

최 중
연구보고서

유전체 히스톤 조절기술을 이용한 돼지
체세포복제 reprogramming 체계 확립

Reprogramming of somatic cells using methods of
epigenetic modifications upon cloning of pigs by
nuclear transfer.

성균관대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “유전체 히스톤 조절 기술을 이용한 돼지 체세포 복제 reprogramming 체계 확립”에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 5월 24일

주관연구기관명 : 성균관대학교
산학협력단

총괄연구책임자 : 한 정 환

세부연구책임자 : 한 정 환

연 구 원 : 박 종 우

연 구 원 : 이 은 경

연 구 원 : 유 정 수

연 구 원 : 강 길 명

요 약 문

I. 제 목

유전체 히스톤 조절기술을 이용한 돼지 체세포복제 reprogramming 체계 확립

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최초의 체세포 핵이식을 통한 복제동물인 돌리의 탄생 이후, 여러 포유류에서 체세포 핵이식 복제동물이 성공적으로 탄생하였으나, 완전한 reprogramming이 잘 이루어지지 않아 생산 효율은 매우 낮은 편이며, 성공적으로 태어나더라도 성장과정에서 여러 가지의 비정상적인 발달이 보고되고 있다. 이러한 문제가 발생하는 원인을 분석하기 위한 다양한 접근하는 노력 중, 체세포의 reprogramming에 관한 분자생물학적 기전, 특히 epigenetic modification에 관한 연구가 필요하다. 본 연구의 목적은 완벽한 복제기술 개발을 위한 선행과제인 체세포의 reprogramming에 관련한 일련의 분자생물학적인 기전연구를 통하여 효과적인 체세포의 reprogramming을 위한 처리방법을 확립하여, 궁극적으로 안정적이고 효율 높은 복제기술을 확립하는데 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1) 유전자 조절에 관여하는 epigenetic factor의 연구 : reprogramming에 관한 연구에 필요한 GFP발현 복제돼지 ‘형광이’를 생산하여 조직특이적 발현양상을 분석한다. GFP 유전자의 조직특이적 DNA 메틸화를 분석하고, Immunoblot을 통한 히스톤 아세틸화 및 메틸화의 관여 여부를 조사하며, Chromatin IP를 통해 GFP 유전자의 발현에 관여하는 factor를 찾아낸다. 또한 정상 수정란 및 복제란에서의 chromatin remodelling 현상을 관찰한다. 이와 같은 분석을 통해 유전자 조절에 관여하는 epigenetic factor의 연구를 수행한다.

2) 체세포 reprogramming 최적화 방법의 연구 : ‘형광이’ 체세포를 이용한 유전체 조절 물질을 탐색하고, 이러한 유전체 조절물질을 통해 체세포 reprogramming 기술을 개발한다. 또한 복제란의 reprogramming 및 remodelling 유도방법을 개발한다. 이러한 연구결과의 상호 결부에 의해 체세포 reprogramming 기술체계를 정립한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

유전자의 후성유전적 조절을 규명하기 위해 GFP 유전자를 발현하는 복제돼지를 생산하여 분석시스템을 구축하였다. 생산된 돼지는 조직별로 형광발현 양상이 다르게 나타났다, 이러한 형광 발현의 차이는 GFP유전자의 특정부위에 존재하는 CpG에서의 DNA탈메틸화와, H4의 아세틸화에 대한 H3의 네 번째 라이신 잔기의 메틸화와 H3의 9, 14번째 잔기의 라이신의 아세틸화의 비율에 영향을 받기 때문이다. 효율적인 reprogramming 유도물질을 탐색하기 위해, 형광발현이 되지 않는 복제돼지의 귀 세포에 DNA 메틸화와 히스톤 탈아세틸화 억제제를 처리한 결과 인위적인 reprogramming이 일어나

형광발현을 유도할 수 있었다. 그 외의 reprogramming을 유도할 수 있는 새로운 물질로 reversine을 도출하였다. 체세포의 reprogramming에 기여하는 인자로는 히스톤의 modification 뿐만 아니라 에피지네틱 효소인 DNMT와 같은 비히스톤 단백질이 관여한다는 결과를 얻어낼 수 있었다. 돼지의 성숙난자를 이용하여 형광발현이 되지 않는 귀세포를 재복제한 결과 정상적으로 배반포로 발생하는 복제 수정란에서만 형광이 발현됨을 관찰할 수 있었다. 재복제를 통해 발생한 복제돼지의 GFP 발현 양상은 모세포를 제공한 “형광이”와 거의 모든 부위가 동일하였다. 재복제를 통해 발생한 돼지는 출산 후 정상적인 발달 상태를 보였고 복제 효율도 타 복제 효율과 비슷한 수치를 보였다. 특히 히스톤 탈아세틸화 억제제를 이용하여 체세포의 reprogramming을 유도한 후, 체세포 핵이식을 수행한 결과 배반포까지의 복제 효율이 향상되는 결과를 얻었다.

이와 같은 유전자 reprogramming에 관여하는 기전연구를 통해 얻은 지식을 바탕으로 독자적인 복제기술의 개발은 물론 보다 더 안전하고 효율적인 복제동물을 생산할 수 있어 세계와 경쟁할 만한 산업화를 이룰 수 있을 것이라 생각된다.

SUMMARY

(영문 요약문)

I. Title

Reprogramming of somatic cells using methods of epigenetic modifications upon cloning of pigs by nuclear transfer.

II. Objective

Cloning or nuclear transfer using adult somatic cells to derive cloned embryos is a new technology with potential applications in both regenerative medicine and agriculture. However, the inefficiency of somatic cell cloning by nuclear transfer remains unresolved. In this study, employing cloned transgenic pigs, we investigated how a gene is programmed in a tissue-specific manner by epigenetic modifications, and whether the programmed gene can be reprogrammed by alterations of epigenetic modifications. Based on these study, we also examined whether epigenetic modifications can improve the incomplete reprogramming of somatic cells upon nuclear transfer.

III. Result

To study molecular mechanisms of nuclear reprogramming, we created cloned transgenic pigs expressing GFP. Cloned transgenic pigs show different tissue-specific patterns of GFP expression. The tissue-specific expression of the transgene correlated with DNA demethylation at specific CpG sites as well as significant changes in histone modifications from a low ratio of methylated H3-lysine 4 or acetylated H3-lysine 9, 14 to acetylated H4 to higher ratios. Based on the programmed status of transgene silenced in cloned mammalian ear-derived fibroblasts, the transgene could be reprogrammed by change of histone modification and DNA methylation by inhibiting both histone deacetylase and DNA methylation, resulting in high expression of the transgene. In addition, epigenetic modifications of somatic cells using HDAC inhibitor apicidin improved the inefficiency of development of embryos cloned from donor cells to blastocysts by two-fold. These findings indicate that dynamic change of histone modification and DNA methylation is potentially important in the establishment and maintenance of tissue-specific gene expression and that epigenetic modifications might improve the inefficiency of somatic cell cloning through inducing reprogramming of genes in somatic cells.

CONTENTS

1. Introduction	1
2. Technical development at the inside and outside of the country	5
3. Method and Result	7
4. Achievement and contribution of related fields.....	31
5. Practical use of in this study	33
6. Foreign reports related to this study	34
7. Attached papers	35

목 차

제1장 연구개발과제의 개요	1
제2장 국내외 기술개발 현황	5
제3장 연구개발수행 내용 및 결과	7
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	31
제5장 연구개발결과의 활용계획	33
제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	34
제7장 첨부서류	35

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 목적

최근 체세포를 이용한 가축의 복제기술이 개발되면서 가축의 개량은 물론, 가축의 이용에 있어 새로운 전기를 맞고 있다. 즉, 이전에는 가축의 고기와 젖을 이용하는 개념에서 가축으로부터 단백질 의약품의 생산은 물론, 사람에게 필요한 심장, 간 등의 장기를 생산할 수 있는 개념으로 확대되어 가고 있다. 특히, 복제기술은 유전적으로 검증된 유용동물의 대량생산, 희귀동물의 차세대로의 보존 및 전달, 치료용 생체물질의 생산, 장기이식용 동물생산, 역분화 배아간세포를 이용한 세포치료 등에 활용할 수 있는 유용성으로 인해 선진국을 비롯한 많은 연구팀이 산업화하기 위한 연구를 경주하고 있다.

최초의 체세포 핵이식을 통한 복제동물인 돌리의 탄생이후, 양, 소, 생쥐, 돼지, 염소, 토끼, 고양이에서 체세포를 이용한 핵이식 복제동물이 성공적으로 탄생하였다. 하지만 복제동물의 생산 효율은 아직 1 ~ 3% 정도에 머물고 있다. 그리고 성공적으로 태어나더라도 복제동물은 성장하면서 면역체계의 문제, 뇌 형성의 문제, 소화기 장애 및 감염 등으로 비정상적인 발달을 하는 것으로 보고되고 있다. 이러한 문제가 발생하는 원인을 기초적으로 분석하기 위해서는 다양한 각도에서 접근하는 노력이 필요한데, 국내의 경우 복제연구는 기초연구보다는 결과물을 내는데 목표를 두고 연구를 진행하여 복제의 성과 측면에서는 세계적 기술을 확보하였지만, 분자생물학적 접근은 아직 초기 상태에 머물고 있는 실정이다.

본 연구에서는 완벽한 복제기술 개발을 위한 선행과제인 체세포의 reprogramming에 관련한 일련의 분자생물학적인 기전연구를 통하여 효과적인 체세포의 reprogramming을 위한 처리방법을 확립하여, 궁극적으로 안정적이고 효율 높은 복제기술을 확립하는데 있다.

2. 연구개발의 필요성 및 범위

1) 기술적 측면

가. 안전한 복제돼지 생산의 필요성

최근 들어 바이오 장기를 생산할 수 있는 모델로 면역관련 유전자를 조절한 복제돼지 연구가 급격히 부상하고 있다. 하지만 아직 생산효율이 낮을 뿐만 아니라, 성공적인 탄생 후에도 갑자기 사망하거나 여러 가지 예상치 못한 기형이 나타나고 있다. 또한 복제기술의 적용과정에서 나타날 수 있는 유해 돌연변이 문제, 유전자의 정확한 발현이 조절되지 않아 나타날 수 있는 기형은 임상에 적용할 때 심각한 문제를 야기할 수 있다. 이와 같은 문제점을 근본적으로 해결하지 못한다면 비록 성공적으로 바이오 장기를 제공할 수 있는 복제돼지를 만들더라도 안전성 측면에서 걸림돌이 될 가능성이 높다. 선진국에서는 이와 같은 문제를 인식하여 완벽한 복제기술 확립을 위해 체세포의 역분화 기전, epigenetic modification, 유전자 발현 조절에 영향을 미치는 히스톤 modification에 관련한 분자생물학적인 기초연구에 전력을 기울이고 있다. 국내 복제기술의 경우 세계적 기술을 보유하고 있기 때문에, 이러한 분자생물학적인 기초연구가 뒷받침된다면 바이오 장기에 관한 기술을 세계적으로 선점해 갈 수 있는 토양을 만들 수 있다.

나. Reprogramming 연구의 필요성

일반적으로 발달단계가 많이 진행된 세포를 사용하여 핵이식을 하면 그 효율이 많이 떨어진다. 수정란의 2, 4, 8 세포기의 할구를 이용한 핵이식에서 그 발달율이 각각 22% 14%, 8%로 떨어진다. 수정란의 생존에 있어서도 배아줄기세포는 2 ~ 11% 정도인데 비하여 G0/G1 상태의 체세포는 1 ~ 3% 정도로 감소한다. 또한 상실배 핵과 태아세포와 성체의 섬유아세포를 이용할 때 임신율은 28%, 13%, 5%로 점점 감소한다고 보고되어 있다. (그림 1)

이러한 발달 또는 분화가 많이 진행된 세포가 효율이 떨어지는 하나의 이유로 최근에는 그림 2와 같이 세포가 분화할수록 세포는 분화특성에 맞게 여러 가지 변화가 진행되는데, 진행된 변화가 많고 복잡할수록 핵이식시 정상적인 발달을 위해 필요한 reprogramming 과정이 완벽하게 일어나지 못해 일어나는 현상으로 추정하고 있다.

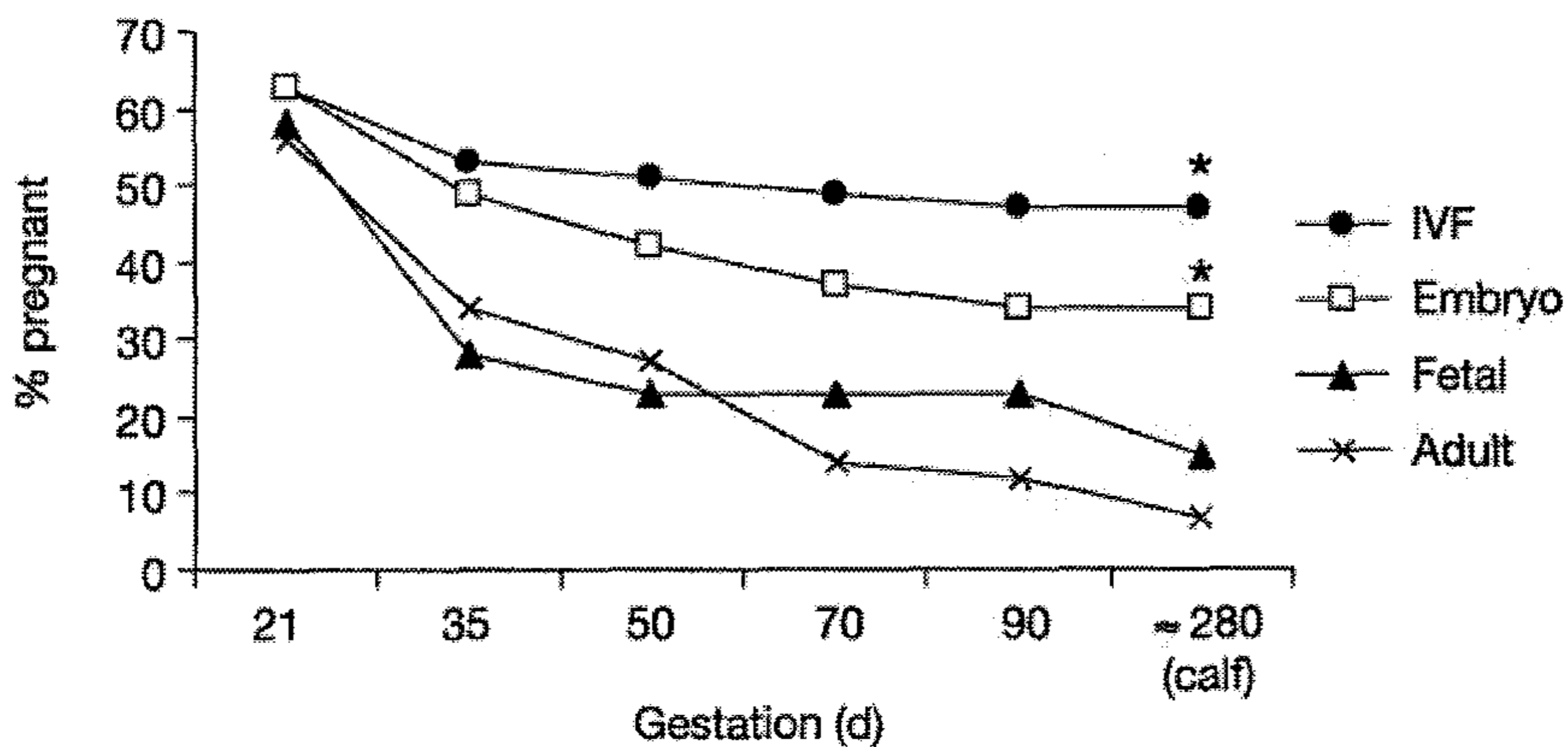


그림 1. 체외수정란과 세포분화 정도(embryo, fetal, adult)에 따른 핵이식 복제란의 임신 유지율

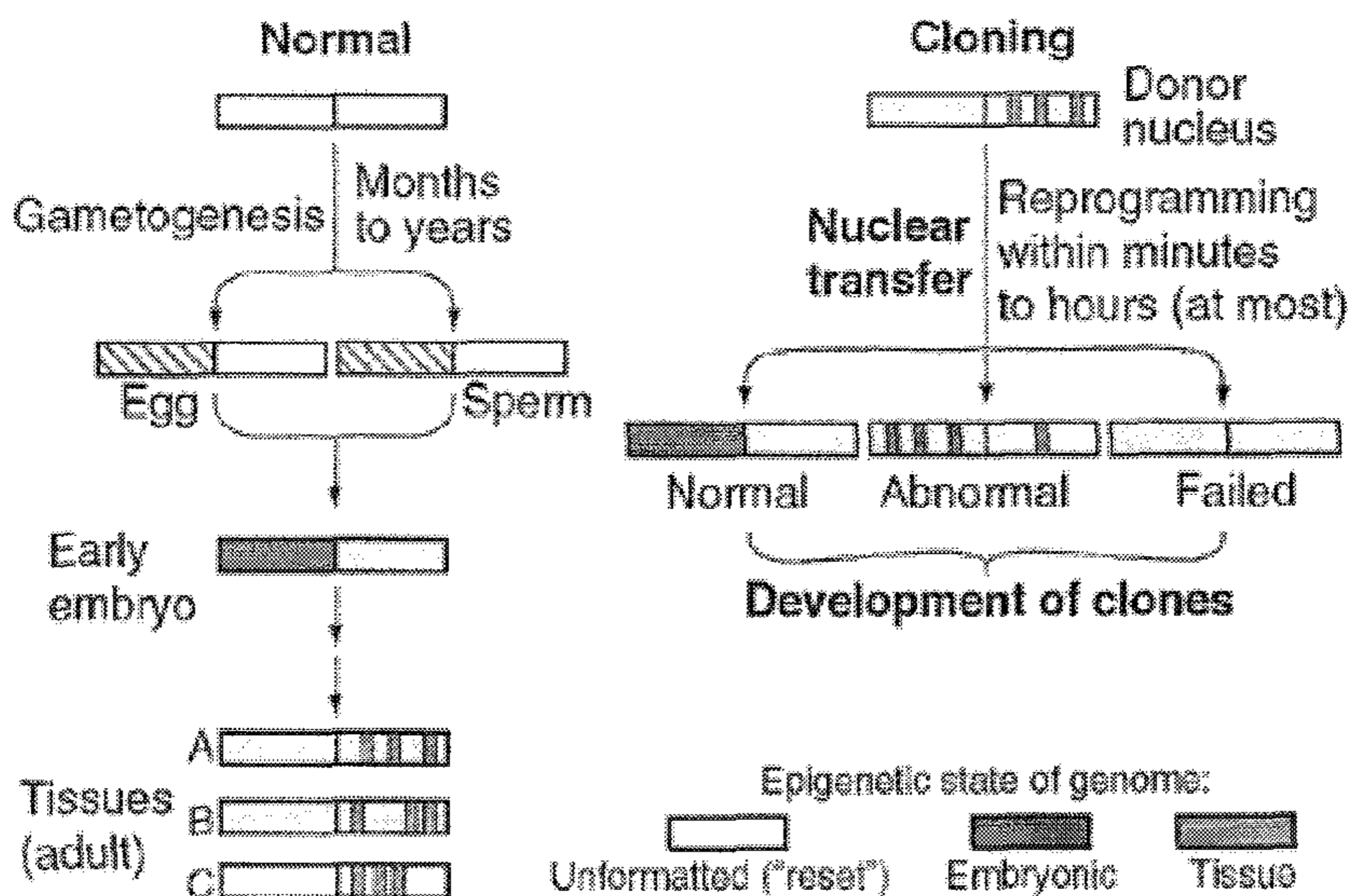


그림 2. 체세포 핵이식에서 Reprogramming

Reprogramming 과정을 이해하기 위해서는 우선 세포가 분화하면서 유전자의 발현을 각 분화 조직에 맞도록 조절하는 DNA 메틸화, 히스톤의 아세틸화, 메틸화 등과 관련한 분자생물학적인 기전의 이해가 필요한데, 이런 일련의 과정을 epigenetic modification이라고 한다. 최근들어 복제동물 생산에서 유전자의 발현과 관계된 epigenetic modification에 대한 연구가 진행되고 있지만, 아직 연구 초기 단계라 DNA methylation과 몇몇 조절 단백질에 대한 연구만 있을 뿐, 히스톤의 modification 등 다양한 연구결과가 부족한 실정이다. 유전자의 전사과정에서 epigenetic한 조절기작은 DNA의 메틸화, 히스톤의 아세틸화/탈아세틸화, 히스톤의 메틸화, chromatin remodeling 등의 기작이 밀접하게 연결되어 있어 종합적인 기전 연구가 필요하다.

