

최 종
연구보고서

유산양에서 복제 및 형질전환 체계의 확립
Establishment of Cloning and Transgenic
System in Dairy Goat

연구기관

충남대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “유산양에서 복제 및 형질전환 체계의 확립”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 10 월 일

주관연구기관명: 충남대학교

총괄연구책임자: 진동일

세부연구책임자: 진동일

연 구 원: 최화식

참여 기업 명: 한국메디알(주)

참여 기업 대표: 고상진

요 약 문

I. 제 목

유산양에서 복제 및 형질전환 체계의 확립

II. 연구개발의 목적 및 중요성

최근 유전공학 및 세포공학 기술의 발달에 따라 종래 생체로부터 미량밖에 얻을 수 없었던 인체생리활성물질을 미생물 또는 동물세포주를 숙주로 이용한 생산이 가능하게 되었다. 미생물을 이용한 인체생리활성물질의 대량생산은 숙주로 이용되는 미생물의 단백질 발현 및 합성 기작이 고등동물과 달라 인체 고유의 생리활성물질과 생물활성이 동일한 것을 생산할 수 없으며, 또한 순수 정제가 어려워 의약품으로써의 요건인 품질의 안정성, 동질성이 결여되는 문제가 있다. 한편 동물세포를 숙주로 이용하는 방법은 의약품의 생물활성 측면에서 미생물을 숙주로 이용할 때의 결점을 보강해 줄 수 있어 바람직한 생산 방법으로 기대되고 있으나, 생산 규모를 늘리는 등의 기업화가 곤란하고 배지 비용이 비싸 원가 절감이 어려운 실정이므로 새로운 생산시스템의 개발이 절실히 요청되고 있다. 따라서, 최근 포유동물 개체를 숙주로 이용하는 방법 즉, 형질전환동물(transgenic animal) 생산기법을 이용한 인체생리활성물질을 생산하는 것이 가장 유력한 방법으로 여겨지고 있다. 이러한 생산방법을 동물생체반응기(Animal Bioreactor)라고 부르며, 최근 미국, 영국 및 네델란드의 세계적인 기업연구소에서 상당한 수준까지 연구가 진행되어 산업화를 위한 연구로 발전되고 있는 실정이다. 현재 Bioreactor로서의 개념으로 형질전환가축을 생산하고 실용화하고자 하는 노력이 계속되고 있으나 막대한 비용과 노력에 비해 만족할 만한 성과를 얻지 못하고 있다. 특히 젖소를 이용한 유용물질의 대량생산에 관한 연구는 상당히 집중적으로 이루어지고 있으나 효율적으로 형질전환젖소를 생산하는 체계가 구축되지 못한 이유로

상대적으로 많은 예산을 필요로 하고 있고 아울러 사양 관리면에서도 상당한 시설과 관리가 요구되고 있으며 아직 실용 가능한 업적이 없는 실정이다.

유산양의 평균 착유 기간은 300일이며, 평균 유량은 소 다음으로 많은 약 600-800리터이다. 소의 경우 최초 착유 시까지 약 3년의 시간이 필요하나, 유산양의 경우 약 16-18개월로 상당히 짧은 장점이 있다. 또한 연간 2회 번식이 가능하고 작은 체구로 사양관리가 용이하다. 이러한 유산양의 장점은 형질전환 방법에 의하여 생산되는 치료용 단백질의 수요에 따른 형질전환 동물군의 조절이 용이함을 의미한다.

본 연구에서는 유산양에서 형질전환기법을 이용하여 형질전환유산양 및 복제 유산양을 생산하여 체계적인 유산양의 형질전환개발 체계를 확립하고 고부가가치를 창출할 수 있는 축산의 가능성을 제시하고자 한다. 따라서 본 연구에서는 산양유 사업을 하는 한국메디알(주)과 형질전환 연구의 경험을 갖고 있는 충남대학교가 산학연구를 통해 tPA(tissue plasminogen activator) 유전자를 이용하여 유산양에서 복제 및 형질전환체계를 확립하고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구의 목표인 형질전환 유산양의 생산하기 위해 핵이식복제 방법을 이용하여 실 연구를 수행하고자 하였다. 본 과제의 연구 내용과 범위는 다음과 같다.

1년차

- 1) 유산양용 벡터개발 및 형질전환수정란의 생산과 검정
 - ① 유산양 난자 이용 시스템 확립
 - ② 유용유전자 및 유선세포 특이 프로모터 클로닝
 - ③ 형질전환 유산양용 벡터 개발
 - ④ 유산양 태아세포 및 유전자 도입 세포주 확립
 - ⑤ DNA 미세주입에 의한 유산양 수정란 생산기술 확립

2) 유산양 핵이식복제 및 수정란이식 시스템의 확립

- ① 유산양에서 효과적인 핵이식란 제조방법의 개발
- ② 핵이식란 및 형질전환수정란의 효율적인 이식 시스템 개발
- ③ 복제 유산양 및 형질전환 유산양의 생산 및 관리
- ④ 연구결과의 상호결부에 의한 형질전환동물생산 기술체계의 정립

2년차

1) 형질전환생쥐의 생산 및 유전자 도입 수정란의 생산

- ① Cell line transfection에 의한 유전자도입 세포주 구축
- ② 유전자 주입 유산양 수정란 생산기술 확립
- ③ 형질전환생쥐의 생산 및 유전자 정착분석

2) 핵이식란 및 형질전환수정란의 이식

- ① 핵이식란 및 형질전환수정란의 체외 배양의 최적조건 확립
- ② 핵이식란 및 형질전환수정란의 이식

3년차

1) 형질전환유산양 및 형질전환생쥐의 유전자 분석

- ① 형질전환 유산양의 유전자 분석
- ② 형질전환생쥐의 발현분석

2) 복제 및 형질전환 유산양의 생산 및 관리

- ① 복제 유산양 및 형질전환 유산양의 생산 및 관리
- ② 임신율 증진방안

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

본 연구에서는 실시하고자하는 개발목표를 거의 완료하여 유산양섬유아세포를 이용하여 한 마리의 복제유산양을 생산하였다. 그러나 tPA유전자를 이용한 형질전환복제유산양은 시간적으로 짧았던 관계로 아직 생산하지 못하고 있으나 계속 이식실험 중에 있다. 본연구에서는 유산양의 복제 및 형질전환을 위한 기초작업으로 유전자 클로닝 및 이식유전자구축과 유산양의 세포주 구축 및 미성숙 난자의 성숙조건과 활성화 등에 대한 기술을 확립하였고, 이를 토대로 유산양 섬유아세포를 재래산양 난자에 핵이식하여 생산된 복제수정란을 대리모유산양에 이식하여 복제유산양을 생산하였다. 계속하여 tPA유전자를 transfection시킨 유산양섬유아세포를 핵이식하여 대리모에 이식하는 실험을 수행 중에 있다.

1) 유산양용 유전자 벡터의 구축

A) 유용유전자 및 유전세포 특이 프로모터 클로닝

- tPA 발현 세포주를 이용하여 사람 tPA 유전자 클로닝
- 자아넨종 유산양 β -casein 프로모터 클로닝
- 유산양 β -casein knock-in 용 벡터 구축을 위한 5' 및 3' flanking region 클로닝

B) 형질전환 유산양용 벡터 구축

- 외래유전자 도입 확인을 위한 GFP 발현 벡터 pCX-EGFP-neo 구축
- 유산양 β -casein knock-in 용 기본 벡터 구축 (15kb)
- 사람 tPA가 삽입된 goat β -casein knock-in tPA 벡터 구축 (16.7kb)
- 사람 tPA가 삽입된 미세 주입용 pBC1-tPA 벡터 구축 (22.7kb)

C) 유산양 태아세포 및 세포주 확립

- 유량이 좋은 종모축의 귀 세포주 확립 (자아넨종 2년생 암컷)
- 50일령 태아 세포주 확립 (자아넨종 암컷 및 수컷)

2) 유산양 난자제조 기술의 확립

A) 유산양 난자 이용 시스템 확립

- 도축장 재란산양(흑염소)난소의 이용기술의 확립
- 미성숙 난포란의 체외성숙 및 배양기술의 확립
- 유산양 배란유기 기술의 확립
- 체외수정용 유산양 정액 채취와 동결보존 기술의 확립

B) 유산양에서 효과적인 핵이식란 제조방법의 개발

- 난자의 활성화 기술의 확립
- 귀 세포를 이용한 세포주기 조절 및 융합조건의 확립
- GFP 발현 벡터인 pCX-EGFP-neo의 마우스 세포 및 수정란에서 발현확인
- pCX-EGFP-neo가 도입된 유산양 귀 세포주 확립

3) 형질전환생쥐의 생산 및 유전자 도입 수정란의 생산

- A) 형질전환생쥐의 생산 및 유전자 정착분석
- B) Cell line transfection에 의한 유전자도입 세포주 구축
- C) 유전자 주입 유산양 수정란 생산기술 확립

4) 형질전환유산양 및 형질전환생쥐의 유전자 분석

- A) 형질전환 유산양의 유전자 분석
- B) 형질전환생쥐의 발현분석

5) 핵이식란 및 형질전환수정란의 이식

- A) 핵이식란 및 형질전환수정란의 체외 배양의 최적조건 확립
- B) 핵이식란 및 형질전환수정란의 이식

6) 복제 및 형질전환 유산양의 생산 및 관리

- A) 복제 유산양 및 형질전환 유산양의 생산 및 관리
- B) 임신율 증진방안

2. 활용 방안

본 연구는 세계적으로 유전자 재조합 형질전환동물을 생산하여 인류에 획기적으로 공헌할 수 있는 방안으로 연구가 추진되고 있는 생명공학의 축산적 응용을 위한 형질전환동물의 생산기법에 대한 연구가 추진되고 있으므로 본 기술개발을 모델로 하여 다음과 같은 목적의 연구와 연계시켜 사회·경제적으로 삶의 질을 향상시킬 수 있는 기술을 국내 관련기관에 이전하고자 한다.

- 가. 유전자 재조합에 관련된 연구 및 산업활동분야
- 나. 모든 동물의 난포란의 회수와 이용에 관련된 연구 및 산업활동분야
- 다. 외래유전자를 난자내에 도입하려고 시도하는 모든 연구 분야
- 라. 동물 수정란의 이용효율을 제고하고자 하는 모든 연구 및 산업분야
- 마. 동물 수정란의 이식 성적을 높이기 위해 실시하는 모든 연구 및 산업분야
- 바. 형질전환동물을 생산하고자 하는 모든 연구와 산업분야
- 사. 동물의 특정부위를 형질전환시켜 유용 단백질을 생산하고자 하는 모든 연구와 산업분야
- 아. Animal bioreactor system을 개발하고 bioactive substances를 동물체에서 생산하고자 하는 모든 연구와 산업분야
- 자. 수정란이식을 전담하는 공무원이나 수정란이식사의 교육자료

또한 본 연구의 지속적인 추가 연구를 통해서 기술체계의 확립에 의한 연구를 국내유관기관에 이전하여 공동으로 활용시 국제 경쟁력이 있는 축산업의 산업화가 실현될 수 있을 것이다

SUMMARY

I. Title

Molecular analysis of abnormal Implantation and placenta in cloned bovine and mouse

II. Purpose and Necessity of the Research

Somatic cell nuclear transfer (SCNT) has been used to clone several mammalian species including sheep, cattle, goats, pigs, rabbits, mice, horses, mules, and cats. Several adult somatic cell types, including mammary gland cells, oviduct epithelial cells, cumulus cells, mural granulosa cells, muscle cells, uterine epithelial cells, and fibroblasts were used to produce these clones. However, the overall efficiency for this technique remains low because only limited proportions (0.5 - 5%) of the reconstructed embryos could develop full-term. Optimization of the SCNT procedures would, presumably, directly improve cloning efficacy for production of transgenic animals and other purposes. With the development of gene targeting and cloning technologies by nuclear transfer (NT) from cultured somatic cells, they have been applied to express some foreign proteins in transgenic animals. One of the more promising approaches to the large-scale production of recombinant proteins has been the secretion of proteins into the milk of transgenic mammals. One very promising approach to increasing the efficiency of creating a herd of animal bioreactors with improved recombinant protein expression is through nuclear transfer technology.

With the advent of transgenic technology, the production of valuable human therapeutic proteins in animals was proposed as a high-quantity, low-cost alternative to the use of chemical synthesis, or microbial and mammalian cell culture expression

systems. There is predicted to be a worldwide shortage of production capacity in the next few years, as a result of the increasing number of human-protein therapeutics under development. Many pharmaceutical proteins are currently produced in microbial fermentors because they can be grown easily at any scale, but bacteria and yeasts cannot perform the posttranslational modifications that are required for the full biological activity of some human therapeutic proteins. Many potential therapeutic proteins require specific posttranslational glycosylation modifications that occur in vivo for their activity. Mammalian cell bioreactors can perform complex posttranslational modifications but are expensive, both in set up and running costs. In addition to the absolute requirement for specific glycosylations for the function of some therapeutic proteins, proteins that are normally glycosylated might have shorter half-lives in the blood and could be antigenic or immunogenic if not correctly modified. Most research and development has been focused on protein production in milk or eggs, although blood, urine and seminal plasma are also being considered as routes for the expression and collection of pharmaceutical proteins.

A variety of human proteins have been expressed in the milk of several species of animals, including insulin-like growth factor 1 in rabbits, α 1-antitrypsin in sheep, antithrombin III in goats, α -lactalbumin in cows and protein C in pigs. Although the concept of transgenic animal bioreactors has been under development for nearly 20 years, the first advanced clinical trials are only now underway. The enzyme α -glucosidase from the milk of transgenic rabbits has been successfully used for the treatment of Pompe's disease in infants. Several biotechnology companies are developing protein therapeutics produced in milk. GTC Biotherapeutics, Inc. (<http://www.transgenics.com>) is at the most advanced stage of product development, with recombinant antithrombin III undergoing review for market authorisation in Europe for the treatment of hereditary antithrombin deficiency. Recombinant C1 inhibitor for the treatment of hereditary angioedema, produced in transgenic rabbit milk, is in phase II and III clinical trials by Pharming Group N.V. (<http://www.pharming.com>).

Tissue plasminogen activator (t-PA) is a 70 kDa serine protease which plays a central role in the fibrinolytic system to disrupt life threatening clots that can form in the vasculature. Currently, t-PA is the “gold standard” of thrombolytic therapy, and is primarily used in the treatment of acute myocardial infarction.

Goat has a value as a important agricultural animal to provide meat, wool and fur and a laboratory animal in the field of medicine and basic sciences. However, the biotechniques such as transgenesis and nuclear transplantation in goat is not well established yet for application to improvement of economic trait or experimental purpose. Present obstacle for the utility of transgenic technology in rabbit is the low efficiency of transgenic cloned goat production resulted in improper conditions of gene transfer and unsettled procedures for embryo manipulation. The increase in efficiency of transgenic cloned rabbit production would allow to apply transgenic technique to animal biotechnology industry.

This project was designed to develop the efficient system of transgenic cloned goat production by establishment of nuclear transfer and human tPA gene fused to β -casein promoter as transgenes for this study. As this project progresses, techniques for the production of transgenic cloned goats will be established and efficiency of transgenic goat production will be improved to provide transgenic technology for biotechnology industry and other applied research fields.

III. The contents of the Research

The goal of this research is to establish transgenic cloning system in dairy goats. To achieve this goal, the contents of this project are as follows;

1. Development of expression vectors for dairy goats and production of transgenic

cloned embryo

- 1) Establishment of IVM and IVF of goat oocytes
 - ① Oocyte production of Korean native goat ovaries derived from slaughter house
 - ② Establishment of IVM of Korean native goat oocytes
 - ③ Establishment of IVF of Korean native goat oocytes
 - ④ Freezing storage of goat semen for the IVF
- 2) Cloning of human tPA gene and mammary gland-specific promoter sequences
 - ① Cloning of human tPA gene from human fetal lung cell lines
 - ② Cloning of goat β -casein promoter sequence
 - ③ Construction of knock-in vector using goat β -casein promoter sequence
- 3) Development of tPA-expression vector for the production of transgenic cloned goats
 - ① Construction of pCX-EGFP-Neo^r for the analysis of transgene expression in somatic cells and cloned embryos
 - ② Construction of β -casein promoter-tPA transgene
- 4) Transfection of expression vector into goat fetal fibroblast cells
 - ① Establishment of goat fetal fibroblast cell lines
 - ② Transfection of pCX-EGFP-neo and β -casein promoter-tPA transgene into fetal fibroblast cells
 - ③ Selection and analysis of cells containing transgenes.
 - ④ Production and analysis of transgenic mice containing β -casein promoter-tPA transgene
- 5) DNA microinjection of transgene into goat zygotes
 - ① DNA microinjection of β -casein promoter-tPA transgene into goat zygotes
 - ② Transfer of the microinjected embryos into recipients

2. Development of nuclear transfer and embryo transfer technologies in dairy goat

- 1) Establishment of efficient nuclear transfer methods in dairy goat
 - ① Establishment of proper IVM methods for goat oocytes
 - ② Establishment of activation methods for goat oocytes
 - ③ Establishment of fusion condition for reconstituted embryo
 - ④ Analysis of GFP expression in reconstituted embryos
- 2) Development of efficient embryo transfer methods for transgenic cloned embryos
 - ① Establishment of synchronization method for goat recipients
 - ② Analysis of estrus and ovulation in synchronized recipients
- 3) Production of cloned and transgenic dairy goats
 - ① Establishment of in vitro culture conditions for the reconstituted embryos
 - ② Analysis of transgene integration in reconstituted embryos
 - ③ Transfer of reconstituted embryos into oviducts of recipients
- 4) Establishment of cooperative technological system for the production of transgenic cloned animals
 - ① Management of cloned offsprings during the delivery
 - ② Analysis of problems for the low efficiency of cloning procedures

IV. Research Results

To establish efficient somatic nuclear transfer technology for dairy goat, construction of transgenes, transfection into goat fetal fibroblast cells, production of reconstituted embryos and transfer of reconstituted embryos into recipients were performed in this study. Finally one cloned dairy goat was produced using Korean native goat oocyte with dairy goat fetal fibroblast cells. Results of this study are as follows;

1. Transgene and expression vectors for dairy goat

1) Cloning of human tPA gene from human fetal lung cell lines by RT-PCR

Human tPA cDNA was cloned by RT-PCR with mRNA of human fetal lung cell line.

2) Cloning of goat β -casein promoter sequence

Goat β -casein promoter sequence (3 kb) was cloned by PCR with Saanen genomic DNA and confirmed by sequencing.

3) Cloning of 5' and 3' flanking sequences of goat β -casein promoter region for knock-in vector construction

Primers deduced from previously reported goat β -casein promoter sequence and exon 1 sequence were used for cloning of 5' flanking region and primers from exon 3 and exon 7 were used for cloning of 3' flanking region. PCR with genomic DNA was used for cloning these flanking regions.

4) Construction of transgene for transgenic goat

Firstly to analyze integration expression of foreign gene in cell and embryo, pCX-EGFP was linked with Neo^r gene. Secondly human tPA cDNA was ligated to pBC1(goat β -casein promoter) for the transgenic mouse and goat production. Thirdly using 5' promoter flanking DNA and 3' exon flanking DNA, knock-in vector was constructed with tPA cDNA.

5) Establishment of goat fetal fibroblast cell lines

Saanen fetal fibroblast cells were established using day 50 fetuses, sexed by PCR and stored in liquid nitrogen.

2. Establishment of IVM and IVF of goat oocytes

1) Establishment of IVM of Korean native goat oocytes

Korean native goat ovaries delivered from slaughter house were used for oocyte source of nuclear transfer of dairy goat cells. For IVM of Korean native goat oocytes. TCM199 containing 10% FBS, 5 ug/ml FSH, 10 ug/ml

LH and 10 ug/ml estrogen was used.

