

최 종
연구보고서

2004117-3

웅성생식세포 유래 물질을 이용한 돼지
체세포핵이식기술의 향상

Improvement of Somatic Cell Nuclear Transfer Technology
using Testis-derived Cell Extracts

서울대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “응성생식세포 유래 물질을 이용한 돼지 체세포핵이식기술의 향상에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 5월 23 일

주관연구기관명 : 서울대
총괄연구책임자 : 노상호
세부연구책임자 : 노상호
협동연구기관명 : 건국대
협동연구책임자 : 조쌍구

요 약 문

I. 제 목

웅성생식세포 유래 물질을 이용한 돼지 체세포핵이식기술의 향상 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 돼지의 정자관련세포를 이용하여 분화된 체세포를 재프로그래밍하여 후성적 변화를 유도함과 동시에 변화된 세포를 핵이식에 이용, 돼지의 핵이식 효율성 향상을 체외에서 검증한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 웅성생식세포 유래물질을 Streptolysin-O를 이용한 가역적 핵막투과체계를 이용, 정자세포 및 Sertoli 세포의 추출물을 체세포 내에 침윤시켜 DNA 구조 및 체세포의 후성적 재프로그래밍을 분석한다. 세포 재프로그래밍이 효율적으로 이뤄진 세포를 FACS를 통해 선별하여 핵이식 실시 후, 일반적인 체세포 핵이식 수정란과 발육률 등 그 성상을 비교해본다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 완전한정배양체계 하에서 단위발생 및 핵이식란의 Kinetin 첨가 효과

단위발생란을 이용하여 핵 주입에 의해 생산된 핵이식란을 아미노산이 첨가된 배양 체계 하에서 배양하여 배반포로의 발육을 유도한 결과 아미노산이 첨가된 한정배양체계 (NC-PVA) 하에서 배반포를 획득할 수 있었다. 돼지의 단위발생란과 핵이식란의 초기 배아발달과정에 있어 kinetin이 미치는 영향을 조사한 결과 kinetin이 배반포의 품질 및 핵이식란의 배반포 발육을 향상시키는 인자임을 확인하였다.

2. Kinetin 첨가 배양액에서 체외배양된 핵이식란의 분자생물학적 분석

각종 핵이식 및 단위발생 배반포의 유전자발현 정상성을 분석하기 위해 분자생물학적 기법을 이용하여 대사와 관련된 각종 유전자를 분석하여 (β -actin, Heat shock protein-70, Glucose transporter-1, poly [A] polymerase) kinetin 첨가군에서 HSP-70의 발현이 정량적으로 증가함을 확인, kinetin에 의한 HSP-70의 발현촉진을 통해 핵이식란이 받는 스트레스가 방어되는 것으로 판단된다.

3. One-step 핵 주입에 의한 핵이식란의 생산

탈핵, 탈핵확인, 세포주입 및 융합으로 이뤄지는 공정을 탈핵 및 핵직접주입으로 단순화시킨 one-step 핵이식에 의한 돼지 핵이식란이 일반 핵이식란에 비하여 높은 배반포 발생효율을 나타내어 작업절차를 단순화한 one-step 핵이식기법이 돼지에서는 효율적인 복제배아 생산방법으로 제시되었다.

4. 고환추출물을 이용한 fibroblast의 응성생식세포화 재프로그래밍

체외배양한 fibroblast cell에 230 ng/ml SLO를 5 ul를 처리하고, cell extract 를 처리 해 보았다. Streptolysin O를 처리한 후 cell morphology의 변화는 보이지 않았으며 SOX9 과 PGK-2, Protein C 3가지의 유전자가 발현됨을 알 수 있었다. 이들 결과로부터 porcine testis의 sertoli extracts를 체세포 내로 도입함으로써, porcine fibroblast cell의 유전자 발현 양상을 변화 시킬 수 있음을 확인하였다.

5. 응성생식세포로 재프로그래밍된 공여핵을 이용한 핵이식

응성생식세포로 재프로그래밍된 세포를 공여핵으로 이용한 결과 핵이식 배반포 생성율이 유의적으로 증가하였다. 이에 어떤 요소들이 생산성을 향상시켰는지 확인하기 위한 지표로서 세포의 성장, 대사 및 전사능과 관련하여 B-actin, glucose transporter-1 및 Poly[A], 전능성과 관련하여 Pou5f 및 Nanog, 핵이식에 의한 재프

로그래밍 후 음성생식세포로 재프로그래밍된 세포의 핵이식 후 경향성 확인을 위해 Sox-9, 초기 착상과 관련하여 cdx-2의 발현을 상대적으로 비교한 결과 음성생식세포로 재프로그래밍된 세포는 핵이식 후에도 일반세포에 비하여 여전히 Sox-9이 높게 발현되는 것을 확인할 수 있었으며 기본적인 대사능이나 전사능도 일반 세포로 핵이식한 경우에 비해 높게 나타나는 경향을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 음성생식세포로 재프로그래밍된 공여핵을 핵이식에 이용할 경우 착상 전 또는 초기 착상시기의 핵이식란의 발생능 및 생존성을 향상시킬 수 있을 것으로 생각된다.

6. 활용계획 및 활용에 대한 건의

본 연구가 마무리된 현 시점에서 논문형태로 2건이 AAAP 국제학술대회에서 발표되었으며 '키네틴을 이용한 포유동물의 임신초기 배아의 배양'이라는 제목의 국내특허가 1건 출원되었으며 국제적 학술지에 현재 2건의 논문이 이미 투고되었고 추가적으로 2건이 투고를 준비하는 과정에 있다. (활용결과보고서에 별도로 보고). 이 외에 매년 2회 이상 국내 및 국제학술대회에서 본 연구과제의 중간결과물을 초록으로 발표한 바 있다.

본 연구에서 확보된 기술을 의학 및 생명과학과 관련된 산업체에 이전하여 특수목적용 복제돼지의 생산효율을 높이거나 질환 모델동물을 생산하는데 활용할 수 있다. 특히 이러한 새로운 접근방식에 의한 효율적인 복제돼지의 생산은 장차 장기이식용 형질전환 복제돼지의 생산효율 향상에 크게 기여할 수 있는 바, 본 연구결과를 대체 장기이식개발과 관련된 연구단체 등에 제공함으로써 국제적으로 경쟁력을 갖추어나가고 있는 국내의 이종 장기이식개발을 더욱 앞당길 수 있을 것이다. 아울러 최근 각광을 받고 있는 생명공학산업에서 축산 및 수의학에 근간을 두고 있는 이러한 연구가 성과를 이룸으로 말미암아 타 분야와의 공동연구를 통한 관련 대학 및 산업계의 연구인력 창출에도 이바지할 수 있을 것이다.

SUMMARY

(영문요약문)

To improve the efficiency of pig cloning, new somatic cell nuclear transfer technology was proposed. The title of this study was "improvement of somatic cell nuclear transfer technology using testis-derived cell extracts" and the results are as below.

1. Establishment of protein-free and completely defined culture medium and optimization of *in vitro* developmental condition of porcine nuclear transfer embryos by addition of 200 μ M kinetin in the medium.
2. Increased expression of Hsp70 and Poly[A] genes by kinetin supplementation in nuclear transfer embryos may be the evidences of stress adaptation by Hsp70 and RNA processing control by Poly[A] as protein carrier.
3. Improvement of blastocyst production by one-step nuclear transfer in porcine somatic cell nuclear transfer program. In this simplified method, enucleation and nuclear injection are performed simultaneously with same microinjection.
4. Reprogramming of porcine fibroblasts into male germ cell functioning cells using testis-derived cell extracts. Without morphology change, the male germ cell specific markers were expressed in the reprogrammed fibroblast cells.
5. Nuclear transfer of reprogrammed donor nuclei. In the reprogrammed cell nuclear transfer blastocysts, expression levels of B-actin, Glucose

transporter-1 (metabolism), Nanong (pluripotency), Cdx-2 (implantation) and Sox-9 (male germ cell differentiation) were increased. These results suggest that nuclear transfer with reprogrammed cells may increase the developmental competence of pre- and peri-implantation stage nuclear transfer embryos.

6. Application of the technology. Two research articles were published as full papers in AAAP 2006 Congress proceeding book, and more than two original articles were submitted to peer-reviewed journals. Two or three more articles are in preparation. A patent entitled 'Supplementation of kinetin for mammalian preimplantation embryo development' is pending now.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1	Introduction	9
Verse 1	Purposes, necessities and Scope	9
Chapter 2	Current status of technical development	14
Verse 1	International and domestic conditions	14
Verse 2	The status of our results	14
Chapter 3	Contents and results	15
Verse 1	Materials and methods	15
Verse 2	Results and products	21
Chapter 4	Achievement and contribution	56
Verse 1	Viewpoint and criteria of evaluation	56
Verse 2	Achievement (annual report)	57
Verse 3	Contribution to the related fields	59
Chapter 5	Application plan	60
Verse 1	Expected outcome	60
Verse 2	Needs for further study and its application	61
Chapter 6	References	63

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 -----	9
제 1 절	연구개발의 필요성 및 범위 -----	9
제 2 장	국내외 기술개발 현황 -----	14
제 1 절	기술개발현황 -----	14
제 2 절	기술개발현황에서 차지하는 위치 -----	14
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 -----	15
제 1 절	연구수행 방법 -----	15
제 2 절	연구내용 및 결과 -----	21
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	56
제 1 절	평가의 착안점 및 기준 -----	56
제 2 절	연구개발목표의 달성도 -----	57
제 3 절	관련분야의 기술발전예의 기여도 -----	59
제 5 장	연구개발결과의 활용계획 -----	60
제 1 절	연구개발결과의 기대효과 -----	60
제 2 절	활용계획 및 추가연구의 필요성 -----	61
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보-----	62
제 7 장	참고문헌 -----	63

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성 및 범위

1. 기술적 측면

가. 핵이식 : 체세포 유래 복제동물 생산기법은 의학 및 농업 분야의 획기적인 개선을 가져올 수 있는 강력한 신기술이다. 복제동물 생산기법은 유전공학 기술과 접목하여 유용 단백질 생산 및 이종 이식용 장기생산 등의 가능성을 제공하고 있을 뿐만 아니라 사람에서 환자의 체세포를 이용, 핵이식을 통해 배아줄기세포를 생산하는 핵이식 치료기법을 이용하여 면역거부반응이 없는 세포 및 조직을 생산할 수도 있다. 핵이식은 중기 II기에 있는 난자 (MII)에서 모계 유래의 유전자를 제거한 후 원하는 유전형질을 지닌 체세포의 핵을 주입 또는 융합하는 과정을 거친다. 재구축된 수정란은 인위적 활성화를 통하여 발육을 시작하게 된다. 성공확률은 동물 종에 따라 다양하게 나타나고 있다 (1-10%). 체세포 복제는 소, 양, 산양, 돼지, 마우스, 고양이, 토끼, 말 및 랫드에 이르기까지 대부분의 포유동물에서 그 성공예가 보고 되었다. 소에서는 이식한 배반포에서 10-15%의 산자생산이 보고 되었으며 이는 마우스나 돼지 등 다른 동물 종에 비해 월등히 높은 수준이다 (Oback et al. 2003, Chavette-Palmer et al. 2002). 그러나 일반적으로 어떠한 동물 종을 막론하고 현재까지 체세포 핵이식의 성공확률은 매우 낮은 수준으로 작출한 복제 수정란의 2-5%만이 산자로 태어나고 있다 (Mann and Bartolomei 2002). 또한 체세포 복제에 의해 태어난 산자의 상당비율이 과체중, 거대태반, 고폐압 및 호흡기장애 등을 보이고 있다 (Mann and Bartolomei 2002). 이러한 발육이상은 핵이식란이 정상 수정란과는 달리 초기 배아발육에 필수적인 몇 가지 절차들을 정상적으로 거치지 못하는데 기인하고 있다. 대부분의 핵이식란은 착상을 전후하여 사멸하는데 최근의 연구결과들에 의하면 이것은 태반형성 및 모체와 태아의 상호작용이 결여되는 것에 기인하는 것으로 알려져 있다 (De Sousa et al. 2001, Hill et al. 2000, Dinnyes et al. 2002). 이것은 발생과정 중 부계 유전자의 발현 과정에

문제가 있다는 것을 시사한다. 배아 형성기간 중 모계 유래 유전체와 부계 유래 유전체는 개체발생에 있어서 각각 다른 역할을 하고 있다. 부계 유전체는 배아외조직의 형성에 관여하는 유전자 군을 발현하는데 반해 모계 유전체는 우선적으로 배아 자체의 발생에 관여한다 (Surani, 2001). 최근의 핵이식연구는 배반포의 발생을 증진뿐만 아니라 복제 배아의 이러한 결함의 원인을 규명하고 제거하는 쪽에 초점을 맞추고 있다.

나. 포유류의 고환 및 정자 : 포유류의 고환은 엽으로 나뉘어져 있으며 각각의 엽은 치밀하게 감겨있는 정세관으로 구성되어 있다. 정자의 생성은 이 정세관 내에서 이뤄진다. 정세관은 결합조직과 남성호르몬인 안드로젠을 생산하는 Leydig 세포에 의해 둘러싸여 있다. 정자생성은 정세관의 변연부에서 시작되어 관의 중심에 있는 내강 쪽으로 진행된다. 정모세포는 분열과 동시에 몇 단계를 거쳐 성숙한 정자로 분화된다. 이러한 분화는 Sertoli 세포에 의해 조절된다. Sertoli 세포는 거대세포의 하나로 관 변연부에서 내강까지 이어져 있으며 분비작용을 통해 정자의 발생을 유도한다 (Martini et al. 1998). 성숙한 포유류 정자의 염색질은 체세포의 염색질과는 그 구성성분이 다르다. 수컷생식세포 내의 유전자는 히스톤에 결합하고 있지 않다. 정자핵의 유전자는 프로타민을 주축으로 하는 별개의 단백질들과 결합하고 있다. 프로타민과 결합한 염색질은 일반 체세포 중기 염색질에 비해 6배 가량 더 치밀하게 응축되어 있어 정자를 가장 핵밀도가 높은 진행세포로 만든다 (Fuentes-Mascorro et al. 2000). 프로타민 P1은 모든 동물에서 발견되며 (Coelingh et al. 1972) P2는 마우스와 사람에서만 발견된다 (McClay and Clark 2003). 이렇듯 치밀하게 응축된 염색질은 부계 유전체의 불활성화와 전사억제 효과를 갖는다. 부계 염색질의 이러한 특징을 체세포 복제 시 적용할 수 있다면 재프로그램 효율을 증가시키는 데 잠재적으로 이용될 수 있을 것이다. 정자생성 시 히스톤연결 염색질에서 고농축 프로타민연결 염색질로의 전환은 곧바로 이뤄지지 않는다. 염색질은 전이단백질 (transition protein; TP)라 불리는 중간 단계의 단백질과 결합하면서 히스톤에서 프로타민으로의 전이를 진행한다. 소의 경우 정자세포가 정자로 전환되는 과정동안 히스톤은 4단계의 전이단백질 (TP1-TP4)로 교체된다. 그리고 마지막으로 프로타민 전구체 (pro-protamine)로 교체된 후 최종적으로 프로타민으로 대체된다 (McLay and Clarke 2003, Dadoune 2003). 원형 및 연장

정자세포 (round and elongating spermatid)에서 발현되는 TP는 안드로겐결합 단백질 (androgen-binding protein; ABP)에 의해 전사가 촉진되고 조절되는 것으로 알려져 있다 (Della-Maria et al. 2002). ABP는 Sertoli 세포에서 생산되며 TP1을 암호화하는 유전자인 *Tnp1*의 전사를 상향조절한다. 랫드에서도 ABP분비와 *Tnp1*의 발현에는 직접적인 관련이 있음을 증명되었으며 (Della-Maria et al. 2002), ABP의 분비 수준이 정자의 수정능력과 관련 있음 또한 증명되어있다 (Anthony et al. 1984).

다. 세포추출물을 이용한 역분화 유도 : 특정 체세포가 DNA/RNA-free 세포추출물을 이용, 후성적 재프로그래밍 과정을 거쳐 다른 종류의 체세포로 전환될 수 있다는 것이 알려져 있다. Hakelien 등 (2002)은 streptolysin-O (SLO)를 이용하여 세포막의 투과성을 높인 후 체세포 내로 세포추출물을 도입하였다. SLO는 콜레스테롤에 결합하여 세포 원형질막 내에서 지름 13 nm 정도의 multisubunit pore를 형성하는 화학물질의 하나이다. Hakelien 등 (2002)의 실험에서 재프로그래밍된 세포는 재봉합되고 배양되어 역분화 여부가 분석되었다. 역분화는 염색질의 리모델링, 특히 단백질발현 및 세포추출물을 제공한 세포에서 보이는 다양한 기능을 발현함으로써 증명되었다. 이러한 결과는 적어도 체외에서는 특정성질의 체세포가 다른 종류의 세포핵을 재프로그래밍하여 자신의 고유한 형질로 유도하는 인자들을 내재하고 있다는 것을 보여준다.

라. 정자화 체세포 (sperm-like somatic cell)를 이용한 핵이식 : 난자의 세포질 내에는 체세포 유전체의 후성적 재프로그래밍을 유도할 능력이 있음이 핵이식을 통해 증명되고 있다 (McLay and Clarke, 2003). 기본적으로 핵이식은 탈핵 난자에 2배체 외래핵을 주입한다는 점을 제외하면 수정 후 정자핵이 난자 내에서 보이는 염색질 탈응축 및 재응축, 핵막종대 및 기타 염색질 재프로그래밍 현상을 그대로 재현한다. 따라서 각각의 단계에서 정자와 난자의 수정과정에 나타나는 현상과 유사한 환경을 조성하는 것이 보다 온전한 체세포핵의 재프로그래밍을 유도하는 방법의 하나라고 가정할 수 있다. 따라서 체세포 핵이 정자 염색질의 기질을 갖도록 세포핵의 변화를 유도하면 핵이식 후 정상수정란과 최대한 유사한 후성적 변화과정을 거쳐 기존의 방법에 비해 핵이식유래 배아의 정상성을 높일 가능성이 있다. 또한 정자가

유도하는 난자의 활성화와 유사한 자극을 유도하여 인위적 활성화를 배제할 수도 있게 된다. 특정세포로 분화된 세포의 성상을 전환하는 방법에는 세포융합 (Tada et al., 2001) 및 세포추출물의 도입 (Hakelien et al., 2002) 등의 방법이 있으나 세포융합의 경우 기존세포의 핵을 제거하는 방법의 개발이 아직 정립되지 않아 기술적으로 적용하기 어려운 부분이 있는 반면에 세포추출물을 이용하는 방법의 경우 상대적으로 명확한 결과를 얻을 수 있어 이와 같은 접근방식으로 체세포의 핵이식이 이뤄진다면 보다 높은 비율로 정상에 가까운 세포의 생산이 가능할 것으로 판단된다. 이러한 일련의 과정을 거쳐 재프로그래밍된 세포는 비록 완전한 전능성을 지니지 않았다 하더라도 재차 핵이식 복제과정을 거쳐 정상 발생에 보다 근접한 결과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

2. 경제·산업적 측면

체세포 복제는 소, 양, 산양, 돼지, 마우스, 고양이, 토끼, 말 및 랫드에 이르기까지 대부분의 포유동물에서 그 성공예가 보고 되었다. 소에서는 이식한 배반포에서 10-15%의 산자생산이 보고 되었으며 이는 마우스나 돼지 등 다른 동물 종에 비해 월등히 높은 수준이다 (Oback et al. 2003, Chavette-Palmer et al. 2002). 그러나 일반적으로 어떠한 동물 종을 막론하고 현재까지 체세포 핵이식의 성공확률은 매우 낮은 수준으로 작출한 복제수정란의 2-5%만이 산자로 태어나고 있다 (Mann and Bartolomei 2002). 소를 제외한 동물에서의 이러한 비효율성은 체세포 복제를 통한 적용이 다양한 돼지 및 기타동물에서의 산업화가 더디게 진행되는 원인이 되고 있다. 특히 이종장기 공급용 동물로 주목받고 있는 돼지의 경우 핵이식 복제기법의 적용 시, 소에 비해 연구재료의 확보가 상대적으로 용이하고 동시에 다수가 참여하는 노동집약적인 방법으로 대규모의 물량지원에 집중함으로 말미암아 상대적으로 낮은 성공률에도 불구하고 효율성을 높이려는 연구는 더디게 진행되고 있으며 이는 실질적으로 산업화에 장애요인이 되고 있다. 따라서 돼지에서 정자 생성에 관련된 세포를 이용하여 재프로그래밍된 체세포를 공여핵원으로 이용하여 핵이식의 효율 및 정상 산자 생산의 가능성이 높아진다면 보다 빠른 산업화에도 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

3. 사회·문화적 측면

핵이식기술을 이용한 복제동물의 탄생은 농업생명과학 분야를 한 단계 높은 성과임에는 틀림없으나 줄기세포의 응용과 더불어 사회적으로 큰 파장을 일으킨 분야이기도 하다. 그러나 과도한 난자 샘플의 이용 및 낮은 효율성에 머물러있는 동물실험의 결과는 장차 사람에서 적용될 가능성이 있는 체세포 핵이식 세포치료기법의 적용에 있어서 소모적이라는 우려를 낳고 있으며 상당한 수준에 이르는 비정상산자의 생산은 핵이식기술 자체에 대한 정당성에 의문을 낳게 하는 부분이 되고 있다. 따라서 낮은 효율성의 극복 및 정상성의 유도가 가능한 기법이 개발된다면 이종장기 혹은 세포이식과 관련된 연구에 있어서 핵이식의 효용성 및 중요성을 일반 사회집단에 설명할 수 있을 것이며 실제적으로 이종장기용 동물의 생산이나 자가 세포치료기술의 개발에 있어 더욱 우려를 잠재울 수 있을 것이다. 이러한 과정을 통해 농업뿐만 아니라 의약학 분야에도 크게 기여함으로써 날로 외면당하고 있는 축산수의분야의 기반기술에 대한 중요성을 부각시킬 수 있을 것으로 생각된다.