다. 발생 유전자의 발현조절 연구의 필요성

체세포 복제는 세포 기능의 분화가 이미 완료된 체세포를 분화 이전의 상태로 되돌리는 과정이라고 할 수 있다. 따라서 체세포가 reprogramming 될 수 있는 최적의 상태를 만드는 것과 더불어, 구체적으로는 초기 배 발생에 중요한 유전자가 적절히 가동되는지 여부를 확인할 수 있어야 한다. 이러한 확인은 핵이식란의 이식 후 임신율을 높일 수 있을 뿐만 아니라, 기형발생의 요인을 사전에 배제할 수 있다.

배아발달 초기에 발현하는 HOX 유전자군은 신체의 패턴을 형성한 후, 영원히 잠재적으로 기능을 상실하게 되는데, 이들 유전자군에 돌연변이 또는 비정상적인 발현조절은 배아의 발달에 악영향을 주게 된다. 배아의 내부세포괴에서만 발현되는 Oct-4 유전자는 다른 유전자의 발현을 조절하는 단백질을 생산하는 유전자로, 배아가 정상적으로 분화하고 활력을 가지는데 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 이 유전자가 핵이식란에서 정상가동 되는지를 추적 연구할 필요가 있다. 또한 X 염색체의 불활성화와 같이 한쪽 유전자만 발현되도록 조절되는 유전체 각인에 의해 조절되는 유전자군의 탐색과 그 조절기전에 대한 연구가 확보될 때 보다 완벽한 복제기술을 확립할 수 있다.

2) 경제·산업적 측면

앞으로 생명공학기술은 의료·약품, 농업, 에너지, 환경, 해양 등 무한한 응용이 가능하고 동시다발적인 급진적 연구개발이 가능하기 때문에 경제·산업적 측면에서 소위 「제4의 물결」을 주도할 것으로 여겨진다. 따라서 2003년 현재 약 540억불의 세계시장이 2013년경 2,100억불 수준으로 성장할 것으로 예측됨에 따라 정보기술을 대신할 경제성장의 새로운 엔진으로 등장할 것으로 많은 경제학자들은 예견하고 있다. 그러므로, 체계적인 생명공학기술의 개발 및 산업화가 향후 국가경제를 가름할 주요한 과제가 되고 있다.

가. 바이오 장기 생산

장기이식은 말기 장기부전증의 궁극적인 치료방법이다. 그러나 장기이식을 필요로 하는 환자의 수가 해마다 증가하는데 비해 공여장기의 수는 정체되어 이식용 장기의 부족현상이 매우 심각한 상황이다. 실제로 2001년 국립장기이식센터 보고에 의하면 이식대기 환자대비 이식시행 비율이 신장, 심장의 경우 약 20%, 간의 경우 약 40%에 지나지 않고 폐의 경우는 이식 예가 전무한 실정이다. 결국 인간 이

외의 동물 장기를 이용하는 이종이식 분야 개발이 절실하다. 이종장기의 제공원으로는 장기의 크기, 번식효율, 사육기술, 인체 감염 가능성 등을 고려할 때 돼지가 가장 적절한 것으로 평가되고 있으며, 실제로 선진국에서는 이미 이식용 돼지의 개발이 시도되고 있다. 장기적으로 시장 또한 비약적인 성장이 예상되고 있다. 이종이식은 동종이식에 비해 면역거부반응이 있기 때문에, 동물 유전자의 효율적인 조작과 정상적인 체세포 reprogramming 과정이 동시에 이루어져야 한다.

나. 복제동물 생산 방법의 특허화로 미래산업 선점

국내의 복제기술은 세계와 경쟁할 만큼 성장해 있지만, 복제기술과 관련한 원천기술은 가지고 있지 못한 상태이다. 복제기술 중 체세포의 상태를 조절하는 방법에 관한 것이 이미 영국과 미국에 의해 선점되어 있는 상태여서 독자적인 복제기술의 개발을 하지 않으면 산업화 후, 많은 로열티의 지불이 예상된다. G0기를 유도하는 방법은 영국 로슬린 연구소가, 그 외 세포주기에 대해서는 미국에서 특허를 선점하고 있다. 그러나 기존 특허들이 정상적인 세포주기의 체세포를 유도하고 이용하는 방법에 관한 특허이기 때문에 체세포의 reprogramming을 효율적으로 유도할 수 있는 조절물질의 탐색과 유도방법을 개발한다면 독자적인 기술을 확보할 수 있다.

3) 사회·문화적 측면

최근 선진국을 비롯한 세계 각 국에서는 앞으로 생명공학시대의 도래에 따른 유전자원 및 지적 재산권 확보를 위하여 치열하게 경쟁하고 있다. 따라서 본 연구에서 수행하고자 하는 생명공학기법을 이용한 효율적인 체세포 reprogramming 방법의 확립은 우루과이라운드 등에 의해 어려운 상황에 놓여 있는 우리나라 농업의 경쟁력을 강화시키는데 기여할 수 있다. 또한, 복제돼지의 바이오 장기가 안전하고 효율적인 방법으로 대량생산이 가능하게 된다면 장기이식 대기 중에 사망하는 많은 환자에게 새 생명을 줄 수 있으므로 인류의 복지증진에 이바지할 수 있을 것이다. 이러한 시도가 성공을 거둔다면 농업분야에서도 세계첨단을 다투는 성과를 거두었다는 사회적인 쾌거를 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 기술과 복제기술을 이용하여 실질적인 가축의 개량을 이룩함으로써 농업교육의 첨단화와 그에 따른 고급인력의 유치가 가능하며, 특히 기초분야의 전공자들과의 교류를 통하여 응용효과가 큰 농업분야에 이바지 할 수 있는 기회를 마련할 수 있을 것으로 여겨진다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

체세포 복제동물의 성공은 포유류의 발생과정의 분화가 가역적이라는 것을 보여준 쾌거일 뿐 만 아니라, 체외에서 체세포에 필요로 하는 유전자 조작을 한 후 복제할 수 있는 괄목할만한 가능성을 보여준 것이었다. 또한 바이오 장기 등 성장할 수 있는 미래산업에 유용한 기술이기 때문에 관심의 초점이 되고 있다. 그러나 체세포의 복제기술의 효율이 낮고 기형 등의 많은 문제가 야기되자 선진국에서는 이러한 문제를 해결하기 위해 체세포의 reprogramming 과정과 관련한 분자생물학적인 연구를 진행하고 있다. Reprogramming 과정을 이해하기 위해서는 우선 세포가 분화하면서 유전자의 발현을 각 분화 조직에 맞도록 조절하는 DNA 메틸화, 히스톤의 아세틸화, 메틸화 등과 관련한 분자생물학적인 기전의 이해가 필요한데, 이런 일련의 과정을 epigenetic modification이라고 한다.

최근에 효율적인 복제동물의 생산을 위해 유전자의 발현 조절과 관계된 epigenetic modification에 대한 연구가 진행되고 있으나 국내외 모두 아직 연구의 초기단계라고 할 수 있다. 현재까지 DNA 메틸화, X 염색체의 불활성화, 초기배 발생의 유전자 전사형태, chromatin remodeling에 대한 단편적인 접근이 이루어지고 있다. 특히 국내의 경우는 DNA 메틸화와 관련한 연구만 진행되고 있어, DNA 메틸화와 chromatin remodeling과의 상관관계를 종합적으로 고찰하는 연구는 거의 이루어지고 있지 않은 실정이다.

- DNA 메틸화의 경우 Kang 등 (2001, 2002)이 돼지와 소의 정상란과 복제란의 DNA 메틸화 변화에 대한 보고를 하였다. 돼지는 발달하면서 DNA 메틸화 변화가 거의 정상 수정란과 비슷하게 변화하지만, 소의 경우 그 변화가 불규칙적이며 내부세포피에서 먼저 일어난다고 하였다.

- Fei 등(2002)은 소 복제란의 연구에서 비정상적인 발달을 보인 복제란을 조사해 본 결과 X 염색체의 불활성화가 제대로 일어나지 않았음을 관찰하였다.

- Daniels 등(2000)은 소를 이용한 연구에서 발달과정에서 중요한 유전자인 Oct4, IL6, FGF2, FGF4, FGFr2, gp130의 전사 양상을 PCR 방법으로 조사한 결과 정상수정란과 복제란 사이에 이들 유전자의 전사 형태가 차이를 발견하였고, 그런 비정상 발현형태가 복제란 발달에 영향을 준다고 보고하였다.

- Kikyo 등(2000)은 개구리 egg를 통한 연구에서 세포질의 adenosine triphosphatase인 ISWI가 공여핵의 뉴클레오솜 linker 단백질인 TBP를 핵 밖으로 내보내 공여핵의 chromatin을 느슨하게 한다고 보고하였다.

- Vilceu 등(2001)은 어떠한 기전에 의한 것인지는 모르지만 마우스 복제란에서 공여핵 내의 히스톤 H1의 경우 핵이식후 빨리 immunoactivity를 잃어버리는 현상을 발견하여, 이런 현상이 정상적으로 핵이식되었음을 파악하는 좋은 마커가 될 수 있다고 보고하였다.

- 최근에는 Shi 등(2003)은 소 태아 섬유아세포에 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제를 처리하여 복제란 생산효율이 증가했음을 보고하였다.

위와 같이 선진국에서는 기존의 분자생물학 영역에서 발전한 기술과 지식을 복제기술에 적용하여 복

제기술의 문제점을 해결하기 위해 노력을 기울이고 있다. 그러나 복제수정란이 분석에 이용할 만큼의 시료량이 불충분한 단점을 안고 있고, 아직 유전자 reprogramming에 관여하는 복잡한 기전을 거의 잘 모르고 있어 제한적인 접근만 이루어지고 있다.

2. 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

국내의 경우 DNA 메틸화와 관련하여 한국생명공학연구소에서 선도적인 연구를 진행한바 있다. 그러나 그 외의 연구는 전무한 실정이다. 더구나 복제동물이 초기에 급사하고 장기간 살아남은 동물이 적어 복잡적이고 전체적인 조명을 하지 못하고 있다. 그리고 복제동물을 연구하는 팀과 유전자의 조절 기전을 연구하는 팀 간의 유기적인 연구교류가 적은 것도 연구가 활성화되지 않은 요인 중의 하나이다.

본 연구팀은 돼지 복제기술에 있어서는 세계적인 기술을 이미 보유하고 있는 (주)엠젠바이오와 현재 유전체조절물질 연구사업팀으로 BK21 연구를 수행하고 있는 성균관대학교 약학부가 산학연구를 하여 공동연구의 좋은 예가 될 수 있을 것이다. 본 연구팀은 현재 GFP가 형질전환된 복제돼지인 형광이를 17두 생산하였고, 형광이의 귀세포를 이용한 재복제를 최근에 성공하였다. 그리고 성대 약학부에서는 비록 복제란을 대상으로 한 것은 아니지만, 히스톤 아세틸화에 관한 연구를 수행하여 히스톤 과아세틸화에 의해 일어나는 유전자발현에서 chromatin remodeling의 역할과 이에 관련된 신호전달체계를 규명한 바 있다. 따라서 유전자발현 조절에서 히스톤 변형의 상호작용을 규명하는데 관련된 기초지식 및 연구계획이 확립되어 있다. 또한, 전사인자 NF- κ B 조절을 통한 약물탐색 및 기전연구에 관한 연구실적을 낸바 있어, 전사인자에 의한 유전자발현 조절물질을 탐색/ 그 과정에서 히스톤 변형의 역할 규명 및 이를 제어할 수 있는 방법을 도출할 수 있다.

복제기술은 유전적으로 검증된 유용동물의 대량생산, 희귀동물의 차세대로의 보존 및 전달, 치료용 생체물질의 생산, 장기이식용 동물생산, 역분화 배아간세포를 이용한 세포치료 등에 활용할 수 있는 유용성으로 인해 선진국을 비롯한 많은 연구팀이 산업화하기 위한 연구를 경주하고 있다. 특히 미래의 주요 산업이 될 것으로 전망되는 바이오 장기 생산에 중요한 기술이기 때문에 빠른 산업화를 위해서 완벽한 복제기술의 개발에 온 노력을 기울이고 있다. 우리나라의 경우도 복제기술에 있어서는 세계와 겨룰 만 할 정도의 기술을 보유하고 있기 때문에 분자생물학적인 연구가 뒷받침 된다면 독자적인 복제기술의 개발은 물론 보다 더 안전하고 효율적인 복제동물을 생산할 수 있어 세계와 경쟁할 만한 산업화가 진행될 것으로 생각된다.

기술의 부분적인 도입은 가능하겠지만, 기술체계 전체를 도입한다는 것은 거의 불가능하다고 본다. 왜냐하면, 복제동물의 생산과 같은 첨단기술은 개발 즉시 특허에 의해 보호될 뿐만 아니라 각국이 자국의 이익을 보호하기 위하여 기술유출을 억제하기 때문이다. 비록 기술도입이 가능하다 할지라도 Royalty가 엄청나게 고가로 책정될 것이므로 국내에서 자체적으로 개발하는 것이 훨씬 유리하다. 또한, 생물공학기술은 화학공학기술과는 달리, 기술공정이 언제나 가변적이고 연구자의 장기간에 걸친 숙련을 필요로 하므로 특허를 도입해도 소기의 성과를 얻을 수 없으므로 자체 개발이 국익에 더 큰 도움이 될 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 연구개발 목표와 내용

○ 최종목표

본 연구에서 추구하는 최종목표는 체세포 reprogramming 방법의 최적화를 통해 복제돼지 생산의 효율성을 향상시키는 것이다.

○ 연구개발 내용

본 연구의 목표인 체세포 reprogramming 방법의 최적화를 위해서는 DNA 메틸화, 히스톤 아세틸화/탈아세틸화, 히스톤의 메틸화, 비히스톤 단백질의 관여여부 및 신호전달에 대한 복합적 연구와 병행하여 이러한 유전체를 효과적으로 조절할 수 있는 물질과 방법을 찾는 연구를 수행하고자 한다. 본 과제의 연구 내용은 다음과 같다.