2) Establishment of IVF of Korean native goat oocytes

Matued oocytes were fertilized with capacitated goat sperm and then cultured in vitro. About 50% of fertilized embryos developed to morula/balstocyst stage.

4) Freezing storage of goat semen for the IVF

For continuous supply of goat semen, good quality of semen in fall season were collected and frozen.

3. Establishment of efficient nuclear transfer methods in dairy goat

1) Establishment of activation methods for goat oocytes

Activation condition was established by performing experiments of parthenogenetic development.

2) Establishment of fusion condition for reconstituted embryo

Fusion condition and donor cell cycle were tested following reconstituted embryos.

3) Analysis of GFP expression in reconstituted embryos

pCX-EGFP gene were transfected into fetal firobalst cells and fetal fibroblast cells expressing GFP were selected. Subsequently those cells were used for nuclear transfer. Reconstituted embryos were analyzed for the expression of GFP.

4. Production of trangenic mice containing human tPA gene

1) Production and analysis of trangenic mice containing human tPA gene

Transgenic mice (5 lines) were produced by microinjection of β -casein promoter-tPA transgene into zygotes. F₁ and F₂ female transgenic mice were bred to obtain milk following parturition.

2) Analysis of trangenic mice

Western blot analysis was carried out to detect secretion of human tPA protein in the transgenic milk using anti-tPA antibody. Milligram level of human tPA protein per one liter milk was secreted from transgenic mammary gland.

5. Transfection of transgene into fetal fibroblast cells
 - 1) Transfection of EGFP gene into fetal fibroblast cells

pCX-EGFP-Neo^r gene was transfected into goat fetal fibroblast cells and neomycin selection was carried out to select cells containing pCX-EGFP-Neo^r gene
 - 2) Transfection of EGFP gene into fetal fibroblast cells

β-casein_{promoter}-human tPA cDNA transgene and PGC-Neo^r gene were co-transfected into goat fetal fibroblast cells and cells containing transgene was selected through neomycin resistance.
6. Development of efficient embryo transfer methods for transgenic cloned embryos
 - 1) Establishment of synchronization method for goat recipients

For the synchronization of recipients, CIDR and PGF_{2α}-treatment experiment was performed to establish appropriate synchronization method.
 - 2) Analysis of estrus and ovulation in synchronized recipients

Following synchronization, recipients were analyzed to examine occurrence of estrus and ovulation.
7. Production of cloned and transgenic dairy goats
 - 1) Establishment of in vitro culture conditions for the reconstituted embryos

Following nuclear transfer of fetal fibroblast cells into Korean native goat oocytes, development of reconstituted embryos in vitro was evaluated. About 20% of those embryos developed upto morula/blastocyst stage.
 - 2) Analysis of transgene integration in reconstituted embryos

Following nuclear transfer of fetal fibroblast cells containing EGFP gene and tPA gene into oocytes, reconstituted embryos was analyzed to detect transgene integration.
 - 3) Transfer of reconstituted embryos into oviducts of recipients

Reconstituted embryos were surgically transferred into oviducts of synchronized recipients. Following transfer, ultrasound-pregnancy test was

carried out at day 50.

4) Production of cloned dairy goat

One cloned fetus was successfully produced by nuclear transfer of dairy goat fetal fibroblast cells into Korean native goat oocytes and embryo transfer into CIDR-induced recipient.

5) Analysis of genotype of cloned goat

Genotype of cloned goat was analyzed by PCR single stranded polymorphism of goat major histocompatibility complex class II DRB gene locus. The genotype of cloned goat was matched to original fetal fibroblast cell.

6) Transfer of reconstituted embryos with cells containing β -casein_{promoter}-human tPA cDNA transgene into synchronized recipients

A total of 422 reconstituted embryos containing β -casein_{promoter}-human tPA transgene were transferred into oviducts of 25 synchronized recipients. Eleven recipients were identified not to be pregnant and nine recipients were not delivered. Others are waiting to term.

V. Implementation and Application

These experiments showed that successful nuclear transfer techniques was established and foreign gene could be incorporated into goats through nuclear transfer of fetal fibroblast cells transfected with transgene. These results will be applied to the improvement of bioreactor system using dairy goats and efficient production of valuable pharmaceuticals into the mammary glands of transgenic goats. Also, a variety of genetic modifications can be possible such as gene knock-in and knock-out for the very elegant gene regulation in transgenic animals. More production and further study of transgenic goats will potentiate to

try their commercialization into animal biotechnology industry.

CONTENTS

Chapter 1. Overview of Project-----	1
Section 1. Necessity of the project -----	1
1. Technical aspect -----	1
2. Economical and industrial aspect -----	5
3. Social and cultural aspect -----	8
Section 2. Objectives and Cotents of the Project -----	10
1. Overall objectives -----	10
1. Yearly contents & scopes of the project -----	11
Chapter 2. Current status of the technology -----	16
1. International and domestic status -----	16
2. Future outlook -----	18
Chapter 3. Research contents and results -----	20
Section 1. Introduction -----	20
Section 2. Materials and Methods -----	22
Section 3. Results and Discussion -----	29
Section 4.. Conclusion -----	64
Chapter 4. Research achievements and contribution -----	66
Chapter 5. Applications of results -----	72
Chapter 6. Scientific informations collected -----	73
Chapter 7. References -----	75

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	1
제1절	연구개발의 필요성	1
1.	기술적 측면	1
2.	경제·산업적 측면	5
3.	사회·문화적 측면	8
제 2 절	연구개발 내용 및 범위	10
1.	연구개발 목표와 내용	10
2.	연차별 연구개발 목표와 내용	11
제 2 장	국내외 기술개발 현황	16
제 1 절	국내외 관련기술의 현황	16
제 2 절	앞으로의 전망	19
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	20
제 1 절	서설	20
제 2 절	연구재료 및 방법	22
제 3 절	연구결과 및 고찰	29
제 4 절	결론	64
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	66
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	72
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	73
제 7장	참고문헌	75

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

가. 동물생체반응기(Animal bioreactor)의 필요성

최근 유전공학 및 세포공학 기술의 발달에 따라 종래 생체로부터 미량밖에 얻을 수 없었던 인체생리활성물질을 미생물 또는 동물세포주를 숙주로 이용한 생산이 가능하게 되었다. 그러나, 미생물을 이용한 인체생리활성물질의 대량생산은 숙주로 이용되는 미생물의 단백질 발현 및 합성 기작이 고등동물과 달라 인체 고유의 생리활성물질과 생물활성이 동일한 것을 생산할 수 없으며, 또한 순수 정제가 어려워 의약품으로써의 요건인 품질의 안정성, 동질성이 결여되는 문제가 있다. 한편 동물세포를 숙주로 이용하는 방법은 의약품의 생물활성 측면에서 미생물을 숙주로 이용할 때의 결점을 보강해 줄 수 있어 바람직한 생산 방법으로 기대되고 있으나, 생산 규모를 늘리는 등의 기업화가 곤란하고 배지 비용이 비싸 원가 절감이 어려운 실정 이므로 새로운 생산시스템의 개발이 절실히 요청되고 있다(표 1. 참조).

표 1. 인체생리활성물질 생산을 위한 제조 방법

Method of production	Transgenics	Blood fractionatin	Fermentation	Cell culture
Secretion level(g/l)	1 to 30	Product-specific	1 to 30	0.1 to 0.8
Product complexity	Wide ranging	All blood protein	No human glycosylation	Wide ranging
Ease of scale-up	Straightforward	Straightforward	Complex	Very complex
Feedstock/media	Renewable	Limited supply	Defined	Defined and expensive

따라서, 최근 포유동물 개체를 숙주로 이용하는 방법 즉, 형질전환동물 (transgenic animal) 생산기법을 이용한 인체생리활성물질을 생산하는 것이 가장 유력한 방법으로 여겨지고 있다. 이러한 생산방법을 동물생체반응기(Animal Bioreactor)라고 부르며, 최근 미국, 영국 및 네델란드의 세계적인 기업연구소에서 상당한 수준까지 연구가 진행되어 산업화를 위한 연구로 발전되고 있는 실정이다. 이와같은 Animal Bioreactor 시스템이 갖는 가장 큰 특징은 첫째로, 대량생산이 가능한 잠재력을 갖추고 있다는 점이다. 특정 조절프로모터 유전자를 이용하여 유즙이나 오줌에서 유용단백질을 생산할 수 있다. 둘째로, 생산원가가 낮다는 점이다. 즉 기존의 목장시스템을 그대로 이용할 수 있으므로 별도의 생산설비가 필요치 않기 때문에 생산설비를 절감할 수 있다. 셋째로, 단백질의 post-translational modification이 가능하다는 점이다. 미생물을 숙주로 사용하는 Bioreactor system에서 기대할 수 없는 glycosylation, gammacarboxylation이 일어나고 있어, 제품의 품질을 향상시킬 수 있다. 넷째로, 영속적인 Bioreactor라는 점이다. 일단 유전자 이식에 의해 고생산성의 개체를 얻을 수 있게 되면, 이들 외래 유전자가 멘델의 유전 법칙에 따라 안정하게 자손에게 유전되기 때문에 생산에 큰 변동 없이 안정된 공급을 할 수 있다.

특히 젖소의 우유에서 생리활성물질을 대량으로 생산하고자 하는 연구가 진행되고 있으나 상당한 비용이 들고 세대간격이 길어 실용화에 상당한 기간이 소요되는 등 문제점을 갖고 있다.

나. 유산양을 이용한 유전자 이식기술 확립의 필요성

수많은 종류의 동물들이 제조합 단백질을 생산하기 위하여 형질전환 연구에 사용되고 있다. 외래 유전자의 발현을 위하여 사용되는 동물의 선택은 필요한 단백질의 양뿐만 아니라 번식적 효율 등의 특징들에 의하여 결정된다. 생쥐의 경우 형질전환군(founder)을 형성하기 전 제조합 벡터의 효율적인 발현을 위한 최적화가 가능하나, 매우 한정된 생쥐의 우유 생산량은 mg 수준의 제조합 단백질의 생산에 부적합하다. 표 2에서와 같이 젖소가 우유생산량에서는 최고이지만 성성숙일령, 임신기간, 산자수, 형질전환율 및 사양관리 측면을 고려하면 Animal Bioreactor로서 적

합하지만은 않다.

표 2. 우유에서 재조합 단백질의 발현을 위해 일반적으로 사용되는 동물의 번식 및 비유평특징

종 류	성숙속 기간 (월)	임신기간 (월)	평 균 산자수	총산자수당 형질전환비율(%)	연간 산유량(ℓ)
생 쥐	1	0.75	10	10-25	0.0015
토 끼	6	1	8	5-15	1.5
돼 지	8	4	9	5-15	120
면 양	8	5	2	3-5	300-400
유산양	8	5	2	3-5	600-800
젓 소	15	9	1	0.-3	10,000

유산양의 평균 착유 기간은 300일이며, 평균 유량은 소 다음으로 많은 약 600-800리터이다. 소의 경우 최초 착유 시까지 약 3년의 시간이 필요하나, 유산양의 경우 약 16-18개월로 상당히 짧은 장점이 있다. 또한 연간 2회 번식이 가능하고 작은 체구로 사양관리가 용이하다. 이러한 유산양의 장점은 형질전환 방법에 의하여 생산되는 치료용 단백질의 수요에 따른 형질전환 동물군의 조절이 용이함을 의미한다. 또한 유산양에서 광우병(scrapie)의 발생율이 상당히 낮은 장점도 있다.

한국에 유산양이 본격적으로 도입된 시기는 1994년 강원도 홍천인데 현재는 호주, 뉴질랜드 등에서 알파인, 토젠부르그, 자아넨 등의 유용종을 중심으로 수입이 진행되어 국내에 유산양이 약 4,000두 정도가 사육되고 있다. 대부분이 자아넨종이고, 충청북도 옥천, 영동이 새로운 유산양의 사육중심지로 부각되고 있다. 현재 우유 알레르기에 의한 부작용이 증가하면서, 다른 대체 유제품에 대한 요구 증가와

더불어 유산양의 사육 규모가 점점 늘어나고 있다. 본 연구의 협동기관인 한국메디알(주)이 전국 유산양 사육두수의 약 80%(약 3500두)를 소유하고 있는 장점을 연구의 효율성 및 산업화에 적극 활용하고자 한다.

따라서, 본 연구에서는 유산양을 이용하여 DNA 미세주입방법 및 핵이식 방법의 보다 적합한 조건 등을 확립하고 인체생리활성물질을 생산하는 형질전환된 유산양을 생산함으로써 형질전환동물 생산기술의 실용화 및 산업적인 기술로 정착시켜 축산업의 국제경쟁력을 향상시키고 농가소득의 증진을 도모할 것이다.

다. 유전자의 개발과 cloning

유전자 조작에 의한 형질전환동물의 생산은 단기간 내에 목적하는 능력의 가축을 생산할 수 있다는 점에서 획기적인 방법이다. 현재 이러한 장점을 살리기 위하여 가축에 도입되고 있는 유전자는 주로 가축의 성장과 육질, 유량·유질, 질병저항성, 사료효율, 각종 유용한 생리활성물질의 생산에 관한 유전자들로서 이러한 유전자를 다수 개발하고 cloning하여 장기간 보존할 수 있는 기술의 개발이 절실히 필요하다. 그러나 실제 이용 가능한 유용유전자가 많이 밝혀져 있지 않았을 뿐더러, 알려진 유전자를 이용하여 형질전환동물을 만들었다하더라도 실제 그 유전자가 발현함으로써 발생하는 체내의 생리적인 효과에 대해서 정확하게 예측할 수가 없다. 그러므로 축산분야에서 유전자 이식을 실용화하기 위해서는 형질전환가축을 생산하는 효율을 증가시키는 방법을 개발해야 하고, 실지 이용 가능한 유전자들을 찾아내어 그 유용성을 밝혀야 한다.

라. 형질전환된 수정란의 이식과 형질전환동물의 생산

농장조건에서 형질전환가축의 생산율은 국내·외를 막론하고 1%이하로 매우 낮다. 이러한 낮은 생산성은 형질전환가축기술의 산업화에 큰 걸림돌이 되고 있다. 따라서 형질전환동물의 생산효율을 높일 수 있는 이식에 관련된 제반 조건의 정립, 과학적인 생물공학방법의 개발, 임신율 향상방법, 임신축의 사양관리법, 산자의 사양관리법 등이 연구 검토되어야 한다.

2. 경제·산업적 측면

앞으로 생명공학기술은 소위 「제4의 물결」을 주도할 것으로 여겨진다. 왜냐하면, 생명공학기술은 의료·약품, 농업, 에너지, 환경, 해양 등 무한한 응용이 가능한 동시다발적인 급진적 연구개발이 가능하기 때문이다. 따라서 2000년 현재 약 540억 불의 세계시장이 2013년경 2,100억불 수준으로 성장할 것으로 예측됨에 따라 정보기술을 대신할 경제성장의 새로운 엔진으로 등장할 것으로 많은 경제학자들은 예견하고 있다. 또한 저명한 타임지와 비즈니스위크지등은 향후 100년은 ‘바이오테크의 시대’로 전세계 4,000여개 연구기관이 현재 「유전자 전쟁」중이라고 보도하고 있다. 그러므로, 체계적인 생명공학기술의 개발 및 산업화가 향후 국가경제를 가름할 주요한 과제가 되고 있다.

가. 형질전환 유산양을 이용한 인체생리활성물질 생산 기술의 유용성

현재 선진국의 여러 기업들과 연구소들은 미래시장의 주도권을 장악하기 위하여 막대한 인력과 연구비를 투자하고 있다. 예를 들어, 미국의 Collagen사는 Genpharming International사와 공동으로 우유로 collagen을 대량생산하는 형질전환 젖소 개발에 1995년에만 160만 달러의 연구비를 투자하였고, 최근 미국의 Genzyme Transgenics사는 형질전환산양개발의 수탁생산을 하기에 이르렀다.(표 3. 참조) 따라서, 국내 축산업의 보호 및 국제 경쟁력을 제고시키기 위하여 형질전환산양개발 연구는 반드시 수행되어야만 한다.

생명공학기술은 오래 전부터 개발되어 왔으나, 1980년대를 기점으로 분자생물학의 발달과 더불어 가시적인 결실을 맺기 시작하였다. 예로서 1982년 유전자 재조합 기술에 의한 사람 인슐린의 시판이 인가된 이래 사람성장호르몬, 각종 인터페론, 간염백신과 여러 가지 혈전치료제가 유전공학기법에 의해 생산·시판되어 오고 있다. 이들 주요한 생리활성물질의 세계적 시장성은 다음의 표 4에서 보는 바와 같다

표 3. 형질전환동물 관련 시장성

제품명	시장규모	개발기업	주요개발내용
형질전환동물에서 생산된 의약품	4,800억원/2000	DNX	-형질전환돼지(ProteinC)
		Genpharm International	-형질전환젖소(Lactoferrin)
		Genzyme	-형질전환산양(AAT,ATIII)
장기이식용 형질 전환동물	약8,000억원/년간	Imutran	-사람보체를 발현하는 형질전 환돼지
		Nextran	-형질전환동물 개발 연구중
		Alexion	-형질전환돼지 개발 계획중

(자료 : 일경 바이오텍 '94)

표 4. 중요한 인체생리활성물질의 시장성 및 용도

(단위 : 백만\$)

항 목	년간필요량	금 액	용 도
Lactoferrin	-	5,000	·조제분유 ·HIV 환자, 화학요법 환자에 투여
AAT	12,000kg	100	·폐혈증 치료제
AT-III	-	300	·혈전용해제
tPA	-	180	·혈전증 치료제
EPO	-	600	·조혈효소촉진제
Insulin	-	325	·당뇨병 치료제
Vaccines	-	125	·질병예방제

따라서, 동물생체반응기 개발에 관한 연구는 산업화 가능성이 매우 높고 유용 물질의 생산비용이 저렴하기 때문에 선진국에서는 이 분야 연구에 집중적으로 투자하고 있는 실정이다. 실제로 혈전용해제인 tissue plasminogen activator(tPA)의 경우, 동물생체반응기로 생산하였을 경우가 미생물이나 동물세포보다 훨씬 경제적인 것으로 평가되고 있다(표 5. 참조).

표 5. 각각의 생체반응기별 경제성 비교 (tPA 생산의 예)

구 분	CHO	E. Coli	Milk
생산량(mg/l)	33.5	460	100
시설비 및 투자비용	\$ 61M	\$ 389M	\$ 3.3M
년간 운영비	\$ 117M	\$ 242.3	\$ 0.51M
년간 생산량(kg)	11.4	11.6	51
g 당 생산비	\$ 10,207	\$ 20,912	\$ 10

나. 국내 유산양 사육 농가의 수익성

국내의 유산양 농가의 수는 2001년말 기준으로 27호이며 총 사육두수는 4,000여두로 이중 18호 3,500여두에서 생산되는 산양유를 한국메디알에서 가공판매하고 있다. 최근 우유알레르기에 의한 부작용이 증가하고, 자연방목 방법에 의한 유산양 사육 그리고 기능성 발효유 등의 개발에 의한 업체의 차별화된 마케팅 등에 힘입어 산양유 시장의 급성장과 함께 유산양 사육농가의 수익도 극대화되고 있다. 예를 들어, 사육두수가 약 200두이고 착유두수가 150두인 경우 그 수익률이 매출액의 약

40%에 육박하고 있다(표 6 참조). 그러므로 형질전환유산양의 생산은 모유유제품, 의약품생산 등 고부가가치 창출뿐만 아니라 유산양 사육농가의 사육규모 증가 및 수익률의 극대화 효과를 가져다 줄 것으로 기대된다.