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

제 1 절 기술개발 현황

1. 국외현황

- Polejaeva 등 (2000) : 최초의 체세포 복제돼지 생산
- Tada 등 (2001) : 마우스 배아줄기(ES)세포를 이용한 thymocyte의 줄기세포화 성공
- Hakelien 등 (2002) : Cell extract를 이용한 세포의 trans-differentiation 보고
- 호주 Monash 대학 (진행중) : 소에서 정자관련세포를 이용한 체세포의 유사정자세포화 시도

2. 국내현황

- Roh와 Hwang (2002) : 돼지 핵이식 시 활성화 및 배양조건 수립
- Hyun 등 (2003) : 국내최초의 형질전환 체세포 복제돼지 생산

제 2 절 기술개발 현황에서 차지하는 위치

본 연구는 현재 생명과학분야에서 가장 관심을 가지고 있는 줄기세포와 관련된 연구 분야의 하나로서 기반기술이 확보될 경우 줄기세포와 관련된 다양한 분야에 응용이 가능할 것으로 판단되며 아직까지 낮은 수준인 돼지의 복제효율을 높임으로써 국내에서 차세대사업의 하나인 이종 장기생산 동물로서의 돼지생산과 관련된 분야에 크게 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

제 3장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 연구수행 방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
체세포 배양	돼지 태아 섬유아세포 배양	<ol style="list-style-type: none"> 1. 35-40일령의 태아 조직으로부터 획득 2. 머리와 사지, 내장을 분리하고 trypsin 처리 3. 2mM L-glutamine이 함유된 DMEM 배양액으로 포화습도인 5% CO₂, 39°C 배양기 내에서 배양
세포추출물 정제 및 추출물 검증	고환에서의 정자세포와 Sertoli 세포의 분리 및 추출액 회수와 검증	<ol style="list-style-type: none"> 1. 돼지고환의 정세관 조직 분해 2. 정자와 sertoli 세포 추출 3. 세포추출액의 단백질 정량 및 단백질 조성 분석
재프로그래밍	세포의 재프로그래밍 분석을 위한 유전자 선별 및 염기서열 분석	<ol style="list-style-type: none"> 1. 세포막의 가역적 투과화 및 리프로그래밍 반응 2. Fluorescence assisted cell sorting (FACS) 3. RNA 추출 4. RT-PCR 수행
핵이식기법의 확립	체세포 핵이식과 체외 배양 확립	<ol style="list-style-type: none"> 1. 수핵난자 준비를 위해 미성숙 난자를 채취하여 44-48h 체외 성숙 2. 미세조작기에 장착된 pipette으로 1극체와 metaphase chromosome을 흡입 3. 공여핵 세포 이식후 전기세포융합장치를 이용하여 전기적 활성화

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
한정배양 체계 확립	완전 한정배양액을 이용한 체외배양	<ol style="list-style-type: none"> 1. 단백질 함유 및 비함유 한정배양액을 이용한 돼지 단위발생란의 체외배양 2. 세포분열촉진 cytokinin의 일종인 Kinetin을 발생배양액에 농도별로 첨가하여 조건 확립 3. 완전 한정배양체계 하의 단위발생란 생산
핵이식란 의 생산	체세포 핵이식 체외배양	<ol style="list-style-type: none"> 1. 핵 주입에 의한 핵이식란 생산 (융합과정 단축) 2. 탈핵 전 핵주입에 의한 핵이식 3. 핵이식란의 체외생산체계 확립 4. 재프로그램 세포를 이용한 핵이식
세포추출물의 세포내 도입	세포추출물 내의 DNA 또는 RNA 함유 여부 검증	<ol style="list-style-type: none"> 1. 세포추출물 내의 DNA 또는 RNA 함유 여부 검증 2. 세포추출물에 ATP-regenerating system (ATP, NTP, GTP, Streptolysin-O; SLO, FITC) 첨가 3. 준비된 섬유아세포와 혼합, 배양 4. SLO 불활화 후 세포막의 복구유도 5. 원심분리 후 상층액 제거
RNA 추출 및 RT-PCR	RT-PCR	<ol style="list-style-type: none"> 1. 재프로그램된 세포, Sertoli 세포, ES 세포 및 태아섬유아세포로부터 mRNA 추출 2. RT-PCR 기법을 이용, PCR산물 획득 3. 전기영동 후 UV 하에서 확인 4. 3차년도에 연이어 수행

1. 섬유아세포 배양

돼지의 섬유아세포는 모돈의 귀에서 생검하여 채취한 조직으로부터 획득하였다. 분리된 체세포는 2mM L-glutamine이 함유된 DMEM 배양액으로 포화습도인 5% CO₂, 39°C 배양기 내에서 배양하였다.

2. 고환에서의 정자세포와 Sertoli 세포의 분리 및 추출액 회수

도축장에서 채취한 돼지고환의 피막을 벗겨낸 후 PBS로 3회 세정한 후 수술용 칼날로 잘게 썰어내고 정세관 조직 내에서 방출되어 부유액 내에 있는 정자와 중간단계의 정자/정모세포들을 회수하여 15 ml 튜브내로 분주한 후 원심분리하여 세포군을 농축하였다. 이와는 별도로 잘게 썰어낸 정세관 조직은 2.5% trypsin으로 36°C 항온수조 shaker에서 50분간 처리하여 분해하였다. 분해된 조직은 상온에서 5분간 정치시켜 세포괴를 가라앉힌 후 75%의 상층액을 제거하였다. 튜브 내에 10% 소태아혈청을 함유한 PBS를 첨가하여 잔류 trypsin을 제거한 후 PBS 용액으로 2회 세정하였다. 세포 조직은 이후 0.17% type 1 collagenase, 0.5% hyaluronidase, 20 µg/ml DNase가 함유된 DMEM/Ham's F-12 (1:1)용액으로 상온에서 수회의 교반과정을 거치며 40분간 처리한 후 80µm의 나일론 망사로 결합조직 등을 걸러내었다. 원심분리 (200 × g, 5분) 후, peritubular cell이 함유된 상층액을 걸러내어 Sertoli 세포를 회수하였다.

앞서 회수한 정자/정모세포와 Sertoli 세포를 각각 10 ml의 cell lysis buffer (CLB)에서 2회 세정하고 420 × g 에서 2분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 펠렛은 액체질소 내에서 보존하였다. 액체질소에 보관중인 세포 펠렛을 회수한 후 ice-cold CLB 1ml을 첨가하여 얼음 위에서 용해한 후 420 × g 에서 2분간 원심분리 하였다. 세포 펠렛은 이후 동일 용액에 재부유하고 세포가 팽창되도록 45분간 정치시켰다. 이후 -25°C 100% 에탄올이 함유된 튜브로 옮겨 초음파로 분쇄하였다 (20% amplitude, 50sec). 세포의 용해를 현미경 상에서 관찰하고 4°C, 15,000 × g 에서 15분간 초원심분리하여 상층액 (세포추출물)을 회수, 액체질소에서 동결한 후 실험에 이용할 때까지 -80°C에서 보관하였다.

3. 세포 추출액의 단백질 정량 및 단백질 조성 분석

세포 추출액의 단백질 양을 Bio-rad사의 단백질 정량액을 이용 Bradford 방법에 의해 측정하였다. 100 ug의 단백질 용액을 SDS-PAGE를 통해 분리한 후, 안드로젠결합 단백질 (androgen-binding protein; ABP)과 같은 특정 단백질의 함유 여부를 Western blotting을 통해 분석하였다.

4. 세포막의 가역적 투과화 및 리프로그래밍 반응

각각의 세포 펠렛을 0.1% PVA 첨가 PBS에 재부유한 후 동일 용액으로 1-2회 세정 후 실험에 공여하였다. 세정 후 재차 회수된 펠렛에 ATP-Regenerating system (25 mM phosphocreatine, 62.5 µg/ml creatine kinase, 2.5 mM ATP, 0.125 mM GTP, 1 mM NTP-mix, 10 µM FITC-Dextran, 1 IU SLO/µl) 이 첨가된 25 µl의 세포추출물 (Cell extract: CE) 용액에 재부유시키고 39°C 에서 25분간 배양하였다. 이후 30% 소태아혈청이 첨가된 DMEM 용액으로 SLO를 불활화 시키고 세포막이 복구되도록 유도하였다. 세포막 재봉합은 대략 1시간 정도 배양 후에 완결되었다.

5. Fluorescence assisted cell sorting (FACS)

세포막 재봉합 후 세포부유액을 원심분리 (420 × g, 4 min) 하여 상층액을 제거하였다. 세포 펠렛은 다시 20 µg/ml의 propidium iodide (PI)가 함유된 PBS에 재부유한 후 FACS 분석을 실시하였다. FITC는 투과화 처리 중 첨가되었고 PI는 재봉합 후 첨가되었기 때문에 성공적으로 재봉합된 세포는 FITC 만을 함유하고 있을 것이고 PI에 염색된 세포는 재봉합되지 못하고 죽은 것으로 판정할 수 있다. 두 가지 다 발현하지 않는 것은 투과화에 실패한 것으로 볼 수 있다. 성공적으로 재봉합된 세포는 재배양 후 핵이식에 공여하거나 1 ml의 TRIzol에 재부유 및 -80°C에서 보관하여 이후 mRNA 추출에 공여하였다.

6. RNA 추출

리프로그래밍된 세포, Sertoli 세포, ES 세포 및 섬유아세포로부터 RNA를 추출하였다. 각각의 샘플에 200 μ l의 chloroform을 첨가한 후 상온에서 3분간 정치시킨 후 4°C에서 15,000 $\times g$ 로 15분간 원심분리 하였다. 이후 최상의 액체층을 1.5 ml의 튜브에 분주한 후 500 μ l의 isopropanol을 첨가하였다. 샘플을 상온에서 10분간 정치시킨 후 4°C에서 15,000 $\times g$ 로 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 펠렛을 0.5 ml의 80% 에탄올에 재부유하고 4°C에서 15,000 $\times g$ 로 5분간 원심분리 하였다. 에탄올을 제거한 후 펠렛을 10분간 공기 중에서 건조시킨 후 30 μ l의 diethyl pyrocarbonate (DEPC)-treated H₂O에 재부유 하였다. 이렇게 준비된 RNA 샘플을 분석 시까지 -80°C에서 보관하였다.

7. RT-PCR

각각의 RT-reaction (총 40 μ l)은 8 μ l 5 \times 1st strand buffer, 2 μ l 0.1 mM 의 dNTP-mix, 2 μ l Random primers, 2 μ l 0.1 mM DTT, 2 μ l RNase-out, 2 μ l Superscript III, 20 μ l DEPC-treated H₂O 및 2 μ l RNA-extract를 포함하였다. RT-reaction은 처음에 RNA의 2차 구조를 제거하기 위해 50°C에서 60분간 실시하며 이후 strand elongation을 위해 70°C에서 15분간 실시하였다. 총 25 μ l에 달하는 각각의 PCR 튜브에는 2.5 μ l 10x PCR buffer, 200 μ mol/L dNTP, 1.3 mM MgCl₂, 1.1 U TAQ-DNA polymerase, 17.5 μ l H₂O, 1 μ l cDNA 및 1 μ mol/L reverse/forward primer 가 함유되어 있다. PCR은 95°C에서 6분간 denaturation 반응을 시키는 것으로 시작하였다. 이후 95°C에서 45초, 58°C에서 45초, 72°C에서 45초의 denaturation, annealing, elongation 과정을 반복하였다. 총 35 사이클 후 72°C에서 5분간 elongation 과정을 거치고 분석 전까지 11°C에서 샘플을 식혔다. PCR 산물은 전기영동 후 UV 하에서 확인하였다. 전기영동용 젤은 2% DNA grade agarose 및 0.04 μ l/ml의 ethidium bromide를 포함하였다. 각각의 PCR 산물로부터 10 μ l의 샘플을 젤에 분주하여 100 bp DNA ladder와 함께 전기영동에 적용하였다.

8. 체세포 핵이식

가. 수핵난자의 준비

난소의 미성숙난포 내 난자를 채취하여 10% FCS가 첨가된 TCM199 배지에서 38-40 시간 동안 성숙배양시켜 metaphase II의 난자를 준비하였다. 준비된 성숙난자는 0.1% hyaluronidase (Sigma, USA)가 첨가된 PBS(+)내에서 mouth pipetting으로 난구세포를 완전히 벗겨낸 후 제 1극체가 보이는 것만을 선별하여 실험에 사용하였다. 탈핵을 용이하게 하기 위하여 수핵란을 제 1극체가 상부로 위치하도록 고정용 pipette (외경 120 μm , 내경 30 μm)으로 흡입 고정한 후, 세포질에 손상을 주지 않도록 예리한 절개용 pipette을 주의하여 투명대와 세포질 사이에 삽입하였다. 난자는 미세조작의 손상을 최소화하기 위해 투명대를 절개한 후에 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 cytochalasin B(Sigma, USA)가 함유된 PBS(-)에 옮겨 20분간 전배양 하여 탈핵을 준비하였다.

나. 미세조작 및 활성화

미세조작기에 장착된 고정용 pipette으로 수핵란을 고정하고 주입용 피펫으로 투명대를 통과한 후 제 1극체와 metaphase chromosomes를 한꺼번에 karyoplast 형태로 흡입, 제거하였다. 수핵란은 탈핵을 마친 후 세정과정을 거쳐 준비된 공여핵 체세포와 동일한 미소적 내로 옮겼다. 탈핵난자의 절개된 투명대를 통해 10% PVP로 처리된 공여핵세포를 세포질 내에 직접 주입하여 핵이식 수정란을 작성하였다. 작성된 핵이식란은 전기세포융합장치를 이용하여 1.6 kV/cm DC 전압에 40 μsec 동안 1-2회 통전하여 인위적 활성화를 유도하였다. 활성화 후 핵이식란은 38.5 $^{\circ}\text{C}$, CO₂ 배양기 내에서 일반적인 돼지 수정란 배양체계에 준하여 체외배양을 실시하였으며 배양체계 수립을 위한 각종 비교실험을 수행하였다 (내용 및 결과에 상세히 기술).

제 2 절 연구내용 및 결과

1. 체세포 배양

핵이식에 공여할 체세포로서 돼지의 태아섬유아세포를 이용하였다. 돼지의 태아섬유아세포는 도축장에서 채취한 임신 30-45일령의 태아조직으로부터 머리와 사지 및 내장을 분리제거하고 trypsin 처리하여 잘게 부순 후 2mM L-glutamine이 함유된 DMEM 배양액으로 포화습도인 5% CO₂, 39°C 배양기 내에서 배양하였다. 이를 통해 현재 3마리의 태아로부터 primary cell stock을 2-9 passage까지 각각 10 vial 이상씩 확보, 보관하고 있다. 본 태아섬유아세포는 doubling time이 24시간 이상으로 비교적 발육속도가 마우스 섬유아세포에 비해 더딘 양상을 보였으나 형태학적 이상은 발견되지 않았으며 9 passage까지 계대하는 동안 (3일에 1회 계대) 증식속도 등에 차이를 보이지 않았다.

2. 한정배양체계에서 체외성숙된 난자의 단위발생능

돼지 난자의 체외성숙 배양체계를 단순화시키기 위해 난포액 대신 PVA를 고분자물질로 사용하여 성숙배양을 실시하였다. 돼지 체외성숙 시 일반적으로 난포액과 함께 첨가되는 GTH의 효과는 초기에 한정되기 때문에 성숙 22-24시간에 배양액을 교체해주게 되는데 한정배양액에서의 효과를 알아보기 위해 배양액 교환그룹과 비교환그룹으로 나누어 실험을 실시하였다 (아래 참조). 각각의 실험군을 이용하여 체외성숙한 후 Hoechst staining을 통해 핵상을 관찰하였으며 일부는 단위발생을 유도하여 배반포로의 발육률을 관찰하였으며 일부는 핵이식에 공여하여 핵이식란의 발육능을 관찰하였다.

실험그룹: 1) IVM for 44 h in TC-PVAwith gonadotropin supplementation (eCG and hCG, 10 IU/ml each) 2) IVM for 44 h in TC-PFF with gonadotropin; 3) IVM for 22 h in TC-PVA with gonadotropin then without hormonal supplements for an additional 22 h; 4) IVM for 22 h in TC-PFF with gonadotropin then without hormonal supplements for an additional 22 h.

표1. 체외성숙 시 첨가된 고분자물질 및 배양액 교환에 따른 난자성숙율

Group*	Number oocytes	GV-GVBD	MI	MII
PVA	175	24	26	125 (71.4)
PFF	164	24	53	87 (53.0)
PVA-PVA	148	25	40	83 (56.1)
PFF-PFF	157	16	30	111 (70.7)

GV: germinal vesicle, GVBD: germinal vesicle breakdown, MI/II: metaphase I/II

PVA: polyvinylalcohol; PFF: porcine follicular fluid

PVA-PVA / PFF-PFF: 체외성숙 22시간째 각각 동일 배양액으로 교환

표2. 체외성숙 시 첨가된 고분자물질 및 배양액 교환이 단위발생에 미치는 영향

Group*	Number oocytes	2-cells	Blastocysts	Number of cells in blastocysts
PVA	101	64 (63.4)	16 (15.8)	37.3±5.1
PFF	99	61 (61.6)	7 (7.1)	33.8±2.1
PVA-PVA	101	56 (55.4)	6 (5.9)	38.8±6.0
PFF-PFF	89	55 (61.8)	16 (18.0)	40.5±7.5

표3. 체외성숙 시 첨가된 고분자물질 및 배양액 교환이 핵이식란의 체외발육에 미치는 영향

Group*	Number oocytes	2-cells	Blastocysts
PVA	153	67 (43.8)	13 (8.5)
PFF-PFF	97	47 (48.5)	10 (10.3)

표 1-3에서 알 수 있듯이 PVA (0.1%, v/v)는 난포액을 대체하여 돼지 미성숙난자의 체외성숙 배양액으로 이용될 수 있으며 PVA를 고분자물질로 이용할 경우 성숙배양 2시간 전에 GTH를 교체할 필요가 없는 것으로 확인되었다. 특히 핵이식 이후 발육률에서도 PVA 첨가배양액에서 배양액 교환없이 성숙된 난자를 이용한 핵이식이 가능함을 확인하여 완전한정배양체계 하에서의 핵이식란 생산 가능성을 확인하였다.

3. 돼지 미성숙난자의 성숙배양시간 조건 확립

돼지 난자의 단위발생을 위한 최적의 체외성숙시간을 조사하기 위해 체외성숙실험을 실시하였다. 도축장유래의 난소로부터 미성숙난자를 채취한 후 1차실험에서 36, 38, 40, 42, 44, 46, 및 48시간동안 체외성숙한 후 전기자극을 이용한 활성화를 통해 단위발생을 유도하였으며 이를 체외배양하여 난자의 발육능을 조사하였다. 본 실험을 통해 48시간 그룹이 36-46시간 체외성숙 그룹보다 단위발생 후 높은 발육능을 보이는 것을 확인하였다 (표 4). 특히 36-38시간 그룹은 분할율은 40시간 이후 성숙난자와 유사하거나 오히려 높은 경향을 나타냈으나 상대적으로 낮은 배반포 발생율을 나타내어 핵성숙은 완료되었으나 세포질성숙은 불완전한 것으로 판단되었다. 실제 실험에 있어서도 48시간 성숙된 난자를 이용하여 단위발생 활성화를 유도하는 것이 가장 효율적인 시간분배가 가능한 것으로 나타나 이후 단위발생 및 핵이식난자의 활성화를 체외성숙 도입 후 48시간으로 고정하여 실시하였다.

표 4. 단위발생시간에 따른 체외성숙난자의 발육능

Duration of <i>in vitro</i> maturation (h)	Total oocytes in culture	No.(%) 2-cells	No.(%) blastocysts
36	178	113 (63.5)	7 (3.9)
38	183	121 (66.1)	4 (2.2)
40	144	94 (65.2)	18 (12.5)
42	196	128 (65.3)	22 (11.2)
44	219	139 (63.5)	34 (15.5)
46	170	97 (57.1)	33 (19.4)
48	157	87 (55.4)	47 (29.9)

4. 완전한정배양체계 하에서의 단위발생 및 핵이식란의 생산

단순 완전한정배양체계 하에서의 핵이식란의 생산은 핵이식란의 발생과정에 있어 미지의 성장인자 및 단백질들을 밝혀내는데 효과적인 배양체계로 사용될 수 있다. 본 연구진은 현재 앞선 1-3까지의 실험결과를 바탕으로 단위발생 및 핵이식란의 단순한 정배양체계 확립을 위한 실험을 수행하고 있으며 2차년도 상반기까지 본 실험체계를 완성할 예정이다. 본 연구를 통해 얻어진 잠정적인 결과는 다음과 같다.

- 필수 및 비필수 아미노산이 완전한정배양액 (NCSU23-PVA) 체계 하에는 필수적이며 필수아미노산의 첨가는 배반포 발생율을 유의적으로 증진시켰다.