1) 유전자 조절에 관여하는 epigenetic factor의 연구

- ① GFP 발현 복제돼지 ‘형광이’의 조직 특이적 발현양상 분석
- ② GFP 유전자의 조직특이적 DNA 메틸화 분석
- ③ Immunoblot을 통한 히스톤 아세틸화 및 메틸화 관여여부 분석
- ④ 크로마틴 IP를 통해 GFP 유전자에 관여하는 Factor 분석
- ⑤ 정상 수정란 및 복제란에서 chromatin remodeling 현상 분석

2) 체세포 reprogramming 최적화 방법의 연구

- ① ‘형광이’ 체세포를 이용한 유전체 조절 물질의 탐색
- ② 유전체 조절을 통해 체세포 reprogramming 기술 개발
- ③ 복제란의 reprogramming 및 remodeling 유도방법 개발
- ④ 연구결과의 상호결부에 의한 체세포 reprogramming 기술체계의 정립

2. 연차별 연구개발 목표와 내용

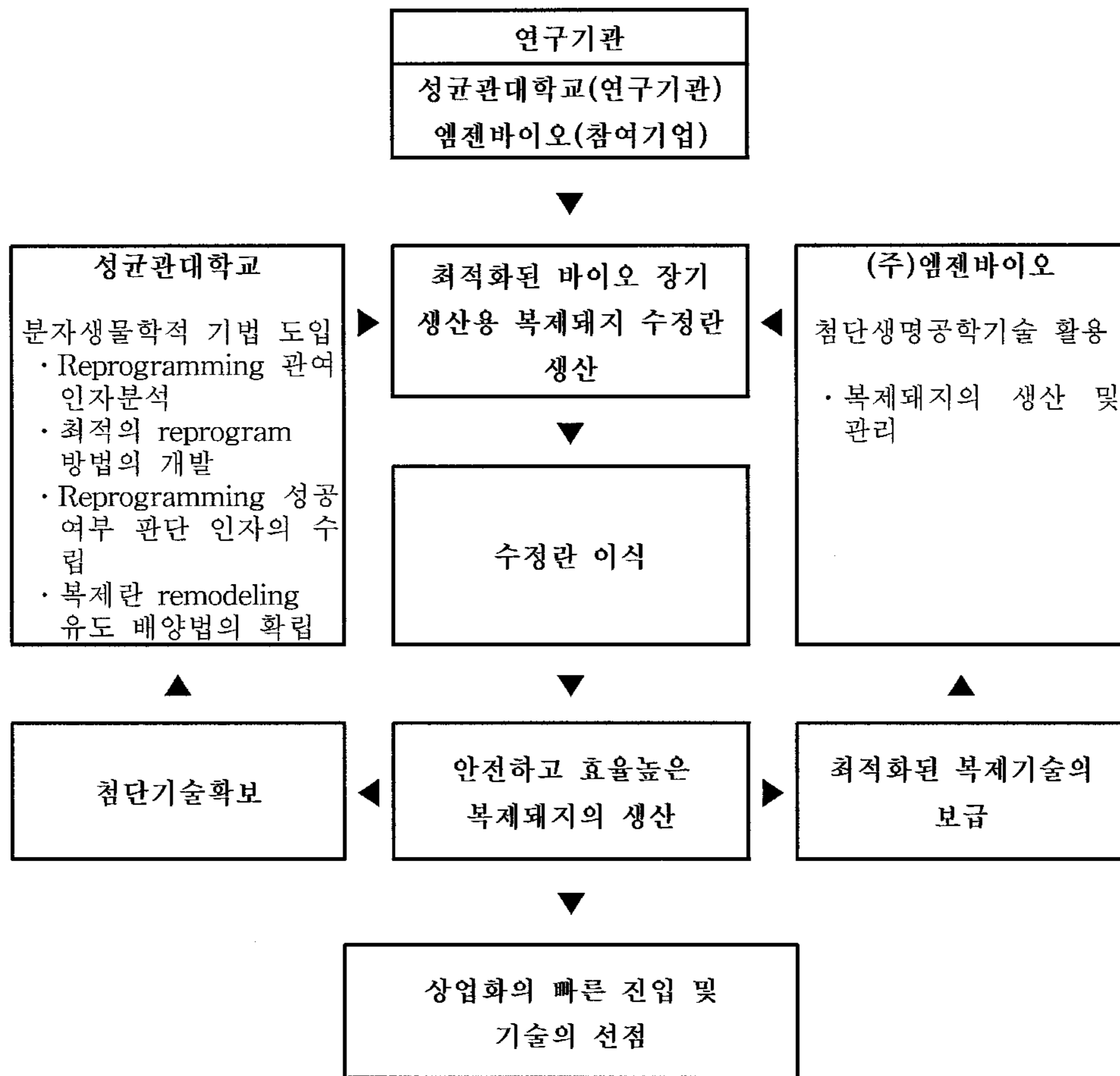
구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2004)	<p>1. '형광이'를 이용한 분석시스템 구축</p> <p>1. 조직간의 GFP DNA 메틸화 분석</p> <p>2. 히스톤의 아세틸화 및 메틸화와의 상호관련 여부 분석</p> <p>2. 내부 조절인자의 탐색</p> <p>1. modification factor의 활성 분석</p> <p>2. 히스톤 메틸화, 아세틸화 효소의 과발현 영향 연구</p>	<p>- '형광이' 귀 등의 세포배양</p> <p>- Bisulfite 서열분석에 의한 DNA 메틸화 분석</p> <p>- Immunoblot에 의한 히스톤 아세틸화 및 메틸화 분석</p> <p>- Chromatin IP에 의한 관련여부 연구</p> <p>- 각 세포의 DNA 메틸화 효소활성 측정</p> <p>- 각 세포의 히스톤 탈아세틸화 효소 활성 측정</p> <p>- 히스톤 메틸화, 아세틸화 효소의 과발현 plasmid 구축</p> <p>- Transfection을 통한 과발현 후 유전자 발현조절 변화 연구</p>

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 (2005)	<p>1. 정상수정란 및 복제란의 히스톤 변화 비교분석</p> <p>1. 히스톤 아세틸화 및 메틸화에 해당하는 항체 구축</p> <p>2. Immunocytochemistry 방법에 의한 정상란과 복제란의 비교분석</p> <p>2. 효율적인 reprogramming 유도물질의 탐색</p> <p>1. GFP 및 중요유전자의 정확한 변화를 유도하는 유도물질의 탐색</p> <p>2. 복제란의 reprogramming 및 remodeling 유도 조건의 확립</p>	<p>- 히스톤 H3 K4, K9에 해당하는 항체의 적용시험</p> <p>- Confocal 현미경을 이용한 비교 관찰</p> <p>- RT-PCR을 통해 중요 초기배 발생 유전자의 비교검토 (Oct-4 등)</p> <p>- DNA 메틸화 저해제, 히스톤 탈아세틸화 저해제 등의 단독 또는 병행처리 조건의 확립</p> <p>- 그 외 조절인자의 첨가에 따른 reprogramming 정도의 연구</p> <p>- 복제란에 유전체유도물질 처리 조건의 확립</p> <p>- 복제란의 정상 발생을 분석</p>

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3차 년도 (2006)	<p>1. 체세포 reprogramming 적용에 의한 reprogramming 정도 확인</p> <p>1. 유전체 조절물질 처리 후, chromatin remodeling 분석</p> <p>2. 복제란의 reprogramming 상태분석 및 비히스톤 단백질의 관여 조사</p> <p>2. 체세포 reprogramming 기술 적용에 의한 복제돼지 생산 효율성 분석</p> <p>1. 체세포 reprogramming을 통한 복제돼지의 생산</p> <p>2. 출산후 정상발달 분석</p>	<p>- 중요유전자의 RT-PCR에 의한 remodeling 여부 확인</p> <p>- 상기 연구를 통한 주요 상관성 높은 인자의 조사 (Oct-4, 히스톤 H3K9의 메틸화 등)</p> <p>- 비히스톤 단백질의 관여여부 chromatin IP를 통해 분석</p> <p>- 핵이식 및 수정란 이식을 통한 복제돼지 생산</p> <p>- 유산 및 사산에 대한 모니터링</p> <p>- 출산 산자의 증체, 기형여부, 번식여부 등 발달검사</p>

3. 연구개발 방법 및 설계

가. 연구 접근 방법



나. 연구개발 방법

● Primary Cell culture

'형광이' 귀, 태아세포등은 잘게 잘라 trypsin이 포함된 배양액에서 밤새 shaking 배양을 하여 부유하는 세포만 회수하여 배양하여 준비한다. 배양액은 Dulbecco's modified Eagle's medium에서 15% fetal bovine serum과 1% penicillin/streptomycin 존재 하에서 배양한다. 배양세포에 Apicidin, n-butyrate (NaB), trichostatin A (TSA) 등의 히스톤 탈아세틸화 억제제와 5-aza, decitabine등의 DNA 메틸화 억제제를 처리한 후 세포의 GFP 발현변화를 형광현미경으로 관찰한다. 각각 처리한 cell을 buffer solution (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 120 mM NaCl, 20 mM NaF, 1 mM EDTA, 5 mM EGTA, 15 mM sodium pyrophosphate, 30 mM p-nitrophenyl phosphate,

1 mM benzamidine, and 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)으로 wash하고 1% Nonidet P-40 함유하는 buffer로 extraction한다. 단백질 정량은 bovine serum albumin을 standard로 하고 Bradford 방법으로 측정한다. Cell extract는 실험 전까지 -70°C 에서 보관한다.

④ Immunoblot

Cell lysate를 laemmli sample buffer로 3분간 끓이고 30 ug의 단백질을 10 또는 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)에 loading하여 단백질발현정도를 분석한다. Polyvinylidene difluoride membranes에 transfer하고, 30분간 PBS containing 0.1% tween 20 (FBS-T) and 5% (w/v) dry skim milk powder로 30분간 blocking한다. 적절한 primary antibody로 4시간 반응시킨 후 HRP-conjugated-secondary antibody를 1시간 반응시킨 다음 ECL Plus Western blotting analysis system (Amersham)으로 발색하여 X-ray film에 노출시켜 검출한다.

④ Transient Transfection

Primary cell을 seeding한지 1일 후 1 ug의 expression plasmid (히스톤 메틸화, 아세틸화 효소)를 calcium phosphate coprecipitation 방법 또는 lipofectamine 방법으로 transfection한 다음 GFP 발현양상을 형광현미경으로 관찰 한 후 그 외 단백질발현 (Immunoblot)을 측정한다.

④ DNA pull-down assay

Cell extract를 biotin-conjugated oligonucleotide (전사조절인자 특이적으로 제작)와 4°C 에서 반응시킨 후 streptavidin-bead로 precipitation시킨다. bead-oligo-전사조절인자 복합체를 SDS-PAGE하여 분리한 다음 전사조절인자 특이적 antibody를 이용하여 immunoblot하여 DNA 결합능력을 측정하며, 또한 다른 단백질과의 상호 interaction을 측정한다.

④ Immunoprecipitation

단백질 interaction을 연구하기 위하여 cell lysate에 specific한 antibody를 2 시간 동안 4°C 에서 incubation한다. Incubation 후 protein A-Sepharose (20 ml)을 30 분 동안 4°C 에서 shaking 하에 incubation한다. Bead는 4°C 에서 extraction buffer로 두 번 wash 해주고 dilution buffer (50 mM MOPS (pH 7.0), 1 mM dithiothreitol, 5 mM MgCl_2 , 10 mM p-nitrophenyl phosphate, and 1% Nonidet P-40)로 한번 wash해 준다. SDS-PAGE 용 5 X sample buffer를 가한 다음, SDS-PAGE에 running한 후 specific한 antibody를 사용하여 immunoblot을 실행한다.

④ RT-PCR

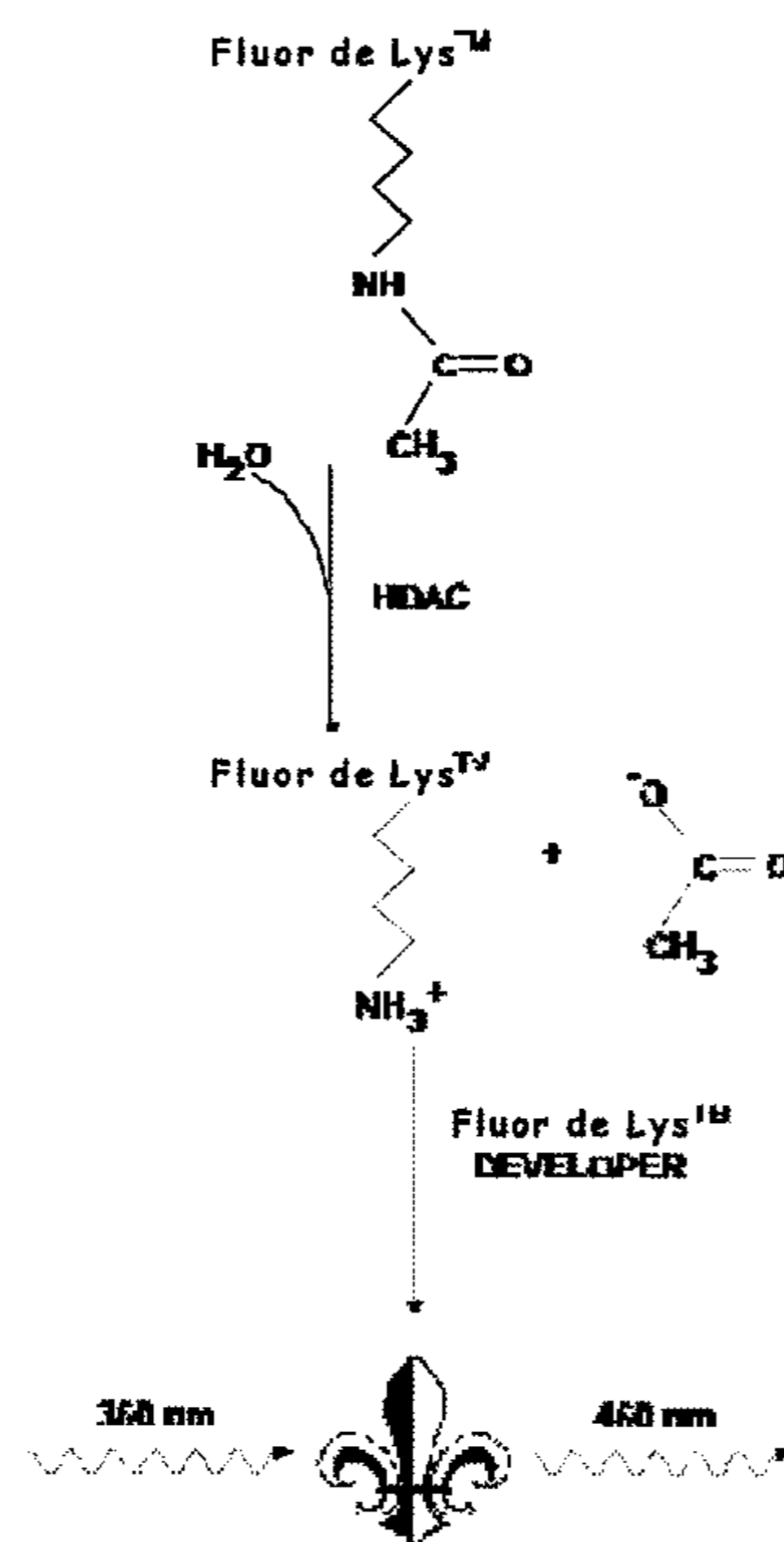
100-mm의 dish에 cell을 80% confluent하게 배양한 후 Trizol reagent (Gibco)를 이용하여 total RNA를 추출하고, 특정 유전자의 발현정도를 RT-PCR로 분석한다. 사용되는 pig GAPDH primer 및 특정 유전자 primer는 Bioneer에서 합성 의뢰하여 사용한다. PCR 조건은 cDNA synthesis는 60°C, 30 min, pre-PCR denaturation은 94°C, 2 min, denaturation은 94°C, 1 min, 그리고 annealing/extension은 60°C, 90 초이며 총 30 cycle이다. 증폭된 product는 1.5% agarose gel에서 분리한다.

● Chromatin Immunoprecipitation

Cell을 formaldehyde 처치하여 DNA-단백질을 cross-linking시킨 다음 sonicator를 이용하여 DNA가닥을 200-1000 bp단위로 shearing 한다. 아세틸화 히스톤 특이적 단백질 또는 전사조절인자 특이적 단백질을 이용하여 immunoprecipitation한 다음 DNA만 추출하여 특이적 primer를 이용하여 PCR하여 chromatin 수준에서의 아세틸화 정도를 측정하고, 또한 특정부위에 전사조절인자가 결합하는지를 측정한다.

● in vitro HDAC 활성도 측정

HDAC Fluorescent Activity Assay/Drug Discovery Kit(Biomol, USA)을 이용하여 HDAC 활성도를 측정한다. 이 방법은 radioisotope을 이용하는 방법보다 감도가 뛰어나고 간편한 방법으로서 기질로는 Fluorogenic Histone Deacetylase Lysyl Substrate를 이용한다. HDAC 활성에 의해 acetyl group이 제거되면, 이 기질이 360 nm의 excitation 파장에서 460 nm의 emission 파장의 빛을 내는 원리를 이용한 것이다. 또한, 효소원으로서 세포의 핵 추출액 또는 immunoprecipitation된 HDAC isoforms 각각의 활성도를 측정할 수 있다.



㉠ DNA 메틸화 효소 활성화 측정

세포의 lysate를 3H-SAM과 기질인 poly(dI-dC)와 함께 37도에서 2시간 반응시킨후, 크로마티그래피 컬럼으로 3H-SAM을 제거한후 scintillation count하여 세포내 효소의 활성을 비교 관찰한다.

㉡ Bisulfite sequencing method

분석하고자 하는 시료의 DNA를 추출한 후, bisulfite를 50도에서 16시간 처리하여 메틸기가 붙지 않은 사이토신을 전부 우라실로 바꾼다. 적절한 PCR primer를 이용하여 분석하기 위한 부위를 증폭한 후, T-plasmid 벡터에 넣어 염기서열분석을 한다.

㉢ 복제동물의 생산과 정상발달 분석

리프로그래밍을 유도한 체세포를 핵이식 기술을 이용해 복제란을 제조한다. 제조한 복제란은 적절한 리모델링 유도용 배양조건에서 배양하며 정상 발달을 분석하고, 수정란 이식 후 복제동물의 생산효율을 분석한다. 출생한 돼지는 정상발달 여부를 여러 가지 임상적 분석을 적용해 관찰한다.

4. 연구결과

1) ‘형광이’를 이용한 분석시스템의 구축

: 본 과제에서는 GFP 유전자를 형질 전환 시켜 형광발현이 잘되는 체세포를 이용하여 복제돼지를 생산하였다.

○ GFP 발현 plasmid 제조 : 모든 조직에서 과 발현시키기 위해 β -actin promoter에 의해 조절되는 mammalian expression vector를 아래 그림과 같이 제조하였다 (그림 1).

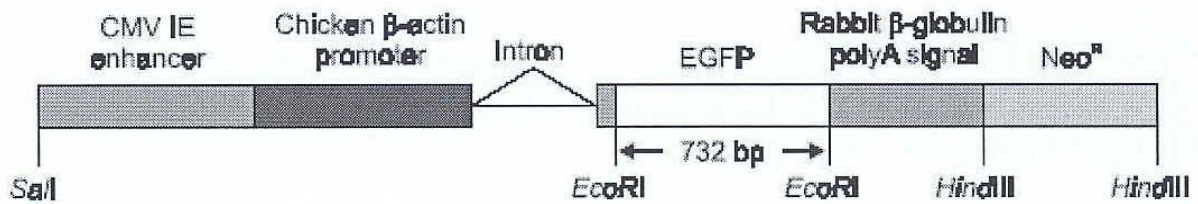
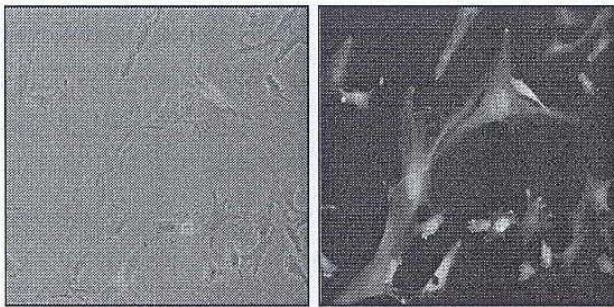


그림 1. pCX-EGFP/neo gene의 구조

○ GFP 발현 복제돼지 생산 : 위 vector가 stable하게 integration된 돼지 태아 섬유아세포를 제조하였다. 그 결과 아래와 같이 GFP가 잘 발현하였으며 (그림 2-A), 삽입된 위치를 확인하기 위한 FISH 시험을 실시한 결과 돼지 염색체 7번 끝 쪽에 삽입되었음을 알 수 있었다 (그림 2-B).

A.



B.