표 6. 유산양 사육 · 착유두수에 따른 사육농가의 수익성 분석

(단위 : 천원)

착유두수	50	100	150	200
사육두수	75	150	225	300
매 출 액	85,956.25	171,912.5	257,868.75	343,825
순 이 익	16,038	54,353	101,668	148,984
순이익률(%)	19	32	39	48

3. 사회 · 문화적 측면

최근 선진국을 비롯한 세계 각국에서는 앞으로 생명공학시대의 도래에 따른 유전자원 및 지적 재산권 확보를 위하여 치열하게 경쟁하고 있다. 따라서 본 연구에서 수행하고자 하는 생명공학기법을 이용한 형질전환동물의 생산은 우루과이라운드 등에 의해 어려운 상황에 놓여 있는 우리나라 농업의 경쟁력을 강화시키는데 기여할 수 있다. 또한, 형질전환동물기법을 이용하여 인체생리활성물질을 아주 저렴한 가격으로 대량생산이 가능하게 된다면 각종 질병으로 고생하는 많은 환자의 질병을 치료할 수 있으므로 인류의 복지증진에 이바지할 수 있을 것이다. 이러한 시도가 성공을 거둔다면 농업분야에서도 세계첨단을 다투는 성과를 거두었다는 사회적인 패거를 이룰 수 있을 뿐만 아니라, 첨단기술을 가축생산에 응용함으로써 농업의 지위를 향상시키고 아울러 첨단산업으로서 농업의 중요성을 인식시킴으로써 농업에 지속적인 투자를 유발할 수 있을 것이다.

또한, 유전자이식 기술을 이용하여 실질적인 가축의 개량을 이룩함으로써 농업 교육의 첨단화와 그에 따른 고급인력의 유치가 가능하며, 특히 기초분야의 전공자들과의 교류에 통하여 응용효과가 큰 농업분야에 이바지 할 수 있는 기회를 마련할 수 있을 것으로 여겨진다.

제 2 절 연구개발 내용 및 범위

1. 연구개발 목표와 내용

가. 최종목표

본 연구에서 추구하는 최종목표는 유선을 통하여 tPA를 분비하는 형질전환유산양을 생산하는 것이다.

나. 연구개발 내용

본 연구의 목표인 형질전환 유산양의 생산하기 위해 기존의 DNA 미세주입법과 핵이식복제 방법을 함께 이용하여 실패요인을 최소화하면서 연구를 수행하고자 한다. 본 과제의 연구 내용은 다음과 같다.

1) 유산양용 벡터개발 및 형질전환수정란의 생산과 검정

- ① 유산양 난자 이용 시스템 확립
- ② 유용유전자 및 유선세포 특이 프로모터 클로닝
- ③ 형질전환 유산양용 벡터 개발
- ④ 유산양 태아세포 및 유전자 도입 세포주 확립
- ⑤ DNA 미세주입에 의한 유산양 수정란 생산기술 확립

2) 유산양 핵이식복제 및 수정란이식 시스템의 확립

- ① 유산양에서 효과적인 핵이식란 제조방법의 개발
- ② 핵이식란 및 형질전환수정란의 효율적인 이식 시스템 개발
- ③ 복제 유산양 및 형질전환 유산양의 생산 및 관리
- ④ 연구결과의 상호결부에 의한 형질전환동물생산 기술체계의 정립

2. 연차별 연구개발 목표와 내용

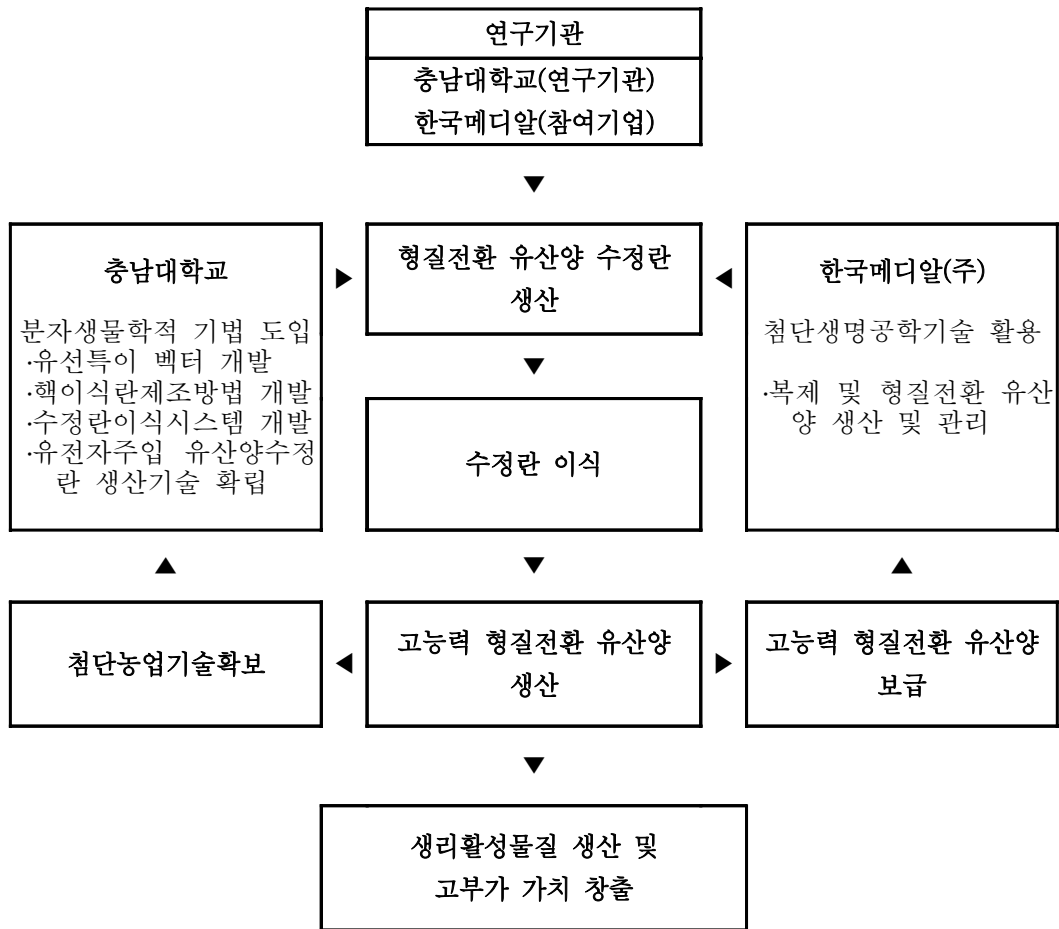
구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2002)	<p>1. 유산양용 유전자 벡터의 구축</p> <p>1. 유용유전자 및 유선세포 특이 프로모터 클로닝</p> <p>2. 형질전환 유산양용 벡터 구축</p> <p>3. 유산양 태아세포 및 세포주 확립</p> <p>2. 유산양 난자제조 기술의 확립</p> <p>1. 유산양 난자 이용 시스템 확립</p> <p>2. 유산양에서 효과적인 핵이식란 제조방법의 개발</p>	<p>- tPA 유전자 클로닝</p> <p>- 유산양 β-casein 프로모터 클로닝</p> <p>- β-casein-tPA gene construction</p> <p>- neo gene 삽입</p> <p>- 종모축의 체세포 확보</p> <p>- 태아 stage별 세포주 확립</p> <p>- 흑염소와 유산양 체란 시스템 확립</p> <p>- 미성숙 난포란의 체외성숙 및 배양기술 확립</p> <p>- 유산양 과배란 유기 및 체란 기술의 확립</p> <p>- 공여세포의 세포주기 조절 및 융합조건의 확립</p> <p>- 수핵난자의 탈핵기술 및 활성화 조건 확립</p> <p>- 외래 유전자가 도입된 핵이식란의 체외발달 연구</p>

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 (2003)	<p>1. 형질전환생쥐의 생산 및 유전자 도입 수정란의 생산</p> <p>1. Cell line transfection에 의한 유전자도입 세포주 구축</p> <p>2. 유전자 주입 유산양 수정란 생산기술 확립</p> <p>3. 형질전환생쥐의 생산 및 유전자 정착분석</p> <p>2. 핵이식란 및 형질전환수정란의 이식</p> <p>1. 핵이식란 및 형질전환수정란의 체외 배양의 최적조건 확립</p> <p>2. 핵이식란 및 형질전환수정란의 이식</p>	<p>- cell transfection 후 DNA 검사</p> <p>- drug selection에 의한 세포주 확립</p> <p>- tPA 유전자의 미세주입방법의 개발</p> <p>- 유전자 이식적기 및 주입 후 생존율 검사</p> <p>- 이식 유전자 정착율 검사</p> <p>- 형질전환생쥐의 생산 및 유전자 분석</p> <p>·Southern/PCR을 이용한 유전자 분석</p> <p>- 난구세포, 난관상피세포 및 태아간세포를 이용하여 체외 수정란 및 핵이식란의 최적배양 조건 확립</p> <p>- 여러 가지 factor 첨가에 따른 체외수정란 및 핵이식란의 최적 배양조건 확립</p> <p>- 대리모의 선발</p> <p>- 효율적인 발정동기화 방법 연구</p> <p>- 이식 조건과 이식 방법에 따른 수태율 조사</p> <p>·수정란의 이식 부위별 수태율 비교</p> <p>·초음파 진단법에 의한 임신진단</p>

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3차 년도 (2004)	<p>1. 형질전환유산양 및 형질전환 생쥐의 유전자 분석</p> <p>1. 형질전환 유산양의 유전자 분석</p> <p>2. 형질전환생쥐의 발현분석</p> <p>2. 복제 및 형질전환 유산양의 생산 및 관리</p> <p>1. 복제 유산양 및 형질전환 유산양의 생산 및 관리</p> <p>2. 임신율 증진방안</p>	<p>- 형질전환 유산양의 DNA 분석 ·Southern/PCR에 의한 DNA 분석</p> <p>- 형질전환생쥐의 발현분석 ·Northern Blotting에 의한 발현분석 ·Westen Blotting에 의한 발현분석</p> <p>- 임신유지 및 분만을 증가 방안 확립 - 유산 및 사산에 대한 원인과 대책 연구</p> <p>- 이식방법의 개선을 통한 착상율 및 임신율 향상</p>

3. 연구개발 방법 및 실계

연구 접근 방법



본 연구는 tPA 유전자를 이용하여 형질전환 유산양을 생산하는 것을 목표로 하여 형질전환기술을 가진 충남대학교 진동일 교수팀과 다년간 유산양유를 시판하고 있고 유산양 수정란이식 등 기초적인 연구가 이루어지고 있는 벤처기업 한국메디알이 참여 기업으로 추진함으로써 실질적으로 연구업적이 이루어질 것이고 현재 충남대학교 교

내에 약 300평 규모의 유산양 전용사육장 및 수술실을 확보하고 있어 주관기관에서
형질전환수정란의 생산 및 이식이 이루어 질 예정이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 관련기술의 현황

동물의 유전자를 인위적으로 조작하여 인류가 이용할 수 있게 된 것은 금세기 최대의 과학적 업적중의 하나로 간주된다. 특히 1982년 Palmiter등에 의해 인위적으로 성장이 촉진된 거대동물이 생산됨으로써, 유전자 재조합 기술은 새로운 미래지향적 생명과학기술로서 각광을 받게 되었다(Watson 등, 1992; FAO 보고서, 1989). 1988년대에는 포유동물의 수정란에 재조합 외래유전자를 미세주입하여 우유에서 고가의 의료단백질을 생산하는 형질전환동물(transgenic animal)을 생산한 이래, 이 기술이 다수의 가축에 적용됨으로서 산업화의 가능성을 열어주었다(Hammer 등, 1985; First와 Haseltine, 1991; Pedersen 등, 1991; Hall 등, 1991). 특히, 형질전환 면양과 산양이 이 분야에 이용되고 있는데 이들 가축의 젖으로부터 값비싼 혈액응고 factor 등의 생산이 시도되고 있다(Clark 등, 1989; Wright 등, 1991). 포유동물에 있어서 이와 같은 transgenic technology의 목적은 인류가 이용하고 있는 동물의 생산 기능을 생물공학적인 기법에 의해 극대화시키는 것으로 그 산업화의 가능성이 기대하여 세계적으로 정부차원에서 이 기술의 산업화를 촉진시키려는 연구가 활발히 진행되고 있다.

형질전환동물 생산에 관련된 연구사례는 세계적으로 매우 많이 보고되어 있으나 여기에서는 본 연구에서 수행하고자 하는 연구내용과 관련된 연구항목별 국내외의 연구개발 실적을 요약하였다.

가. 국외의 경우

- Gordon 등(1980)이 외래유전자를 수정란에 미세주입하여 최초의 형질전환 생쥐를 생산하는데 성공함.
- Palmitere 등(1982, 1983)은 각각 사람과 흰쥐 성장호르몬 유전자가 발현되는 형

- 질 전환 생쥐를 개발하였는데, “수퍼마우스”로 명명될 만큼 성장속도가 정상보다 약 2배 정도 빠른 실험동물을 개발함으로써 형질전환동물 생산기법의 산업적 응용 가능성을 제시함.
- Harmmer 등(1985)은 형질전환 기법을 가축에 적용할 목적으로 토끼, 돼지, 및 면양의 수정란내에 외래유전자 미세주입 기술을 확립함.
 - Gordon 등(1987)이 고가의 인체 약으로 사용되고 있는 plasminogen activator를 생쥐의 유즙에서 분비하게 하는데 성공하였음.
 - Simmon 등(1988)은 인간의 혈액응고인자 유전자를 면양의 수정란에 도입하여 유선에서 다량의 혈액응고인자를 분비하는 양을 생산하고 특허동물로 등록하였음.
 - Clark 등(1989)은 Factor IX을 25mg/ℓ 정도 유선을 통하여 분비하는 형질전환 면양을 개발함.
 - Wright 등(Pharmaceutical Protein사社, 1991)은 사람의 α₁-antitrypsin을 면양의 유즙에서 대량으로 생산할 수 있는 형질전환 면양을 생산함.
 - Ebert 등(1991)은 사람의 tPA를 3mg/ℓ 정도 유즙으로 생산하는 형질전환 산양의 결과를 보고하여 형질전환 중소가축에서 산업화의 기틀을 마련함.
 - Genzyme Transgenic社(1994)는 유즙으로 2~3g/ℓ의 α₁-antitrypsin을 생산하는 산양을 개발하였다. 이는 고가의 의약품 생산을 산양의 유선으로부터 대량생산하려는 시도중의 하나임.
 - Genzyme Transgenic社(1995)는 4g/ℓ의 monoclonal antibody를 유즙에서 생산하는 형질전환 산양도 개발함.
 - PPL사는 1996년 형질전환산양의 유즙에서 생산된 AAT를 정제하여 임상실험 제 2단계에 들어감으로써 산업화의 기틀을 마련함.
 - Schnieke 등(1997)은 transfection에 의하여 human factor IX가 주입된 양의 태아세포를 이용하여 최초로 핵치환방법에 의하여 형질전환양의 생산에 성공하였고, 모든 산자가 100% 형질전환된 양으로 확인되었음.
 - Baguisi 등(1999)은 human antithrombin III 형질전환산양의 태아세포를 핵치환하여 형질전환산양을 최초로 성공함.
 - Brett 등(2001)은 human antithrombin III 형질전환산양의 태아세포를 과배란 처

리된 산양과 도축된 산양의 난소에서 얻어진 난자를 이용하여 핵치환 하는 방법으로 형질전환산양을 생산함.

결국 동물생체반응기를 이용한 의료용 단백질을 산업적 생산을 위한 제반 여건을 정비하면서 경쟁기업간의 협력을 통한 독점적 지위를 확보하려는 움직임이 가시화되고 있음을 알 수 있다.

나. 국내의 경우

국내에서 형질전환동물 생산에 관한 연구 보고는 축산기술연구소에서 형질전환 돼지, 한국생명공학연구소에서의 형질전환 재래산양(이 등, 1999)과 소(이 등, 1998)의 생산을 보고한바 있고 복제방법과 retrovirus 및 정자주입법을 이용한 형질전환 가축을 생산하고자 하는 시도가 진행중이다.

현재까지 유산양을 이용한 형질전환 연구는 전무한 상태로 한국메디알만이 유산양 수정란이식 및 복제 연구를 추진중이다.

제 2 절 앞으로의 전망

형질전환동물 생산기술의 도입은 가축의 육질과 육류생산, 유질과 유생산량, 난질과 산란수, 질병에 대한 저항성 등의 개선을 통해서, 혹은 각종 생리활성물질의 생산을 통해서 국가와 축산농가에 가져올 이익은 실로 엄청난 것으로 예상된다. 그렇기 때문에 세계 각국은 이 기술의 개발에 총력을 경주하고 있어 조만간 괄목할 만한 성과가 도출될 것으로 기대된다. 우리나라도 가격 경쟁력을 확보할 수 있는 주요 생리활성물질을 선택하여 집중적인 연구를 수행하고 있기에 머지 않아 가시적인 성과가 있을 것으로 기대된다. 유산양의 경우 초식동물로서 초자원의 이용성이 좋고 산양유 뿐만 아니라 고기를 생산하는 가축으로 소 등의 대가축에 비하여 성성숙과 임신기간이 짧고, 사양관리가 용이함으로 유전자 이식기술의 적용이 수월하기 때문에 형질전환기술을 이용한 경제형질의 유전적 개량 및 고가의 생리활성물질의 상업화가 훨씬 빠르게 이루어질 것으로 기대된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 서론

지금까지 가축의 형질을 개량하기 위하여 수정란 이식, 핵치환, 성감별, 수정란 동결 등의 기술개발과 함께 가축의 생산성을 향상시키려는 노력이 계속되고 있다. 또한, 1980년대부터는 분자생물학적인 기술이 동물생명공학과 접목되어 가축에게 새로운 유용한 형질을 인위적으로 획득하게 해 주는 형질전환기술이 개발됨으로써 가축개량 및 생산성 향상에 급격한 변화가 이루어지고 있다. 유용한 형질전환동물의 생산하기 위한 기술적 요체는 유용한 외래유전자를 지닌 형질전환동물의 생산효율을 높이는 것이며, 또한 경제적 부가가치가 높은 의료약품의 생산을 극대화하는 것이다. 현재 Bioreactor로서의 개념으로 형질전환가축을 생산하고 실용화하고자 하는 노력이 계속되고 있으나 막대한 비용과 노력에 비해 만족할 만한 성과를 얻지 못하고 있다. 특히 젖소를 이용한 유용물질의 대량생산에 관한 연구는 상당히 집중적으로 이루어지고 있으나 효율적으로 형질전환젖소를 생산하는 체계가 구축되지 못한 이유로 상대적으로 많은 예산을 필요로 하고 있고 아울러 사양 관리면에서도 상당한 시설과 관리가 요구되고 있으며 아직 실용 가능한 업적이 없는 실정이다.

최근 인체생리활성물질을 대량생산하기 위한 방법으로 형질전환동물(transgenic animal)을 생산하여 동물생체반응기(Animal Bioreactor)로 활용하는 기술이 선진국의 세계적인 기업연구소에서 상당한 수준까지 연구가 진행되고 있고 산업화로 발전되고 있다. 이와같은 Animal Bioreactor 시스템이 갖는 가장 큰 특징은 유즙이나 오줌에서 유용단백질을 대량생산할 수 있고 실제 생산된 단백질의 post-translational modification이 인체에서와 가장 흡사하여 미생물을 숙주로 사용하는 system에서 기대할 수 없는 glycosylation이나 gammacarboxylation 등이 일어나고 있어, 향상된 활성을 기대할 수 있다. 또한 유전자 이식에 의해 고생산성의 개체를 얻을 수 있게 되면, 이들 외래 유전자가 멘델의 유전 법칙에 따라 안정

하게 자손에게 유전되기 때문에 생산원기를 낮출 수있고 안정된 공급을 할 수 있는 장점이있다.