- BSA 첨가 배양액과 달리 PVA가 첨가된 단순한정배양체계 하에서는 배반포가 부화되는 비율이 현저히 떨어졌으며 이 시기에 특정 성장인자 또는 에너지를 첨가해주는 것이 효과적일 것으로 판단된다.
- 필수 및 비필수 아미노산은 모두 embryonic genome activation이나 상실배의 compaction 및 배반포로의 분화 등 착상 전 배아의 전 발생시기에 걸쳐 영향을 미치는 것으로 확인되었다.
- 각종 아미노산은 배반포의 부화 자체에는 큰 영향을 미치지 못하였다.

5. 핵직접 주입에 의한 핵이식란의 생산

전기융합에 의한 핵이식은 탈핵 및 핵 주입 후 다시 융합이라는 과정을 거치는 번거로움이 있으며 특히 투명대 절개에 의한 핵이식의 경우 미세조작 시 잦은 미세피펫 교체라는 과정을 거쳐야만 한다. 이러한 절차상의 번거로움을 극복하기 위해 단일피펫을 이용하여 탈핵 및 핵주입을 실시하는 핵직접 주입법을 도입하였다.



그림 1. 핵주입법에 의해 생산된 핵이식 배반포의 모습

6. RT-PCR을 이용하여 porcine testis sertoli cell 확인

돼지 고환에서 분리한 total RNA를 First strand cDNA synthesis kit (Roche co.)를 이용해서 RT-PCR을 하였다.

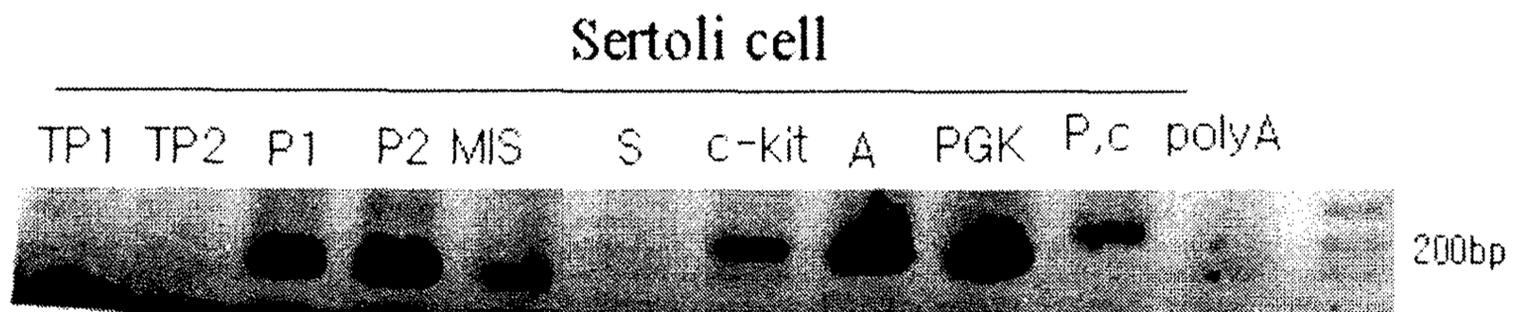


그림 2. 돼지고환 total RNA를 이용해서 RT-PCR하여 sertoli cell 이 정확한 지 확인.

TP:transition protein , P:protamine, S:SOX9, A:acrosin, Pc: protein C

위 그림에서 보이듯 sertoli cell에서 특이적으로 발현되는 것으로 알려진 protamine 1,2와 SOX9, c-kit, ACR, PKG-2, 및 protein C의 발현을 확인 할 수 있었다. 반면에 fibroblast cell에서는 발현되지만, sertoli cell에서는 발현이 안되는 것으로 알려진 IL6, collagen, VEGFA, 및 dochrine 유전자들의 sertoli cell을 이용한 RT-PCR에서 확인되지 않음을 확인할 수 있었다.

사용된 porcine testis sertoli cell -specific primer는 다음과 같다.

5. Testis specific primers

Gene product	sequence	size(bp)	
MIS	F: gtc ctt ttc tgt ggg tgg tg R: aac ttc agc aag ggt gtt gg	244	sertoli cell
Protamine1(P1)	F: gcc aga tac aga tgt tgc c R: ctt cta cac ctt ata acg gtg tag cg	144	sertoli cell
Protamine2(P2)	F: ccg cta cca cta cag aca ca R: tgc atc ttc tcc tcc tcc tg	128	sertoli cell
Transition protein 1(TP1)	F: ctt ctc gta aat taa aat ctc atg g R: gag aac gat aat tac gat tag cat ca	153	sertoli cell
Transition protein 2(TP2)	F: tct ggt cct caa tct cat gct R: cac gtt tac gat gac gag ga	196	sertoli cell
SOX9	F: aat ctc ctg gac ccc ttc at R: tgt cct ctt cgc tct cct tc	199	sertoli cell
c-kit	F: gat gcc ttc aag gat ttg ga R: gag gct gga gtc ttc aat gg	198	sertoli cell
Preproacrosin (ACR)	F: tgg tca gcc tcc aga tct tt R: ctt ccc cac aca act tcg tt	169	sertoli cell
Phosphoglycerate kinase2(PGK2)	F: atg cct ttg cta atg gaa cg R: tcc tcc agt gct cac atg ac	152	sertoli cell
Protein C (Pc)	F: cct gat cat ctg ggc agt tt R: cca gaa ggc cat tgt gtt tt	217	sertoli cell

표 6. Non-testis specific primers

Gene product	sequence	size(bp)	
Collagen	F:gga ttc cct ggc tct aaa gg R:tcc tgt tac tcc ctg gtt gg	246	fibroblast
Decorin	F: ggg act ggg ttt caa tag ca R: gcg ggc aga agt cat tag ag	194	fibroblast
VEGFA	F:ctc tac ctc cac cat gcc aag R:ggg act cct gga aga tgt cca cc	147	fibroblast
IL(interleukin)6	F:tgc ttc tgg tga tgg cta ctg cct tc R:gtg gtg gct ttg tct gga tt	443	fibroblast

7. 돼지고환유래 Sertoli cell의 cell lysate 단백질 정량분석

가. Cell lysate 얻기 (연구수행방법 참조)

나. Lysate의 protein quantification (그림 3, 1 mg/ml BSA:Sigma, 5 x Bradford; Bio-Rad)

0	0	sample	ABS	ug/ul
2.5	0.075	1	0.205	1.007371
5	0.18	sertoli cell	0.242	1.189189
10	0.424			
20	0.796			

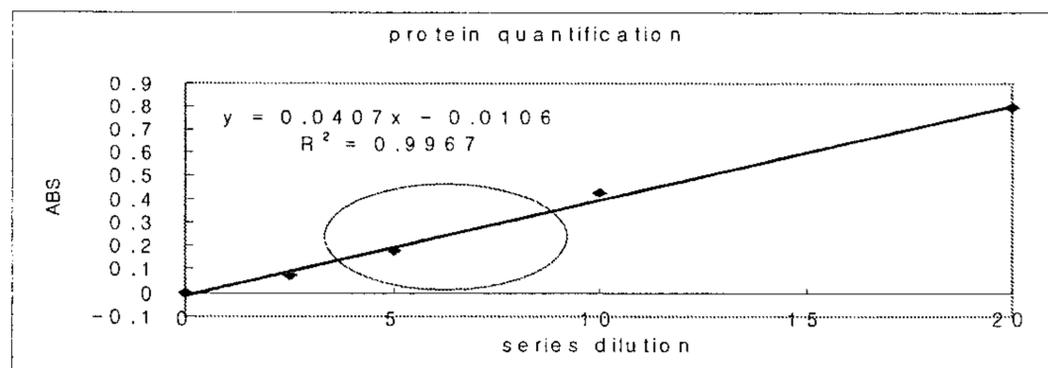


그림 3. Lysate의 protein quantification

위의 표에서 보듯이 Protein의 농도가 매우 낮게 나타남을 알 수 있는데, 실험에 필요한 고농도의 protein 을 갖는 testis tissue extract를 얻기 위해 여러 가지로 실험을 하여 최대 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이상의 cell extract를 얻을 수 있었다.

8. Fibroblast cell에 streptolysin O 를 이용한 cell permeability의 증가

예비실험으로 fibroblast cell에 Texas red-conjugated dextran이 들어가면 어떻게 나타나는지 보기 위하여 일반적으로 cell에 pore를 형성 시키는데 많이 사용하는 0.2% Triton X-100을 처리한 후 texas red를 처리해보았다.

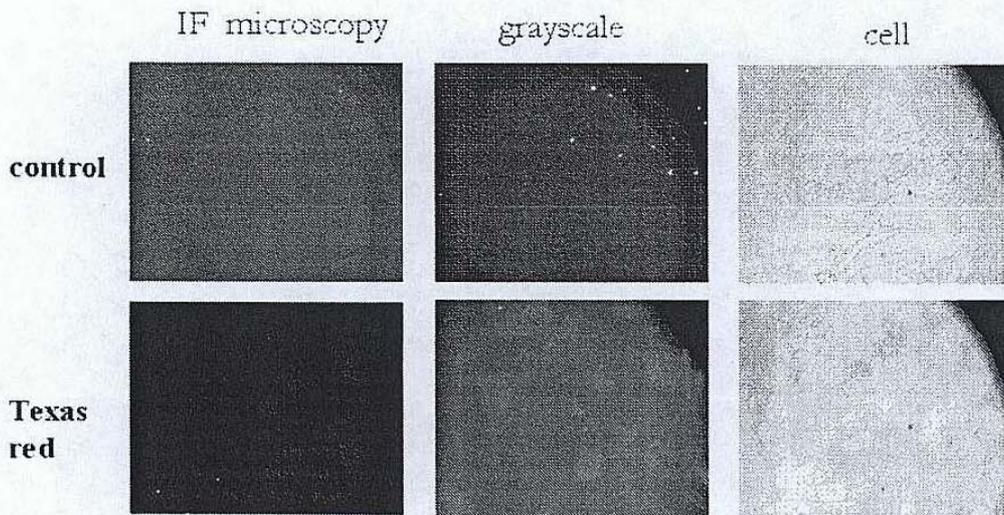


그림 4. Triton X-100 treated fibroblast cell

그림 4와 같이 Texas red-conjugated dextran이 cell cytoplasm으로 통과되어 세포 내에 존재하는 protein과 binding 하여 빨간색을 나타냄을 확인할 수 있었다. 그림에서 보면 cell의 cytoplasm에서 texas red가 빨간색을 나타내는 것으로 보아 triton x-100에 의해 cell membrane에 pore가 생겨 texas red가 들어간 것을 확인할 수 있다. 그러나 cell의 주변이 깨끗하지 않은 것으로 보아 triton x-100이 cell에 toxic 하게 작용한 다는 것도 알 수 있었다.

위의 실험을 바탕으로 실험에 이용할 fibroblast cell의 membrane에 pore를 형성하여 extract가 세포 내부로 들어갈 수 있게 해주는 streptolysin O(SLO)의 적정량과 농도 조건을 잡기위해 다양한 농도로 세포를 처리하였고, 비교를 위해 Cell에 pore를 형성하는 다른 물질인 TritonX-100도 농도 별로 처리하여 비교해 보았다.

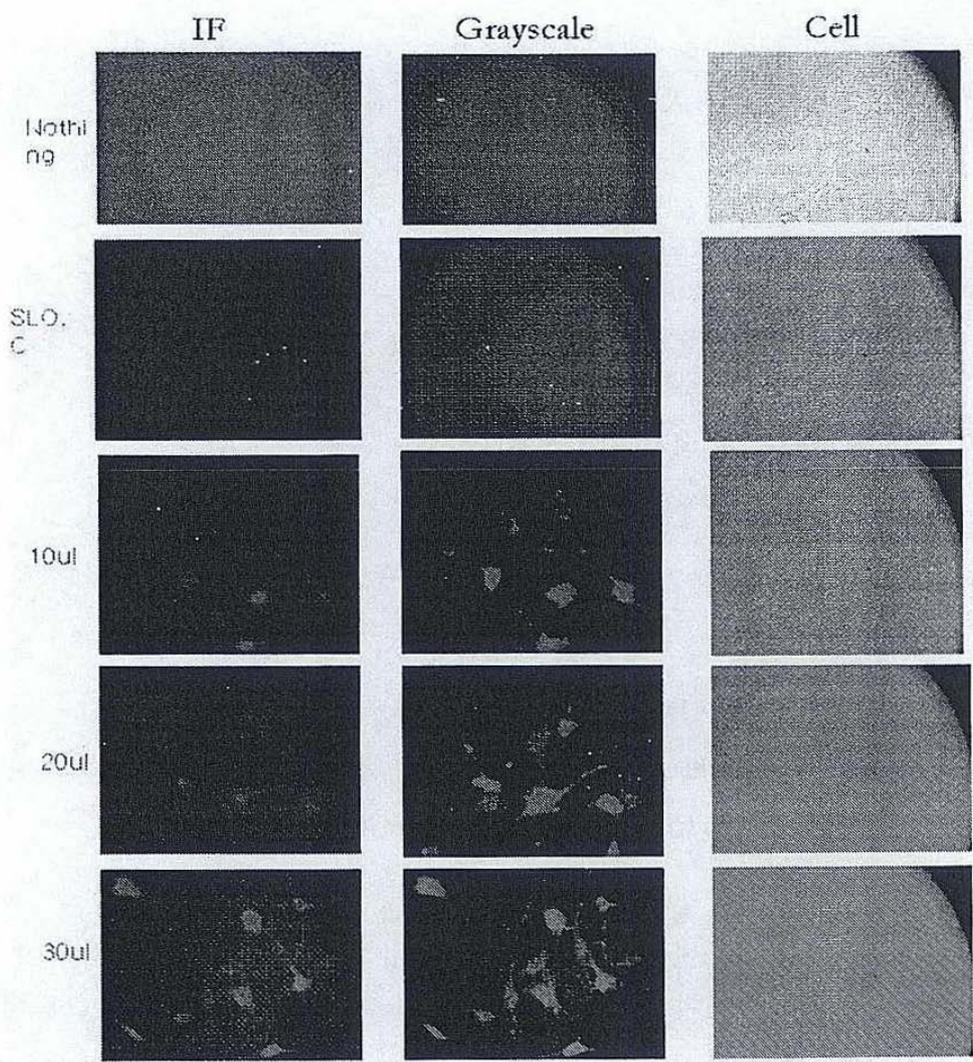


그림 5. Streptolysin O의 양에 따른 효과

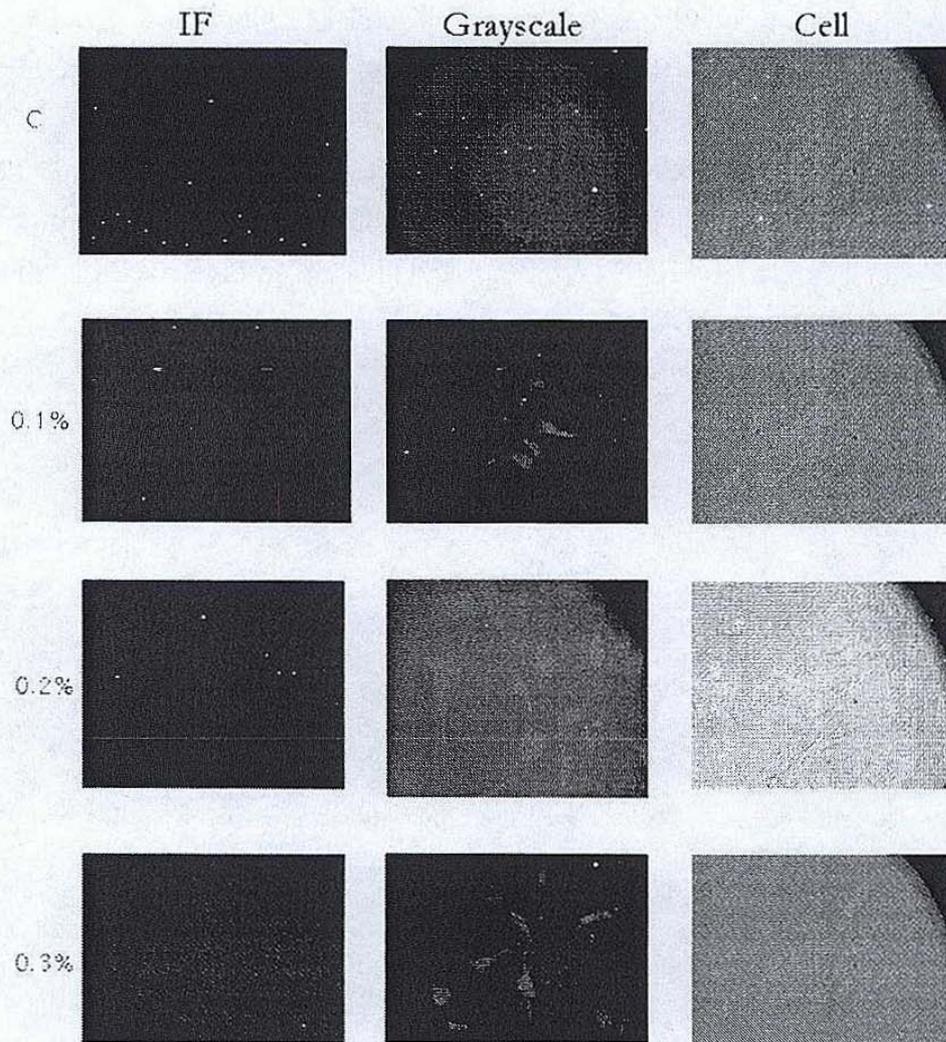


그림 6. Triton X-100의 농도별 처리

그림 5, 6은 6×10^5 cell을 dish에 고정 시킨 후, 각각 시약을 처리한 후 50ug/ml Texas red를 처리한 것이다. 우선 그림 9는 230 ng/ml SLO를 처리한 양에 따른 비교를 한 것이다. 그림 3은 Triton X-100을 농도별로 처리 한 것이다. 전체적으로 보아 SLO를 처리한 것 보다 cell이 적은 것으로 보아 더 많은 cell이 죽었음을 알 수 있었다. 그리고 앞서와 같이 cell의 주변이 깨끗하지 않은 것으로 보아 cell에 주는 damage가 SLO보다 더 크다는 것을 알 수 있었다. 이것을 바탕으로 실험에서는 살

아있는 cell에 시약을 처리하므로 같은 수의 cell에 230ng/ml의 SLO를 10 ul, 5 ul를 각각 처리하고, Triton X-100 0.1% 를 처리하여 50 ug/ml Texas red를 처리하여 보았다. 결과를 나타내지 않았지만, dish에 고정시킨 후 처리한 것과 달리 cell membrane에 pore가 생겼음에도 불구하고 cell 모양이 유지됨을 볼 수 있었다.

위의 예비실험 결과를 바탕으로 해서 fibroblast cell에 230 ng/ml SLO를 5 ul를 처리하고, cell extract 를 처리 해 보았다. Streptolysin O를 처리한 후 cell morphology의 변화는 보이지 않았다.

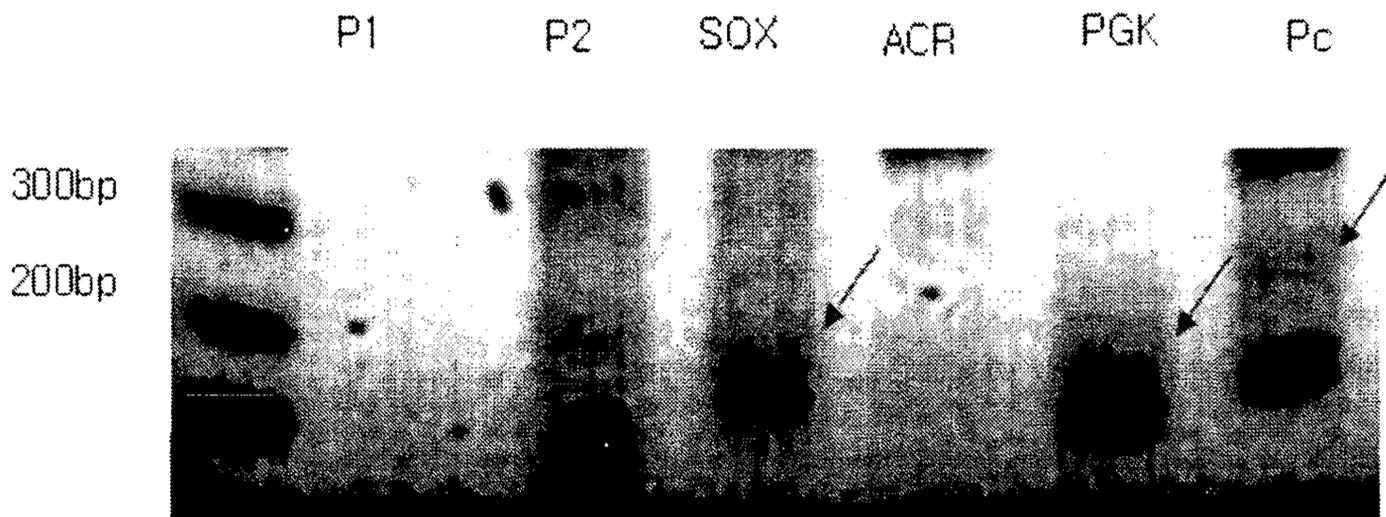


그림 7. porcine testis tissue extracts 처리 후 RT-PCR

위의 그림 7.에서 볼 수 있듯이 SOX9 과 PGK-2, Protein C 3가지의 gene이 발현됨을 알 수 있었다. 이들 결과로 부터 porcine testis의 sertoli extracts를 체세포 내로 도입함으로써, porcine fibroblast cell의 유전자 발현 양상을 변화 시킬 수 있음을 RT-PCR로 확인할 수 있었다.

