

최 종 보 고 서

발간등록번호

11-1543000-000654-01

Zinc finger nucleases를 이용한 소 광우병발현유전자가
제거된 배아 생산 및 유전자 제거 검증
(Generation of PRNP knockout embryos using zinc finger
nucleases and verification of its knockout)

충 남 대 학 교

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “Zinc finger nucleases를 이용한 소 광우병발현유전자가 제거된 배아 생산 및 유전자 제거 검증에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

년 월 일

주관연구기관명 : 충남대학교

주관연구책임자 : 조 종 기

세부연구책임자 : 조 종 기

연 구 원 : 이 두 수

연 구 원 : 조 상 철

연 구 원 : 김 강 용

협동연구기관명 : 서울대학교

협동연구책임자 : 장 구

협동연구기관명 : (주)틀젠

협동연구책임자 : 김 석 중

요 약 문

I. 제목

- Zinc finger nucleases를 이용한 소 광우병발현유전자가 제거된 배아 생산 및 유전자 제거 검증

II. 연구개발의 목적 및 필요성

제1절. 연구개발의 필요성

최근 조류독감 (AI; avian influenza), 구제역 (FMD; foot and mouth disease), 광우병 (BSE; bovine spongiform encephalopathy) 등 가축 전염병으로 인하여 전 세계적으로 막대한 피해가 발생하고 있으며 현재 우리나라 역시 이로 인하여 많은 피해가 발생하고 있다. 최근 구제역으로 인한 국가 피해액은 2조원을 넘었다는 보고가 있다. 그리고 2008년 광우병의 발생국가 (미국)로부터 소고기 수입 협상에 대한 결과는 우리나라에 사회적으로 큰 파장을 야기하였다. 그 이유는 광우병 소고기 섭취로 인해 인간에게 발생할 수 있는 치명적인 질병, variants Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) 때문이다. 오른쪽 표 1은 국가별로 2007년까지 보고된 소해면상뇌증(BSE) 및 vCJD 발병에 대한 통계이다 (<http://www.wikipedia.org>). 영국을 포함한 유럽 일부 국가에서 광우병에 걸린 소에서 유래한 변형된 prion 감염으로 variants vCJD라는 질병으로 인해 죽는 환자가 발생하여, 인수 공통 전염성 질병의 무서움을 다시 한번 경고하였다. 하지만 현재까지 국내에서 PrP-BSE 및 PrP-vCJD에 대한 발생 보고는 없었다. 광우병의 원인이 되는 prion은 단백질성 감염성 입자(Proteinaceous Infectious Protein)로서, 정상 cellular prion protein (PrPc)이 amyloid folding을 해서 비정상적인 단백질 구조인 pathogenic한 scrapie isoform의 prion protein(PcPSc)으로 변형되면서 뇌와 같은 신경 조직에 침착되어 동물에서 transmissible spongiform encephalopathy를 야기한다¹.

광우병에 대한 연구는 현재까지는 마우스에서 rodent models for prion diseases를 이용하여 많은 연구가 이루어지고 있다. 초기 1960-70년대에는 마우스와 햄스터에서 scrapie에 걸린 양의 뇌물질을 직접 넣어 해면상뇌증을 유도하는 conventional 방식으로 진행되다가 1982년² 광우병의 원인이 prion으로 밝혀진 이후로 3가지 형태의 형질전환 마우스 질환모델을 이용한 연구가 시작되었다. 첫 번째로 PrPc 발현 유전자인 PRNP(PRioN Protein) gene을 knockout(PRNP-KO)한 마우스를 이용한 연구가 시작되었다³⁻⁷. 현재까지 4가지 종류의 PrP-KO mouse가 보고되었으며⁸ 이 모든 연구에서 PrPc가 포유류의 세포의 발육과 기능에는 필요하지 않지만 prion의 replication과 해면상뇌증을 야기한다는 것을 증명하였다. 두 번째로 mutant PrP expression model 마우스를 이용한 많은 연구가 있었으며 특히 prion 단백질에 대해서 많은 정보를 얻게 되었다⁹. 세 번째는 매우 낮은 중간 prion의 전파율을 극복하기 위해 다른 종의 prion이 숙주동물에서 발현될 수 있는 형질전환 마우스가 생산되어 이용

되었다^{10,11}. 이 세가지 종류의 광우병 질환모델 마우스는 homologous recombination된 마우스 embryonic stem cells을 이용한 blastocyst injection 방법과 전핵 내 주입법(pronuclear microinjection)으로 생산되었다.

이렇게 실험동물인 마우스에서 광우병 질환모델 마우스를 이용한 많은 연구가 진행되고 있지만, 실제 동물의 고기를 섭취 시 사람에게 전파될 수 있어 소를 이용한 연구는 광우병에 걸린 소의 임상학적 검사 분야에서는 많은 결과가 발표되었지만 그 발병 기전에 대해서 연구할 수 있는 질환모델 소 생산 연구는 현재 매우 제한적이다. 현재까지 광우병 질환모델 소 생산은 미국과 일본 그룹의 협동으로 2007년 Richt 등¹²에 의해 homologous recombination 방법에 의한 PRNP knockout (PRNP^{-/-}) 방법으로 prion lacking 소 생산이 보고되었다. 그 연구 결과에 따르면, prion이 없는 소들은 20개월까지 성장하면서 임상학적, 생리학, 조직학적, 면역학적, 번식학적으로 분석한 결과 그 모든 측면에서 정상임이 보고되었다. 그리고 adeno-associated virus vectors¹³ 또는 small interfering RNA (siRNA)¹⁴을 이용하여 PRNP 유전자 발현이 억제된 소 체세포 생산까지 보고되었다. 그러나 최초의 광우병 질환모델 소의 경우 Fig. 1에서와 같이 이를 생산하기 위해 embryonic stem cell이 수립되지 못한 종 특성상 biallelic targeted gene knockout을 위해 체세포에서 gene targeting과 또 이를 이용한 복제된 태아의 fibroblast에서 sequential gene targeting이 이루어졌기 때문에 그 방법이 매우 복잡하며, 경비 및 시간이 많이 소요되고 무엇보다도 체세포에서 homologous recombination율이 너무 낮다는 단점이 있다. 그래서 이를 극복할 수 있는 다른 gene targeting 방법이 요구된다.

최종적으로 광우병 질환모델 동물 생산은 인간에게 문제를 일으킬 수 있고 최근 국내에서 사회적으로 큰 문제가 되었던 동물 종인 소에서 이루어져야 하며 특히 그 생산 효율을 획기적으로 높일 수 있는 방법이 필요한 실정이다.

제2절 연구개발의 목적

- ZFNs 시스템을 이용하여 광우병의 prion 발현 유전자인 PRNP knockout 소 배아를 생산하고, 생산된 배아에서 유전자의 발현이 제거되었음을 검증

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

1. 주관연구기관(제1세부) (PRNP KO 세포를 이용한 복제 배아 생산)

가. PRNP knockout 복제 배아 생산

(1) 우수 형질의 소 복제 배아 생산

(가) 우수 형질의 한우 및 젖소 세포주 확립

(나) 체세포 핵이식에 의한 복제 배아 생산

(다) 복제 배아 생산 효율을 높이기 위한 최적의 배양 조건 확립

(라) 대조군으로 체외수정 배반포 생산

(2) PRNP-KO 복제 배아 생산

(가) 제2세부연구기관에서 PRNP-KO 세포를 공여받아 체세포 핵이식 실시

(나) 배반포 생산 효율을 높이기 위한 최적의 배양 조건 확립

나. 수정란에서 PRNP 유전자 발현 검증

(1) 일반 배반포에서 유전자 분석 체계 확립

(가) 복제 및 체외수정(대조군) 배반포에서 genomic DNA 및 RNA 추출

(나) 배반포 단계에서 복제 및 체외수정 배반포에서 PRNP 유전자 발현 비교

(2) 배반포에서 PRNP-KO 확인

(가) 체외수정란과 PRNP-KO 복제 배반포에서 genomic DNA 및 RNA 추출

(나) 배반포 단계에서 복제 및 체외수정 배반포에서 PRNP KO 검증

다. PRNP-KO 복제 배아 대량 생산 체계 확립

(1) PRNP-KO 복제 배아 대량 생산 체계 확립

(가) PRNP-KO 복제 배아 생산을 위한 최적의 체세포 핵이식 조건 확립

(나) 생산효율을 높이기 위한 최적의 배양 조건 확립

(다) 향상된 생산효율로 PRNP-KO 복제 배아 대량 생산 체계 확립

2. 세부연구기관(제2세부) (ZFNs을 이용한 PRNP-KO 세포주 수립 및 ZFNs의 난자내 주입법 확립)

가. PRNP Knockout을 위한 우수 세포주 생산

(1) 한우 세포주 확립

(가) 혈통이 확보된 한우 태아 세포주를 확립

(나) 유전자 검사를 통하여 성별 판정 및 세포 proliferation assay

나. PRNP KO 세포주 개발

(1) 3세부 연구팀과 협동으로 PRNP KO 세포주 생산

다. PRNP KO 배아 생산을 위한 ZFNs injection 방법 확립

(1) ZFNs의 injection 방법 확립

(가) 활성화 자극 이전에 미세 주입과 활성화 자극 이후 미세주입 비교

- (나) 농도에 따른 ZFNs의 미세 주입 후 배아 발육 평가
- 라. 한 개의 배반포에서 PRNP KO을 검증하기 위한 세포 배양
 - (1) 한 개의 배반포에서 효율적으로 genomic DNA 와 RNA 추출하기 위한 배양 기법 확립

3. 세부연구기관(제3세부) (ZFNs을 이용한 knockout 시스템 개발 및 검증)

- 가. PRNP Knockout을 위한 다양한 쌍의 ZFNs 생산
 - (1) PRNP knockout genomic analysis
 - (가) 실험에 적용된 체세포의 genomic DNA를 추출하여 PRNP에 대한 ZFNs 평가
 - (나) 선별된 ZFNs의 생산 및 검증
 - (다) PRNP KO 검증 시스템 확립
- 나. 체세포에서 ZFNs의 검증
 - (1) 제2세부 과제와 협동으로 체세포에 ZFNs을 이용한 PRNP KO검증
 - (가) 유전자 도입 후 genomic DNA 수준의 평가
 - (나) KO을 효율 개선 방법 개발
 - (다) KO 세포 분리 기술 개발
- 다. PRNP knockout 세포주 완성 및 Knockin 세포주 수립
 - (1) 제 2세부 과제와 협동으로 PRNP knockout 및 knockin 세포주 완성
 - (가) KO 후 Knock-in시스템 개발
 - (나) 효과적 Knock-in 후 제 2세부과제와 협동으로 세포주 완성
 - (다) 완성된 세포주를 2세부과제와 협동으로 분석

IV. 연구개발 결과

1. PRNP 제거 세포를 위한 PRNP 시퀀싱 세포 확립

가. 한우 세포 확보 및 PRNP발현 조사 및 분석

(1) 한우의 태아세포는 임신된 자궁에서 분리하였고, 성체 세포는 흥천 한우 클러스터 사업단에서 검증된 ‘한우퀀’ 귀조직의 생검을 통하여 분리하였다. 그 이외에도 화성 목장과 장수군 한우 목장의 도움을 받아서 10여두의 한우 세포를 분리 배양하였다.

(2) 한우 세포에서 PRNP발현 조사 및 분석

(가) 한우의 세포에서 mRNA를 추출하여 cDNA를 만들어서 유전자 발현을 비교 분석하였다. 한우의 primary 세포의 경우 PRNP 발현이 개체에 따라 다를 수 있다는 점을 규명하였다.

나. PRNP제거를 위한 불멸화 세포 개발

- 체세포를 불멸화 상태로 만들기 위하여 BMI유전자 또는 TERT유전자를 발현시키는 아래 그림과 같은 DNA vector를 제작하였으며, 이들 DNA를 체세포 도입하여 한우의 불멸화를 유도하였다.
- BMI 또는 BMI와 TERT유전자의 발현을 통해 만들어진 불멸화 세포는 passage를 거치면서 senescency를 거치지 않고 지속적인 doubling time을 가지고 장기간 성장하였으며 또한 Single 세포 클로니의 형성 및 성장 속도가 크게 향상된 것으로 보여 불멸화가 성공적으로 수행되었음을 확인하였다.

2. PRNP 제거된 수정란 생산을 위한 최적의 미세 주입법 및 체세포 핵이식 조건 수립

가. 미세주입 확립

- PRNP KO 영양막세포 배양을 위한 초기 실험으로서, reporter DNA를 microinjection (미세 주입)을 수행하였다. 미세주입을 조건을 위하여 pcDNA3.1-mCherry-stop-sv40p-neomycinR-stop유전자를 이용하였으며 미세 주입을 실시한 후 배아는 단위 발생을 화학적 조건을 이용하여 유도하여 배양을 하고 유전자 발현을 검토하였다. 배양 후 7일째 형광 현미경 하에서 관찰한 결과 아래와 같이 RFP 유전자가 잘 발현되는 것을 관찰하였다.

나. 불멸화 세포를 이용한 복제 배반포 생산 효율 비교

- 대조군 세포와 2개의 불멸화 세포주(RAP, TERT)를 이용한 체세포 핵이식란의 발육율을 비교한 결과 분할율에서는 각 군간 유의적 차이는 없었으며 배반포 발육율에서는 TERT 군에서 유의적으로 높은 배반포로의 발육율(22.1, 22.0 vs. 28.4)을 보였다.

다. 공여핵원용 불멸화 세포주 종류에 따른 소 핵이식란의 발육 속도 비교

- 불멸화 세포주 종류에 따른 체세포 핵이식란의 발육 속도를 비교한 결과 TERT 세포주를 이용한 군에서 빠른 배반포 발육 속도를 보였다.

라. 공여핵원용 불멸화 세포주 종류에 따른 소 핵이식란의 내부세포피 비율 비교

- 체세포핵이식란의 질적 평가를 위한 지표로서 내부세포피수/영양막세포수를 비교한 결과 TERT 불멸화 세포를 이용한 배반포에서 상대적으로 좋은 지표를 보였다.

마. PRNP제거가 된 불멸화 세포를 이용한 복제 배반포 생산 및 효율 비교

- 불멸화 세포에서 PRNP가 제거된 세포 라인을 확립하고 확립된 세포별로 체세포 복제 실험을 한 결과는 아래와 같다.

3. Genome editing 기술을 이용한 PRNP 유전자 제거

가. ZFN제작 및 준비

(1) Cow PRNP ZFN 개발

- 확보된 ZFN/TALEN의 활성을 소 세포내에서 검증하기 위해 Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>)를 이용하여 primer를 고안하고 한우 세포의 genomic DNA에서 PRNP target site의 PCR 과정을 확립하였다. Gradient PCR을 통해 최적화된 PCR melting temperature를 결정하였다.

(2) ZFN 검증 및 개선

- ZFN 활성 검증은 리포터시스템을 이용하여 이루어 졌다. 툴젠의 리포터 시스템은 유전자가위의 활성에 따라 정량적으로 세포에서 형광단백질을 발현하여 유전자 가위의 활성을 조사하는 중요한 도구로 특히 리포터에서 관찰되는 활성은 세포내의 원하는 유전자 부위를 자르는 실제의 활성과 높은 상관관계를 보여 유전자가위의 대량생산을 위해 유용하게 사용되고 있다. 먼저 합성된 각 ZFN의 목적 서열을 포함하는 활성 리포터를 제작하고 293T 세포 내로 도입하여 형광 단백질의 발현을 측정하여 1차로 활성이 관찰되는 ZFN을 찾아내었다. 이후 ZFN의 FokI 부분을 활성 및 특이성이 개선된 형태의 nuclease variant (DAS/RR, RR/DAS)로 교체하여 다시한번 활성 조사를 진행하여 ZFN에 따라 더 높은 활성을 갖는 ZFN 구조를 확인하였다. 이를 통해 2 pair의 Cow PRNP ZFN을 확보하였다.

나. TALEN 제작 및 준비

(1) Cow PRNP TALEN 제작

- 2009년 새롭게 발견된 맞춤형 염기결합 도메인 구조인 TAL effector 염기결합 도메인의 모듈을 이용한 유전자가위인 TAL effector nucleases (TALEN)이 최근 크게 각광을 받고있다. 툴젠은 독립적 연구를 통해 자체의 TALEN 구조 및 생산 시스템을 구축하였으며 이를 이용한 PRNP TALEN 개발을 진행하였으 ZFN과 같은 과정으로 고안 및 합

성을 진행한 후 유전자가위 활성 리포터를 이용하여 활성을 조사하였으며 이를 통해 4 pair의 고효성 TALEN을 확보하였다.

(2) TALEN 리포터 제작 및 검증

- 세포 내에서 활성 확인된 PRNP TALEN의 인식서열을 합성하여 MACS reporter에 cloning하여 PRNP TALEN MACS reporter를 제작하고 sequencing으로 서열 검증하였다.

(3) TALEN 실험결과

- 총 12쌍의 TALEN pairs를 immortalization 세포에 prnp talen유전자 nucleofection을 실시한 후 제 2협동 연구팀에서 mutation assay를 실시하여 prnp ko할 수 있는 쌍을 선별하였으며 이중 가장 활성이 좋았던 TALEN을 선정하여 추후 KO 실험에 사용하였다.
- 유전자 KO 효과가 있는 pair에 대해서 enrichment 실험을 위하여 reporter를 제 2협동 연구팀에서 제작하였고, 이렇게 완성된 talen DNA를 maxi-prep을 통해서 많은 양의 DNA를 확보하였다.
- 확보된 DNA를 가지고 한우 태아 섬유아세포에 nucleofection을 실시하여, RFP/GFP발현을 확인하고, MACS sorting을 하여 유전자 변형 세포를 일차적으로 enrichment를 하였다.
- Enrichment 된 세포의 PRNP locus를 T7E1 assay를 이용하여 분석한 결과 mutation의 도입이 관찰되었으며 특히 MACS를 이용한 enrichment를 통해 돌연변이 도입 세포가 농축된 것을 확인할 수 있었다. 또한 해당 세포 pool의 PRNP locus에 대한 돌연변이 서열 분석을 통해 실제로 KO를 일으킬 수 있는 frameshift 돌연변이가 들어간 것을 보았다.
- KO clone을 얻기 위해 Enriched cell population에서 총 6개의 싱글세포 콜로니를 확보하고 돌연변이 분석을 진행한 결과 2개의 콜로니에서 mutation이 관찰되었다. 이 세포를 제 2협동 연구팀에서 mutation assay를 한 결과 prnp유전자에 mutation이 관찰되었고, mutation된 결과를 시퀀싱한 결과 2개의 콜로니에서 mutant형태가 관찰되었다.
- mutation assay를 한 후 남은 세포를 싱글세포 콜로니로 키워서 싱글 콜로니 유래의 세포를 확보하기 위하여 실험을 하였다. 총 6개의 콜로니를 확보하였고, 그 중에서 2개의 콜로니를 얻었고, 얻어진 콜로니 중 2개의 콜로니에서 mutation이 관찰되었다.
- 같은 과정으로 PRNP KO 세포주를 소 체세포 및 불멸화 체세포에서 제작하여 그 효율을 분석한 결과 불멸화 체세포가 DNA전달 효율 및 성장성이 좋은 이유로 전체 KO cell line 구축 과정에서의 효율이 소 체세포에 비해 높았다.

4. 불멸화 세포와 기본 세포에서 PRNP유전자 제거 효율 비교 테이블

가. PRNP-KO 확인

- 확보된 PRNP gene knockout 소 불멸화 체세포의 genotype을 확인하여 각 clone들이 가지고 있는 framefshift 돌연변이의 모양을 확인하였다.

나. 복제 배아에서 PRNP-KO확인

- 또한 확보된 PRNP KO 불멸화세포주의 복제 배반포를 제작 후 확보된 배반포의 PRNP locus 서열을 분석하였을 때 공여세포가 가지고 있는 PRNP 돌연변이가 그대로 관찰되어 PRNP 유전자 녹아웃 복제 배반포가 성공적으로 생산 되었음을 확인하였다.

다. mRNA 단계에서 복제 배아 PRNP-KO 확인

- PRNP KO 복제 배반포에서 PRNP 유전자의 mRNA 발현을 RT-PCR로 조사한 결과 몇몇 돌연변이 type에 따라서는 PRNP mRNA의 발현이 현저히 줄거나 사라진 것을 관찰할 수 있었다.

V. 연구개발결과의 활용계획

제1절. 추가연구의 필요성

1. 본 연구의 결과로 유전자 가위를 이용하여 특정 유전자인 프리온 단백질 발현 유전자인 PRNP 유전자가 제거된 세포주를 수립하였고 이를 공여핵원으로 하여 체세포 핵이식을 하여 생산된 복제 배아에서 PRNP 유전자가 제거된 것을 확인되어 본 연구는 목표인 PRNP 유전자 제거된 복제 배아를 생산하였음
2. 본 연구 과제의 성공적인 수행으로 복제 배아를 생산하였으나 복제 배아 단계에서는 그 활용 가치가 높지 않으며 단지 소에서 유전자 가위 효용성 검증했다는데 의의를 둘 수가 있음
 - 가. 유전자 가위가 소의 체세포에서 적용되어 그 효용 가능성이 입증됨
 - 나. 그리고 이 세포를 복제하였을 경우 복제 배아에서도 그 유전자가 제거되었음
3. 대리모에 이식하여 PRNP 유전자가 제거된 복제 송아지가 태어날 경우
 - 가. 국민들에게 광우병 내성소 생산 가능성에 대해 홍보 가능
 - 나. 광우병 예방에 대한 획기적 기반을 마련 가능
 - 다. 국내에서 최신 기법으로 광우병의 원인이 되는 prion knockout소를 개발하면, 이에 대한 안전성 연구에 과학적인 성과를 거둘 수 있음
 - 라. 관련 기술이 아직 진입단계이므로 다양한 대동물을 이용한 다양한 모델 동물을 생산할 수 있는 기술 및 특허를 취득하여 경제 산업적으로 도움 가능함
4. 이에 추가적으로 본 연구로 성공적으로 생산된 복제 배아에서 연구가 멈추는 게 아니라 이를 대리모에 이식하여 광우병 내성소 생산 연구가 필수적으로 수행되어야 함
 - 가. 소에서 대리모 이식은 실험실에서 하는 연구보다 그 비용이 훨씬 많이 들어가며 소의 경우 현실적으로 대리모를 구입할 수 없기 때문에 학교 농장 또는 일반 축산 농가에게 대리모 대여를 하여 함
 - 나. 대리모에 대량 생산된 광우병 내성 복제 배아를 이식하였을 경우 임신 기간 277일을 거친 후 광우병 내성소 생산이 가능하게 됨

제2절. 다른 연구에의 응용

1. 본 연구 결과가 성공하면, 생산된 형질 전환 소의 세포 또는 개체를 이용하여 prion의 안전성을 과학적으로 검증 할 수 있으며, 이 세포주 또는 개체가 완성되면, prion의 질병의 발병 및 치료에 대한 기초 자료가 될 수 있는 샘플을 확보하여, 다양한 기관들에게 샘플을 제공하여, 이 분야에 활발한 연구를 할 수 있을 것이다.
2. 기대성과

가. 기술적 측면

현재 많은 부분에서 유전자 변형, 특히 knockout에 대한 기술이 HR을 이용하여 적용되고 있지만, 소와 같은 대형동물에서는 그 연구의 한계로 제한적이었다. ZFNs을 이용한 본 연구의 성공은 대형동물에서 목적에 맞는 유전자 변형 동물을 좀 더 효과적으로 생산할 수 있다는 장점이 있다. 나아가 다른 유전자 및 동물에도 ZFNs을 적용할 수 있으므로 대형동물 형질 전환 동물을 통한 새로운 장을 열수 있다.