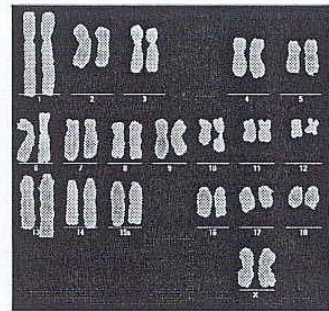
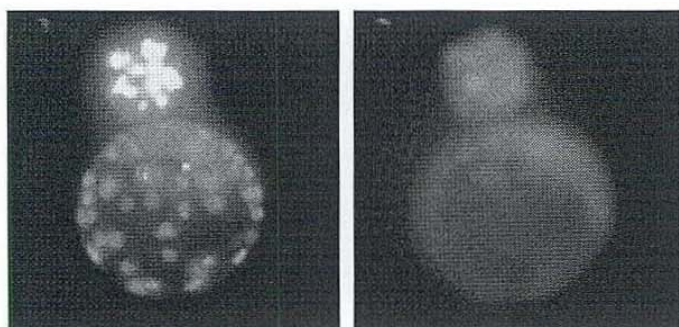


그림 2. (A) pCX-EFG/neo vector를 이용해 transfection된 donor fetal fibroblast cell에서 GFP 발현을 함. (B) donor cell에서 chromosome assay와 FISH를 수행함. GFP gene은 chromosome 7번의 telomere에 integration되어 있음 (orange 색).

상기 세포주를 활용하여 복제란을 생산하였고, GFP가 잘 발현하는 정상적인 복제수정란을 이식하여 건강한 복제돼지 12마리를 얻을 수 있었다 (그림 3).

A.



B.



그림 3. NT embryo와 offspring에서의 GFP 발현

(A) NT blastocyst를 in vitro에서 6일간 배양함. 왼쪽의 사진은 Hoechst 33342를 이용해 염색한 embryo를 UV에 노출하여 nuclei number를 판별함. 오른쪽의 사진은 GFP 발현 사진임 (200배)

(B) NT piglet에서의 GFP 발현 사진

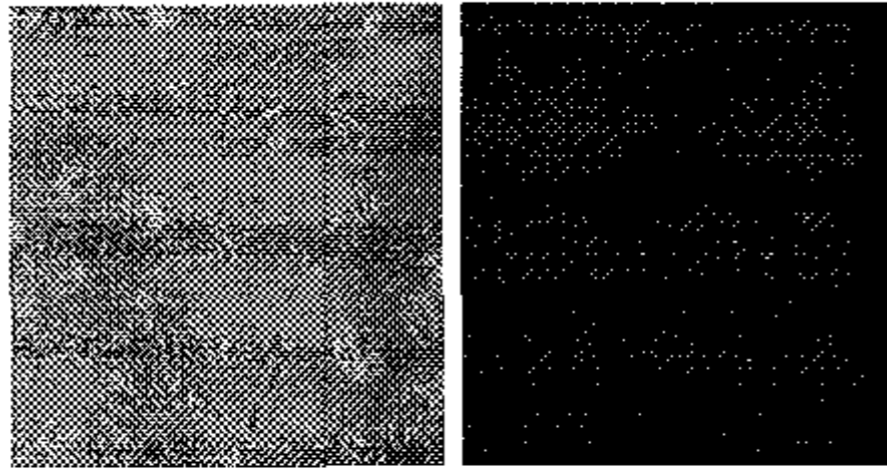
복제돼지의 생산효율은 아래 표와 같이 약 0.47%였다. 보고된 효율보다는 약간 낮았으나 생산된 복제 돼지는 정상적인 발달을 보였다 (표 1).

Reconstructed embryos	224
Blastocysts to develop	29 (12.9%)
Nuclei of blastocysts (range)	23.8±2.0 (10-40)
Embryos transferred*	2578
Recipients	18
Pregnancy at day 50	5 (27.8%)
Term pregnancy	3 (16.7%)
Live offspring	12
% Alive from embryos transferred	0.47%

표 1. 복제 돼지의 복제 효율

○ 형광이 조직의 bisulfite 서열분석에 의한 DNA 메틸화 분석 : 생산된 복제돼지의 다른 부위와는 달리, 귀 세포에서의 GFP 발현상태를 검사해 본 결과 아래 그림과 같이 발현하지 않음을 확인하였다. 그러나 삽입한 GFP 유전자는 정상적으로 염색체 7번 위치에 존재하였다 (그림 4)

A.



B.

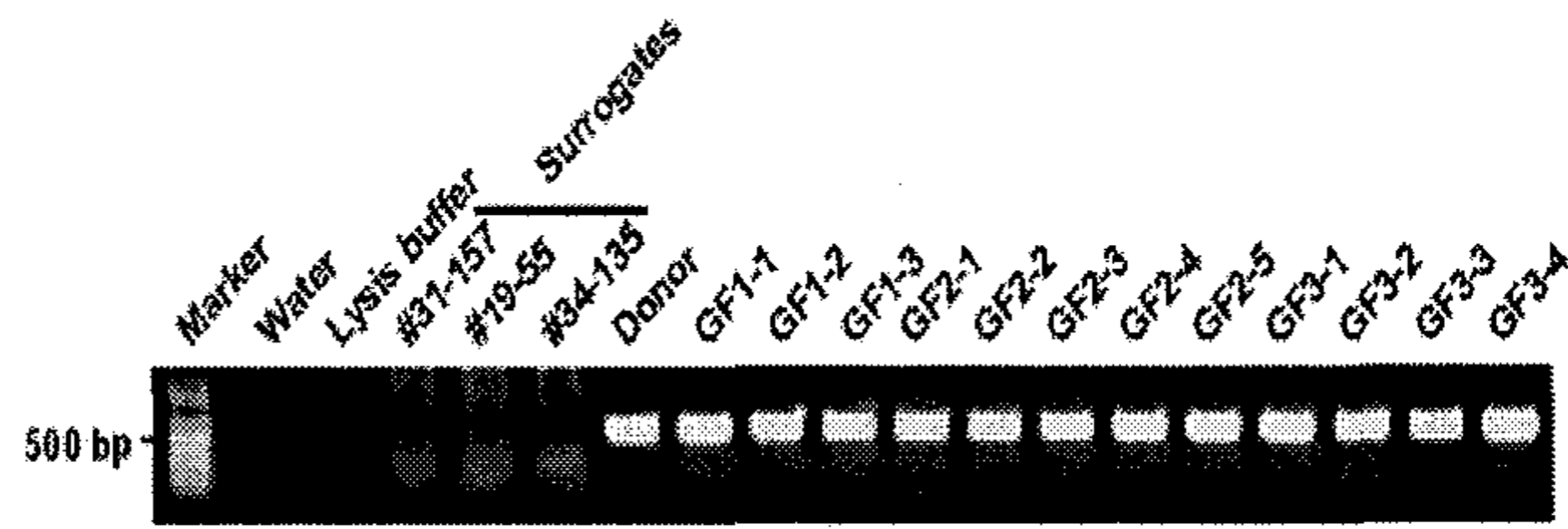


그림 4. 복제 돼지의 primary ear fibroblast에서의 transgene의 silencing

(A) primary ear fibroblast에서의 GFP silencing (100배) (B) surrogate, donor, ear cell에서의 PCR 분석

위 결과는 유전자의 에피제네틱스에 의한 조절 가능성을 시사하는 결과이다. 따라서 삽입한 GFP 유전자의 메틸화 상태를 분석하여 상호 비교하였다. 그 결과 아래 그림과 같이 GFP가 발현하지 않는 복제돼지 귀 섬유아세포는 GFP의 coding 부위의 CpG가 hypermethylation 되어 있었다 (그림 5). 이렇게 생산된 복제돼지 ‘형광이’는 특히 유전자 발현에 있어 후성유전적 조절 기전을 연구하는데 좋은 모델이 될 수 있다고 생각된다.

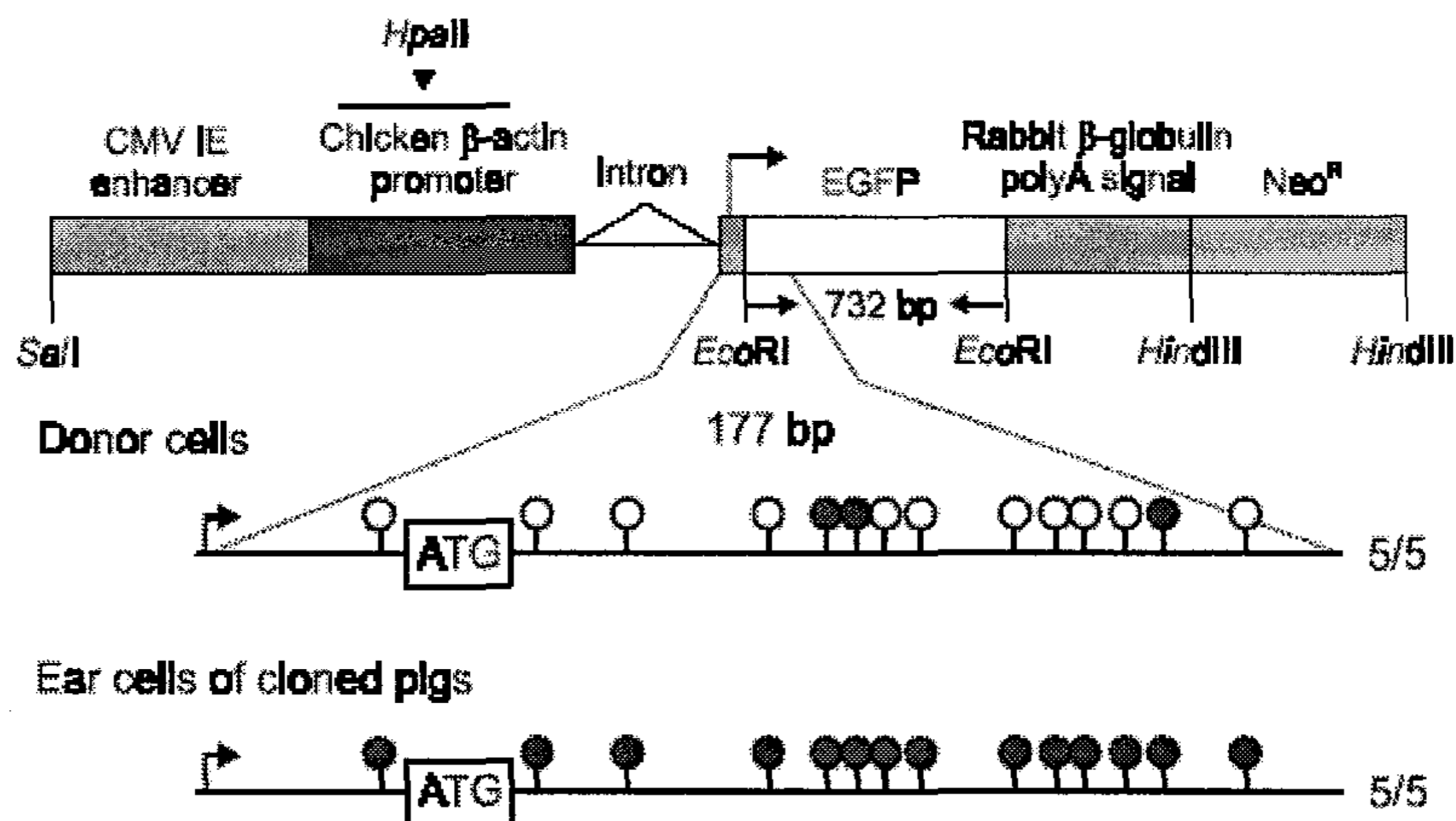


그림 5. donor cell과 ear fibroblast에서의 transgene의 DNA methylation에서의 차이. GFP coding region에서 bisulfite genome sequencing이 시행됨. 5개의 clone에서 분석됨. CpG site는 각각의 원으로 표시되었고, methylation CpG site는 closed circle, unmethylated CpG site는 open circle로 표시됨.

2) 내부 조절인자의 탐색

: 복제 돼지는 조직에 따라 조직 특이적인 유전자 발현 양상을 보였고, 이와 같은 발현 양상에 대한 조절이 어떠한 epigenetics 기전에 의한 것인지 알아보았다. 여러 가지 epigenetics 기전 중에서 특히 histone modification과 DNA methylation을 중심으로 연구를 진행하였다. DNA methylation은 CpG site에서 일어나는 현상으로 유전자의 silencing과 관련되어 있다고 알려져 있다. histone modification은 보다 복잡한 기전으로 이루어져 있다. histone acetylation은 유전자의 activation과 연관되어 있고, histone의 methylation은 보다 복잡한 기전으로 이루어져 있다. 본 연구에서 이용한 histone H3 K4의 methylation은 유전자의 activation과 연관되어 있다.

○ 각 세포의 promoter에서의 히스톤 아세틸화 및 메틸화 분석 : 에피제네틱스 조절기전중 히스톤의 modification을 알아보기 위하여, donor cell과 복제돼지의 귀세포에서 삽입된 GFP에서의 히스톤 아세틸화와 메틸화 정도를 ChIP 방법으로 측정하였다. 그 결과 아래 그림과 같이 donor cell에서 귀세포 보다, 히스톤 H3의 아세틸화, H4의 아세틸화 정도가 높았으며, 동시에 H3-K4의 메틸화 정도도 높았다. 이는 기존에 유전자의 activation과 관계된다고 보고된 히스톤의 modification과 유사한 결과를 보였다.

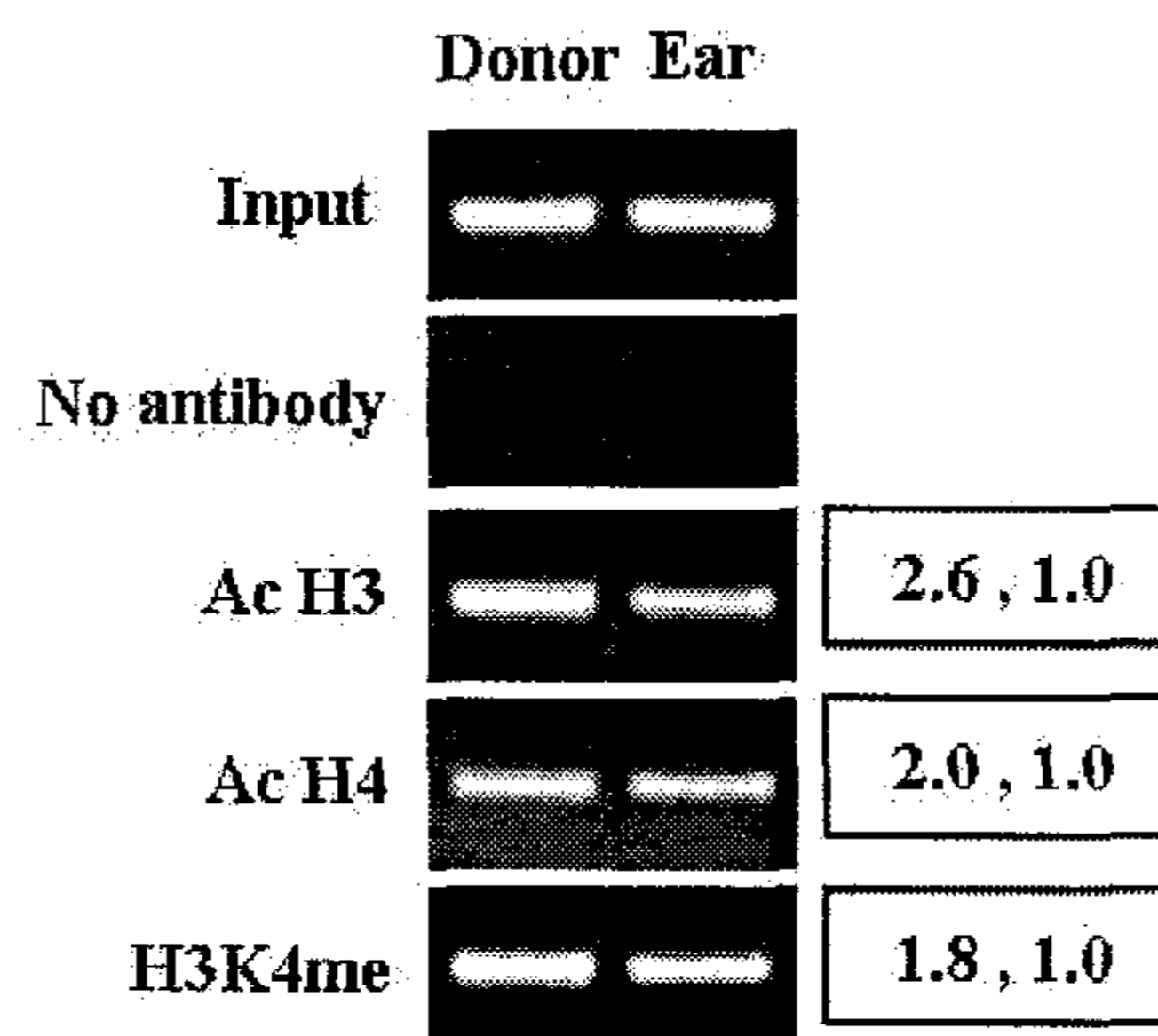


그림 6. donor cell과 ear fibroblast에서의 transgene의 histone modification에서의 차이. ChIP assay가 이용되었으며 active modification인 AcH3, AcH4, H3K4me가 donor에 비해 ear에서 감소하는 것이 관찰됨.

○ 복제돼지의 여러 조직에서의 GFP 발현관찰 : 귀세포 이외의 조직에서는 GFP의 발현양상이 어떻게 나타나는지 알아보기 위하여, 한달된 복제돼지를 도살하여 21개 조직에 대해 GFP 발현여부를 형광현미경을 이용하여 관찰하였다. 그 결과 아래 그림과 같이 근육, 혀 등을 포함한 일부 조직에서는 잘 발현하였으나, 간, 신장 등의 조직에서는 GFP가 발현되지 않았다 (그림 7).