9. 완전한정배양체계 하에서 단위발생 및 핵이식란에의 필수 및 비필수 아미노산의 효과

돼지와 소를 비롯한 많은 포유동물 배아의 체외배양 시, 배반포 생산의 효율성과 생산된 배반포들의 발달능은 체외배양체계의 확립에 있어 매우 중요시되고 있으며 생육 가능한 건강한 산자를 얻는 것과는 직결되어있다. 실제로 체외배양조건의 선택이 배아의 형태나 탄수화물대사, 세포사멸, 그리고 발달에 중요한 유전자들의 발현에 영향을 미친다는 보고들이 있다. 그러나 혈청(serum)에 의존한 체외배양체계는 이러한 점에 있어서 여러 가지 결점을 지니고 있다. 필수 및 비필수 아미노산은 모체의 난관에 많이 분포하고 있으며, 정자와 난자의 수정이후 착상전후 단계까지 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구진은 완전한정배양체계 하에서 필수 및 비필수 아미노산이 단위발생 및 핵이식란에 미치는 효과를 알아보았다.

우선 단위발생란에서의 필수 및 비필수 아미노산의 효과를 알아보기 위해 한정배양액에서 48시간 동안 성숙시킨 돼지난자의 cumulus cell를 제거 후, 전기세포융합장치를 이용하여 1.6 kV/cm에서 40 μ sec동안 1회 통전하여 활성화 시켰으며 이 난자들을 각각의 그룹으로 나누어 배양함으로써 수행하였다. 실험그룹은 크게 두 가지, 완전한정배양액(NC-PVA)와 체외배양액(NC-BSA)에 필수 및 비필수 아미노산의 첨가여부로 나누었으며, 각각은 아무것도 첨가하지 않은 그룹, 필수 아미노산만 첨가한 그룹(EAA), 비필수 아미노산만 첨가한 그룹(NEAA), 필수 및 비필수 아미노산 모두 첨가한 그룹(AAs)으로 나누어 수행하였다(필수 아미노산은 50 μ M, 비필수 아미노산은 100 μ M 첨가함). 완전한정배양액(NC-PVA)과 일반 체외배양액(NC-BSA)에 비필수 아미노산만을 첨가한 경우, 분할율이 NC-PVA-NEAA 내에서는 58.24%, NC-BSA-EAA 내에서는 67.03%로 낮게 나타났으나, 아미노산 미첨가시(NC-PVA, NC-BSA)와 필수 아미노산만 첨가시(NC-PVA-EAA, NC-BSA-EAA), 그리고 필수 및 비필수 아미노산을 모두 첨가하였을 경우(NC-PVA-AAs, NC-BSA-AAs), 70% 전후의 분할율을 나타내었다(그림 8A). 배반포 발달율에 있어서 NC-PVA-AAs 및 NC-BSA-AAs를 제외한 전 실험군에서 낮게 나타났으나 NC-PVA-AAs에서는 38.06%, NC-BSA-AAs는 58.82%로 매우 높은 배반포 발육률을 보였다(그림 8B). 이는 필수 및 비필수 아미노산이 돼지 단위발생란의 발달에 있어서 함께 작용할 때 매우 효과적이며 배양액 내의 단백질 원(BSA)과는 상관관계 또는 중복효과를 보이지 않음을 나타내는 것이다. 흥미로운 것은 생산된 배반포 가운데 확장 및 부화배반포의 비율은 NC-PVA-AAs 및 NC-BSA-AAs 군에서 각각 39.22%와

55.71%로 나타났는데 (그림 8C), 이는 각종 아미노산이 배아의 발달속도 및 배반포 형성 이후 생존성에 영향을 준다는 것을 시사하는 것이다. 이상의 결과로부터 필수 및 비필수 아미노산 모두 돼지 단위발생란의 체외배양 시 세포분열, 배반포형성, 및 배아의 발달속도에 효과를 보임을 알 수 있었다.

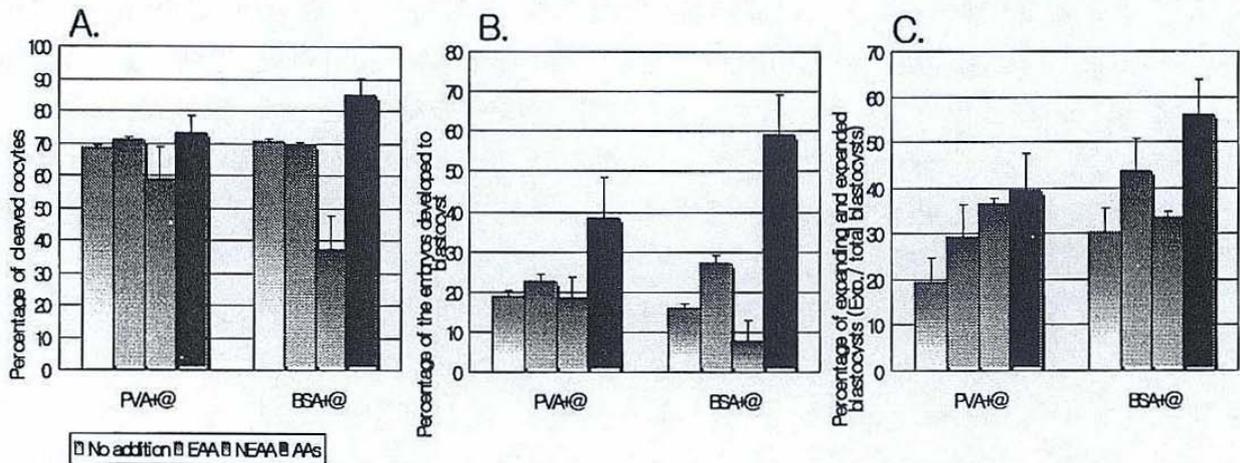
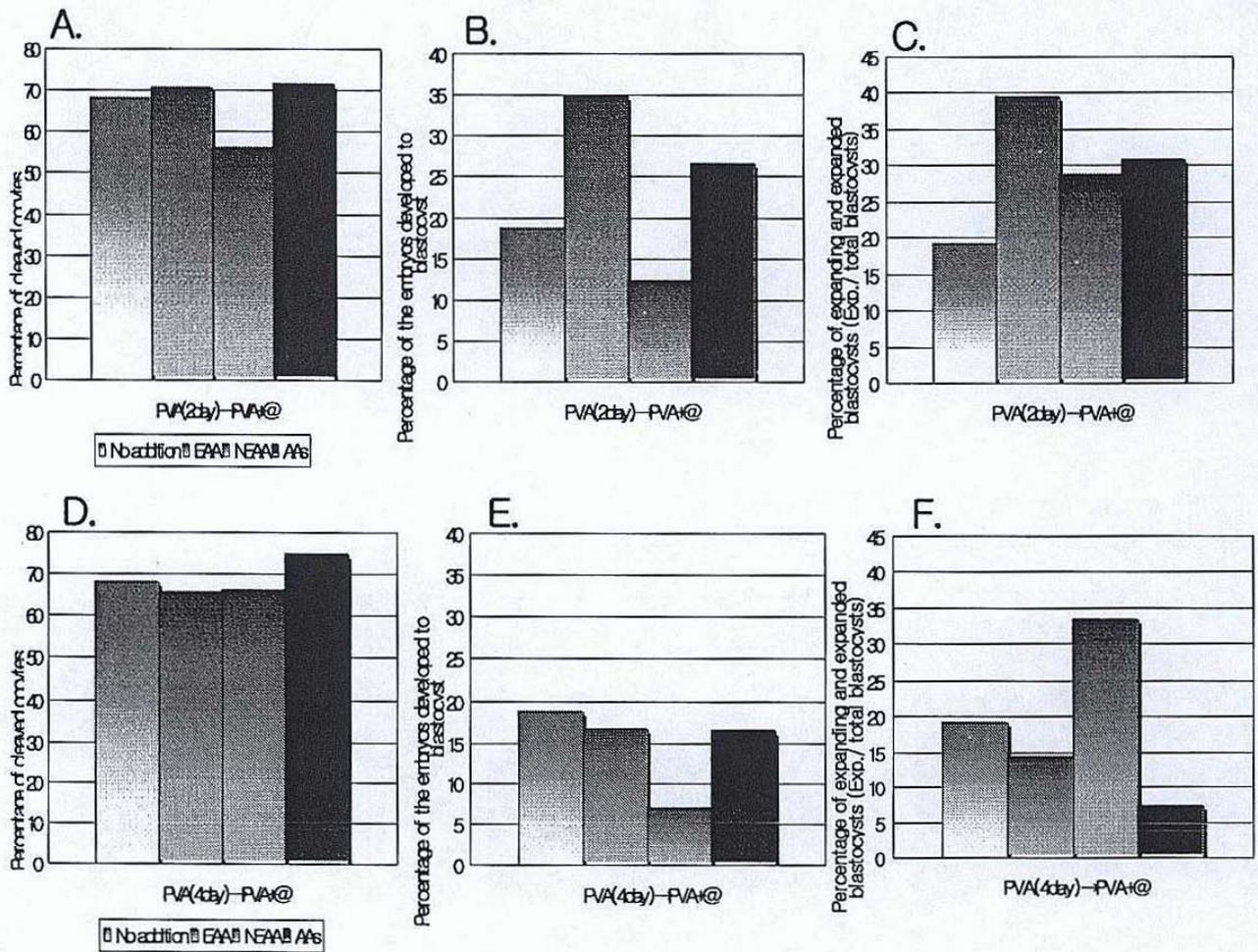
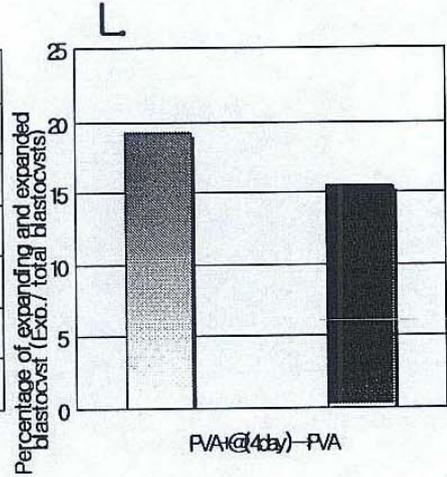
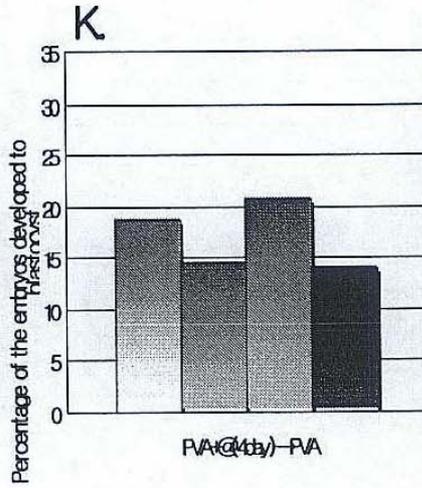
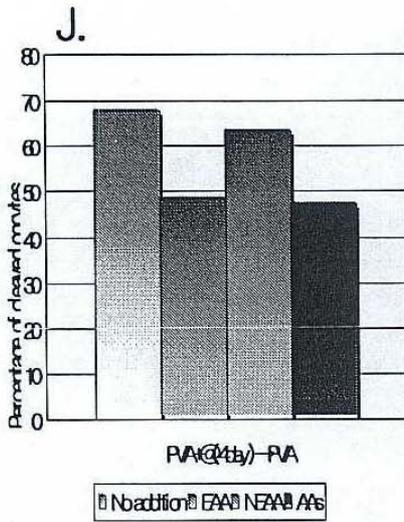
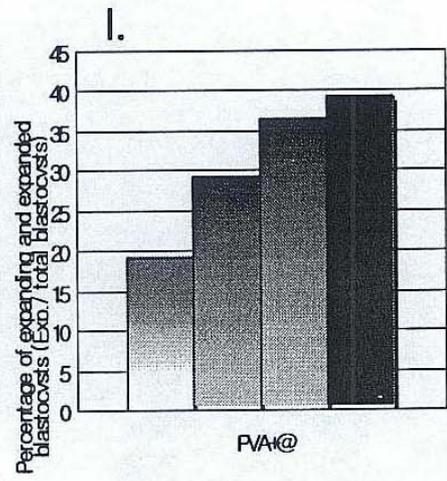
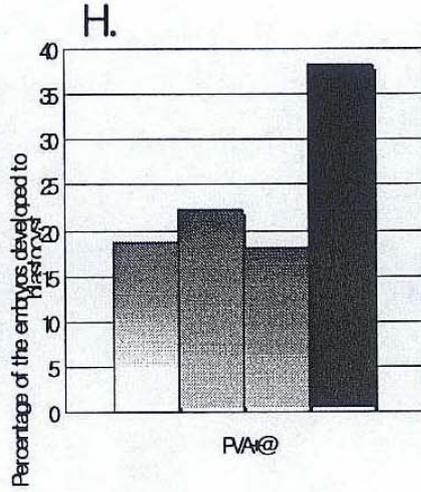
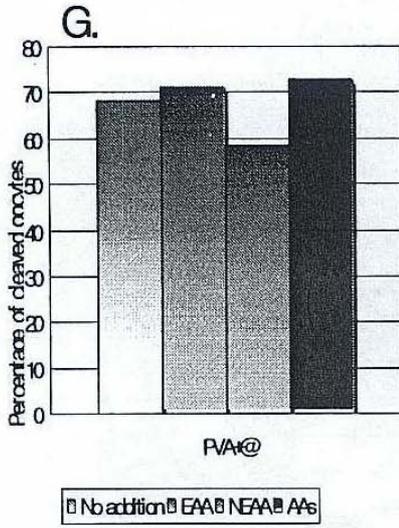


그림 8. 돼지 단위발생란에서 완전한정 배양액 (NCSU-PVA) 및 혈청원첨가 배양액 (NCSU-BSA)에 필수 (EAA) 및 비필수 (NEAA) 아미노산의 첨가 시, 세포분열 (A) 및 배반포 발육률 (B)과 생산된 배반포 중 확장 및 부화배반포 형성비율 (C).

이후 이러한 아미노산의 효과가 배아발달의 어느 시기에 주로 어떠한 아미노산에 의해 영향을 나타나는지 알아보기 위하여 배아발생단계의 주요 분기점이 되는 Maternal Embryonic Transition (MET; 수정란의 전사활동이 시작되는 단계로 돼지에서는 4세포기 전후) 단계와 compaction (응축상실배를 이루는 시기로 밀착된 세포들의 상호신호전달에 의해 배반포로의 세포분화를 준비하는 시기)의 두 시기를 기준으로 하여 아미노산의 효과를 측정하였다. 본 실험에서 명확한 효과를 보기 위해 단백질원이 배제된 완전한정배양체계를 이용하였다. 먼저 MET 이후에 아미노산을 첨가한 실험군 (체외배양 2일째부터 첨가, PVA (2 days)-> PVA+AAs; 그림 9. A-C)과 Compaction 직후에 아미노산을 첨가한 실험군 (체외배양 4일째부터 첨가, PVA (4 days)-> PVA+AAs; 그림 9.

D-F), 배양 전 과정에 AAs를 첨가한 실험군 (PVA+AAs; 그림 9. G-I), Compaction 전 까지 아미노산을 첨가한 실험군 (체외배양 1-4일까지 첨가, PVA+AAs (4 days)-> PVA; 그림 9. J-L) 및 MET 이전에 아미노산을 첨가한 실험군 (체외배양 1-2일동안만 첨가, PVA+AAs (2 days)-> PVA; 그림 9. M-O)으로 나누어 각각 분할율, 배반포형성을 및 확장/부화배반포의 비율을 조사하였다.





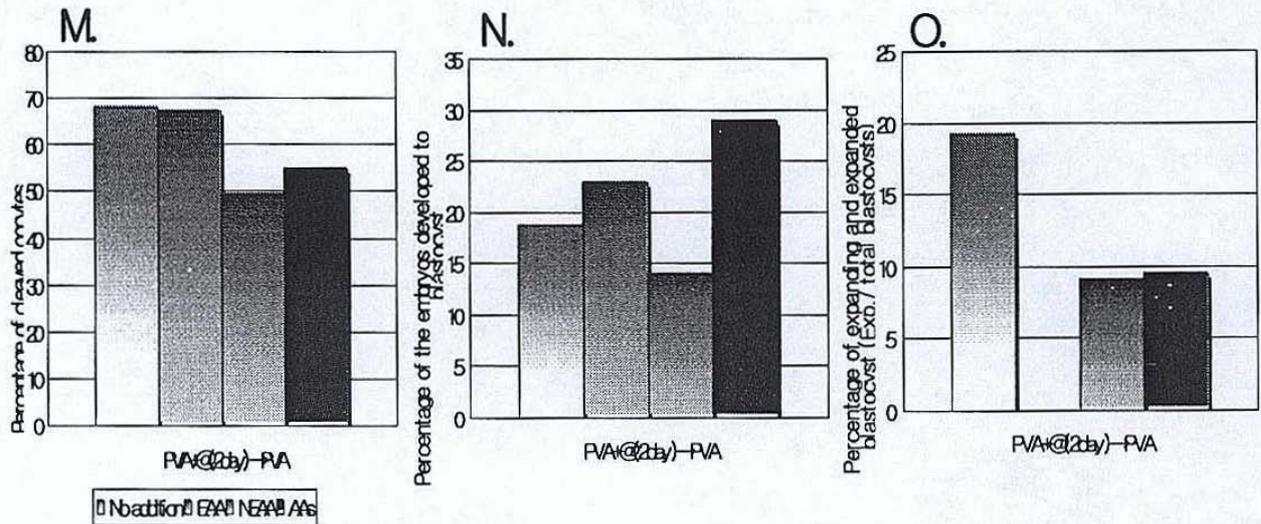


그림 9. 돼지 단위발생란에서 완전한정배양액 (NCSU-PVA)에 maternal embryonic transition 및 compaction 전후 시기에 필수 및 비필수 아미노산이 세포분열 (A,D,J,G,M) 배반포 발달을 (B,E,K,H,N) 및 배반포 중 확장/부화배반포의 비율 (C,F,L,I,O)에 미치는 영향.

본 연구를 통하여 아미노산은 필수 및 비필수 아미노산이 동시에 첨가되어야 단위발생란의 발육에 상승작용을 나타내는 것이 확인되었다. 특히 필수아미노산만 단독으로 첨가되었을 경우 전 시기에 걸쳐 배반포형성에 긍정적인 효과가 있었으며 후기로 갈수록 세포발육 및 분화속도에 영향을 미치는 것으로 나타났으며 비필수 아미노산의 경우에는 배양 1-2일의 최초 배양시기에 배반포형성에 좋은 영향을 미치지 못하였으나 후기에는 확장 및 부화배반포의 비율에 긍정적인 영향을 미쳐 배반포의 생존성 및 성장속도에 영향을 미치는 것으로 판단되었다. 흥미로운 것은 Compaction 시기를 기준으로 그 이전 또는 이후에 필수, 비필수 아미노산을 함께 첨가한 경우 모두 대조군에 비해 저하된 발육률을 보인 반면에 (D-F, J-L 참조) 2-7일까지 필수 또는 필수/비필수 아미노산 첨가 시 (A-C) 발육률 및 확장/부화비율이 급격히 개선되는 현상을 보여 각종 아미노산, 특히 필수아미노산이 상실배의 compaction 전후에 연속성을 가지고 충분히 공급될 때 배반포 형성 및 생존성에 영향을 미치는 것으로 판단되었다.

앞서 나타난 결과를 바탕으로 핵주입에 의해 생산된 핵이식란을 아미노산이 첨가된 배양체계 하에서 배양하여 배반포로의 발육을 유도하였다 (그림 10,11). 핵이식란의 배양 시 아미노산이 배제된 한정배양체계 (NC-PVA) 하에서는 배반포를 획득할 수 없었으나 아미노산이 첨가된 경우 일정비율의 배반포를 확보할 수 있었다 (그림 10). 그러나, 혈청원 (BSA) 첨가 배양체계에 비해서는 절반정도의 생산성을 나타내어 이후 Kinetin을 이용한 후속연구를 수행하였다.

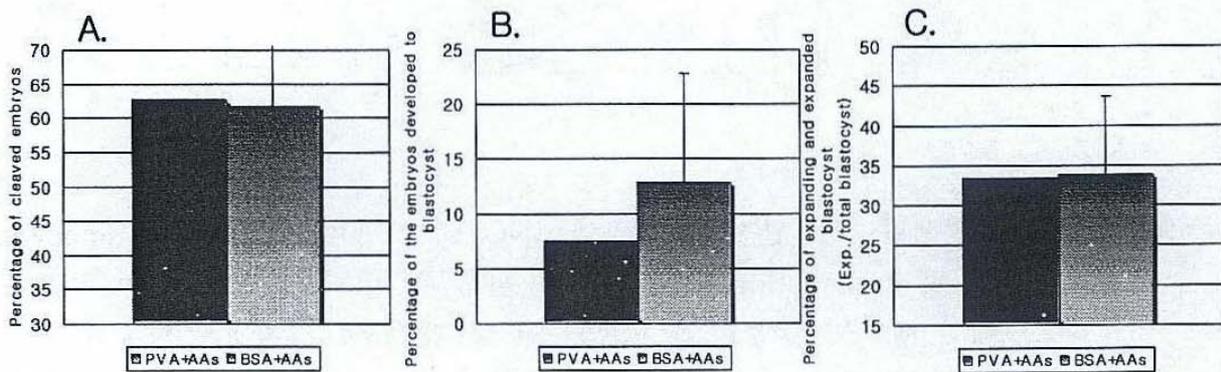


그림 3. 돼지 핵이식란에서 완전한정 배양액 (NCSU-PVA) 및 혈청원첨가 배양액 (NCSU-BSA)에 필수 및 비필수 아미노산의 첨가 시, 세포분열 및 배반포의 발달율과 배반포 중 expanding/expanded 그리고 hatching 배반포의 비율.

