

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001354-01

배아줄기세포 및 번식공학기법을 이용한 한우유전자원의
개량 및 보존

(Improvement and conservation of genome resources for
Korean cattle (HanWoo) using the embryonic stem cell and
reproductive biotechnologies)

서울대학교 산학협력단

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “배아줄기세포 및 번식공학기법을 이용한 한우유전자원의 개량 및 보존”
과제의 보고서로 제출합니다.

2012년 4월 9일

주관연구기관명 : 서울대학교산학협력단

주관연구책임자 : 노 상 호

세부연구책임자 : 노 상 호

협동연구기관명 : 이티바이오텍(주)

협동연구책임자 : 정 연 길

요 약 문

I. 제 목

배아줄기세포 및 번식공학기법을 이용한 한우유전자원의 개량 및 보존

II. 연구개발의 목적

본 연구는 우량한우 유래 수정란을 확보하여 수정란이식을 통해 우수한 한우를 생산함과 동시에 이 우수한 유전자원을 수정란의 형태로 보관하는 방식에 그치지 않고 생산된 배반포로부터 배아줄기세포주를 수립, 줄기세포 형태로 유전자원을 보존함으로써 체세포복제기법을 사용하지 않고도 동일 한우유전자원을 대량증식 및 유지, 보존하고 아울러 수립된 배아줄기세포를 번식공학기법과 접목, 지속적으로 한우유전자원의 보존 및 개량을 유도.

III. 연구개발 내용

- ① 한우 체외수정란유래 배아줄기세포 생산
- ② 소 단위발생 및 체세포핵이식 유래 배아줄기세포 생산
- ③ 배아줄기세포의 동결보존 및 융해 후 분석
- ④ 각종 배아줄기세포의 체내외 특성 검증
- ⑤ 줄기세포 관련 첨단 발생공학기법 연구
- ⑥ 포유동물 초기배아의 배아축 형성기전 규명
- ⑦ 동물 핵이식 배아 발생효율 향상기법 개발
- ⑧ 개체별 체외수정 프로그램 확립 및 생산 및 생산된 송아지 특성 검증
- ⑨ 수정란이식 후 임신율 향상기술 개발

IV. 연구개발결과

- ① 한우 체외수정란유래 배아줄기세포 생산
한우 체외생산 배반포를 이용한 배아줄기세포 확립 및 대량생산 (60계대 이상 증식 중인 세포주 16개 확보)
- ② 소 단위발생 및 체세포핵이식 유래 배아줄기세포 생산
 - 한우 체세포 핵이식 배반포 유래 배아줄기세포주의 수립 및 대량생산 (50계대 이상 증식 중인 세포주 9개 확보)
 - 한우 단위발생 배반포 유래 배아줄기세포주의 수립 및 대량생산 (36계대 이상 증식 중인 세포주 4개 확보)

- ③ 배아줄기세포의 동결보존 및 융해 후 분석
동결보존 및 융해 후 생존을 향상기법 확립 (Thiazovivin 처리에 의한 동결융해 후 생존 및 계대유지 효율 향상)
- ④ 각종 배아줄기세포의 체내외 특성 검증
전능성 줄기세포의 다양한 분자세포생물학적 특성 체외분석, 핵형분석 및 누드마우스 내 세포접종 후 테라토마 조직생성 유도를 통한 체내확인 결과제시
- ⑤ 줄기세포 관련 첨단 발생공학기법 연구
마우스 배아줄기세포를 이용한 뼈 및 연골 재생모델 개발
마우스 핵이식 및 동정생식 배아줄기세포 생산
한우 유도만능줄기세포 생산 시도 (후속연구과제로 진행 중)
인간치수 유래 만능줄기세포 생산 시도 (후속연구과제로 진행 중)
- ⑥ 포유동물 초기배아의 배아축 형성기전 규명
포유동물 초기배아의 배아축 형성기전 규명 (2세포기 배아의 지질분포와 발생 중 축형성과의 관계 규명)
- ⑦ 동물 핵이식 배아 발생효율 향상기법 개발
마우스 핵이식 배아 발생효율 향상기법 개발 (핵이식 수행 시 TSA의 효과 규명)
- ⑧ 개체별 체외수정 프로그램 확립 및 생산 및 생산된 송아지 특성 검증
 - 개체별 체외수정 프로그램을 통한 한우 및 젃소 대리모를 이용한 수정란이식 프로그램 개발 및 보급
 - 개체별 이력추적 시스템으로 수정란이식을 실시한 한우의 비육성적 결과 제시 및 동결융해 후 수정란을 이용한 수정란이식 후의 수태실적 제시
- ⑨ 수정란이식 후 임신율 향상기술 개발
텍사메타손과 LIF를 이용하여 모체 염증반응 억제를 유도하는 수정란이식용액 개발 및 이를 이용한 수정란이식 후 수태율 향상 프로그램 개발 (특허 출원)

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- ① 연구논문게재 성과
보고서 작성시점 현재 SCI급 국외학술지 4편, KCI급 국내학술지 8편 게재
- ② 특허출원 및 등록 성과
보고서 작성시점 현재 국내 특허 1건 출원 (출원번호 10-2011-0107543)

③ 인력지원성과

보고서 작성시점 현재 석사4인 및 학사 2인 배출 및 박사과정 진학 3인 지원

④ 추가연구 및 타 연구 활용계획

현재 ‘비배아성 만능줄기세포 생산 및 분석을 통한 가축 유전자원의 보존 및 활용’이라는 제목으로 농림수산식품기술기획평가원과제 수행중이며 본 연구과제에서 도출된 배아줄기세포의 연구결과를 후속연구의 결과물과 비교분석 예정.

⑤ 실용화, 산업화 및 교육지도홍보 등 기술 확산 계획

- 고급육 출현 한우 암소 (밀소)의 생산기반 구축을 통한 암수 양측의 한우개량 시도.
- 고능력 한우의 선진화된 수정란 선별 및 수정란 이식 관리 시스템 구축.
- 한우에서 배아줄기세포를 이용한 유전자원 보존기법개발로 새로운 한우유전자 관리시스템 구축 (embryo and stem cell banking).
- 산업체, 학계 및 지방자치단체의 협업에 의한 농업경영효율화 달성 및 축산관련 연구인력의 신규 일자리 창출과 국내 및 국제 경쟁력 강화.

⑥ 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획

- 확보한 배아줄기세포주의 최종 검증 후 (현재 마무리 단계임) 세포주은행에 등록예정.
- 향후 추가적으로 논문 (SCI급 4편) 게재예정 (2편 리뷰 중, 2편 투고예정).

SUMMARY

(영문 요약문)

I. Title

Improvement and conservation of genome resources for Korean cattle (HanWoo) using the embryonic stem cell and reproductive biotechnologies

II. Purpose

In the purpose of this project is to produce and preserve outstanding genetic traits of HanWoo such as good meat features by using embryonic stem cells which can proliferate long term in vitro without losing their properties and genetic traits.

III. Contents and scope

- ① Generation of in vitro produced embryo-derived ES cell lines in HanWoo cattle
- ② Generation of parthenogenetic and SCNT embryo -derived ES cell lines in HanWoo cattle
- ③ Cryopreservation and thawing of ES cell lines
- ④ In vivo and in vitro assays of ES cell lines to confirm their characteristics
- ⑤ Cutting edge researches of developmental biotechnology and stem cell biology
- ⑥ Investigation of early embryonic axis formation in mammalian development
- ⑦ Improvement of SCNT technology in mammals
- ⑧ Establishment of individual IVF program in cattle and their progeny test
- ⑨ Development of technology for pregnancy improvement after embryo transfer in cattle

IV. Results

- ① Generation of in vitro produced embryo-derived ES cell lines in HanWoo cattle
Establishment of 16 ES cell lines, and they are maintained over 60 passages.
- ② Generation of parthenogenetic and SCNT embryo-derived ES cell lines in HanWoo cattle
Establishment of 9 SCNT-ES cell lines, and they are maintained over 60 passages.
Establishment of 4 parthenogenetic ES cell lines, and they are maintained over 36 passages.
- ③ Cryopreservation and thawing of ES cell lines
Enhanced survival rate after freezing and thawing of the cells by Thiazovivin treatment
- ④ In vivo and in vitro assays of ES cell lines to confirm their characteristics
Confirmation of pluripotent characteristics of the cells by in vitro and in vivo assays
- ⑤ Cutting edge researches of developmental biotechnology and stem cell biology
Development of Bone regeneration potential model using murine ES cells

Generation and differentiation of androgenetic ES cell lines

Generation of iPS cells in HanWoo (ongoing next project)

⑥ Investigation of early embryonic axis in mammals

Relationship between biased lipid distribution in 2-cell blastomeres and early embryonal axis formation in mammals

⑦ Improvement of SCNT technology in mammals

Improvement of SCNT efficiency by the trichostatin A (TSA) treatment

⑧ Establishment of individual IVF program in cattle and their progeny test

Obtaining high-quality meat producing HanWoo by application of individual IVF program

⑨ Development of technology for pregnancy improvement after embryo transfer in cattle

Improvement of pregnancy rate by using novel embryo transfer solution containing LIF and dexamethasone which may attenuate inflammatory process during embryo transfer (patent is pending)

V. Outcomes and application plan

① Peer-reviewed research articles

Published 4 SCI indexed articles and 8 KCI indexed (local) articles

② Patent Application and Registration Accomplishments

One domestic patent application is pending (application number 10-2011-0107543)

③ Human resource development

Total 4 graduate students obtained master's degrees and 2 undergraduates obtained bachelor's degrees, and 3 PhD students are currently being supported from this research project (at the time point this report being prepared)

④ Further researches and applications to other related researches

We are currently conducting the project entitled "Conservation and utilization of genome resources by the generation and analysis of non-embryonic pluripotent stem cells in livestock".

⑤ Security plans for intellectual property rights such as international and local patents, strain register, and research articles, etc.

- Registration to national cell bank after final confirmation
- Publication plans of 4 or more additional peer-reviewed articles

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1	Introduction	9
Verse 1	Purposes	9
Verse 2	Necessities and Scope	9
Chapter 2	Global and national position of technical development	12
Verse 1	Current status of technical development	12
Verse 2	The status of our results	13
Chapter 3	Contents and results	14
Verse 1	Materials and methods	14
Verse 2	Results and products	16
Chapter 4	Achievement and contribution	52
Verse 1	Achievement (annual report)	52
Verse 2	Contribution to the related fields	53
Chapter 5	Outcomes and application plan	54
Verse 1	Outcomes	54
Verse 2	Application plans	56
Chapter 6	Acquisition of the information from oversea colleagues	57
Chapter 7	References	58

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	9
제 1 절	연구개발의 목적	9
제 2 절	연구개발의 필요성 및 범위	9
제 2 장	국내외 기술개발 현황	12
제 1 절	기술개발현황	12
제 2 절	기술개발현황에서 차지하는 위치	13
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	14
제 1 절	연구수행 방법	14
제 2 절	연구내용 및 결과	16
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	52
제 1 절	연구개발 목표의 달성도	52
제 2 절	관련분야의 기술발전예의 기여도	53
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	54
제 1 절	연구개발 성과	54
제 2 절	성과활용계획	56
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	57
제 7 장	참고문헌	58

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

본 연구과제는 우량한우 유래 수정란을 확보하여 수정란이식을 통해 우수한 한우를 생산함과 동시에 이 우수한 유전자원을 수정란의 형태로 보관하는 방식에 그치지 않고 생산된 배반포로부터 배아줄기세포주를 수립, 줄기세포 형태로 유전자원을 보존함으로써 체세포복제기법을 사용하지 않고도 동일 한우유전자원을 대량증식 및 유지, 보존할 수 있으며 아울러 수립된 배아줄기세포를 첨단 번식공학기법과 접목, 생물학적 위해를 최소화하면서 지속적으로 한우 유전자원의 보존 및 개량을 유도하는 것을 목적으로 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위

축산형태의 세계적 추세가 기술 집약형 산업의 형태로 전환되고 있으며 선진국의 축산 산업 시장개방이 이미 이루어진 시점에서 국내의 축산업이 현 수준의 비효율적이고 첨단산업화 추세에 뒤떨어진 상태를 벗어나지 못한다면 머지않아 기반붕괴의 위기에 봉착할 수밖에 없는 실정이다. 이에 국내 축산물의 품질개선과 생산비 절감방안의 본질적인 문제를 해결하기 위해서는 무엇보다도 대상동물의 선발강도를 극대화하여 유전형질의 개량효과 및 우수 유전형질을 가진 대상동물의 비율을 높여가면서 노동, 비용대비 생산력과 품질을 향상시키는 방안이 중요하다. 그러나 지금까지의 국내의 현행 한우 검정체계는 우수한 수소의 선별만을 중심으로 당대 및 후대검정을 통하여 우량 종모우를 선발하는 방식에만 치중하는 매우 고전적 방법을 답습하고 있어 종모우 선발지수의 정확성이 결여되는 등 개량과정에서 후진적인 방법을 벗어나지 못하고 있으며 이로 인해 한우의 산육능력이나 언급했던 노동, 비용대비 우육의 생산량이 선진국의 산업화된 생산방식에 비하면 상대적으로 비효율적인 실정이다.

따라서 이와 같은 국내 축산의 생산방식과 개량 및 유전자원 보존에서 나타나는 현실적 한계를 극복하기 위하여 첨단 번식기법인 수정란이식기술을 우량형질우의 육종체계에 도입하고 있으나, 고가의 소요비용과 공란우로 사용가능한 고능력우의 유전자원이 취약한 실정에 처해 있어 국내 축산여건에서는 실용화에 그 한계점에 봉착하고 있다. 그 동안 축산연구소의 전신인 축산시험장과 국립종축장을 비롯한 각 도 축산연구기관, 농협중앙회 가축개량사업소, 대학 등에서는 공란우 과배란처리, 수정란 동결, 직접 수정란이식 및 체외수정 등의 실용화 시험연구를 지속적으로 수행하여 많은 기술개발과 성과를 거두었다. 그러나 선진축산국가와 대등하게 발전된 국내 수정란이식기술에 비해 그 외의 번식공학적 방법을 이용한 유전자원보존 및 산업화는 이를 위한 제도와 법률개선이 뒤따르지 못하고 있어 산업계 차원에서 수정란이식회사는 활성화되지 못하였으며 우수 유전자원의 보존 현황에 있어서도 기관중심의 체내회수 수정란 동결보존이나 종모우를 관리하는 것 이외에는 마땅한 대안이 없는 상태에 머물러 있는 실정이다. 현재까지 관련대학이나 연구소, 중앙정부, 지방자치단체와 축산연구기관 등에서 막대한 예산과 연구비를 투자하여 가축을 개량하는데 있어 많은 시간과 노력을 쏟아 부었으나 기술의 편중화 및 원천기술의 부재로 인해서 가축개량에 실질적으로 이바지한 것은 아주 미미한 실정

이며, 실제로 우수 유전자원의 보존에서는 우수한 번식공학기술을 보유하고 있음에도 불구하고 여러 가지 제약에 의해 현장에서는 적용하지 못하고 고전적인 방법에만 매달려 있는 경우가 많은 실정이다. 본 연구팀의 한 축인 이티바이오텍과 장수군 유전자뱅크 내 수정란이식센터는 우수한 유전자원의 확보를 위해 국내에서 가축개량의 최 일선에 서서 활약하고 있는 가축인공 수정사, 수의사, 연구원 등으로 조직을 구성하여, 국내·외 축산기관 및 연구소와의 기술과 연구 교류를 통한 한우수정란생산 및 이식연구 등으로 축산농가현장에서 직접적으로 적용할 수 있는 체계를 갖추고 있는 곳으로 이를 중심으로 축산농가, 축산기관, 기업연구소, 단체, 대학, 중앙정부, 지방자치단체의 공공기관과의 산·학·연 공동으로 과학적이고 체계적으로 유기적인 협조 체계를 구축하여 고능력 한우의 수정란을 지속적이고 안정적으로 공급하고 있다.

수정란을 보존하는 등의 고전적인 유전형질 보존 방법에서 벗어나기 위한 대안으로 본 연구에서 제시하고 있는 것이 배아줄기세포를 이용한 유전자원 보존방법이다. 배아줄기세포란 수정란이 배반포 단계가 되었을 때 전분화능을 지닌 내부세포괴 만을 선별하여 지속적으로 증식, 배양하여 자가복제와 전분화능의 2가지 특성을 지닌 세포로 만든 것으로 1981년 마우스에서 최초로 수립되었다 (Evans and Kaufman 1981).