나. 경제-산업적 측면

본 연구의 성공은 광우병 예방에 대한 획기적 기반을 마련할 수 있다. PRNP-KO 세포주 및 배반포가 수립되면 이를 이용하여 핵이식을 실시 PRNP-KO 소를 생산하고자 한다. 일단 국내에서 최신 기법으로 광우병의 원인이 되는 prion knockout소를 개발하면, 이에 대한 안전성 연구에 과학적인 성과를 거둘 수 있다. 나아가 관련 기술이 아직 진입단계이므로 다양한 대동물을 이용한 다양한 모델 동물을 생산할 수 있는 기술 및 특허를 취득하여 경제 산업적으로 도움이 될 수 있다.

제3절. 기업화 추진방안

1. 유전자 가위를 이용한 넉아웃 동물 생산 기업 수립

가. 현재 소와 돼지에서 유전자 가위를 이용한 넉아웃 및 넉인이 된 형질전환 동물 생산 보고가 미국 및 일본 등 생명공학 선진국에서 많이 이루어지고 있으며 특히 그동안 이 분야 후진국으로 분류되었던 중국에서 천문학적인 연구비와 인적 자원 투여로 그 생산 보고가 우리나라 보다 훨씬 빠르게 이루어지고 있음

나. 본 연구가 성공적으로 이루어져 산업동물에서 유전자 가위의 적용 가능성을 보았으며 생산된 복제 배아를 대리모에 이식하여 광우병 내성소가 태어났을 경우 기업화를 추진하여 소나 돼지에서 원하는 유전자가 제거된 동물을 생산한다.

2. 기술 이전

가. 기업화가 어려울 경우 본 유전자 가위 기술을 우수 생명공학 회사에 전수하여 그 산업적 가치를 창출하고자 함

5. 영문 요약서

SUMMARY

Due to the decline in the livestock industry in Korea, a research was financed by a grant from the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, “Generation of PRNP knockout embryos using zinc finger nucleases and verification of its knockout” . The mission was to This research was performed to generate the PRNP knockout embryos using zinc finger nucleases and verify the its knockout. within a project duration date of 3 years.

1. Establishment of the of HanWoo cell lines for PRNP sequencing to remove the PRNP gene
 - 1) Significant differences in the expression of PRNP gene was confirmed after comparing of transcripts in the RT-PCR of PRNP.
 - 2) Establishment of bovine immortalized cell lines for PRNP-KO.
2. Intracytoplasmic injection and somatic cell nuclear transfer to produce the bovine PRNP-KO embryos.
 - 1) Establishment of optimal methods for intracytoplasmic injection of PRNP genetic scissor.
 - 2) Investigation of the most efficient immortalized cell lines in bovine somatic cell nuclear transfer
3. Removal of PRNP gene using genome editing
 - 1) Development of efficient ZFNs systems for PRNP-KO
 - 2) Development of efficient TALENs systems for PRNP-KO
4. Verification of PRNP-KO in the cloned bovine embryos
 - 1) Production of cloned embryos using PRNP-KO cells
 - 2) Confirmation of PRNP-KO in the cloned bovine embryos

We performed this Our research findings show possibility of production of PRNP-KO cows by genetic scissors (ZFNs and TALENs) and somatic cell nuclear transfer and its application into development of the livestock industry is possible. Our research can be applied to other biotechnology and medical field including with production of cloned pig for xenotransplantation.

6. 영문 목차

CONTENTS

Chapter I- Overview of Research projects -----	16
Chapter II - Current research activities in domestic or foreign countries -----	21
Chapter III - Research activities and Results -----	24
Chapter IV - Achievements and Contribution to related era -----	50
Chapter V - Research outcomes and applications -----	52
Chapter VI - Scientific informations in the middle of research projects -----	56
Chapter VII - Current state of research facilities and equipments -----	60
Chapter VIII - References -----	61

7. 목 차

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 -----	16
제 2 장	국내외 기술개발 현황 -----	21
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 -----	24
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	50
제 5 장	연구개발결과의 활용계획 -----	52
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	56
제 7 장	연구시설·장비 현황 -----	60
제 8 장	참고문헌 -----	61

목 차

제1장 연구개발과제의 개요

제1절 연구 개발의 필요성

최근 조류독감 (AI; avian influenza), 구제역 (FMD; foot and mouth disease), 광우병 (BSE; bovine spongiform encephalopathy) 등 가축 전염병으로 인하여 전 세계적으로 막대한 피해가 발생하고 있으며 현재 우리나라 역시 이로 인하여 많은 피해가 발생하고 있다. 최근 구제역으로 인한 국가 피해액은 2조원을 넘었다는 보고가 있다. 그리고 2008년 광우병의 발생국가 (미국)로부터 소고기 수입 협상에 대한 결과는 우리나라에 사회적으로 큰 파장을 야기하였다. 그 이유는 광우병 소고기 섭취로 인해 인간에게 발생할 수 있는 치명적인 질병, variants Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) 때문이다. 오른쪽 표 1은 국가별로 2007년까지 보고된 소해면상뇌증(BSE) 및 vCJD 발병에 대한 통계이다 (<http://www.wikipedia.org>). 영국을 포함한 유럽 일부 국가에서 광우병에 걸린 소에서 유래한 변형된 prion 감염으로 variants vCJD라는 질병으로 인해 죽는 환자가 발생하여, 인수 공통 전염성 질병의 무서움을 다시 한 번 경고하였다. 하지만 현재까지 국내에서 PrP-BSE 및 PrP-vCJD에 대한 발생 보고는 없었다. 광우병의 원인이 되는 prion은 단백질성 감염성 입자(Proteinaceous Infectious Protein)로서, 정상 cellular prion protein (PrPc)이 amyloid folding을 해서 비정상적인 단백질 구조인 pathogenic한 scrapie isoform의 prion protein(PcPSc)으로 변형되면서 뇌와 같은 신경 조직에 침착되어 동물에서 transmissible spongiform encephalopathy를 야기한다¹.

광우병에 대한 연구는 현재까지는 마우스에서 rodent models for prion diseases를 이용하여 많은 연구가 이루어지고 있다. 초기 1960-70년대에는 마우스와 햄스터에서 scrapie에 걸린 양의 뇌물질을 직접 넣어 해면상뇌증을 유도하는 conventional 방식으로 진행되다가 1982년² 광우병의 원인이 prion으로 밝혀진 이후로 3가지 형태의 형질전환 마우스 질환모델을 이용한 연구가 시작되었다. 첫 번째로 PrPc 발현 유전자인 PRNP(PRioN Protein) gene을 knockout(PRNP-KO)한 마우스를 이용한 연구가 시작되었다³⁻⁷. 현재까지 4가지 종류의 PrP-KO mouse가 보고되었으며⁸ 이 모든 연구에서 PrPc가 포유류의 세포의 발육과 기능에는 필요하지 않지만 prion의 replication과 해면상뇌증을 야기한다는 것을 증명하였다. 두 번째로 mutant PrP expression model 마우스를 이용한 많은 연구가 있었으며 특히 prion 단백질에 대해서 많은 정보를 얻게 되었다⁹. 세 번째는 매우 낮은 중간 prion의 전파율을 극복하기 위해 다른 종의 prion이 숙주동물에서 발현될 수 있는 형질전환 마우스가 생산되어 이용되었다^{10,11}. 이 세가지 종류의 광우병 질환모델 마우스는 homologous recombination된 마우스 embryonic stem cells을 이용한 blastocyst injection 방법과 전핵 내 주입법(pronuclear microinjection)으로 생산되었다.

이렇게 실험동물인 마우스에서 광우병 질환모델 마우스를 이용한 많은 연구가 진행되고 있지

만, 실제 동물의 고기를 섭취 시 사람에게 전파될 수 있어 소를 이용한 연구는 광우병에 걸린 소의 임상학적 검사 분야에서는 많은 결과가 발표되었지만 그 발병 기전에 대해서 연구할 수 있는 질환모델 소 생산 연구는 현재 매우 제한적이다. 현재까지 광우병 질환모델 소 생산은 미국과 일본 그룹의 협동으로 2007년 Richt 등¹²에 의해 homologous recombination 방법에 의한 PRNP knockout (PRNP^{-/-}) 방법으로 prion lacking 소 생산이 보고되었다. 그 연구 결과에 따르면, prion이 없는 소들은 20개월까지 성장하면서 임상학적, 생리학적, 조직학적, 면역학적, 변식학적으로 분석한 결과 그 모든 측면에서 정상임이 보고되었다. 그리고 adeno-associated virus vectors¹³ 또는 small interfering RNA (siRNA)¹⁴을 이용하여 PRNP 유전자 발현이 억제된 소 체세포 생산까지 보고되었다. 그러나 최초의 광우병 질환모델 소의 경우 Fig. 1에서와 같이 이를 생산하기 위해 embryonic stem cell이 수립되지 못한 종 특성상 biallelic targeted gene knockout을 위해 체세포에서 gene targeting과 또 이를 이용한 복제된 태아의 fibroblast에서 sequential gene targeting이 이루어졌기 때문에 그 방법이 매우 복잡하며, 경비 및 시간이 많이 소요되고 무엇보다도 체세포에서 homologous recombination율이 너무 낮다는 단점이 있다. 그래서 이를 극복할 수 있는 다른 gene targeting 방법이 요구된다.

최종적으로 광우병 질환모델 동물 생산은 인간에게 문제를 일으킬 수 있고 최근 국내에서 사회적으로 큰 문제가 되었던 동물 종인 소에서 이루어져야 하며 특히 그 생산 효율을 획기적으로 높일 수 있는 방법이 필요한 실정이다.

제2절 연구 개발의 최종 목표

ZFNs 시스템을 이용하여 광우병의 prion 발현 유전자인 PRNP knockout 소 배아를 생산하고, 생산된 배아에서 유전자의 발현이 제거되었음을 검증

제3절 연구 개발의 범위

신청하고자 하는 본 연구 개발의 주 내용은 기존의 광우병 내성소 생산을 위하여 수행된 gene targeting방법의 많은 단점을 극복할 수 있는 최신 유전자 절단 기술인 zinc finger nucleases(ZFNs)을 이용하여 인간에게 전염되어 치명적인 뇌질환을 야기할 수 있는 prion 발현 유전자인 PRNP를 녹아웃하는 최신 연구 방법의 응용 및 적용이라고 할 수 있다.

최근 생명공학 분야에서 새로운 gene targeting 방법으로 이용되고 있는 ZFNs는 특정 염기서열을 갖는 DNA에 특이적으로 결합하는 zinc finger array 부분과 DNA의 절단을 일으킬 수 있는 nuclease 부분을 결합하여 만들어지는 인공제한효소이다 (Fig 2).

ZFNs은 유전체의 정해진 목표 locus를 절단하도록 고안될 수 있어서 지금까지는 자유로운 유전체 engineering이 불가능 하였던 다양한 동물 모델 시스템에서 효율적으로 유전자를 knockin 및 knockout을 가능하게 해주는 획기적인 기술로 최근 크게 각광을 받고 있다²⁵. 원하는 유전

자를 인식하도록 고안된 ZFNs이 세포에서 발현되면 매우 특이적으로 target 유전자의 DNA를 절단하여 이중가닥손상 (Double strand break)을 유발한다. 세포에서 이중가닥손상이 발생하면 세포는 자체적으로 가지고 있는 수리 기작을 이용하여 손상된 부위를 고치게 된다 (Fig 2). 이때 손상된 부분과 유사한 DNA 서열을 가진 DNA(donor DNA)를 세포 내에 도입해 주면 세포는 이를 주형으로 사용하여 손상된 염색체 부분을 수리하는 homologous recombination방법을 이용한다. 동시에 donor DNA에 우리가 원하는 염기서열을 넣어주면 유전체 상의 특정 부위에 원하는 대로 조작이 가능하게 되며 donor DNA가 없을 경우에도 세포는 non-homologous end joining(NHEJ) 방식으로 손상된 부위를 고치게 된다. NHEJ는 끊어진 DNA 가닥을 바로 접합시켜서 원상태로 수리할 수도 있지만, 끊어진 DNA 가닥 말단에서 작은 insertion이나 deletion (indel)이 일어나는 error-prone한 방향으로 수리가 진행될 수도 있다. 따라서 ZFNs을 이용하여 특정 유전자의 염기서열 부분에 이중가닥손상을 일으켜 NHEJ를 유도하면 원하는 유전자에 돌연변이를 일으키고 knockout 세포주를 수립할 수 있다.

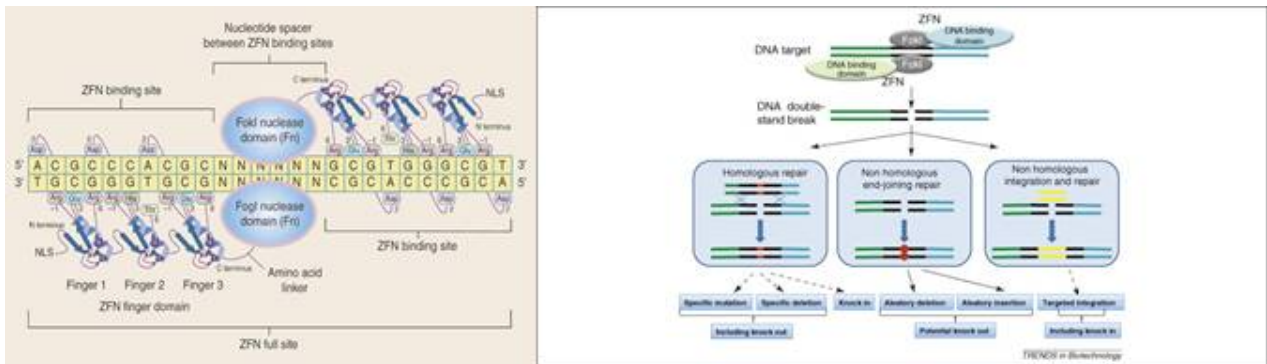


그림 1 Zinc finger nucleases homodimer binding to DNA²⁷ and Potential genome manipulation using zinc finger nucleases²⁵

특히 NHEJ를 이용하는 유전자 knockout의 방식은 다양한 세포 및 동물 배아에서 1% ~ 20%의 높은 효율로 ZFNs target site에 indel을 유도하기 때문에 drug selection marker등을 이용한 추가적인 과정이 필요 없이 knockout cell을 빠르게 분리 하는 것이 가능하다는 장점이 있다.

ZFNs을 개발하는데 있어서 가장 핵심적인 기술은 zinc finger domain을 조합하여 원하는 염기서열을 특이적으로 인식할 수 있게 하는 zinc finger engineering 기술이다. 제3세부 연구팀인 툴젠은 2003년에 인간 유전체에서 다양한 염기서열을 인식하는 zinc finger들을 확보하고 이를 조합하여 원하는 염기서열에 결합하는 designed zinc finger DNA binding domain을 구축하는 기술을 개발하여 발표하였다^{28,28}. 그리고 zinc finger engineering 기술을 ZFNs 제작에 사용할 수 있는 제반 시스템을 구축하고 이를 이용해 AIDS 치료를 위해 중요하게 연구되고 있는 인간 CCR5 유전자를 targeting하는 ZFNs을 개발하여 발표한 바 있다^{30,31}. 특히 최근에는 ZFNs의 대량 생산 및 검증 시스템을 완성하고³² 이를 이용하여 세계 연구자들에게 ZFNs 개발 서비스를 시작해 지난 10개월간 세계 6개국 30여 연구실에 ZFNs을 공급해왔다.

ZFNs을 이용해 목적 유전자 녹아웃 동물을 생산하기 위한 접근법으로는 크게 두가지가 있다. 첫 번째는 인공수정란에 직접 ZFNs을 주입하는 방법인데 이때 ZFNs은 mRNA의 형태로 전달하는 경우가 많다. ZFNs인 주입된 인공수정란에서 태어나는 개체는 높은 확률로 목적 유전자에 돌연변이를 가지고 있다 (Table 1). 특히 각 개체에서 높은 효율의 mosaicism (목적유전자의 wild-type과 mutant의 비율)을 보이기 때문에 추가적인 교배를 통해 쉽게 목적유전자 녹아웃을 얻을 수 있다. 인공수정란의 ZFNs 주입은 zebrafish, drosophila, mouse 그리고 rat등의 다양한 실험동물에서 효율적으로 사용된다.

그림 2 ZFNs-mediated Thmpd3 disruption in mouse embryos.

Conc. of mRNA Injected [cytosol# or (ng/μl)]	No. of PN stage embryos examined	No. of survived zygotes (%)	No. of 2-cell stage embryos*	No. of 8-cell/morulla stage embryos*	No. of blastocyst stage embryos*	No. of mutant embryos/outgrowth embryos (%)
Control (0)	22	22 (100)	22 (100)	22 (100)	21 (95.4)	-
Thumpd3# (10)	69	63 (91.3)	60 (95.2)	55 (87.3)	46 (73.0)	30/38 (78.9)

Natural fertile pronuclear-stage embryos (FVB strain) were injected with the Rosa26 specific ZFN mRNAs and incubated.

* Based on numbers of zygotes that survived;

Cytosolic injection of Thumpd3 specific ZFN mRNA

두 번째로는 체세포에서 ZFNs을 이용하여 목적 유전자의 녹아웃을 유도하고 이를 핵이식에 이용하여 유전자 녹아웃 동물을 생산하는 것이다. 배양 세포에 ZFNs을 발현시키면 짧은 시간 (보통 2~3일)내에 높은 효율로 목적 유전자에 돌연변이가 일어나게 된다. 이때 돌연변이는 NHEJ에 의해 자연적으로 생산되는 small indel이고 그 효율은 ZFNs에 따라 1%~20%로 다양하게 나타난다 (Fig 3). 중요한 것은 목적유전자의 한 allele에서 돌연변이가 발생하였을 경우 다른 allele에도 돌연변이가 일어나서 homozygous mutation이 일어날 확률이 상대적으로 높기 때문에 많은 경우 목적 유전자에 돌연변이가 일어난 세포 중 10~30%는 homozygous 녹아웃 상태인 것으로 관찰되고 있다.

이에 본 연구는 광우병 내성소를 생산하기 위해 Fig 4에서와 같이 소 체세포에서 ZFNs을 이용하여 광우병의 원인이 되는 prion 발현 유전자인 PRNP이 knockout된 체세포 주를 수립하고 이를 이용하여 체세포 핵이식을 실시 배반포 단계에서 PRNP 유전자가 knockout 됐음을 증명하고자 한다. 본 신청 연구가 성공적으로 수행되어 PRNP-KO 체세포 핵이식란 생산 체계가 확립되면 이를 수란우에 이식하여 최종적으로 광우병 내성소를 생산연구에 적용하고자 한다.

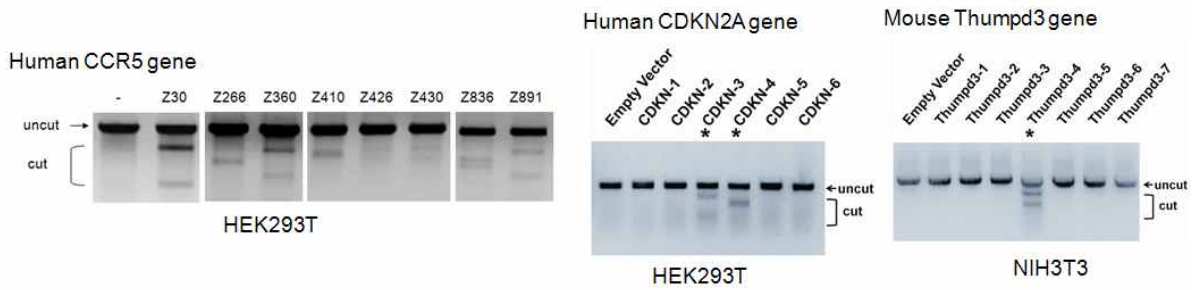


그림 3 Targeted mutagenesis using ZFNs in cultured cells. Genomic DNA isolated from cultured cells transfected with ZFNs expression plasmids were analyzed for target gene mutation using a mismatch-sensitive nuclease assay. If the DNA amplicons contain both wild-type and mutated DNA sequences, heteroduplexes would be formed. T7E1 recognizes and cleaves heteroduplexes, but not homoduplexes.