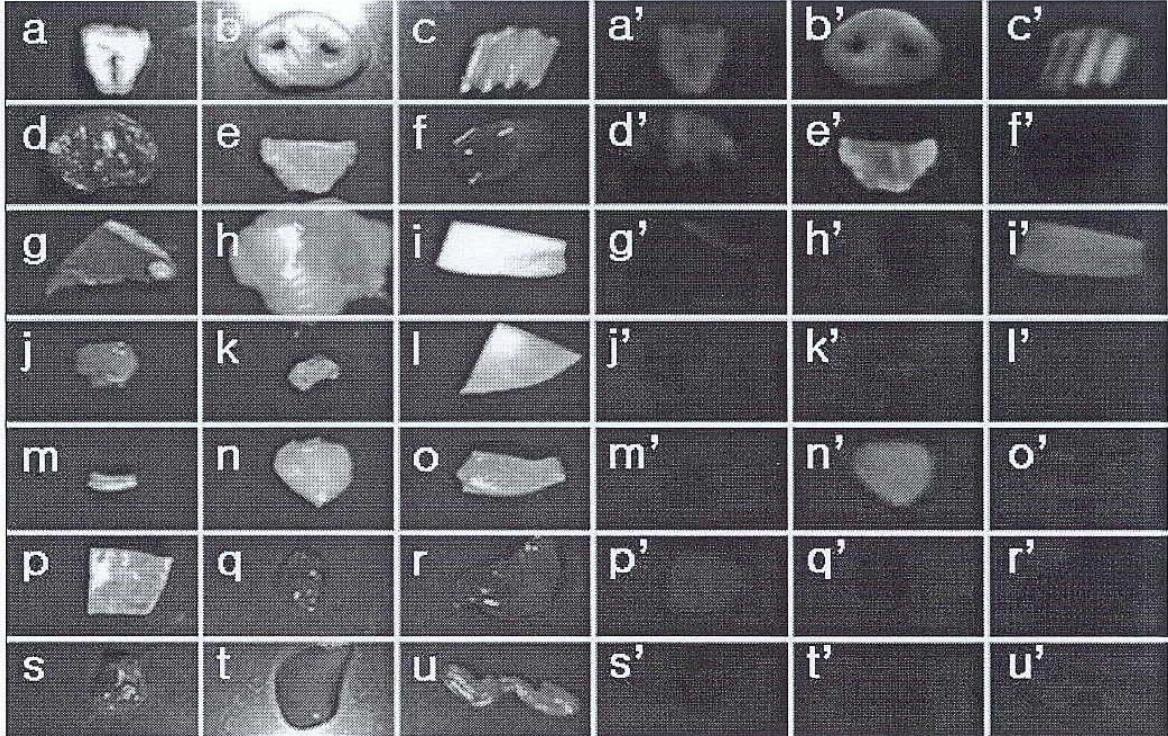


그림 7. NT piglet에서의 조직 특이적인 GFP 발현 양상.

(a-a') Hoof, (b-b') nose, (c-c') Ribs with skeletal muscle, (d-d') Heart, (e-e') Tongue, (f-f') Kidney, (g-g') Skeletal muscle (non-transgenic, negative control), (h-h') Brain, (i-i') Skin, (j-j') Thymus, (k-k') Ovary (l-l') Ear, (m-m') Spinal cord, (n-n') Skeletal muscle (o-o') Umbilical cord, (p-p') Frontal bone, (q-q') Pancreas, (r-r') Liver, (s-s') Thyroid gland, (t-t') Lung, (u-u') Small intestine.

○ 조직특이적인 발현차이에 관한 분자생물학적인 기전 연구 : GFP를 발현하는 조직과 발현하지 않는 조직의 히스톤 메틸화와 DNA 메틸화를 관찰함으로써 조직특이적인 발현조절을 에피지네틱적인 관점에서 관찰하였다. GFP가 발현하지 않는 간, 신장의 경우 coding 지역의 DNA의 CpG site는 대부분 메틸화된 경향을 보인다. 그러나 GFP가 발현하는 근육과 혀 조직의 coding 지역의 DNA CpG site는 탈메틸화의 경향을 보인다. 특히; 9번째(근육 조직에서 50%, 혀조직에서 70%의 비메틸화) 와 11번째(근육 조직과 혀 조직에서 60%의 비메틸화)의 CpG site의 탈메틸화는 GFP의 발현에 결정적인 역할을 하는 지역으로 보인다 (그림 8).

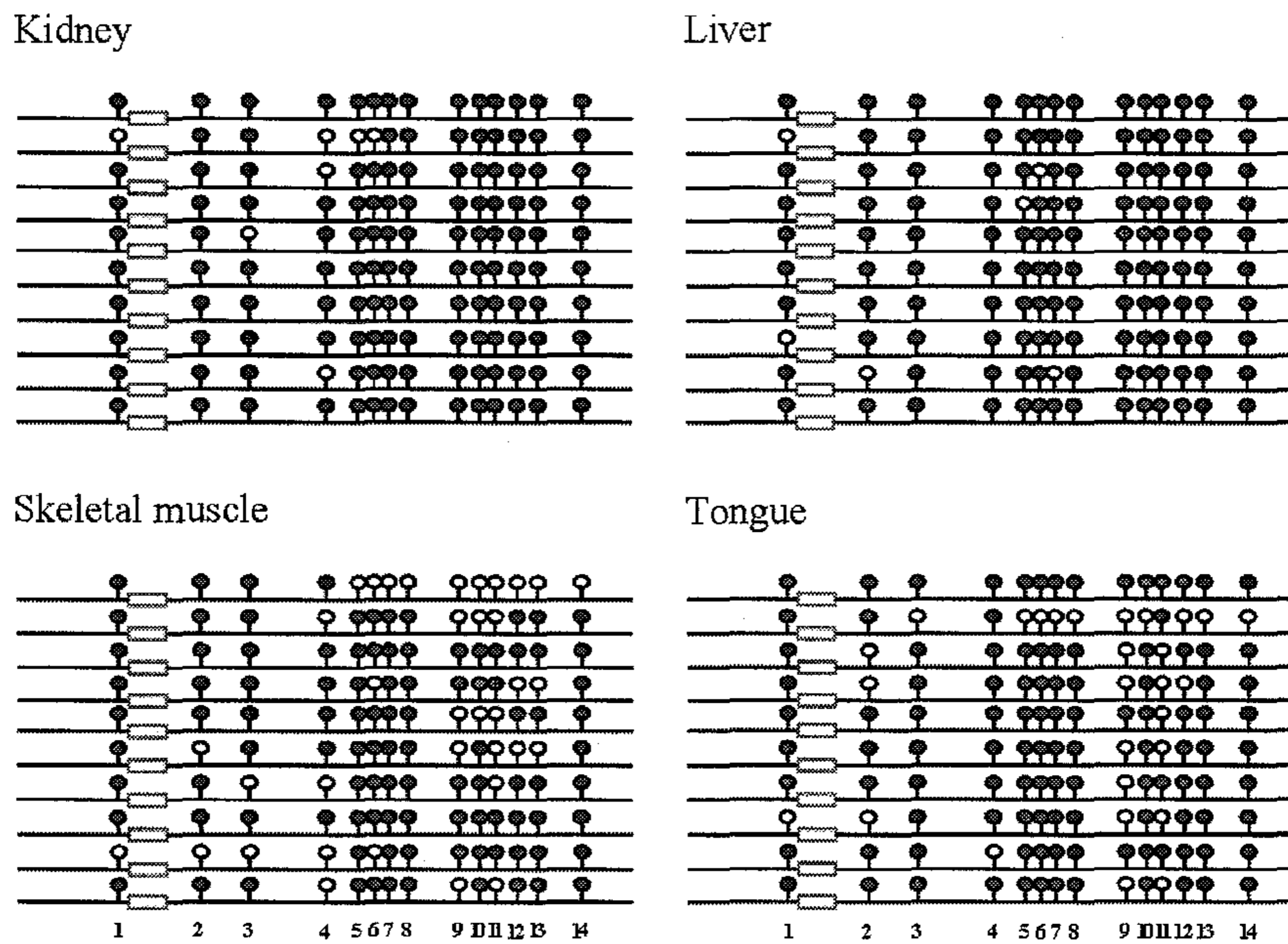


그림 8. 조직특이적인 발현차이에 관한 DNA methylation 패턴 연구

여러 조직에서 bisulfite genomic sequencing이 수행됨. GFP의 coding region에서 이루어짐. methylation CpG site는 closed circle, unmethylated CpG site는 open circle로 표시됨. 총 10개의 clone이 선택됨.

다음에는 GFP 발현 유무와 관련하여 히스톤의 modification 상황을 연구하였다. GFP의 발현은 기존에 알려진 히스톤 H3, H4의 N-말단의 독립적인 변형에 의하기 보다는 H4 아세틸화에 대한 H3의 네 번째 라이신의 메틸화의 비율에 영향을 받고 있었다. 즉 H3의 네 번째 라이신의 메틸화의 비율이 높을수록 GFP가 발현하는 것을 관찰하였다 (그림 9). 이러한 사실은 개체 발생과정에서 DNA 메틸화와 히스톤 N-말단의 가역적인 변형이 조직특이적인 유전자 발현조절에 중요한 역할을 하고 있다는 사실을 의미한다.

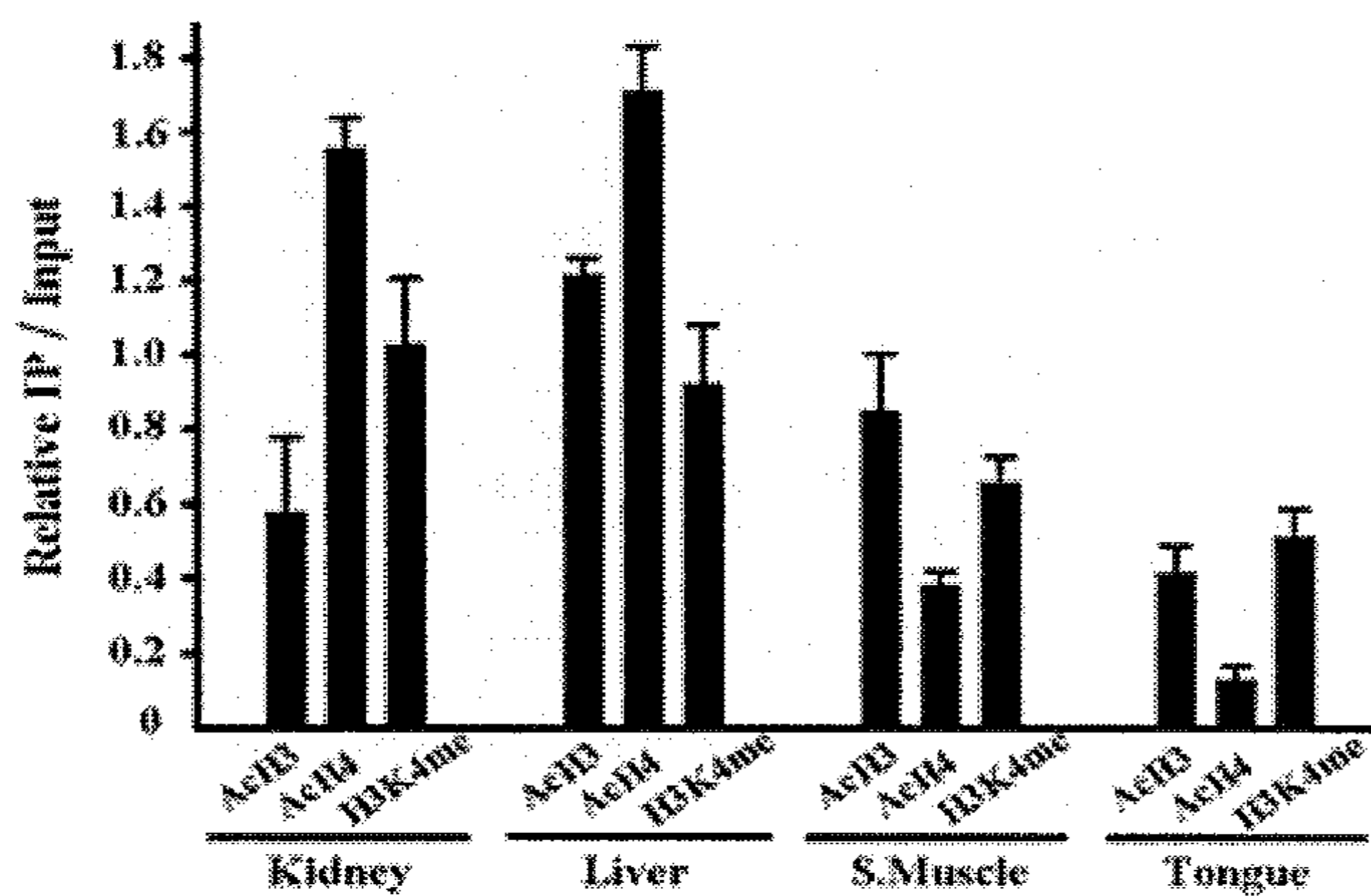
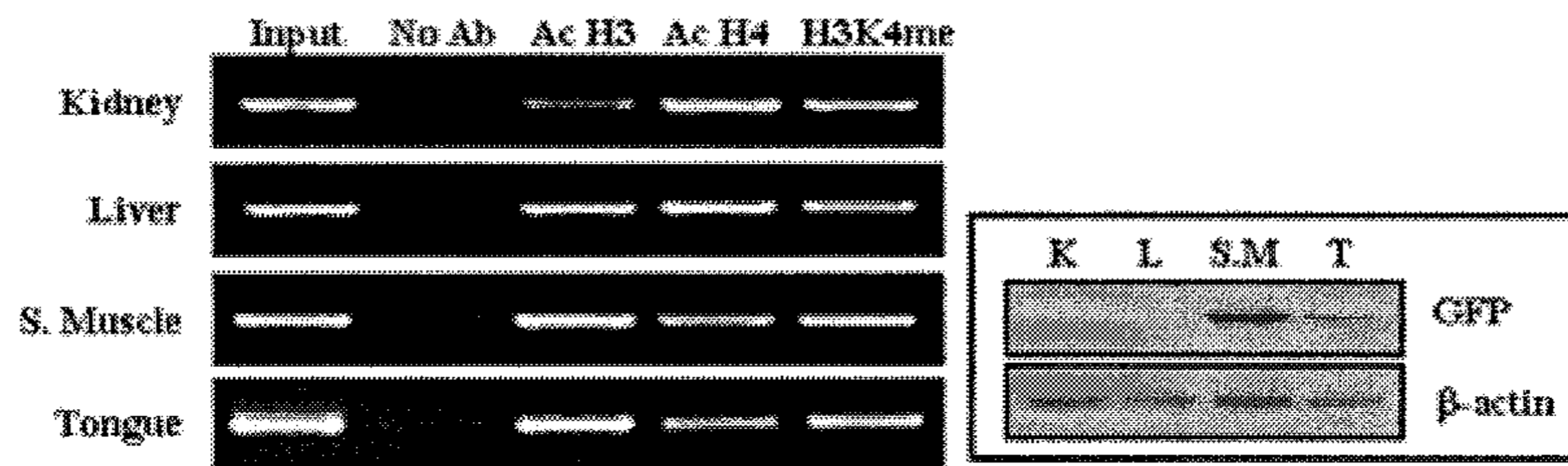


그림 9. 조직특이적인 발현차이에 관한 histone modification 패턴 연구
여러 조직에서 ChIP assay가 수행됨. GFP의 coding region에서 이루어짐.

복제 돼지를 통한 연구를 진행한 결과, 조직 특이적으로 일어나는 GFP 형광 발현의 차이는 GFP 유전자의 특정 부위에 존재하는 CpG site에서의 DNA demethylation과, 기존에 알려진 histone H3, H4의 N termianl의 독립적인 변형에 의하기 보다는 H4 qcetylation에 대한 H3 K4의 methylation 과 H3의 acetylation의 비율에 영향을 받고 있다는 사실을 알 수 있었다.

3) 정상 수정란 및 복제란의 히스톤 변화 비교분석

○ 히스톤 아세틸화 및 메틸화에 해당하는 항체 구축 : 돼지의 히스톤 아세틸화 및 메틸화에 해당하는 항체를 확립하기 위하여 항체를 제작하였으며, western blot을 통해 각 항체가 올바르게 작동함을 확인하였다. modification이 되어 있지 않은 히스톤 H3 peptide, 4번째 라이신 잔기에 메틸화가 되어 있는 히스톤 H3 peptide, 9번째 라이신 잔기에 메틸화가 되어 있는 히스톤 H3 peptide를 제작하여 히스톤 H3 K4, K9의 메틸화에 해당하는 항체의 적용시험을 하였다. 실험결과 각각의 항체는 올바르게 작동함을 알 수 있었다 (그림 10).

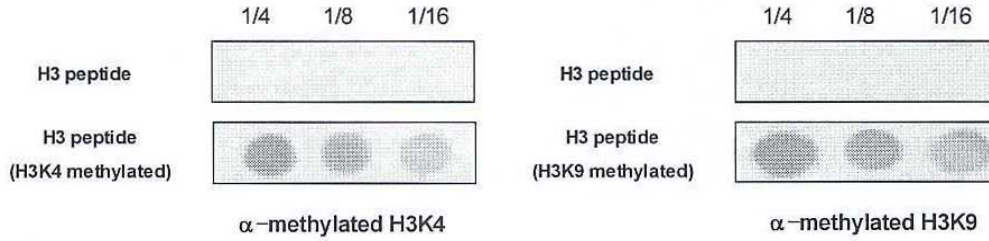


그림 10. 돼지 특이적인 항체의 생산

○ 정상란과 복제란 간의 중요 초기에 발생 유전자의 비교 분석 및 히스톤 변형 비교 관찰 : 정상 수정란과 복제란의 히스톤 변화는 앞에서 검증한 메틸화된 히스톤 H3K4의 항체를 이용하여 immunocytochemistry로서 관찰하였다. 정상 수정란과 복제란의 히스톤 H3K4의 메틸화로 인한 히스톤 변형은 유사하다는 결과를 알아내었다 (그림 11).

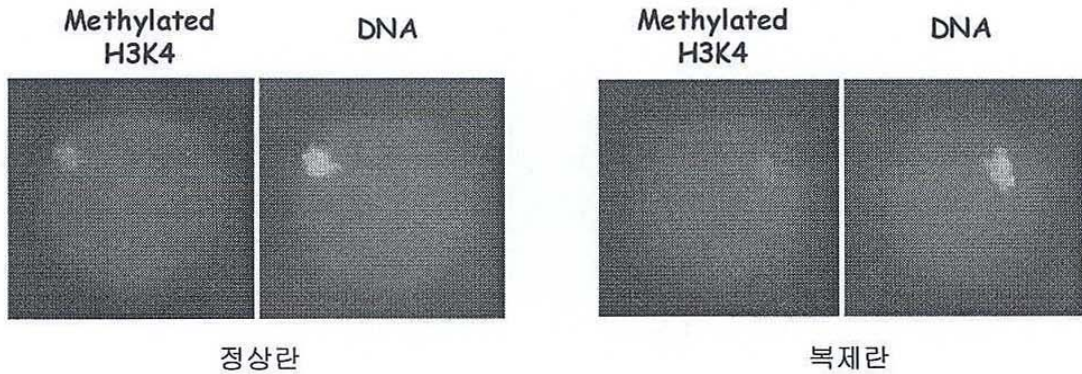


그림 11. 정상란과 복제란의 히스톤 변화 관찰

H3K4 항체를 이용하여 Immunocytochemistry를 이용하여 분석함.

4) 효율적인 reprogramming 유도물질의 탐색

○ GFP 및 중요 유전자의 정확한 변화를 유도하는 유도 물질의 탐색 : 발달 또는 분화가 많이 진행된 세포에서 복제 효율이 떨어지는 이유 중 하나로 세포가 분화할수록 세포는 분화특성에 맞게 조직 특이적으로 여러 가지 변화가 진행되는데, 진행된 변화가 많고 복잡할수록 핵 이식시 정상적인 발달을 위해 필요한 reprogramming 과정이 효과적으로 일어나지 못해 나타나는 현상으로 추정되고 있다. 본 연구진은 DNA 메틸화 저해제, 히스톤 탈아세틸화 저해제의 단독 또는 병행 처리하여 에피지네틱을 변화시켰을 경우 발현하지 않았던 복제돼지 귀세포의 GFP가 재발현함을 알아내었다 (그림 12).