특히 젖소의 우유에서 생리활성물질을 대량으로 생산하고자 하는 연구가 진행되고 있으나 상당한 비용이 들고 세대간격이 길어 실용화에 상당한 기간이 소요되는 등 문제점을 갖고 있다. 본 연구에서는 유산양에서 형질전환기법을 이용하여 형질전환유산양 및 복제 유산양을 생산하여 체계적인 유산양의 형질전환개발 체계를 확립하고 고부가가치를 창출할 수 있는 축산의 가능성을 제시하고자 한다. 따라서 본 연구에서는 유산양사업을 하고 있는 있는 한국메디알(주)과 형질전환 연구의 경험을 갖고 있는 충남대학교가 산학연구를 통해 tPA(tissue plasminogen activator) 유전자를 이용하여 형질전환유산양을 생산하고 이를 산업화에 적극 활용하고자 한다.

제 2 절 연구재료 및 방법

1. 유용단백질의 대량생산을 위한 형질전환 유산양용 벡터개발

① 유용유전자 및 유선세포 특이 프로모터 클로닝

사람의 tPA 유전자와, 유산양에서 β -casein promoter flanking region을 클로닝한다. 일반적으로 사람의 tPA 유전자의 cDNA는 2.5kb 이며, 유산양의 β -casein promoter flanking region 부위는 약 3 kb 이상 되는 것으로 알려져 있다. tPA 유전자를 발현하는 cell line에서 RNA를 추출하여 RT-PCR에 의해 cDNA를 클로닝하고 sequencing에 의해 염기해석을 실시하였다. 유선세포에서 특이적으로 발현된다고 기존에 보고된 β -casein promoter와 엑손(exon) 1부위 프라이머(primer)를 제작하여 LR-PCR(long range-PCR)을 이용하여 증폭한 후 T plasmid vector에 삽입·연결(ligation)시킨 후 sequencing analysis를 수행하여 염기서열을 확인한다. β -casein 유전자 knock-in 용 벡터 구축을 위해 β -casein 유전자 3' flanking region을 엑손 3, 4, 5, 6, 7 부위가 포함되도록 LR-PCR하여 제작하고 염기서열을 확인한다.

② 형질전환 유산양용 벡터 구축

클로닝된 사람의 tPA cDNA에 3.7 kb 의 유산양 β -casein promoter flanking region을 재조합하였다. 또한, 핵이식란의 생산을 위하여 필요한 외래유전자가 도입된 유산양 세포주를 선발하기 위하여 selection marker로 Neo^r 유전자를 삽입하였다. knock-in 벡터의 경우에는 TK 유전자를 삽입하여 negative 선별 유전자로 사용하였다.

③ 유선세포 특이 프로모터 조절인자 분석

goat β -casein promoter region에는 유선세포에서 특이적으로 발현하도록 하는 많은 조절인자가 존재 할 것으로 여겨진다. 따라서 이러한 조절인자들을 screening 및 해석의 과정을 통하여 유선세포에서 최대한의 발현조절능을 나타내는 부위를 확인

함으로써 최적의 발현백터를 개발하고자 하였다.

2. 형질전환생쥐의 생산

① 수정란 준비

생쥐의 수정란은 성성숙에 도달한 암컷 FVB종에 5 IU의 PMSG와 5IU의 HCG로 과배란을 유도하였으며 HCG 주사 후 교미시켜 다음날 vaginal plug를 확인하였다. 교미한 암컷의 난관 팽대부에서 cummulus cell로 둘러싸인 수정란을 회수하한 다음 hyaluronidase를 처리하여 cummulus cell을 제거하였고 DNA 미세주입 시까지 CZB medium으로 37 °C에서 배양하였다. 생쥐 수정란의 DNA 미세주입 시에는 CZB medium에 Herpes buffer을 1:1로 섞어 사용하였다.

② DNA 미세주입

micromanipulator(Leica)를 이용하여 DNA를 생쥐 1-cell 수정란의 전핵으로 주입한다. 준비된 DNA는 모세관현상을 이용하여 injection pipette에 loading하였다. 전핵이 약간 부푸는 것에 의해 injection을 완료하였다.

③ 수정란 이식

DNA가 주입된 수정란은 DNA 미세주입 후 약 3시간 후에 HCG와 vasectomized male에 의해 발정주기를 동기화 시킨 recipient 생쥐의 난관 팽대부위로 평균 10개의 수정란을 외과적인 방법으로 이식하였다.

④ 형질전환생쥐의 식별

태어난 새끼는 약 3주 후에 꼬리 조직 일부를 잘라 proteinase K로 digenstion하여 genomic DNA를 추출한 다음 이식유전자 specific primer를 이용하여 우선 PCR로 검사하였다. 사용된 primer로는 forward primer는 bovine β -casein promoter region에서 oligomer를 선택하였고 reverse primer로는 human tPA에서 oligomer를 선택하였다. primer sequence는 다음과 같다.

Foward : TPA5F 5'-A T C G A G A C T C A A A G C C C T G G T-3'

Reverse: TPA3R 5'-A T T T C A G C T G C A G C A G C G C A A T G-3'

본 primers로는 β -casein promoter 3□□region으로부터 human tPA cDNA의 5'

부위를 포함하는 약 480 bp band가 증폭하게 된다.

⑤ Southern blotting

Southern blotting을 위해서는 약 10ug의 genomic DNA를 EcoRI으로 digestion 시킨 다음 0.9% agarose gel에서 전기영동 시킨 후 denaturation buffer(1.5M NaCl, 0.5M NaOH)에서 30분간 denature를 시키고 neutralization buffer(0.5M Tris, pH7.4, 1.5M NaCl)에서 30분간 중화시킨 다음 nylon membrane으로 gel stacking에 의해 overnight transfer하였다. hybridization은 1.7 kb bovine β -casein promoter 부위를 이용하여 random labeling kit에 의해 P^{32} -dCTP로 labeling된 probe을 만들었고 hybridization을 시킨 후 extensive하게 washing한 다음 signal을 detection하였다.

⑤ 형질전환생쥐 유즙 분석

암컷 형질전환생쥐를 임신시킨 후 분만을 유도하여 1 주일 경에 주사기로 유선을 흡입하여 유즙을 회수하였다. 회수된 유즙을 약 1:10으로 희석한 후 단백질정량을 실시하였고 약 20ug의 유단백을 gel에 loading하여 Western blotting을 실시하였다. acrylamide gel에서 sample을 loading한 후 전기영동을 실시하고 nitrocellulose membrane에 transfer시켰다. 5% nonfat milk를 함유하고 있는 blocking buffer로 incubation한 후 1:1000으로 희석한 anti-tPA antibody로 incubation 시킨 후 secondary IgG로 배양하고 washing 후 ECL detection kit를 이용하여 film에 expose 시킨 다음 현상하여 signal을 검사하였다..

3. 유산양 체세포주 확립 및 유전자도입 수정란의 생산과 분석

① 유산양 태아세포 및 유선세포주 확립

효율적이고 안정적으로 핵이식 방법에 의한 복제 유산양 개발을 위하여 종모축을 확보하였고. 이후 종모축의 귀 및 유선세포 등 체세포와 stage 별 태아세포를 확보하였다. 확립된 세포주는 동결방법으로 장기간 안정적인 보존하였다.

② 형질전환 유산양용 벡터의 transfection 및 선발

구축한 외래유전자가 효과적으로 세포와 수정란에 도입 및 발현이 잘 되는지 확인

하기 위하여 pCX-EGFP-neo을 마우스 세포와 수정란에 도입하여 GFP 발현을 확인하였다. 유산양 핵이식에 이용하기 위한 pCX-EGFP-neo가 도입된 귀 세포는 lipofectamine을 이용하여 삽입을 유도하였고 Neo^r 유전자를 이용하여 neomycin 처리하여 선별하였다. 6-well tissue culture dish에 exponentially growing fibroblast cell을 plating(5×10^5 cells/well)하고 overnight 배양하여 50-80% confluency 상태로 자라게 하였다. polystyrene tube에 DNA/liposome complex를 준비 (Solution A: antisense vector DNA 2-5 ug을 100 μ l DMEM-SF에 희석, Solution B: CLONfectin 2-8 ug을 DMEM-SF 100 μ l에 희석) 한 후 A와 B solution을 섞어 mixing 하고 실온에서 10-30분 동안 배양하였다. 1.8 ml의 DMEM-SF를 다시 첨가한후 mixing하였다. 배양중인 섬유아세포의 배지를 제거한 후 세포에 DNA/liposome complex solution을 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C CO₂ 배양기에서 1-4시간 배양하였다. DNA/liposome complex solution을 세포로부터 제거하고 1X PBS로 washing 한 후 2ml의 complete DMEM (serum 10%)을 첨가하고 48시간 동안 배양한 후 100 mm plate 로 옮기면서 항생제 selection (G418, 600 μ g- 1,000 μ g/ml medium)을 실시하였다. 약 3일 마다 배지를 교환하면서 총 2-3주 동안 stable transfection을 실시한 후 cell cloning을 실시하였다.

④ 형질전환유산양의 유전자 발현분석

유전자 미세주입 방법 및 핵이식 방법 등에 의하여 생산된 형질전환 유산양을 형질전환생쥐에서와 마찬가지로 유전자 분석 등의 방법을 이용하여 재조합 유전자가 발현되는지 분석한다.

4. 핵이식 복제 시스템의 확립과 형질전환 수정란 이식을 통한 고부가성 유산양 개발

① 유산양 난자 이용 시스템 확립

핵이식 및 유전자 미세주입 방법에 이용될 난자의 안정적 확보를 위하여 흑염소와 유산양의 채란 시스템의 확립이 필요하다. 따라서, 유산양의 in vivo란의 채란을 위하여 유산양의 progesteron 제제를 이용한 과배란 유도 및 초음파 진단기 및 채란기를 이용한 비외과적 방법에 의하여 유산양의 in vivo란을 채란하는 기술을 확립한다. 또

한 도축장에서 얻어진 난소를 이용한 in vitro란의 생산기술을 기술의 확립도 필요하다. 이러한 방법으로 얻어진 미성숙 난포란의 체외성숙(in vitro maturartion)을 위하여 성숙용 배지에 여러 가지 growth factor를 첨가하여 최적의 체외성숙 방법을 확립한다. 그리고 체외성숙된 난자를 이용하여 체외수정을 실시하고 최적의 체외수정 시간 및 배양 시스템을 확립하였다.

② 유산양에서 효과적인 핵이식란 제조방법의

② 유산양에서 효과적인 핵이식란 제조방법의 확립

성공적인 핵이식을 위한 공여핵 세포의 세포주기를 조절하는 방법을 조사하고 G₀/G₁의 세포주기에 있는 세포를 이용한 핵이식과 이외의 세포주기에 있는 세포를 이용한 핵이식 방법에 따른 복제 수정란의 체외 발육능을 조사하고 수핵난자의 적절한 탈핵기술을 확립하였다.

또한, 다양한 체세포를 이용하여 핵이식을 실시할 때 세포에 따른 융합조건을 찾아 세포간의 최적융합체계를 구축한다. 핵이식 후 배발생의 효율을 개선하기 위하여 6-DMAP, DC, Ionomycin 등을 이용하여 인위적인 활성화 처리를 통한 최적 활성화 조건을 확립하였다. 구체적인 방법으로는 먼저 재래산양 난소에서 난자를 선별하여 TCM199배양액[TCM199 (9ml)+FBS(1ml,10%농도)+ gentamicin(100ul)+ FSH(10ul, 5mg/ml)+ LH(10ul,10mg/l)+ B-estradiol(10ul,1mg/ml)+ pyruvate(0.00022g/10ml)+ cystein(20ul, 0.1mM/10m)]에 배양하고 24시간 배양후 HY를 사용하여 난구세포를 제거하여 극체가 있는 것만을 선별한다. 체세포 핵이식 후 Fusion조건은 2.39Kv/cm (15usec) BTX전기충격을 준다. 난자의 활성화를 위해 5분간 Ionomycine 처리하고, DMAP처리는 Ionomycine처리 후 4시간동안 배양한 후 G1 medium에 배양하고 .48시간 후에 G2 medium으로 교체준다.

③ 핵이식란 및 형질전환수정란의 체외배양 기술확립

일반적으로 핵이식란 및 외래유전자가 주입된 수정란의 발달율은 정상적인 체외 수정란보다 저조한 체외 발달율을 보인다는 여러 보고가 있었다. 따라서 본 연구에서는 핵이식란과 형질전환수정란의 효율적인 체외배양을 위한 배양액에서의 여러 growth factor의 효과를 확인하고, MEF(mouse embryonic fibroblast), GEF(goat embryonic fibroblast), GOEC(goat oviduct epithelial cell)등의 세포를 이용한 공동

배양을 통하여 핵이식란 및 형질전환수정란의 체외 발달율을 향상시키려고 한다.

④ 핵이식란 및 형질전환수정란의 이식

유산양이 주로 봄·가을에 번식하는 계절번식동물이므로 핵이식란 및 형질전환수정란의 성공적인 이식을 위하여 봄과 가을에 건강하고 우수한 대리모를 각각 20두씩 선발하고, 선발된 대리모의 효율적인 발정동기화 방법을 확립한다. 또한 핵이식란 및 형질전환수정란의 발달 단계별 이식에 따른 효과적인 임신 방법을 확립함과 아울러 이식조건과 이식방법에 따른 수태율의 조사를 통하여 최적의 이식 시스템을 마련한다.

⑤. 복제 유산양 및 형질전환유산양의 생산 및 관리

전반적인 연구수행에 있어서 대리모 및 연구수행 결과로 태어난 새끼 유산양의 특별관리가 무엇보다도 중요하다. 따라서 대리모의 특별관리를 통하여 임신유지 및분만을 증가시키는 방안을 확립하고 대리모의 정상분만을 유도하며, 태어난 새끼 유산양에서 외래유전자의 삽입여부를 조사한다.

또한, 핵이식란 및 형질전환수정란의 이식에 따른 유산 및 사산에 대한 여러 보고가 있으므로 그 원인 분석 및 대책을 강구한다.

5. 발정동기화 및 수정란이식 방법

정액 채취를 위한 종양 2~4두와 발정동기화 및 인공수정을 위한 빈양을 선발하여 분리 사육하였다. 분리 사육한 빈양의 질내에 CIDR-S를 삽입한 후, 11일간 정치하였다. 11일간 정치한 CIDR-S를 제거하면서 PMSG 500IU를 근육주사한 후, 발정여부를 관찰하면서 60시간 후에 수정란이식을 실시하였다.

보통 사이터를 이용한 발정유기 및 배란유도는 19일 이상 질 내 정치하게 되어 있으나, 장기간 사이터를 질 내에 둬므로서 질염의 가능성이 높아 사이터 정치기간의 단축을 위해 0.3mg PGF2a의 투여하였다. 유산양 공시축에 모두 사이터를 질 내 삽입하였고 사이터 제거 이틀전인 9일째에 0.3mg PGF2a와 500IU PMSG를 동시에 주사한 후, 11일째 사이터를 제거하였다. 24시간째부터 48시간째에 발정을 관찰 한 후 다음날 수술을 통하여 양쪽 난관을 적출하여 난관째 쪽으로 수정란 이식을 실시하였

다하였다. 이식을 하기전날 대리양은 하루간 절식을 시키고, 대리모의 수술의 마취에는 케타민과 럼폰을 1:1로 섞은 것이나 .2% xylazine과 lidocaine를 투여한 후 정중선을 절개하여 난관만을 드러내어 난관채 부위로 micropipette을 이용하여 소량의 medium과 함께 복제란을 주입 이식하였다. 본 연구에서는 이식시 각 난관으로 복제란을 이식하였다. 이식 후 정중선을 잘 봉합하고 회복실로 옮겨 회복시킨 다음 관리하였다.

제 3 절 연구결과 및 고찰

1. 유산양용 유전자 벡터의 구축

A) 유용유전자 및 유선세포 특이 프로모터 클로닝

혈전용해제로 사용되며 고가의 단백질 의약품인 tPA 유전자를 발현하는 human fetal lung cell에서 mRNA를 추출하여 RT-PCR에 의해 cDNA를 T-vector에 클로닝 하였다. RT-PCR시 향후 형질전환 벡터의 제작을 용이하게 하기 위해 5' 끝에는 xho I, 3' 끝에는 Sal I 제한효소 사이트를 첨가하여 약 1.7kb의 tPA cDNA를 만들어 클로닝 하였다. 클로닝 한 벡터는 sequencing analysis를 수행하여, 보고된 유전자 서열과 비교 확인하였다 (그림 1).

B) 자아넨종 유산양 κ -casein 프로모터 클로닝

유선세포에서 특이적으로 발현을 유도하기 위해, 유선에서 분비되는 κ -casein 유전자의 프로모터를 이용하였다. 자아넨종의 귀에서 genomic DNA 추출하여 PCR을 통해 κ -casein 프로모터를 증폭하여(2kb) T-Vector에 클로닝 하였다. 클로닝한 벡터는 염기서열 분석을 통해 보고된 sequence와 비교 확인하였다. 그 결과 중간에 약간의 SNP가 존재함을 알 수 있었다.

또한 goat κ -casein promoter region에는 유선세포에서 특이적으로 발현하도록 하는 많은 조절인자가 존재하는데, 보고된 참고문헌을 조사하여 이러한 조절인자들을 screening 및 해석을 하였다 (그림2).

Xho I - 54 atggatg

61 caatgaagag agggctctgc tgtgtgctgc tgctgtgtgg agcagtcttc gtttcgcca
121 gccaggaaat ccatgcccga ttcagaagag gagccagatc ttaccaagtg atctgcagag
181 atgaaaaaac gcagatgata taccagcaac atcagtcatg gctgcgcct gtgctcagaa
241 gcaaccgggt ggaatattgc tgggtcaaca gtggcagggc acagtgccac tcagtgcctg
301 tcaaaagttg cagcgagcca aggtgttca acggggggcac ctgccagcag gcctgtact
361 tctcagattt cgtgtgccag tgccccgaag gatttgctgg gaagtgtgt gaaatagata
421 ccagggccac gtgctacgag gaccagggca tcagctacag gggcacgtgg agcacagcgg
481 agagtggcgc cgagtgcacc aactggaaca gcagcgcgtt ggcccagaag ccctacagcg
541 ggcggaggcc agacgccatc aggctgggcc tggggaacca caactactgc agaaaccag
601 atcgagactc aaagccctgg tgctacgtct ttaaggcggg gaagtacagc tcagagtct
661 gcagcaccct gcctgctct gagggaaaca gtgactgcta cttgggaat gggtcagcct
721 accgtggcac gcacagctc accgagtcgg gtgcctctg cctcccgtgg aattccatga
781 tctgatagg caaggtttac acagcacaga acccagtcgc ccaggcactg ggctgggca
841 aacataatta ctgccggaat cctgatgggg atgccaagcc ctggtgccac gtgctgaaga
901 accgcaggct gacgtgggag tactgtgatg tgcctctg ctccactgc ggctgagac
961 agtacagcca gcctcagttt cgcataaag gagggctctt cgccgacatc gcctcccacc
1021 cctggcaggc tgccatctt gccaaagcaca ggaggtgcc cggagagcgg ttctgtgcg
1081 ggggcatact catcagctcc tgetggatc tctctgccgc cactgctc caggagaggt
1141 ttccgcccc caacctgacg gtgatcttg gcagaacata ccgggtggtc cctggcgagg
1201 aggagcagaa atttgaagtc gaaaaataca ttgtccataa ggaattcgat gatgacactt
1261 acgacaatga cattgcgctg ctgcagctga aatcggatc gtcccgtgt gccaggaga
1321 gcagcgtggt ccgcaactgtg tgcctccc cggcggacct gcagctgccg gactggacgg
1381 agtgtgagct ctccggctac ggcaagcatg aggccttgc tctttctat tcggagcggc
1441 tgaaggagge tcatgtcaga ctgtacccat ccagccgctg cacatcacia catttactta
1501 acagaacagt caccgacaac atgctgtgtg ctggagacac tcggagcggc gggccccagg
1561 caaacttgca cgacgcctgc cagggcgatt cgggagggccc cctggtgtgt ctgaacgatg
1621 gccgcatgac ttggtgggc atcatcagct ggggcctggg ctgtggacag aaggatgtcc
1681 cgggtgtgta caccaagggt accaactacc tagactggat tcgtgacaac atgcgaccgt
1741 ga - Sal I

그림 1. 클로닝한 tPA 유전자의 염기서열

-340

Xatatttctg ttgtgtatta gaatttacc caagatctca aagacccact gaatactaaa gagacctcat
tgtggttaca ataattggg gactgggcca aaacttccgt gcatcccagc caagacctgt agctactgga
caatttcatt tcctttatca gactgtgagt tattctgtt aaaatgctcc ccagaatttc tggggacaga
aaaataggaa gaattcatt cctaatactg cagatttcta ggaaattcaaa tccactgttg gttttatttc
aaaccacaaa attagcatgc cattaataac tatatataaa cagccactaa atcagatcatt -1

그림 2. Goat β -casein 유전자 발현조절 부위 분석(-340 ~ -1). 굵은체는 조절부위를 내며, 조절부위 내에 밀줄 친 곳은 순서대로 C/EBP, C/EBP, STAT, OCT, TATA 자리를 나타낸다.