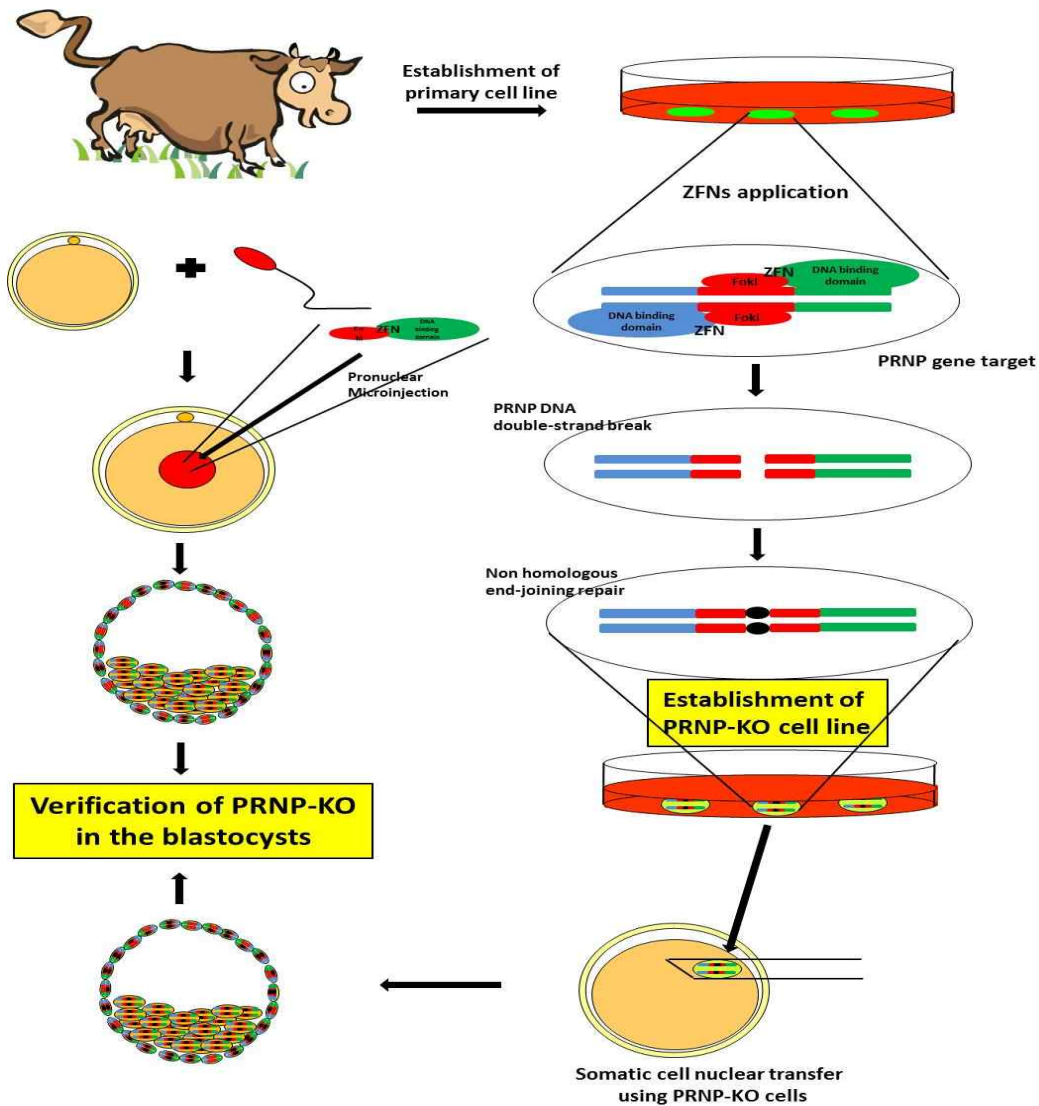


그림 4 Production of PRNP-KO bovine blastocysts by SCNT and pronuclear microinjection

제2장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내 연구 개발의 필요성

1. 국내 관련 연구 현황

가. 서울대 연구팀에서 1996년부터 2004년까지 최초로 광우병 감염우 역학 조사 실시하여 8,677 samples에서 광우병 음성으로 판정됨¹⁵

나. 정 등에 의해 한국 소에서 PRNP 유전자의 genotype 분포 연구가 이루어짐¹⁶

다. 2004년 mutant prion을 발현하는 광우병 소 생산

2. 국내 연구 개발의 필요성

가. 우리나라 국민 정서에는 예로부터 먹을거리, 특히 축산 식품에 대한 안정성을 중요시 하였으며, 광우병이라는 치명적 질병에 대해서 사회적으로 불안한 잠재 요소로 작용하고 있으며, 그 예로, 최근 미국산 소고기 수입할 때 많은 국민들이 촛불 시위에 참여할 정도로 전염성 질병에 관심이 크며 광우병을 극복하기 힘든 질병으로 인식하고 있다. 이에 광우병 내성소를 생산하여 광우병은 인간이 극복할 수 있으며 국민들에게도 소고기에 대한 막연한 불안감을 해소시킬 필요가 있다.

나. PRNP 유전자가 녹아웃된 광우병 내성소를 생산하기 위해서는 수정란 유래 줄기세포가 없는 동물 종인 소의 특성상 체세포에 직접 gene targeting을 실시하여 이를 핵이 제거된 난자에 이식하는 체세포 핵이식 방법을 이용해야 한다.

그러나 앞서 언급한 바와 같이 기존의 연구에서 소 체세포에서 gene targeting 방법은 극히 낮은 효율과 소요되는 시간 및 경비 측면에서 많은 단점들이 있어 이를 극복할 수 있는 다른 방법이 요구된다.

다. 이에 본 신청자는 현재 국외에서 많이 적용되고 있는 Zinc Finger Nucleases(ZFNs) 기술을 응용하여 기존의 유전자 제거 방법보다 좀 더 효과적으로 소 체세포에서 PRNP 유전자를 제거하고자 한다. 이 기술은 현재까지 많은 부분에서 응용되고 있으며 최근 생명공학 분야에 적용되어 형질전환 동물 생산보고가 국외에서 많이 이루어지고 있다. 실험동물인 rat와 마우스에서 ZFNs를 이용한 knockout 동물 생산이 보고되었으며¹⁷⁻¹⁹ 산업동물에서는 2010년 돼지에서 외인성 유전자인 GFP가 knockout 된 세포주²⁰와 올해 2011년에는 이를 이용한 복제 돼지²¹가 생산 보고되었다. 그리고 줄기세포에서도 적용되어 인간의 수정란유래²²⁻²⁴ 및 유도만능^{22,24} 줄기세포에 적용되어 생명공학 분야에서 ZFNs의 효용성은 점점 높아지고 있다. ZFNs의 가장 큰 장점은 1) 수정란유래 줄기세포뿐만 아니라 체세포에 적용 가능하며 2) 높은 gene targeting

효율이다. 보통 마우스에서 knockout 마우스를 만들기 위해 수정란유래 줄기세포에 gene targeting을 하였을 경우 $10^{-6} \sim 10^{-9}$ 의 효율로 homologous recombination이 일어난다고 알려져 있지만²⁵ Santiago 등²⁶의 연구에서는 줄기세포가 아닌 체세포인 Chinese hamster ovary (CHO) cells에서 1% 이상의 biallelic gene disruption이 보고되었다. 이 ZFNs 기술을 광우병 내성소 생산에 적용 시 Fig. 1과 표2에서와 같이 기존의 방법에서는 매우 낮은 확률의 2번의 homologous recombination과 2번의 복제 과정을 거쳐서 광우병 내성소를 생산하였지만 이 기술로는 아주 쉽게 1% 이상의 확률로 PRNP-KO 세포주를 수립할 수 있고 이를 이용하여 광우병 내성소를 생산할 수 있다. 이는 수정란유래 줄기세포가 수립되지 않고 번식주기가 상대적으로 긴 동물종인 소에서 질환모델 동물 생산을 위한 매우 획기적인 방법이라 할 수 있다.

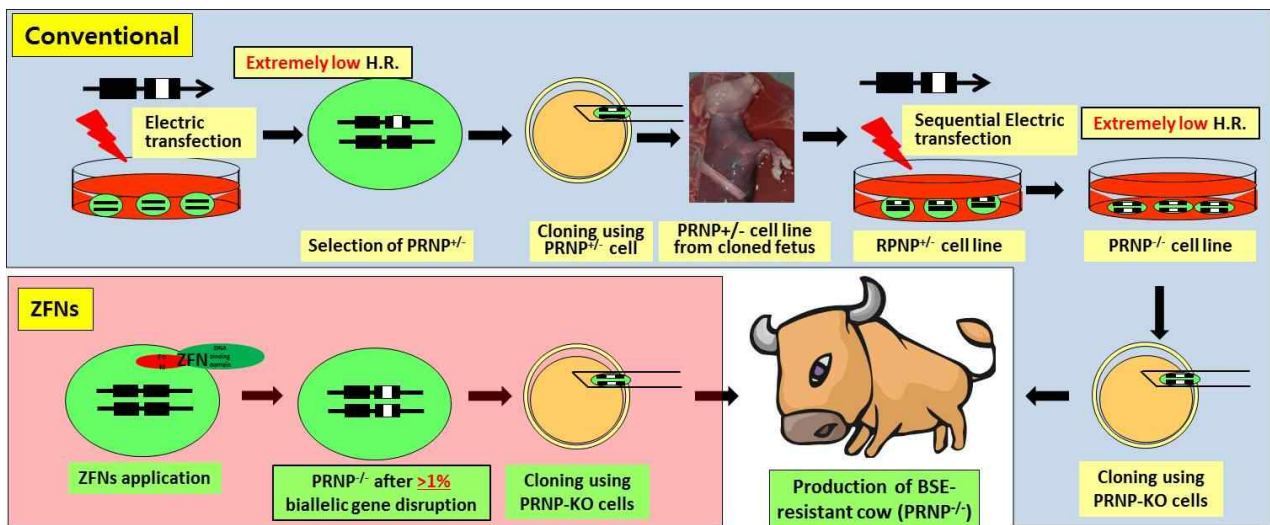


그림 5 Comparison of conventional and ZFNs-mediated methods to produce BSE-resistant cow

표2. 광우병 내성소 생산 방법 비교(기존의 방법 vs. ZFNs를 이용한 방법)

	기존의 생산 방법 ¹²	ZFNs 이용한 생산 방법
Homozygous PRNP KO	필요횟수: 2회 확률: 매우 낮음	필요횟수: 1회 확률: 상대적으로 높음(>1%)
필요한 복제 과정 횟수	2회	1회
외부유전자 도입 여부	2개의 항생제 내성 유전자	없음
연구 수행 경비 및 시간	많은 시간과 경비 요구	시간과 경비 단축 가능

- 라. 국외에서 앞서 언급한 바와 같이 ZFNs이 생명공학 분야에 적용되어 많은 연구 보고가 있지만 국내에서는 아직까지는 연구 초기 단계라고 할 수 있다. 국내에서 ZFNs의 적용은 서울대학교 김진수 교수팀과 본 연구신청의 제 3세부 연구팀인 (주)ToolGen 등 몇몇 연구기관에서 인간 세포수준에서 그 연구를 수행하고 있으며 ZFNs을 이용한 형질전환 동물 생산 보고는 없는 실정이며 세포 수준에서 벗어나 동물 및 사람의 적용 연구에 해당하는 in vivo 관련 연구는 늦은 상태이다.
- 마. 본 연구 신청의 제1세부 연구팀인 충남대학교 수의과대학은 그 동안 수행된 bioreactor로서 형질전환 소 생산 연구 경험으로 ZFNs에 의한 PRNP-KO 세포주를 이용하여 체세포 핵이식을 실시하여 그 생산 효율을 높일 수 있으며 제2세부 연구팀인 서울대학교 수의과대학은 오랜 기간 동안 동물의 전염병과 관련하여, 전염병학, 병리학, 미생물학, 면역학 등 관련 전문가들이 연구를 수행해 왔으며, 특히 기존의 생명공학 분야에서 정부지원 다른 연구과제를 수행하고 있어 형질 전환 동물 생산에 대한 연구 인프라가 충분히 확보된 상태이다.
- 바. 형질 전환 가축 생산 기반을 위한 기술로 ZFNs을 적용하면 PNRP 유전자를 knockout 하여 좀 더 효과적으로 prion 발현을 억제할 수 있으며 이를 이용한 knockout 동물 생산 및 이 생산된 동물을 이용하여 사람의 CJD의 연구에 기초가 될 수 있으리라 사료된다. 생산된 형질 전환 동물의 안전성 등을 추가적으로 확인하여 식품 안전성에 크게 기여할 수 있는 모델이 될 수 있을 것이다.

제3장 연구개발 수행 내용 및 결과

제1절 연구기관 별 연구 개발 내용

1. 주관연구기관(제1세부) (PRNP KO 세포를 이용한 복제 배아 생산)

가. PRNP knockout 복제 배아 생산

(1) 우수 형질의 소 복제 배아 생산

(가) 우수 형질의 한우 및 젃소 세포주 확립

(나) 체세포 핵이식에 의한 복제 배아 생산

(다) 복제 배아 생산 효율을 높이기 위한 최적의 배양 조건 확립

(라) 대조군으로 체외수정 배반포 생산

(2) PRNP-KO 복제 배아 생산

(가) 제2세부연구기관에서 PRNP-KO 세포를 공여받아 체세포 핵이식 실시

(나) 배반포 생산 효율을 높이기 위한 최적의 배양 조건 확립

나. 수정란에서 PRNP 유전자 발현 검증

(1) 일반 배반포에서 유전자 분석 체계 확립

(가) 복제 및 체외수정(대조군) 배반포에서 genomic DNA 및 RNA 추출

(나) 배반포 단계에서 복제 및 체외수정 배반포에서 PRNP 유전자 발현 비교

(2) 배반포에서 PRNP-KO 확인

(가) 체외수정란과 PRNP-KO 복제 배반포에서 genomic DNA 및 RNA 추출

(나) 배반포 단계에서 복제 및 체외수정 배반포에서 PRNP KO 검증

다. PRNP-KO 복제 배아 대량 생산 체계 확립

(1) PRNP-KO 복제 배아 대량 생산 체계 확립

(가) PRNP-KO 복제 배아 생산을 위한 최적의 체세포 핵이식 조건 확립

(나) 생산효율을 높이기 위한 최적의 배양 조건 확립

(다) 향상된 생산효율로 PRNP-KO 복제 배아 대량 생산 체계 확립

2. 세부연구기관(제2세부) (ZFNs을 이용한 PRNP-KO 세포주 수립 및 ZFNs의 난자내 주입법 확립)

가. PRNP Knockout을 위한 우수 세포주 생산

(1) 한우 세포주 확립

(가) 혈통이 확보된 한우 태아 세포주를 확립

(나) 유전자 검사를 통하여 성별 판정 및 세포 proliferation assay

나. PRNP KO 세포주 개발

(1) 3세부 연구팀과 협동으로 PRNP KO 세포주 생산

다. PRNP KO 배아 생산을 위한 ZFNs injection 방법 확립

(1) ZFNs의 injection 방법 확립

(가) 활성화 자극 이전에 미세 주입과 활성화 자극 이후 미세주입 비교

(나) 농도에 따른 ZFNs의 미세 주입 후 배아 발육 평가

라. 한 개의 배반포에서 PRNP KO을 검증하기 위한 세포 배양

(1) 한 개의 배반포에서 효율적으로 genomic DNA 와 RNA 추출하기 위한 배양 기법 확립

3. 세부연구기관(제3세부) (ZFNs을 이용한 knockout 시스템 개발 및 검증)

가. PRNP Knockout을 위한 다양한 쌍의 ZFNs 생산

(1) PRNP knockout genomic analysis

(가) 실험에 적용된 체세포의 genomic DNA를 추출하여 PRNP에 대한 ZFNs 평가

(나) 선별된 ZFNs의 생산 및 검증

(다) PRNP KO 검증 시스템 확립

나. 체세포에서 ZFNs의 검증

(1) 제2세부 과제와 협동으로 체세포에 ZFNs을 이용한 PRNP KO검증

(가) 유전자 도입 후 genomic DNA 수준의 평가

(나) KO을 효율 개선 방법 개발

(다) KO 세포 분리 기술 개발

다. PRNP knockout 세포주 완성 및 Knockin 세포주 수립

(1) 제 2세부 과제와 협동으로 PRNP knockout 및 knockin 세포주 완성

(가) KO 후 Knock-in시스템 개발

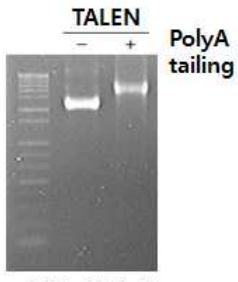
(나) 효과적인 Knock-in 후 제 2세부과제와 협동으로 세포주 완성

(다) 완성된 세포주를 2세부과제와 협동으로 분석

제2절 실험적 접근 방법 및 내용

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
한우 세포 분리	프라이머리 세포 분리	1.Primary culture 1) PRNP 제거를 위해서 한우의 세포 분리를 위하여 한우 목장에 방문하여 혈통 등록이 되어 있는 한우 조직을 무균적으로 생검 기구를 이용하여 분리하였다. 2) 분리한 조직을 멸균된 수술용 칼을 이용하여 잘게 자르고 단백질 분해 효소에서 15시간 이상 배양을 하고, 배양된 조직을 배양 접시에 넣고 약 일주일간 배양을 하고 자라게 된 세포는 액체질소에 보관하였다.
소 불멸화 세포	불멸화 세포주 수립	1.불멸화세포 제작

<p>포주 수립</p>		<p>1) 체세포에 유전자 transposon-BMI-2A-RFP 유전자가 들어가있는 DNA lug을 nucleofection을 통하여 transfection을 실시한 후 RFP를 발현하는 세포를 mechanically 분리한다. 이렇게 분리된 BMI-RFP 세포에 hTERT-Neomycin 유전자를 재 transfection을 실시하였다. 이후 neomycin이 선별을 하여 살아남은 세포를 분리하여 동결하였다.</p> <p>2) 불멸화 세포 분열 능력</p> <p>BMI-2A-RFP 세포와 BMI/hTERT 세포를 1×10^5로 seeding을 한 후 매 24시간 마다 세포수를 측정하여 세포 수가 doubling 되는 시간을 측정하였다.</p>
<p>불멸화 세포주 종류에 따른 핵 이식란의 발육을 비교</p>	<p>공여핵원용 불멸화 세포주 종류에 따른 핵 이식란의 발육을 비교</p>	<p>1. 체세포 핵이식</p> <p>1) 수핵난자 준비</p> <ul style="list-style-type: none"> - 도축장 유래 난소를 실험실에 운반 주사기로 난포를 흡입하여 난자를 선별 - 선별된 난자를 체외배양기에 18시간 배양하여 체외성숙 유도 - Hyaluronidase로 난구세포 제거한 후 제1극체가 돌출되어 있는 성숙 난자 선별하여 체세포 핵이식에 공여 <p>2) 공여핵원용 세포 준비</p> <ul style="list-style-type: none"> - 서울우유협동조합의 고능력 젖소의 귀섬유아세포를 대조군으로 하고 이에 RAP 유전자와 TERT 유전자가 도입된 불멸화 세포주를 공여핵원으로 함 - 실험 2일 전에 계대배양한 후 trypsin으로 cell suspension을 유도하여 체세포 핵이식에 공여 <p>3) 체세포 핵이식</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hoechst 염색을 한 후 UV light하에서 핵의 위치를 확인한 후 제1극체와 함께 제거하여 탈핵을 실시 - 기 수립된 대조군 및 2개의 불멸화 세포주를 탈핵된 난자의 주란강내에 도입 - 각 세포군당 30개씩 총 90개의 난자에서 실시

		<ul style="list-style-type: none"> - 전기적 충격(1.75kV/cm)으로 세포와 난자의 융합 유도 - 4시간 동안 체외배양하여 reprogramming을 유도 - Ionomycin으로 activation 유도 - 6-DMAP으로 4시간동안 post-activation 유도 - 체외 배양기에서 8일 동안 배양 <p>4) 분할율과 배반포로의 발육율 비교</p> <ul style="list-style-type: none"> - 체세포 핵이식 실시 2일 후 실체현미경하에서 분할율 비교 - 체세포 핵이식 실시 8일 후 각군간 배반포로의 발육율 비교
	공여핵원용 불멸화 세포주 종류에 따른 소핵이식란의 발육 속도 비교	<p>1) 핵이식란의 발육 속도 비교</p> <ul style="list-style-type: none"> - 앞서 수행된 실험에서 배반포로의 발육속도를 비교하기 위해 3가지 세포군에서 발육 6일, 7일, 8일에 배반포 발육 비교함
	공여핵원용 불멸화 세포주 종류에 따른 소핵이식란의 내부세포괴 비율 비교	<p>1) 핵이식 배반포의 질적 평가를 위한 내부세포괴/영양막세포 비율 비교</p>
PRNP-KO 용 TALENs mRNA 직접 주입	PRNP-KO TALENs mRNA 제작	<ul style="list-style-type: none"> - 확보된 TALEN 발현 vector를 PvuII를 이용하여 linearize 후 T7 polymerase를 이용하여 mRNA를 합성 (mMESSAGE mMACHINE® T7 Kit, Lifetechnologies) - 합성된 Capped mRNA에 polyA tailing을 통해 세포내 mRNA 형태와 유사한 형태로 구성 <div style="text-align: center;">  <p>TALEN mRNA 합성 예</p> </div>
	PRNP-KO TALENs	- 합성된 PRNP-KO용 TALENs mRNA를 20ng/ul군과 50

	<p>mRNA 농도에 따른 주입</p> <p>PRNP-KO TALENs mRNA 주입 시기에 따른 KO 비교</p>	<p>ng/ul 균으로 나누어서 소 체외수정란에 주입하여 PRNP-KO을 유도</p> <p>- 합성된 PRNP-KO용 TALENs mRNA를 수정 후 16시간, 20시간 및 24시간 후로 구분하여 체외수정란에 주입</p>																														
<p>- PRNP KO 세포주 개발</p>	<p>소 PRNP TALEN의 고안 및 합성</p>	<p>PRNP sequence에서 TALEN target site를 찾아 TALEN 합성을 준비하였다. TALEN target site는 T로 시작하여 A로 끝나는 48~52 base pair로 이루어진다.</p> <table border="1" data-bbox="678 750 1417 936"> <thead> <tr> <th>No</th> <th>Sequence Length</th> <th>Pattern</th> <th>TALEN1 Length</th> <th>Spacer Length</th> <th>TALEN2 Length</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>52</td> <td>T CTTTATTTTGCAGATAAGT CATCATGGTGAA AAGCCACATAGGCAGITGG A</td> <td>20</td> <td>12</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>51</td> <td>T CATGGTGAAAAGCCACATA GGCAGITGGATC CTGTTCTCTTTTGGCC A</td> <td>20</td> <td>12</td> <td>19</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>51</td> <td>T GAAAAGCCACATAGGCAGT TGSATCCTGGTIT CTCITTTGGCCATGTGG A</td> <td>20</td> <td>12</td> <td>19</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>53</td> <td>T GGATCCTGGTTCCTTTGT GGCCATGTGGAGT GACGTGGGCCCTGTGCAAGA A</td> <td>20</td> <td>13</td> <td>20</td> </tr> </tbody> </table> <p>도출된 TALEN 후보들을 golden gate TALEN 합성 system을 이용하여 제작하였다.</p> <p>그림 8 Golden Gate TALEN assembly 방법.</p>	No	Sequence Length	Pattern	TALEN1 Length	Spacer Length	TALEN2 Length	1	52	T CTTTATTTTGCAGATAAGT CATCATGGTGAA AAGCCACATAGGCAGITGG A	20	12	20	2	51	T CATGGTGAAAAGCCACATA GGCAGITGGATC CTGTTCTCTTTTGGCC A	20	12	19	3	51	T GAAAAGCCACATAGGCAGT TGSATCCTGGTIT CTCITTTGGCCATGTGG A	20	12	19	4	53	T GGATCCTGGTTCCTTTGT GGCCATGTGGAGT GACGTGGGCCCTGTGCAAGA A	20	13	20
No	Sequence Length	Pattern	TALEN1 Length	Spacer Length	TALEN2 Length																											
1	52	T CTTTATTTTGCAGATAAGT CATCATGGTGAA AAGCCACATAGGCAGITGG A	20	12	20																											
2	51	T CATGGTGAAAAGCCACATA GGCAGITGGATC CTGTTCTCTTTTGGCC A	20	12	19																											
3	51	T GAAAAGCCACATAGGCAGT TGSATCCTGGTIT CTCITTTGGCCATGTGG A	20	12	19																											
4	53	T GGATCCTGGTTCCTTTGT GGCCATGTGGAGT GACGTGGGCCCTGTGCAAGA A	20	13	20																											
<p>- PRNP KO 세포주 개발</p>	<p>PCR 조건 확립</p>	<p>- Primer List</p> <table border="1" data-bbox="689 1675 1369 1854"> <thead> <tr> <th></th> <th>Primer name</th> <th>Sequence</th> <th>Size</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">1st PCR</td> <td>Cow_PRNP_N_F2</td> <td>AGGCTCATTCCCTGCTTACAT</td> <td rowspan="2">973</td> </tr> <tr> <td>Cow_PRNP_N_R2</td> <td>ATGCTTCATGTTGGTTTTTGG</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">2nd PCR</td> <td>Cow_PRNP_N_F1</td> <td>GCAATGTTGCTGGCATTCTA</td> <td rowspan="2">619</td> </tr> <tr> <td>Cow_PRNP_N_R1</td> <td>TGGCTTACTGGGTTTGTCC</td> </tr> </tbody> </table> <p>- PCR condition</p>		Primer name	Sequence	Size	1 st PCR	Cow_PRNP_N_F2	AGGCTCATTCCCTGCTTACAT	973	Cow_PRNP_N_R2	ATGCTTCATGTTGGTTTTTGG	2 nd PCR	Cow_PRNP_N_F1	GCAATGTTGCTGGCATTCTA	619	Cow_PRNP_N_R1	TGGCTTACTGGGTTTGTCC														
	Primer name	Sequence	Size																													
1 st PCR	Cow_PRNP_N_F2	AGGCTCATTCCCTGCTTACAT	973																													
	Cow_PRNP_N_R2	ATGCTTCATGTTGGTTTTTGG																														
2 nd PCR	Cow_PRNP_N_F1	GCAATGTTGCTGGCATTCTA	619																													
	Cow_PRNP_N_R1	TGGCTTACTGGGTTTGTCC																														