그 후 30여 년간 닭, 햄스터, 밍크, 돼지, 원숭이, 양 등에 이르기까지 다양한 동물에서 배아줄기세포가 만들어 졌으며 1998년에는 미국에서 인간의 수정란을 이용한 배아줄기세포 생성에 성공하였다 (Behboodi et al. 2011;Doetschman et al. 1988;Pain et al. 1996;Sukoyan et al. 1993;Thomson et al. 1998;Thomson et al. 1995;Thomson et al. 1996;Wheeler 1994). 이런 배아줄기세포는 수정란이 가진 유전형질과 동일한 유전형질을 가진 세포집단으로서 전분화능을 유지한 채로 장기간 동결보존이 가능하기 때문에 유전형질을 보존하기 위한 새로운 대안으로 제시될 수 있다. 최초로 1992년 소의 배반포를 이용해서 유사 배아줄기세포의 확립이 보고된 이후 현재까지 국내외 다수의 연구팀에서 소의 배아줄기세포를 만들었다는 연구보고가 있으나 이미 배아줄기세포 확립에 성공한 다른 동물과는 달리 현재까지 소의 배아줄기세포의 성상은 완전히 규명되지 않은 상태이다 (Saito et al. 1992). 이후 배아줄기세포 유사세포를 이용한 복제소 생산이나 키메라 생산, 배아줄기세포의 형질전환 후 핵이식을 적용한 형질전환복제소 등의 생산이 보고된 바 있다. 수컷의 형질만 보존, 전달되는 정액보존과 동일형질의 보존에 양적 한계가 분명한 수정란보존과는 달리 소에서 배아줄기세포의 확보는 한우유전자원의 반영구적 보존 및 대량증식에 의한 고능력 유전자원 확산이 가능하게 된다. 또한 이를 키메라생산, 핵이식 등의 다양한 번식공학기법과 접목하여 활용하게 된다면 한우 유전형질의 개량을 조기에 도모하여 한우의 경쟁력을 높이는 데 이바지할 수 있을 것이다. 배아줄기세포는 수정란에서 태아가 되는 부분에서 유래한 세포이므로 부계 및 모계 모두의 유전자를 동시에 보유한 세포이며 특히 우량한우유래 배아줄기세포를 이용하여 키메라 소 생산 및 핵이식에서의 공여핵원으로 배아줄기세포를 사용할 수 있게 된다면 가축개량 및 형질전환동물 생산 등에 있어서 도입된 특정형질의 후대전달 효율증대, 외래유전자도입 후 선발의 수월성 및 체세포 핵이식에 비해 정상성을 지닌 동물생산효율이 월등히 높아지는 등 첨단번식기법의 응용에 있어서 소에서 적용하기 어려웠던 부분을 상당부분 극복할 수 있을 것으로 생각된다. 특히 향후 할구 및 체세포를 이용한 핵이식이 부분적으로 산업화가 인정될 경우 체세포 핵이식에 비해 정상신생축의 생산확률이 높고 할구 핵이식에 비해 배아줄기세포 핵이식은 유전자원의 보급속도가 월등하다. 또한 핵이식을 통한 형질전환동물 생산이 법률적, 사회적 제약으로 인해 수월하지 않을 경우에도 외래유전자도입 배아줄기세포와 배반포의 키메리즘을 이용한 형질전환 키메라 소의 생산을 통한 경

우 우회적인 방법을 통한 형질전환동물의 생산도 가능할 것이다 (Takahashi and Yamanaka 2006). 소에서 배아줄기세포 생산기술을 확보하고 있는 서울대 팀을 중심으로 한 본 연구팀은 첨단기술의 하나로 최근 각광을 받고 있는 각종 동물에서의 역분화 줄기세포에 관한 연구도 수행하고 있으므로 우량한우에서의 배아줄기세포 확보는 역분화 줄기세포의 특성비교분석 등에 있어서 인간에 적용하기 전에 설치류가 아닌 타 동물종 (특히 소)을 모델로 이용하는데 기초재료로 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구과제에서는 이러한 방안의 하나로서 고능력 유전형질을 가진 우수한 한우 공란우로부터 수정란을 안정적으로 생산하고 도축장에서 폐기되는 한우의 유전자원을 개체별 체외수정 (개체별 난소채취, 체외성숙, 체외수정, 체외배양, 동결보존 등의 전 과정)을 통한 재활용과정을 통해 유전적으로 우수한 한우 수정란을 대량생산함과 동시에 이를 국내 한우사육농가에 수정란이식을 통해 확대·보급하는 수정란이식기법과 병행하여 우량 유전자원을 가진 한우 수정란 유래의 배아줄기세포를 확립 및 보존하고 나아가 확립된 한우 배아줄기세포를 이용하여 키메라생산 및 핵이식 등의 첨단번식공학기법을 이용한 한우의 개량속도 가속화를 시도하고 장기적으로 대동물에서의 형질전환동물 모델을 개발함으로써 우리나라의 고유품종인 한우에서의 유전형질 개량 극대화 및 우수 유전형질의 새로운 보존 및 후대전달방법 제시를 통하여 안정적으로 우수한 유전자원을 후대에 전달하고 이를 통해 장차 우리나라 축산업의 국제경쟁력을 향상시키고 자 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 기술개발 현황

1. 세계적 수준

일본의 경우 화우유전자 재활용으로 육질최고 등급의 A5등급의 비율이 높고, 경매가격은 인공수정비육우보다 높은 1kg에 2,000엔을 넘는 수준으로 마리당 100만엔 (약 9,000,000원)이 넘는 결과를 보여 지방자치단체와 일본농협 (JA)에서 체외수정란을 활용한 사업을 지속적으로 추진하고 있다. 체외수정에 의한 우수 유전자 재활용으로 화우의 육질 최고등급인 A5로 확정된 비율은 70%로 일반적인 인공수정에 의한 A5등급의 비율인 44.2%에 비하면 획기적으로 높게 나타난다. 이에 시험 농가에서는 고급육이 판정된 우수유전자원으로 체외수정란 수정란을 이식하면 대부분 A5를 예상한다. 체외수정란유래 비육우는 연간 2,000두 (농림성조사) 전후이다. 이는 인공수정으로 태어난 비육우의 10%에도 못 미치는 숫자이지만, 10년 전에 비해 2배정도 증가했다. 미국에서는 2000년 현재 133개소의 수정란이식회사에서 37,680두의 공란우로부터 237,181개의 수정란을 회수하고, 수정란이식회사당 연간 283두의 공란우에서 수정란을 채란하고 있다. 소에서 배아줄기세포 또는 핵이식의 경우 관련법령 등의 모호함으로 인해 상업화 여부를 비롯하여 나라별로 많은 차이를 보이고 있고 있으나 현재 미국과 일본에서 핵이식의 경우는 체세포 핵이식으로 태어난 동물도 식육으로 사용하여도 무방하다는 결론을 내린 바 있으며 대다수의 포유동물에서 배아줄기세포를 공여핵으로 활용할 경우 핵이식 산자의 정상성이 체세포 핵이식의 경우보다 월등히 높아지고 형질전환 또한 수월하므로 인간의 질병치료에 있어서 역분화줄기세포가 점차 배아줄기세포를 대체해가고 있는 것과는 달리 산업동물에서의 배아줄기세포의 활용에 대한 관심은 현재도 높은 수준에 놓여있다. 배아줄기세포의 경우 연구목적으로는 배아줄기세포 유사세포의 수립 및 이의 분석과 관련된 기초적인 단계의 연구가 진행되고 있으나 배아줄기세포의 활용에 해당되는 주요 적용영역은 실험실 수준에서 연구가 진행되고 있으며 실제 산업현장으로의 적용에 꼭 필요한 체내에서의 검증은 초기수준에 머물고 있다.

2. 국내수준

국내에서는 국립종축원에서 능력이 우수한 젖소 공란우에서 채취한 수정란을 수란우에 이식하여 1983년 4월 국내최초로 수정란이식 유래 젖소 송아지를 생산한 바 있으며 이후 많은 성과보고가 있으나 유전자 재활용으로 고급육이 판정된 수정란을 생산하는 곳은 본 연구의 협동연구팀인 이티바이오텍을 제외하면 활동이 미미한 실정이다. 다만 통계에 의하면 능력이 확인되지 않은 도축우의 난소를 이용한 체외수정란의 생산 및 수정란이식은 2004년도를 기준으로 총 25,000두에 이르렀다 (농촌진흥청 통계). 체외수정란 이식은 2004년도를 기준으로 세계에서 가장 많은 수의 수정란을 공급, 이식한 상태이나 가축개량 측면에서는 결과가 전무한 상태이고, 한우의 수적인 증가에만 기여했다고 볼 수 있다. 개체별 유전자 재활용 연구는 국내에서는 본 연구팀에서만 유일하게 2003년부터 능력이 우수한 개체별 난소를 활용한 고급육수정란 생산을 통해 진행하고 있으며 관련 연구결과를 학술대회를 통해 다수 발표한 바 있으며 체외 배양시스템 또한 세계적인 수준으로 국내 축산기술연구소 및 위생시험소 4곳

과 민간 기업에 기술컨설팅을 실시하고 있으며 국외에도 기술지도를 수행하고 있다. 한우에서의 유전자원 보존을 위한 목적의 우량 한우수정란 유래 배아줄기세포주 수립 및 번식공학적 적용에 관한 연구는 미, 일 연구진과 마찬가지로 기초연구를 수행하는 연구팀이 일부 있으나 극히 제한적으로 수행되고 있는 상황이며 본 연구팀에서도 본 연구과제 수행 이전부터 배아줄기세포주를 확립하는 기초기술을 이미 확보하여 본 연구과제를 통해 개체별 체외수정, 체내회수란 등 다양한 종류의 수정란을 이용하여 배아줄기세포주를 수립하였으며 후속적으로 이를 적용하기 위한 연구를 지속적으로 진행 중에 있다.

제 2 절 기술개발 현황에서 차지하는 위치

본 연구는 현재 생명과학분야에서 가장 관심을 가지고 있는 줄기세포와 관련된 연구 분야의 하나로서 기반기술이 확보될 경우 줄기세포와 관련된 다양한 분야에 응용이 가능할 것으로 판단되며 인간배아줄기세포와 유사한 특성을 지닌 소 배아줄기세포의 확보는 인간배아줄기세포 및 만능줄기세포를 활용하는 의학분야에서도 사전기초연구를 수행하는데 크게 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

제 3장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 연구수행 방법

1. 과배란 처리에 의한 체내수정란 생산

체내수정란 생산을 위해서 사용된 공란우는 장수 한우 영농조합법인의 고능력우와 장수군 유전자뱅크 내 고능력우에서 사육중인 한우를 공시한다. 공란우의 처리는 발정발현과 무관하게 Progesterone releasing device인 CIDR(InterAg, NZ)를 질 내에 삽입하고 CIDR 삽입 7~8일째부터 FSH(Antorin R-10, Kawasaki, Japan) 24 AU를 감량법으로 12시간 간격으로 4일간 분할 근육 주사하고, FSH투여 5회째에 PGF2 α 2.5mg, 6회째에 15mg을 투여하여 7회째에 CIDR를 제거한다. 발정정후를 나타내는 공란우는 12시간 간격으로 2회 인공수정을 실시하고, 인공수정 후 7일째 비외과적인 방법으로 수정란을 채란한다.

2. 개체별 체외수정

가. 개체별 난소채취

난소를 암소 개체별로 분류하여 미성숙난포 내 난자를 채취, 22시간 성숙배양과정을 거쳐, 다음날 등급판정사가 판정한 등급판정기록표와 대조하여 1+이상 (근내지방: 6-9)인 개체만을 선별하여 체외수정란을 생산한다.

- 실험실에서 37°C의 생리식염수가 들어있는 보온병, 해부도, 타올, 여과지, 가운, 장화를 준비한다.

- 도축장에서 난소를 개체별로 채취하여 여분의 결체조직을 제거하고 멸균타올로 혈액과 오염된 부분을 닦아낸 뒤 여과지로 혈액 및 수분을 한 번 더 흡수시키고 보온병에 넣어 한 시간 내로 실험실로 운반한다.

나. 난포 내 난자채취

- 도축장에서 개체별 채취한 난소를 생리식염수로 2-3회 세정한 후 멸균여과지로 수분을 흡수시키고 18 gauge needle이 연결된 10 ml 주사기로 난자를 흡인한다.

- 흡인된 난자가 포함된 난포액을 35 mm dish에 놓고 실체현미경 하에서 난구세포에 둘러싸인 직경 2-8mm의 미성숙난포를 선별한다.

다. 난포 내 난자의 성숙배양

- 5%의 FBS가 첨가된 HP-199을 성숙배양액으로 준비한다.

- 4-well dish에 5 μ g/ml의 FSH 및 1 μ g/ml의 estradiol-17 β 를 첨가하고 각 well 당 0.9 ml의 성숙배양용 HP-199을 분주한다.

- 각 well 당 개체별 난자를 넣어 22시간 배양한 후 체외수정을 한다.

라. 개체별 우량 유전자선발

- 도축 후 익일 등급 판정소로부터 소 도체등급 판정기록표를 받아 등록우 별 우량형질을 선별한다.

- 혈통등록우를 기준하여 산육능력, 체형, 로스의 단면적, 등지방 두께, 근내지방 (육색, 지방색, 조직감, 성숙도) 및 지육중량을 중점적으로 분석하여 우량형질을 선별한다.

마. 체외수정

- 체외수정은 BO액을 개량한 Hoshi 등 (2002)의 방법으로 실시한다. 동결정액을 37°C의 온수에 45초간 용해한 후, IVF 100으로 2회 세정하고 각각의 배양액 100 μ l 미소적에 20개씩 5-6시간 수정시킨다.

바. 체외배양

- 저산소분압의 배양환경 하에서 (O₂, 5%, CO₂, 5%) IVD 101 배양액 (일본, 펩티트연구소)로 7-9일간 배양하여 배발생율을 조사하고 동결한다.

3. 수정란이식 및 송아지생산

- 한우 및 젃소대리모에 자연발정 및 발정주기 동기화 처리로 수정란이식을 수행한다.
- 수정란이식 후 45-60일에 직장검사법에 의한 태막 및 양막낭 촉진과 초음파진단으로 수태여부 및 태아수를 판정한다.

4. 소 배아줄기세포주 확립

- 과배란 유도 및 인공수정 후 또는 체외수정 및 배양 7일 쯤의 초기-중기 배반포 소 수정란을 수거한 후 화학적 또는 기계적 방법으로 투명대를 제거한다.
- 투명대가 제거된 배반포를 30G 바늘을 사용하여 내부세포괴 (ICM)를 분리하고 mitomycin-C로 처리된 STO feeder layer위에 seeding한다. 이후 미리 준비된 배아줄기세포 배양액을 넣어주고 39°C, CO₂ 배양기 내에서 배양, 세포부착을 유도한다.
- 부착 후 콜로니 형성이 관찰되면 새로이 준비된 feeder로 옮겨 계대배양을 실시한다.
- 다양한 소분자물질이 포함된 배양액을 이용(연구결과에서 설명), 수차례 (5~6) 계대를 통해 명확한 모양을 가지는 콜로니가 확인될 경우 배아줄기세포를 검증하는 다양한 체내외 실험기법을 이용하여 (ALP 염색, Oct4, Nanog 및 SSEA gene family 발현 확인, nude mouse 접종 후 teratoma 형성확인) 배아줄기세포로의 확립 여부를 확인한다.

5. 배아줄기세포주의 동결보존

- 검증된 배아줄기세포는 대량증식을 유도한 후 계대배양 단계별로 동결보존을 실시한다.
- 동결은 마우스 및 인간 배아줄기세포 동결보존법에 준하여 아래와 같이 실시한다. 먼저 0.05% trypsin을 보존할 배아줄기세포에 처리하여 배양접시로부터 feeder와 함께 분리해 내고 분리된 배아줄기세포를 10%의 DMSO가 들어있는 배양액에 넣어서 -70°C의 저온 냉장고에서 2일간 보관한다. 이후 액체질소탱크로 옮겨 액체질소 내에서 보관한다.
- 동결보존된 세포의 일부를 회수하여 급속용해한 후 feeder 위에서 재배양하여 생존성 여부 및 생물학적 성상을 재확인한다.

6. 확립된 배아줄기세포를 이용한 첨단 번식공학기법의 활용

가. 배아줄기세포 키메라 수정란 생산

- 미세조작기를 이용, 동결용해 후 재배양한 배아줄기세포를 7일째 초기 배반포의 내강에 주입하거나 8-16세포기 수정란의 주란강 (perivitelline space)에 주입하여 키메라수정란 형성을 유도한다.

제 2 절 연구내용 및 결과

1. 한우 배반포의 내부세포괴를 효과적으로 선별, 증식유도하는 방법 및 내부세포괴의 최적 증식효율을 보이는 배양액 조성 및 배양조건 개발

가. 소 배아줄기세포 확립을 위한 내부세포괴(ICM) 분리 방법 개선 및 배양조건 확립

(1) 체외수정란 배아줄기세포 확립

(가) 30G needle을 이용한 ICM 분리

기존에 많이 사용하는 방법으로 pH 2의 acid tyrode 용액에서 투명대를 제거한 후 30G needle 를 이용하여 ICM를 분리하여 seeding하였다. 이와 같은 방법은 ICM이 명확히 보이고 질이 좋은 배반포에서 사용이 가능하였고 큰 장비의 필요 없이 숙달된 실험자가 쉽게 적용할 수 있는 방법이다 (그림 1).

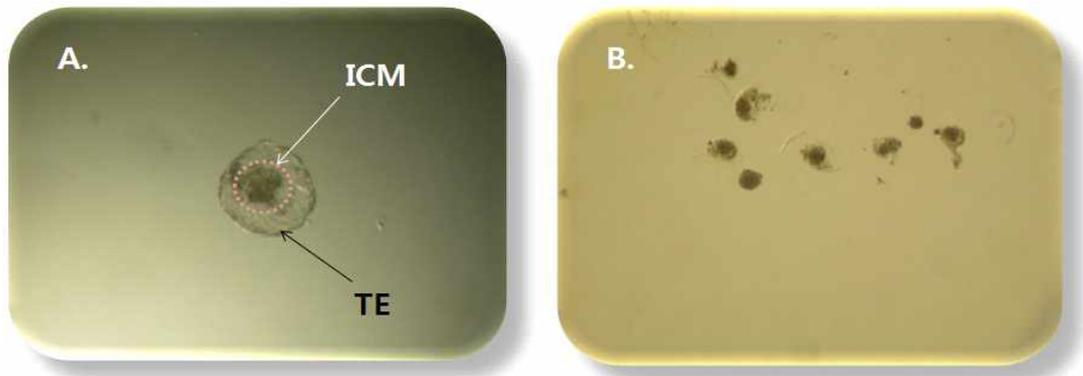


그림 1. 30G needle을 이용한 소 체외수정란에서의 ICM 분리. A. ICM: 내부세포괴, TE: 영양세포층, B. needle을 이용하여 분리된 ICM의 모습.

(나) 미세조작기를 이용한 ICM 분리

미세조작기에 미세한 blade를 달아서 빠르고 손쉽게 ICM를 분리하였다. 이와 같은 방법은 needle을 이용한 방법보다 정교하고 일률적으로 한 번에 많은 수를 분리할 때 좋은 방법으로 사용이 가능하다. 또한 투명대를 제거하지 않고 한 번에 one-step으로 ICM를 분리 할 수 있으므로 효율적이고 acid Tyrode' s solution에 의한 세포손상도 최소화 할 수 있다 (그림 2).