C) 유산양 β -casein knock-in 용 벡터 구축을 위한 5' 및 3' flanking region 클로닝

5' flanking region은 기존에 보고된 β -casein 프로모터와 엑손 1 부위 프라이머를 각각 5'-gcg gcc gcg gta atg aat aga tga agc-3', 5'-ctc gag gct ctc gat tcc tgt gaa tgg-3' 으로 제작하여, 유산양 Saanen 종의 genomic DNA에서 직접 LR-PCR 증폭한 3.2kb를 T-vector에 클로닝 하였다.

3'-flanking region의 경우에는 엑손 3, 4, 5, 6, 7를 포함하게 하기 위해, 엑손 3과 엑손 7 부위에 해당하는 프라이머를 각각 5'-gct agc agg aag aac tca atg tag tcg-3', 5'-gaa ttc aga ctt aca aga ata ggg aag-3'을 제작하여 위와 같은 방법으로 4.2kb를 클로닝 하였다. 클로닝 된 벡터는 sequencing analysis를 수행하여, 보고된 유전자 서열과 비교 확인하였다.

2. 형질전환 유산양용 벡터 구축

A) 외래유전자 도입 확인을 위한 GFP 발현 벡터 pCX-EGFP-neo 구축

외래유전자의 도입 및 발현여부를 육안으로 쉽게 확인할 수 있도록 GFP 유전자를 발현하는 pCX-EGFP 벡터에 체세포에서 선별을 용이하게 하기 위해 Neo^r 유전자 삽입하여 pCX-EGFP-neo 벡터(약 7.4kb)를 구축하였다. 이 벡터는 모든 세포의 actin 발현부위에서 activation 되기 때문에 종간의 차이 없이 외래유전자의 발현을 확인할 수 있다(그림 3).

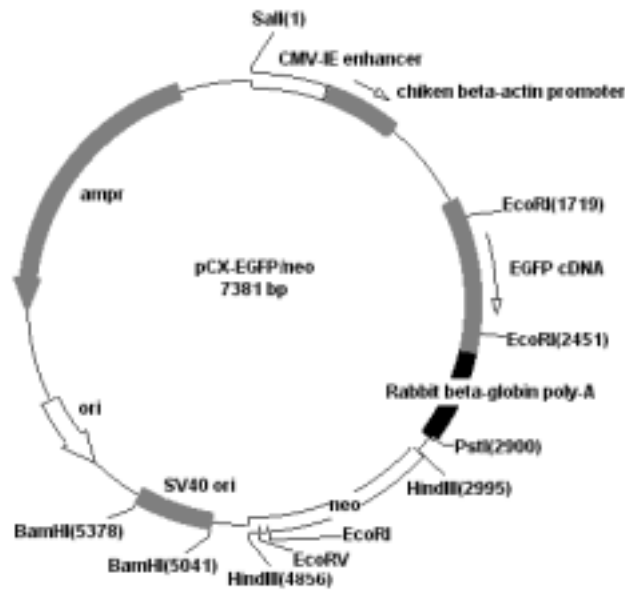


그림 3. pCX-EGFP-neo 벡터 map

B) 유산양 β -casein knock-in 용 기본 벡터 구축 (15kb)

유산양 genomic β -casein DNA를 이용하여 상동유전자재조합방법에 의해 여러 종류의 유용유전자를 genomic β -casein 유전자 부위에 대치 시켜 이용할 수 있도록 knock-in 용 기본 벡터 구축하였다 (그림 4).

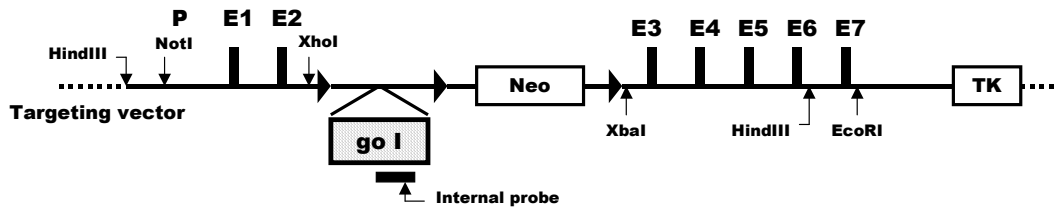


그림 4. Goat β -casein Knock-in vector의 기본구조 개념도. go I : Interested DNA for insertion

클로닝된 유산양의 5' 및 3' flanking region을 외래유전자가 도입된 체세포주의 선발이 용이하도록 Neo 유전자와 TK 유전자를 갖고 있는 pL3-PNT vector에 삽입하여 goat β -casein Knock-in vector를 구축하였다 (그림 5). 벡터의 구축 시 향후 불필요한 Neo 유전자의 제거를 위해 Neo 유전자 양쪽 끝에 Lox P를 삽입하여 제작하였다.

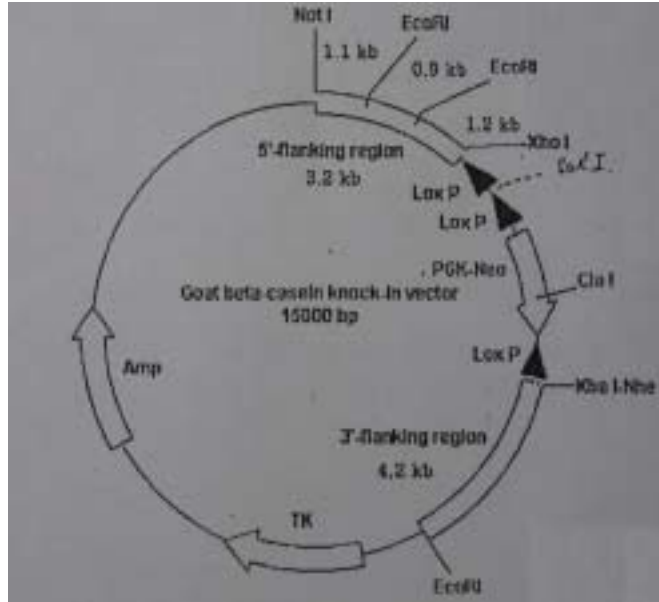


그림 5. Goat β -casein knock-in 벡터의 map

C) 사람 tPA가 삽입된 goat β -casein knock-in tPA 벡터 구축 (16.7kb)

상기 goat β -casein knock-in 기본 벡터에, 클로닝된 사람의 tPA cDNA 1,7kb 를 Xho I과 Sal I 제한효소 부위 사이에 삽입하여 재조합 하여 유용유전자인 tPA를 안정적으로 발현하는 goat β -casein knock-in tPA 벡터를 구축하였다.

D) 사람 tPA가 삽입된 미세 주입용 pBC1-tPA 벡터 구축 (22.7kb)

미세주입용 벡터는 유선세포에서 발현효율이 좋다고 알려진 INVITROGEN에서 시판하는 pBC-1 벡터를 이용하였다(그림 6).

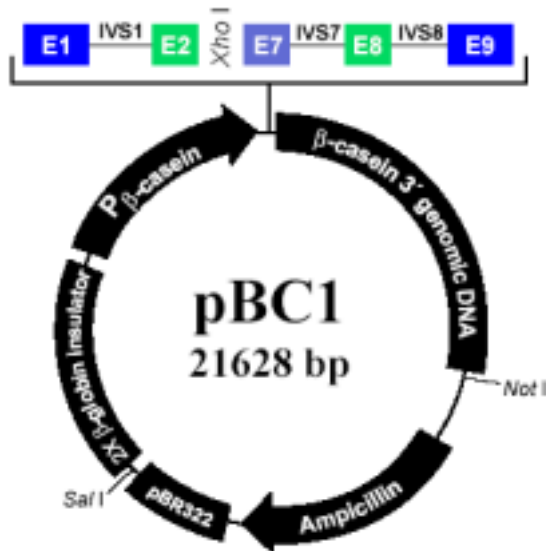


그림 6. pBC-1 벡터의 지도

상기 pBC-1 벡터의 Xho I 부위에, 클로닝된 사람 tPA 유전자(1.7b)를 삽입하여 미세주입용 pBC1-tPA 벡터를 구축하였다.

E) 유산양 태아세포 및 세포주 확립

복제 유산양의 좋은 형질을 확보하기 위해, 유량과 후대의 유량이 우수한 자아넨 종 2년생 암컷중축의 귀조직을 떼어내어 세절하고 trypsin 처리하여 primary 귀세포를 만들어 동결보존 하였다.

체세포 핵이식용 유산양 태아 세포주를 확립하기 위하여, 초산 암컷(9개월령)과 자아넨 숫컷을 자연종부 시켜 임신 약 50일째 제왕절개 수술로 태아를 적출 하였다 (그림 7).



그림 7. 제왕절개로 적출한 임신 50일령의 태아

적출 된 태아는 각각 머리와 내장을 제거한 후, 세절하고 trypsin 처리하여 primary 태아 세포를 만들어 성관별과 배양상태를 파악하고 동결보존 하였다. 제조된 세포를 각각 SG101, SG201로 명명하였고, 키워본 결과 각각 약간 다른 특징을 보였다 (그림 8).



(SG101) 40% fibroblast-like 60% epithelial-like cells (SG201) 100% fibroblast-like cells

그림 8. SG101과 SG201의 배양된 세포의 상태

F) 확립된 태아 세포주 성판별(Sexing)

SG101과 SG201의 sexing을 위해 다음과 같은 유전자의 primer를 제조하여 PCR 하였다.

(goat SRY gene) 146bp :

```

1 ctcgtgaacg aagacgaaag gtggctctag agaatcccaa attgcaaac tcagagatca
61 gcaagcagct gggatacagag tggaaaaggc ttacagatgc tgaaaagcgc ccattctttg
121 aggaggcaca gagactacta gctata

```

primer : gsry(f) AGG TGG CTC TAG AGA ATC CC (20mer)

gsry(r) TAT AGC TAG TAG TCT CTG TG (20mer)

(goat testis-specific Y-encoded protein (TSPY) gene) 181bp :

```

1 gagaagacag tggaggagca gtgccaggaa agrcctggag gcccgattga rcttccggca
61 ctagatgtga tgcaggcact ggtgacyctg caagtggatg tgagctgtga gcatgagcaa
121 aactkcaggg cctacgtttg gttgatgtgc aagaaccats agaggaggaa gcggtgacttg
181 g

```

primer : gtspy(f) GAG AAG ACA GTG GAG GAG CA (20mer)
 gtspy(r) ATG GTT CTT GCA CAT CAA CCA AAC G (25mer)

PCR sexing 결과 SG101은 암컷, SG201은 수컷으로 판명하였다(그림 9).

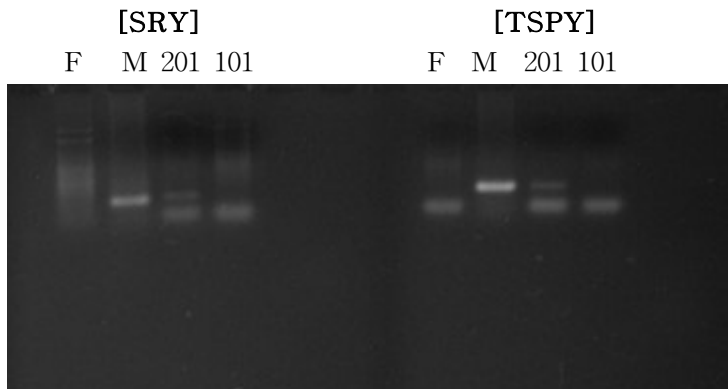


그림 9. SG101, SG201 세포 DNA의 PCR 결과. F, M은 자아넨 유산양 암, 수컷의 귀 조직에서 DNA를 추출한 것.

3. 유산양 난자제조 기술의 확립

A) 유산양 난자 이용 시스템 확립

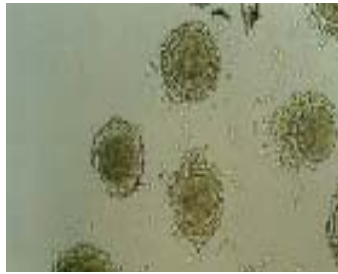
핵이식 및 유전자 미세주입에 이용될 난자를 안정적으로 확보하기 위해서, 도축장에서 얻은 난소를 이용한 미성숙 난포란의 채취 및 성숙배양에 대한 연구를 실시하였다. 현재 우리나라에서는 유산양의 도축이 거의 없는 실정이고, 흑염소의 도축이 이루어지고 있는 상황이어서 흑염소 난포란을 채취하여 이용하였다.

봄(3~5월), 여름(6~8월), 가을(9~11월), 겨울(12~2월)로 나뉘 난소 당 최소 한겹이

상 붙은 난포란의 회수율과 24~27시간 성숙배양 후 성숙율을 관찰하였다. 난포란의 회수는 투명대 주위에 난구세포가 1겹 이상 붙어있는 난을 사용하였고, 성숙배양은 TCM-199에 10% FBS, 5ug/ml FSH, 10ug/ml LH, 10ug/ml e2가 되도록 하여 24 ~ 27시간 성숙배양을 하였다. 성숙율의 관찰은 극체가 잘 보이는 것을 성숙된 난자로 판정하였다. 그 결과 난포란의 회수 수는 가을철이 가장 높았고 (4.7개/난소), 여름철이 가장 낮았다 (3.1개/난소). 그러나 회수된 난자의 성숙율은 계절별 차이를 보이지 않았다(표 1, 그림 10). 따라서 여름철에 난소의 상태와 난포란의 회수율은 떨어지지만 질 좋은 난자를 골라 시험에 공시한다면 난자의 발달에 계절적 차이는 보이지 않았다.

표 1. 계절별 도축장에서 채취한 난포란의 회수와 성숙율

계절	난소수	1겹이상 난포란수	난포란/난소	공시란 성숙율
봄 (3 ~ 5월)	110	410	3.7	71.7%
여름 (6 ~ 8월)	108	337	3.1	70.0%
가을 (9 ~ 11월)	62	292	4.7	73.3%
겨울 (12 ~ 2월)	292	1207	4.1	72.7%
Total	572	2246	3.9	72.2%



(체외성숙 난포란)



(난구세포 제거후 극체)

그림 10. 도축장 난소에서 채란한 난포란의 체외성숙

B) 미성숙 난포란의 체외성숙 및 배양기술의 확립

미성숙 난포란의 성숙배양에 TCM-199에 10% FBS, 5 ug/ml FSH, 10 ug/ml LH, 10 ug/ml E₂가 되도록 하여 38.5°C, 5% CO₂ 조건에서 24 ~ 27시간 성숙배양을 하였는데, 성숙율이 평균 약 72% 정도로 양호하였다. 그러나 성숙배양액에 일반적으로 사용하는 항생제인 streptomycin을 첨가하면 성숙율이 유의적으로 (p<0.01) 저하되는 현상을 발견하였다(표 2).

특히 다른 항생제에는 영향을 받지 않았으나, streptomycin 첨가시 영향을 받으므로, 이를 고려하여 성숙 배양시 배양액에 streptomycin을 제거하는 것이 좋은 결과를 가져왔다.

표 2. 흑염소 난포란의 성숙배양시 항생제의 영향

처리	난포란 수	성숙율(% ± SEM)
Control	84	73.8 ± 7.2 ^a
Penicillin	88	69.1 ± 11.1 ^a
Streptomycin	84	42.5 ± 8.3 ^b
Gentamycin	84	71.3 ± 10.1 ^a
Pen + Strep	82	45.7 ± 8.5 ^b

C) 유산양 배란유기 기술의 확립

과배란 방법을 적용하기 전에 호르몬 처리에 의해 적절한 발정유기와 배란이 제대로 이루어지는 지 확인하기 위한 실험을 실시하였다. 보통 사이더를 이용한 발정유기 및 배란유도는 19일 이상 질 내 정치하게 되어 있으나, 장기간 사이더를 질 내에 둬므로서 질염의 가능성이 높아 사이더 정치기간의 단축을 위해 PGF_{2α}의 투여효과를 조사하였다.

유산양 공시축 4두 모두 사이더를 질 내 삽입한다. 그 중 2두는 사이더 제거 이틀전인 9일째에 PGF_{2α}와 PMSG를 동시에 주사한 후, 11일째 사이더를 제거하고, 다른 2두는 11일째 사이더를 제거하면서 PMSG를 동시에 주사하였다. 4두 모두 사이더 제거 후, 24시간째부터 48시간째까지 약 하루동안만 숫산양과 합사하여 자연종부를 유도하였다. 자연종부 종료 약 48시간 후, 수술을 통하여 양쪽 난소와 난관을 적출하여 배란 유무와, 난관 관류를 통해 수정란 생성 유무를 관찰하였다.

사이더 제거 이틀전에 PGF_{2α}와 PMSG를 주사한 2마리 모두 발정유기가 잘 되었으나, 사이더를 11일 동안 정치 후 제거하면서 PMSG를 근육주사한 군은 전혀 발정이

유도되지 않았다. 그 결과 숫산양과 합사시 PGF_{2α} 처리 유산양과는 2~4번 정도의 교미행위가 있었지만, 다른군의 유산양과는 교미행동을 보이지 않았다. 교미 종료 48시간 후, 수술을 통해 난소를 적출하여 배란점과 난관 내 수정란의 생성여부를 관찰하였다. 그 결과 발정유도가 잘된 군에서는 1~2개소의 배란점을 확인 할 수 있었고, 4세 포기의 수정란을 관찰할 수 있었다(표3).

표 3. 발정동기화 방법에 따른 배란 점과 수정란의 생성

발정동기화 방법	공시축	배란점	난관 관류시
PGF _{2α} + 11일 정치	#4	1개소	수정란 1개
	#34	2개소	수정란, 난자 각각 1개
사이드 11일 정치법	#45	0개소	난자 없음
	#3	0개소	난자 없음

D) 체외수정용 유산양 정액 채취와 동결보존 기술의 확립

미세주입용 수정란의 안정적인 생산을 위해서는 난자의 확보만큼이나, 안정적이고 일정한 유산양 정액의 준비가 필수적이다. 따라서 연중 숫양의 정자생성량과 정자활력은 어떤 변화가 일어나는지 조사할 필요가 있으며, 그에 따라 가장 활력이 좋은 시기의 정액을 채취하여 효과적인 동결보존을 기술을 확립하여야 한다.