		<p>1st PCR</p> <table border="0"> <tr><td>gDNA</td><td>100ng</td><td>95 °C 4:00</td></tr> <tr><td>Primer F2</td><td>10pmol</td><td rowspan="4">} 20cycle</td></tr> <tr><td>Primer R2</td><td>10pmol</td><td>95 °C 0:30</td></tr> <tr><td>10x Taq. Buf.</td><td>2ul</td><td>68 °C 1:00</td></tr> <tr><td>Hipi plus Taq.</td><td>0.2ul</td><td>68 °C 1:00</td></tr> <tr><td>dNTP</td><td>0.4ul</td><td rowspan="2">} 20cycle</td></tr> <tr><td>D.W</td><td>to 20ul</td><td>68 °C 10:00</td></tr> </table> <p>2nd PCR</p> <table border="0"> <tr><td>1st PCR product</td><td>0.5ul</td><td>95 °C 4:00</td></tr> <tr><td>Primer F1</td><td>10pmol</td><td rowspan="4">} 30cycle</td></tr> <tr><td>Primer R1</td><td>10pmol</td><td>95 °C 0:30</td></tr> <tr><td>10x Taq. Buf.</td><td>2ul</td><td>68 °C 1:00</td></tr> <tr><td>Hipi plus Taq.</td><td>0.2ul</td><td>68 °C 1:00</td></tr> <tr><td>dNTP</td><td>0.4ul</td><td rowspan="2">} 30cycle</td></tr> <tr><td>D.W</td><td>to 20ul</td><td>68 °C 10:00</td></tr> </table>	gDNA	100ng	95 °C 4:00	Primer F2	10pmol	} 20cycle	Primer R2	10pmol	95 °C 0:30	10x Taq. Buf.	2ul	68 °C 1:00	Hipi plus Taq.	0.2ul	68 °C 1:00	dNTP	0.4ul	} 20cycle	D.W	to 20ul	68 °C 10:00	1 st PCR product	0.5ul	95 °C 4:00	Primer F1	10pmol	} 30cycle	Primer R1	10pmol	95 °C 0:30	10x Taq. Buf.	2ul	68 °C 1:00	Hipi plus Taq.	0.2ul	68 °C 1:00	dNTP	0.4ul	} 30cycle	D.W	to 20ul	68 °C 10:00
gDNA	100ng	95 °C 4:00																																										
Primer F2	10pmol	} 20cycle																																										
Primer R2	10pmol		95 °C 0:30																																									
10x Taq. Buf.	2ul		68 °C 1:00																																									
Hipi plus Taq.	0.2ul		68 °C 1:00																																									
dNTP	0.4ul	} 20cycle																																										
D.W	to 20ul		68 °C 10:00																																									
1 st PCR product	0.5ul	95 °C 4:00																																										
Primer F1	10pmol	} 30cycle																																										
Primer R1	10pmol		95 °C 0:30																																									
10x Taq. Buf.	2ul		68 °C 1:00																																									
Hipi plus Taq.	0.2ul		68 °C 1:00																																									
dNTP	0.4ul	} 30cycle																																										
D.W	to 20ul		68 °C 10:00																																									
- PRNP KO 세포주 개발	TALEN 활성검증	<p>- Genomic DNA preparation (G-DEX genomic DNA kit, Intronbio)</p> <p>- PCR of PRNP locus</p> <p>- Induction of heteroduplex formation</p> <p>95 °C 4:00 95 °C to 85 °C -2 °C/s 85 °C to 25 °C -0.1 °C/s</p> <p>- T7E1 assay</p> <table border="0"> <tr><td>PCR</td><td>3+7ul</td></tr> <tr><td>10x NEB buf. 2</td><td>2ul</td></tr> <tr><td>T7E1</td><td>0.2ul</td></tr> <tr><td>D.W</td><td>to 20ul</td></tr> </table> <p>→ incubate at 37°C for 20min.</p> <p>그림 13 유전자가위에 의한 유전체상 목적위치 돌연변이 도입 효율 검증 실험법</p>	PCR	3+7ul	10x NEB buf. 2	2ul	T7E1	0.2ul	D.W	to 20ul																																		
PCR	3+7ul																																											
10x NEB buf. 2	2ul																																											
T7E1	0.2ul																																											
D.W	to 20ul																																											
PRNP knockout cell line 제작	PRNP knockout cell clone 확인 법	<ol style="list-style-type: none"> 1. PRNP TALEN을 소 세포 및 불멸화 소 세포에 electroporation (neon, Lifetech)을 통해 전달 2. 3일 후 10cm dish에 적절한 양의 세포를 분주. 3. 2~4주 간 지켜보면서 하나의 세포에서 증폭된 세포 colony를 확인하고 분리하여 독립적인 세포주로 배양 																																										

		<p>4. 각 colony에서 유래된 세포주들의 genomic DNA를 분리 후 T7E1 assay를 통해 mutant cell clone을 확보</p> <p>5. mutant clone의 genomic DNA에서 증폭된 PRNP target locus를 TA-cloning 및 Sanger sequencing을 통해 서열 분석하여 mutation의 모양을 확인하고 frameshift 돌연변이를 동정</p>
--	--	--

제3절 연구결과

1. PRNP가 제거 및 Sequencing을 위한 한우 세포주 수립

가. 한우 세포 확보 및 PRNP발현 조사 및 분석

(1) 한우의 태아세포는 임신된 자궁에서 분리하였고, 성체 세포는 홍천 한우 클러스터 사업단에서 검증된 ‘한우퀸’ 귀조직의 생검을 통하여 분리하였다. 그 이외에도 화성 목장과 장수군 한우 목장의 도움을 받아서 10여두의 한우 세포를 분리 배양하였다. 그림은 홍천 한우퀸의 생검 모습이다.



그림 14 한우 생검 사진

아래 그림은 생검된 한우 조직으로부터 분리되어 자라고 있는 한우 세포의 사진이다. 세포의 성별 판정을 위하여 Colcemid를 이용하여 배양중인 세포를 metaphase로 유도하였고, 유도된 세포를 hypotonic KCL solution을 이용하여 세포를 팽창시킨후 고정액으로 세 번의 세정을 통하여 세포내 염색체를 고정시킨 후 약 100cm위에서 세포를 슬라이드 글라스에 떨어뜨려 염색체를 조사하였다.

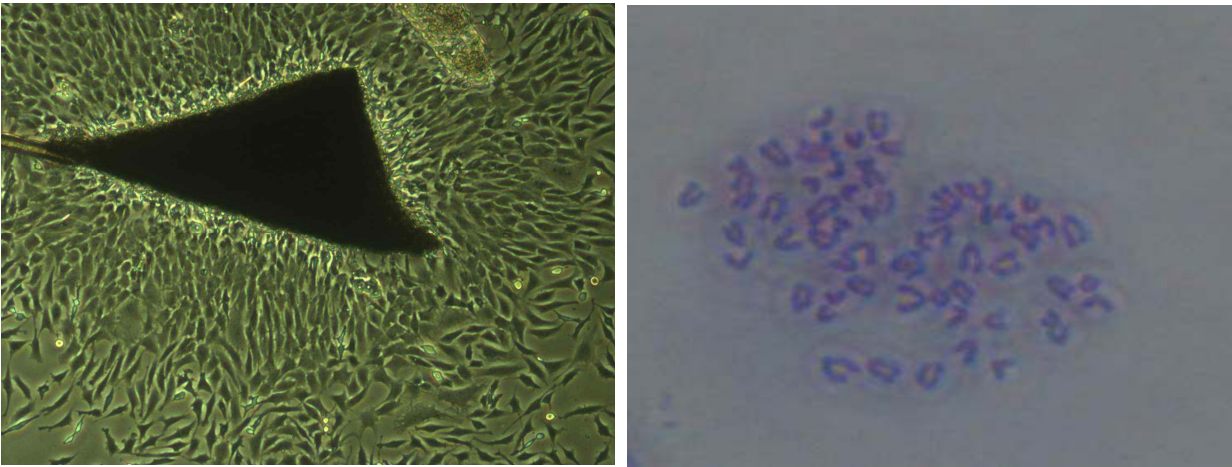


그림 15 조직으로부터 자라나오는 한우 세포와 세포의 성별을 위한 Karyotyping 사진 (XX)

(2)한우 세포에서 PRPN발현 조사 및 분석

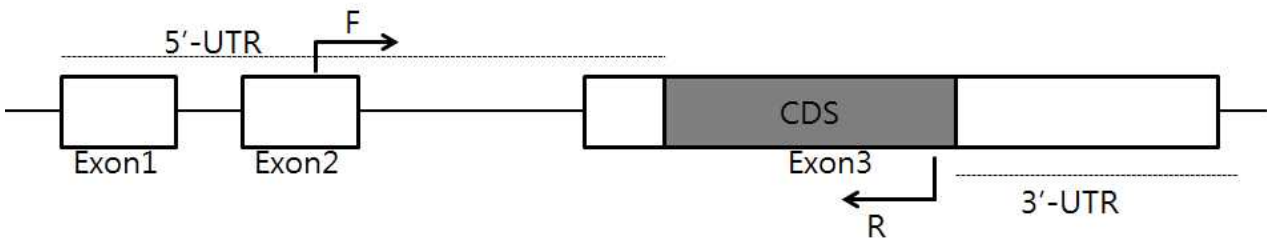


그림 16 PRPN유전자의 Exons

기 발표된 연구결과에 의하면 소의 fibroblasts에서 mRNA가 발현된다는 보고가 있어 (Wang et al., Mol Biol Rep, 2009), 한우의 세포에서 mRNA를 추출하여 cDNA를 만들어서 유전자 발현을 비교 분석하였다. 위의 그림처럼 Forward primer는 exon2에 reverse primer exon3번에 의하여 PCR을 아래와 같은 조건으로 수행하였다.

- PCR for PRNP
 - Primers
 - F (5'→3') : AAATCCAAGTGGAGCTGAATC
 - R (5'→3') : GGTTGCCCTATCCTACTATG
 - PCR reaction
 - Initial denaturation : 94°C for 5 min
 - Denaturation : 94°C for 30 sec
 - Annealing : 58°C for 30 sec
 - Extension : 72°C for 50 sec
 - Final Extension : 72°C for 10 min

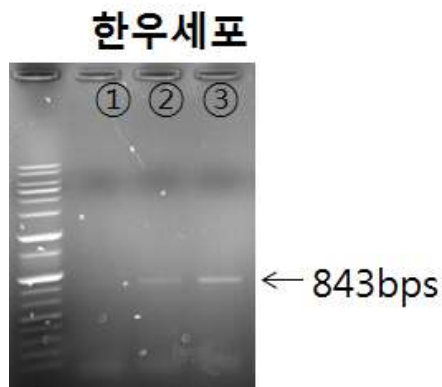


그림 17 Prion expression detection을 위한 PCR 조건 및 gel picture

위의 그림처럼 3가지의 다른 개체 유래의 한우 세포에서 추출한 mRNA를 cDNA로 합성한 결과, 1번 한우에서는 PRNP유전자가 발현 되지 않았지만 2/3번에서는 서로 다른 수준으로 발현

이 관찰되었다. 2/3번의 한우 Sample에서 RT-PCR을 통해 관찰된 DNA band가 PRNP임을 확인하기 위해 PCR product의 서열을 분석하였으며 이를 통해 알려진 소의 PRNP유전자와 일치함을 확인하였다. 이는 한우의 primary 세포의 경우 PRNP 발현이 개체에 따라 다를 수 있다는 점을 보여준다.

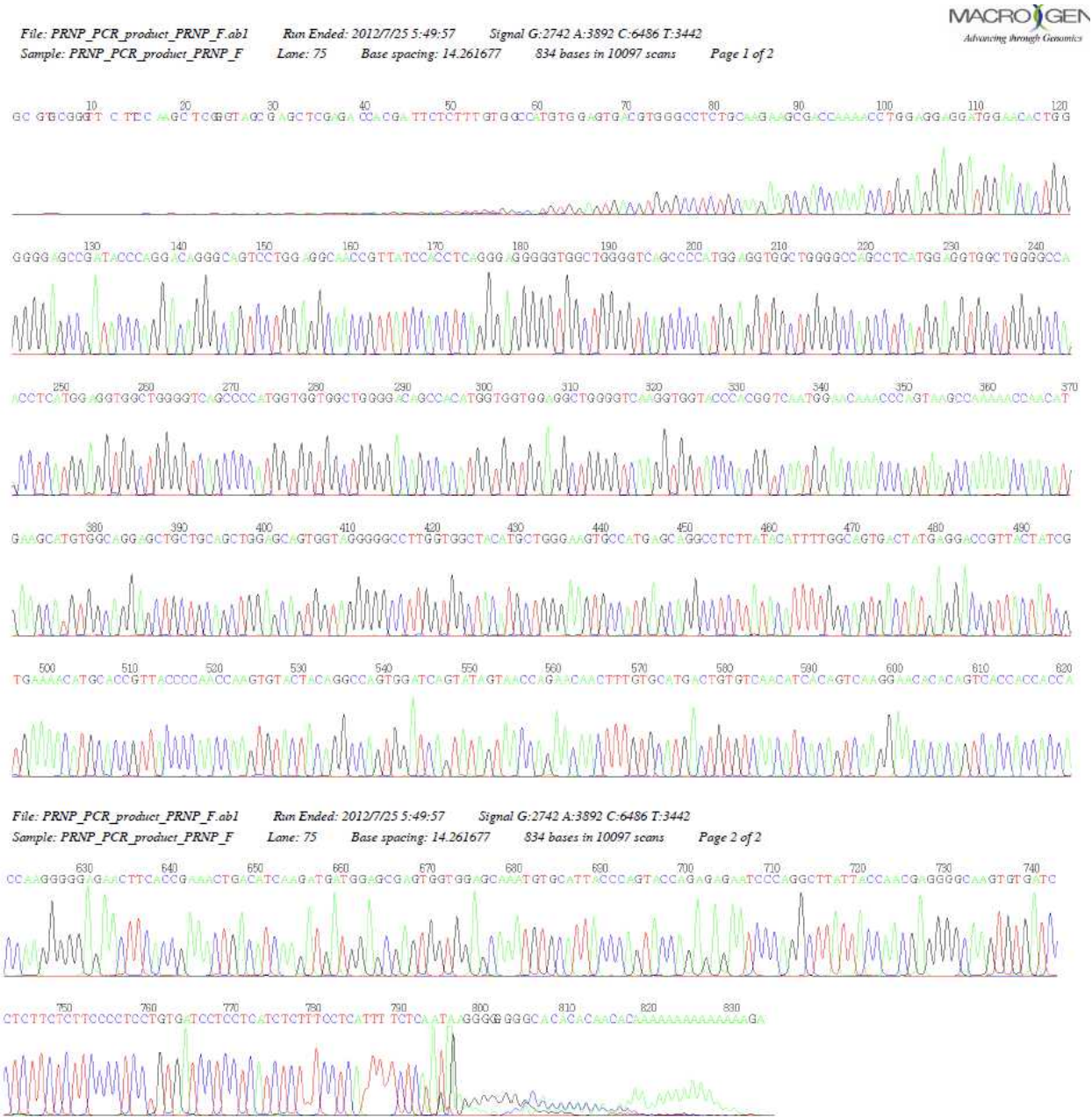


그림 18 RT-PCR을 통해 증폭된 PRNP 유전자 부위의 sequencing 결과

나. PRNP제거를 위한 불멸화 세포 개발

체세포를 불멸화 상태로 만들기 위하여 BMI유전자 또는 TERT유전자를 발현시키는 아래 그림과 같은 DNA vector를 제작하였으며, 이들 DNA를 체세포 도입하여 한우의 불멸화를 유도하였

다.

A



B



그림 19 불멸화 세포에 이용한 유전자 모식도. (A)BMI를 발현하는 DNA, (B) hTERT를 발현하는 DNA

BMI 또는 BMI와 TERT유전자의 발현을 통해 만들어진 불멸화 세포는 passage를 거치면서 senescency를 거치지 않고 지속적인 doubling time을 가지고 장기간 성장하였으며 또한 Single 세포 콜로니의 형성 및 성장 속도가 크게 향상된 것으로 보여 불멸화가 성공적으로 수행되었음을 확인하였다.

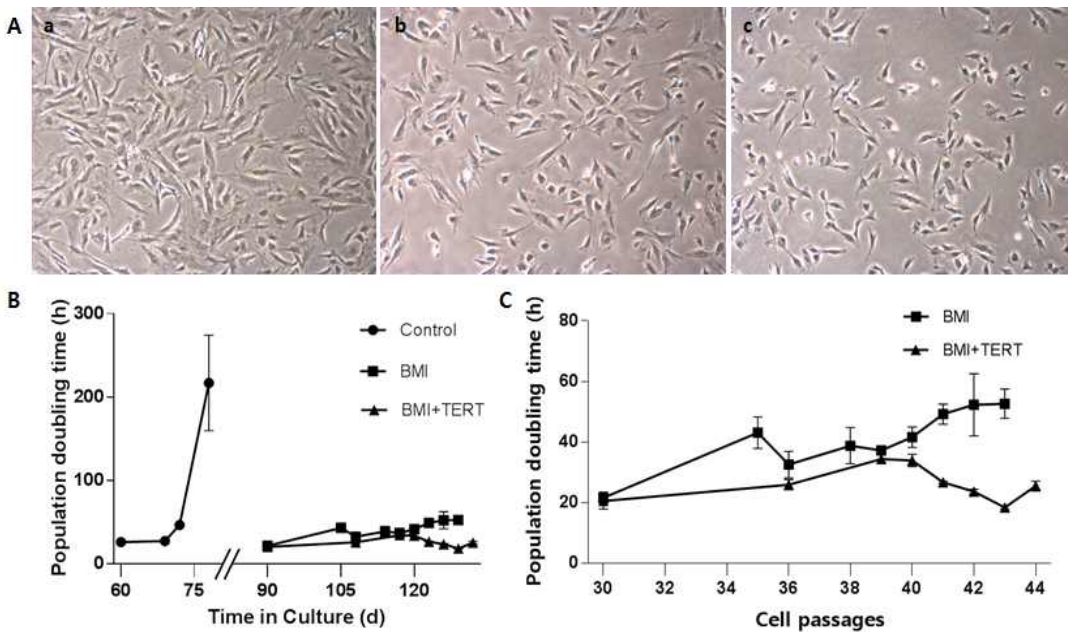


그림 20 세포 불멸화 세포들의 불멸화 사진 (A, a: 대조군, b: BMI, c: BMI-TERT), 불멸화 세포의 성장곡서 (B), 불멸화 세포들간의 성장곡선 (C).

2. PRNP 제거된 수정란 생산을 위한 최적의 미세 주입법 및 체세포 핵이식 조건 수립

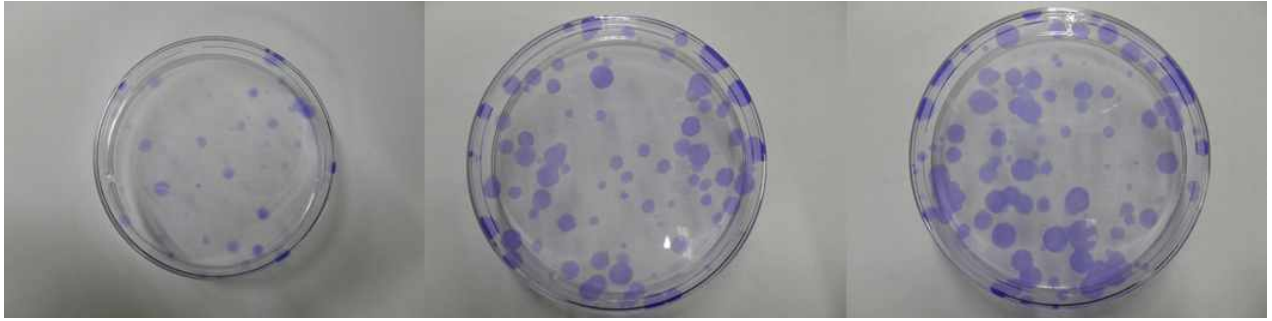


그림 21 BMI/hTERT을 이용하여 세포불멸화의 싱글 세포 유래의 콜로니 생성능력 염색 사진.
 왼쪽(대조군 세포), 중간(BMI), 오른쪽(BMI/TERT)
 가. 난자 세포질 내 최적의 미세주입법 확립

PRPN KO 영양막세포 배양을 위한 초기 실험으로서, reporter DNA를 microinjection (미세주입)을 수행하였다. 미세주입을 조건을 위하여 pcDNA3.1-mCherry-stop- sv40p-neomycinR-stop 유전자를 이용하였다.