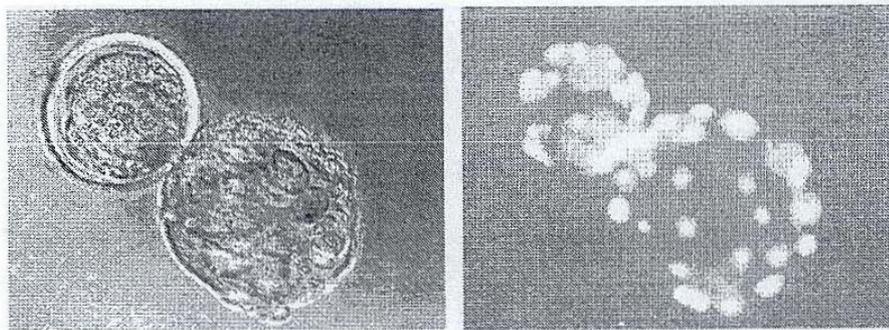


그림 4. 필수 및 비필수 아미노산이 첨가된 배양액 (NCSU-BSA-AA)에서 발생된 체세포 핵이식 유래 배반포의 모습 (활성화 후 8일째).

10. 완전한정배양체계 하에서 단위발생 및 핵이식란의 Kinetin 첨가 효과

Kinetin은 식물세포의 세포분열을 촉진시키는 cytokinin으로 알려진 식물 호르몬이다. Kinetin이 DNA에 존재할 경우에는 repair enzyme의 합성을 증가시키고 superoxide dismutase를 촉진시키는 것으로 알려져 있으며, 또한 ribosomal RNA transcription을 촉진시키는 것으로도 알려져 있다. 그러나 포유동물의 임신초기배아의 발달에 주는 효과는 아직 보고 된 바가 없었다. 따라서 본 연구는 돼지의 단위발생란과 핵이식란의 초기 배아발달과정에 있어 kinetin이 미치는 영향을 조사하였다.

완전한정 배양체계 하 (NCSU-PVA)에서의 kinetin 첨가 농도를 적정화하기 위하여, 단위발생란을 각각 100, 200, 400 및 800 μM 의 kinetin이 첨가된 완전한정배양액에서 발달시켜 세포분화율, 배반포 발달율, 그리고 총 배반포 중 확장 및 부화된 배반포율을 조사하였다 (표 7).

표 7. 완전한정 배양체계 (NCSU-PVA) 하에서 kinetin 첨가 시 돼지 단위발생란에 미치는 kinetin의 농도별 영향

	Total	Cleavage(%)	Blastocyst development(%)	Expanding & expanded blastocysts	Exp./total blastocysts(%)
PVA+ AAs	268	195(72.76%)	102(38.06%)	40(14.93%)	40/102(39.22%)
PVA+ AAs+ 100 μM kinetin	498	398(79.92%)	199(39.96%)	85(17.07%)	85/199(42.71%)
PVA+ AAs+ 200 μM kinetin	195	153(78.46%)	79(40.51%)	39(20.00%)	39/79(49.37%)
PVA+ AAs+ 400 μM kinetin	104	79(75.96%)	40(38.46%)	13(12.50%)	13/40(32.50%)
PVA+ AAs+ 800 μM kinetin	146	116(78.38%)	60(40.54%)	26(17.57%)	26/60(43.33%)

완전한정배양체계 (NCSU-PVA) 하에서 kinetin 첨가 시, 돼지 단위발생란에서 배반포 발육률은 별다른 차이를 보이지 않았지만 배반포 중 확장 및 부화된 배반포의 비율은 200 μ M의 kinetin 첨가 시 (49.37%) 대조군 (PVA+AAs; 39.22%)에 비하여 높게 나타났다. 이는 kinetin이 돼지의 초기 배아의 발달속도를 증가시키며, 초기배아발달에 있어 kinetin이 세포독성 혹은 유해한 영향을 미치지 않는다는 것을 보여준다.

다음은 혈청원 첨가 체외배양체계 (NCSU-BSA) 하에서 kinetin이 돼지 단위발생란의 발달에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 대조군 (BSA+AAs)에 비해 200 μ M의 kinetin 첨가 시 배반포의 발달율은 58.8%에서 40.82%로 감소하였다. 그러나 배반포 중 확장 및 부화된 배반포의 비율은 55.71%에서 70.00%로 증가하였다 (표 8). 이는 kinetin이 배반포의 발육속도 또는 생존성에는 부분적으로 긍정적인 효과가 있으나 BSA와 함께 첨가되었을 때 배반포 형성자체에는 부정적인 영향이 있음을 보여주고 있다.

표 8. BSA 첨가배양액 내에서 Kinetin이 돼지 단위발생란의 발육에 미치는 영향

	Total	Cleavage(%)	Blastocyst development(%)	Expanding & expanded blastocysts	Exp./total blastocysts(%)
BSA+ AAs	238	201(84.45%)	140(58.82%)	78(32.77%)	78/140(55.71%)
BSA+ AAs+ 200 μ M kinetin	98	78(79.59%)	40(40.82%)	28(28.57%)	28/40(70.00%)

위의 결과들을 토대로 하여 kinetin 첨가 시, 돼지 초기배아 발달단계의 compaction 이후 단계부터 5일, 6일, 7일째에 배반포의 발달단계를 조사, 분석하였다.

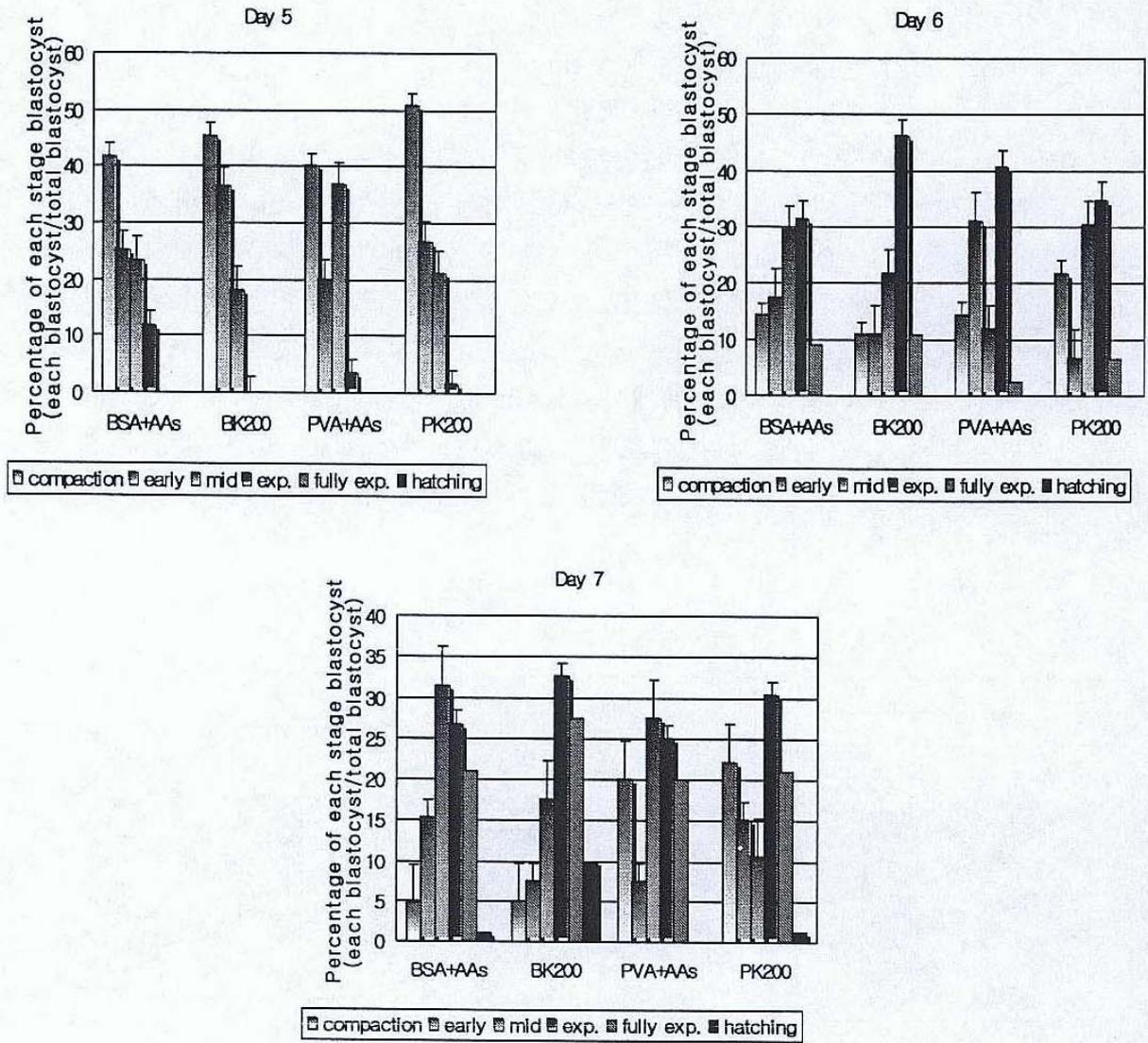


그림 12. Kinetin의 농도에 따른 돼지 단위발생란의 발달단계분포 (BK200: BSA+AAs+200 μ M kinetin, PK200: PVA+AAs+200 μ M kinetin).

그 결과 완전한정배양체계 (PVA 첨가)와 혈청원 첨가 배양체계 (BSA 첨가)에 각각 200 μ M의 kinetin을 첨가할 경우, 배반포의 성장속도 또는 생존성이 증가하는 것으로 나타났다. 특히 BSA 첨가 배양체계에서는 kinetin 첨가 시 배반포 형성비율은 저하된 반면 (표 8 참조) 총 배반포 가운데 부화된 배반포의 비율은 200 μ M kinetin 첨가 시에 0.95%에서 10.00%로 증가하여 kinetin이 배반포의 품질을 향상시키는 인자임을 보였다.

이후 단위발생란에서 얻은 결과들을 토대로 핵이식란에 kinetin이 미치는 영향에 대해 조사하였다 (그림 13). 핵이식란에 있어서 완전한정배양체계에 200 μ M의 kinetin을 첨가할 경우, 배반포 발육률이 7.50%에서 15.38%로 증가하였으며, 이것은 BSA 첨가 배양체계에서 배양한 핵이식란의 배반포 발달율 12.80%와 비교될 만한 것이었다. 또한 BSA 첨가 배양체계와 PVA 첨가 배양체계에 kinetin을 첨가하였을 때 생산된 배반포의 확장 및 부화배반포로의 발달율은 각각 37.50% 및 33.33%에서 50.00% 및 43.75%로 증가하여 핵이식란의 발육에 있어 kinetin은 BSA의 존재 유무에 관계없이 배반포의 발육 및 생존성에 효과가 있는 것으로 판명되었다.

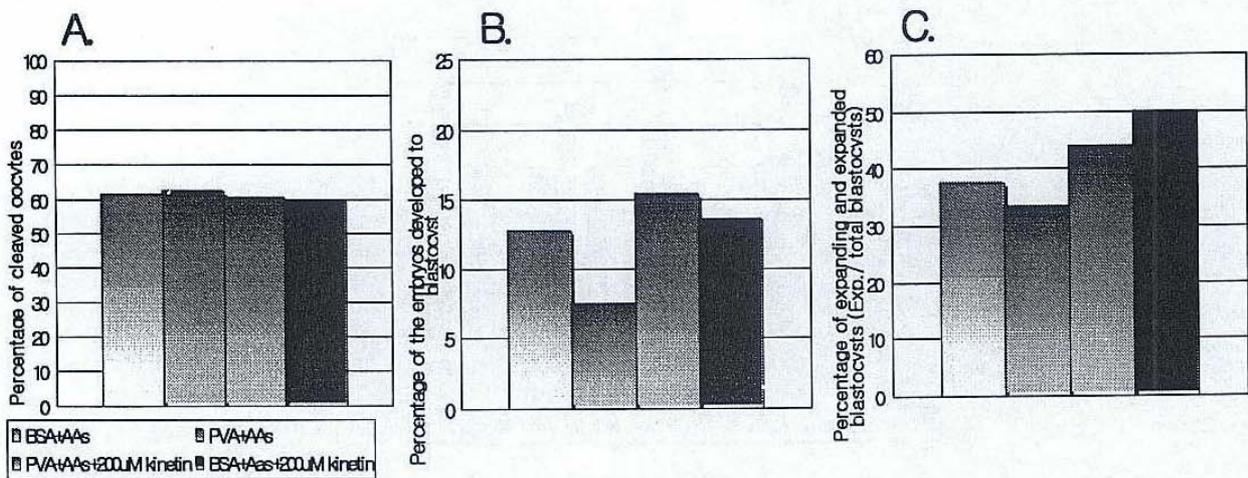


그림 13. 돼지 핵이식란에서 완전한정배양액(NCSU-PVA) 및 체외배양액(NCSU-BSA)에 kinetin 첨가 시, 세포분열 및 배반포의 발달율과 배반포 중 expanding/expanded 그리고 hatching 배반포의 비율.

11. 핵이식란의 분자생물학적 분석

Kinetin이 첨가된 배양액에서 배양된 핵이식 및 단위발생 배반포의 유전자발현 정상성을 분석하기 위해 분자생물학적 기법을 이용하여 대사와 관련된 각종 유전자를 분석하였다 (β -actin, HSP70, Glucose transporter-1, poly [A] polymerase). 그 결과 HSP70, poly [A]의 발현이 증가하였으며 이는 배양액 내의 kinetin이 전사과정에서의 단백질 3차구조 접힘 오류를 감소시키고 전사 후 변이를 최소화하는데 보조적 역할을 하는 것으로 판단된다.

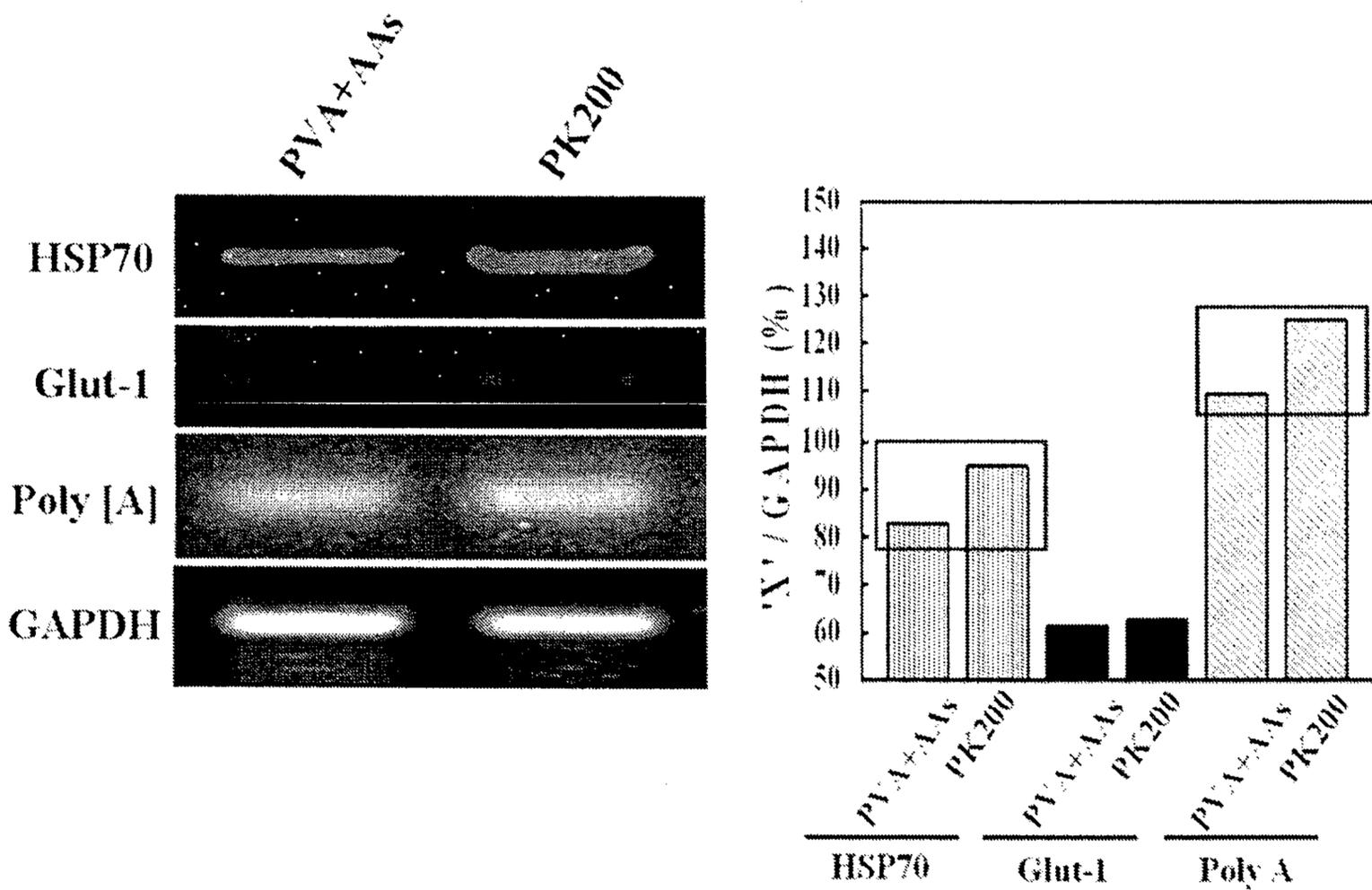


그림 14. 핵이식란의 체외배양 시 첨가한 kinetin이 HSP70, Glucosetransporter-1 및 poly[A]polymerase 유전자의 발현에 미치는 영향. HSP70 및 poly [A]의 발현이 증가되었음.

12. Cell extracts를 이용한 fibroblasts의 reprogramming

Porcine testes tissues에서 cell extracts를 얻는데 있어서 고농도의 protein 을 얻기 위하여 여러 번 porcine testes tissues의 sonication 조건을 조절하여 약 60% power에서 약 50초 로 2번씩 sonication 하였을 때 일정하게 약 4.2 mg/ml 농도를 갖는 cell extracts를 얻을 수 있었다. 이렇게 얻은 cell extracts를 230 ng/ml streptolysin O 를 처리하여 permeability를 갖는 porcine fibroblasts와 함께 배양하였다. 이때, ATP reagent system (1 mM ATP, 10 mM creatine phosphate, 25 ug/ml creatine kinase)과 1 mM NTP, 100 uM GTP를 함께 넣어 주었으며, extracts가 세포 내에서 잘 작용하도록 도와주는 물질을 함께 넣어 37°C water bath에서 50분 간 배양하면서 20분 간격으로 가라앉는 세포를 resuspending 시켜 주었다. 2 mM CaCl₂가 들어있는 DMEM 배지에 permeablized 된 세포를 넣고 37°C에서 배양 하여 pore가 형성된 cell membranes 을 resealing 해 준 후 15% FBS DMEM media를 넣어 세포가 culture dish에서 잘 자라도록 하였다. 조건에 따라 reprogramming 실험을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

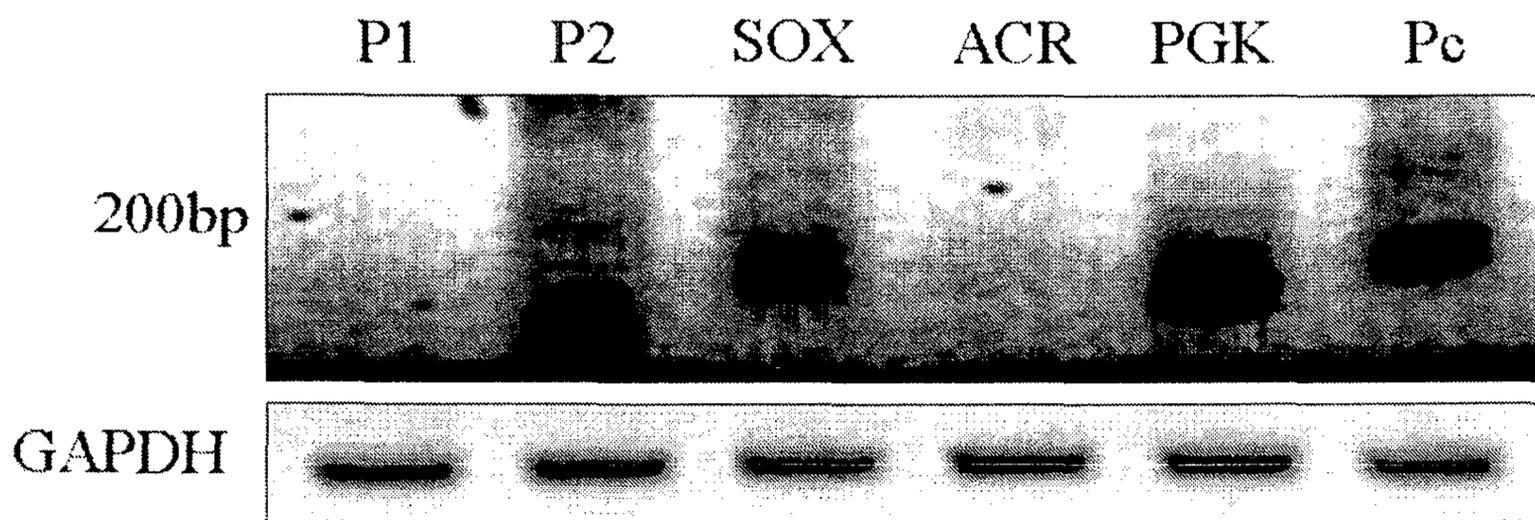


그림 15. porcine testis tissue extracts 처리 후 RT-PCR. P: protamine, SOX: SOX9, ACR: preproacrosin, Pc: protein C

그림 15는 porcine testes extracts를 처리하여 plating 후 48시간 후에 mRNA를 얻고, RT-PCR 하여 PCR 산물을 1% agarose gel 에 loading 하여 UV를 이용하여 확인한 사

진이다. 우선 정자의 고밀도 염색체 응축에 관여하고 있는 protamine 2 유전자가 확인 되는 것으로 보아서 확실히 섬유아세포가 porcine testes의 성질을 갖는 세포로 reprogramming 되었다고 볼 수 있다. 이 protamine 2 는 정자를 확인 할 수 있는 잘 알려진 marker gene으로 알려져 있기 때문이다. 그리고 그 외 에도 SOX9 이나 정자의 침체에 존재하는 acrosin의 전구체인 preproacrosin 유전자도 확인 할 수 있었고, protein C 도 확인 할 수 있었다. 실험에서 House keeping gene인 GAPDH 유전자를 이용하여 동량의 DNA를 사용하였음을 보여주었다.