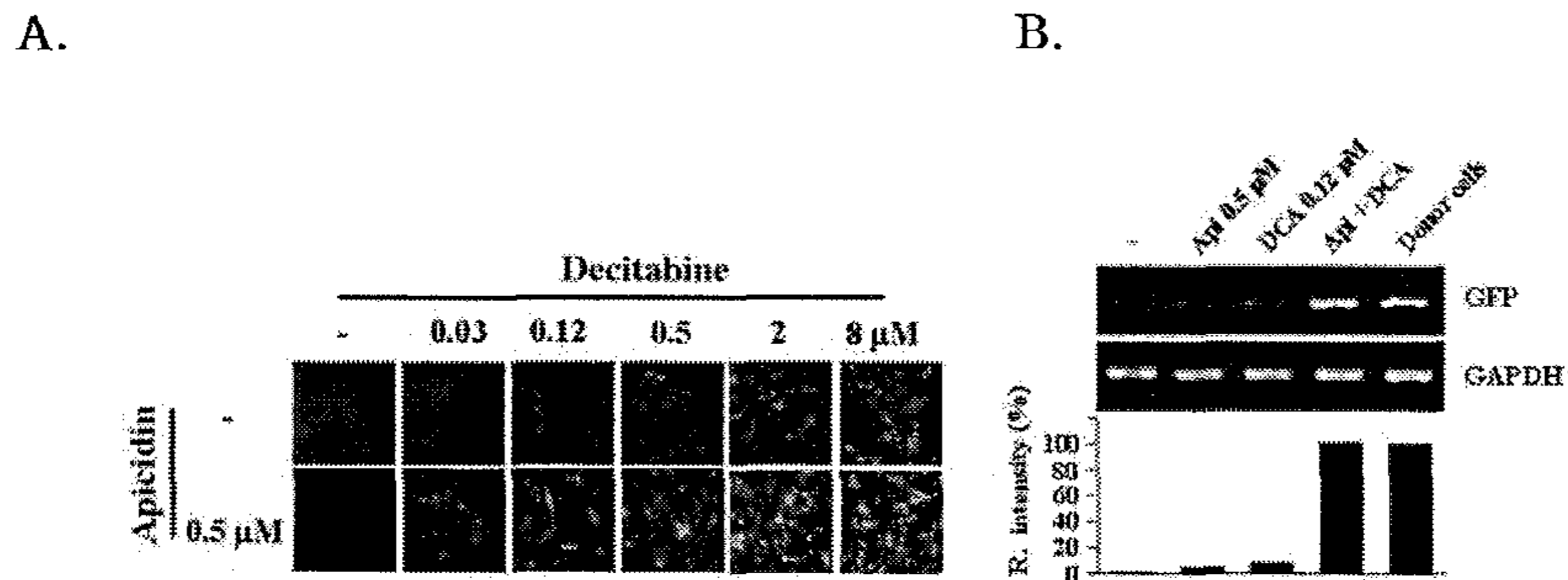


그림 12. DNA methylation 저해제와 HDAC 저해제를 이용한 GFP의 재발현 연구

(A) cloned ear fibroblast에 DNMT inhibitor(DCA)와 HDAC inhibitor(apicidin)을 함께 처리한 후 GFP 유전자의 재발현. (B) DCA와 apicidin 처리후 GFP의 발현 증가를 RT-PCR로 확인

이에 착안하여 본 연구진은 apicidin과 DCA 이외에도 에피지네틱을 조절하거나 그 외 조절인자를 제어할 수 있다고 여겨지는 약물의 reprogramming 정도를 검토하였다. 마우스의 근아세포에 reversine을 5uM의 농도로 4일간 처리하였을 경우 근아세포의 표지 단백질인 MyoD의 발현은 줄어들지만, 배아의 초기 발생 시기에서만 발현하는 중요 초기배 발생 유전자인 NANOG의 발현은 증가하였음을 관찰하였다 (그림 13). 이는 reversine에 의해 초기 발달과정의 중요유전자의 에피지네틱의 변화로 인하여 유전자의 발현이 조절되었을 가능성을 시사한다.

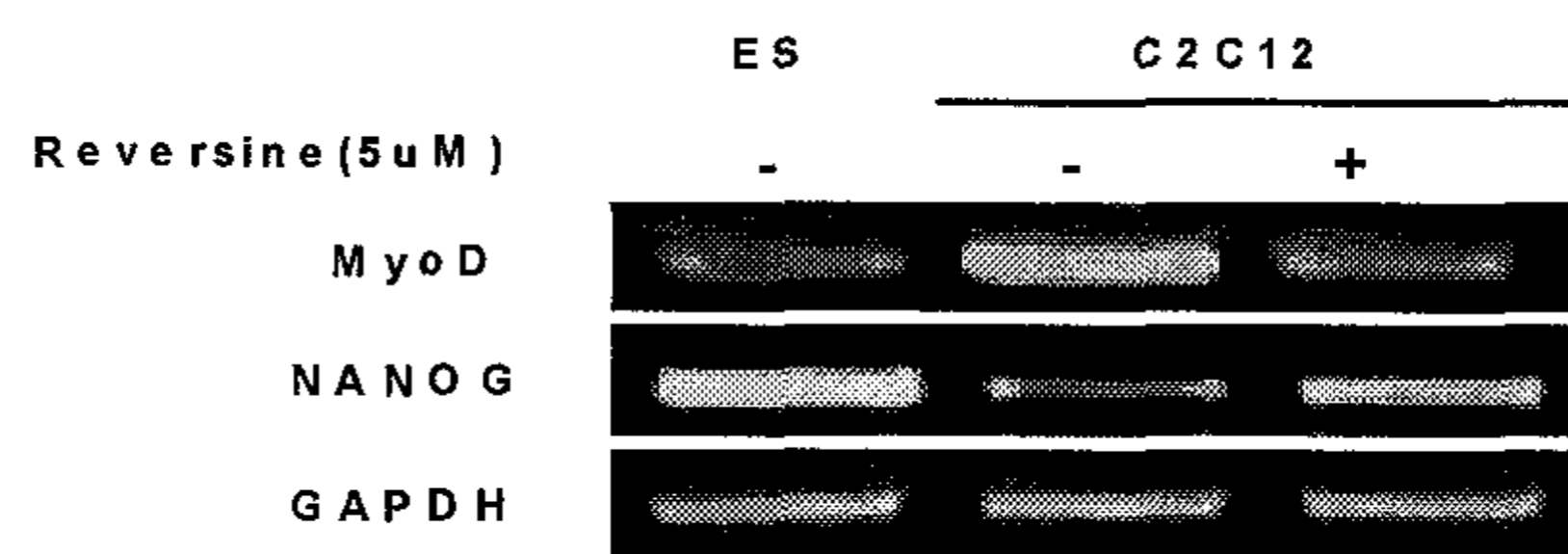


그림 13. Epigenetic 조절물질에 의한 마우스 근아세포의 reprogramming 실험

마우스 근아세포인 C2C12 cell에 reversine 5uM을 4일간 처리한 후, RT-PCR을 통해 중요 초기배 발생유전자의 발현을 관찰함.

복제돼지의 귀세포에 히스톤 탈아세틸화 저해제인 apicidin과 DNA 메틸화 저해제인 DCA를 단독 또는 병행 처리하였을 경우에는 GFP는 발현하였으나 NANOG 등의 초기발생관련 유전자들은 발현하지 않았다. 그러나 reversine을 처리했을 경우에는 복제 돼지세포의 GFP 뿐만 아니라 중요 초기유전자인 NANOG도 발현하였다 (그림 14). reversine은 약한 히스톤 탈아세틸화 효과를 가지고 있는 약물로 현재 성체 세포에서 역분화를 일으킨다고 보고되어 있는 약물이다. 또한 본 연구진은 이러한 역분화 과정에 있어 중요 유전자의 발현변화가 에피지네틱스에 의한 것이라는 미발표 연구결과를 보유하고 있다. 따라서 이러한 결과는 reversine으로 인해 돼지 귀세포의 에피지네틱스가 체세포의 에피지네틱스에서 초기배아 상태의 에피지네틱스로 역분화되었을 가능성을 시사한다.

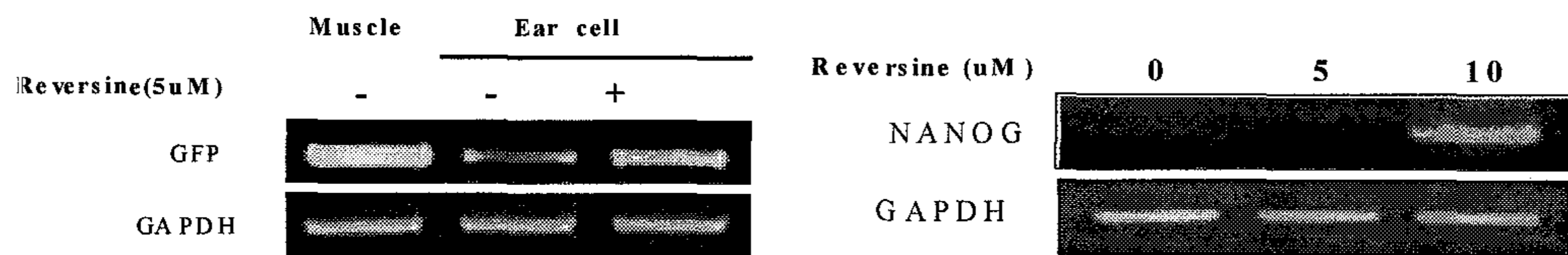
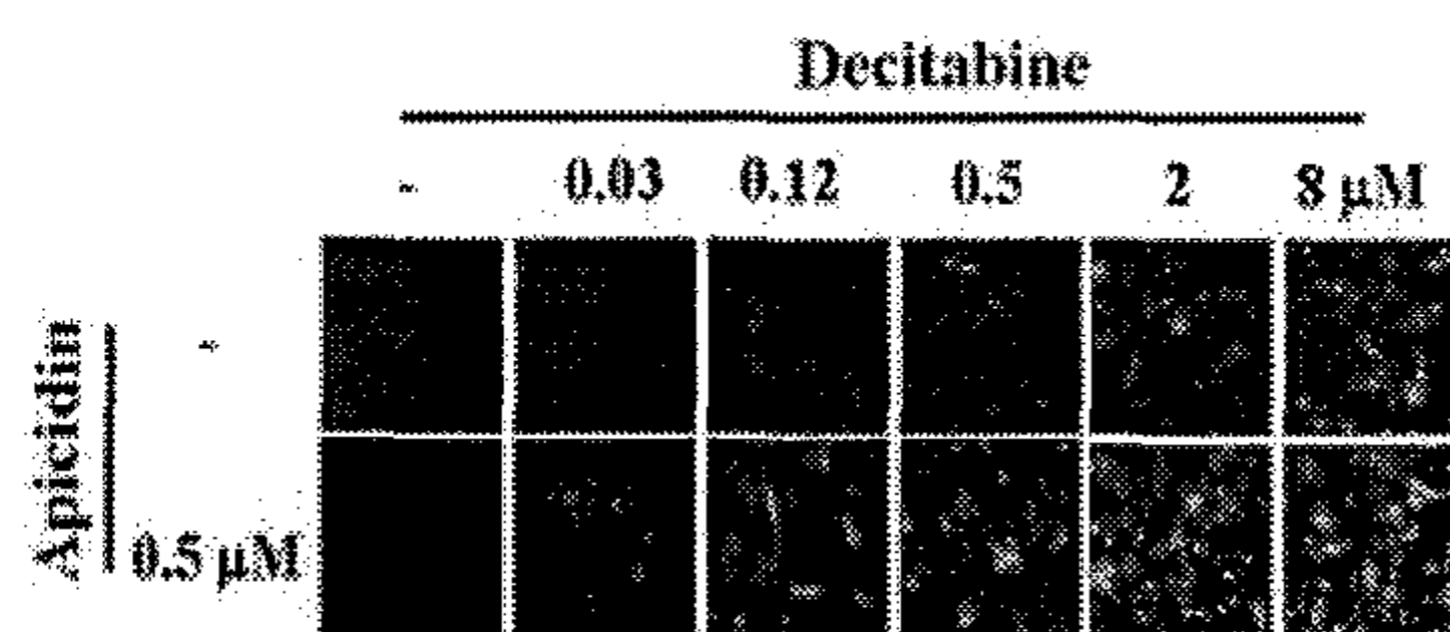


그림 14. Epigenetic 조절물질에 의한 돼지 ear cell의 reprogramming 실험

돼지 ear cell에 reversine 5uM을 4일간 처리한 후, RT-PCR을 통해 중요 초기배 발생유전자의 발현을 관찰함

○ 복제란의 reprogramming 및 remodeling 유도 조건의 확립 : 크로마틴의 remodelling 유도를 위해 히스톤 탈아세틸화 저해제인 apicidin과 DNA 메틸화 저해제인 Decitabine을 여러 가지 농도로 처리를 하였다. 복제 piglet의 ear cell은 epigenetic regulator 약물에 의해 GFP 재발현이 유도됨 (그림 15.A, B). 이와같은 조건 중 특히 세포에 독성이 적은 농도인 apicidin 0.5uM으로 세포에 전처리하여 복제란의 reprogramming을 유도한 후, 체세포 핵이식을 수행하기로 하였다.

A.



B.

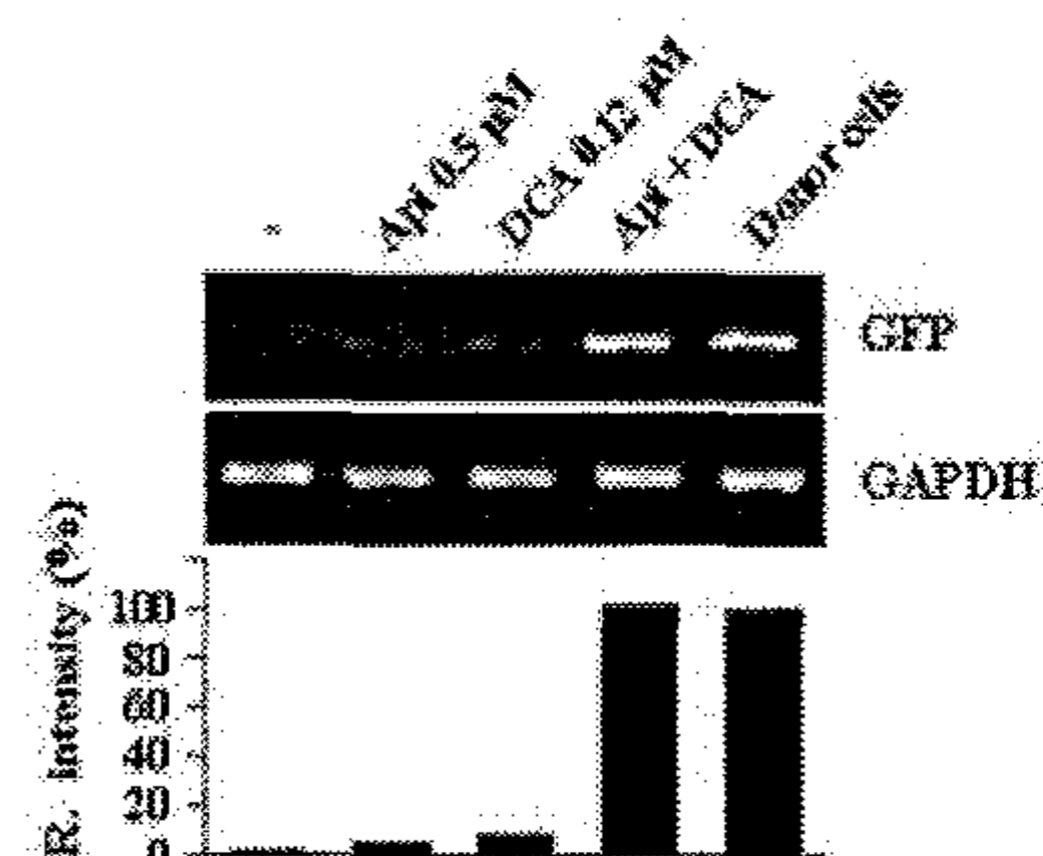


그림 15. Epigenetic 조절물질에 의한 돼지 ear cell의 GFP 재발현 조건의 실험

(A) cloned ear fibroblast에 DNMT inhibitor(DCA)와 HDAC inhibitor(apicidin)을 함께 처리한 후 GFP 유전자의 재발현. (B) DCA와 apicidin 처리후 GFP의 발현 증가를 RT-PCR로 확인

또다른 epigenetic regulator로 작용하는 약물인 reversine로서 donor cell의 효과적인 nuclear reprogramming을 유도하고자 MTT assay를 수행하여 donor cell의 유효농도를 정하는 실험을 하였다 (그림 16)

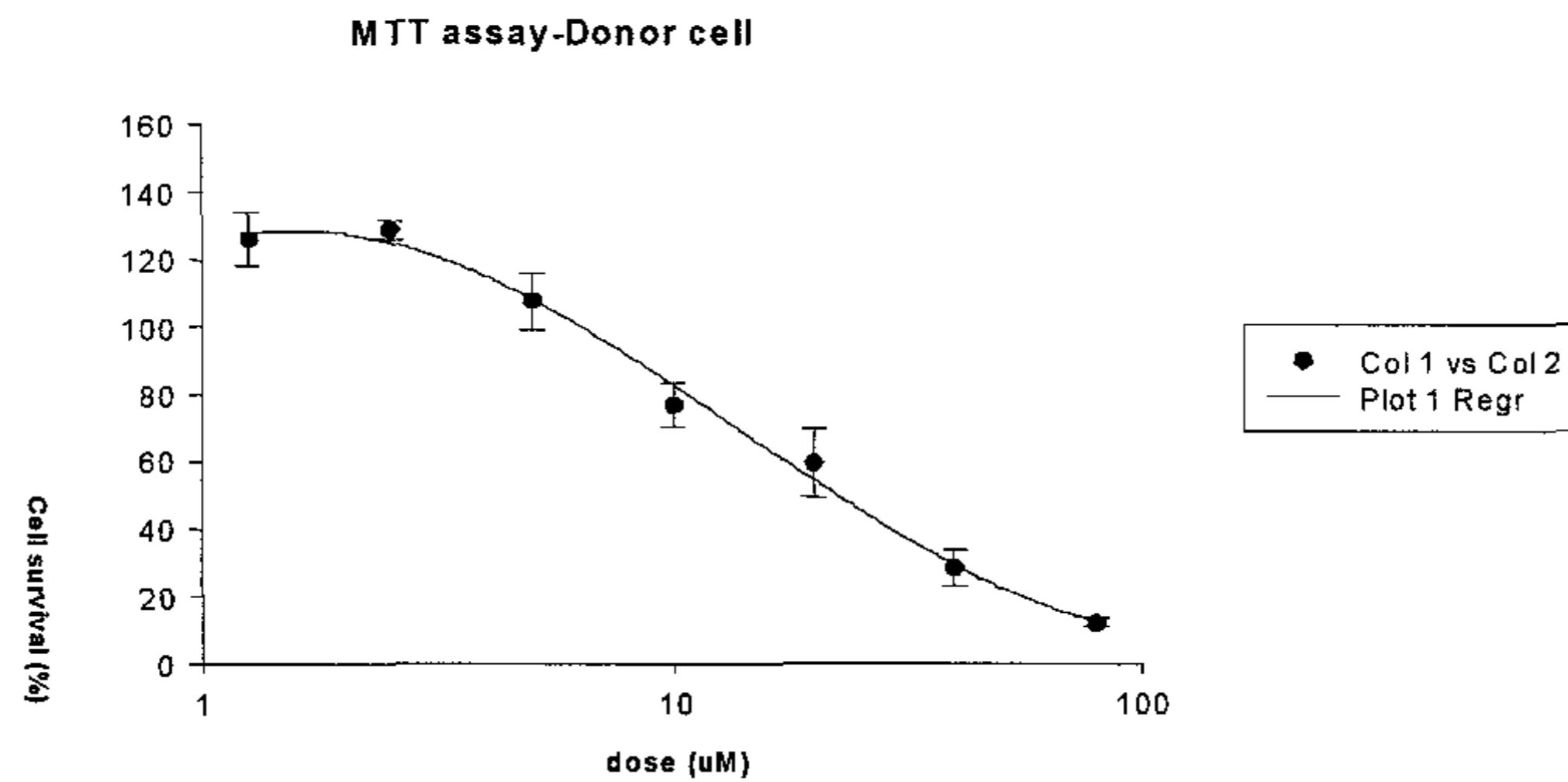


그림 16. 체세포 reprogramming을 위한 약물 농도 조건 확립

돼지 donor cell에 각각의 농도의 reversine을 처치한 후 4일 경과 후, MTT assay를 수행함.