본 실험에서는 한여름과 가을에 채취한 정액의 질을 검사하였고, 채취된 정액의

동결보존 방법에 따른 컴퓨터 정자분석기를 통한 정액의 정상 분석을 하여 동결정액을 채외수정에 공시할 가능성에 대해 검토하였다.

한여름과 가을에 숫양의 정액 채취상태를 비교하기 위해, 8월의 이른 아침에 정액 채취성적과 10월 오전중의 정액 채취성적을 비교하였다. 정액의 채취는 전기자극법을 이용하였고, 직장에 전기 자극봉을 삽입한 후 10여 회 전기자극을 유도하여 정액을 채취하였다.

채취한 정액은 정액의 양과 현미경에서 육안으로 관찰된 정자의 운동성을 살펴본다. 그 결과는 표 4와 같다. 한 여름철에 채취한 정액량과 운동성이 가을철에 비해 감소함을 관찰 할 수 있었다. 따라서 채외수정용 동결정액은 가을철에 채정한 정액을 이용하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

표 4. 시기별 정액 채정량과 운동성

채정 시기	공시축수	평균 정액량	원정액의 운동성
8월	2두	0.7ml	64%
10월	2두	1.3ml	80%

채정한 정액은 정장성분의 제거를 위해 세척액으로 2회 세척하였다. 세척액은 0.9% NaCl, 1.15% KCl, 1.22% CaCl₂, 2.11% KH₂PO₄, 3.82% MgSO₄·7H₂O, 5.34% anhydrous glucose의 조성으로 제조한 후 Phosphate buffer를 이용하여 pH를 7.4로 맞추었다. 세척 방법은 채정한 정액량의 약 9배 되는 세척액으로 바로 희석한 후, 500-600g에서 15분간 원심분리를 하였다. 원심분리 후 상층액을 제거한 후, 다시 한번 세척액으로 희석하였다. 세척이 끝난 정액은 동결보존용 희석액에 따른 동결보존성을

조사하기 위하여 다음 두가지의 다른 희석액을 이용하여 동결보존을 하였다.

(가) 희석액은 Tris Aminomethane, Citric Acid, Lactose를 기본으로 20%의 Egg yolk와 5% Glycerol이 되도록 하였다.

(나) 희석액은 anhydrous glucose에 10%의 cow skimmed-milk (지방 1% 이하)를 섞어 제조한 후, 약 15분간 끓여서 제조하였고, 사용시에 5% Glycerol을 혼합하여 시험에 이용하였다.

세척된 정액을 각각의 희석액에서 글리세롤이 없는 것으로 1차 희석하여 냉장고에(4℃) 2시간동안 정지한 후, 글리세롤이 포함된 희석액으로 3차에 걸쳐 천천히 평형을 시켰다. 평형시에는 4℃에서 작업을 하였으며, 평형 후 액체질소 상층 4cm에서 2~3분간 정지한 다음 액체질소에 침지 하였다. 동결보존 한달 후, 보존성을 검토하기 위해 37℃ water bath에서 1분간 넣어 녹인 후 컴퓨터정자분석기 (CASA)를 이용하여 정자의 수, 정자의 운동성 등을 측정하였다.

Egg yolk를 사용한 경우와 cow skimmed-milk를 사용하였을 때, 어떤 희석액이 유산양 정액에 유용한지 알아본 결과는 표 5와 같다. 난황을 사용한 방법 보다, skimmed milk를 사용하는 것이 정자의 동결보존에 더 효과적이었다.

표 5. 희석액에 따른 정자의 동결보존 후 상태 분석

구 분	(가) 희석액	(나) 희석액
농도 ($10^6/ml$)	104	45
운동성 (%)	33.06	96.29
속도 ($\mu m/s$)	32.01	89.87
선형 속도 ($\mu m/s$)	9.05	60.74
직진성	28.25	67.57

4. 유산양에서 효과적인 핵이식란 제조방법의 개발

A) 난자의 활성화 기술의 확립

핵이식된 난자의 효율적인 활성화를 위해서는 활성화 조건의 확립과 배양체계의 구축이 필요하다. 따라서 효율적인 활성화 조건과 배양조건을 찾기 위해 성숙된 난자의 단위발생 후, CR1과 TCM-199에 발달배양 시켜 48시간째 $2 \sim 4$ cell로 발달하는 비율을 관찰하였다.

화학적 활성화를 위한 난자는 난포란의 성숙배양 후, 난구세포를 제거하여 극체가 잘 관찰되는 것을 시험에 공시하였다. 화학적 활성화는 25시간 성숙배양하여 성숙된 난자를 5uM ionomycin에서 5분 배양한 후, 잘 세척하여 2mM 6-DMAP에서 3시간 30분 배양하였다. 배양이 끝난 후, 각각 CR1과 TCM-199 발달배지에서 48시간동안 배양하며 단위발생율을 관찰하였다. 그 결과 CR1, TCM-199간의 발달배지의 영향은 없었으며, 두 경우 모두 양호한 단위발생율을 보였다(표 6, 그림 11).

표 6. 화학적 활성화후 발달배양액에 따른 단위발생율

발달배양액	성숙란수	단위발생율 (%)
CR1	69	55 (79.7%)
TCM-199	258	210 (81.4%)

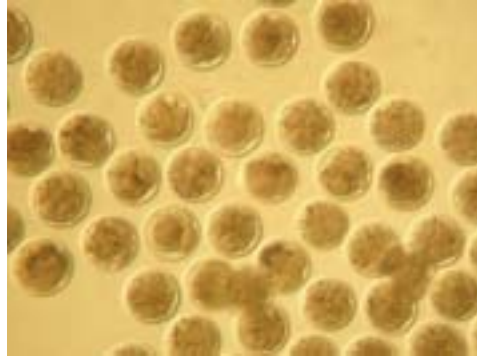


그림 11. 난자의 활성화 처리후 48시간째 단위발생한 흑염소 난포란

B) 귀 세포를 이용한 세포주기 조절 및 융합조건의 확립

구축한 유산양 귀 세포주를 이용하여, 가득 자란 상태의 귀세포에 0.5% 혈청 배양액으로 혈청기아배양 하여 귀 세포를 G0/G1 상태로 유도하였다. 휴지기로 유도된 귀 세포를 공여핵으로 하여, 성숙된 난포란을 제핵한 후 핵이식란을 만들어 융합 및 배 발달을 관찰하였다. 그 결과 체세포와의 전기융합 및 배발달에서 기존에 보고된 성적에 아주 가까운 성적을 얻었다 (표 7, 그림 12). 제핵은 극체가 있는 부위의 투명대를 찢은 후, 30% 가량의 세포질이 나오도록 눌러 실시하였다.

표 7. 귀세포를 이용한 유산양 핵이식란의 융합 및 발달

	공시란수	No.(%) couplets produced	No.(%) couplets fused	No.(%) embryos*
Abattoir derived	135	112(54)	58(28)	44(21)

* Four- to eight embryos. Includes both high- and low-quality embryos.

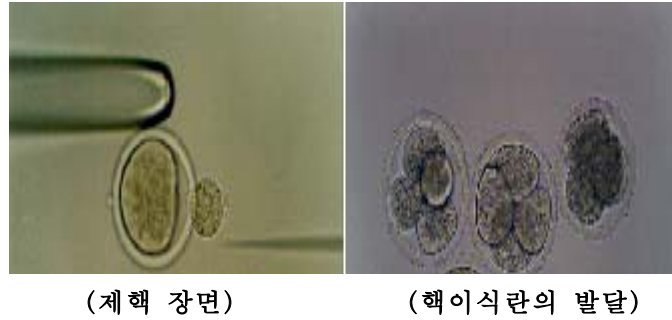


그림 12. 귀세포를 이용한 핵이식란의 제조와 발달

C) GFP 발현 벡터인 pCX-EGFP-neo의 마우스 세포 및 수정란에서 발현확인

외래유전자를 도입한 미세주입 수정란과 핵이식란을 제조하기 위해, 사전연구로 구축한 pCX-EGFP-neo 벡터의 발현여부를 마우스의 세포와 마우스 수정란에 미세주입하여, GFP 발현여부를 관찰하였다.

pCX-EGFP-neo 벡터를 마우스 fibroblast 세포에 lipofectamine를 이용하여 transfection 후 GFP 발현여부를 관찰하였다(그림 13).

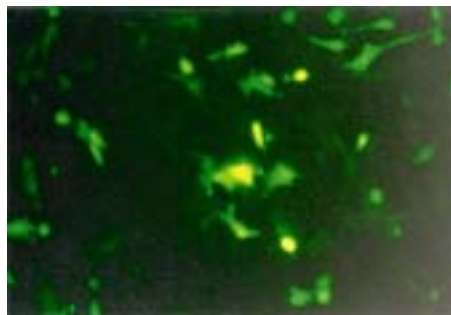


그림 13. pCX-EGFP-neo 가 도입된 세포

그 결과 세포로의 도입 및 세포내에서 도입한 유전자의 발현을 관찰 할 수 있었다. 수정란에 도입여부와 발현상태를 파악하기 위하여 마우스 수정란의 응성전핵에 pCX-EGFP-neo를 미세주입하여 배발생과 발현여부를 관찰하였다(그림 14).

그 결과 수정란 내로의 도입 및 배발생에 큰 문제를 발생하지 않았고, 정상적인 발현양상을 보였다. 상기 실험을 통해 외래유전자 도입 방법 및 기술을 확립할 수 있었다.

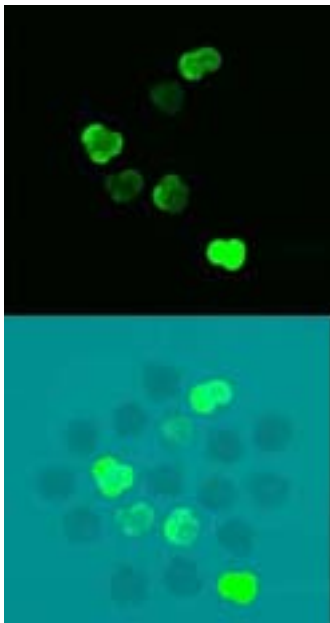


그림 14. pCX-EGFP-neo가 도입된 수정란

D) pCX-EGFP-neo가 도입된 유산양 귀 세포주 확립

형질전환 복제 유산양을 만들기 위한 공여핵으로 외래 유전자가 도입된 귀세포주를 확립하기 위해 실시하였다. pCX-EGFP-neo 벡터를 구축한 유산양 귀세포주에 lipofectamine를 이용하여 transfection한 후, neomycin을 이용하여 14일간 배양하며 transfected cell을 선별하였다. 선별한 세포는 PCR을 통해 분석항 후 공여핵으로 사용하기 위해 동결보존 하였다.

5. 유전자미세주입에 의한 형질전환산양 수정란 생산기술 확립

외래유전자를 도입한 미세주입 수정란과 핵이식란을 제조하기 위해, 사전연구로 구축한 pBC1-tPA 벡터를 산양 수정란에 미세주입(microinjection)하고 배양한 후 tPA 유전자의 정착 여부를 PCR로 관찰하였다(표8, 그림 15). 총 60 마리의 산양 zygote에 DNA를 미세주입한 후 배발달율은 48 시간 후의 cleavage stage에서는 70.0%(42/60), 72 시간 후의 morular에서는 58.3% (35/60)로 감소하였다. 또한 발달된 수정란으로부터 genomic DNA를 추출한 후 PCR으로 tPA 유전자를 가지고 있는가를 검사하였는데 약 25.0%의 형질전환율을 나타내었다(표 8).

표 8. 산양 zygote에 microinjection 후 배발달율 및 형질전환효율

DNA	No. embryos microinjected	No. embryos surviving (%)		PCR-positive embryos (%)
		4- or 8-cell	Morula	
pBC1-tPA	60	42 (70.0)	35 (58.3)	15 (25.0)

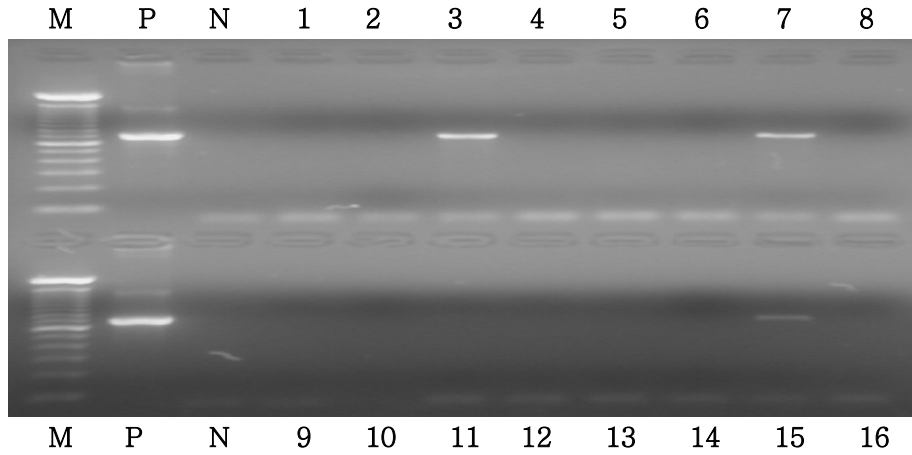


그림 15. tPA 도입 형질전환수정란의 PCR 분석. M: molecular marker, P: positive control, N: negative control, 1-16: microinjected embryo DNA

6. 형질전환생쥐의 생산 및 유전자 도입 수정란의 생산

A) 형질전환생쥐의 생산

1 차년도에 구축한 β -casein_{promoter}-tPA DNA를 이용하여 생쥐 1-cell embryo의 pronucleus로 microinjection하여 대리모에 이기상 후 태어난 새끼는 약 3주 후에 꼬리 조직 일부를 잘라 proteinase K로 digestion하여 genomic DNA를 추출한 다음 이식유전자 specific primer를 이용하여 우선 PCR로 검사하였다. tPA primers로는 β -casein promoter 3' region으로부터 tPA cDNA의 5' 부위를 포함하는 약 580 bp band가 증폭하였다. 본 실험에서 founder 형질전환생쥐는 총 5 마리로 2마리의 암컷과 3마리의 수컷이 형질전환생쥐인 것으로 확인되었다. 성성숙에 도달한 이들 형질전환생쥐를 정상 FVB 종과 교미시켜 F₁을 생산중이며 현재까지 생산되어 확인된 것은 약 20-50%까지의 F₁에 전달되는 것으로 나타나 정상적으로 이식유전자가 염색체상에 정착되었다는 것

을 확인할 수 있었다(표 9). 생산된 F₁은 성숙에 도달시킨 후 F₂의 생산을 실시한 후 Western blotting에 의한 tPA 단백질 발현관계의 실험을 실시하였다.

표 9. pBC1-tPA transgene의 형질전환생쥐 생산 및 transmission rate

Transgenic line	No. of progeny	No. of Transgenic F ₁	Transmission rate(%)
1	17	6	35.3
2	10	5	50.0
3	16	3	18.8
4	17	9	52.9
Total	60	23	38.3

pBC1-tPA유전자 도입 생쥐를 확인하기 위해 사용된 primer로는 forward primer는 bovine κ -casein promoter region에서 oligomer를 선택하였고 reverse primer로는 human tPA에서 oligomer를 선택하였다. PCR cycle의 조건은 denaturation: 94°C, 1분 30초, annealing: 56°C, 1분, extension: 72°C, 2분으로 총 35 cycle을 실시한다. PCR 후 Gel electrophoresis에 의해 형질전환여부를 판단하였다. positive control로는 original plasmid를 이용하였고 negative control로는 정상 FVB종 genomic DNA를 사용하였다. 그림 1에서와 같이 형질전환생쥐 새끼들의 DNA를 screening한 결과 전체적으로 non-specific band를 나타내고 있었으나 positive control과 같은 약 580 bp의 band를 나타내고 있는 형질전환생쥐를 확인할 수 있었다(그림 16).

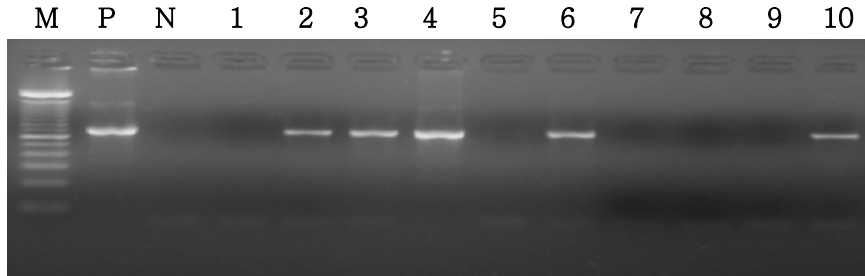


그림 16. tPA 형질전환생쥐의 PCR 분석. M: molecular marker, P: positive control, N: negative control, 1-10: F₁ 새끼 DNA

pBC1-tPA의 경우 XhoI-Sac I digestion에 의해 2 cut이 되어 1.3 kb band가 나타나게 되는데 genomic DNA를 double digestion 시킨 다음 전기영동 후 P³²-tPA probe으로 hybridization 시킨 결과 5마리에서 모두 1,3 kb가 detection 되었다(그림 17). 이식유전자가 생쥐 염색체에 정착된 copy number에서는 founder 형질전환생쥐 line에 1 - 50 copy의 tPA 유전자가 정착된 것으로 나타났다.

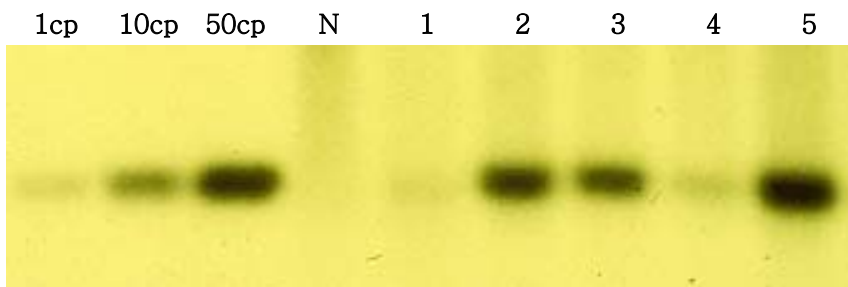


그림 17. tPA형질전환 생쥐의 Southern blot 분석. 1cp, 10cp, 50cp: 1-50 copy positive control, N: negative control, 1-5: 형질전환생쥐 DNA

B) Cell line transfection에 의한 유전자도입 세포주 구축

pBC1-tPA 벡터로부터 β -casein_{promoter}-tPA DNA를 추출하여 pPGC-neo 벡터와 함께 유산양 fetal fibroblast 세포에 lipofectamine과 FuGENE6를 이용하여 transfection 후, G418 medium을 이용하여 14일간 배양하며 자라나는 colony cell을 선별하였다. 선별한 세포는 PCR을 통해 tPA 유전자의 정착유무를 분석한 후 공여핵으로 사용하기 위해 동결보존 하였다(그림 18). 그 결과 세포내에서 도입된 tPA 유전자는 안정적으로 정착된 것을 확인 할 수 있었다. 모두 10 여개의 tPA 유전자 도입 cell line을 구축하였고 복제수정란에 사용하기 위해 염색체검사를 실시하여 모두 정상적인 karyotype을 가진 것으로 확인되었다.