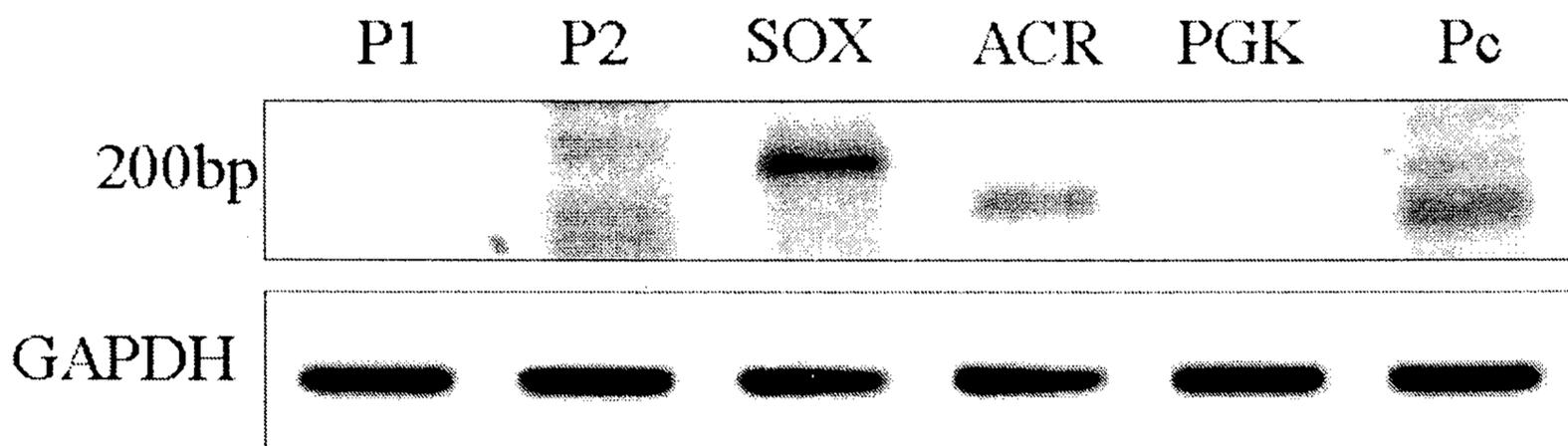


그림 16. porcine testis tissue extracts 처리 후 72시간 후 RT-PCR
P:protamine, SOX:SOX9, ACR:preproacrosin, Pc : protein C

그림 16은 porcine testes tissues extracts를 처리한 후 72시간 이 지난 후 RT-PCR을 실시 한 것인데, 동량의 DNA를 이용하여 PCR한 산물을 agarose gel에서 UV를 이용하여 확인 해본 결과 SOX9이나 preproacrosin과 같은 유전자들이 발현되고 있음을 확인 할 수 있었다. 위에서 확인한 것처럼 porcine testes tissues extracts를 이용하여 reprogrammed porcine fibroblasts를 얻을 수 있었다. 다음으로 reprogrammed porcine fibroblasts를 계대배양을 하였을 때도 reprogrammed 성질이 유지가 되는지, 유지가 된다면 얼마나 오래가는지 등을 확인해 보기위해서 위에 실험한 것과 같은 방법으로 reprogramming 유도 실험을 한 후, culture dish의 80% 정도에 세포가 채워졌을 때 계대 배양을 하여 RT-PCR을 통해 분석해보았다.

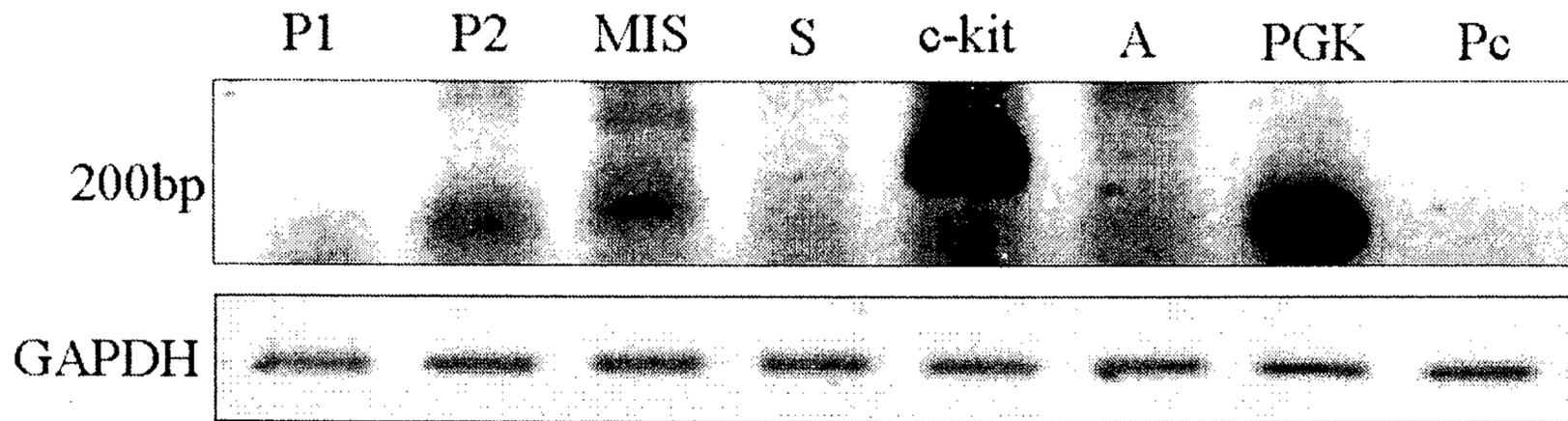


그림 17. porcine testis tissue extracts 처리하여 계대배양 후 RT-PCR

P: protamine, MIS: mullerian inhibitory S:SOX9, c-kit: c-kit ligand, Pc : protein C

그림 17은 porcine testes tissues extracts를 처리한 섬유아 세포를 계대배양한 후 RT-PCR 하여 PCR 산물을 1% agarose gel에 loading 하여 UV를 통해 본 것이다. 계대 배양을 하였음에도 불구하고 정자의 marker로 알려진 protamine 2 유전자가 여전히 계속 발현되고 있음을 확인할 수 있었다, 또한, 다른 marker로 정자의 c-kit protein이 binding 할 수 있는 c-kit ligand가 발현되고 있음을 확인할 수 있었다. 그 외의 몇 가지 유전자도 발현되고 있었으나 정자를 가진 testes의 특징이라고 알려진 2가지 marker gene이 발현 되고 있는 것으로 보아 이 porcine fibroblasts는 porcine testes tissues extracts에 의해서 reprogramming 되었다고 확인할 수 있었다. 위의 결과로 porcine testes tissues extracts를 이용하여 porcine fibroblasts가 reprogramming 되었다는 것을 확인할 수 있었다.

부가적인 실험으로 앞에 이용한 섬유아세포는 primary culture 된 것으로 시간이 지남에 따라서 세포가 생체의 세포처럼 나이가 들어 점점 자라는 속도도 느려지며 여러 다른 기능들이 퇴화하는 세포로 되어 결국은 더 이상 자라지 못하는 문제점이 있다. 그래서 이미 stable 화 되어 cell line으로 구축된 몇 가지의 porcine cell을 이용하여 실험해 보았다. 우선 앞선 실험과 마찬가지로 porcine cell에서 porcine testes의 specific한 유전자들이 발현되는지 RT-PCR을 통하여 확인 해 보았다. 그 결과 fibroblast cell에서는 발현되지 않지만, sertoli cell에서는 발현이 안 되는 것으로 알려진 IL6, collagen, VEGFA, 및 dochrine 유전자들이 sertoli cell을 이용한 RT-PCR에서 확인되지 않음을 앞선 실험에서

확인하였다. 그래서 이런 몇 가지 porcine cell line들을 이용하여 reprogramming 실험을 하였다. 실험에 이용한 cell line은 총 5 가지로 S (spontaneous stable porcine fibroblast), V6 (Transfected SV40 porcine fibroblast), TE (Transfected hTERT porcine epithelial cell), V22 (Transfected SV40 porcine epithelial cell), VTE (Transfected SV40 and SV40 porcine epithelial cell)을 이용하여 실험하였다. 우선 5가지의 porcine cell을 230 ng/ml streptolysin O를 이용하여 permeability 시킨 후 porcine testes tissues extracts를 처리하여 RT-PCR을 하여 확인하였다.

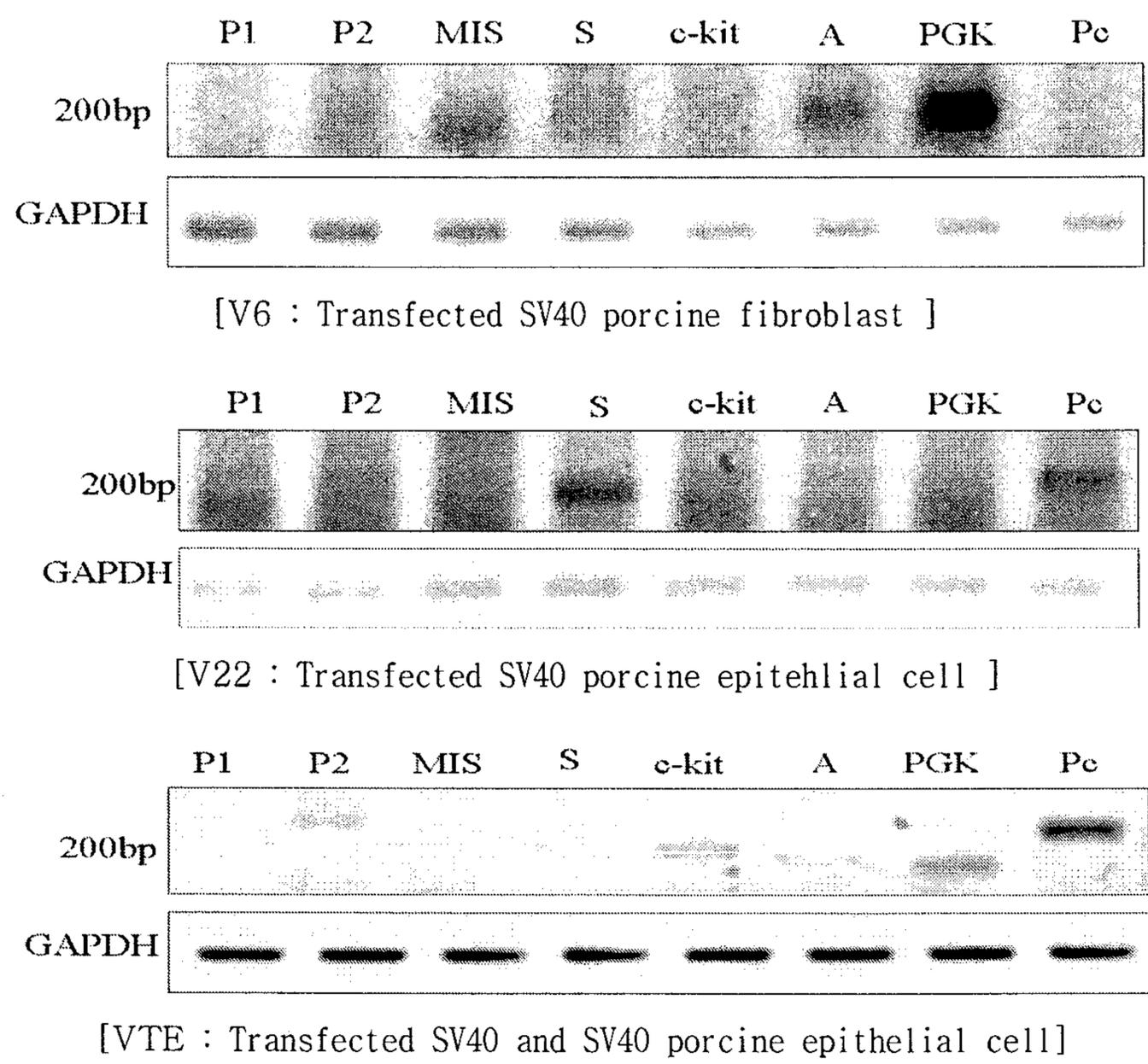
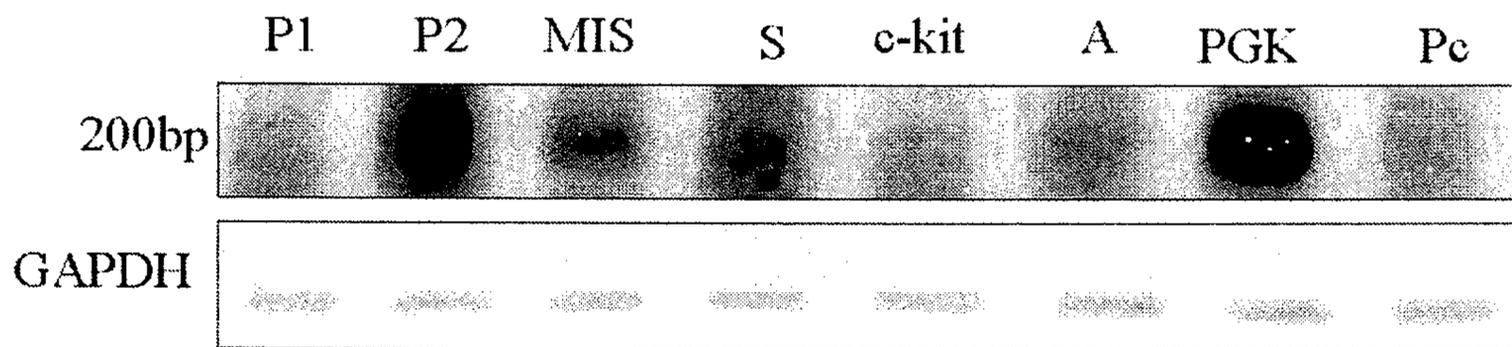
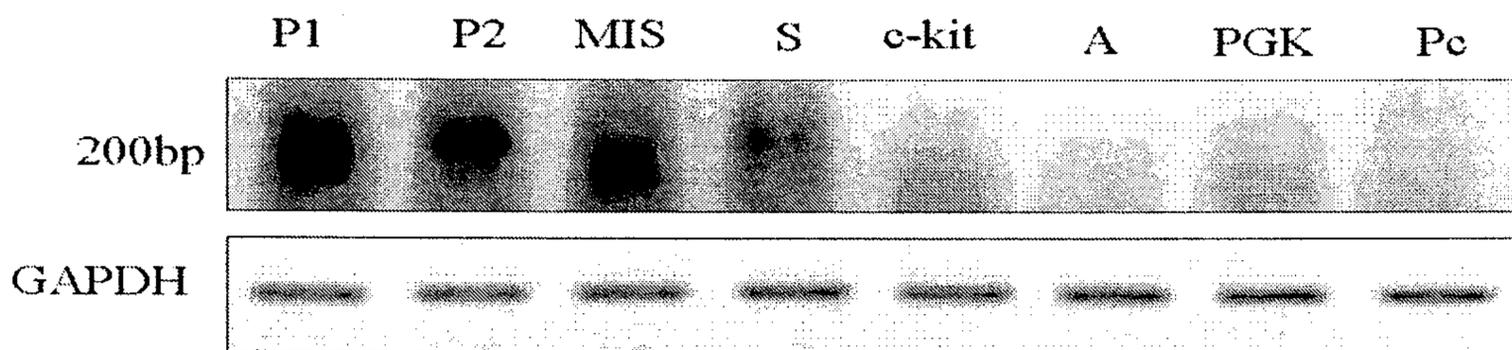


그림 18. Porcine cell line에 porcine testes tissues extract를 처리한 후 RT-PCR

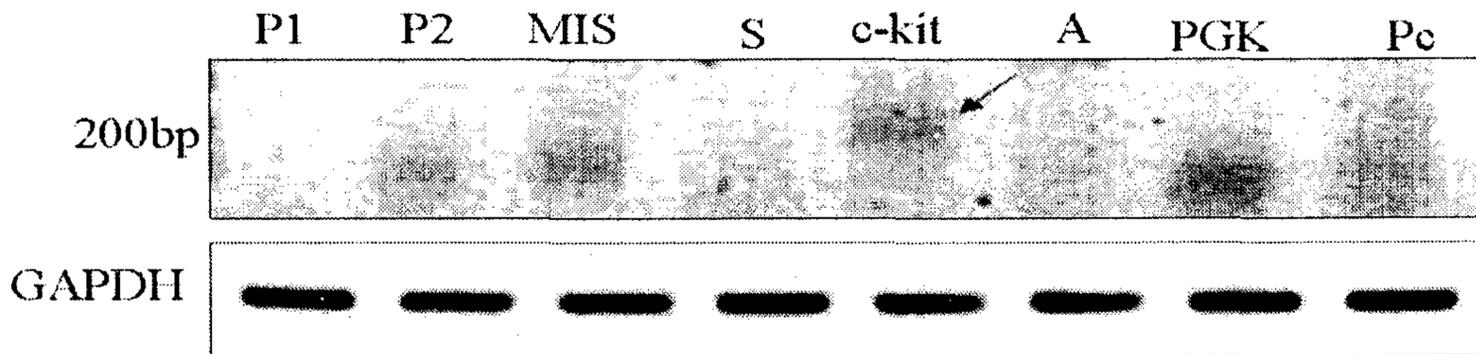
그림 18에서 stable 화 된 porcine cell line을 이용하여 실험한 결과 3 가지 cell line에 서 몇 가지의 testes specific한 유전자가 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 대부분 PGK2 (Phospho-glyceratekinase 2) gene을 발현하는 정도가 강한 것을 확인 할 수 있었다. 그 리고 fibroblast 가 아닌 epithelial cell line 에서는 원래 design 한 것과 다른 사이즈의 밴드가 specific 하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과로 이미 stable화 된 cell line 보다 primary culture 된 porcine fibroblasts에서 reprogramming이 잘 일어난다는 것 을 확인하였다. 그리고, 다음으로 이런 reprogrammed porcine cell도 계대 배양을 하였을 때 reprogramming 의 성질일 유지 되는지 확인해 보았다.



[V6 : Transfected SV40 porcine fibroblast]



[V22 : Transfected SV40 porcine epithelial cell]



[VTE : Transfected SV40 and SV40 porcine epithelial cell]

그림 19. Porcine cell line에 porcine testes tissues extract를 처리하여 계대배양한 후 RT-PCR

그림 19에서 보듯이 stable 화 된 porcine cell line은 계대 배양하여 RT-PCR 한 결과이다. 그림에서 보듯이 V6와 V22 cell line 에서는 48시간 후에 분석한 것보다 더 많은 유전자가 발현되는 것을 확인 할 수 있었고 발현 정도도 더 높은 것을 알 수 있었다. 반대로 VTE cell line 에서는 48시간 후에 발현되던 유전자도 거의 발현되지 않고 발현정도도 낮은 것으로 확인되었다. 이와 같은 결과로 보아 primary culture된 porcine fibroblasts가 stable화된 cell line 보다 reprogramming의 효율이 더 높음을 알 수 있었다. 따라서 primary culture 된 porcine fibroblasts를 이용하여 reprogrammed cell을 만들어서 세포핵을 얻어, 이후 핵이식에 이용함으로써 그 효율이 높아지는지 확인하였다. 핵이식 결과는 다음과 같다.

13. 핵주입에 의한 핵이식란의 생산 및 재프로그래밍 세포의 공여핵원 사용

핵주입 및 세포융합 기법을 이용하여 예비실험을 실시한 결과 핵주입에 의한 핵이식란의 공급이 효율적인 것으로 판단되어 1차년도 사업기간 중 세포융합에 의한 생산을 중단하였으며 핵주입에 의해 모든 핵이식실험을 진행하였다. 이후 재프로그래밍된 세포를 이용, 음성생식세포로 재프로그래밍된 세포핵을 핵주입 기법에 의해 핵이식을 수행, 핵이식 배반포를 생산하였다 (표 9).