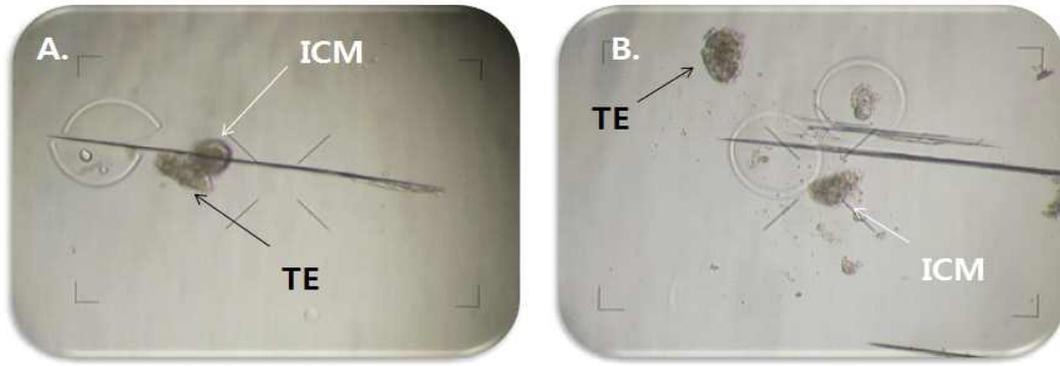


그림 2. 미세 blade를 이용한 소 체외수정란의 내부세포괴 (ICM) 분리. A: 이 등분할을 통해 ICM 영역을 분리하는 모습. B: 분리된 ICM 및 영양세포층 (TE).

나. 고능력 한우 수정란을 이용한 배아줄기세포의 생산

(1) 한우 배반포를 통한 줄기세포 확립

본 연구에서는 선행연구를 통해 확립된 소 체외수정, 단위발생 및 핵이식 기법을 이용하여 한우에서 배반포를 생산, 배아줄기세포주의 확립에 자원으로 활용하였다. 먼저 우량 등급의 한우 체외수정란을 생산하여 배아줄기세포의 확립에 이용하였다. 초기에는 인간배아줄기세포에 사용되는 수준의 소태아혈청 (FBS)이 첨가된 배양액에서 배아줄기세포를 유도하였으나 이와 같은 방법을 적용할 경우 세포주의 확립효율이 떨어지고 FBS의 품질 및 batch에 따라서 세포주 확립의 효과 및 세포주 유지 정도의 편차가 심하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 단점을 극복하여 효율성을 높이고 반복재현 가능한 결과를 획득하고자 신호경로 억제를 통해 배아의 전능성을 유지하여 배아줄기세포 확립을 높일 수 있는 기술을 적용하여 소 배아줄기세포의 생산을 유도하였다. 일반적으로 줄기세포가 갖고 있는 전능성을 유지하기 위해서는 Wnt- β -catenin 경로, MEK-ERK 경로, Tgf3 β 경로 등이 주로 연관이 되어 있다고 보고되고 있다. 최근 Pashaiasl M al.,(2010) 그룹에서 발표한 연구 자료에서는 이중 직접적으로 전능성-분화 경로와 관련된 분자 ERK1/2, FGFR, 그리고 GSK3 β 관련 억제제(inhibitor)를 이용해 각 경로의 차단을 통해 단위발생란에서 배아줄기세포 확립 및 유지를 보고 하였다. 본 연구실은 이러한 연구 사실을 바탕으로 여러 가지 배양조건을 조합하여 한우에서 각종 배아줄기세포를 확보하였다. 먼저 기존의 3i라고 알려진 PD184352(MEKi), SU5402(FGFRi), CHIR99021(GSK3 β i)를 지지세포 위에 붙인 배반포에 처리하여 배양을 유도하였다. 이러한 억제제에 의해 초기 콜로니가 형성이 되었고 5~7일 사이로 계대배양을 실시하였다. 또한 신호경로 제어물질을 이용한 초기 배아줄기세포의 형성 후 줄기세포의 안정적 증식, 콜로니 형태유지 및 세포손상 감소를 위해 FBS 또는 serum knockout replacement (KSR)를 기반으로 화학물질 없는 배양액으로 교체 후 줄기세포를 유지(2-Step) 시켰다.

표 1. 신호경로 제어물질의 처리 조건에 따른 세포 부착 및 증식력 비교

종류	최대유지 계대	계대 주기	특징
신호경로 억제제 (3i) 첨가군	Passage 50	4-5일	<ul style="list-style-type: none"> 부착력이 2-step 보다 상대적으로 좋음 Seeding 또는 계대 후 죽는 세포들이 많음 부착 후 증식력 좋아 커다란 콜로니 형성
2-Step	Passage 5	6-7일	<ul style="list-style-type: none"> 억제제 첨가그룹보다 부착력이 약해 계대 후 많은 세포 잔해(debris) 관찰 억제제 첨가 그룹보다 증식력이 약함 억제물질 처리 그룹과 유사한 콜로니 유지 가능

다음으로 다양한 방법으로 생산된 배반포를 통해 줄기세포를 확립하고자 하였다. 지금까지 줄기세포를 얻고 배양하는 방법은 주로 사람이나 마우스에서 얻는 방법을 바탕으로 하였다 (Anand et al. 2011; Cao et al. 2009; Munoz et al. 2008; Wang et al. 2005; Yadav et al. 2005). 본 연구실에서도 역시 줄기세포를 확립하기 위해 현재 알려진 줄기세포 배양법의 변형을 통해서 시도했다. 변형된 줄기세포 배양액은 아래 표 2와 같다.

표 2. 한우 유래 줄기세포 배양을 위한 변형된 기존 배양액

	DF12	KO	KO serum	FBS	NEAA	2-Me	L-Glu	LIF	bFGF
Medium A	○			○	○	○	○		○
Medium B		○	○		○	○	○		○

그러나 표 2과 같은 배양액에서 자란 한우 배아 유래 줄기세포는 그림 3과 같이 초기에 콜로니를 보였으나 장기 배양 시 실패해 줄기세포를 활용하는데 문제가 보였다. 즉 이러한 배양액 조성은 한우유래 배아줄기세포 배양에 적합하지 않았다.

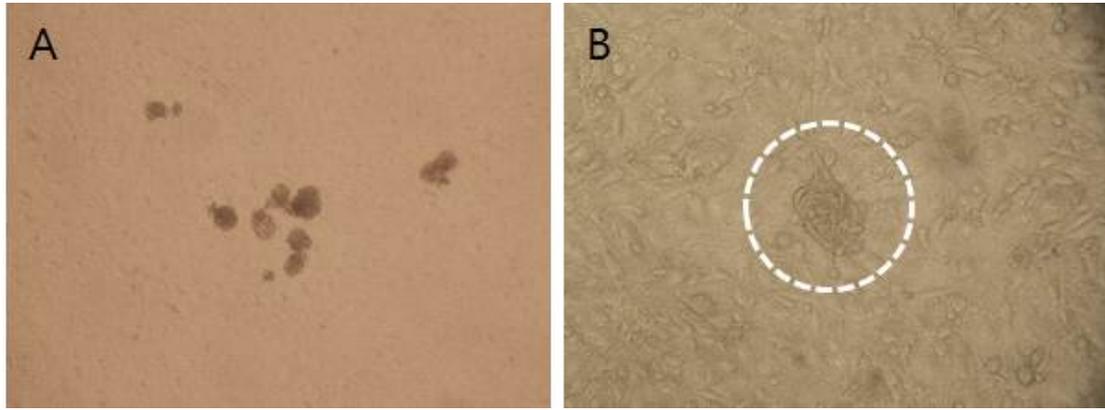


그림 3. 변형된 기존 배양을 통한 한우 배아줄기세포. A: 배아줄기세포 생산을 위해 배반포를 배양보조세포 위에 올려놓은 형태. B: 계대를 2회 넘긴 후 세포괴의 모습 (점선 내부).

(2) 분화관련 신호경로 제어 소분자물질의 처리를 통한 한우 배아줄기세포 확립

사람과 마우스 유래 배아줄기세포는 그 형태가 다르며 최근에는 전능성의 상태 또한 각각 primed state와 ground state로 달리 설명하고 있다. 그러나 두 배아줄기세포 모두 자기 재생능력을 유지하고 분화를 억제하면서 배아줄기세포 성향을 유지하고 있다. 본 연구실에서는 이러한 점에 착안하여 한우 유래 배아줄기세포의 분화를 억제해 그 줄기세포 성향을 유지하고자 하였다. 먼저 다양하게 발견된 분화관련 신호경로 제어 소분자물질을 조사하여 몇 가지 조합으로 실험을 진행하였다. 먼저 다른 동물에서 이미 알려진 세 가지 신호경로 제어물질인 PD184352 (P1), SU5402 (SU) 그리고 CHIR99021 (CH) 즉 3i를 양성대조군으로 이용하여 실험을 진행하였고 다른 그룹에서는 P1의 대체물로 효과적인 MEK 특이 억제물질로 알려져 있는 PD98059 (P9)를 이용해 배양을 시도하였다 (Ying et al. 2003; Ying et al. 2008; Pashaiasl et al. 2010). 이들 신호경로 제어물질은 각각 줄기세포 분화와 관련이 있는 GSK-3 β , MEK 그리고 FGF signal을 억제하는 것으로 분화의 핵심적 신호를 억제해 줄기세포를 유지하고자 하였다.

표 3. 신호경로 제어 소분자물질을 통한 한우 유래 배아줄기세포 배양액

	P1	P9	SU	CH	B27	N2	Colonies	
							Generation	Maintenance
Medium 1	○		○		○	○	○	
Medium 2	○			○	○	○	○	
Medium 3	○		○	○	○	○	○	○
Medium 4		○	○	○	○	○	○	○

*P1 - PD184352, P9 - PD98059, SU - SU5402, CH - CHIR99021

초기 억제 소분자를 통한 한우 유래 배아줄기세포 배양액을 구축하기 위해 몇 가지 조합과 진행한 결과는 표 3와 같다. 위 표에서 보는 것과 같이 한우 유래 배아줄기세포 콜로니를 유지는 분화와 관련 있는 세 가지 신호를 모두 차단한 Medium 3과 4에서 가능하였다 (표 3). 즉 한우 유래 배아줄기세포 주 유지를 위해서는 세 가지 소분자물질을 사용해야 가능했다. 이렇게 세 가지 소분자 억제물질을 통한 배양법은 체외 수정 유래 배반포 뿐만 아니라 단위발생과 핵이식 법 유래 배반 포에서도 콜로니를 유지 할 수 있었다. 표 4에서와 같이 세포주 수립에 있어 Medium 3과 새로운 조합인 medium 4의 유의적 차이는 없으며 두 그룹 모두 초기 배아줄기세포 콜로니를 높은 효율로 확립했을 뿐만 아니라(81.2%, 76.6%) 장기배양 (60 계대 이상, 75.0%, 73.3%)에도 적합하였다. 이러한 결과는 일반적인 과거 연구결과인 30-50%와 비교해 볼 때 획기적으로 높은 결과로 볼 수 있다.

표 4. 한우 유래 배아 줄기세포 확립 및 장기 배양 효율

Group	Total blatocyst	Early passage		Over 60 passage	
		Number	%	Number	%
Medum 3 (P1)	32	26	81.2	24	75.0
Medium 4 (P9)	30	23	76.6	22	73.3

*P1 - PD184352, P9 - PD98059

(3) 한우 배아줄기세포 형태학적 특징

분화 신호경로 제어 소분자물질이 첨가된 배양액에서 유도된 한우 배아줄기세포 콜로니의 형태는 그림 4와 같다. 전체적인 형태는 사람 줄기세포 주와 유사하였다 (그림 4-C). 그러나 사람과는 다르게 일부 세포들은 커다란 크기를 보이며 전체적으로 세포가 질긴 것과 같은 성질을 나타내어 계대를 넘기는 것이 용이하지 않았다 (그림 4-F). 그림에서 보는 바와 같이 콜로니는 뚜렷한 경계를 보이며 복층으로 보이는 내부와 단층으로 보이는 외부로 나눌 수 있다 (그림 4-C). 내부 복층은 주변 단층을 이루는 세포와 달리 작고 컴팩트한 형태의 세포가 작은 클럼프 (clump) 형태로 모여 존재하였다 (그림 4-E). 이러한 콜로니 형태는 수정란, 단위발생란 및 핵이식란 등 세 가지 다른 기원의 배아줄기세포 모두에서 공통적으로 보여 배아의 기원에 따른 형태적 차이는 확인되지 않았다. 이러한 결과는 핵이식 배반포에서 유래한 한우 배아줄기세포 역시 정상 체외수정란을 통해 만들어진 배아줄기세포와 형태적으로는 차이가 없다는 것을 나타낸다.

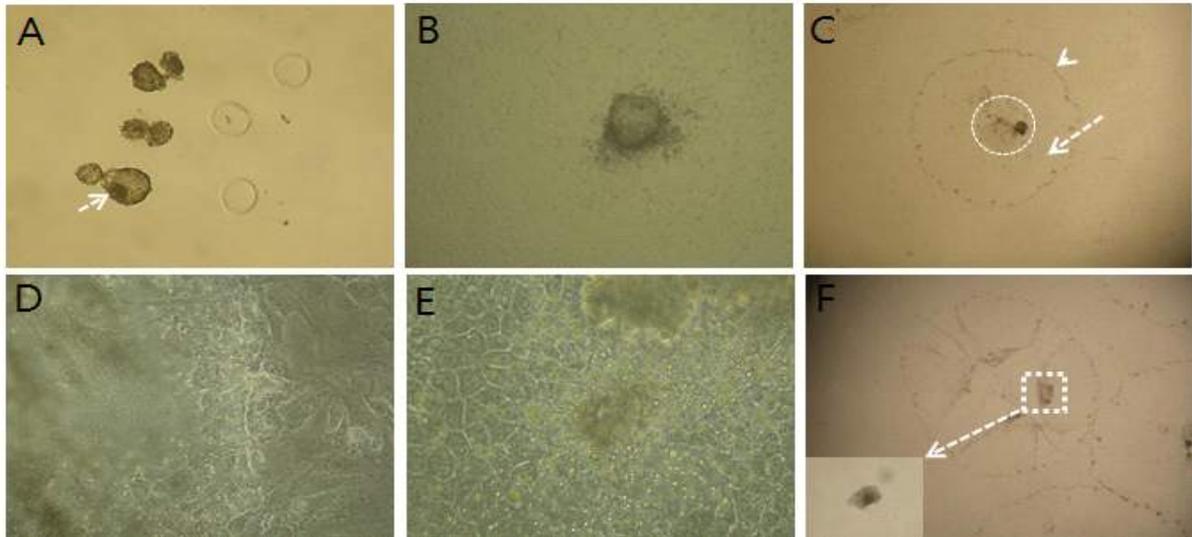


그림 4. 억제 소분자 배양액을 통한 한우 유래 배아줄기세포. A: 투명대를 제거한 배반포. B: Seeding 후 24 h. 초기 콜로니 형성을 위한 배반포의 outgrowth. C: 초기 콜로니의 모습. 점선을 중심으로 내부와 외부 (화살표) 로 구분. D: 콜로니 경계를 확대한 모습. 배양보조 세포에 비해 밝은 색을 보임. E: 콜로니의 내부를 확대한 모습. 일부 주변보다 더 작은 세포덩어리가 존재함. F: 계대를 넘기기 위해 콜로니를 작은 조각으로 자른 모습. 좌측하단 상자는 계대를 넘긴 후 모습.

다. 한우 배아줄기세포 생산을 위한 단위발생 및 핵이식 배반포 생산

(1) 한우 배아줄기세포 생산을 위한 단위발생란 생산

본 연구에서는 단위발생란의 생산효율을 향상시키기 위해 활성화방법, 배양조건 및 체외배양 시 배양기 내 산소분압 등 다양한 요인들을 조사하였다. 관련된 조건을 이용한 실험결과는 다음과 같다.

(가) 활성화 조건에 따른 단위발생란 생산

① 본 연구에 적합한 조건을 확립하기 위해 전기자극과 화학적 방법을 병행한 방법과 화학적 방법만 단일 처리한 방법을 비교하였다. 화학적 단일 처리에 따른 실험결과 전기자극과 화학적 방법을 병행처리한 방법에 비해 활성화 이후 분할율 (57.7% vs 44.6%)과 배반포 발육률 (26.6% vs 18.3%)이 높게 나타났다 (표 5).

표 5. 활성화 방법에 따른 소 단위발생 배반포 생산

Activation conditions*	No. of oocytes	No. (%) of parthenotes developed to		
		Cleaved	2-8 cells	Day 7 blastocysts (% from 2-cells)
Electric pulse +Chemical	404	180 (44.6)	121	33 (18.3)
Chemical	333	192 (57.7)	141	51 (26.6)

*Electric pulse : 100 V/mm, 40 μ sec in 0.3 M Mannitol solution.

Chemical : 5 μ M Ca²⁺-inophore for 5min + 2.5 mM 6-DMAP for 3 h.

② 본 실험에서 화학적 활성화를 위해 사용한 Ca^{2+} -ionophore의 농도에 따른 단위발생 배반포 발육률을 조사한 결과 10 μM Ca^{2+} -ionophore의 처리가 5 μM Ca^{2+} -ionophore 처리에 비해 높은 분할율 (65.5% vs 40.3%)과 배반포 발달율 (29.8% vs 24.0%)을 나타내어 (표 6) 최종적으로 위의 두 실험결과를 바탕으로 한 조건 하에서 단위발생 배반포 생산을 위한 화학적 활성화처리 조건을 확립하였다.

표 6. Ca^{2+} -ionophore의 농도에 따른 단위발생 배반포 발육률

Activation conditions*	No. of oocytes	No. (%) of parthenotes developed to		
		Cleaved	2-8 cells	Day 7 blastocysts (% from 2-cells)
5 μM Ca^{2+} -ionophore	62	25 (40.3)	19	6 (24.0)
10 μM Ca^{2+} -ionophore	87	57 (65.5)	40	17 (29.8)

*5 μM Ca^{2+} -ionophore : 5 μM Ca^{2+} -ionophore for 5min + 2.5 mM 6-DMAP for 3 h.

5 μM Ca^{2+} -ionophore : 10 μM Ca^{2+} -ionophore for 5min + 2.5 mM 6-DMAP for 3 h.

(나) 배양 시 산소분압조건이 단위발생란의 체외발육에 미치는 영향

- 일반적으로 세포배양을 위한 탄산가스배양기 내의 산소분압은 20% 전후로 고정되나 동물 종에 따라 수정란의 체외배양은 저산소분압 하에서 유도되기도 한다. 본 실험에서는 5% 산소분압을 사용해 단위발생란의 발달에 미치는 영향에 대해 실험한 결과 저산소분압 (5% O_2) 하에서의 체외배양이 높은 배반포 발육률 (20.3% vs 2.6%)을 나타내어 (표 7) 이후 단위발생 배반포 생산을 위한 체외배양에 5% 산소분압조건을 적용하였다. 특히 5% O_2 하에서 체외배양 시 배양 6일째 배반포가 다수 확인되어 발육속도 또한 5% O_2 하에서 향상된 것으로 확인되었다.