MTT 세포독성 실험결과를 토대로 reversine 처치 농도의 조건을 실험한 결과 10uM의 농도에서 4일 처치를 했을 경우 초기 배아세포에서 발현하는 유전자인 NANOG가 적은 양 발현하였다. 이와 같은 결과는 완전하지는 않지만 체세포에 reprogramming이 일어난다는 것을 의미한다 (그림 17). 유효 농도라고 생각되는 reversine 10uM을 처치한 donor cell을 이용하여 체세포핵이식을 하여 배반포 발생의 효율을 높이는 실험이 진행되고 있다.

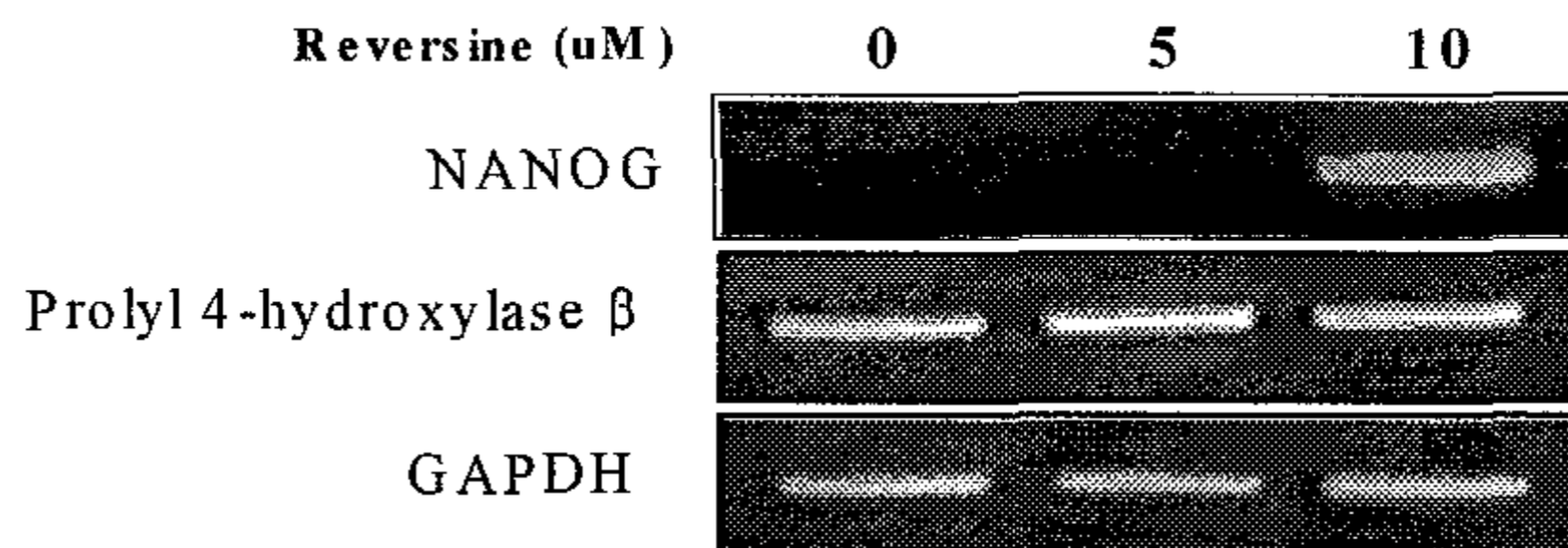


그림 17. reversine에 의한 돼지 donor cell의 reprogramming 연구

reversine 10nM을 4일 처치한 후, 체세포 특이적인 유전자인 Prolyl 4-hydroxylase b와 초기 배아 세포 특이적인 유전자인 Nanog의 발현을 RT-PCR로 확인함.

이와 같은 연구를 통해 형광의 발현이 되지 않는 복제 돼지의 ear cell에 DNA methylation inhibitor와 HDAC inhibitor를 처리하여 형광발현이 되게 인위적인 reprogramming을 유도할 수 있음을 알 수 있었다. 또한 새로운 reprogramming 유도 물질인 reversine을 발굴하였다.

5) 체세포 reprogramming 적용에 의한 reprogramming 정도 확인

○ 유전체 조절물질 처리 후, 크로마틴 IP를 통한 히스톤 변형 관련여부 규명 : Donor와 귀 세포에 아세틸화 억제제를 처리하였을 때, 그리고 DNA 메틸화 효소를 병용처리 하였을 때, 히스톤의 modification의 상태와 GFP 발현과는 어떤 상관성이 있는지를 ChIP를 통해 연구하였다. 그 결과 GFP발현은 H3-K4의 메틸화 정도와 상관성이 높다는 것을 알 수 있었다.

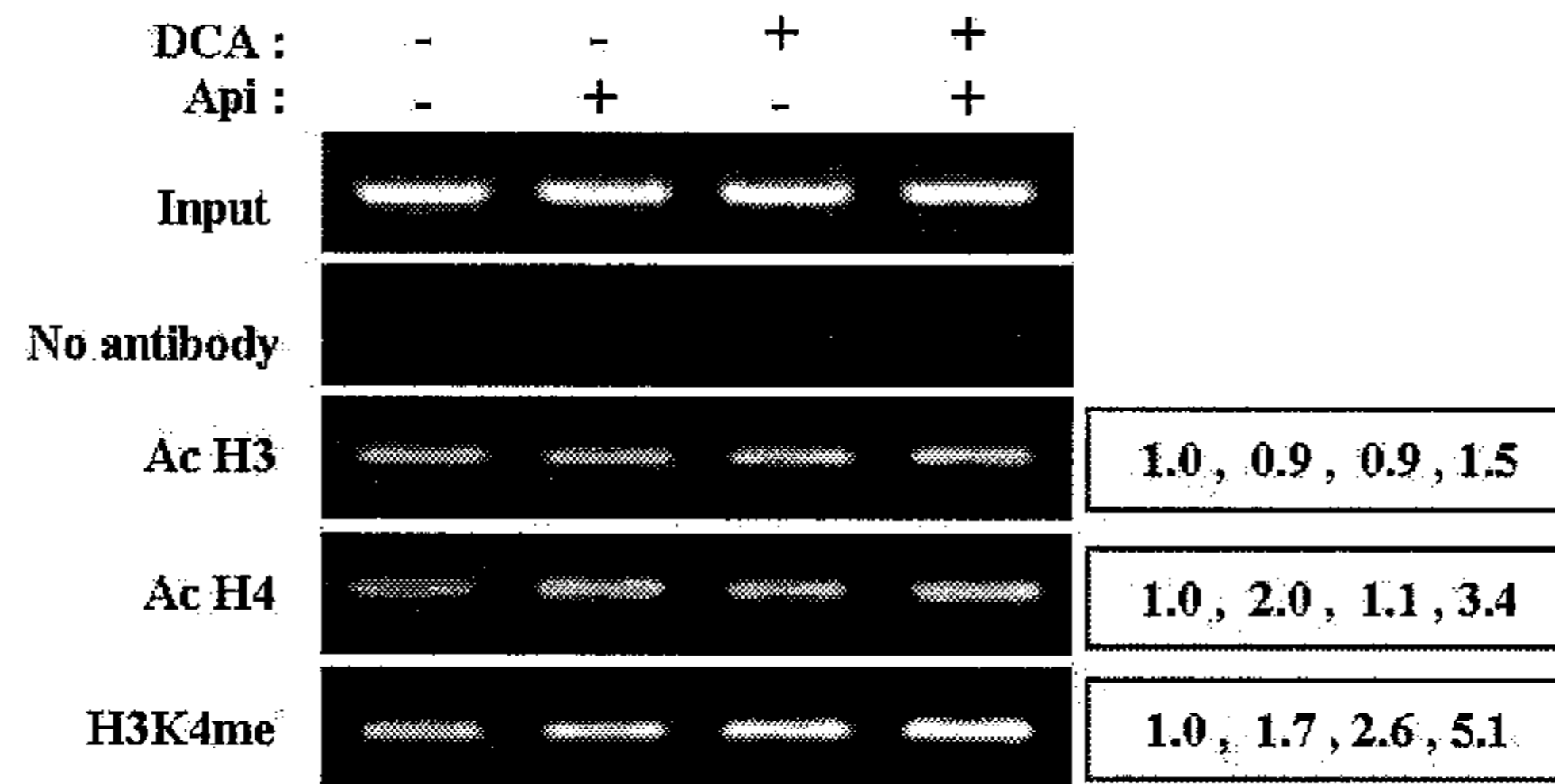


그림 18. 유전체 조절물질 처리 후 histone modification 상황

Donor cell과 ear cell에 DCA 혹은 apicidin을 처치한 후 24시간 후에 ChIP assay를 통해 histone modification 상황 관찰

○ 복제란의 reprogramming 상태 분석 및 비히스톤 단백질의 관여 조사 : 상기 결과들을 조절하는데 있어 주요 상관성 높은 인자의 조사를 위해 크로마틴에 직접적인 영향을 주는 비히스톤 단백질인 DNMT와 HDAC의 발현량의 변화 여부를 조사하였다. apicidin 0.5uM 처치 결과, HDAC1의 RNA 및 단백질의 발현량에는 별다른 변화가 없었다. 그러나 DNMT1의 경우에는 RNA와 단백질의 양 모두 감소하는 결과를 보였다 (그림 19). 따라서 DNA의 메틸화에 영향을 주는 비히스톤 단백질인 DNMT는 reprogramming에 관여 가능성을 타진할 수 있다.

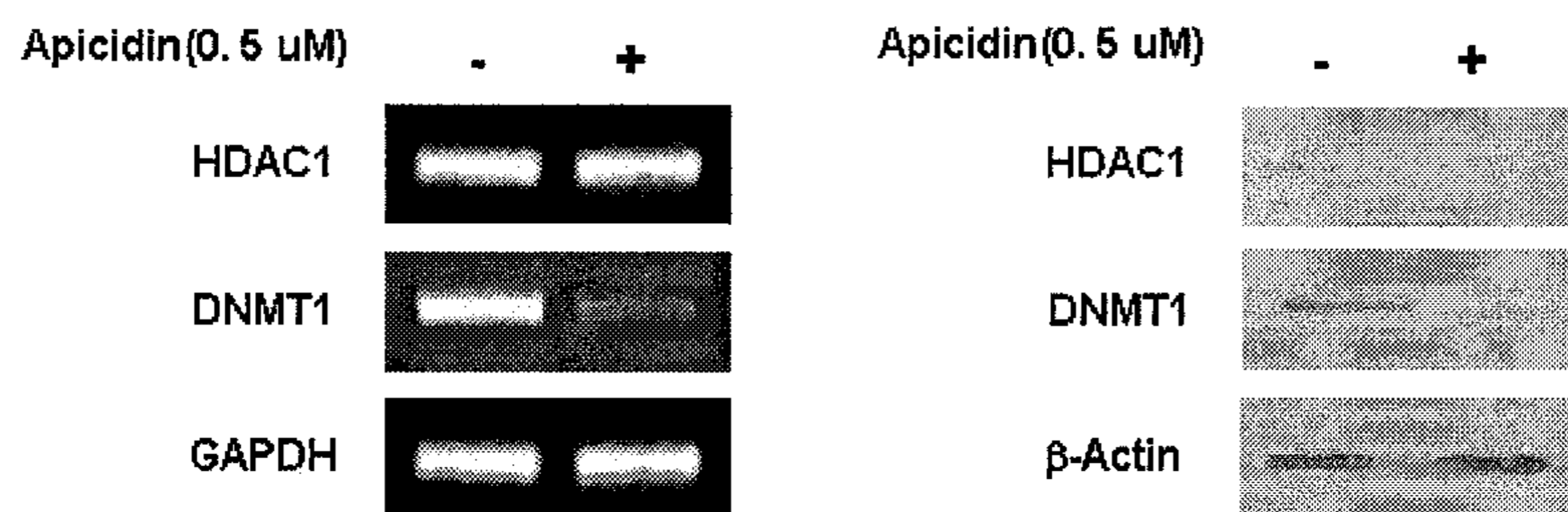


그림 19. 유전체 조절 물질 처치 후 epigenetic modifier의 양태 변화

Donor cell과 ear cell에 apicidin을 처치한 후 24시간 후, RT-PCR과 western blot을 수행함

6) 체세포 reprogramming 기술 적용에 의한 복제돼지 생산 효율성 분석

○ 복제된 귀세포의 재복제에 의한 변화 관찰 : 복제돼지의 난소를 얇게 절편화하여 시료를 제작한 후, GFP 발현을 알아보았다. 복제돼지의 난소에서 난자를 포함하는 난포만이 GFP를 발현하였다. 따라서 복제돼지의 난자를 채취하여 GFP의 발현을 재확인 하였다. 흥미롭게도 난자 주위의 난구세포에서는 GFP 발현이 일어나지 않는데, 난자에서는 발현하였다 (그림 20). 이와 같은 사실은 돼지의 난세포질에 히스톤 modification과 DNA 메틸화를 조절하는 등의 여러 가지 중요한 reprogramming factor가 존재함을 시사한다.

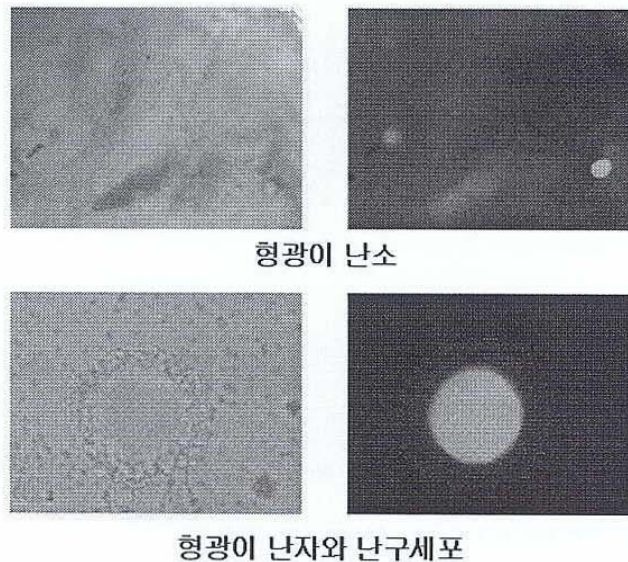


그림 20. 복제 돼지의 난소에서의 GFP 관찰

따라서 GFP 발현이 안되는 귀세포를 재 복제 하였을 때, 돼지의 난세포질이 재프로그래밍의 능력이 어떻게 나타나는지 알아보기 위해, 귀세포를 채취한 돼지 난자에 핵이식하였다. 그 결과 아래와 같이 정상적으로 배반포로 발생하는 핵이식란에서만 GFP가 발현하였다 (그림 21). 이는 초기수정란 발생에 에피제네틱에 의한 조절이 중요하며, 돼지 난세포질은 그런 능력을 가지고 있다고 생각된다.

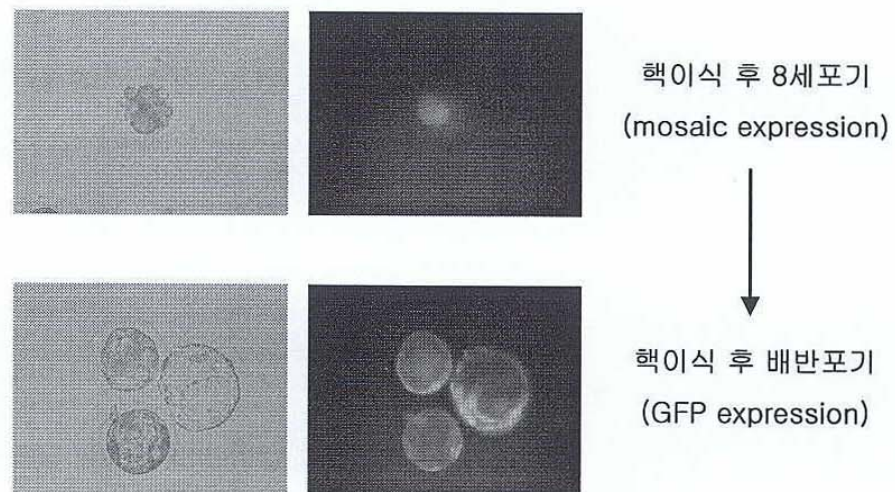


그림 21. 복제 돼지의 ear cell을 재 복제 후 reprogramming 관찰

○ 복제된 귀세포의 재복제 효율 관찰 : 복제 돼지의 귀세포를 이용해 재복제를 하였을 때의 복제 효율은 아래의 표와 같다. 10마리의 대리모 돼지와 1716개의 배아가 이용되었으며, 임신 50일째에 착상되어 발달하고 있는 확률은 60%였다. 임신 150일까지 성공적으로 임신이 유지되고 있는 확률은 30%이었다. 이와 같은 작업을 통해 생산한 재복제 돼지는 총 15마리였으며, 최종 복제 효율은 0.87%로 일반적인 체세포 복제 돼지의 복제 효율과 비슷한 수준이다 (표 2).