표 9. 재프로그래밍된 공여세포를 이용한 돼지 체세포 핵이식란의 체외배양

Donor cell*	total nuclear injected oocytes	cleaved (%)	blastocysts (%)	hatching (%)
Reprogrammed	119	72 (60.5)	27 (22.7) ^a	10 (8.4)
control	83	46 (55.4)	11 (13.3) ^b	5 (6.0)

*Reprogrammed: donor cells treated with streptolysin-O were co-incubated with cell extracts derived from whole porcine testes.

^{ab}p<0.05

표 9에서 보는 바와 같이 웅성생식세포로 재프로그래밍된 세포를 이용할 경우 배반포 생성율이 유의적으로 증가하였다. 이에 어떤 요소들이 생산성을 향상시켰는지 확인하기 위한 지표로서 세포의 성장, 대사 및 전사능과 관련하여 B-actin, glucose transporter-1 및 Poly[A], 전능성과 관련하여 Pou5f (Oct-4관련) 및 Nanog, 핵이식에 의한 재프로그래밍 후 웅성생식세포로 재프로그래밍된 세포의 핵이식 후 경향성 확인을 위해 Sox-9, 초기 착상과 관련하여 cdx-2 및 Eomes의 발현을 상대적으로 비교하였다 (그림 20). 그 결과 흥미롭게도 웅성생식세포로 재프로그래밍된 세포는 핵이식으로 전능성을 회복한 후에도 일반세포를 이용한 핵이식에 비하여 여전히 Sox-9이 높게 발현되는 것을 확인할 수 있었으며 기본적인 대사능이나 전사능도 일반 세포에 비해 높게 나타나는 경향을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 또한 초기분화 및 착상에 결정적인 인자인 cdx-2도 높게 발현되는 것으로 나타나 웅성생식세포로 재프로그래밍된 세포를 이용한 핵이식이 장차 수정란이식을 통한 실제 복제돼지의 생산 시 착상효율을 개선하여 생산성을 높일 수 있는 방안의 하나가 될 것으로 판단된다.

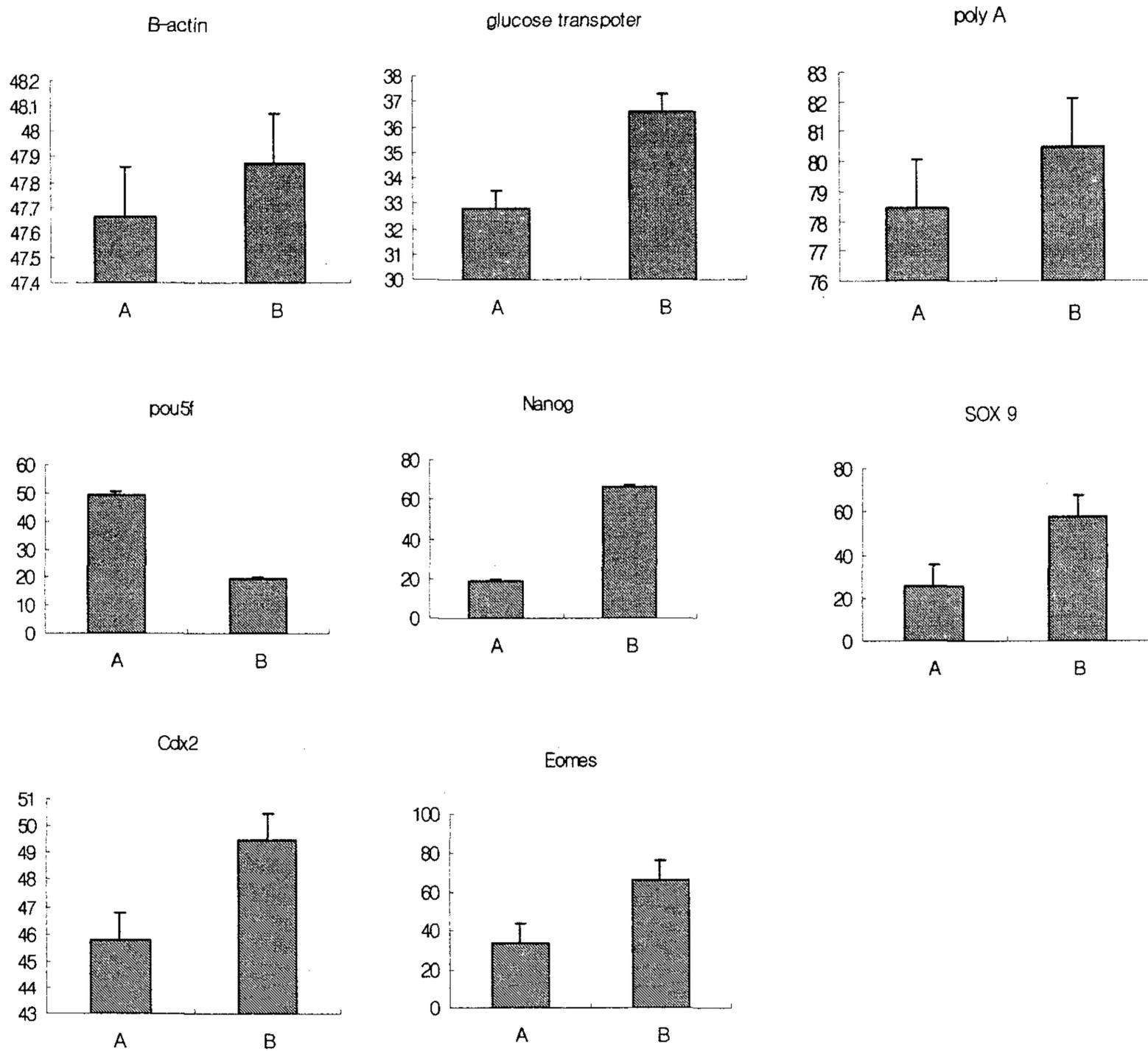


그림 20. 재프로그래밍된 세포를 이용한 핵이식 배반포의 각종 유전자 발현 비교 A: 일반 섬유모세포 공여핵, B: 웅성생식세포로 재프로그래밍된 섬유모세포 공여핵

14. 돼지 단위발생 및 핵이식 배반포의 axis 패턴 분석

돼지 2세포기 핵이식란의 할구에 형광표지를 하는 방법은 Piotrowska et al. (2001)의 방법에 준하여 다음과 같이 수행. 세포막 투과성 염색액인 DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate; Molecular Probes, OR, USA)를 virgin olive oil에 2.5 mg/ml의 농도로 녹인 다음 전핵주입용 미세침으로 흡입, 미세조작기에 장착. 염색액이 장착된 미세침으로 투명대를 통과한 후 오일미소적을 할구 세포막에 밀착시켜 놓아 염색액이 투과되도록 하거나 세포막을 관통하여 세포질 내로 직접 주입하였다. 이때 2세포기 단위발생란의 특정 할구에 무작위로 염색액을 주입한 후 매 1시간마다 관찰, 선분할세포 (leading cell)와 후분할세포 (lagging cell)을 확인하고 이에 따라 염색액이 주입된 세포가 선분할세포인 경우와 후분할세포인 경우를 각각 나누어 체외배양하였다. 그 결과 부분적으로 2세포기의 분할순서에 따라 배아부와 배아외부로 나뉘는 것을 확인하였으며 완전히 구분되지 않는 경우에도 내부세포피를 중심으로 하는 부분과 영양막세포를 중심으로 하는 부분이 나뉘어짐을 확인하였으며 선분할세포가 영양막세포로 가는 경향을 나타내었다 (그림 21 참조). 이는 정자의 도입각도에 따라서만 배반포 axis가 결정되고 단위발생에서는 나타나지 않는다는 마우스에서의 보고 (Piotrowska et al., 2001)와는 다르게 나타나 돼지에서는 난자에서도 axis 결정유도인자가 존재하는 것으로 판단되었다.

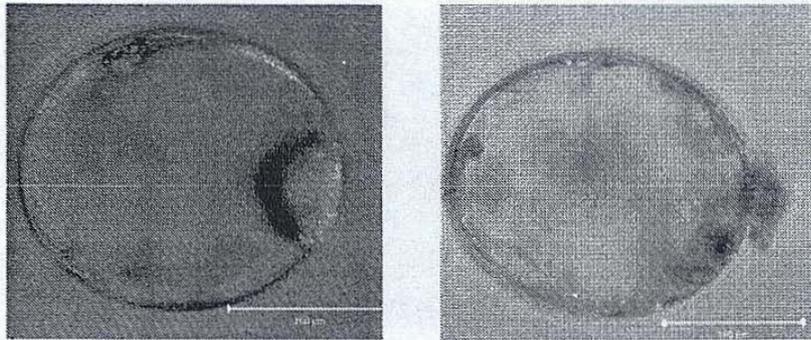


그림 21. DiI 및 DiD 염색 후 배반포 염색상 :좌측: 붉은 색의 DiI가 염색된 쪽의 할구가 내부세포피(ICM)에서 먼 쪽의 영양막세포층으로, 우측: ICM 및 주변 영양막세포에 한정된 모습 확인.

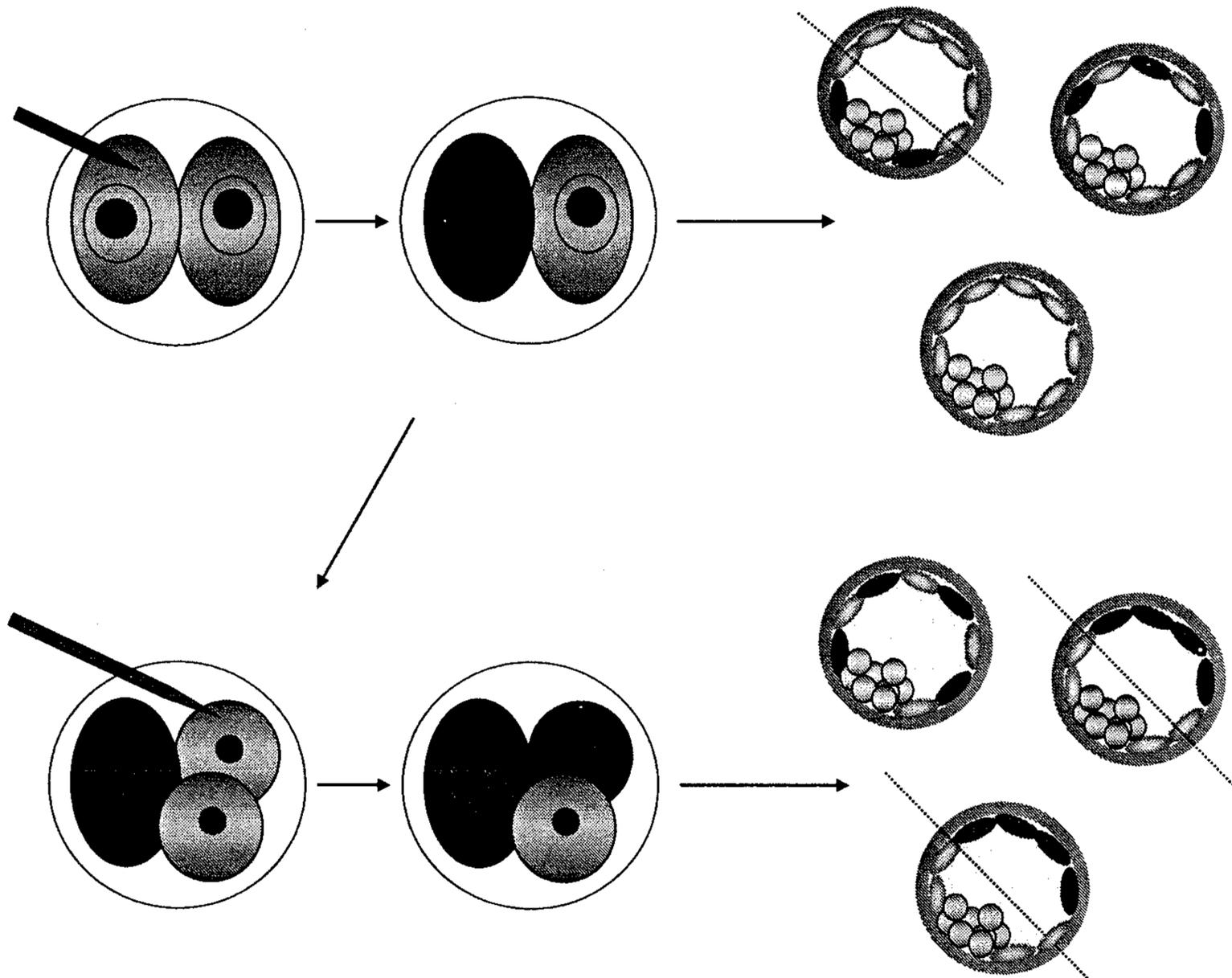


그림 22. 핵이식 2세포기 배아에 나타날 수 있는 배반포 axis의 경우의 수

그림 22는 핵이식 2세포기 배아에 나타날 수 있는 배반포 axis의 경우의 수로서 앞선 단위발생에서의 결과를 바탕으로 핵이식 배아를 이용 후속실험을 수행하였으나 특별한 차이점을 발견되지 않았으며 단위발생란과 마찬가지로 배반포 axis의 편향성은 60-70%의 경향을 나타내었다.

15. One-step 핵이식에 의한 핵이식 배반포 생산

일반적으로 핵이식은 그림 23에서와 같은 과정을 거치게 되는데 본 연구팀에서는 핵이식 효율을 최적화하고 작업시간을 단축시키기 위해 우측과 같은 one-step 핵이식 기법을 개발하였다 (그림 23). 예비실험결과 핵을 주입한 직후에 탈핵하는 것보다는 탈핵직후에 주입하는 효율이 높게 나타나 탈핵 직후에 핵을 주입하는 방법을 사용하였으며 탈핵 시 cytoskeletal inhibitor는 사용하지 않았다. 이는 타 동물종에서는 작업이 불가능한 사항으로 돼지의 경우만 가능하였는데 세포질의 구조에 차이에 기인한 것으로 판단된다.

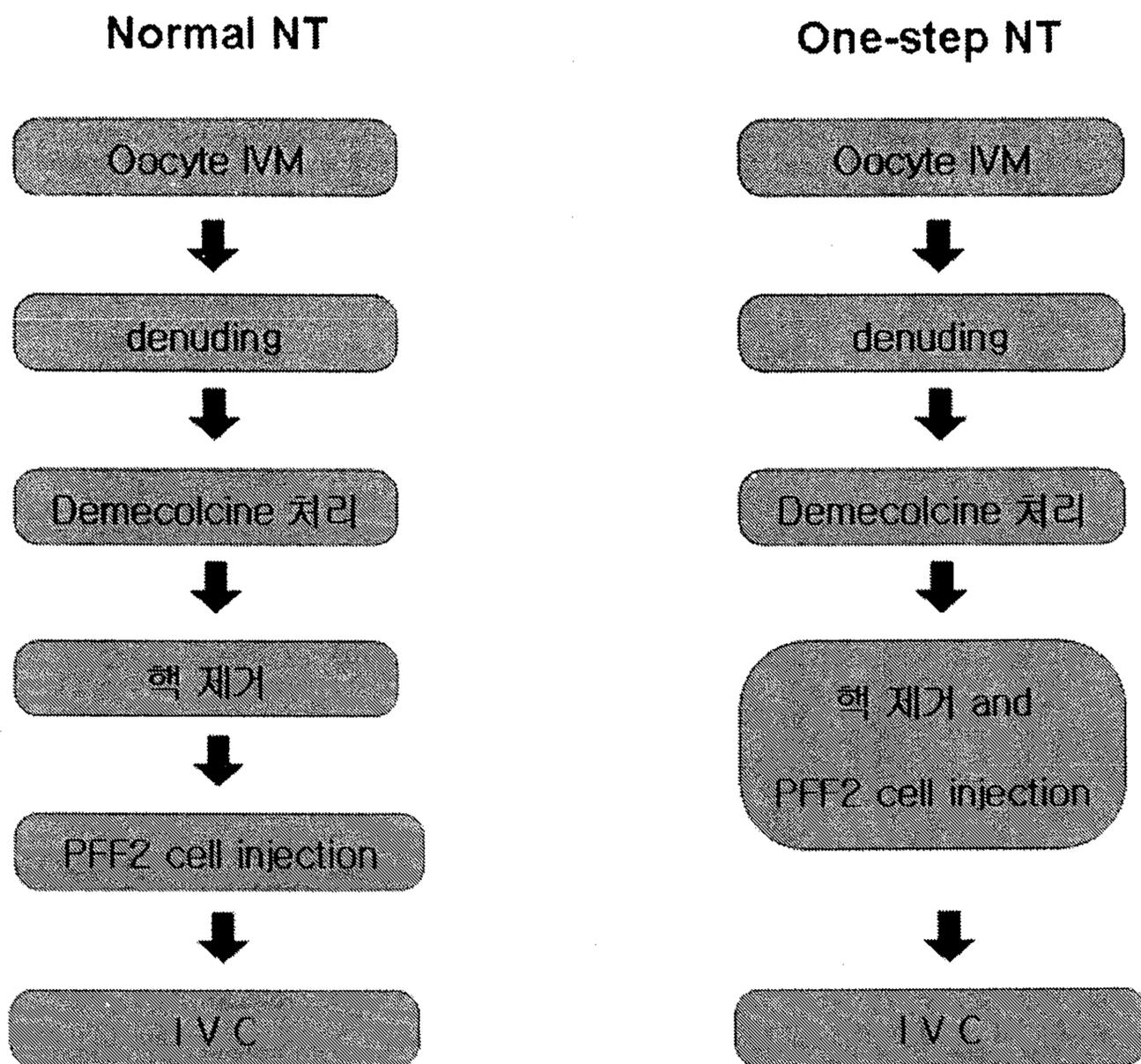


그림 23. One-step 핵이식에 의한 핵이식 배반포 생산과정

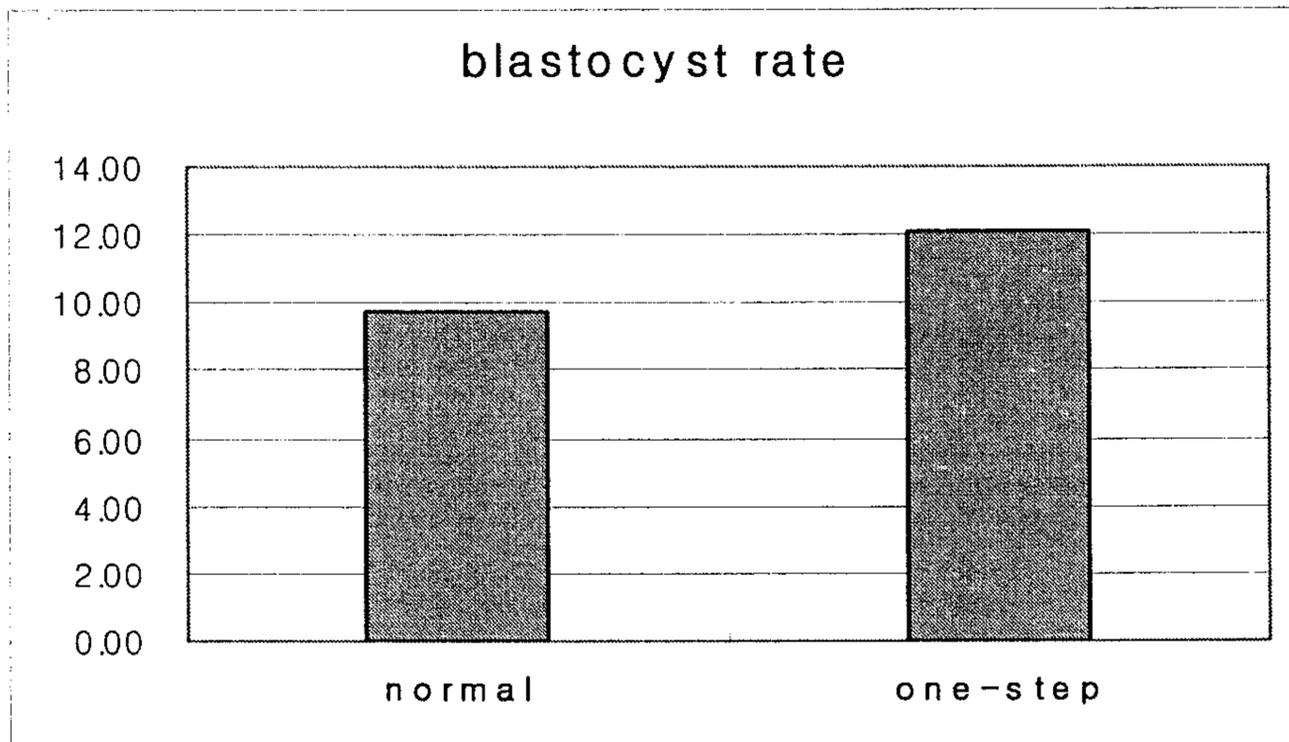


그림 24. One-step 및 일반 핵이식에 의한 핵이식 효율비교. One-step 일 때 배반포 생성율이 높게 나타남.