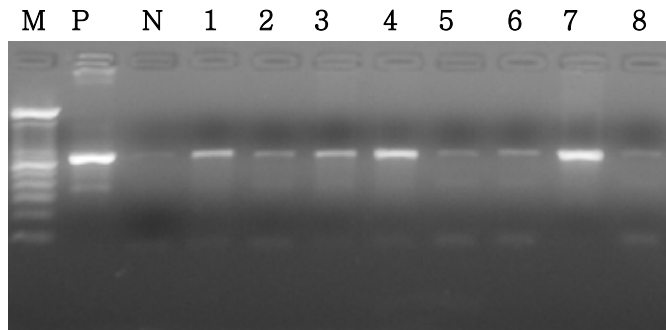


그림 18. tPA-도입 유산양 fetal fibroblast cell의 PCR 분석. M: molecular marker, P: positive control, N: negative control, 1-8: G418-resistant colony DNA

7. 형질전환생쥐의 발현 분석

F₁ 및 F₂ 암컷 형질전환생쥐를 교미시켜 임신시킨 후 분만을 유도하여 분만 후 포유 1 주일 경에 유선으로부터 주사기로 흡입하여 유즙을 회수하였다. 회수된 유즙을 약 1:10으로 희석한 후 단백질정량을 실시하였고 약 20 ug의 유단백을 gel에 loading 하여 Western blotting을 실시하였다. anti-tPA antibody blotting을 실시한 결과 3번과 4번 line이 강하게 발현하고 있고 그 외 line에서는 약하게 발현하고 있는 것으로 확인되었다(그림 19). 그러므로 형질전환생쥐의 mammary gland에서의 tPA가 성공적으로 발현하는 것을 확인할 수 있어 유산양에서도 정상적으로 발현될 수 있을 것으로 사료되었다.

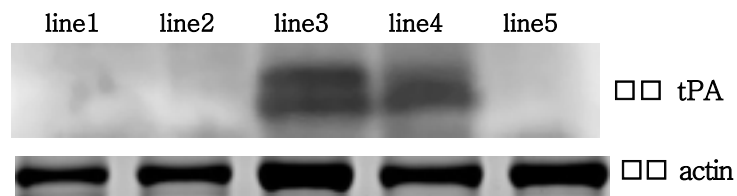


그림 19. 형질전환생쥐 유즙의 Western blotting 분석

8. 핵이식란 형질전환수정란의 생산

A) 핵이식란 및 형질전환수정란의 체외 배양의 최적조건 확립

안정적으로 tPA 유전자가 도입된 유산양 fetal fibroblast cell을 이용하여 재래산양 미수정란에 핵이식한 후 활성화시켜 융합율과 체외 발달능력을 조사하였는데, 그 결과 체세포와의 전기융합율은 68.4% 및 배발달에 있어서는 30%를 기록하여 기존에 보고된 성적과 큰 차이가 없는 것으로 나타났다(표 10).

핵이식형질전환 수정란의 체외 발달능력을 조사하였는데 기존의 산양 medium인 TCM-199과 새로 개발된 G1-G2 medium(Vitrolife Co.) 배양액에서 배양한 결과 상실배기까지의 배발달율은 각각 13% 및 22%로서 G1-G2 medium의 성적이 우수한 것으로 나타나 복제유산양 수정란을 위해서는 G1-G2 medium이 더 적합 것으로 나타났다($P < 0.05$, 표 11).

유산양 복제 핵이식란의 체외배양시 G1-G2 medium only, MEF(mouse embryonic fibroblast), GEF(goat embryonic fibroblast), GOEC(goat oviduct epithelial cell)등의 세포를 이용하여 공동배양하였을 때 핵이식란의 체외 배발달율을 조사하였는데 GOEC가 30%의 상실배가 발달율을 기록하여 가장 높은 것으로 나타났으나 medium only군과 GEF와는 유의성이 없는 것으로 나타나 유산양에서 공배양의 효과는 크지 않은 것으로 나타났다. 이는 G1-G2 medium이 유산양 핵이식란의 체외 배양에 적합한 것으로 공배양의 필요성을 감소시킨 것으로 사료된다.

또한 tPA 유전자가 도입된 체세포를 이용하여 핵이식란을 만든 후 배양하여 핵이식 수정란에 tPA 유전자 유무를 알아보기 위해 PCR 분석을 실시한 결과 수정란 모두 tPA 유전자를 지닌 것으로 관찰되어 체세포 복제 수정란의 생산 기술이 확립되었음을 확인 할 수 있었다(그림 20).

표 10. tPA 유전자가 도입된 유산양 fetal fibroblast cell를 이용한 유산양 핵이식란의 융합율 및 발달율

	No nuclear transferred	No.(%) couplets produced	No.(%) couplets fused	No.(%) developed*
Abattoir derived	250	215 (86.0)	171 (68.4)	75(30.0)

* Four- to eight embryos following 48 hour culture.

표 11. 핵이식 유산양 복제 수정란의 체외배양액에 따른 배발달율

Medium	No. of cloned embryos examined	Cultured oocytes	
		No. of cleaved (%)	No. of morula (%)
TCM-199	100	62 (62.0)	13 (13.0) ^b
G1-G2 medium	100	65 (65.0)	22 (22.0) ^a

^{ab} Means in the same column with different superscript are different (P<0.05)

표 12. 유산양 핵이식란의 공배양에 따른 체외 배발달율

coculture cells	No. of cloned embryos examined	Cultured oocytes	
		No. of cleaved (%)	No. of morula (%)
Medium only	60	36 (60.0)	15 (25.0) ^{ab}
MEF	60	33 (55.0)	13 (21.6) ^a
GEF	60	35 (60.0)	16 (26.6) ^{ab}
GOEC	60	40 (66.6)	18 (30.0) ^a

^{ab} Means in the same column with different superscript are different (P<0.05)

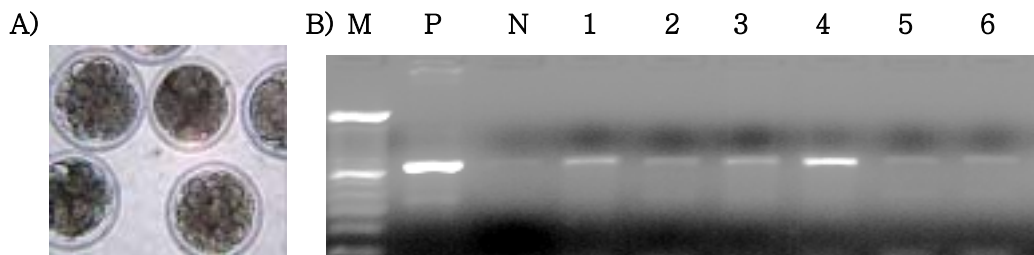


그림 20. tPA 유전자가 도입된 유산양 fetal fibroblast cell를 이용한 유산양 핵 이식란(A)의 PCR 분석(B). M: molecular marker, P: positive comntrol, N: negative control, 1-6: 복제수정란 DNA

B) 효과적인 발정동기화 방법의 검토

사이더(CIDR)를 19일간 질내에 정치시키는 방법은 유산양에게 질염, 자궁내 염증 등 여러 가지 부작용을 일으킬 수 있다. 따라서 좀 더 짧은 시간 동안 사이더를 정치시켰을 때 발정을 유기하는 방법과, 같은 공간에서 사육하는 군의 일정한 수의 유산양에게 사이더를 삽입하였을 때 삽입하지 않은 유산양의 발정 유기율을 검토하기 위해 본 시험을 실시하였다. 발정동기화방법으로는

(가) 사이더 삽입 후, 19일째 제거하면서 PMSG 500IU를 주사하는 방법,

(나) 사이더 삽입 후, 11일째 제거하면서 PMSG 500IU를 주사하는 방법,

(다) 사이더 삽입 후, 9일째 PGF_{2α} 0.3mg와 PMSG 500IU를 동시에 주사하고 2틀 후인 11일째에 사이더를 제거하는 방법,

(라) 같은 공간에서 사육하는 암 유산양의 20%만 (다) 방법을 적용하는 방법으로 나누어 발정동기화율을 비교 검토하였다.

사이더를 정치시키는 시간을 단축하기 위한 방법과 좀 더 경제적인 발정동기 방법을 찾기 위해 시험한 결과, 황체퇴행호르몬인 PGF_{2α}를 병행 투여하면 사이더 삽입 기간을 11일에서도 발정 유도율이 19일 정치법 보다 좋았고, 같은 군의 약 20% 정도에서 발정동기화를 실시하면 처리한 유산양이 발정이 온 후, 실시하지 않은 유산양의 약 86%에서 일주일 내에 발정이 유도되었다(표 13). 사이더를 19일 동안 정치시키는 방법에는 염증 등의 부작용이 발생하여, 정치기간을 11일로 줄이는 시험을 실시하였다. 그 결과 11일 동안 사이더를 정치했던 29두중 2두에서만 미약하게 질 염증이 나타날 뿐으로 19일 정치에서 나타났던 심각한 염증 등의 부작용이 나타나지 않았다. 그러나 단순히 사이더의 정치기간을 단축하는 것만으로는 효과적인 발정유기를 시키지 못하였다 (나 방법).

이 문제를 해결하기 위해 황체퇴행호르몬을 사이더 제거 이틀 전에 처리한 후, 사이더를 제거하면 발정유도율이 19일 정치시킬 때 보다 상당히 좋았다. 보고에 의하면 황체퇴행호르몬을 투여하면 약 48시간 후에 프로게스테론 수치가 최저가 된다고 한다. 그리고 사이더를 제거하면 곧바로 프로게스테론 수치가 낮아진다고 보고되고 있어, PGF_{2α}와 사이더가 상승상용을 하여 우수한 발정유도를 나타낸 것으로 사료된다.

표 13. 다양한 발정동기화 방법에 따른 발정유도율

발정동기화 방법	공시축수	발정유도율
(가) 19일 정치법	126두	94.4%(119두)
(나) 11일 정치법	3두	0%
(다) PGF _{2α} + 11일 정치	12두	100%(12두)
(라) 군내 20% PGF _{2α} + 11일 정치	56두 (미처리) 14두 (처리)	85.7%(48두) 100%(14두)

c) 핵이식 형질전환수정란의 이식

β-casein_{promoter}-tPA DNA를 이용하여 transfection시킨 유산양 fetal fibroblast cell을 가지고 재래산양 미수정란에 핵이식을 실시한 후 발정동기화된 대리모의 난관에 이식하여 하였다. 현재까지 395마리의 embryos를 12마리의 대리모에 이식하여 초음파 진단으로는 3두가 임신한 것으로 관찰되었고 조만간 분만을 기대하였으나 새끼를 분만하지 않았다. DNA microinjection에 의해서는 총 56마리를 이식하여 2두의 대리모에 이식하여 이중 1마리가 임신하여 쌍태를 생산하였다(표 14). 태어난 새끼 폐지의 귀 조직으로부터 genomic DNA를 추출하여 PCR 실시하였으나 형질전환은 확인되지 않았다. 그러나 조만간 태어날 복제 산양에서는 형질전환유산양이 기대되고 있다.

표 14. 형질전환복제 수정란이식 효율

Treatment	No. of cloned embryos transferred	No. of recipients	No. of pregnant recipients	No. of piglets born	No. of transgenic piglets
Nuclear transfer	295	12	3	0	0
Microinjection	56	2	1	2	0

9. 복제유산양 생산

유산양 fetal fibroblast cell을 재래산양 미수정란에 핵이식을 실시한 후 CIDR를 이용하여 발정동기화된 유산양 대리모의 난관에 이식하는 실험을 하였다. 총 19두의 대리모에 총 324 마리의 NT embryos를 이식하여 임신 50일경에 초음파 진단으로는 8두가 임신한 것으로 관찰되었으나 1 마리가 정상적으로 출산하였다 (표 15, 그림 21). 나머지 비분만 대리모에게서는 비정상적인 태아를 분만한 흔적을 찾을 수 없어 조기 유산을 한 것으로 추정된다. 마지막 이식 실험한 것의 경우 임신기간이 아직 남아 있어 정상적인 분만 여부를 기다리고 있다.

표 15. 유산양 섬유아세포를 재태산양난자에 핵이식 후 수정란 이식 후 분만효율

Experiment no*	No. Recipients	No. embryos	No. pregnant (day 50)	No. offspring
1	5	74	2	0
2	4	78	1	0
3	5	77	2	1
4*	5	85	3	-
Total	19	324	8	1

* Waiting for parturition

10. 복제유산양의 유전자형 검사

핵이식에 사용하였던 유산양 섬유아세포와 복제유산양의 체세포에서 genomic DNA를 추출하여 유전자형 검사를 실시하였다. polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) 방법을 이용하였는데 goat major histocompatibility complex (MHC) class II DRB gene(Amills et al., 1995)을 확인하고자 primers를 제작하여 약 286 bp fragment를 확인하였다. (ACB0445: 5' -TATCCCGTCTCTGCAGCACATTTC-3' ; ACB0446: 5' -ATCGCCGCTGCACAC TGAAACTC-3')를 이용하여 증폭하였다. 그림 22에서와 같이 복제 유산양의 유전자형은 donor cell인 유산양 fetal fibroblasts와 같은 pattern을 나타내어 완전한 복제 유산양임을 확인할 수 있었다.



그림 21. 핵이식 유산양의 수정란이식과 복제 유산양. A, 마취 후 수술 준비; B, 수정란이식; C-D, 복제유산양 No 15

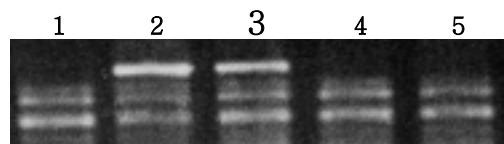


그림 22. 산양 major histocompatibility complex (MHC) class II DRB gene의 PCR-SSCP 분석 결과. lanes 1, ear cells of Korean Native Goat, lanes 2, donor Fetal fibroblast cells, lane 3, ear cells of clone; lanes 4 - 5, ear cells of recipient does.

11. 형질전환복제수정란의 이식

tPA DNA를 transfection시킨 유산양 fetal fibroblast cell을 이용하여 재래산양의 난자에 핵이식을 실시한 후 발정동기화된 Recipient의 난관에 이식하는 실험을 계속하고 있다. 현재까지 422마리의 복제 수정란을 25마리의 recipient에 이식하여 초음파 진단으로는 11두가 임신한 것으로 관찰되었으나 거의 분만에는 실패를 하였고 마지막 5번째 실험군의 대리모를 기대하고 있다(표 16). 지속적인 이식으로 조만간 형질전환유산양의 생산이 기대되고 있다.

표 16. 유산양 섬유아세포를 재래산양난자에 핵이식 후 수정란 이식 후 분만효율

Experiment no	No. Recipients	No. embryos	No. pregnant (day 50)	No. parturition
1	5	88	2	0
2	5	79	2	0
3	5	76	2	0
4	5	89	2	0
5*	5	90	3	-
Total	25	422	11	-

* Waiting for parturitiuon

제 4 절 결론

본 연구에서는 유산양의 효율적인 형질전환용 활용을 위하여 핵이식에 의한 복제 방법을 확립하고 사람 tPA 유전자를 클로닝하고 유선-특이적 발현을 하도록 이식 유전자를 구축하고, 이를 활용하여 형질전환유산양의 생산 체계를 확립하는 것이었다. 이를 위하여 본 연구에서는 tPA 발현 세포주를 이용하여 사람 tPA 유전자 클로닝하고 자아넨종 유산양 β -casein 프로모터를 클로닝 하였으며, 유선특이 발현 벡터인 사람 tPA가 삽입된 pBC1-tPA 벡터 구축하였고 또한 tPA가 삽입된 goat β -casein knock-in tPA 벡터 구축하였다. 그리고 임신 약 50일째된 자아넨종 암컷에서 제왕 절개 수술로 태아를 적출하여 태아로부터 태아세포주(fetal fibroblasts)를 구축하였고 PCR에 의해 성관별을 실시하였다. 유산양 난자이용 시스템을 확립하기 위해 도축장에서 얻은 흑염소 난소의 난포란을 이용한 미성숙 난포란의 채취 및 성숙배양에 대한 연구를 실시하여 성숙배양 조건을 확립하였다. 그리고 체외수정란의 생산을 위해 안정적이고 일정한 유산양이 가장 활력이 좋은 시기의 정액을 채취하여 효과적인 동결 보존을 기술을 확립하였다. 또한 유산양의 발정동기화를 위해 CIDR의 정치기간 영향과 PGF_{2 α} 의 투여효과를 조사하여 배란유기기술의 확립 적절한 발정유기와 배란이 제대로 이루어지는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 유산양에서 효과적인 핵이식란 제조방법을 개발하기 위해 난자의 활성화 조건 및 세포주기 조절 및 융합조건 등 확립확립하였다. 유전자 이식 후 발현상태를 확인하기 위해 GFP 발현 벡터인 pCX-EGFP-neo를 유산양 세포주에 transfection시켜 EGFP-neo gene이 도입된 체 세포주를 확보하였으며 체세포 및 수정란에서 GFP의 발현을 확인하였다. 본 연구에서는 β -casein_{promoter}-tPA 유전자가 형질전환동물에서 정상적으로 유선에서 tPA 단백질이 발현될 것인지 확인하기 위하여 형질전환생쥐를 생산하였다. 암컷형질전환생쥐의 유즙으로부터 tPA 단백질이 다량 발현되는 것을 확인하여 유산양에서도 정상적으로 발현될 수 있음을 확인하였다.

본 연구에서는 유산양 태아섬유아세포를 재래산양 난자에 핵이식하고 유산양 대리모에 이식하여 복제유산양을 생산하여 유산양에서 복제방법의 확립하였다. 아울러

형질전환복제 수정란을 대리모에 이식하는 실험을 수행하였다. 이상에서와 같이 본 과제는 유산양에서 핵이식 방법과, 대리모 동기화 및 형질전환 체계를 차례대로 확인하는 실험과정을 거쳐 유산양에서 복제 및 형질전환에 대한 기술을 확립하여 원래 계획대로 연구를 성공적으로 수행하였다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구에서는 실시하고자하는 개발목표를 거의 완료하였고 본다. 유산양의 복제 및 형질전환을 위한 기초 작업으로 유전자 클로닝 및 이식유전자의 구축과 유산양 세포주의 구축 및 미성숙 난자의 성숙조건과 활성화 등에 대한 기술을 확립하였고, 이를 토대로 유산양 섬유아세포를 재래산양 난자에 핵이식하여 생산된 복제수정란을 대리모유산양에 이식하여 복제유산양을 생산하였다. 계속하여 tPA유전자를 transfection 시킨 유산양섬유아세포를 핵이식하여 대리모에 이식하는 실험을 수행하였다.

본 연구의 결과로 유산양을 이용한 유용단백질의생산이 가능해져 동물생물공학산업분야에 실질적인 응용이 가능해 졌다고 사료된다. 다만 아직도 복제나 형질전환생산 효율이 낮아 효율증진에 대한 연구가 계속적으로 이루어 져야 할 것이다.

1. 유산양용 유전자 벡터의 구축 (달성도: 100%)

A) 유용유전자 및 유선세포 특이 프로모터 클로닝 (달성도: 100%)

- tPA 발현 세포주를 이용하여 사람 tPA 유전자 클로닝

Human fetal lung cell에서 mRNA를 추출하여 RT-PCR에 의해 tPA cDNA를 클로닝 하였다

- 자아넨종 유산양 β -casein 프로모터 클로닝

자아넨종의 genomic DNA 추출하여 PCR을 통해 β -casein 프로모터를 증폭하여 (3kb) 클로닝 하였다.

- 유산양 β -casein knock-in 용 벡터 구축을 위한 5' 및 3' flanking region 클로닝

5' flanking region은 기존에 보고된 β -casein 프로모터와 엑손 1 부위 프라이머를 제작하여, genomic DNA에서 직접 LR-PCR 증폭시켜 클로닝 하였고, 3'-flanking region의 경우에는 엑손 3과 엑손 7 부위에 해당하는 프라이머를 제작하여 같은 방법으로 4.2kb를 클로닝 하였다.