표 7. 배양 시 산소분압조건이 단위발생란의 체외발육에 미치는 영향

Oxygen concentration in incubator*	No. of oocytes	No. (%) of parthenotes developed to			
		Cleaved (%)	2-8 cells	Blastocysts on Day 6	Day 7 blastocysts (% from 2-cells)
20%	302	116 (38.4)	85	0	33 (18.3)
5%	524	231 (44.1)	158	22	51 (26.6)

*20% O_2 : 5% CO_2 +20% O_2 in air.

5% O_2 : 5% CO_2 + 5% O_2 +90% N_2 in air.

(다) 체외배양조건에 따른 단위발생란 생산

- 체외배양 시 insulin, transferrin 및 selenium 복합체 (ITS)가 단위발생란의 체외발육에 미치는 영향을 알아보기 위하여 본 연구실의 체외수정란 시 첨가하는 활성화 후 배양액에 ITS (1% v/v ITS complex 100x, Sigma)를 첨가하여 체외배양을 실시하였다. ITS 복합체는 일반적으로 세포의 성장유도 및 항산화효과를 위해 세포배양 시 사용되며 본 연구진은 소 체외수정란의 체외배양에 이를 적용하여 결과를 확인한 바 있다 (Roh et al., 1998). 본 실험에서 단위발생란의 체외배양 시 ITS를 첨가한 결과 무첨가군에 비하여 높은 분할율 (66.7% vs 51.1%)과 배반포 발육률 (30.5% vs 25.5%)을 나타내었다 (표 8).

표 8. 배양조건에 따른 단위발생란의 생산

Culture conditions	No. of oocytes	No. (%) of parthenotes developed to		
		Cleaved	2-8 cells	Day 7 blastocysts (% from 2-cells)
Control	184	94 (51.1)	70	24 (25.5)
ITS addition	123	82 (66.7)	57	25 (30.5)

따라서 본 연구에서 단위발생 배아줄기세포생산을 위한 단위발생 배반포 생산조건은 10 μ M Ca^{2+} -ionophore를 이용한 난자의 활성화, ITS가 첨가된 배양액 및 5% 산소분압 하에서의 체외배양 실시로 최종 확정하여 이후 배아줄기세포 생산유도 실험에 공여하였다.

(2) 한우 배아줄기세포 생산을 위한 핵이식란 생산

(가) 핵이식란 생산을 위한 융합조건 확립

전기세포융합장치 (ET3, Japan)를 이용하여 탈핵 및 체세포 핵의 위란강 내 주입이 완료된 난자의 공여세포와 세포질 융합을 유도하였다. 전기융합 완충액은 0.1 mM $CaCl_2$ 및 0.5 mM $MgCl_2$ 가 첨가된 0.26 ~ 0.3 M Mannitol 용액을 사용하였으며 본 완충액 내에서 2 ~ 3분간 재구축배의 평형을 유도한 후, 핵이식란을 전기융합용 needle을 이용하여 양 needle 사이에 핵이식란을 위치한 후 (그림 5) 핵은 전극의 양극(+)쪽으로 향하게 하고 세포질은 음극(-)쪽으로 향하게 하여 전기자극을 가하였다. 먼저 통전시간을 고정된 후 (20 μ sec) 각기 다른 전압 하에서 실시하였으며 그 결과 재구축배의 융합율은 다른 통전전압에 비하여 26 ~ 27 V/20 μ sec 하에서 상대적으로 높게 나타났다 (52.9-59.7%, 표 9). 또한 26 V로 전압을 고정된 상태에서 통전시간을 각각 20, 25 및 30 μ sec로 적용한 결과 25 μ sec의 통전시간이 보다 높은 융합율을 나타내어 (표 10) 본 조건을 향 후 핵이식란 생산에 적용하였다.

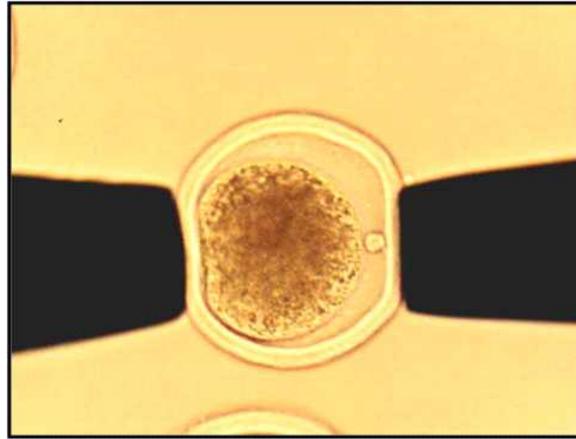


그림 5. Needle을 사용한 전기융합.

표 9. 소 핵이식 재구축배의 전기융합 시 통전전압에 따른 세포융합율

Electric pulse*	No. of oocytes	No. (%) of reconstructed oocytes	
		Fused (%)	Not fused
10V	36	0 (0)	36
15V	36	0 (0)	30
18V	54	10 (18.5)	36
19V	18	2 (11.1)	14
20V	52	12 (23.1)	14
25V	119	46 (38.7)	23
26V	139	83 (59.7)	56
27V	68	36 (52.9)	32
30V	27	5 (18.5)	9
40V	16	1 (6.3)	2

*Pulse duration: 20 μ sec.

표 10. 소 핵이식 재구축배의 전기융합 시 통전시간에 따른 세포융합율

Duration of electric pulse*	No. of oocytes	No. (%) of reconstructed oocytes	
		Fused (%)	Not fused
20 μ sec	43	4 (9.3)	23
25 μ sec	27	5 (18.5)	9
30 μ sec	16	1 (6.3)	2

*Voltage: 26 V, DC.

또한 융합용 완충액을 0.3 M mannitol 및 Zimmermann 's cell fusion medium 두 가지를 사용하여 비교 실험한 결과 mannitol 완충액에 비해 Zimmermann 's cell fusion medium이 유의적으로 높은 융합율 (48.4% vs 91.1%)을 나타내었다 (표 11).

표 11. 전기융합 완충액의 종류에 따른 핵이식 재구축배의 세포융합율

Fusion buffer*	No. of oocytes	No. (%) of reconstructed oocytes	
		Fused (%)	Not fused
Mannitol	128	61 (48.4)	66
Zimmermann	45	41 (91.1)	4

*Mannitol: 0.1 mM CaCl₂ + 0.5 mM MgCl₂ + 0.3 M Mannitol solution.

Zimmermann : 0.28 M Sucrose + 0.5 mM Mg(C₂H₃O₂)₂·4H₂O + 0.1 mM Ca(C₂H₃O₂)₂ + 1.0 mM K₂HPO₄ + 0.1 mM glutathione.

(나) 핵이식란 생산을 위한 융합 후 활성화 조건 확립

단위발생에서 적용하였던 방법을 이용하여 핵이식 재구축배의 활성화를 유도하였다. 각각 5 및 10 μM Ca²⁺-ionophore를 이용하여 재구축배의 활성화를 유도한 결과 단위발생란과는 달리 ionophore의 농도에 따른 배반포 발육률의 차이는 확인되지 않았다 (표 12). 이는 전기융합 이후 활성화를 유도함으로써 말미암아 융합 완충액 내의 미량의 칼슘이온이 전기자극 시 외부에서 유입되었거나 전기자극 자체가 부분적으로 재구축배의 활성화에 기여한 것으로 판단된다.

표 12. 활성화 조건에 따른 핵이식 재구축배의 발육률

Activation conditions*	No. of oocytes	No. (%) of reconstructed oocytes			
		Fused	Cleaved	2-8 cells	Day 7 blastocysts (% from 2-cells)
5 μM-Ca	105	40	28 (40.3)	23	9 (32.1)
10 μM-Ca	60	28	12 (65.5)	9	4 (33.3)

*5 μM Ca: 5 μM Ca²⁺-ionophore for 5min + 2.5 mM 6-DMAP for 3 h.

5 μM Ca: 10 μM Ca²⁺-ionophore for 5min + 2.5 mM 6-DMAP for 3 h.

따라서 본 연구에서는 26V, 25 μsec 전기융합 조건 하에서 Zimmermann's cell fusion medium을 융합용 완충액으로 사용하는 것을 핵이식 배반포를 생산하기 위한 재구축배의 융합 조건으로 확정하였으며 이러한 조건을 이용하여 확립된 단일조건을 통하여 핵이식 및 체외배양 후 배반포를 생산하여 평균 49.4% 인 높은 배반포 생산효율을 나타내었다 (표 13, Kim et al. 2011).

표 13. 핵이식 복제배아의 체외발달 효율

Series	Oocyte	Fusion	Blastocyst	Percentage to	
				Fusion	Blastocyst
1	25	25	8	78.1	38.1
2	36	26	12	72.2	60.0
3	24	19	4	79.2	50.0
AVG				76.5	49.4

*AVG : 평균값

(3) 각종 한우 배아의 체외배양

체세포 핵이식 및 단위발생을 통한 방법으로 생산된 한우 배아의 형태학적 특성을 체외배양을 통해 정상 체외수정란과 비교하여 확인하였다. 아래 그림과 같이 생산된 핵이식 및 단위발생 배아와 체외수정란은 외형적 차이는 보이지 않았으며 다만 체세포핵이식 유래 배반포의 경우 미세조작용 피펫에 의해 야기된 틈을 통해 부화가 조기에 일어난 현상을 보였다 (그림 6).

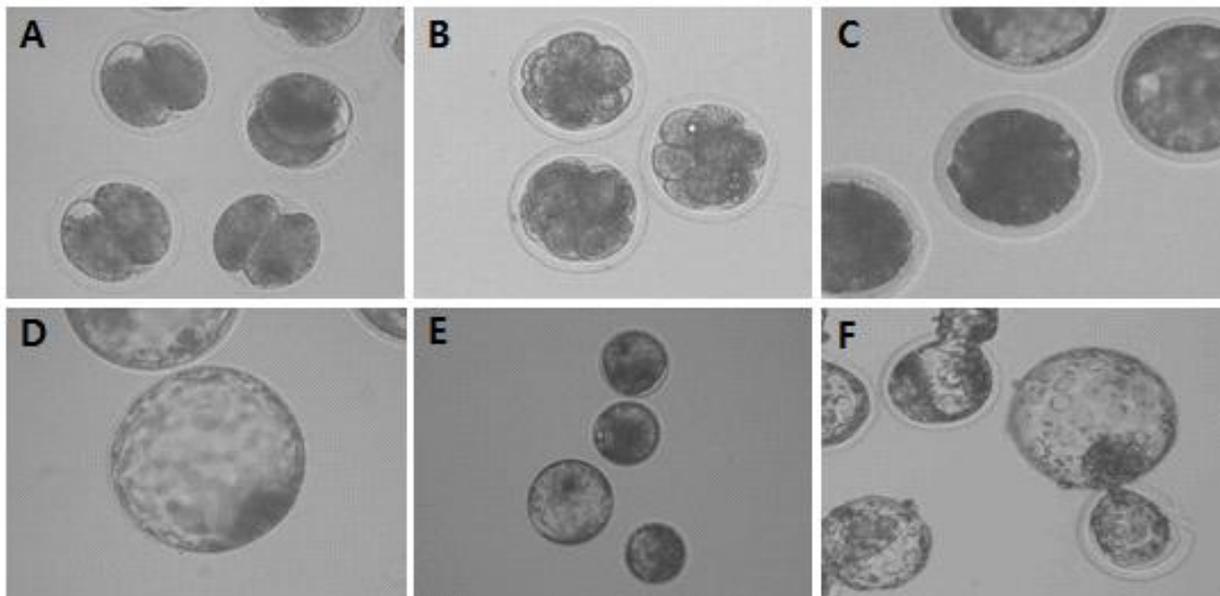


그림 6. 한우 배아의 체외발달. A-C : 2-세포기 부터 상실배 시기. D: 체외수정 배반포. E: 단위발생 배반포. F: 체세포 핵이식 배반포.

(가) Mouth pipette를 이용한 ICM 분리

단위발생란 및 핵이식란은 체외수정란에 비해 세포수도 적고 ICM양도 적다. 그러므로 ICM를 분리하기가 수정란에 비해 상대적으로 어렵다. 배아줄기세포를 확립할 때 ICM를 분리하는 방법 이외에 배반포 전체를 seeding하여 계대 후 자연스럽게 영양막세포는 분화되는 방법을 사용하기도 한다. 이와 같은 방법을 적용할 때 역시 투명대를 제거하여야 하는데 이 때 세포손상이 많이 생길 수 있으므로 내경이 배반포 크기보다 약간 작은 90~110 μ m의 mouth pipette를 이용하여 손쉽게 투명대를 제거 후 seeding하였다 (그림 7).

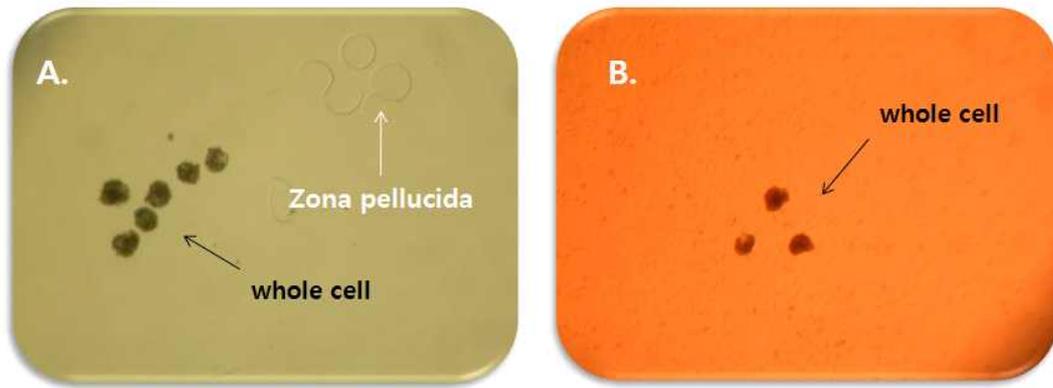


그림 7. Mouth pipette를 이용한 소 단위발생란에서의 투명대 제거 (A) 및 whole seeding (B).

(나) 소 단위발생란을 이용한 배아줄기세포의 확립

단위발생란에서 배아줄기세포 생산은 윤리적인 문제점을 극복하고 치료에 이용이 가능한 배아줄기세포의 생산과 핵이식 배아줄기세포 같이 세포수가 적은 배아에서의 줄기세포를 확립하는데 방법적 기초연구로서 그 의미가 있다. 본 연구진은 전년도에 수립된 화학적 활성화를 통한 소 단위발생란의 생산방법을 이용해 단위발생란을 생산하여 부화되기 전 확장 배반포를 사용하여 배아줄기세포 확립을 시도하였다. 단위발생란에서 배아줄기세포 확립은 체외수정란에 비해 확립이 어렵다고 알려져 있다. 전년도에 FBS 또는 KSR을 기본으로 한 배양액에서 줄기세포주의 생산을 시도하였으나 그 확립효율이 현저하게 낮고 유지가 어려워 체외수정란에서 효과가 검증된 신호경로 억제제 첨가 배양액을 이용하여 유도를 시도하였다. 이와 같은 연구는 2010년 다른 연구진에 의해 보고가 되었으나 MEK 신호경로 억제제의 교체(PD184352 → PD98059)를 통해 타 연구진의 선행보고에 비하여 더 안정적인 부착과 증식 효과를 보인다는 것을 새롭게 확인할 수 있었다. 총 18개의 단위발생란을 이용하여 4개의 세포주를 확립하였고 외형적으로는 체외수정란 유래 배아줄기세포와 유사한 모양을 보이고 Oct4, Nanog, SSEA4 와 TRA-1-60 염색결과도 유사하게 나타났다.

라. 고능력 한우유래 핵이식란 생산을 통한 핵이식 배아줄기세포 생산

(1) 고능력 한우유래 핵이식란 생산

(가) 앞서 확립된 핵이식 조건을 바탕으로 2-5mm² 크기의 고능력 한우 유래 귀 조직을 이용하여 단일 체세포 수준으로 만들어 배양한 후 핵이식란 생산 시 공여핵 체세포로 사용하였다. 확보된 고능력 한우 체세포를 이식하여 체세포 핵이식기법을 이용, 핵이식란을 생산하여 표 14에 제시한 결과를 확보하였다. 본 연구결과는 본 실험실의 소 핵이식란 체외배양 시스템이 배아줄기세포를 수립하기 위한 배반포 생산의 최적화된 체외배양조건임을 제시해 주고 있으며 그림 8에서 볼 수 있듯이 형태학적으로도 뚜렷한 내부세포괴 (inner cell mass)와 체내외 수정란에 상응하는 세포수를 보유하고 있음을 확인할 수 있다.