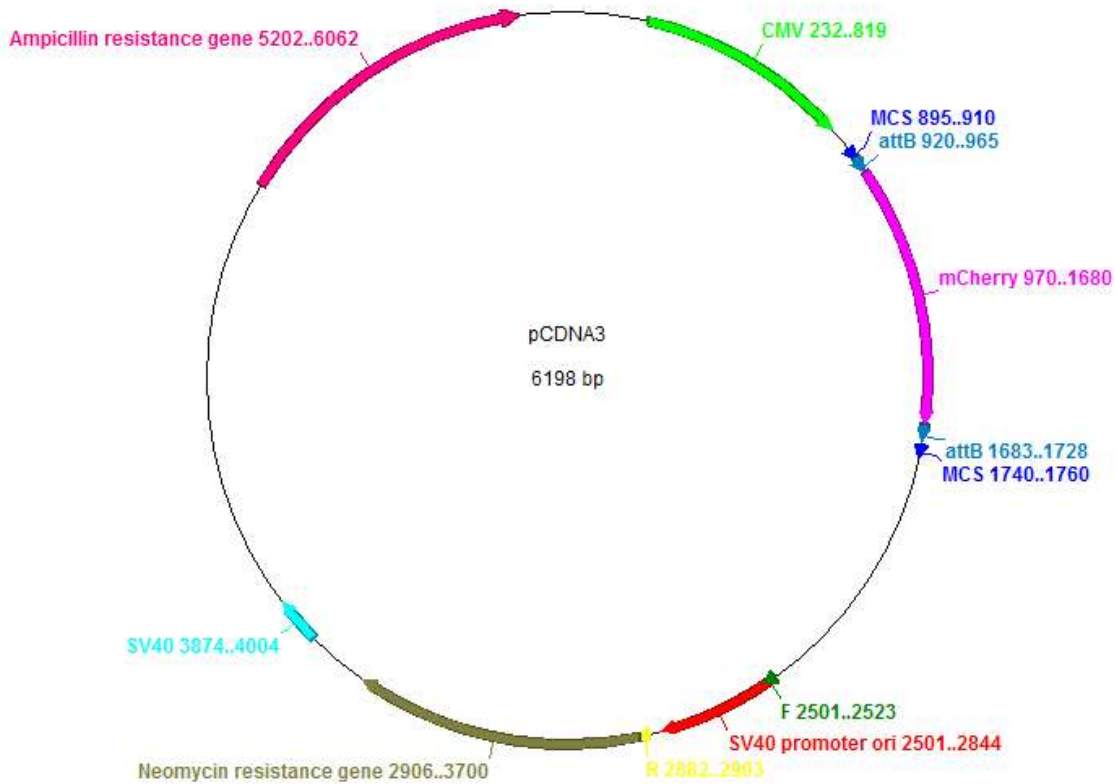


그림 22 미세주입 조건을 위해 사용된 pcDNA3.1-mCherry vector map

아래 그림은 미세주입을 실시하고 있는 사진이다.

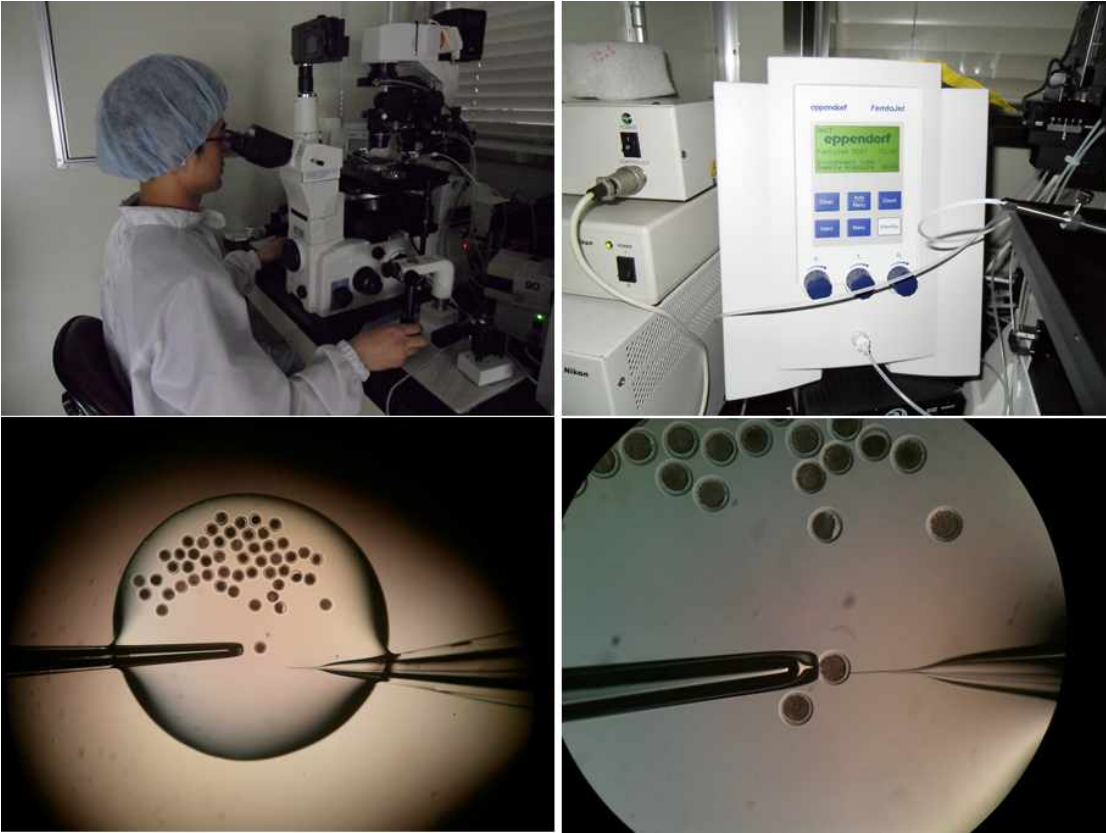


그림 23 소 수정란에 미세주입하고 있는 모습

미세 주입을 실시한 후 배아는 단위 발생을 화학적 조건을 이용하여 유도하여 배양을 하고 유전자 발현을 검토하였다. 배양 후 7일째 형광 현미경 하에서 관찰한 결과 아래와 같이 RFP 유전자가 잘 발현되는 것을 관찰하였다.

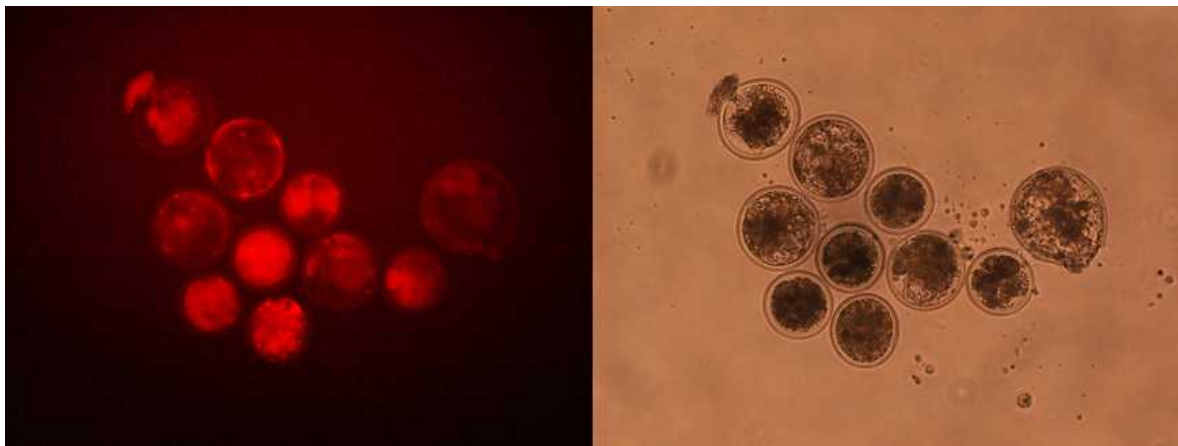


그림 24 형광DNA를 미세주입후 발현하는 배아사진. 왼쪽(형광), 오른쪽(brightness)

나. 불멸화 세포를 이용한 복제 배반포 생산 효율 비교

- 대조군 세포와 2개의 불멸화 세포주(RAP, TERT)를 이용한 체세포 핵이식란의 발육율을 비교한 결과 분할율에서는 각 군간 유의적 차이는 없었으며 배반포 발육율에서는 TERT 군에서 유의적으로 높은 배반포로의 발육율(22.1, 22.0 vs. 28.4)을 보였다.

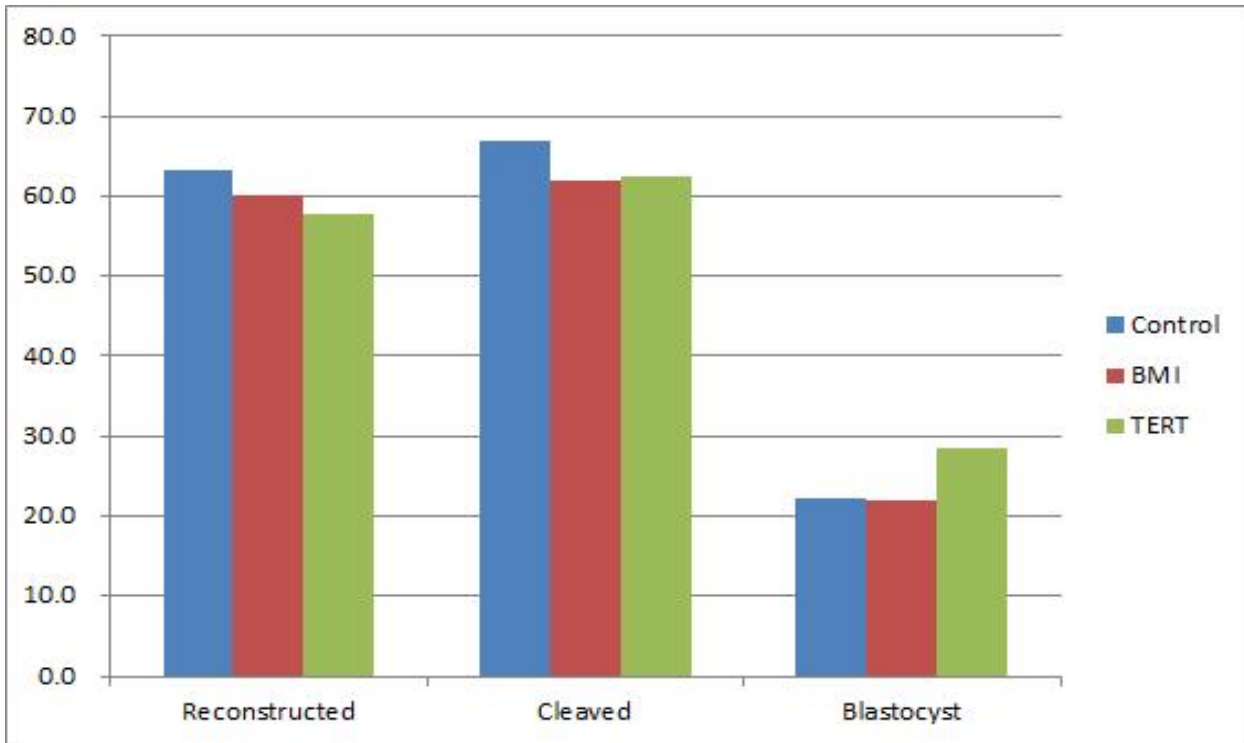


그림 25 소 체세포 및 불멸화체세포의 복제 수정란 발달 효율 비교

Table1. Comparison of development rates of bovine somatic cell nuclear transfer embryos using immortalized cells

	No. of embryos		
	Reconstructed	Cleaved (%)	Develep. to Bl (%)
Control	226	151 (66.8)	50 (22.1) ^a
BMI	218	135 (61.9)	48 (22.0) ^a
TERT	208	130 (62.5)	59 (28.4) ^b

다. 공여핵원용 불멸화 세포주 종류에 따른 소 핵이식란의 발육 속도 비교

- 불멸화 세포주 종류에 따른 체세포 핵이식란의 발육 속도를 비교한 결과 TERT 세포주를 이용한 군에서 빠른 배반포 발육을 속도를 보였다.

Table 2. Comparison of time to develop to the blastocyst according to donor cell types in the bovine somatic cell nuclear transfer embryos

	No. of blastocysts			
	Total	Day 6	Day 7	Day 8
Control	50	0 (0)	31 (62.0)	19 (38.0)
BMI	48	0 (0)	32 (66.7)	16 (33.3)
TERT	59	0 (0)	42 (71.2)	17 (28.8)

라. 공여핵원용 불멸화 세포주 종류에 따른 소 핵이식란의 내부세포괴 비율 비교

- 체세포핵이식란의 질적 평가를 위한 지표로서 내부세포괴수/영양막세포수를 비교한 결과 TERT 불멸화 세포를 이용한 배반포에서 상대적으로 좋은 지표를 보였다.

Table 3. Comparison of inner cell mass/trophectoderm according to donor cell types after immortalization

	Inner cell mass/trophectoderm	
	Day 7 blastocysts	Day 8 blastocysts
Control	0.74 ± 0.02	0.78 ± 0.07
BMI	0.34 ± 0.03	0.15 ± 0.02
TERT	0.51 ± 0.05	2.01 ± 0.19

마. PRNP제거가 된 불멸화 세포를 이용한 복제 배반포 생산 및 효율 비교

불멸화 세포에서 PRNP가 제거된 세포 라인을 확립하고 확립된 세포별로 체세포 복제 실험을 한 결과는 아래와 같다.

Cell line	Total No.	Fusion	Cleavage	Blastocysts
7-5	67	58 86.6%	54 93.1%	15 25.9%
6-6	63	54 85.7%	35 64.8%	13 24.1%
10-1	59	37 62.7%	31 83.8%	13 35.1%
3-2	73	54 73.9%	45 83.3%	13 24.1%
Summary	262	203 77.5%	165 81.3%	54 20.6%

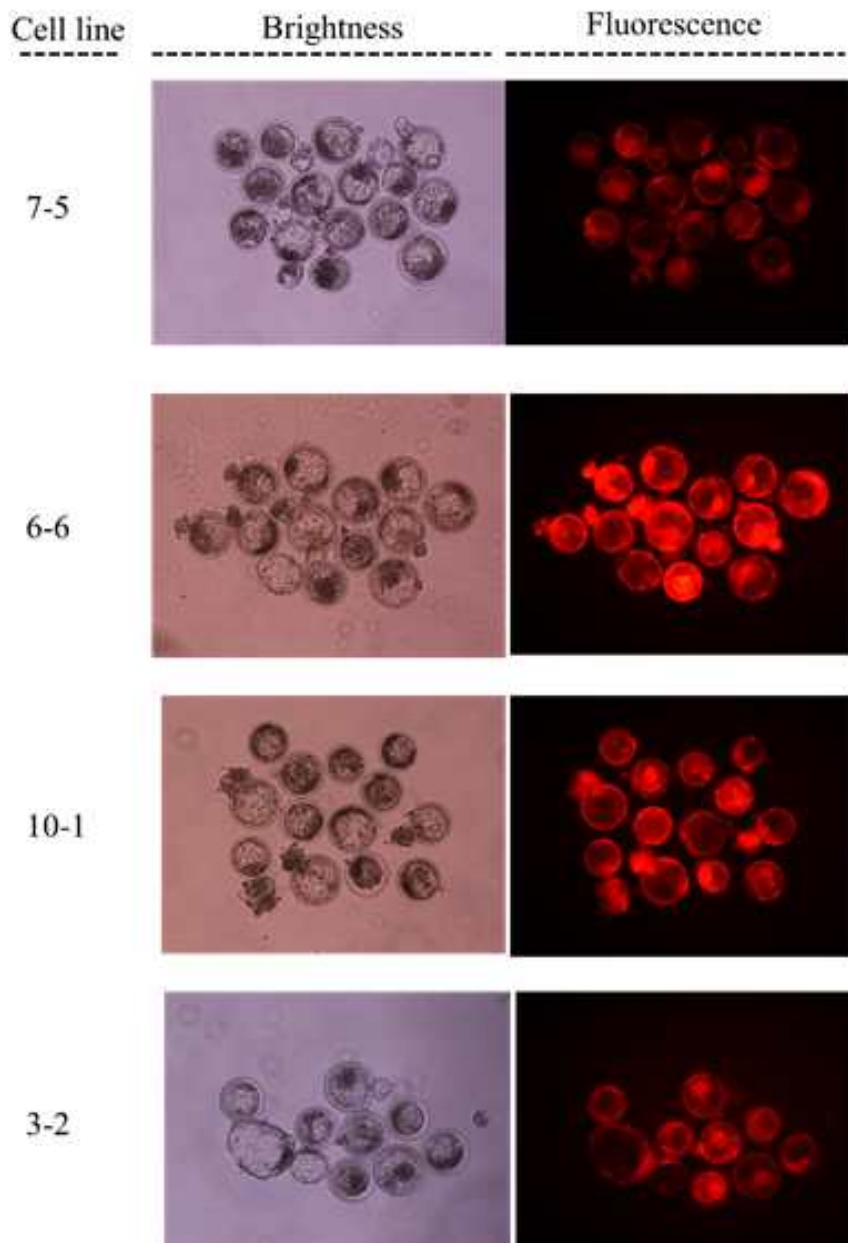


그림 26 PRNP제거를 통해서 얻어진 세포주를 이용한 배반포

3. Genome editing 기술을 이용한 PRNP유전자 제거

가. 최적의 ZFNs 제작 및 준비

(1) Cow PRNP ZFN 개발

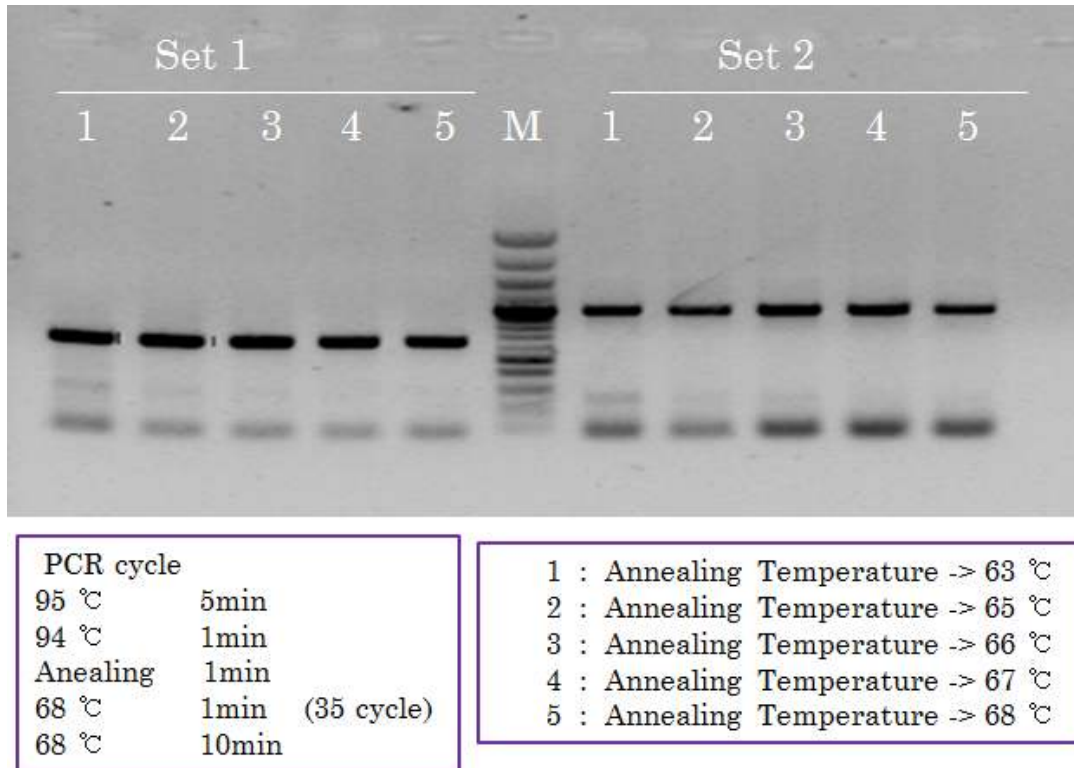


그림 27 Cow PRNP ZFN/TALEN의 검증을 위한 Primer test 및 PCR조건 확립

확보된 ZFN/TALEN의 활성을 소 세포내에서 검증하기 위해 Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>)를 이용하여 primer를 고안하고 한우 세포의 genomic DNA에서 PRNP target site의 PCR 과정을 확립하였다. Gradient PCR을 통해 최적화된 PCR melting temperature를 결정하였다.

(2) ZFN 검증 및 개선

ZFN 활성 검증은 리포터시스템을 이용하여 이루어 졌다. 톨젠의 리포터 시스템은 유전자가위의 활성에 따라 정량적으로 세포에서 형광단백질을 발현하여 유전자 가위의 활성을 조사하는 중요한 도구로 특히 리포터에서 관찰되는 활성은 세포내의 원하는 유전자 부위를 자르는 실제의 활성과 높은 상관관계를 보여 유전자가위의 대량생산을 위해 유용하게 사용되고 있다. 먼저 합성된 각 ZFN의 목적 서열을 포함하는 활성 리포터를 제작하고 293T 세포 내로 도입하여 형광 단백질의 발현을 측정하여 1차로 활성이 관찰되는 ZFN을 찾아내었다. 이후 ZFN의 FokI 부분을 활성 및 특이성이 개선된 형태의 nuclease variant (DAS/RR, RR/DAS)로 교체하여 다시 한번 활성 조사를 진행하여 ZFN에 따라 더 높은 활성을 갖는 ZFN 구조를 확인하였다. 이를 통해 2 pair의 Cow PRNP ZFN을 확보하였다.