Embryo transferred	1,716
Recipients	10
Pregnancy at day 50	6(60.0%)
Term pregnancy	3(30.0%)
Live offspring	15
% Alive from embryo transferred	0.87%

표 2. 복제된 ear cell을 이용한 재복제 효율

○ 출산후 정상발달 분석 : 재복제 돼지의 출산 직후 체중을 분석한 결과, 아래의 표에 기술한 것과 같은 체중을 보이며 정상적으로 발생한 돼지와 비슷한 체중을 보였다. 이와 같은 결과로 미루어 볼 때, 정상적인 발달이 이루어 졌음을 알 수 있었다 (표 3).

<대리모 #1이 출산한 재복제돼지>

체중 평균 (Kg)	1	2	3	4	5	6
1.17	0.95	1.41	1.02	1.28	1.29	1.07

<대리모 #2이 출산한 재복제돼지>

체중 평균 (Kg)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.45	1.58	1.56	1.23	1.52	1.61	1.33	1.56	1.22	1.46

표 3. 재복제 돼지의 산자 분석

○ 재복제돼지의 여러 조직에서의 GFP 발현관찰 : 복제 돼지의 귀세포를 이용하여 재복제한 돼지의 GFP의 발현양상이 어떻게 나타나는지 알아보기 위하여, 재복제돼지를 도살하여 15개 조직에 대해 GFP 발현여부를 형광현미경을 이용하여 관찰하였다. 그 결과 아래 그림과 같이 심장, 코 등을 포함한 일부 조직에서는 잘 발현하였으나, 간, 신장 등의 조직에서는 GFP가 발현되지 않았다. 이와 같은 패턴은 재복제시 체세포를 제공한 복제돼지인 ‘형광이’의 조직 내 GFP발현과 거의 동일한 결과이다. 이는 체세포 핵이식 직후 GFP가 발현한 배반포만이 정상적인 발생과정을 겪게 되었으나 각 조직으로의 발생이 진행되면서, 조직 특이적인 epigenetic기전에 의해 GFP가 각각 다른 발현의 조절을 받게 된다는 결론을 재확인 시켜준다.

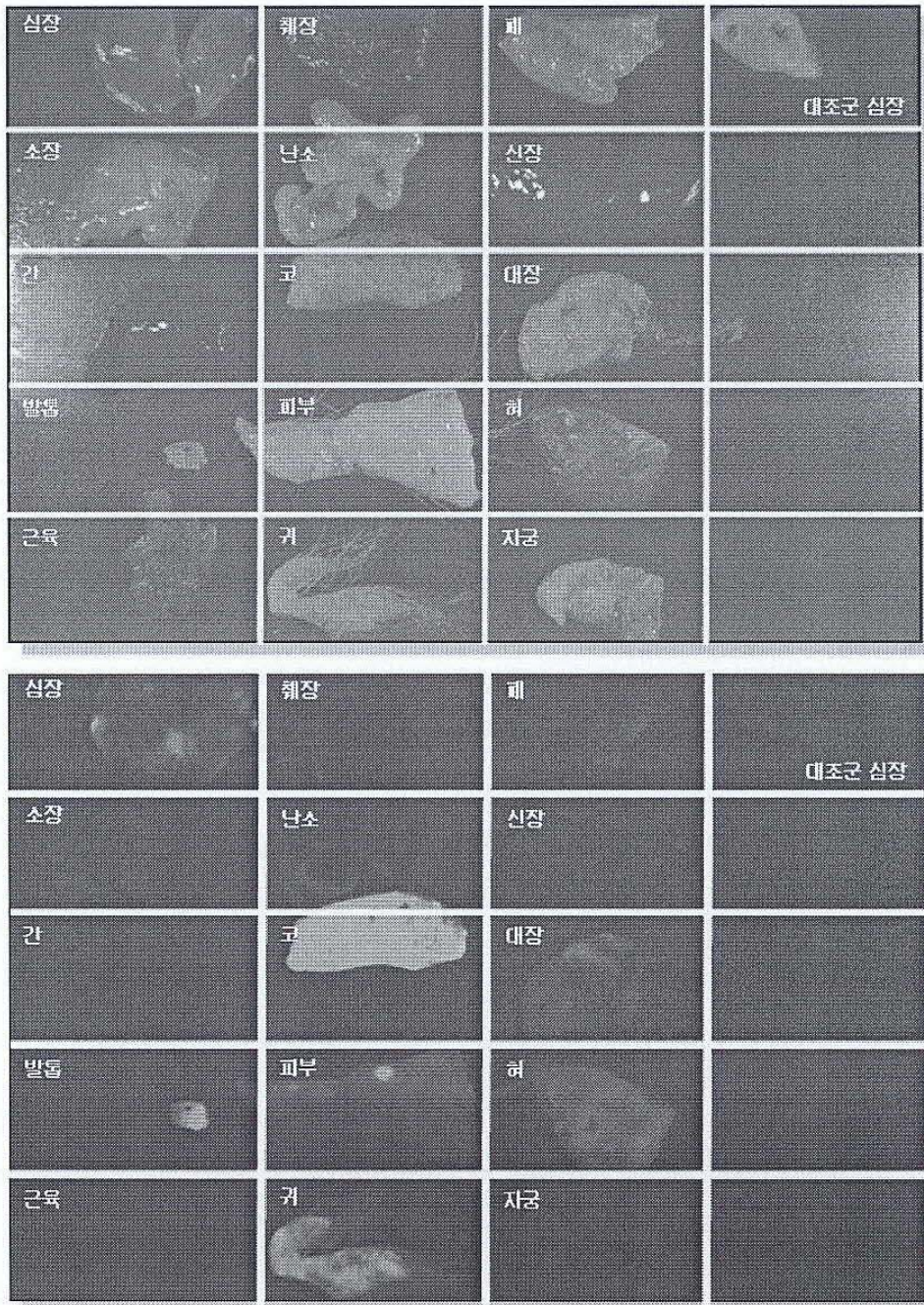


그림 22. 재복제 돼지의 여러 가지 장기에서의 GFP 발현 분석

○ 체세포 reprogramming을 통한 복제돼지의 생산 : apicidin 0.5uM을 20시간 전처리한 donor cell으로 체세포핵이식을 하였을 경우, 배반포까지의 정상 발생율을 분석하였다. 발생효율은 아래 표와 같이 약 0.045%였다. 이는 control에서의 배반포까지의 발생효율인 0.027%보다 향상된 수치로 epigenetic regulator의 전처리로 epigenome을 조절할 경우, 체세포 핵이식 시 효과적인 reprogramming이 유도될 수 있음을 알 수 있다.

	control	apicidin
No.oocyte	336	332
Fused	281	287
Fusion(%)	0.836	0.864
>2cell	157	196
Clea.(%)	0.467	0.590
Blastocys	9	15
Blast.(%)	0.027	0.045
No.cell	26.3	25

표 4. 체세포 reprogramming을 통한 복제 돼지 생산 효율

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

-목표달성도-

구 분	평가의 착안점 및 달성도	
	착 안 사 항	달성도(%)
1차년도(2004)	○ 형광이 조직의 bisulfite 서열분석에 의한 DNA 메틸화 분석	100
	○ 각 세포의 DNA 메틸화 효소활성 측정법 구축	100
	○ Immunoblot에 의한 히스톤 아세틸화 및 메틸화 분석	100
	○ 히스톤 메틸화, 아세틸화 효소의 과 발현 영향 연구	100
	○ 크로마틴 IP를 통한 히스톤 변형 관련여부 규명	100
2차년도(2005)	○ 히스톤 아세틸화 및 메틸화에 해당하는 항체 구축	100
	○ Immunocytochemistry 방법에 의한 정상란과 복제란의 히스톤 변형 비교분석	100
	○ GFP 및 초기배 발생에 중요한 유전자의 reprogramming을 유도하는 유도물질의 탐색	100
	○ 복제란의 reprogramming 및 remodeling 유도조건의 확립	100
3차년도(2006)	○ 중요유전자의 RT-PCR에 의한 remodeling 여부 확인	100
	○ 복제란의 reprogramming 상태 분석 및 비히스톤 단백질의 관여여부 조사	100
	○ 체세포 reprogramming 방법을 통한 복제동물의 생산 및 정상발달 분석	100
최종평가	○ 유전자 조절에 관여하는 epigenetic factor의 연구	100
	○ 체세포 reprogramming 최적화 방법의 연구	100

-관련 분야에의 기여도-

- 이상의 본 연구팀의 연구결과는 GFP 유전자가 조직 특이적으로 epigenetic modification에 의해 조절된다는 것을 시사하며 이는 체세포 복제과정에서 다시 회복되는 reprogramming 과정을 거친다는 사실을 명확히 보여주는 결과이며, 이를 바탕으로 체세포 복제과정에서의 epigenetic modification 과정 제어를 통한 유전체의 reprogramming은 체세포 복제 연구에 새로운 개념을 제공하는 것으로 평가됨.
- 체세포 핵이식 복제, 유전자 조작기술, 형질 전환 동물 복제 기술 등 동물 생명 공학 기술의 향상과 이식 면역 조절, 장기 이식 및 세포 이식 기술 등 의학 기술의 확립을 통한 이종간 장기 이식 분야의 발전을 도모할 수 있음.
- 생명체의 발생과 분화에 관여하는 유전체 연구의 기초자료를 제공함으로써 발생분자생물학, 세포생물학, 이식면역학 등 기초 과학과 임상의학 발전에 크게 기여
- 돼지 체세포 핵이식 수정란의 대량생산 시스템 확보 및 형질 전파 돼지를 통한 고가의 단백질 생산의 기반 기술 확립
- 체세포 epigenetic modification 제어기술의 확립을 통한 독자적인 최적화된 복제기술 확보
- Epigenetic modification 제어 성공 유무 확인을 위한 마커의 개발로 복제 효율의 극대화
- 생명체의 발생과 분화에 관여하는 유전체 연구의 기초자료를 제공함으로써 생물학 및 의학 발전에 크게 기여
- 체세포 발생 관련 단백질 상호 작용 제어 기술의 확립을 통한 최적화된 복제 기술 확보
- 다양한 동물에서의 체세포 복제 기술 향상을 위한 기초자료 제공

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

● 복제기술은 유전적으로 검증된 유용동물의 대량생산, 희귀동물의 차세대로의 보존 및 전달, 치료용 생체물질의 생산, 장기이식용 동물생산, 역분화 배아간세포를 이용한 세포치료 등에 활용할 수 있는 유용성으로 인해 선진국을 비롯한 많은 연구팀이 산업화하기 위한 연구를 경주하고 있다. 특히 미래의 주요 산업이 될 것으로 전망되는 바이오 장기 생산에 중요한 기술이기 때문에 빠른 산업화를 위해서 완벽한 복제기술의 개발에 온 노력을 기울이고 있다. 우리나라의 경우도 복제기술에 있어서는 “형광이”를 탄생시킬 정도로 세계 선도연구그룹과 겨룰 만 할 정도의 기술을 보유하고 있다. 그러나 복제 동물을 연구하는 팀과 분자생물학을 연구하는 팀이 분리되어 있어 산학 간 협력이 잘 이루어지지 않는 상태에서, 본 연구과제에서와 같이 복제돼지에 관한 연구와 유전자 epigenetic 연구 등 분자생물학적 연구가 통합적으로 뒷받침 된다면 독자적인 복제기술의 개발은 물론 보다 더 안전하고 효율적인 복제동물을 생산할 수 있어 세계와 경쟁할 만한 산업화가 진행될 것으로 생각된다. 이와 같은 연구과제를 통해 본 연구진은 복제돼지에서 형질전환 유전자의 조직특이적인 epigenetics의 조절에 관해 논문을 SCI급 저널에 발표하였다. 이는 복제 동물 관련 연구에 기여하는 성과이다.

● 히스톤 탈아세틸화 저해제 혹은 DNA 메틸화 저해제를 전처리하여 체세포의 reprogramming을 유도한 후 복제돼지의 생산에 관한 추가 연구가 필요하다. 그리고 현재 복제 수정란의 수량이 한정적이어서 Chromatin IP같은 관련 분자생물학적 도구가 이용될 수 없는 한계가 있다. 적은 수량의 검체에서도 epigenetics를 관찰할 수 있는 방법의 개발이 절실하다.

● 본 연구 과제를 통한 경제 산업적 측면에서의 활용 방안

- 2010년경 약 200억불로 예측되는 바이오 장기 시장에 경쟁 우위적으로 진출이 가능함.
- 독자적인 복제 기술의 개발과 특허화로 아직은 복제 기술의 산업적이용이 없는 상태라 특허료를 정확히 예측할 수 없지만, 예상되는 고가의 로열티 등에 대한 대체 효과를 얻을 수 있음.
- 유용물질 생산, 바이오 장기 생산 복제 동물, 유전자 및 세포치료 기술 그리고 질환 모델 동물 생산 기술의 산업화 촉진.
- 동물 산업 분야에 생명 공학 기술의 폭넓은 활용으로 고부가가치 창출
- 바이오 장기를 위한 돼지의 생산을 산업으로 육성 및 외화 획득
- 세계 바이오 장기 시장 선점은 향후 제품 이미지 제고와 더불어 시장 지배력을 강화하는데 결정적 역할
- 전문 인력 양성

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

㉠ 체세포의 reprogramming 관련 연구

: 배아줄기세포를 연구함에 있어, 세포치료제로서의 이용 뿐만 아니라 줄기세포의 기전을 연구함에 있어서도 배아줄기세포의 이용은 윤리적 비난을 면키 어려웠음. 따라서 윤리적인 문제를 해결한 배아줄기세포의 수립에 관한 연구가 이루어지고, 성체 줄기세포에 관한 연구가 진행되었음. 이러한 대안적인 배아줄기세포 연구에 있어 새롭게 주목을 받는 분야로 체세포의 후성유전체적 리프로그래밍을 통한 역분화 유도가 부각됨. 그러나 transdifferentiation이나 하등 동물에서의 역분화와는 달리, 포유류에서의 역분화 모델은 확립된 예가 거의 없음.

○ 역 분화 과정은 Dictyostelium이라는 하등 동물에서 microarray 결과 분화과정에서 activation 혹은 silencing 순서와 역분화과정에서의 순서가 서로 반대란 연구결과가 보고되었음. 이러한 양상은 역분화 과정이 매우 정교하게 조절되는 일련의 과정이라는 주장을 뒷받침 해주는 결과임. 아울러 역분화가 일어나는 switch point에 중요한 역할을 하는 유전자를 보고함으로써 역 분화에도 master switch gene이 필요함을 밝혔음 (Katoh 외, 2004)

○ 쥐의 oligodendrocyte precursor cell에 bFGF라는 성장인자를 리간드로 이용했을 때, 다분화능을 가진 CNS 성체줄기세포로 리프로그래밍, 즉 역분화가 일어난다고 보고하였음. 역분화 된 세포는 neuron, astrocyte, oligodendrocyte로 재분화가 관찰됨.(Kondo 외, 2000)

○ 쥐의 근세포에서 msx1이라는 유전자를 과발현 한 경우 근세포의 분화 표지 유전자인 myogenin, MHC 등은 감소하고, 세포는 분화능을 획득하여 연골세포, 지방세포, 골아세포 등으로 재분화되는 현상을 보고 하였음. (Odelberg 외,2000)

○ 쥐의 근세포에서 REST라는 신경세포 관련 유전자에 특이적인 repressor에서 repression-domain을 결핍시키고 activation-domain을 치환한 분자를 과 발현 할 경우 근세포가 신경세포화 하는 현상을 보고하였음. (Watanabe 외, 2004)

○ 쥐의 근세포에 reversine이라는 약물을 처치하면, 근세포가 역 분화를 일으켜 지방세포와 골아세포로의 분화능을 가지는 현상을 보고하였음. (Chen 외, 2004)

☞ 세포 치료를 위한 체세포의 reprogramming 관련 연구는 초기단계이며, 자가세포의 이식으로 면역 거부반응의 제거를 장점으로 예측하고 있음. 또한 장기 이식을 위한 면역 거부 물질을 제거한 동물 모델에 관한 연구가 진행되고 있음.

제 7 장 참고문헌

- K.Hubner, G.Fuhrmann, L. Christenson, J. Kehler, R.Reinbold, R.Fuente, J.Wood, J.Strauss III, M.Boiani & H.Scholer 2003 Derivation of oocyte from mouse embryonic stem cells. Science 300 : 1251-1256
- N.Geijsen, M.Horoschak, K.Kim, J.Gribnau, K.Eggan & G.Daley 2004. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. Nature 427 : 148-154
- M. Kanatsu-Shinohara, K.Inoue, J.Lee, M.Yoshimoto, N.Ogonuki, H.Miki, S.Baba & T.Shinohara 2004 Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. Cell 119 : 1001-1012
- M.Katoh, C.Shaw, Q.Xu, N.Driessche, T.Morio, H.Kuwayama, S.Obara, H.Urushihara, Y.Tanaka & G.Shaulsky 2004 An orderly retreat : Dedifferentiation is a regulated process. PNAS 101 : 7005-7010
- T.Kondo & M.Raff 2000 Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. Science 289 : 1754-1757
- A.Meissner, R.Jaenisch 2006 Generation of nuclear transfer-derived pluripotent ES cells from cloned Cdx2-deficient blastocyst. Nature 439 : 212-215
- E.Meshorer & T.Misteli 2006 Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. Nature Review Molecular Cell Biology 7 : 540-546
- C.J.McGann, S.J.Odelberg & M.T.Keating Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract. PNAS 98 : 13699-13704
- S. Odelberg, A.Kollhoff & M.Keating 2000 Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by msx1. Cell 103 : 1099-1109
- E.J.Richards & S.C.R.Elgin 2002. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing : Rounding up the Usual Suspects. Cell 108 : 489-500
- K.Takahashi, S.Yamanaka 2006 Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126 1 : 14
- C.Taranger, A.Noer, A.Sorensen, A. Hakelien, A. Boquest & P.Collas 2005. Induction of dedifferentiation, genome-wide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. Molecular Biology of the Cell 16 :

5719-5735

• I.Wilmut, N.Beaujean, P.A.de Sousa, A.Dinnyes, T.J.King, L.A.Paterson, D.N.Wells & L.E.Young 2002. Somatic cell nuclear transfer. Nature 419 : 583-586