표 14. 소 핵이식 배반포 생산효율

총 난자 수	성숙난자 (%)	2-세포기 (%)	배반포 (%)
385	247 (64.2)	136 (74.3)	68 (37.2)

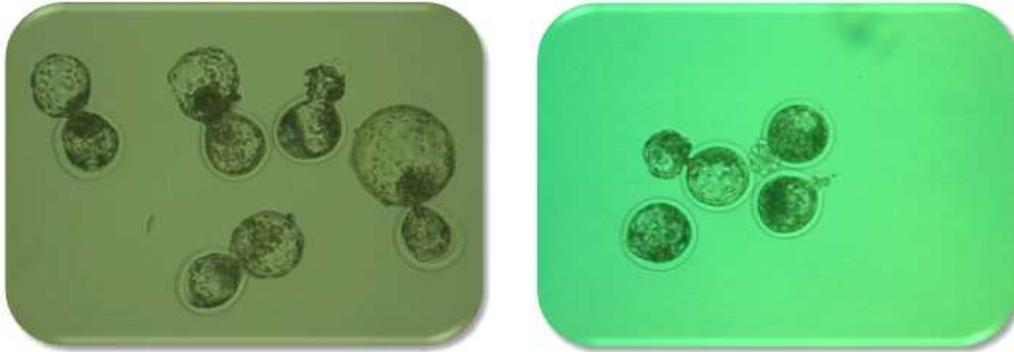


그림 8. 핵이식 후 6일 후 초기 배반포

(2) 고능력 한우유래 핵이식란을 통한 핵이식 배아줄기세포주 수립

본 연구에서는 체외수정 배반포를 이용, 배아줄기세포를 수립한 앞선 연구결과에서 효과가 검증된 화학물질을 이용해 분화를 억제해 줄기세포를 확립하는 방법을 적용하여 핵이식란 유래 배아줄기세포를 확립하였다. 배아의 seeding 방법은 배반포 전체를 feeder에 부착하는 whole seeding 방법을 이용하여 실험을 진행하였다. 배반포 단계에서 줄기세포를 얻는 방법에는 여러 가지가 있지만 본 연구실에서 사전 연구를 진행한 결과 whole seeding 방법이 가장 우수한 결과를 보여주었다. 일반적으로 초기 발생단계에서 핵이식란은 체외수정란에 비하여 배반포가 되는 잠재력이 많이 떨어진다고 알려져 있다. 그러나 배반포 단계에서 줄기세포를 확립하는데 있어서 서로 다른 둘은 크게 차이가 없었다. 이러한 결과로 보아 체외수정란보다 확립이 어렵다고 알려진 핵이식란의 배아줄기세포를 체외수정란에서 수립된 신호경로 억제제를 이용한 방법으로 확립을 시도하였을 때 체외수정란과 유사하게 배아줄기세포의 형성이 이루어지는 것을 알 수 있다. 이 연구를 바탕으로 고능력의 소 배아 또는 고능력의 체세포를 공여세포로 핵이식을 통해 얻는 배아를 이용하여 배아줄기세포를 확립하면 유전자적 자원을 쉽게 장기간 보관이 가능할 것이라고 판단된다.

(3) 확립된 한우 배아줄기세포의 성장 검증

(가) 형태학적 소견

소 배아줄기세포의 확실한 검증체계는 아직 잡혀져 있지 않다. 배아줄기세포 유사세포를 생산한 타 연구진에서 발현하는 마커의 종류나 발현도가 각각 다르고 그 외형적 형태도 상당히 서로 다른 모양을 보이고 있다. 외형적으로 인간배아줄기세포는 넓게 퍼지는 형태로 큰 콜로니를 형성하면서 증식이 일어나고 마우스 배아줄기세포 같은 경우 작고 몇 개의 층으로 쌓여서 자

라는 형태를 보인다. 인간배아줄기세포는 마우스에서는 배아위관줄기세포 (Epiblast stem cell)과 유사한 소견을 보인다고도 알려져 있다. 소의 배아줄기세포 (유사세포)의 경우에는 인간배아줄기세포와 유사한 외형을 보인다고 보고가 되고 있는데 본 연구진이 신호경로 억제제를 통해 확립한 배아줄기세포의 경우에도 이와 마찬가지로 인간배아줄기세포와 유사한 외형적 형태를 나타내었다 (그림 9).

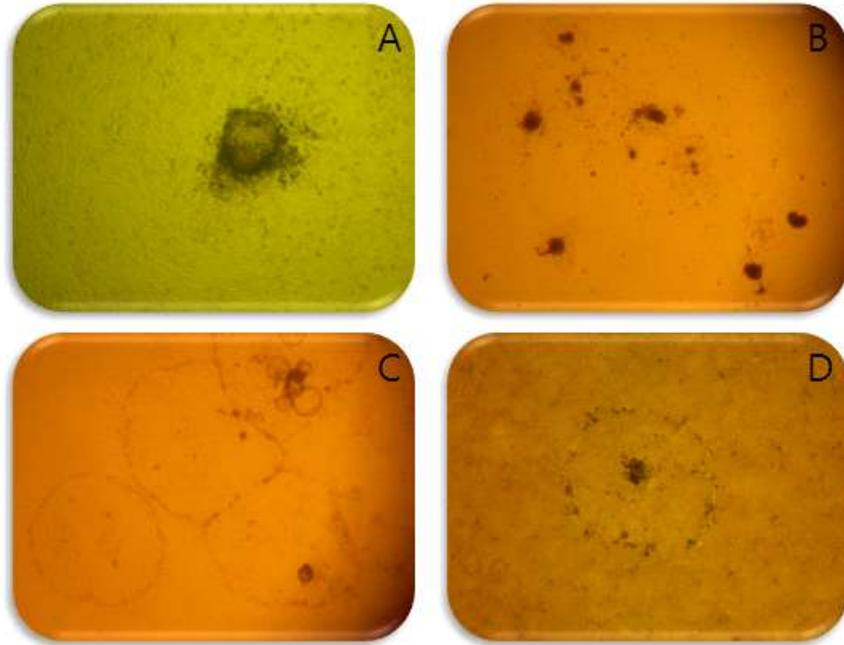


그림 9. 한우 배아줄기세포의 형태학적 소견. A. Seeding 24시간 후 부착모습. B. Seeding 진행 48시간 후 모습. C. 배양 5일 후 콜로니 형성모습. D. 신호경로 억제 소분자물질 배제 후 KSR 배양액에서의 콜로니 형성모습.

(나) 분자생물학적 검증

배아줄기세포의 검증 시 보통 전능성 관련 마커와 배아줄기세포에서 특이적으로 발현하는 세포표면 마커를 이용하게 된다. 이러한 마커의 발현은 인간과 마우스의 배아줄기세포에서 다르게 발현을 하는데 소의 경우 정립된 마커가 없기 때문에 인간과 마우스에 기초하여 분석을 하였다. 초기세대에서부터 ALP 염색상을 확인하였으며 (그림 10), 전능성 마커인 Oct4와 Nanog 및 인간 배아줄기세포에서 발현하는 세포표면 마커인 SSEA-4와 TRA-1-60을 면역 염색법을 통해 확인하였다 (그림 11). 마커의 발현은 FITC 영역에서 확인하였으며 DAPI 염색을 통해 색의 위치를 확인하였다. 형광염색 상을 확인한 결과 전능성 관련 마커인 Oct4, Nanog의 발현이 나타났고 SSEA-4와 TRA-1-60도 발현하였다. 이러한 연구결과는 확립 세포주가 전능성을 가지는 배아줄기세포인 것을 보여주고 있다. 각각의 체세포핵이식유래 배아줄기세포주는 체외분석결과 배아체에서 전분화능 (그림 12A, B) 및 정상핵형 (그림 12C)이 확인되었으며 현재 핵이식을 통한 소 배아줄기세포를 누드마우스의 고환에 주입하여 teratoma로 판단되는 조직을 확보(그림 12D), 조직병리학적 검증을 진행 중이며 동일한 방법으로 체외수정란과 단위발생 배아줄기세포에서도 teratoma 형성을 시도하고 있다.

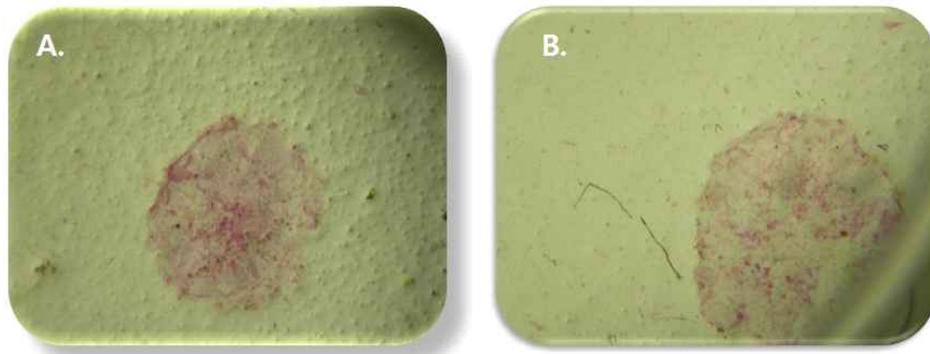


그림 10. 소 배아줄기세포(유사세포)의 ALP staining 소견

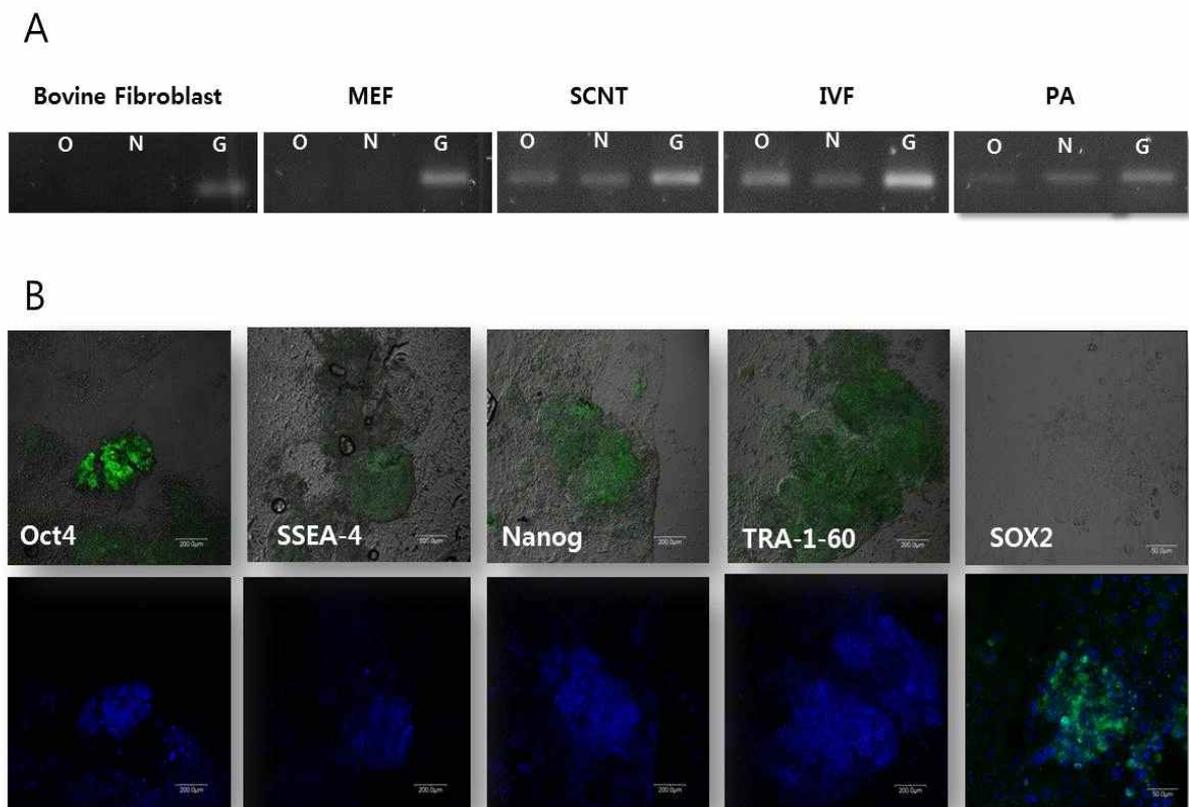


그림 11. 확립된 한우 유래 배아줄기세포의 RT-PCR 분석. A: RT-PCR 결과. MEF (mouse embryonic fibroblast), SCNT (somatic cell nuclear transfer), IVF (In vitro fertilized), PA (Parthenogenesis) B: 전분화능 관련 마커에 대한 면역염색 결과.

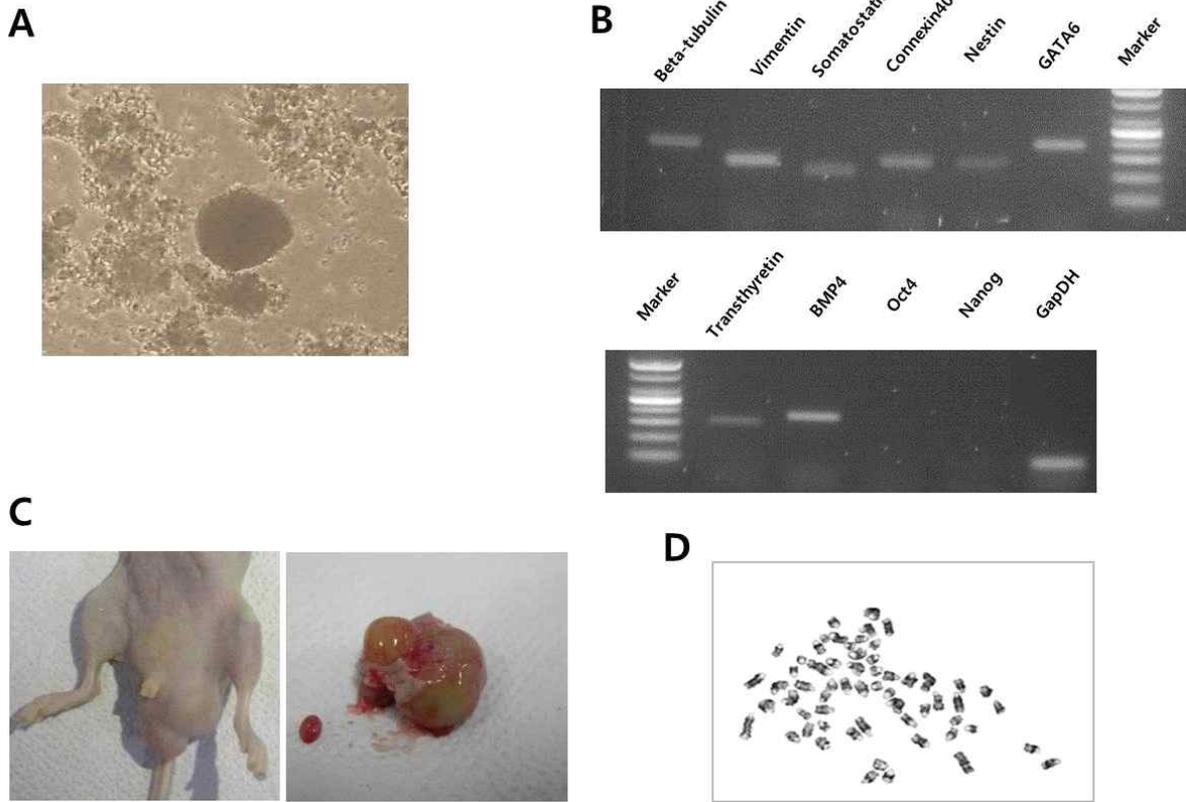


그림 12. 한우 유래 배아줄기세포 분화능 및 핵형 분석. A: 생성된 EB 모습. B: RT-PCR을 통한 분화 마커 확인. Ectodermal: beta-3-Tubulin, Nestin과 Vimentin, Endodermal: Somatostatin과 Gata6, Mesodermal: Connexin40과 BMP4. C: 고환에 생성된 putative-teratoma. D: 50계대에서 정상으로 나타난 핵형분석 결과.

마. 체외수정란, 단위발생란 및 핵이식란 유래 배아줄기세포 수립 현황

신호경로를 억제하는 억제제를 사용하여 각각의 배아에서 다수의 줄기세포주를 확보하였으며 (표 15) 보고서 작성일 현재 모두 70계대 전후로 계대배양을 유지하고 있다.

표 15. 체외수정란, 단위발생란 그리고 핵이식란을 통한 확립된 줄기세포주

종 류	Embryo seeding 개수	확립된 줄기세포주
체외수정란	31	16
단위발생란	18	4
핵이식란	21	9

바. 배아줄기세포 (유사세포)의 동결보존 및 융해 후 분석

한우 배아줄기세포를 계대할 때 세포군집을 4-6 조각으로 잘라 새로운 배양보조세포위에 올려놓아 계대하게 되나 많은 수의 콜로니 조각이 새로운 배양보조세포위에서 다시 콜로니를 유지하지 못하고 분화되는 현상을 보였다. 또한 동결보존 후 융해하여 다시 세포를 증식배양하고자 할 때 그 효율성이 매우 낮게 나타났다. 이러한 현상은 한우 배아줄기세포를 오랫동안 안전하게 유지하기 위해 극복해야할 문제의 하나인데 본 연구에서는 부착에 관련된 소분자물질을 배양액에 첨가하여 이러한 현상을 극복하고자 하였다. 본 실험에서 사용된 소분자물질은 Thiazovivin (Tz)으로 흔히 부착 분자들과 연관된 ROCK 신호를 억제시키는 물질로 알려져 있다 (Xu et al. 2010). Tz는 줄기세포 및 여러 가지 세포에서 생존율을 향상시키고 부착 분자의 증가를 유도한다고 알려져있다 (Gauthaman et al. 2010; Xu et al. 2010).

연구의 결과는 표 16과 17과 같다. 표에 나타난 대로 Tz는 한우 배아줄기세포 콜로니의 계대 및 융해 후 콜로니 재형성 효율을 증가시켰다. 뿐만 아니라 Tz 처리한 그룹은 계대 후 증식력 역시 증가됨을 보였다. 이를 통해 한우 배아줄기세포의 계대유지 및 동결보존 효율향상에 본 기법의 적용이 가능할 것으로 생각된다.

표 16. 한우 유래 줄기세포 계대 후 콜로니 유지 효율 비교

Group	Repeats	No. clumps	No. Maintained colonies	%
P1	5	35	23	65.7
P1+T	5	35	31	88.6

표 17. 동결 보존 후 해동 시 콜로니 유지 효율

Group	Repeats	No. clumps	No. Maintained colonies	%
P1	3	50	19	38.0
P1+T	3	50	33	66.-

사. 유도만능줄기세포 생산 시도

(1) 한우 체세포를 이용한 유도만능줄기세포의 생산 시도

성체의 귀로부터 확보한 고능력 한우 섬유모세포를 이용하여 유도만능줄기세포의 생산을 시도하였다 (Takahashi and Yamanaka 2006). 현재까지 국내외를 막론하고 소에서는 유도만능줄기세포를 유도하는 방법이 온전히 정립이 되지 않았기 때문에 인간에서의 유도만능줄기세포의 방법을 기초로 하여 일부 변형된 방법을 적용, 유도만능줄기세포로의 재프로그래밍을 시도하였다. 인간 유도만능줄기세포 연구에서 사용되는 Oct4, Sox2, Klf4 와 c-Myc이 하나의 카세트에

들어가 있는 바이러스 팩을 이용하여 2회에 걸쳐 바이러스를 통한 유전자도입을 시도하였다. 바이러스를 이용한 유전자 삽입 후 섬유모세포의 외형적 변화는 관찰되었으나 현재까지 기존에 알려진 유도만능줄기세포의 형태를 관찰되지 않았다 (그림 13). 진행 중인 후속연구를 통하여 지속적으로 연구를 수행할 예정이다.