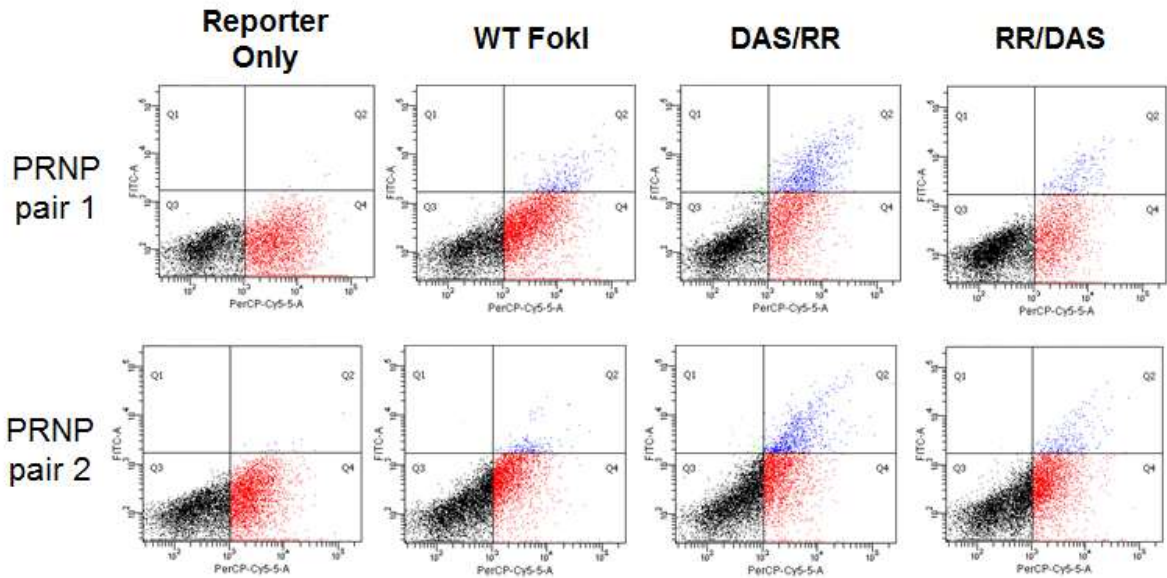


그림 28 Cow PRNP ZFN 처리 후 세포 활성조사

```

5' - atggtgaa aagccacata ggcagttgga tctgtgtct ctttgtggcc atgtggagtg acgtgggct ctgcaagaag
cgacccaaaac ctggaggagg atggaacact ggggggagcc gataccagg acagggcagt cctggaggca accgttatcc acctcagga
gggggtggct ggggtcagcc ccatggaggt ggctggggcc agcctcatgg aggtggctgg ggccagcctc atggaggtgg ctggggtcag
ccccatggtg gtggctggg acagccacat ggtggtggag gctggggta aggtggtacc cacggtcaat ggaacaaacc cagtaagcca
aaaaccaaca tgaagcatgt ggcaggagct gctgcagctg gagcagtgtt agggggcctt -3'
  
```

	Target sequence (Left)	spacer	Target sequence (Right)
Pair 1	5' -ATC CAC CTC AGG	GAGGGG	GTG GCT GGG GTC-3'
Pair 2	5' -GAC AGC CAC ATG	GTGGTG	GAG GCT GGG GTC-3'

그림 29 확보된 PRNP ZFN의 PRNP 유전자상 위치

나. TALEN 제작 및 준비

(1) Cow PRNP TALEN 제작

2009년 새롭게 발견된 맞춤형 염기결합 도메인 구조인 TAL effector 염기결합 도메인의 모듈을 이용한 유전자가위인 TAL effector nucleases (TALEN)이 최근 크게 각광을 받고있다. 톨젠은 독립적 연구를 통해 자체의 TALEN 구조 및 생산 시스템을 구축하였으며 이를 이용한

PRNP TALEN 개발을 진행하였다.

ZFN과 같은 과정으로 고안 및 합성을 진행한 후 유전자가위 활성 리포터를 이용하여 활성을 조사하였으며 이를 통해 4 pair의 고효성 TALEN을 확보하였다.

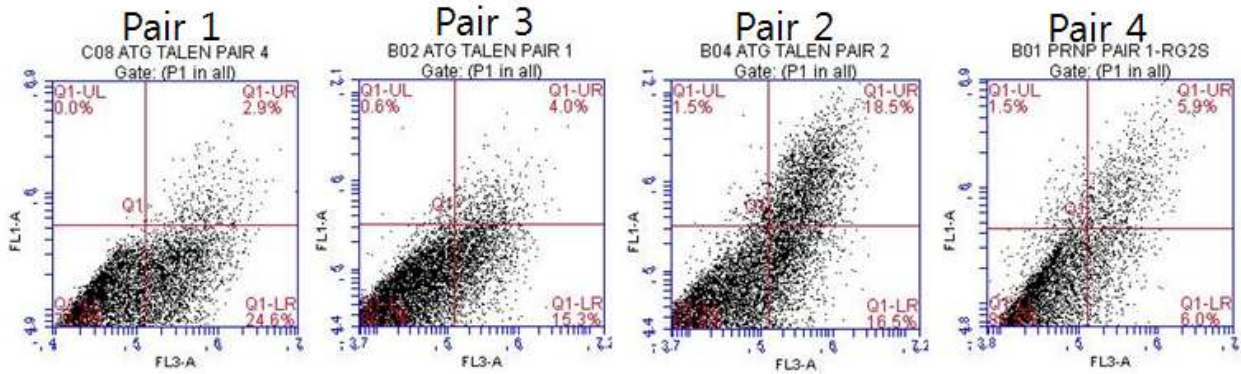


그림 30 Cow PRNP TALEN 활성검증

Left 1-DAS (3)	Spacer	Right 1-RR
5' TTTATTTTGCAGATAAGTC	12	5' TCCAAC TGCCTATGTGGCT
Left 2-DAS (3)	Spacer	Right 2-RR
5' TTGATCCTGGTTCTCTTTG	13	5' TCTTGCAGAGGCCACGTCA
Left 3-DAS (3)	Spacer	Right 3-RR
5' TCTGCAAGAAGCGACCAAAA	13	5' TCGGCTCCCCCAGTGTTC
Left 4-DAS (3)	Spacer	Right 4-RR
5' TTACTATCGTGAAAACATGC	12	5' TGGCCTGTAGTACACTTGGT

그림 31 확보된 PRNP의 TALEN site 정리

(2) TALEN 리포터 제작 및 검증

세포 내에서 활성 확인된 PRNP TALEN의 인식서열을 합성하여 MACS reporter에 cloning하여 PRNP TALEN MACS reporter를 제작하고 sequencing으로 서열 검증하였다.

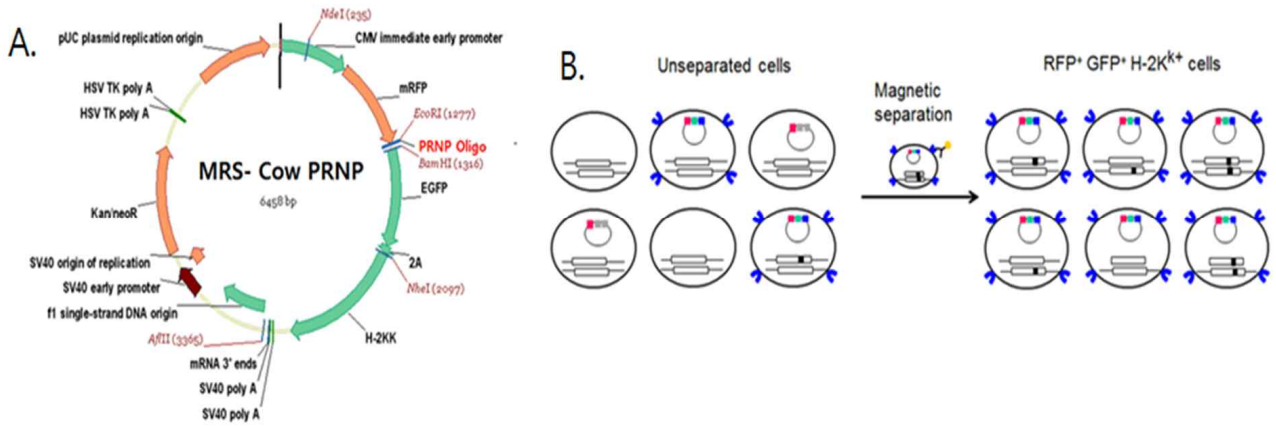


그림 32 그림 32 MACS Reporter 구조 및 KO cell enrichment 실험과정

또한 제작된 리포터와 TALEN 발현 벡터를 함께 세포에 도입하였을 때 TALEN에 의한 Reporter 유전자의 발현이 관찰되어 기능성이 검증 되었다.

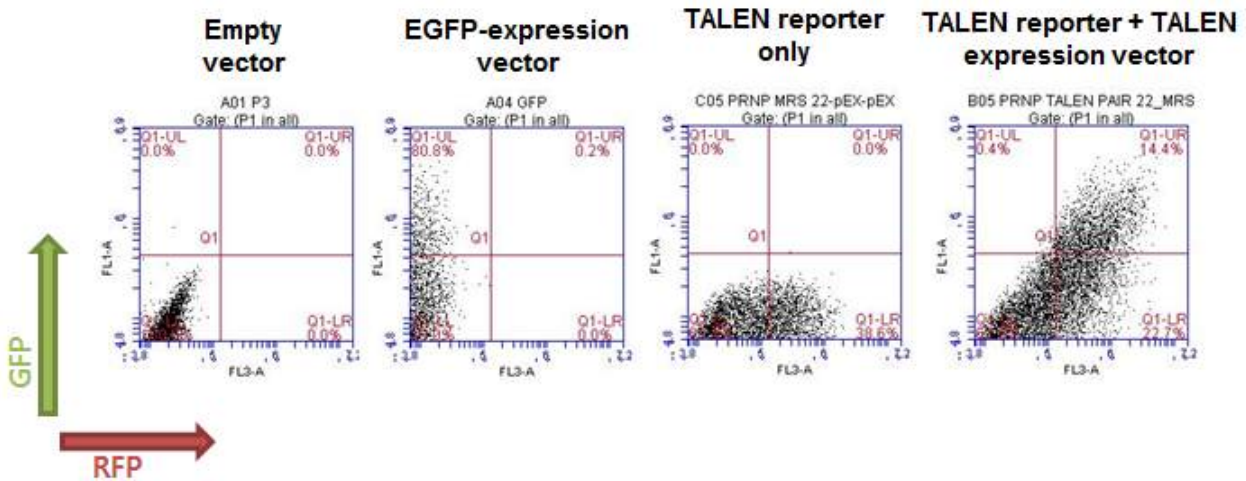


그림 33 TALEN reporter 검증. 293T 세포에 TALEN reporter 및 TALEN 발현 벡터를 전달하고 RFP/GFP 발현을 flow cytometer로 관찰

(3) TALEN 실험결과

총 12쌍의 TALEN pairs를 Immortalization 세포에 prnp talen 유전자 nucleofection을 실시한 후 제 2협동 연구팀에서 mutation assay를 실시하여 prnp ko할 수 있는 쌍을 선별하였다.

이중 가장 활성이 좋았던 TALEN을 선정하여 추후 KO 실험에 사용하였다.

유전자 KO 효과가 있는 pair에 대해서 enrichment 실험을 위하여 reporter를 제 2협동 연구팀에서 제작하였고, 이렇게 완성된 talen DNA를 maxi-prep을 통해서 많은 양의 DNA를 확보하였다.

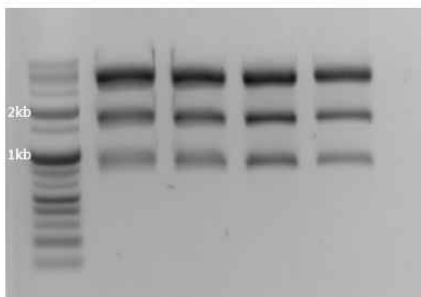
확보된 DNA를 가지고 한우 태아 섬유아세포에 nucleofection을 실시하여, RFP/GFP 발현을 확인

하고, MACS sorting을 하여 유전자 변형 세포를 일차적으로 enrichment를 하였다.

PRNP DNA Maxiprep. 후 확인 (2013.5.16)

Reporter (Double RS1)

- Enzyme : NheI, NotI
- Size : 1.4kb, 700bp & backbone 5kb



L1, R1

- Enzyme : EcoRI-HF
- Size : 2kb & 5kb

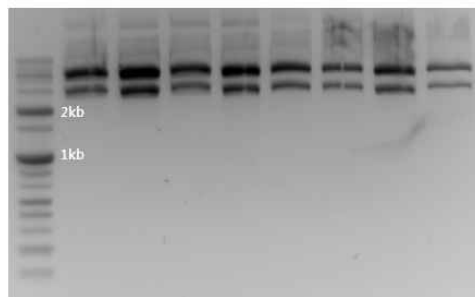


그림 34 DNA maxi-prep결과

A



그림 35 TALEN을 이용한 PRNP 적중 위치 모식도

Enrichment 된 세포의 PRNP locus를 T7E1 assay를 이용하여 분석한 결과 mutation의 도입이 관찰되었으며 특히 MACS를 이용한 enrichment를 통해 돌연변이 도입 세포가 농축된 것을 확인할 수 있었다. 또한 해당 세포 pool의 PRNP locus에 대한 돌연변이 서열 분석을 통해 실제로 KO를 일으킬 수 있는 frameshift 돌연변이가 들어간 것을 보았다.

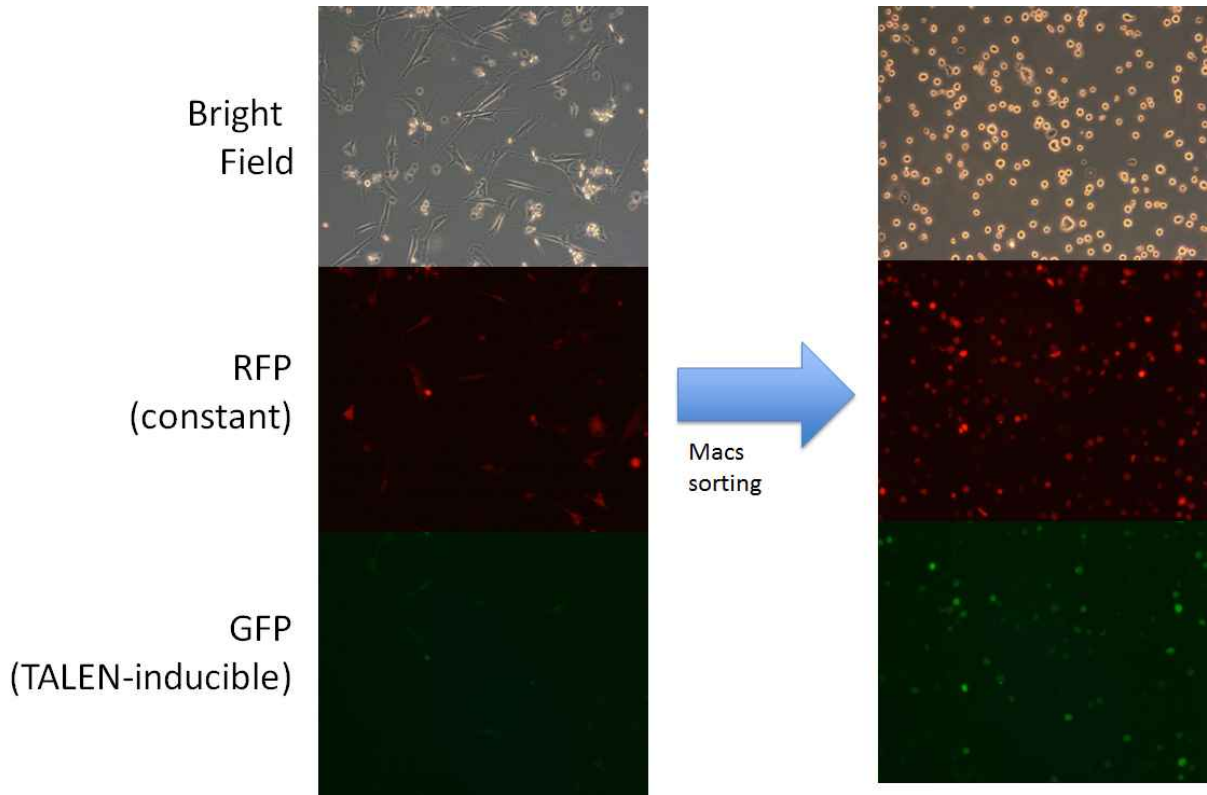


그림 36 TALEN 활성화 리포터를 이용한 KO 세포 enrichment과정의 검증. RFP는 reporter에서 constant 하게 발현되는 단백질. GFP는 TALEN에 의해 유도되는 단백질임. 농축을 통해 골라진 세포에서 RFP,GFP 발현 빈도가 향상됨.

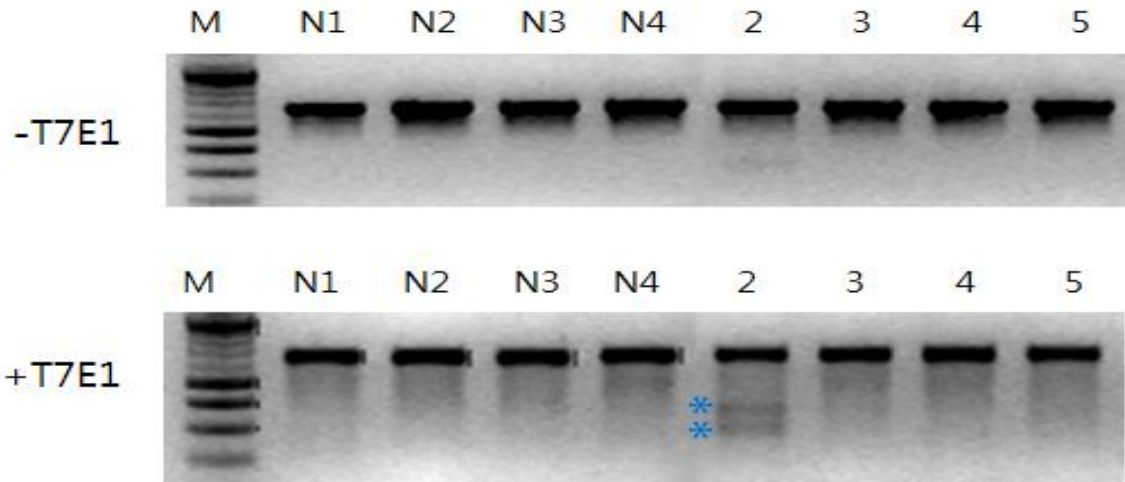


그림 37 TALEN 활성화 검증의 예. 2/3/4/5번 TALEN 발현 vector의 electroporation 실행 2일 후 genomic DNA를 준비하여 T7E1 assay로 돌연변이 도입을 관찰. * T7E1에 의한 돌연변이 위치 절단시 나타날 것으로 예상되는 DNA band 위치

TGCTGACACCCTCTTTATTTTGCAGATAAGTCATCATGGTGAAGCCACATAGGCAGTTGGATCCTGGTTCTC (WT, X12)
 TGCTGACACCCTCTTTATTTTGCAGATAAGTCATCATG-TGAAAAGCCACATAGGCAGTTGGATCCTGGTTCTC (-1 deletion, X1)
 TGCTGACACCCTCTTTATTTTGCAGATAAGTCA-----CACATAGGCAGTTGGATCCTGGTTCTC (-14 deletion, X1)

그림 38 Enriched KO cell pool에서 관찰된 PRNP mutant allele sequence

KO clone을 얻기 위해 Enrichmed cell population에서 총 6개의 싱글세포 콜로니를 확보하고 돌연변이 분석을 진행한 결과 2개의 콜로니에서 mutation이 관찰되었다.

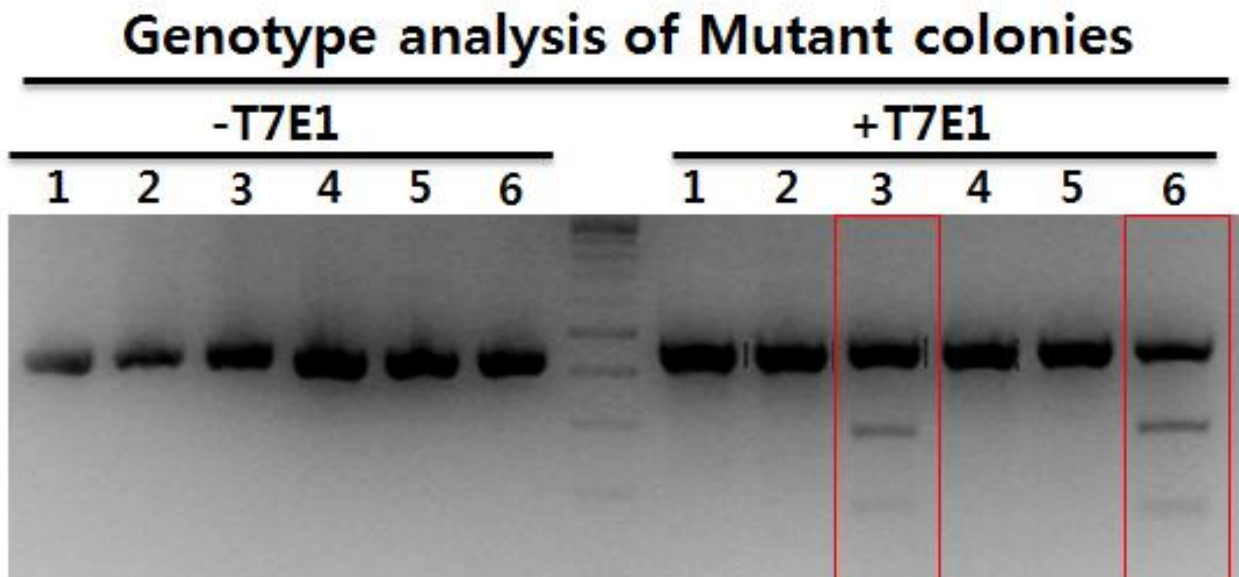


그림 39 Enriched Mutant cell pool에서 monoclonal cell colony를 분리 및 배양하여 mutation을 관찰

같은 과정으로 PRNP KO 세포주를 소 체세포 및 불멸화 체세포에서 제작하여 그 효율을 분석한 결과 불멸화 체세포가 DNA전달 효율 및 성장성이 좋은 이유로 전체 KO cell line 구축 과정에서의 효율이 소 체세포에 비해 높았다.