B) 형질전환 유산양용 벡터 구축 (달성도: 100%)

- 외래유전자 도입 확인을 위한 GFP 발현 벡터 pCX-EGFP-neo 구축
외래유전자의 도입 및 발현여부를 쉽게 확인할 수 있도록 GFP 유전자를 발현하는 pCX-EGFP 벡터에 Neo^r 유전자 삽입하여 pCX-EGFP-neo 벡터(약 7.4kb)를 구축하였다
- 유산양 β -casein knock-in 용 기본 벡터 구축 (15kb)
유용유전자의 안정적인 발현을 위해 β -casein 유전자와 homologous recombination 될 수 있도록 5' 및 3' flanking region 클로닝 하여 knock-in될 수 있는 벡터를 완성하였다.
- 사람 tPA가 삽입된 goat β -casein knock-in tPA 벡터 구축 (16.7kb)
구축된 goat β -casein knock-in 기본 벡터에, 클로닝된 사람의 tPA cDNA 재조합 하여 goat β -casein knock-in tPA 벡터를 구축하였다
- 사람 tPA가 삽입된 미세 주입용 pBC1-tPA 벡터 구축 (22.7kb)
미세주입용 벡터는 INVITROGEN에서 시판하는 pBC-1 벡터를 이용하여 사람 tPA 유전자를 삽입한 pBC1-tPA 벡터를 구축하였다.

C) 유산양 태아세포 및 세포주 확립 (달성도: 100%)

- 유량이 좋은 종모축의 귀 세포주 확립 (자아넨종 2년생 암컷)
우수한 종모축의 귀조직을 떼어내어 primary 귀세포를 만들어 동결보존 하였다.
- 50일령 태아 세포주 확립 (자아넨종 암컷 및 수컷)
임신 약 50일째된 암컷에서 제왕절개 수술로 태아를 적출하여 태아로부터 태아 세포주를 구축하였고 PCR에 의해 성관별을 실시하였다.

2. 유산양 난자제조 기술의 확립 (달성도: 100%)

A) 유산양 난자 이용 시스템 확립 (달성도: 100%)

- 도축장 난소의 이용기술의 확립
난자를 안정적으로 확보하기 위해서 도축장에서 얻은 흑염소 난소의 난포란을

이용한 미성숙 난포란의 채취 및 성숙배양에 대한 연구를 실시하여 성숙배양 조건을 확립하였다.

○ 미성숙 난포란의 체외성숙 및 배양기술의 확립

미성숙 난포란의 성숙배양에 TCM-199에 10% FBS, 5ug/ml FSH, 10ug/ml LH, 10ug/ml E₂가 되도록 하여 성숙율이 평균 약 70% 정도의 조건을 확립하였다.

○ 유산양 배란유기 기술의 확립

적절한 발정유기와 배란이 제대로 이루어지는 지 확인하기 위한 실험으로 사이더를 정치기간의 영향과 PGF_{2α}의 투여효과를 조사하였다.

○ 체외수정용 유산양 정액 채취와 동결보존 기술의 확립

수정란의 생산을 위해 안정적이고 일정한 유산양이 가장 활력이 좋은 시기의 정액을 채취하여 효과적인 동결보존을 기술을 확립하였다.

B) 유산양에서 효과적인 핵이식란 제조방법의 개발 (달성도: 100%)

○ 난자의 활성화 기술의 확립

핵이식된 난자의 효율적인 활성화를 위해서는 성숙된 난자의 단위발생 후, CR1과 TCM-199에 발달배양 시켜 48시간째 2~4 cell로 발달하는 비율을 관찰하여 활성화 조건 확립하였다..

○ 귀 세포를 이용한 세포주기 조절 및 융합조건의 확립

유산양 귀 세포주를 혈청기아배양 하여 귀 세포를 G0/G1 상태로 유도한 후 공여핵으로 하여 핵이식란을 만들어 융합율 및 배 발달율을 관찰하였다.

○ GFP 발현 벡터인 pCX-EGFP-neo의 마우스 세포 및 수정란에서 발현확인
구축한 pCX-EGFP-neo 벡터의 발현여부를 마우스의 세포와 마우스 수정란에 미세주입하여, GFP 발현여부를 확인하였다

○ pCX-EGFP-neo가 도입된 유산양 귀 세포주 확립

pCX-EGFP-neo 벡터를 구축한 유산양 세포주에 lipofectamine를 이용하여 transfection한 후, neomycin을 이용으로 selection하여 transfection된 cell을 선별하였다.

3. 형질전환생쥐의 생산 및 유전자 도입 수정란의 생산 (100%)

A) 형질전환생쥐의 생산 및 유전자 정착분석 (달성도: 100%)

- β -casein_{promoter}-tPA DNA를 이용하여 형질전환생쥐 생산
 β -casein_{promoter}-tPA 생쥐 1-cell embryo의 pronucleus로 microinjection하여 총 5마리로 형질전환생쥐를 생산하였다.
- 성숙에 도달한 이들 형질전환생쥐를 교미시켜 F₁을 생산하여 약 20-50%까지의 F₁에 전달되는 것으로 나타나 이식유전자가 염색체상에 정착되었다는 것을 확인할 수 있었다.

B) Cell line transfection에 의한 유전자도입 세포주 구축 (달성도: 100%)

- β -casein_{promoter}-tPA DNA와 pPGC-neo벡터와 함께 유산양 태아섬유아세포에 transfection 후, G418 medium을 이용하여 선별하였고 선별한 세포는 PCR을 통해 tPA 유전자의 정착유무를 분석한 후 공여핵으로 사용하기 위해 동결보존 하였다.

C) 유전자 주입 유산양 수정란 생산기술 확립 (달성도: 100%)

- pBC1-tPA벡터를 산양 수정란에 미세주입(microinjection)하고 배양한 후 tPA 유전자의 정착 여부를 PCR로 관찰하였다.
- 발달된 수정란으로부터 genomic DNA를 추출한 후 PCR으로 tPA 유전자를 검사하여 약 25 %의 형질전환율을 확인하였다.

4. 핵이식란 및 형질전환수정란의 이식 (100%)

A) 핵이식란 및 형질전환수정란의 체외 배양의 최적조건 확립 (달성도: 100%)

- tPA유전자가 도입된 유산양 fetal fibroblast cell을 이용하여 재래산양 미수정란에 핵이식한 후 활성화시켜 융합율과 체외 발달능력을 조사하였다.
- 핵이식형질전환 수정란의 체외 발달능력을 조사하였는데 기존의 산양

medium인 TCM-199과 새로 개발된 G1-G2 medium(Vitrolife Co.)에서 비교실험하여 복제유산양 수정란을 위해서는 G1-G2 medium이 더 적합 것을 확인하였다.

○ tPA 유전자가 도입된 체세포를 이용하여 핵이식란을 만든 후 PCR 분석을 실시한 결과 수정란 모두 tPA 유전자를 지닌 것을 확인 하였다.

B) 핵이식란 및 형질전환수정란의 이식 (달성도: 100%)

○ 유산양 fetal fibroblast cell을 재래산양 미수정란에 핵이식을 실시한 후 CIDR를 이용하여 발정동기화된 유산양 대리모의 난관에 이식하여 1마리의 복제 유산양을 생산하였다.

○ tPA DNA를 transfection시킨 유산양 fetal fibroblast cell을 이용하여 재래산양의 난자에 핵이식을 실시한 후 발정동기화된 Recipient의 난관에 이식하는 실험을 수행하였다.

○ 현재까지 422마리의 복제 수정란을 25마리의 recipient에 이식하여 초음파 진단으로는 11두가 임신한 것으로 관찰되었으나 거의 분만에는 실패를 하였으나 계속적인 이식으로 조만간 형질전환유산양의 생산이 기대되고 있다.

5. 형질전환유산양 및 형질전환생쥐의 유전자 분석 (100%)

A) 복제유산양의 유전자 분석 (달성도: 100%)

○ 핵이식에 사용하였던 유산양 섬유아세포와 복제유산양의 체세포에서 genomic DNA를 추출하여 polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) 방법을 이용하였는데 goat major histocompatibility complex (MHC) class II DRB gene 을 확인하고자 primers 를 제작하여 유전자형 검사를 실시하였다.

○ 복제유산양의 유전자형은 donor cell인 유산양 fetal fibroblasts와 같은 pattern을 나타내어 완전한 복제 유산양임을 확인할 수 있었다.

B) 형질전환생쥐의 발현분석 (달성도: 100%)

- F₁ 및 F₂ 암컷 형질전환생쥐로 부터 분만 후 포유 1 주일 경에 유선으로부터 주사기로 흡입하여 유즙을 회수하여 Western blotting을 실시하였다.
- anti-tPA antibody blotting을 실시한 결과 tPA 단백질이 유즙에서 발현하고 있는 것으로 확인하였다.

6. 복제 및 형질전환 유산양의 생산 및 관리 (100%)

A) 복제 유산양 및 형질전환 유산양의 생산 및 관리 (달성도: 100%)

- 유산양 fetal fibroblast cell을 재래산양 미수정란에 핵이식하여 총 19두의 대리모에 총 324 마리의 NT embryos를 이식하는 실험을 수행하여 1 마리의 복제유산양을 생산하였다.
- tPA DNA를 transfection시킨 유산양 fetal fibroblast cell을 이용하여 재래산양의 난자에 핵이식한 것을 현재까지 422마리의 형질전환복제수정란을 25마리의 recipient에 이식하였다.

B) 임신율 증진방안 (달성도: 100%)

- 적절한 발정유기를 위한 실험으로 장기간 사이터를 질 내에 둠으로서 질염의 가능성이 높아 사이터 정치기간의 단축을 위해 PGF2 α 의 투여효과를 조사하였다.
- 유산양 공시축 4두 모두 사이터를 질 내 삽입한다. 그 중 2두는 사이터 제거이틀전인 9일째에 PGF2 α 와 PMSG를 동시에 주사한군이 모두 발정유기가 잘 된 것으로 나타났다.
- 성숙배양액에 일반적으로 사용하는 항생제인 streptomycin을 첨가하면 성숙율이 유의적으로 저하되는 현상을 발견하였다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구에서는 형질전환복제 유산양을 이용하여 유용단백질을 생산하는 체계를 확립하였으나 인류에 공헌할 수 있는 방안으로 연구가 추진되고 있는 생명공학의 축산학적 응용을 해서는 복제나 형질전환생산 효율이 낮아 효율증진에 대한 연구가 계속적으로 이루어져야 할 것이다. 특히 복제나 형질전환에서의 문제점을 분자생물학적인 수준과에서의 연구가 더욱 필요한 것으로 사료된다.

본 기술개발을 모델로 하여 다음과 같은 목적의 연구와 연계시켜 사회·경제적으로 삶의 질을 향상시킬 수 있는 기술을 국내 관련기관에 이전하고자 한다.

- 가. 유전자 재조합에 관련된 연구 및 산업활동분야
- 나. 모든 동물의 난포란의 회수와 이용에 관련된 연구 및 산업활동분야
- 다. 외래유전자를 난자내에 도입하려고 시도하는 모든 연구 분야
- 라. 동물 수정란의 이용효율을 제고하고자 하는 모든 연구 및 산업분야
- 마. 동물 수정란의 이식 성적을 높이기 위해 실시하는 모든 연구 및 산업분야
- 바. 형질전환동물을 생산하고자 하는 모든 연구와 산업분야
- 사. 동물의 특정부위를 형질전환시켜 유용 단백질을 생산하고자 하는 모든 연구와 산업분야
- 아. Animal bioreactor system을 개발하고 bioactive substances를 동물체에서 생산하고자 하는 모든 연구와 산업분야
- 자. 수정란이식을 전담하는 공무원이나 수정란이식사의 교육자료

또한 본 연구의 지속적인 효율증진에 대한 추가 연구를 통해서 기술체계의 확립에 의한 기술을 국내 유관기관에 이전하여 공동으로 활용하고자 하는 노력으로 국제 경쟁력이 있는 축산업의 산업화를 실현할 수 있을 것이다.

제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

형질전환동물 생산기법은 가축의 개량은 물론 고품질 축산물의 생산, 유용생리활성물질의 대량생산 및 인체질환모델 동물개발 등에 광범위하게 응용될 수 있는 기술이다. 따라서, 생물공학 및 의약품 산업이 21세기의 주요 산업이 되리라는 세계적인 추세를 반영하여 2000년대 초에 산업화가 이루어지면서 더욱 급속히 발전하고 있다. 특히, 국외에서는 주요 3社를 중심으로 연구가 진행되고 있으며, 최근 공동연구 체제를 확립하여 독점적 기술 우위를 점하려 하고 있다. 이와 관련한 일련의 특징을 살펴보면 다음과 같다.

- 형질전환 주요 3社간의 협력체제 구축

- 주요 3社 : Genzyme Transgenic(USA), Pharming Healthcare NV(Netherland), PPL therapeutics(UK)
- 협력체제의 예 : Genzyme Transgenic과 Pharming Healthcare NV간 Joint-Venture의 형태로 α -glucosidase 의약품 개발을 위해 생산, 임상시험, marketing등에서 영역분담.

- 형질전환 동물의 소형화

- 주로 면양, 산양, 토끼 등을 이용한 연구가 진행중이며, Factor IX의 경우 세계 시장의 필요량을 공급하는데 산양 약 100두 정도로 추정됨.

- Transgenic 기법에 의해 만들어진 형질전환동물을 체세포 복제 기술로 계통 유지 및 자손 획.

- Genzyme Transgenic의 경우 Antithrombin III를 생산하는 형질전환산양태아세포를 이용하여 복제 산양을 생산하여 이를 상업적으로 이용할 계획임.

- 형질전환 주요 3社와 기존 주요 제약업체간의 협력체제 구축.

- Genzyme Transgenic과 Lilly간의 기존 단백질 제제 의약품의 생산을 Transgenic 기법으로의 전환 모색.

국외 주요 3社의 생체반응기 생산 단백질의 상업화 현황을 보면 다음과 같다.

- 국외 주요 3社の 생체반응기 생산 단백질의 상업화 현황

	Anti-thrombin III (rhATIII)	α_1 -anti-trypsin (rhAAT)	α -glucosidase (haGLU)
Specise	Goat(β -casein)	Sheep(BLG)	Rabbit(WAP)
Therapeutic application	Acquired ATIII deficiency	Cystic fibrosis - Aerosol delivery	Glycogen storage Disease Type II
Expression(g/L)	14	15	8
Annual need(kg)	75	5,000	20
Development Status	Phase III clinical trials	Phase II clinical trials	Phase I / II clinical trials
Company	Genzyme Transgenics (Framingham, MA)	PPL Therapeutics (Edinburgh, Scotland)	Pharming Healthcare Products (Leiden, The Netherlands)

제 7 장 참고문헌

- Amills, M.O. Francino and A. Sanchez, 1995. Nested PCR allows the characterization of TaqI and PstI RFLPs in the second exon of the caprine MHC class II DRB gene, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 48:313 - 321.
- Andersen, D.C. and L. Krummen. 2002. Recombinant protein expression for therapeutic applications, *Curr. Opin. Biotechnol.* 13 : 117 - 123.
- Armstrong, D.T., A.P. Pfitzner, K.J. Potter, G.M. Warnes, P.O. Janson and R.F. Seamark. 1982. Ovarian responses of anoestrous goats to stimulation with pregnant mare serum gonadotropin. *Anim. Reprod. Sci.*, 5 : 15
- Baguisi. A., Behboodi. E., Melican. D. T., Pollock. J. S., Destrempes. M. M., Cammuso C., Williams. J. L., Nims. S. D., Poter. C. A., Midura. P., Palacios. M. J., Palacios. M. J., Aryes. S. L., Denniston. R. S., Hayes. M. L., Ziomek. C. A., Meade. H. M., Godke. R. A., Gavin. W. G., Overstrom. E. W., and Echelard. Y. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotech.* 17 : 456
- Brett C. Reggio., Aidita N. James, Heather L. Green, William G. Gavin, Esmail Behboodi, Yann Echelard, and Robert A. Godke. 2001. Cloned transgenic offspring resulting from somatic cell nuclear transfer in the goat: Oocytes derived from both follicle-stimulating hormone-stimulated and nonstimulated abattoir-derived ovaries. *Biol. Reprod.* 65 : 1528
- Campbell. K. H. S., Loi. P., Otaegui. P., and Wilmut. I., 1996. Cell cycle coordination in embryos cloning by nuclear transfer. *Rev. Reprod.* 1 : 40

- Cibelli J. B., Stice. S. L., Golueke. R. J., Kane J. J., Jerry. J., Blackwell. C., Ponce de Leon. F. A. and Robl. J. M., 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280 : 1256
- Collen, D. and H. Lijnen, 1994. In: G. Stamatoyannopoulos, A.W. Nienhuis, P.W. Majerus and H. Varmus (Editors). *The Molecular Basis of Blood Diseases*, W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp 725 - 752.
- Freitas V.J.F., G. Baril, J. Saumande. 1997. Estrus synchronization in dairy goats: use of fluorogestone acetate vaginal sponges or norgestomet ear implants. *Ani. Repro. Sci.* 46 : 237
- Gordon. K., E. Lee., Vitale. J. A., Smith. A. E., Westphal. H. and Hennighausen. L., 1987. Production of human tissue plasminogen activation in transgenic mouse milk. *Bio. Technology.* 5 : 1183
- Kolb, A.F., Ansell, R., McWhir, J. and Siddell, S.G. 1999. Insertion of a foreign gene into the β -Casein locus by Cre-mediated site-specific recombination. *Gene* 227 : 21
- Kumar, S., Clarke, A.R., Hooper, M.L., Horne, D.S., Law, A.J.R., Leaver, J., Springbett, A., Stevenson, E., and Simons, P. 1994. Milk composition and lactation of β -casein deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 : 6138
- Kundu C.N., J. Chakraborty, P. Dutta, D. Bhattacharyya, A. Ghosh, G.C. Majumder. 2000. Development of a simple cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. *Cryobiology* 40 : 117
- Lechner, J., Weltet, T., Tomasi, J.K., Bruno, P., Cairns, C., Gustafsson, J., and Doppler, W. 1997. Promoter-dependent Synergy between Glucocorticoid Receptor and Stat5 in the Activation of

- β-Casein Gene Transcription. *J. Bio. Chem.* 272(33) : 20954
- Ongeri, E.M., Bormann, C.L., Butler, R.E., Melican, D., Gavin, W.G., Echelard, Y., Krisher, R.L. and Behbood, E. 2000. Development of goat embryos after in vitro fertilization and parthenogenetic activation by different methods. *Theriogenology* 55 : 1933
- Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa and T. Sekiya. 1989a Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:2766 - 2770.
- Orita, M., Y. Suzuki, T. Sekiya and K. Hayashi. 1989b A rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction, *Genomics* 5 (1989), pp. 874 - 879.
- Roberts, B.T., Ditullio, P., Vitale, J., Hehir, K. and Gordon, K. 1992. Cloning of the goat beta-casein encoding gene and expression in transgenic mice. *Gene* 121 : 255
- Sasaki, H., Saito, Y., Hayashi, M., Otsuka, K. and Niwa, M. 1988. Nucleotide sequence of the tissue-type plasminogen activator cDNA from human fetal lung cells. *Nucleic Acids Res.* 16 : 5695.
- Schenieke, A. E., Kind A. J., Ritchie. W. A., Mycock. K., Scott. A. R., Ritchie. M., Wilmut. I., Colman. A., Campbell. K. H., 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science.* 278 : 2130
- Wakayama T., Perry. A. C., Zuccotti. M., Johnson. K. R., Yanagimachi. R., 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cummulus cell nuclei. *Nature* 394 : 369
- Wilmut. I. and Whitelaw. C. B., 1994. Strategies for production of pharmaceutical

proteins in milk. *Reprod. Fertil. Dev.* 6 : 625

Wilmot, I. A. Schnieke, J. McWhir, A.J. Kind and K.H.S. Campbell, 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells, *Nature* 385 : 810