그림 13. 한우 섬유모세포를 이용한 유도만능줄기세포의 유도 시 초기 콜로니 형태

아. 기타 (각종 배아줄기세포 생산, 분화유도 및 착상 전 배반포 단계의 axis 형성 패턴 분석)

(1) 단위발생 배아줄기세포의 조골세포로 분화 유도 시 배양액에 IGF-2의 첨가효과확인

(가) 단위발생 배아줄기세포를 이용하여 조골세포로의 분화를 유도함과 동시에 단위발생배아 유래 배아줄기세포에서 이전에 보고된 특성인 중배엽 유래 기능세포들로의 분화 유도 시 분화효율 저하에 대한 보완방법에 대하여 연구하였다.

(2) 배아체 형성 시 첨가된 IGF-2에 의해 변화된 조골세포 관련 유전자발현양상

(가) 첨가된 또한 단위발생 배아줄기세포를 기능세포로 분화 유도하는 첫 단계인 배아체 형성 과정에 실제로 세포 내에서 발현되지 않는 IGF-2를 배양액에 첨가하여 외인성 자극을 통해 이러한 세포들이 이후 분화과정에서 어떠한 유전자발현양상을 보이는 지 분석한 결과 골형성에 관련된 유전자들의 발현양상이 일반 정상수정란 배아줄기세포를 이용한 조골세포 분화유도와 유사 또는 그 이상으로 증가하였으며 IGF-2가 첨가되지 않은 단위발생 배아줄기세포의 분화유도 시에 비하여는 2배 이상 증가하는 양상을 나타내었다 (그림 14).

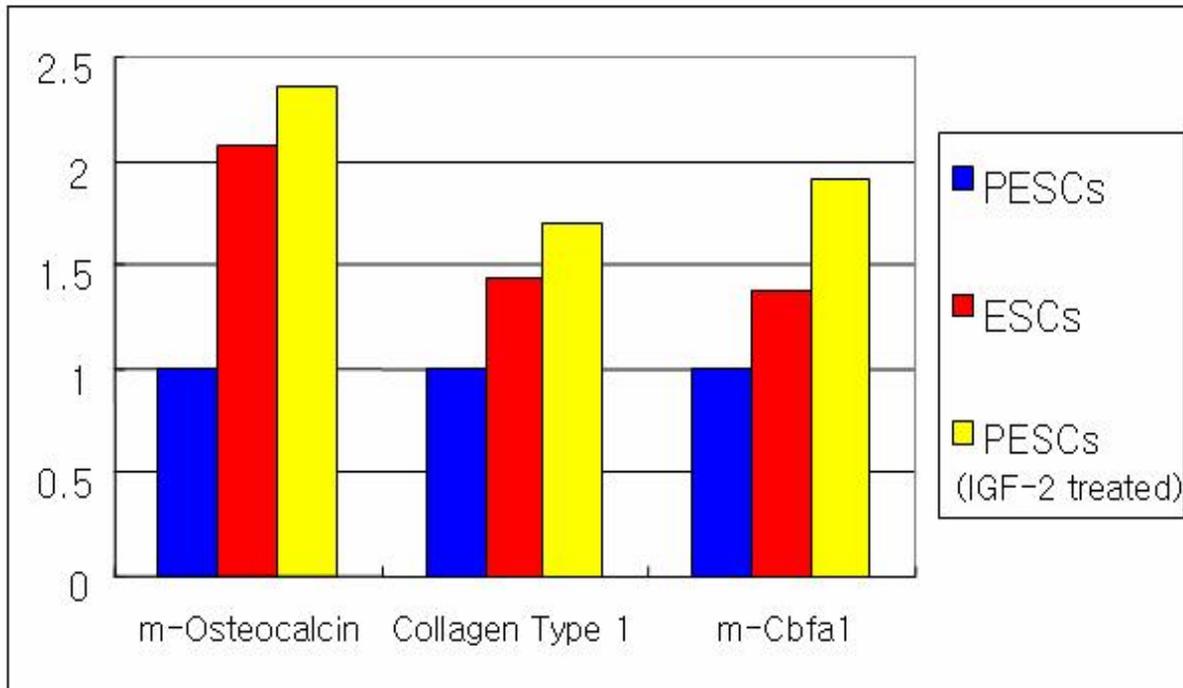
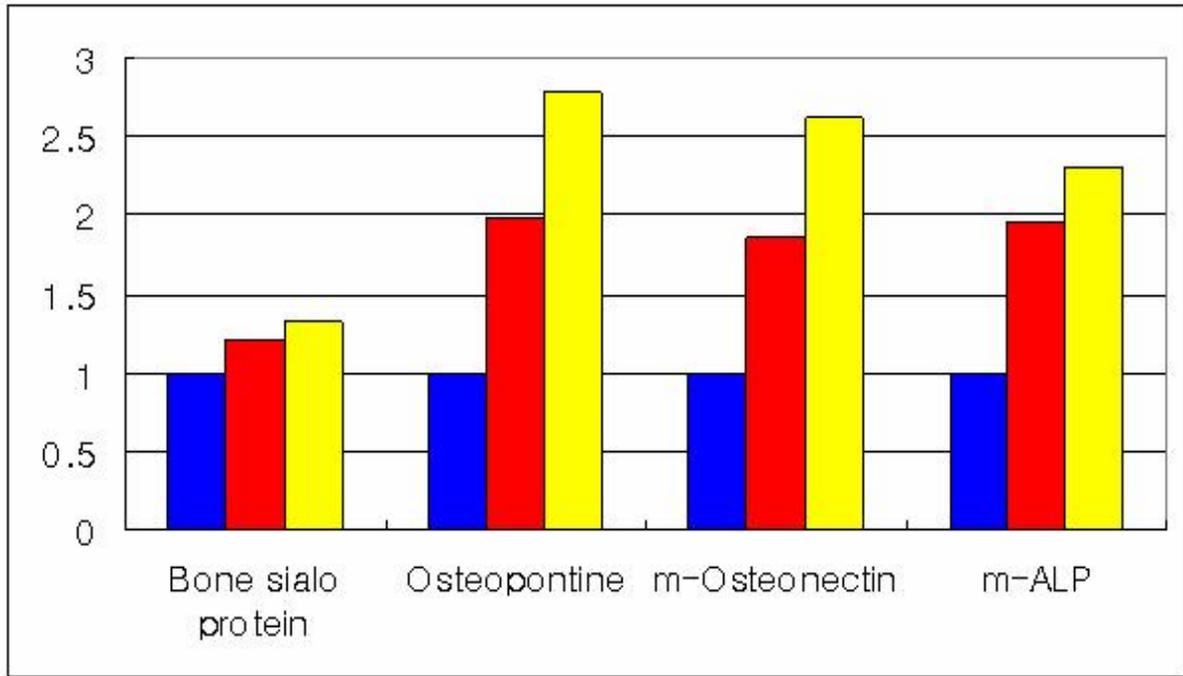


그림 14. 배아체 (EB) 형성 시 첨가된 IGF-2에 의해 변화된 골형성 관련 유전자의 발현양상 (골형성관련 유전자 발현량 증가; PESCs: 단위발생배아줄기세포, ESCs: 정상수정란 배아줄기세포).

(3) 배아체 형성 시 IGF-2를 첨가한 후 조골세포로 분화유도된 단위발생 배아줄기세포의 조골 세포 및 골조직 형성능 체내검증

(가) 본 연구에서는 또한 체외분화유도 실험에서 확인된 유효한 첨가효과가 실제로 임상적으로 적용이 가능한지를 알아보기 위해서 두개골결손 마우스에 골 재생실험에 가장 널리 쓰이는 세포 이식 재료인 PLA 지지체와 함께 배아줄기세포로부터 유도되어진 조골세포를 식립하여 실제 골 재생이 유도되는 지 여부를 확인해 보았다. 이를 위해 인공적으로 마우스 두개골에 지름 5mm 의 원형의 상처를 낸 다음 단위발생 배아줄기세포로부터 유래한 조골 세포를 이식한 뒤 6주 뒤 두개골을 꺼내어 재생 정도를 확인해 보았다 (그림 15). 체내이식 결과도 체외에서와 마찬가지로 IGF-2를 처리해준 단위발생 배아줄기세포로부터 분화된 조골세포가 두개결손이 일어난 부위의 골 재생에 유효한 것을 확인할 수 있었다. X-Ray 결과를 통하여 두개골이 결손된 부위에 더 많은 석회물질이 침착된 것을 확인하였으며 (그림 16) 정량적인 분석을 위하여 Micro-CT tset를 이용하여 실제로 얼마나 더 많은 석회화 물질이 침착되었는지 확인한 결과 2배 이상의 골 물질이 IGF-2를 처리하여 분화를 유도한 세포집단에서 침착되었음을 확인할 수 있었다 (그림 17). 그리고 정확하게 조골세포에 의해 석화화 및 골침착이 이뤄졌는지를 확인하기 위하여 조직시료의 탈회 후 H&E 염색을 통하여 골조직 생성여부를 확인한 결과 앞의 결과와 동일하게 실험그룹에서 더 확연한 골 물질 침착을 확인 할 수 있었다 (그림 18). 본 실험 통하여 실제 분화능이 떨어져 중배엽성 유래 기능세포들의 분화가 용이하지 않았던 단위발생유래 배아줄기세포를 이용한 경조직 재생 및 세포치료 동물모델을 제시할 수 있었다.



그림 15. 인공적으로 두개골에 지름 5mm의 원형의 상처를 낸 마우스.

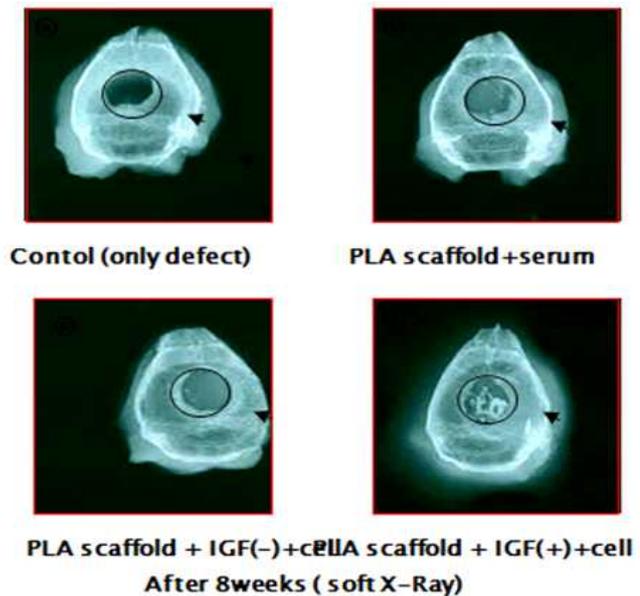


그림 16. 각각의 실험 그룹의 X-Ray 결과: 우측하단의 IGF-2 처리 줄기세포 주입 그룹에서 강한 골조직 형성 관찰.

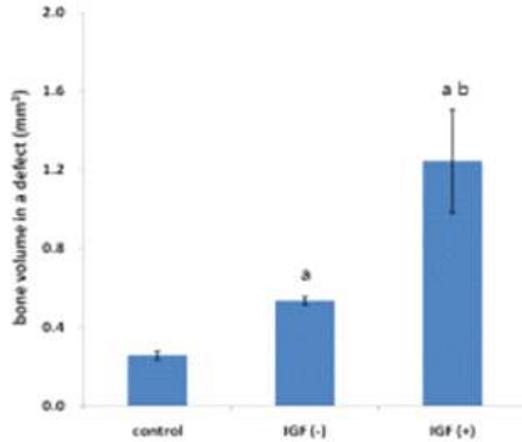
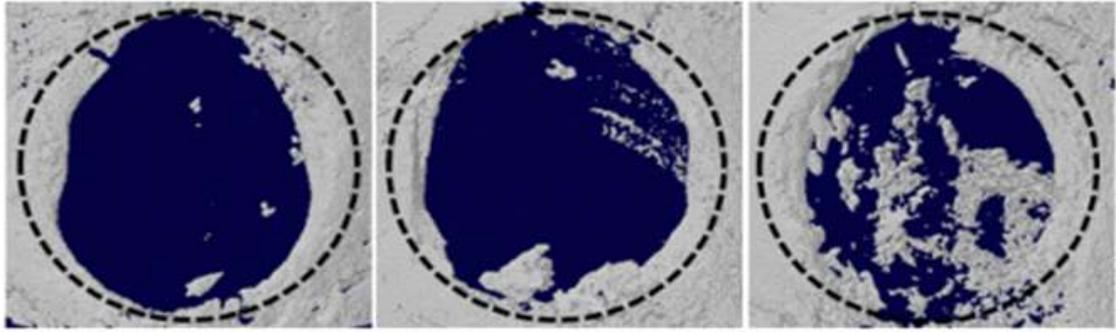
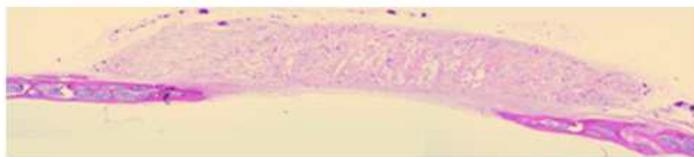
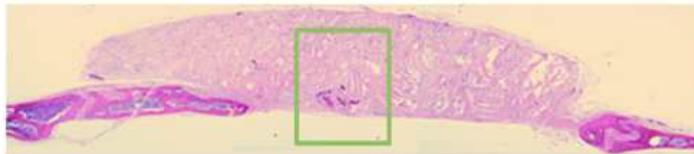


그림 17. 두개결손 마우스를 이용한 단위발생 배아줄기세포 유래 조골세포의 뼈 재생능 확인 (상) 및 조골세포 분화유도 시 사용된 배양액 내의 IGF-2 유무에 따른 골형성능 차이 분석 (하).



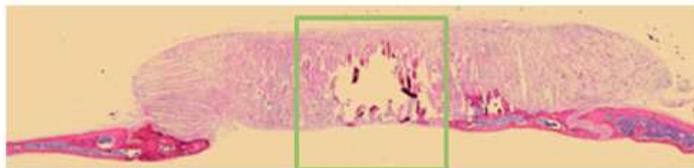
Control (PLA)

Defect 내 fibrous tissue로 채워져있음.
Defect 변연부에 석회화 물질 관찰.
dystrophic calcification으로 추정.



IGF II(-)

Defect 내 fibrous tissue로 채워져있음.
Defect 이개부에 골형성 일부 관찰됨



IGF II(+)

Defect 내 fibrous tissue로 채워져있음.
Defect 이개부에 골형성이 뚜렷이 관찰됨.

그림 18. IGF-2 첨가 실험의 각각의 실험그룹에 따른 골 재생 부분의 H&E 염색 결과.

자. 기타 발생공학 관련 연구성과

(1) 난자 활성화 후 trichostatin A의 추가처리가 마우스 핵이식란의 초기발달에 미치는 효과

본 연구에서는 강력한 히스톤 탈아세틸화 억제인자 인 trichostatin A (TSA)가 마우스 핵이식란의 체외발육에 미치는 영향에 대하여 평가하였다. 탈핵 및 핵주입 후 마우스 재구축배는 TSA가 첨가 또는 배제된 활성화 배양액에서 6시간동안 활성화 유도하였으며 TSA 처리군의 경우 활성화 처리가 종료된 이후 체외배양액 내에 TSA를 3, 5 및 18시간 동안 추가로 첨가하여 총 TSA 처리시간이 각각 6, 9, 11 및 24시간에 이르도록 처리하였다 (그림 19).



그림 19. 마우스 핵이식란 활성화 및 배양 시 처리한 TSA 첨가 실험 개요도

전체 실험군 (총 5그룹)에서 TSA 11시간 처리군 (TSA-11 hr)에서 배반포 발달율이 가장 높게 나타났으며 (표 18) TSA의 처리 시간과 달리 처리농도는 배발육에 크게 영향을 미치지 않았다 (표 19). 유전자발현 분석 결과, 히스톤 탈아세틸화효소 (HDAC1 및 HDAC2)와 DNA 메틸화 관련 유전자 (DNMT3a 및 DNMT3b)의 발현은 TSA-11 hr 및 TSA-24 hr 그룹에서 감소하는 양상을 나타내었으나 히스톤 아세틸전이효소 (P300 및 CBP)와 배아의 전능성에 관여하는 유전자 (OCT4 및 NANOG) 및 배아/태반형성관련 유전자인 FGF4의 발현은 증가하는 양상을 나타내었다 (그림 20, 21). 태반형성의 초기세포인 영양막세포 형성에 필수적인 CDX2 유전자의 경우 TSA-24 hr 그룹에서만 유의적으로 증가하는 모습을 나타내었다. 본 연구결과는 핵이식란의 활성화 및 이후 시기에서의 TSA 처리가 마우스 핵이식 재구축배의 발육을 개선시킴을 증명하였으며 이러한 현상은 TSA에 의해 과아세틸화, 탈메틸화, 전능성 유전자발현 촉진 및 배아성장인자의 활성화에 의한 것으로 생각된다. 특히 표 18에서와 같이 TSA-11 hr 그룹에서만 핵이식배아줄기세포 형성에 성공하였으며 그림 21에서 보이듯이 유전자발현결과도 태반형성관련 인자보다는 전능성 유지인자의 발현을 증진시키는 효과가 큰 것으로 나타나 마우스 핵이식에서의 TSA 처리는 핵이식유래 배아줄기세포 생산에 더욱 큰 효과가 있을 것으로 판단된다.