4. 복제 배아에서 PRNP 유전자 제거 확인

가. 세포에서 PRNP-KO 확인

- 확보된 PRNP gene knockout 소 불멸화 체세포의 genotype을 확인하여 각 clone들이 가지고 있는 frameshift 돌연변이의 모양을 확인하였다.

```

WT      GACACCCTCTTTATTTTGCAGATAAGTCATCATGGTGAAAAGCCACATAGGCAGTTGGATCCTGGT
6-6     GACACCCTCTTTATTTTGCAGATAAGTCATCA----GAAAAGCCACATAGGCAGTTGGATCCTGGT (-4)
10-1    GACACCCTCTTTATTTTGCAGATAAGTCA-----GTGAAAAGCCACATAGGCAGTTGGATCCTGGT (-5)
3-2     ACCTAGACTGTTTATAGCTGAT----(104bp del)----GCCCATAGGCAGTTGGATCCTGGT (-104)
7-5     GACACCCTCTTTATTTTGCAGATAAGTCATCA----GAAAAGCCACATAGGCAGTTGGATCCTGGT (-4)
        GACACCCTCTTTATTTTGCAGATAA----- (120bp ins)-----CGTTATCCACCTCA (+120)
    
```

그림 40 불멸화 세포에서 PRNP가 제거된 싱글세포 유래의 콜로니 세포주 분석 결과

	Primary cell	Immortalized cell
Screening clones	40	99
Mutant clones	8	66
Mutation frequency	20%	67%
Biallelic homo mutant clones		19
Biallelic homo mutation frequency		19%
Clones for sequencing analysis	3	12
KO clones (-/-)	-	6

나. 복제 배아에서 PRNP-KO 확인

- 또한 확보된 PRNP KO 불멸화세포주의 복제 배반포를 제작 후 확보된 배반포의 PRNP locus 서열을 분석하였을 때 공여세포가 가지고 있는 PRNP 돌연변이가 그대로 관찰되어 PRNP 유전자 녹아웃 복제 배반포가 성공적으로 생산되었음을 확인하였다.

```

WT      GACACCCTCTTTATTTTGCAGATAAGTCATCATGGTGAAAAGCCACATAGGCAGTTGGATCCTGGT
3-2     CTAGACTGTTTATAGCTGAT----- (104BP DEL) -----GCCCATAGGCAGTTGGATCCTGGT (-104)
BL1     CTAGACTGTTTATAGCTGAT----- (104BP DEL) -----GCCCATAGGCAGTTGGATCCTGGT (-104)
BL2     CTAGACTGTTTATAGCTGAT----- (104BP DEL) -----GCCCATAGGCAGTTGGATCCTGGT (-104)
BL3     CTAGACTGTTTATAGCTGAT----- (104BP DEL) -----GCCCATAGGCAGTTGGATCCTGGT (-104)
BL4     CTAGACTGTTTATAGCTGAT----- (104BP DEL) -----GCCCATAGGCAGTTGGATCCTGGT (-104)
    
```

그림 42 PRNP가 제거된 세포를 이용한 체세포 복제 배반포 생산 후 생산된 배반포의 PRNP시퀀싱 결과

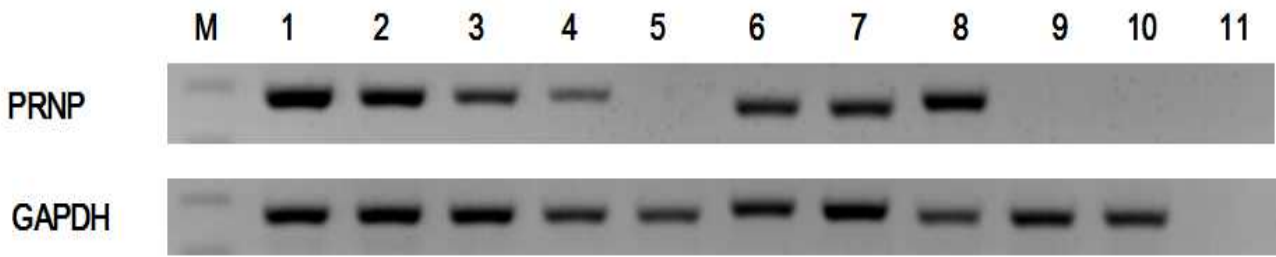


그림 43 분별화 세포(1-4), PRNP제거 세포(5), 배반포(6-8), PRNP제거 배반포(9-10)에서 PRNP 발현 검사 결과

다. mRNA 단계에서 복제 배아 PRNP-KO 확인

- PRNP KO 복제 배반포에서 PRNP 유전자의 mRNA 발현을 RT-PCR로 조사한 결과 몇몇 돌연변이 type에 따라서는 PRNP mRNA의 발현이 현저히 줄거나 사라진 것을 관찰할 수 있었다.

5. PRNP rGENs 개발

새로운 유전자가위 platform인 RNA-guided Engineered Nucleases (rGENs)을 소 PRNP knockout에 적용하기 위해 PRNP coding sequence 중간에 rGENs이 targeting 할 수 있는 motif에 대해 rGENs 발현 벡터를 제작하였다.

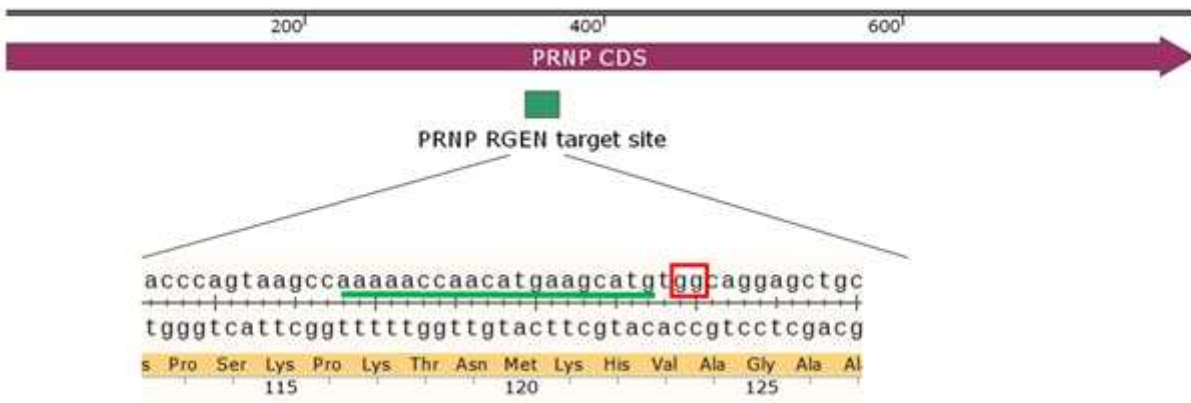


그림 44 PRNP Knockout rGENs target sequence 및 PRNP 유전자 상 위치.

PRNP rGENs의 발현 벡터를 분별화 체세포에 전달하였을 때 효율적으로 돌연변이가 도입되는 것을 T7E1 assay를 통해 확인 하였다. 특히 반복적인 rGENs 발현벡터의 전달을 통해 돌연변이 축적 비율이 향상되는 것을 확인하였다.

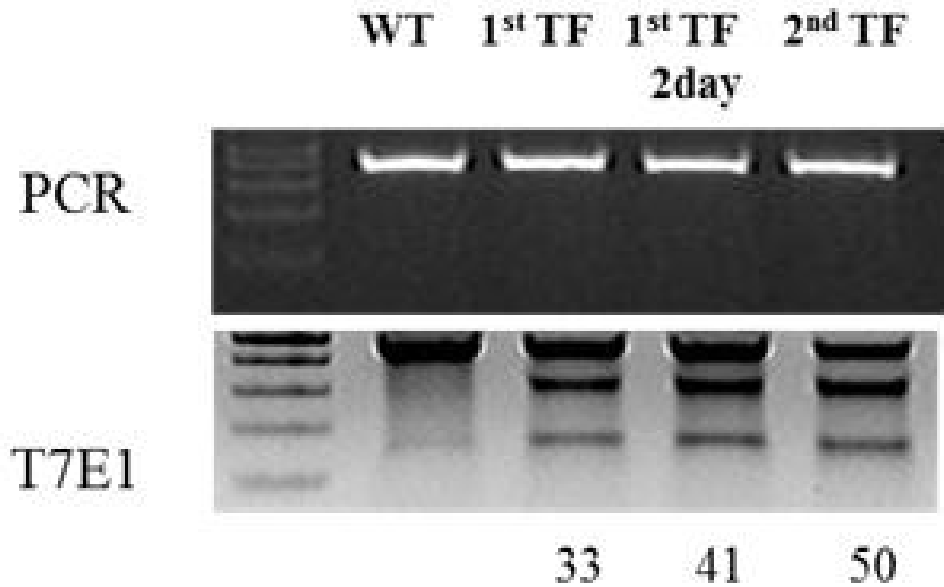


그림 45 PRNP 녹아웃 rGENs의 돌연변이 도입 효율

6. rGENs을 이용한 돌연변이 확인 방법 확립

rGENs은 효소 형태로 제작되어 *in vitro*에서도 표적 sequence를 절단할 수 있다. 이런 특징을 이용하여 TALEN 또는 rGENs등 유전체교정에 의하여 유도된 돌연변이 allele을 분석하기 위한 실험 방식을 개발할 수 있다. 특히 기존에 사용되는 T7E1 assay의 경우에는 세포가 가지고 있는 allele중 돌연변이가 들어간 수를 (hetero / homo) 알수 없는 반면 rGENs-RFLP의 경우 WT allele이 남아 있는지를 알수 있어 좀더 손쉽게 KO cell을 찾는 방식으로 사용될 수 있다.

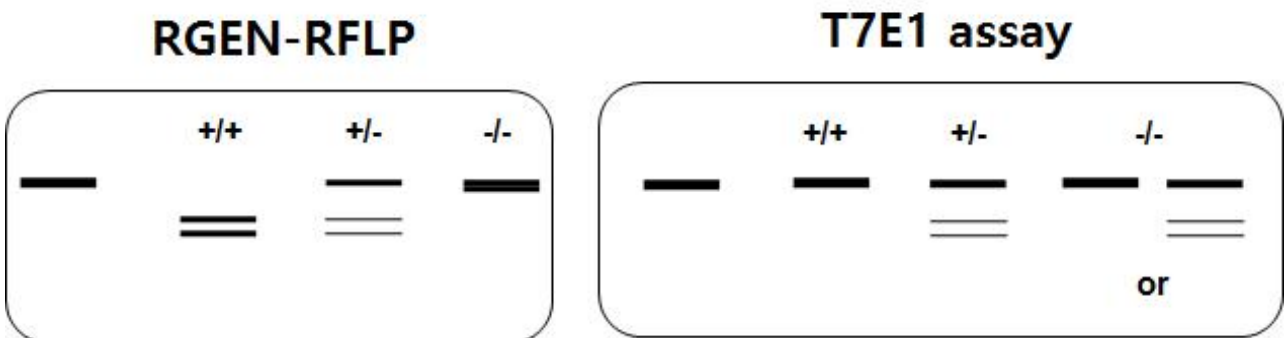


그림 46 rGENs을 이용한 돌연변이세포 유전자 분석 방법

이를 test하기 위해 DNA vector 형태의 rGENs으로 돌연변이가 유도되고 single clone으로 분리된 인간 암세포 population에 대해 T7E1과 rGENs-RFLP 분석을 진행하였다. 실제로 T7E1 분석을 통해 발견된 돌연변이 colony 세포 중 rGENs-RFLP를 통해 WT allele이 남아 있지

않은 전체 allele에 돌연변이가 도입된 세포를 차별적으로 발견할 수 있었다.

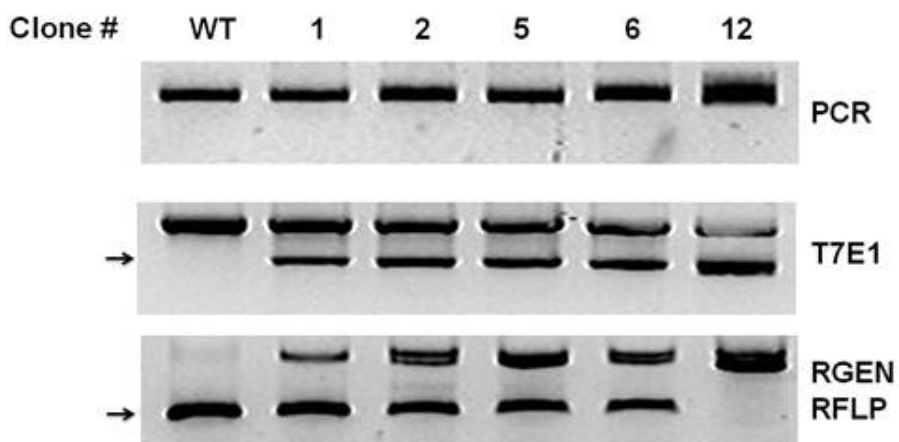


그림 47 유전자 돌연변이 세포 clone의 T7E1 및 rGENs-RFLP 분석

앞으로 이런 방식을 이용해 PRNP 유전자에 돌연변이가 도입된 세포 clone의 동정이 손쉽게 진행될 수 있을 것으로 예상된다.

7. rGENs에 의한 knock-in 세포주 개발

rGENs으로 double strand break을 유도한 다음 homologous recombination을 유도하여 knocki-in 세포주를 개발중에 있다.

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1 차 년 도 (2011-2 012)	- 소 복제 시스템 구축 및 배반포에 서 PRNP 발현 분 석	- 한우 암수 체세포주 수립	100	- 3개의 암수 한우 체세포 주 수립 - 4개의 한국 재래 칩소 세포주 수립 - 2개의 한국 재래 흙소 세포주 수립 - 1개의 거대 한우(1ton) 세포주 수립
		- 한우 체세포 핵이식 및 배반포 생산	80	- 매주 2회의 체세포핵이식 실시 - 400개 이상의 배반포 생산
	- 한우 암소 체세 포주 수립 및	- 한우 암수 체세포주 수립	80	- 세포주 확립 후 성 판정 및 증식 평가 - PRPN유전자 염기 서열 확인
	ZFNs 난자내 주입 법 평가	- ZFNs의 난자내 주입 법 평가	80	-단위 발생 난자에 ZFNs의 주입에 따 른 단위발생란에서 KO평가
	- PRNP ZFNs 시 스템 구축	- PRNP ZFNs 시스템 구축	120	- PRNP 유전자 서열 분석을 통한 유전 자가위 고안 - 대량생산 시스템을 통한 합성 및 활 성조사
- PRNP-KO 검증 시스템		80	- PRNP ZFN target 위치에 대한 PCR 조건 확립 - 유전자가위 처리 후 돌연변이 관찰 및 효율 비교	
2 차 년 도 (2012.9 ~2013. 9)	- 소 복제 시스템 구축 및 배반포에 서 PRNP 발현 분 석	- PRNP-KO 복제 배아 생산	90	- 2개의 불멸화 세포주를 제1협동연구 팀에서 받아 대조군과 발육능 비교 - 최적의 소 체세포핵이식란 발육 시스 템 확립
		- 복제배반포에서 PRNP-KO 확인	80	- 한 개의 복제 배반포에서 genomic DNA를 추출하여 PRNP-KO 검증 프로토콜 확립
	- 한우 암소 체세 포주 수립 및 ZFNs 난자내 주입 법 평가	- 한 개의 배반포에서 PRNP KO 검증 시스템 확립	80	- 한 개의 배반포에서 효율적으로 geno- mic DNA와 RNA 추출 기법 확립

		- PRNP KO 세포주 개발	80	- 제3세부 과제와 협동하여 PRNP ZFNs/TALENs을 수립된 소 체세포주에 적용 PRNP-KO 유도 - PRNP KO 세포주 생산
	- ZFNs을 이용한 KO 시스템 개발 및 검증	- PRNP KO 세포주 개발	120	- PRNP-KO 세포주 개발 - PRNP-KO 효율 증가 - PRNP-KO 검증
		- 배반포에서 PRNP-KO 검증	80	- 배반포 단계에서 복제 및 체외수정 배반포에서 PRNP 유전자 KO 검증
3 차 년 도 (2013.9 ~ 2014.0 9)	PRNP-KO 복제 배아 대량생산 체계 확립	- PRNP-KO 복제 배아 생산	100	- PRNP-KO 복제 배아 생산을 위한 최적의 체세포 핵이식 조건 확립 - 생산효율을 높이기 위한 최적의 배양 조건 확립 - 향상된 생산효율로 PRNP-KO 복제 배아 대량 생산 체계 확립
		- 배반포에서 PRNP-KO 확인	100	- 체외수정란과 PRNP-KO 복제 배반포에서 genomic DNA 및 RNA 추출
	PRNP KO 유전자 가위 최적화 및 KO 검증	- PRNP KO 세포주 개발	100	- 제3세부 과제와 협동하여 PRNP nuclease (Talen 및 rGENs)을 소 체세포주에 적용 PRNP-KO 유도 및 세포주 개발
		- PRNP KO 배반포 생산 및 검증	100	- 체외배아에 PRNP nuclease를 미세주입후 PRNP-KO배반포 생산 및 검증 - PRNP KO 세포를 이용한 배반포 생산 및 검증
	ZFNs을 이용한 KO 시스템 개발 및 검증	- PRNP 유전자가위 다양화 및 최적화	100	- 세포용 PRNP rGENs 개발 - 수정란 용도 PRNP rGENs 개발
		- rGENs을 이용한 PRNP KO검증 방법 확립	80	- rGENs을 이용한 in vitro 유전자 변형 검증법 개발

제5장 연구개발결과의 활용계획

제1절. 연구개발의 성과

1. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신	공동저자				
2012	Embryonic development and implanatation related gene expression of oocyte reconstructed with bovine trophoblast cells	Saadeldin	Jang G	Choi W, Roibas Da Torre B, Kim B, Lee B	Journal of reproduction and development	58(4)	국외	SCIE
2014	Production of <i>CMAH</i> Knock out Preimplantation Embryos Derived From Immortalized Porcine Cells Via TALE Nucleases	Moon JH	Jang G	Lee CI, Kim SJ, Choi JY, Lee BC, Kim JS,	Molecular Therapy-Nucleic acids	3(5):e166	국외	SCIE
2014	Identification of abnormal gene expression in bovine transgenic somatic cell nuclear transfer	Cho JK	Lee BC	Kang SK	J Vet Sci	15(2)	국내	SCIE
2014	Oct4 overexpression facilitates proliferation of porcine fibroblasts and development of cloned embryos	Kim SJ	Jang G	Koo OJ, Park HJ, Moon JH, da Toore BR, Javaregowda PK, Kang JT, Park SJ, Saadeldin IM, Choi JY, Lee BC	Zygote	in press	국외	SCIE
2014	Disruption of Exogenous eGFP gene Using RNA-guided Endonuclease in bovine transgenic somatic cells	Choi WJ	Jang G	Yum SY, Lee SJ, Lee WW, Lee JH, Kim SJ, Koo OJ, Lee BC	Zygote	accepted	국외	SCIE

2. 학술대회 발표

발표 연도	발표제목	저자			학술대회 명	페이 지	국내외 구분	발표장 소
		주저자	교신	공동저자				
2013	Diagnostic imaging of congenital meningoencephalocele in a Holstein calf	Lee JW	Cho JK	Jeung WC, Son JM, Oh SK, Kim SH, Lee HC, Lee KC, Choi HJ, Lee YW, Son HY, Shin ST,	한국임상수의학회	P-27-OB	국내	서울

2013	A case of congenital hydrocephalus in a Holstein	Kim YS	Cho JK	Kim SK, Kim SH, Oh SK, Cho SC, Shin ST	한국임상수의학회	P-23-OB	국내	서울
2013	Targeted gene knockout using transcription activator-like effector nucleases in immortalized porcine fetal fibroblasts	Moon JH	Jang G	Lee CI, Park SJ, Kim SJ, Kang JT, Choi JY, Choi WJ, Lee BC	제 11회 국제 형질 전환 학회	231	국외	중국 광저우
2013	Implantation of transgenic bovine clone dembroys derived from transfected cells by piggybac transposon	Choi WJ	Jang G	Lee SJ, Lee WW, Kim SJ, Saadeldin IM, Cho JK, Lee BC	제39회 세계 수정란 이식학회	173	국외	독일 하노버
2013	GENERATION AND CHARACTERIZATION OF BOVINE INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS	Koo OJ	Jang G	Kwon HS, Kwon DK, Kang KS, Lee BC	제39회 세계 수정란 이식학회	289	국외	독일 하노버
2013	Development of porcine cloned embryos using induced pluripotent stem-like cells	Kim SJ	Jang G	Moon JH, Kwon HS, Bego, Park SJ, Koo OJ, Kang JT, Choi JY, Lee BC	제 11회 국제 줄기세포 학회	T-218 7(72)	국외	미국 보스턴
2013	Endocrine patterns on Superovulation Treatment in Dairy cow	Lee WY	Jang G	Bae SH, Kim HS, Park JH, Jang GJ	춘계동물 번식학회	P082	국내	청주
2013	Knockout beta-lactoglobulin (BLG) in bovine embryos using RNA-guided Cas9 system	Choi WJ	Jang G	Lee CI, Lee JH, Yum SY, Lee BC, Kim JS	춘계수정란이식학회	P003	국내	청주
2014	Producing a Transgenic Cattle using Transposon	Choi WJ	Jang G	Park JH, Lee SJ, Kim SJ, Yum SY, Lee JH, Kim HJ, Lee WY, Lee BC	춘계수정란이식학회	P-75	국내	청주
2014	Case of congenital meningoencephalocele in a Holstein calf	Jeung WC	Cho JK	Lee JW, Son JM, Lee HC, Lee KC, Choi HJ, Lee YW, Shin ST	제28회 세계우병학회	P53	국외	호주 케언즈
2014	Improved developmental competence using immortalized cells as donor in bovine nuclear transfer	Ramachandras	Cho JK	Malaweera DBO, Wu J, Oh SK, Kim SJ, Cho WJ, Jang G	제28회 세계우병학회	P68	국외	호주 케언즈
2014	Efficient PRNP deletion in bovine genome using gene-editing technologies in immortalized bovine cells	WooJa e Choi	Jang G	Kim EJ, Yum SY, Lee CI, Lee JH, Moon JH, Cho JK, Lee BC, Kim JS, Kim SJ	제 12회 형질 전환학회	872	국외	영국 에딘버러
2014	Expression of prion-like protein gene (PRND) in PRNP knockout in PRNP Knockout Bovine Fibroblasts	Choi WJ	Jang G	Kim EJ, Yum SY, Lee CI, Lee YH, Moon JH, Cho JK, Lee BC, Kim JS, Kim SJ	제14회 발생공학회	P-40(74)	국내	서울

2014	Recombinase Dependent Target gene expression in a transgenic attle using piggybac transposon	Yum SY	Jang G	Lee SJ, Kim HJ, Choi WJ, Lee JH, Jang GJ, Lee BC	제 14회 발생공학 회	P-78(139)	국내	서울
------	--	--------	--------	--	--------------	-----------	----	----

제2절 연구추가연구의 필요성

1. 본 연구의 결과로 유전자 가위를 이용하여 특정 유전자인 프리온 단백질 발현 유전자인 PRNP 유전자가 제거된 세포주를 수립하였고 이를 공여핵원으로 하여 체세포 핵이식을 하여 생산된 복제 배아에서 PRNP 유전자가 제거된 것을 확인되어 본 연구는 목표인 PRNP 유전자 제거된 복제 배아를 생산하였음
2. 본 연구 과제의 성공적인 수행으로 복제 배아를 생산하였으나 복제 배아 단계에서는 그 활용 가치가 높지 않으며 단지 소에서 유전자 가위 효용성 검증했다는 데 의의를 둘 수가 있음
가. 유전자 가위가 소의 체세포에서 적용되어 그 효용 가능성이 입증됨
나. 그리고 이 세포를 복제하였을 경우 복제 배아에서도 그 유전자가 제거되었음
3. 대리모에 이식하여 PRNP 유전자가 제거된 복제 송아지가 태어날 경우
가. 국민들에게 광우병 내성소 생산 가능성에 대해 홍보 가능
나. 광우병 예방에 대한 획기적 기반을 마련 가능
다. 국내에서 최신 기법으로 광우병의 원인이 되는 prion knockout소를 개발하면, 이에 대한 안전성 연구에 과학적인 성과를 거둘 수 있음
라. 관련 기술이 아직 진입단계이므로 다양한 대동물을 이용한 다양한 모델 동물을 생산할 수 있는 기술 및 특허를 취득하여 경제 산업적으로 도움 가능함
4. 이에 추가적으로 본 연구로 성공적으로 생산된 복제 배아에서 연구가 멈추는 게 아니라 이를 대리모에 이식하여 광우병 내성소 생산 연구가 필수적으로 수행되어야 함
가. 소에서 대리모 이식은 실험실에서 하는 연구보다 그 비용이 훨씬 많이 들어가며 소의 경우 현실적으로 대리모를 구입할 수 없기 때문에 학교 농장 또는 일반 축산 농가에게 대리모 대여를 하여 함
나. 대리모에 대량 생산된 광우병 내성 복제 배아를 이식하였을 경우 임신 기간 277일을 거친 후 광우병 내성소 생산이 가능하게 됨

제3절. 다른 연구에의 응용

1. 본 연구 결과가 성공하면, 생산된 형질 전환 소의 세포 또는 개체를 이용하여 prion의 안전성을 과학적으로 검증 할 수 있으며, 이 세포주 또는 개체가 완성되면, prion의 질병의

발병 및 치료에 대한 기초 자료가 될 수 있는 샘플을 확보하여, 다양한 기관들에게 샘플을 제공하여, 이 분야에 활발한 연구를 할 수 있을 것이다.