그림 24에서와 같이 one-step 핵이식에 의한 돼지 핵이식란이 일반 핵이식란에 비하여 높은 배반포 발생효율을 나타내어 작업절차를 단순화한 one-step 핵이식기법이 돼지에서는 효율적인 복제동물 생산방법의 하나라고 생각된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 평가의 착안점 및 기준

구분	연도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
1차 연도	(2004-2005)	핵이식기법의 확립	40 %	돼지 핵이식기법의 확립정도
		세포배양, 추출물의 획득 및 세포내 추출물 도입	30 %	세포내 추출물 도입 성공여부
		특이유전자의 발굴	30 %	발굴 유전자 목록제시
2차 연도	(2005-2006)	핵이식기법의 확립 및 체외배양	50 %	핵이식 배반포 생산
		세포추출물 도입에 의한 체세포핵의 재프로그래밍	40 %	재프로그래밍 여부 분석
		선별유전자의 염기서열분석 및 분석시스템구축	10 %	분석 성공 여부
3차 연도	(2006-2007)	재프로그래밍 세포를 이용한 핵이식 및 체외배양	60 %	재프로그래밍 세포 핵이식란의 발달효율 및 배반포발육 시도
		세포추출물 도입세포의 재프로그래밍 분석	30 %	핵이식란의 재프로그래밍 여부 분석결과제시
		재프로그래밍 세포 유래 배반포의 분자생물학적 분석	10 %	재프로그래밍 핵이식 배반포를 이용한 분자생물학적 분석
최종 평가		효율적인 세포추출물의 세포 내 도입	20 %	세포추출물의 도입 기법 확립
		세포추출물 도입세포의 재프로그래밍	30 %	도입 세포의 재프로그래밍 확인
		재프로그래밍 세포를 이용한 핵이식의 효용성	50 %	재프로그래밍 세포 핵이식란의 발생 효율성

제 2 절 연구개발 목표의 달성도

1. 연구개발목표의 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
체세포 배양	체세포는 오염의 가능성이 적고 핵이식 시 비교적 좋은 결과를 보이는 돼지 태아섬유아세포를 이용하였으며 primary cell stock을 3가지 종류의 세포를 각각 2-9 passage까지 확보하였다.	목표치 달성
세포추출물의 정제 및 추출물의 검증	수태지 고환에서 채취한 Sertoli 세포를 초음파로 의해 분쇄한 후 추출물을 얻어 3 µg/µl 이상의 cell extract를 확보하였다.	목표치 달성
세포의 재프로그래밍 분석을 위한 유전자 선별 및 염기서열 분석	Sertoli 세포에 발현되는 고환 특이유전자 primer와 섬유아세포에서는 발현되나 sertoli 세포에서는 발현되지 않는 비특이유전자 primer를 발굴하여 RT-PCR을 이용, 각각의 세포에서 검증하였다.	목표치 달성
세포추출물의 세포내 도입	섬유아세포에 230 ng/ml streptolysin을 처리하여 permeability 를 주어 ATP-regenerating system (ATP, NTP, GTP) 과 함께 세포 추출물을 넣어 혼합 배양한 후 CaCl ₂ 를 이용하여 세포막을 복구하여 plating하였다.	목표치 달성
RNA 추출 및 RT-PCR	재프로그래밍된 세포에서 mRNA를 추출하여 RT-PCR을 통해 얻은 PCR 산물을 전기영동하여 UV 하에서 확인하였다.	목표치 달성
효율적인 핵이식란의 생산 및 분석	단순한정 배양체계 확립을 위해 PVA 및 필수/비필수 아미노산이 첨가된 배양액 이용하였으며 세포 분열 촉진인자인 kinetin을 이용한 배양효율 향상에 성공하였다.	목표치 달성

다음 장에 계속

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
One-step 핵이식 기법의 확립	단위발생란을 이용하여 화학적 한정배양체계를 이용한 체외성숙 및 체외배양기법을 확립하였고 (필수 및 비필수아미노산 첨가 NCSU23을 기초배양액으로 사용) 2차년도에 이를 핵이식란의 기본 배양체계로 활용하였다. 핵이식은 핵직접 주입법을 이용함으로써 전기융합에 따른 번거로운 과정을 생략하고 10% 이상의 배반포 발생율을 확보하였고 3차년도에서는 one-step 핵이식기법을 이용하여 작업절차의 단축 및 생산효율 향상을 이루었다.	목표치 달성
핵이식 배반포 분석	재프로그래밍된 세포를 이용한 핵이식 배반포의 유전자발현 특성 분석을 통해 일반 공여핵을 이용한 핵이식세포와의 차이점을 분석하고 응성생식세포화된 체세포의 핵이식에 따른 장점을 확인하여 재프로그래밍된 세포의 효용성을 증명하였다. 특히 착상 및 초기발생과 관련된 인자의 유전자발현정도가 재프로그래밍된 세포에서 높게 나타남을 확인하여 간접적으로 복제동물 생산효율을 증가시키는 방법이 될 수 있음을 증명하였다. (수정란이식 부분은 아래 부가설명 참조)	목표치 달성
배반포 axis 패턴 분석	단위발생 및 핵이식란의 배반포 axis 패턴을 분석함으로써 다른 동물종과 다른 돼지 배아의 초기분화기전의 일부를 밝혀내었다.	추가자료로 활용 (기존 목표 외 성과)

*수정란이식에 의한 복제산자생산은 본 연구진이 바이오장기사업을 추가적으로 수행하는 과정에서 함께 수행하려 하였으나 총괄 및 협동연구책임자 모두 각자 진행하던 바이오장기사업의 세부과제가 현재 중단 또는 종료된 상황으로 본 arpc 과제만으로는 이를 단독으로 수행하기 매우 곤란하여 배아단계의 분석에서 불가피하게 과제를 종료하였으며 체내이식실험은 수행하지 못하였다. 현재 개인적으로 농장섭외 및 추가연구계획을 모색 중이나 유관기관의 연구진과 함께 장기적인 계획을 가지고 수행해야 할 것으로 생각된다.

제 3 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

핵이식은 탈핵 난자에 2배체 외래핵을 주입한다는 점을 제외하면 수정 후 정자핵이 난자 내에서 보이는 염색질 탈응축, 재응축, 핵막종대 및 기타 염색질 재프로그램 현상을 그대로 재현하므로 각 단계에서 정자와 난자의 수정과 유사한 환경을 조성하는 것이 보다 온전한 체세포핵의 재프로그램을 유도하는 방법의 하나라고 가정할 수 있다. 따라서 체세포 핵이 정자 염색질의 기질을 갖도록 체세포핵의 변화를 유도하면 핵이식 후 정상수정란과 최대한 유사한 후성적 변화과정을 거쳐 기존의 방법에 비해 핵이식유래 배아의 정상성을 높일 가능성이 있으며, 정자가 유도하는 난자의 활성화와 유사한 자극을 유도하여 인위적 활성화를 배제할 수도 있게 된다. 이러한 가정을 바탕으로 본 연구에서 음성생식세포 유래 추출물을 이용한 핵이식을 돼지에서 수행한 결과, 핵이식 배반포의 생산효율이 증가하였으며 또한 생산된 배반포의 대사능, 전사능력 및 초기분화와 착상에 관련된 유전자의 발현효율 또한 증가하여 일반 체세포 핵이식 시 나타나는 착상전후의 급격한 배아소실과 같은 결함 비율을 낮출 수 있는 기술로 평가할 수 있다. 또한 본 연구에서는 one-step 핵이식이라는 돼지에서만 적용할 수 있으면서도 간편하고 신속한 핵이식 기법을 제시하였다. 이 기술은 관련 연구자들이 복제돼지 관련연구를 사업화하는데 현장에서 수용 가능한 신기술로 관련기술의 보급에 크게 이바지할 것이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 연구개발결과의 기대효과

1. 기술적 측면 : 포유류 성체의 체세포를 이용한 동물의 복제기법은 각종 동물 종에서의 복제산자의 탄생으로 말미암아 기술적인 면에서 분화 발생이 종료된 체세포의 역분화를 통한 개체 발생이 가능함을 증명하였다. 그러나 그 효율성은 여전히 매우 낮은 상태로 큰 개선이 이뤄지지 않고 있다. 특히 동물복제에 공여되는 난자의 발생능에 관련된 연구들과 복제수정란의 배양 및 복제된 개체의 신체상태 등에 관한 접근은 다양하게 이뤄지고 있는 반면에 공여핵 세포에 있어서는 세포주기 동기화 또는 혈청기아배양 등과 같은 처리방식 이외에는 세포의 변화를 이용한 복제효율의 개선에 관한 접근방식은 이루어지고 있지 않고 있다. 핵이식에 도입되는 체세포는 결과적으로 외래 핵인 정자의 난자세포질 내 도입과정과 동일한 과정을 거치게 되므로 외래도입 체세포를 정자의 성상과 유사하게 만들어주는 이와 같은 연구를 통해 난자의 활성화 과정을 비롯하여 핵이식의 전 과정을 일반 수정과정에 보다 근접시킴으로써 관련 연구분야의 발상의 전환을 가져올 수 있을 것이다.
2. 경제 · 산업적 측면 : 돼지의 경우 핵이식 복제기법의 적용 시, 소에 비해 연구재료의 확보가 상대적으로 용이하고 동시에 다수가 참여하는 노동집약적인 방법으로 대규모의 물량지원에 집중함으로써 말미암아 상대적으로 낮은 성공률에도 불구하고 효율성을 높이려는 연구는 더디게 진행되고 있으며 이는 실질적으로 산업화에 장애요인이 되고 있다. 본 연구개발을 통하여 복제돼지의 생산에 있어서 핵이식 시 공여되는 체세포의 역분화를 보다 안정적으로 유도함으로써 장차 장기이식용 형질전환 복제돼지의 생산효율 향상에 크게 기여할 수 있어 산업화에 있어서 우위를 선점할 수 있을 것이다. 본 기술을 실험동물에 적용한다면 부가가치가 높은 질환 모델동물로서의 실험동물 생산 가능성을 열어 차세대 농축산업 분야의 하나로 생산성 높은 질환모델동물의 작출에 관한 가능성을 모색해볼 수 있을 것이며 이를 통해 의약학 분야와 유기적인 관계를 가지고 산업화로 적극적으로 나아갈 수 있을 것이다.

제 2 절 활용계획 및 추가연구의 필요성

1. **활용방안** : 본 연구에서 확보된 기술을 의학 및 생명과학과 관련된 산업체에 이전하여 특수목적용 복제돼지의 생산효율을 높이거나 질환 모델동물을 생산하는데 활용할 수 있다. 특히 이러한 새로운 접근방식에 의한 효율적인 복제돼지의 생산은 장차 장기이식용 형질전환 복제돼지의 생산효율 향상에 크게 기여할 수 있는 바, 본 연구결과를 대체 장기이식개발과 관련된 연구단체 등에 제공함으로써 국제적으로 경쟁력을 갖추어나가고 있는 국내의 이종 장기이식개발을 더욱 앞당길 수 있을 것이다.

2. 후속인력양성 및 결과물 활용

- 가. 본 연구의 참여인력을 장차 국내 의과, 수의과 및 농과대학의 관련 교수요원으로 육성하여 우리나라 농축산 및 기초의학 연구 발전에 기여함과 아울러 국내 관련 산업계의 선진기술개발에 참여.
- 나. 본 연구과제에 석·박사 대학원생의 직접 참여를 유도함으로써 국제적으로 저명한 학회에서 결과를 발표토록 하거나 SCI 등재 학술지에 투고할 수 있도록 지원.
- 다. 본 연구결과가 실제 바이오장기 등 복제돼지와 관련된 유관 연구에 체계적으로 활용될 수 있도록 SCI 급 학술지에 논문을 발표함.
- 라. 연구결과 지적 재산권으로 보호해야 할 영역이 있다고 판단되는 경우 국내외 특허 등 지적 재산권 출원을 적극적으로 검토함.
- 마. 관련연구진과의 상호기술제공을 통해 연구성과물의 적용 폭을 확대함.

3. 추가연구의 필요성

본 연구를 통해 실질적으로 복제돼지를 생산하려면 장기적으로 대형과제 (예: 바이오장기사업) 등과 함께 공동연구가 이루어질 필요가 있을 것으로 생각된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

Anthony CT, Danzo BJ, Orgebin-Crist MC (1984) Investigations on the relationship between sperm fertilizing ability and androgen-binding protein in the restricted rat. *Endocrinology* 114:1413-1418.

Chavatte-Palmer P, Heyman Y, Richard C, Monget F, LeBourhis D, Kann G, Chilliard Y, Vignon X, Renard JP (2002) Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. *Biol Reprod* 66:1596-1603.

Coelingh JP, Monfoort CH, Rozijn TH, Leuven JA, Schiphof R, Steyn-Parve EP, Braunitzer G, Schrank B, Ruhfus A (1972) The complete amino acid sequence of the basic nuclear protein of bull spermatozoa. *Biochem Biophys Acta* 285:1-14.

Dadoune JP (2003) Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microsc Res Tech* 61:56-75.

Della-Maria J, Gerard A, Frank P, Gerard H (2002) Effects of androgen-binding protein (ABP) on spermatid Tnpl gene expression in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 198:131-141.

De Sousa PA, King T, Harkness L, Young LE, Walker SK, Wilmut I (2001) Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. *Biol Reprod* 65:23-30.

Dinnyes A, De Sousa P, King T, Wilmut I (2002) Somatic cell nuclear transfer: Recent progress and challenges. *Cloning Stem Cells* 4:81-90.

Fuentes-Mascorro G, Serrano H, Rosado A (2000) Sperm chromatin. *Arch Androl* 45:215-225.

Hakelien AM, Landsverk HB, Robl JM, Skalhegg BS, Collas P (2002) Reprogramming fibroblasts to express T-cell functions using cell extracts. *Nat Biotechnol* 20:460-466.

Hill JH, Burghardt RC, Jones K, Long CR, Looney CR, shin T, Spencer TE, Thompson JA, Winger QA, Westhusin ME (2000) Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol Reprod* 63:1787-1794.

Hyun S, Lee G, Kim D, Kim H, Lee S, Nam D, Jeong Y, Kim S, Yeom S, Kang S, Han J, Lee B, Hwang W (2003) Production of nuclear transfer-derived piglets using porcine fetal fibroblasts transfected with the enhanced green fluorescent protein. *Biol Reprod* 69:1060-1068.

Mann MRW, Bartolomei MS (2002) Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones. *Genome Biol* 3:1003.1-1003.4.

Martini FH, Ober WC, Garrison CW, Welch K, Hutchings RT (1998) Fundamentals of anatomy and physiology 4th Ed. *Prentice Hall Inc.*

McLay DW, Clarke HJ (2003) Remodeling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction* 125:625-633.

Oback B, Wiersema AT, Gaynor P, Laible G, Tucker FC, Oliver JE, Miller AL, Troskie HE, Wilson KL, Forsyth JT, Berg MC, Cockrem K, McMillan V, Tervit HR, Wells DN (2003) Cloned cattle derived from a novel zona-free embryo reconstruction system. *Cloning Stem Cells* 5:3-12.

Piotrowska K, Zernicka-Goetz M (2001) Role for sperm in spatial patterning of the early mouse embryo. *Nature* 409:517-521.

Polejaeva IA, Chen S-H, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayarers DL, Colman A, Campbell KHS (2000) Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407:86-90.

Roh S, Hwang WS (2002) In vitro development of porcine parthenogenetic and cloned embryos: comparison of oocyte-activating techniques, various culture systems and nuclear transfer methods. *Reprod Fertil Dev*, 14:93-99.

Surani MA (2001) Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature* 414:122-128.

Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T (2001) Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol* 11:1553-1558.

Further Readings

Amann RP (1983) Endocrine changes associated with onset of spermatogenesis in Holstein bulls. *J Dairy Sci* 66:2606-2622.

Anway MD, Folmer J, Wright WW, Zirkin BR (2003) Isolation of sertoli cells from adult rat testes: an approach to ex vivo studies of sertoli cell function. *Biol Reprod* 68:996-1002.

Bucci LR, Brock WA, Johnson TS, Meistrich ML (1986) Isolation and biochemical studies of enriched populations of spermatogonia and early spermatocytes from rat testes. *Biol Reprod* 34:195-206.

Buzzard JJ, Wreford NG, Morrison JR (2002) marked extension of proliferation of rat Sertoli cells in culture using recombinant human FSH. *Reproduction* 124:633-641.

Cameron DF, Hushen JJ, Dejarlais T, Colado L, Wolski KM, Sanberg PR, Saporta S (2002) A unique cytoplasmic marker for extratesticular Sertoli cells. *Cell Transplant* 11:507-512.

Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, Ninfa EG, Frey AZ, Gash DJ, Chow EP (1986) Isolation of the bovine and human genes for Mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* 45:685-698.

Dean W, Santos F, Strojko M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, Reik W (2001) Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13734-13739.

Dean W, Santos F, Reik W (2003) Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Stem Cell & Dev Biol* 14:93-100.

Duncan JL, Schlegel R (1975) Effect of streptolysin O on erythrocyte membranes, liposomes, and lipid dispersions: a protein-cholesterol interaction. *J Cell Biol* 67:160-173.

Gilmont RR, Coulter GH, Sylvester SR, Griswold MD (1990) Synthesis of transferrin and transferrin mRNA in bovine Sertoli cells in culture and in vivo: sequence of partial cDNA clone for bovine transferrin. *Biol Reprod* 43:139-150.

Hammadeh ME, Stieber M, Haidl G, Schmidt W (1998) Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program. *Andrologia* 30:29-35.

Hayashi M, Shima H, hayashi K, Trelstad RL, Donahoe PK (1984) Immunocytochemical localization of Mullerian inhibiting substance in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in Sertoli cells of the neonatal calf testis using a monoclonal antibody. *J Histochem Cytochem* 32:649-654.

Hemendinger RA, Gores P, Blacksten L, Harley V, Halberstadt C (2002) Identification of a specific Sertoli cell marker, Sox9, for use in transplantation. *Cell Transplant* 11:499-505.

Kang YK, Koo DB, Park JS, Choi YH, Chung AS, Lee KK, Han YM (2001a) Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nature Genet* 28:173-177.

Kang Y-K, Koo D-B, Park JS, Choi Y-H, Kim H-N, Chang W-K, Lee K-K, Han Y-M (2001b) Typical demethylation events in cloned pig embryos: clues on species-specific differences in epigenetic reprogramming of a cloned donor genome. *J Biol Chem* 276:39980-39984.

Kuhholzer-Cabot B, Brem G (2002) Aging of animals produced by somatic cell nuclear transfer. *Exp Gerontol* 37:1317-1323.

Lampa J, Hoogerbrugge JW, Baarends WM, Stanton PG, Perryman KJ, Grootegoed JA, Robertson DM (1999) Follicle-stimulating hormone and testosterone stimulation of immature and mature Sertoli cells in vitro: inhibin and N-cadherin levels and round spermatid binding. *J Androl* 20:399-406.

Landsverk HB, Hakelien AM, Kuntziger T, Robl JM, Skalhegg BS, Collas P (2002) Reprogrammed gene expression in a somatic cell-free extract. *EMBO Rep* 3:384-389.

Legendre F, Dudhia J, Pujol JP, Bogdanowicz P (2003) JAK/STAT but not ERK1/ERK2 pathway mediates interleukin (IL)-6/soluble IL-6R down-regulation of Type II collagen, aggrecan core, and link protein transcription in articular chondrocytes. Association with a down-regulation of SOX9 expression. *J Biol Chem* 278:2903-2912.

Matsuzaki S, Uenoyama Y, Okuda K, Watanabe G, Kitamura N, Taya K, Cruzana MB, Yamada J (2001a) Prepubertal changes in immunoreactive inhibin concentration in blood serum and testicular tissue in Holstein bull calves. *J Vet Med Sci* 63:1303-1307.

Matsuzaki S, Cruzana MB, Budipitojo T, Hondo E, Watanabe G, Taya K, Sasaki M, Kitamura N, Yamada J (2001b) Immunohistochemical localization of inhibin subunits in the testis of the bull. *Anat Histol Embryol* 30:375-378.

Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T (2000) Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 403:501-502.

McCoard SA, Lunstra DD, Wise TH, Ford JJ (2001) Specific staining of Sertoli cell nuclei and evaluation of Sertoli cell number and proliferative activity in Meishan and White composite boars during the neonatal period. *Biol Reprod* 64:689-695.

Meistrich ML, Longtin J, Brock WA, Grimes SR Jr, Mace ML (1981) Purification of rat spermatogenic cells and preliminary biochemical analysis of these cells. *Biol Reprod* 25:1065-1077.

Numabe T, Oikawa T, Kikuchi T, Horiuchi T (2000) Production efficiency of Japanese black calves by transfer of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology* 54:1409-1420.

Ohgane J, Wakayama T, Kogo Y, Senda S, Hattori N, Tanaka S, Yanagimachi R, Shiota K (2001) DNA methylation variation in cloned mice. *Genesis* 30:45-50.

Powolny A, Xu J, Loo G (2001) Deoxycholate induces DNA damage and apoptosis in human colon epithelial cells expressing either mutant or wild-type p53. *Int J Biochem Cell Biol* 33:193-203.

Rosenbusch BE (2000) Frequency and patterns of premature sperm chromosome condensation in oocytes failing to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet* 17:253-259.

Spielman M, Vinkenoog R, Dickinson HG, Scott RJ (2001) The epigenetic basis of gender in flowering plants and mammals. *Trends Genet* 17:705-711.

Steger K, Schimmel M, Wrobel KH (1994) Immunocytochemical demonstration of cytoskeletal proteins in seminiferous tubules of adult rams and bulls. *Arch Histol Cytol* 57:17-28.

Tamashiro KL, Wakayama T, Blanchard RJ, Blanchard DC, Yanagimachi R (2000) Postnatal growth and behavioral development of mice cloned from adult cumulus cells. *Biol Reprod* 63:328-334.

Vigier B, Picard JY, Camargue J, Forest MG, Heyman Y, Josso N (1985) Secretion of anti-Mullerian hormone by immature bovine Sertoli cells in primary culture, studied by a competition-type radioimmunoassay: lack of modulation by either FSH or testosterone. *Mol Cell Endocrinol* 43:141-150.