☞ 18. Time-dependent effects of TSA^{a)} treatment on the development of SCNT^{b)} and parthenogenetic murine embryos^{c)}

	Duration of TSA treatment ^{d)}	Activation	No.(%) 2-cells	No.(%) blastocysts	No. SCNT-ESC ^{e)}
SCNT embryos	TSA-0 hr	116	44(37.9) ^a	4 (3.4) ^a	0
	TSA-6 hr	164	68(41.5) ^b	8 (4.8) ^a	0
	TSA-9 hr	188	80(42.5) ^b	21 (10.6) ^b	0
	TSA-11 hr	208	92(44.2) ^b	44 (21.2) ^c	2
	TSA-24 hr	140	76(54.2) ^c	24 (17.1) ^c	0
Parthenotes	TSA-0 hr	100	100(100) ^a	84 (84) ^a	N/A
	TSA-6 hr	84	84(100) ^a	61 (71.4) ^b	N/A
	TSA-9 hr	112	108(96.4) ^a	87 (78.5) ^b	N/A
	TSA-11 hr	108	108(100) ^a	91 (85) ^a	N/A
	TSA-24 hr	104	92(88.4) ^b	59 (60) ^c	N/A

a) Trichostatin-A

b) SCNT: Somatic cell nuclear transfer.

c) Four replicates.

d) 실험그룹 세부설명 그림 20 참조

e) SCNT-ESC: putative somatic cell nuclear transfer embryonic stem cell lines.

Values with different superscripts (a, b, c) in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

☞ 19. Dosage-dependent effects of TSA treatment on the development of SCNT embryos^{a)}

TSA concentration	No. activated oocytes	No.(%) 2-cells	No.(%) blastocysts
1 nM	228	108(47.4) ^a	12 (5.2) ^a
5 nM	208	92(44.2) ^a	44 (21.2) ^b
25 nM	180	84(46.6) ^a	31 (17.7) ^b
50 nM	148	64(43.2) ^a	29 (19.5) ^b

a) Four replicates.

Values with different superscripts (a, b) in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

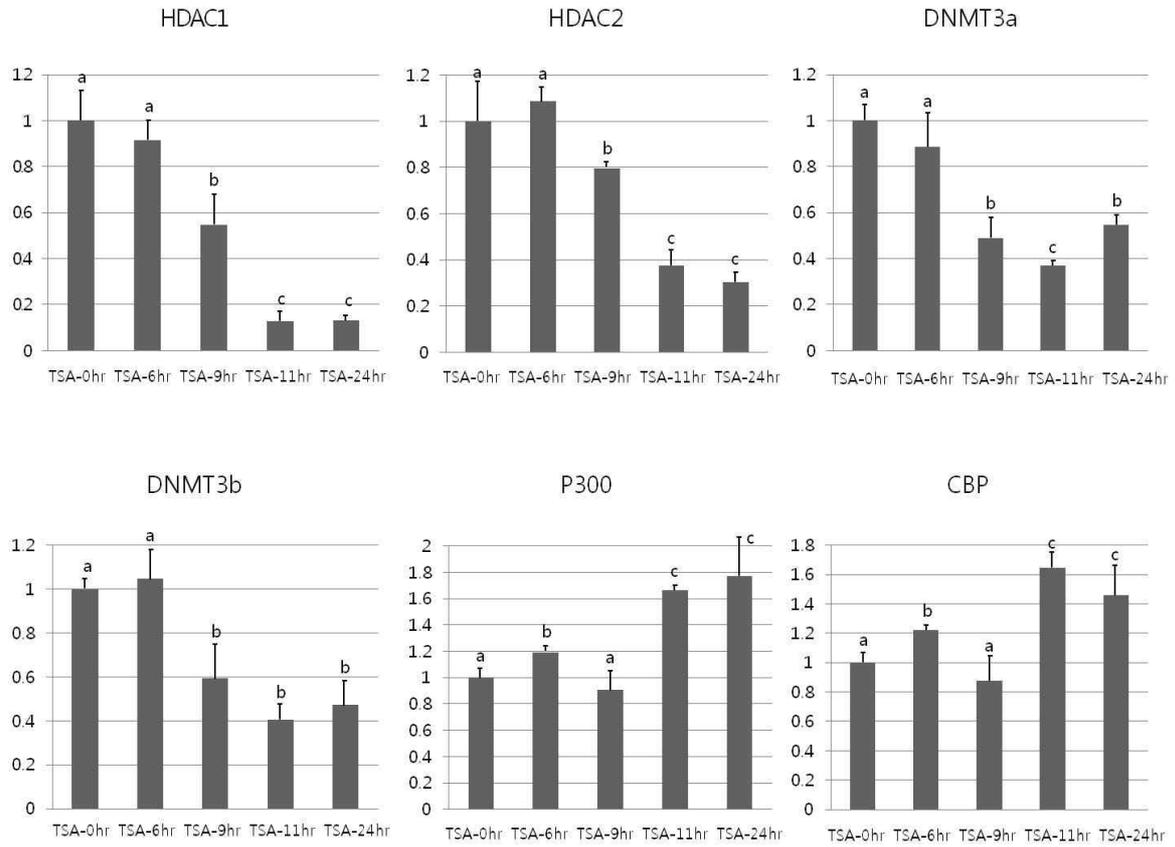


그림 20. The expression levels of histone modification (HDAC1, HDAC2, P300 and CBP) and DNA methylation (DNMT3a, DNMT3b)-related genes after TSA treatment for different durations. ^{a,b,c}Values without a common superscript differ ($P < 0.05$).

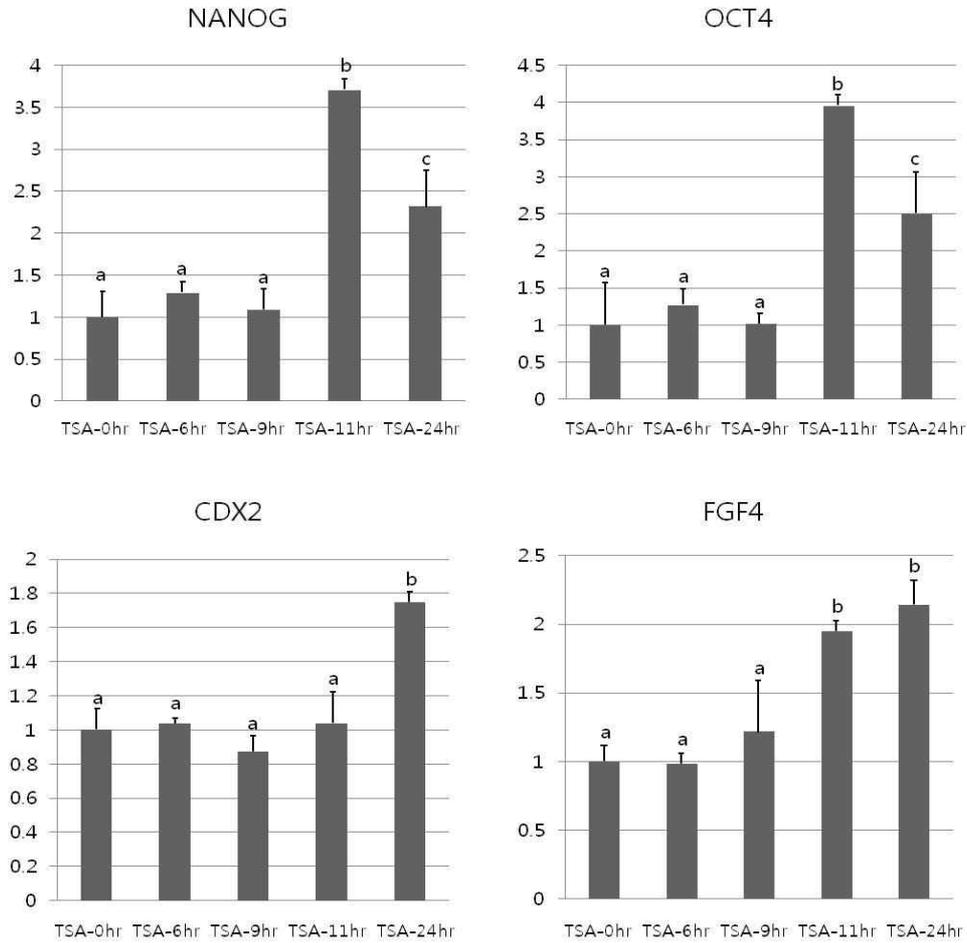


그림 21. The expression levels of pluripotency (OCT4, NANOG) and early embryonic development (FGF4, CDX2)-related genes after TSA treatment for different durations. ^{a,b,c}Values without a common superscript differ ($P < 0.05$).

(2) 돼지 단위발생에서 할구의 크기와 지방분포의 차이에 따른 배반포 축형성 양상 분석

(가) 본 연구팀은 1차년도에 선행연구를 통하여 할구의 밝기차이에 따른 분화 성향은 어두운 할구는 내부세포괴로, 밝은 할구는 영양막세포로 분화하는 성향을 보이는 것을 관찰한 바 있다 (표 20).

표 20. 돼지 단위 발생란에서 2세포기에 지질의 함유가 다른 각각의 할구에 DiI와 DiD의 주입 후 배반포 발달 시 세포의 분포

Number of blastocysts	Distribution of the progeny of the lipid rich blastomere of 2-cell embryos(%)		
	Embryonic	Abembryonic	Unspecified
39	17(43.6)	7(17.9)	15(38.5)

(나) 돼지 난자에는 많은 lipid droplet이 있어 색상이 짙으며 (그림 22) lipid droplet에는 단백질과 mRNA와 같은 인자들이 많이 포함되어 있는 것으로 알려져 있다. 이로 인하여 분화성향이 차이가 나는 것으로 판단하고 있으며 이후 이를 바탕으로 2-세포기 단계 배아의 할구에서 배반포 축형성과 관련되어 있다고 알려진 유전자 (*Oct4*, *Carm1*, *Cdx2*, *Tead4*)의 할구의 크기 및 지방과립량 차이에 따른 상대적인 발현량을 분석하였다. 내부세포괴로 분화를 촉진한다고 알려진 *Carm1*은 어두운 할구에서 13.16 ± 1.13 , 밝은 할구에서 8.46 ± 1.78 로 어두운 할구에서 유의적으로 높게 발현하였으며 (그림 23, $P < 0.05$), 내부세포괴의 표지 유전자인 *Oct4*는 어두운 할구에서 0.74 ± 0.26 , 밝은 할구에서 0.45 ± 0.33 로 비록 유의적 차이는 나타나지 않았으나 어두운 할구에서 다소 높게 발현하는 경향을 보였다. 영양막세포의 표지 유전자인 *Cdx2*는 어두운 할구에서 0.72 ± 0.39 , 밝은 할구에서 1.01 ± 0.22 , *Tead4*는 어두운 할구에서 3.45 ± 0.58 , 밝은 할구에서 3.89 ± 0.34 로 나타나 유의적 차이는 보이지 않았다. 본 연구의 결과는 돼지 단위발생 배아의 2-세포기 할구에서 배반포 축형성과 관련된 유전자 발현이 지방과립의 분포와 관계가 있으며 그로 인해 배반포 축형성에 영향을 주는 것으로 볼 수 있다. 또한, 2-세포기의 돼지 단위발생 배아에서 *Carm1*이 지방과립의 분포와 관계있으며, 할구의 향후 세포분화의 방향성을 결정짓는 중요한 요소의 하나로 작용한다고 생각된다.

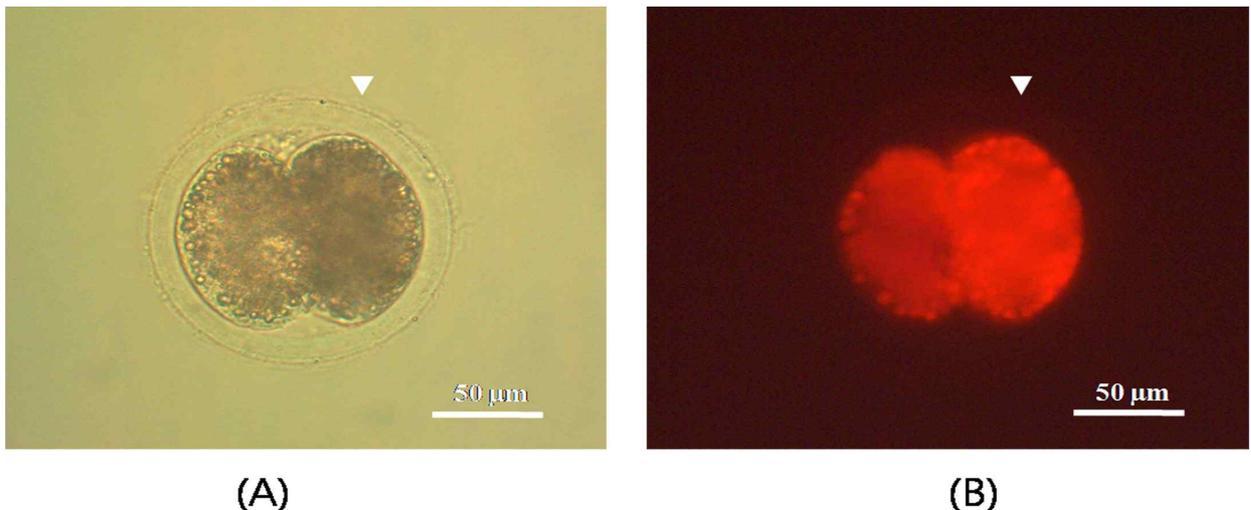


그림 22. 지방염색시약인 Nil Red 염색이 세포질색이 더 어두운 쪽에서 짙게 염색되는 것이 확인되어 지방함유가 높은 할구가 상대적으로 어둡다는 것을 확인.

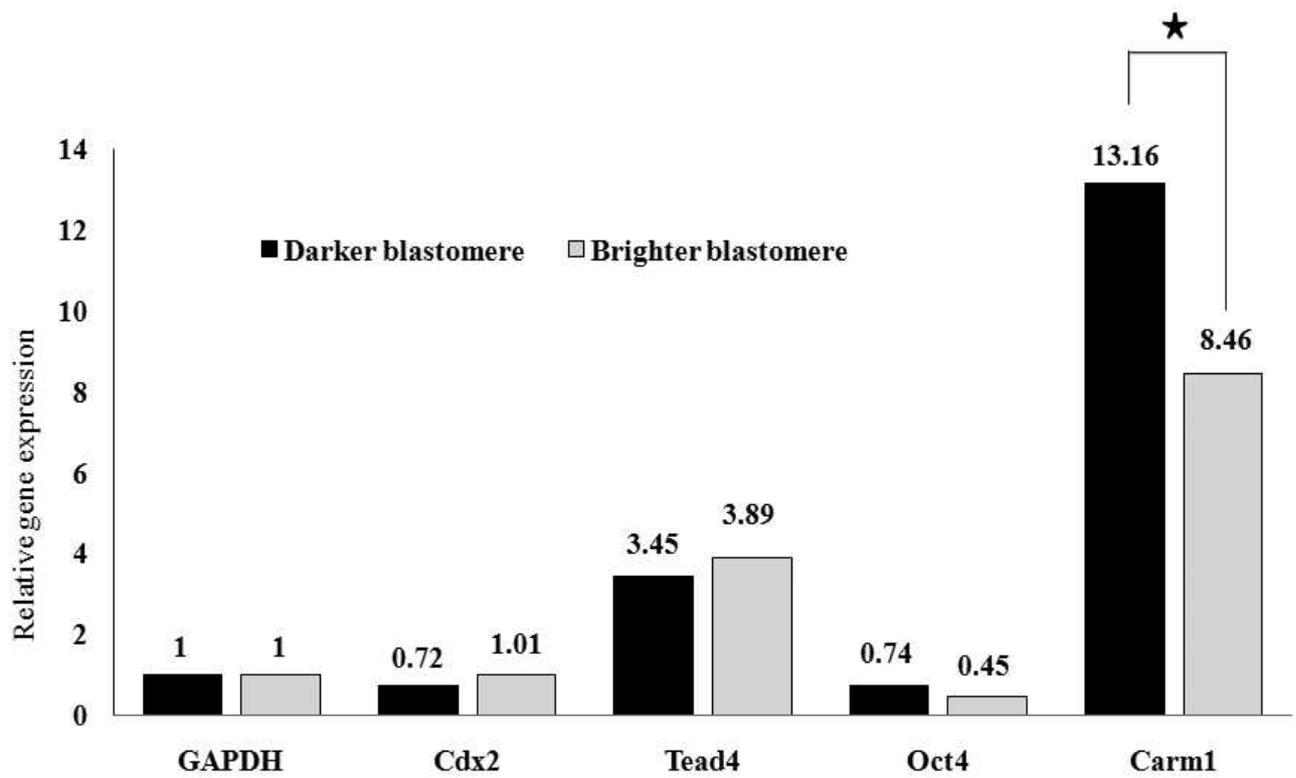


그림 23. Relative gene expression patterns of darker and brighter blastomeres of the 2-cell porcine parthenote. The gene expression of the brighter (less lipid content) and darker (more lipid content) blastomeres of 2-cell parthenotes are analyzed by real time PCR and $\Delta\Delta$ CT method. Relative expression was calculated as a ratio to the value of *GAPDH*, and shown as the mean \pm S.D. (n=3). “*” indicates $P < 0.05$.

2. 고능력 한우유래 체내의 수정란이식, 번식핵군조성 및 농가관리

가. 공란우의 체란 및 수정란 회수율 극대화 및 수정란이식

(1) 우수 유전형질을 지닌 공란우 확보 및 과배란 체란프로그램 개발

(가) 과배란 처리에 의한 체내수정란 생산

- 체내수정란 생산을 위해서 사용된 공란우는 장수 한우 영농조합법인의 고능력우와 장수군 유전자뱅크 내 고능력우에서 사육중인 한우를 공시하였다. 공란우의 처리는 발정발현과 무관하게 Progesterone releasing device인 CIDR(InterAg, NZ)를 질내에 삽입하고 CIDR삽입 7~8일째부터 FSH(Antorin R-10, Kawasaki, Japan) 24AU를 감량법으로 12시간 간격으로 4일간 분할 근육 주사하고, FSH투여 5회째에 PGF_{2α} 25mg, 6회째에 15mg을 투여하여 7회째에 CIDR를 제거하였다. 발정정후를 나타내는 공란우는 12시간 간격으로 2회 인공수정을 실시하고, 인공수정 후 7일째 비외과적인 방법으로 수정란을 채란하였다 (그림 24).