2. 기대성과

가. 기술적 측면

현재 많은 부분에서 유전자 변형, 특히 knockout에 대한 기술이 HR을 이용하여 적용되고 있지만, 소와 같은 대형동물에서는 그 연구의 한계로 제한적이었다. ZFNs을 이용한 본 연구의 성공은 대형동물에서 목적에 맞는 유전자 변형 동물을 좀 더 효과적으로 생산할 수 있다는 장점이 있다. 나아가 다른 유전자 및 동물에도 ZFNs을 적용할 수 있으므로 대형동물 형질 전환 동물을 통한 새로운 장을 열수 있다.

나. 경제-산업적 측면

본 연구의 성공은 광우병 예방에 대한 획기적 기반을 마련할 수 있다. PRNP-KO 세포주 및 배반포가 수립되면 이를 이용하여 핵이식을 실시 PRNP-KO 소를 생산하고자 한다. 일단 국내에서 최신 기법으로 광우병의 원인이 되는 prion knockout소를 개발하면, 이에 대한 안전성 연구에 과학적인 성과를 거둘 수 있다. 나아가 관련 기술이 아직 진입단계이므로 다양한 대동물을 이용한 다양한 모델 동물을 생산할 수 있는 기술 및 특허를 취득하여 경제 산업적으로 도움이 될 수 있다.

제4절. 기업화 추진방안

1. 유전자 가위를 이용한 넉아웃 동물 생산 기업 수립

가. 현재 소와 돼지에서 유전자 가위를 이용한 넉아웃 및 넉인이 된 형질전환 동물 생산 보고가 미국 및 일본 등 생명공학 선진국에서 많이 이루어지고 있으며 특히 그동안 이 분야 후진국으로 분류되었던 중국에서 천문학적인 연구비와 인적 자원 투여로 그 생산 보고가 우리나라 보다 훨씬 빠르게 이루어지고 있음

나. 본 연구가 성공적으로 이루어져 산업동물에서 유전자 가위의 적용 가능성을 보았으며 생산된 복제 배아를 대리모에 이식하여 광우병 내성소가 태어났을 경우 기업화를 추진하여 소나 돼지에서 원하는 유전자가 제거된 동물을 생산한다.

2. 기술 이전

가. 기업화가 어려울 경우 본 유전자 가위 기술을 우수 생명공학 회사에 전수하여 그 산업적 가치를 창출하고자 함

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제1절. 유전자 가위 기술

1. 유전자가위 구조의 개발

유전자가위는 맞춤형 염기결합 protein에 nuclease domain을 결합하여 만들어지고(그림 x) 한 개의 유전자 가위는 최소 20개 염기쌍 이상의 서열을 인식하기 때문에 세포내에서 정확히 원하는 유전체상 위치만을 인식하여 절단할 수 있다. 2011년 유전자가위는 Nature Methods에서 올해의 기술로 선정되었다. 이는 유전자가위 구조의 다양화 및 유전자가위 활용의 다양화를 통해 유전자가위를 이용한 유전체 조작이 보편적인 실험기법으로 발전할 수 있는 배경이 마련된 것에 기인한다.

가. Zinc Finger Nuclease (ZFN)

최초의 유전자가위는 3개의 염기쌍을 인식하는 Zinc finger 기본 모듈이 여러 개 연결되어 만들어지는 맞춤형 염기결합 단백질과 FokI 염기절단 제한효소 결합으로 제작된 Zinc Finger Nuclease (ZFN)이다. 지난 약 5년간 ZFN은 다양한 동식물에서 사용되어 Genome engineering 분야의 초창기 좋은 연구성과를 보여 왔으나, 고효율의 ZFN을 찾기 위해 많은 노력이 필요하고 만들 수 있는 위치도 제한적인 단점이 있었다.

나. TAL Effector Nuclease (TALEN)

한편, 식물의 pathogen bacteria에서 특별히 발견되는 TAL effector의 염기결합기능부분이 각각 하나의 염기쌍을 인식하는 기본 모듈 십여 개 이상이 연결되어 있는 구조임이 2009년 말 밝혀지면서 TAL effector의 염기결합 기본 모듈이 유전자 가위의 구성에 새로운 재료가 되었다. 이러한 특징을 가진 TAL effector 염기결합 모듈은 하나의 염기를 인식하므로 세 개의 염기서열을 인식하는 zinc finger에 비해 더욱 다양한 염기서열에 대한 유전자 가위가 생산될 수 있는 장점을 가지고 있다. 실제로 TALEN은 높은 정확도 및 다양한 서열을 타겟할 수 있는 장점 외에도 평균적으로 ZFN에 비해 세포 toxicity가 낮은 것으로 관찰되고 있는 큰 장점이 있다.

다. RNA-Guided ENdonucleases (rGENs)

CRISPR/CAS system은 박테리아의 adaptive immunity 시스템으로서 guide RNA와 Cas nuclease 단백질로 구성된다. 이중 TypeII S CRISPR/Cas system는 target-specific crRNA와 constant RNA 요소인 tracrRNA로 구성되는 guide RNA와 Cas9 단백질로 구성된다. crRNA의 첫 20bp는 target 위치를 정하는 역할을 한다. 이와 함께 Cas9 단백질은 di-guanidine (GG) sequence를 인식한다. 이중 crRNA의 목적 서열은 연구자에 의해 reprogram이 가능하여 Cas9의 인식서열로 고정된 GG sequence를 제외한 나머지 target sequence를 자유롭게 유연하게 조정할 수 있는 새로운 유전자가위를 만들어 내는 것이 가능하다. rGENs의 유전자가위가 인식하는 서열의 길이는 총 20nt로 기존의 ZFN이나 TALEN

에 비해 상대적으로 짧은 점 때문에 유전자 가위로서 세포내 사용을 위해 충분한 특이성을 갖는지에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

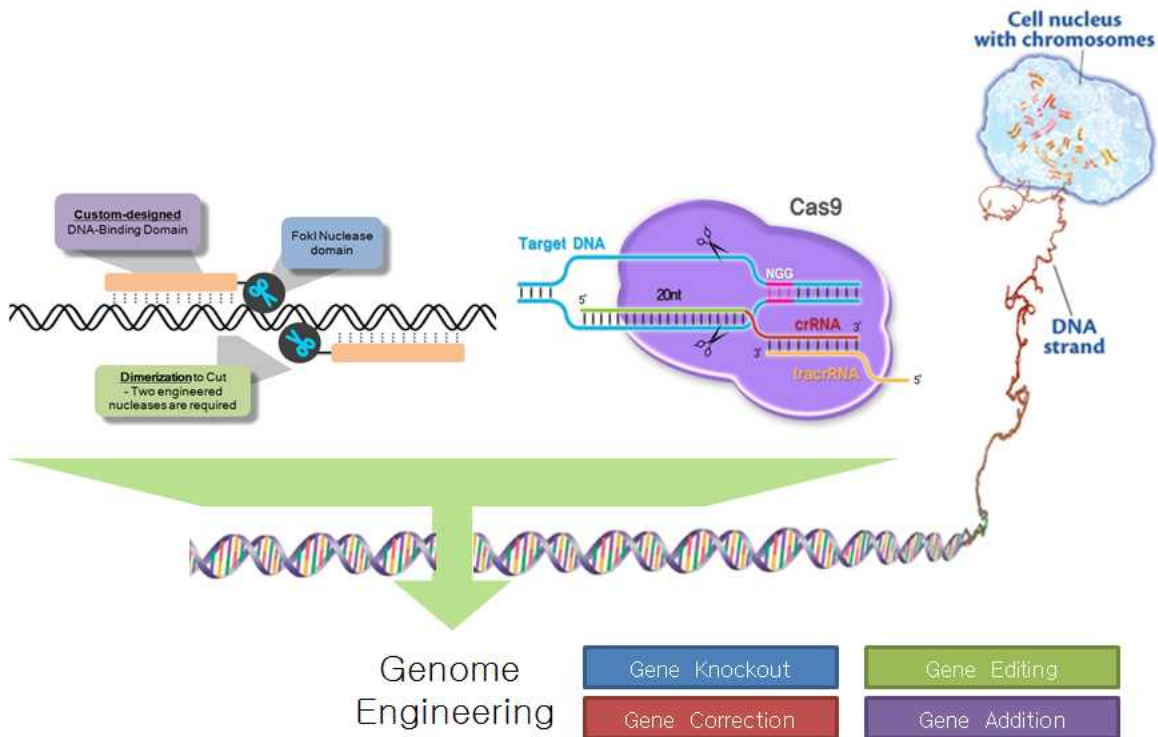


그림 48 대표적인 유전자 가위 구조 및 기능

Technology	ZFN	TALEN	RGEN
Since	2000s~	2010~	2012~
Type	1 st Generation	2 nd Generation	3 rd Generation
DNA binding	Zinc Finger module	TAL effector module	RNA:DNA interaction
Mode of recognition	Protein to DNA	Protein to DNA	RNA to DNA
Resolution	★ ~ ★★ (50bp~500bp)	★★★★★ (<10bp)	★★★★★ (<10bp)
Nucleases	FokI	FokI	Cas9
Recognition Sequence	9~12bp X 2 = 18~24bp	16~20bp X 2 = 32~40bp	20bp + 2bp = 22bp
Specificity	★	★★★★★	★★★★★

표 12. 유전자 가위 특성 비교

2. 유전자가위 활용법의 다양화

유전자가위를 이용한 유전체 조작은 유전자가위가 정확하게 유전체상 위치를 자르는 것으로 시작한다. 이때 유전자가위에 의해 잘려진 유전체상 위치는 DNA 양 가닥 절단의 형태를 보이기 때문에 세포는 매우 효율적인 치료과정을 통해 손상부위를 복구하게 된다. 유전자가위를 이용한 유전체 조작의 형태는 세포 자체가 가지고 있는 두 가지 손상치료 기작인 비상동 말단 결합 (Non-homologous recombination, NHEJ)과 상동재조합 (Homologous recombination, HR)에 의해 결정된다.

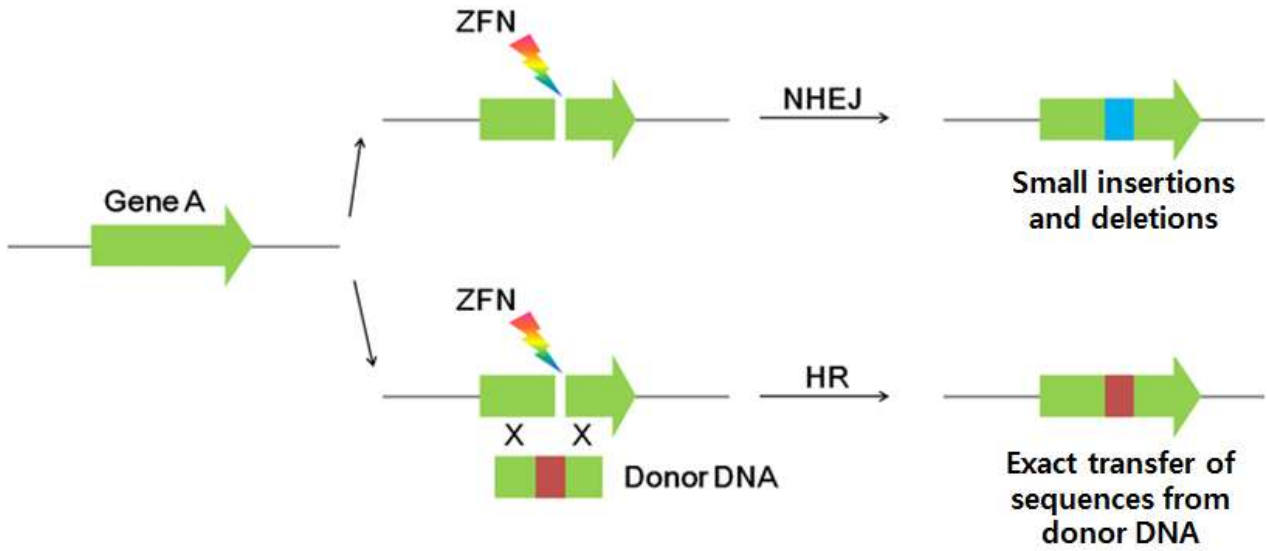


그림 50 세포내의 대표적인 유전자 손상 수선 메커니즘

이때 특히 NHEJ에 의해 목적부위에 도입되는 small insertion/deletion 돌연변이는 단백질 합성과정을 방해하는 frameshift 돌연변이로 작용하여 유전자 녹아웃 형질을 유도하게 된다. 이때 NHEJ에 의한 유전자 녹아웃 과정은 1~20% 정도의 효율로 나타난다. 이러한 효율은 기존의 유전체 조작 기법에 비해서는 수천~수만 배 높은 고효율로서 관찰되나 유전자가위를 사용해 만든 돌연변이 세포와 정상 세포를 쉽게 구별할 수 없기 때문에 폭 넓은 활용에 제약이 있어왔다. 이러한 점을 극복하기위한 유전자녹아웃 세포 농축 시스템이 개발됨으로써 다양한 방법을 이용한 돌연변이 세포 관찰과 농축이 가능해졌다. 유전자녹아웃 세포 농축 시스템은 유전자가위에 의해 복구되는 리포터시스템의 녹색형광단백질 시그널을 통해 세포 내 정해진 유전자에 돌연변이가 일어난 세포들을 선별해 내는 방법이다. 즉 돌연변이를 도입하여 형광단백질이 발현하지 않도록 고안된 리포터와 유전자가위를 동시에 세포에 도입하면 일부 세포에서 유전자가위의 작용으로 리포터 상의 돌연변이가 고쳐져서 형광단백질이 발현되는데 이들 세포를 분리하면 세포 내 유전자에도 높은 효율로 돌연변이가 도입되어 있음을 확인하였다.

특히 최근에는 유전자가위 활성 리포터의 다양화를 통해 기존의 형광 단백질을 이용한 세

포 분리를 위한 FACS 과정이 세포의 손상을 많이 일으켰던 것에 비해 다양한 세포분리 과정을 위한 유전자가위 활성 리포터 개선을 통해 상대적으로 세포에 손상이 적은 MACS 및 antibiotics-selection을 통한 유전자녹아웃 세포 농축을 가능하게 하였다.

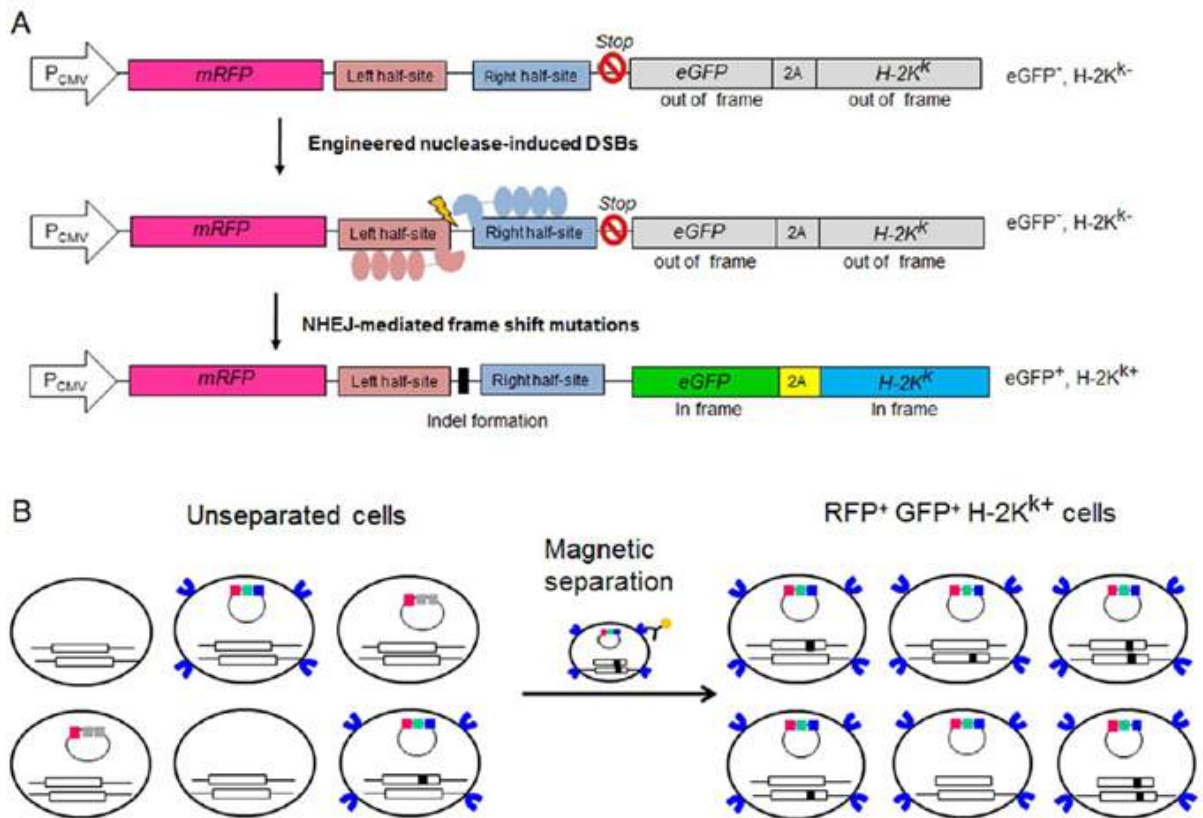


그림 51 녹아웃 세포 농축활용을 위한 유전자가위 활성 리포터

제7장 연구시설·장비 현황

- 해당사항 없으며 모두 기존 장비로 연구하였음

제8장 참고문헌

1. Prusiner, S. B. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13363-13383 (1998).
2. Prusiner, S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136-144 (1982).
3. Lledo, P. M., Tremblay, P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. & Nicoll, R. A. Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2403-2407 (1996).
4. Prusiner, S. B. et al. Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10608-10612 (1993).
5. Bueler, H. et al. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356, 577-582, (1992).
6. Manson, J. C. et al. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol* 8, 121-127, (1994).
7. Bueler, H. et al. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73, 1339-1347 (1993).
8. Weissmann, C. & Flechsig, E. PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research. *Br Med Bull* 66, 43-60 (2003).
9. Nishida, N. et al. A mouse prion protein transgene rescues mice deficient for the prion protein gene from purkinje cell degeneration and demyelination. *Lab Invest* 79, 689-697 (1999).
10. Scott, M. R., Kohler, R., Foster, D. & Prusiner, S. B. Chimeric prion protein expression in cultured cells and transgenic mice. *Protein Sci* 1, 986-997, (1992).
11. Scott, M. et al. Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes. *Cell* 73, 979-988 (1993).
12. Richt, J. A. et al. Production of cattle lacking prion protein. *Nat Biotechnol* 25, 132-138, (2007).
13. Hirata, R. K. et al. Efficient PRNP gene targeting in bovine fibroblasts by adeno-associated virus vectors. *Cloning Stem Cells* 6, 31-36, (2004).
14. Wang, S. et al. Knockdown of the prion gene expression by RNA interference in bovine fibroblast cells. *Mol Biol Rep* 37, 3193-3198, (2010).
15. Kim, T. Y. et al. Risk analysis of Bovine Spongiform Encephalopathy in Korea. *J Vet Med Sci* 67, 743-752 (2005).
16. Jeong, B. H., Lee, Y. J., Kim, N. H., Carp, R. I. & Kim, Y. S. Genotype distribution of the prion protein gene (PRNP) promoter polymorphisms in Korean cattle. *Genome* 49,

- 1539-1544, (2006).
17. Geurts, A. M. et al. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science* 325, 433, (2009).
 18. Mashimo, T. et al. Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases. *PLoS One* 5, e8870, (2010).
 19. Meyer, M., de Angelis, M. H., Wurst, W. & Kuhn, R. Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15022-15026, (2010).
 20. Watanabe, M. et al. Knockout of exogenous EGFP gene in porcine somatic cells using zinc-finger nucleases. *Biochem Biophys Res Commun* 402, 14-18, (2010).
 21. Whyte, J. J. et al. Gene targeting with zinc finger nucleases to produce cloned eGFP knockout pigs. *Mol Reprod Dev* 78, 2, (2011).
 22. Zou, J. et al. Gene targeting of a disease-related gene in human induced pluripotent stem and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 5, 97-110, (2009).
 23. Brunet, E. et al. Chromosomal translocations induced at specified loci in human stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 10620-10625, (2009).
 24. Hockemeyer, D. et al. Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 27, 851-857, (2009).
 25. Le Provost, F. et al. Zinc finger nuclease technology heralds a new era in mammalian transgenesis. *Trends Biotechnol* 28, 134-141, (2010).
 26. Santiago, Y. et al. Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5809-5814, (2008).
 27. Porteus, M. H. & Carroll, D. Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nat Biotechnol* 23, 967-973, (2005).
 28. Bae KH, Kwon YD, Shin HC, Hwang MS, Ryu EH, Park KS, Yang HY, Lee DK, Lee Y, Park J, Kwon HS, Kim HW, Yeh BI, Lee HW, Sohn SH, Yoon J, Seol W, Kim JS. Human zinc fingers as building blocks in the construction of artificial transcription factors. *Nat Biotechnol.* 21, 275-280, (2003).
 29. Park KS, Lee DK, Lee H, Lee Y, Jang YS, Kim YH, Yang HY, Lee SI, Seol W, Kim JS. Phenotypic alteration of eukaryotic cells using randomized libraries of artificial transcription factors. *Nat Biotechnol.* 21, 1208-1214, (2003).
 30. Kim HJ, Lee HJ, Kim H, Cho SW, Kim JS. Targeted genome editing in human cells with zinc finger nucleases constructed via modular assembly. *Genome Res.* 19, 1279-1288, (2009).
 31. Kim JS, Lee HJ, Carroll D. Genome editing with modularly assembled zinc-finger

- nucleases. *Nat Methods*. 7, 91, (2010).
32. Kim S, Lee MJ, Kim H, Kang M, Kim JS. Preassembled zinc-finger arrays for rapid construction of ZFNs. *Nat Methods*. 8, 7, (2011).

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.