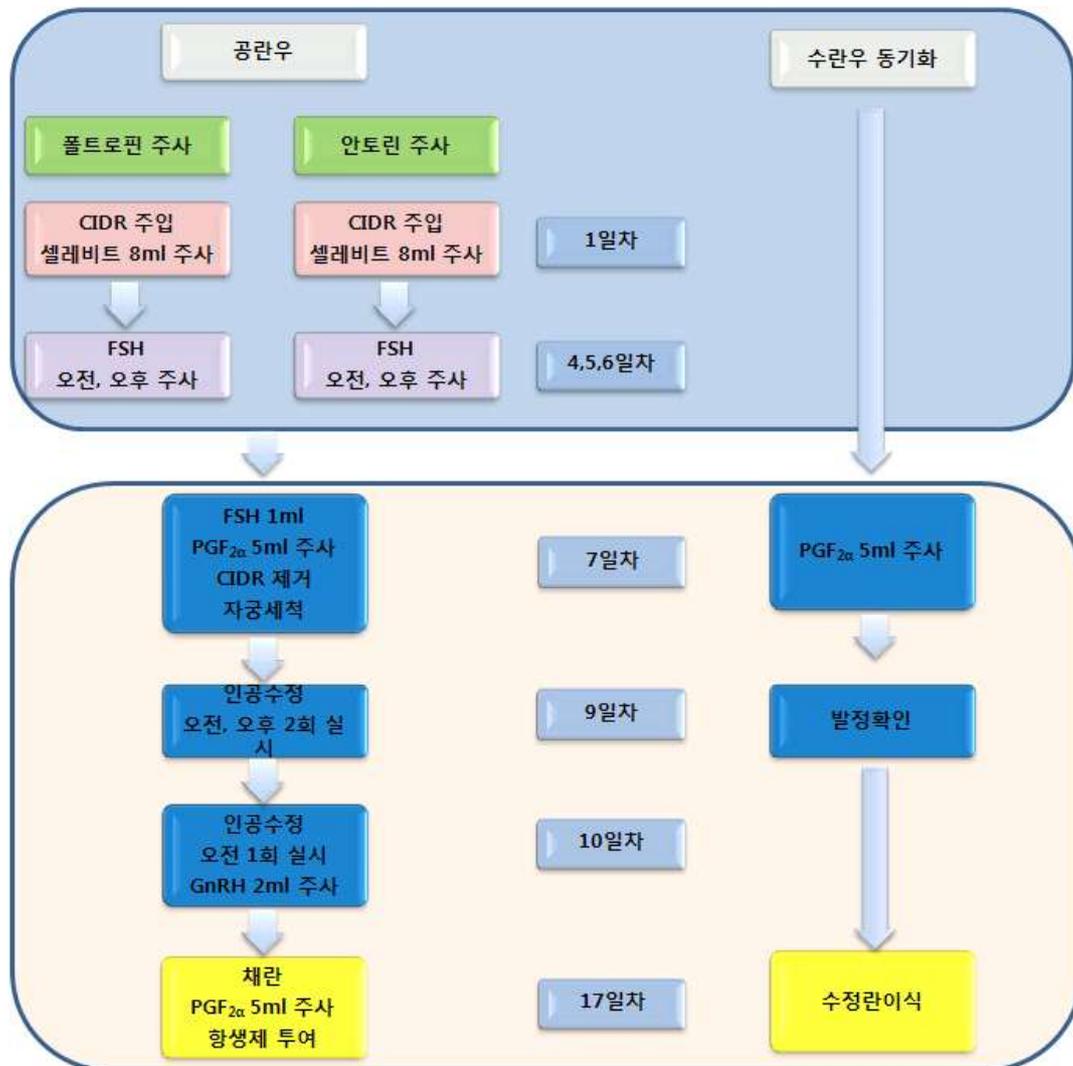


그림 24. 체란프로그램 모식도.

(2) 고능력 한우 수정란을 이용한 수란우에의 이식

(가) 젖소 및 한우 수란우에 수정란이식

① 과배란 처리에 의해 회수된 고능력 한우유래 수정란을 장수유전자뱅크 내 한우 대리모 및 김제, 거창지역의 선발농가 젖소 대리모에 자연발정 및 발정주기 동기화 처리로 수정란이식을 수행하고 수정란이식 후 45-60일에 직장검사법에 의한 태막 및 양막낭 촉진과 초음파진단으로 수태여부 및 태아수를 판정한 결과 56-62%의 수태율을 나타내었다. (표 21, 22).

표 21. 장수유전자뱅크에서의 수정란이식 및 수태실적 (2009)

이식두수	수태두수	수태율
110두	64두	58.0%

표 22. 거창 및 김제지역 농가에서의 수정란이식 및 수태실적

년도	이식두수	수태율 (%)	분만두수	비고
2009	100	56 (56.0)	54	유산2두
2010	100	62 (62.0)	58	유산4두
2011	122	69 (56.6)	최종결과 미확정 (진행중)	최종결과 미확정 (진행중)

나. 개체별 체외수정 프로그램 확립 및 생산

(1) 등급별 난소구분 및 개체별 난자채취에 의한 한우수정란의 대량생산

(가) 개체별 난소채취

난소를 암소 개체별로 분류하여 미성숙난포 내 난자를 채취, 22시간 성숙배양과정을 거쳐, 다음날 등급판정사가 판정한 등급판정기록표와 대조하여 1+이상 (근내지방:6-9)인 개체만을 선별하여 체외수정란을 생산하였다 (그림 25).

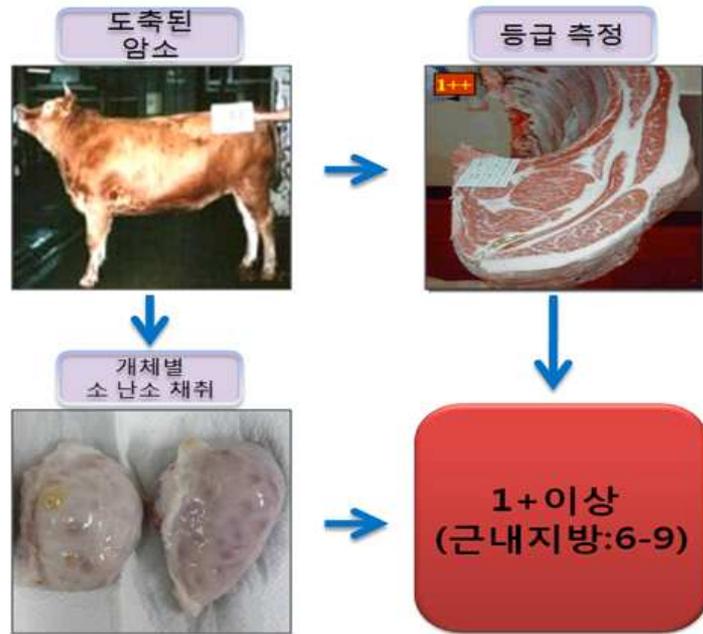


그림 25. 개체별 난소 채취 모식도.

(나) 개체별 체외성숙, 수정 및 배양

등급이 확인된 개체별로 난자를 표지하고 이를 이용하여 체외수정란을 생산한 후 1+등급 이상 판정을 받은 개체 유래의 수정란만을 이용하여 수정란이식을 통해 산자를 생산하였다. 한우 및 젃소대리모를 이용한 개체별 한우수정란이식에 있어 대리모의 품종에 관계없이 미경산우가 경산우에 비하여 높은 수태율을 나타내었다 (표 23). 따라서 대리모로서 한우와 젃소 모두 한우수정란이식에 이용 할 수 있다고 판단되며 착유우를 대리모로 활용하여 한우를 생산하면 농가소득 및 한우개량보급속도를 증가시키는 데 기여할 것으로 생각된다.

표 23. 한우 및 젃소대리모의 개체별 한우수정란이식 성적

대리모 품종	수태율 (%)	
	경산우	미경산우
한우	132/313 (42.2)	75/124 (60.5)
젃소	54/137 (39.4)	263/380 (69.2)

(다) 비육점정

태어난 수소는 비거세 또는 거세를 하여 비육전기 후기를 거쳐 30개월 령에 도축 후 최종육질등급을 판정하였다. 이전 연구를 통하여 개체별 이력추적 시스템 하에서 등급이 확인된 체외수정란 유래 한우의 비육성적은 다음과 같다 (표 24). 본 연구결과 개체별 체외수정란을 정란생산을 통해 우량등급의 수정란을 이식할 경우 그 산자 또한 90%가량이 동일등급 이상을 나타내는 것으로 확인되었으며 선발농가에 이식하여 생산한 경우에도 최고등급인 1++를 보이는 개체는 전국 평균에 비해 5배가량 높은 38.3%로 확인되었다 (표 25).

표 24. 개체별 이력추적 시스템으로 수정란 이식한 한우의 비육성적(장수유전자뱅크)

생체중(kg)	공시두수	등급판정결과			1 ⁺ 이상 (%)
		1	1 ⁺	1 ⁺⁺	
700미만	2	-	2	-	
700 ~ 749	3	1	1	1	
750이상	5	-	4	1	
합계	10	1	7	2	9(90.0)

표 25. 전국 한우 거세우 등급출현율과 본 연구팀의 수정란이식 산자의 등급출현율 비교

구분	출하두수	등급					
		1 ⁺⁺ (%)	1 ⁺ (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)	D (%)
전국	98,090	7,698 (7.8)	19,514 (19.5)	27,695 (28.0)	25,695 (26.2)	17,108 (17.4)	614 (0.6)
본 연구팀	60	23 (38.3)	24 (40.0)	13 (21.7)	0	0	0

(라) 개체별 체란 시스템 후 잉여 수정란의 동결 및 용해

동결액은 PBS(+) 에 1.8M ethylene glycol 및 0.1M sucrose를 첨가하여 작성하였으며 동결할 수정란을 선정, PBS(+)로 세정하고 동결액에 넣어 5-10분간 정치시킨 후 0.25ml straw에 수정란이 포함된 배양액을 흡입하고 동결 straw를 -6°C로 조정된 동결기에서 10분간 정치시킨 후 식빙을 실시하고 동결을 수행하였다. 동결-용해 후 배반포의 생존율은 48시간 체외에서 추가 배양 후 정상 배반포로의 회복 정도에 의해 판단하였다. 수정란의 등급은 육안적으로 A-C 등급으로 나누어 그림 26과 같이 판단하였다. 동결-용해된 배반포의 생존율에 있어 배반포의 등급에 따라 회복율이 낮아지는 결과를 나타내었지만 A등급과 B등급의 경우 각각 95%, 80.1%의 회복율을 나타냄으로서 높은 생존율을 나타내었다. 또한 A등급의 경우 84.2%가 동결용해 후 부화배반포가 형성되었으며, B등급의 경우도 50.1%의 부화배반포가 형성되었다 (표 26).

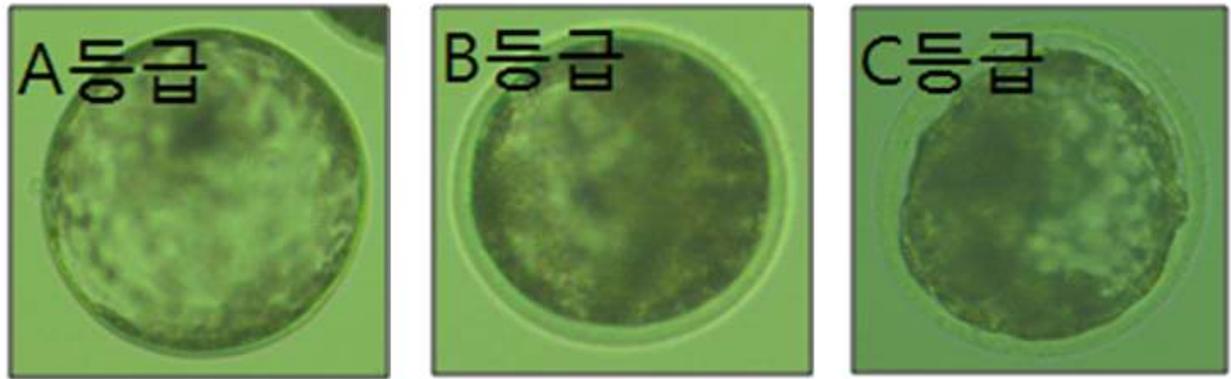


그림 26. 한우 수정란의 등급 구분

표 26. 체외수정란의 동결융해 후 생존율

배반포	동결융해 수정란	생존율(%)	부화배반포 (%)
A등급	76	72 (95.0)	64 (84.2)
B등급	63	51 (80.1)	32 (50.1)
C등급	83	54 (65.1)	36 (43.3)

(2) 한우수정란의 동결융해 후 수태실적

개체별 체외수정란 생산에 따른 잉여 수정란의 생산은 수란우와 생산된 수정란의 번식주기가 맞지 않을 경우 필수적으로 동결보존 해야만 잉여 수정란의 활용이 가능하게 된다. 앞서 제시된 결과를 바탕으로 A 등급의 체외수정란만을 이용하여 동결 및 융해 후 이식을 통해 수태를 유도하고 그 결과를 신선란과 비교한 결과 신선란과 동결란을 각각 1개씩 이식하였을 경우 동결란의 수태율이 신선란에 비하여 다소 낮은 것으로 나타났으나 동결란 2개를 대리모에 이식했을 경우 신선란을 1개 이식한 결과와 유사 또는 다소 높은 수태율을 나타내었다 (표 27). 따라서 잉여 수정란을 동결융해한 후 수정란이식할 때 수태율을 높이기 위해서는 2개의 수정란을 동시에 이식하는 것이 효율적일 것으로 판단되며 이를 통하여 고능력 한우생산효율을 가속화할 수 있을 것으로 생각된다.

표 27. 한우수정란 동결실적 및 동결융해 후 수태실적

구 분	이식두수	임신두수	수태율 (%)
신선란	315	177	56.2
동결란 (1개)	97	43	44.3
동결란 (2개)	30	18	60.0

다. 염증반응 억제를 통한 수정란이식 효율 향상기법 개발 (체외배양 모델)

(1) 수정란이식 시 모체 국소염증반응 완화유도를 위한 후보물질 선발

(가) 인공수정에 비해 낮은 수정란이식 효율은 다양한 요인에 의한 것으로 판단되며, 그중 수정란이식 시 발생하는 수정사에 의한 자궁의 자극 및 수정란이식기의 삽입에 따른 자궁내부의 상처에 의해 염증반응이 유발되며, 이로 인해 자궁 내 PGF2a의 급격한 증가가 보고되었다. 따라서 본 연구에서는 수정란이식 시 발생하는 염증반응에 의한 낮은 효율성을 높이기 위해 염증반응을 억제하여 이식된 수정란의 착상 시 착상효율 및 임신율을 향상시키기 위해 실시하였다.

(나) 수정란이식 효율 저하를 향상시키기 위해 프로스타글란딘을 조절할 수 있는 물질 확보: 지금까지 보고된 연구들은 자궁내부의 염증반응에 의한 PGF2a의 증가를 수정란이식 전 주사제의 사용을 통해 낮추는 방식을 사용하였다. 이런 주사제 사용은 체내에 잔류물질을 남기게 되어 이후 임신유지 및 한우 생산에 영향을 미쳐 생산효율 및 안정성에 문제가 발생되고 있다. 본 연구에서는 체외모델을 통해 검증된 물질을 수정란이식 시 배반포와 같이 자궁 내에 주입하여 직접적으로 자궁 내에 작용할 수 있도록 유도하며, 체내에 잔류할 수 있는 물질을 최소화 할 수 있는 방법을 개발하고자 하였다. 이러한 후보물질로 dexamethasone 및 rhLIF를 프로스타글란딘을 억제할 수 있는 물질로 선발하여 먼저 체외배양 실험에 사용하였다.

(2) 수정란이식 시 체내에서 프로스타글란딘의 증가에 따른 배반포 부화율 및 착상저해 극복을 위한 체외모델 확립

(가) 프로스타글란딘에 의한 부화율저하 극복을 위한 체외실험모델 개발

체외수정을 통해 생산된 수정란들은 5일차 상실배기 단계부터 10일차 부화 단계까지 체외에서 배양을 하였다. 각 체외 생산된 5일차 상실배기 수정란들은 Dexamethasone과 rhLIF가 첨가된 상태로 체외배양을 실시하여 배반포 발달률 및 부화율을 측정했으며, 또한 부화 저해 인자인 PGF2a를 첨가한 상태로 Dexamethasone과 rhLIF를 첨가하여 체외조건에서 체내와 같이 염증에 의해 발생하는 PGF2a의 분비에도 부화가 되는지를 알아보기 위해 실험하였다. 실험과정은 그림 27에서 나타내었다.

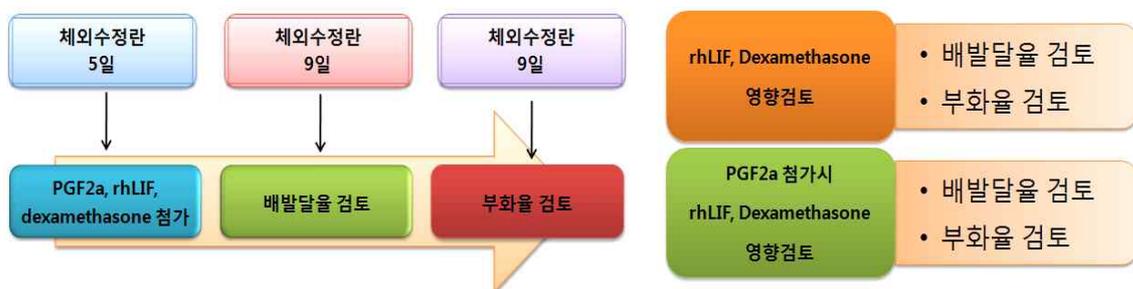


그림 27. 프로스타글란딘 억제제 첨가 소 수정란 체외배양 모델 모식도

(나) 체외배양 시 Dexamethasone 및 rhLIF의 첨가 후 배반포 발달 및 부화율 검토

프로스타글란딘 (PGF2a) 증가를 억제하는 것으로 알려진 dexamethasone과 rhLIF를 체외배양 시 첨가한 후 해당물질들이 수정란 자체에 영향을 주는 지 확인하기 위해 배반포 발달 및 부화율을 확인하였다. Dexamethasone과 rhLIF를 첨가 시 배반포 발달에는 영향이 없었지만 dexamethasone과 rhLIF를 단독 또는 병행 처리 시 높은 부화율이 확인되었다 (그림 28).

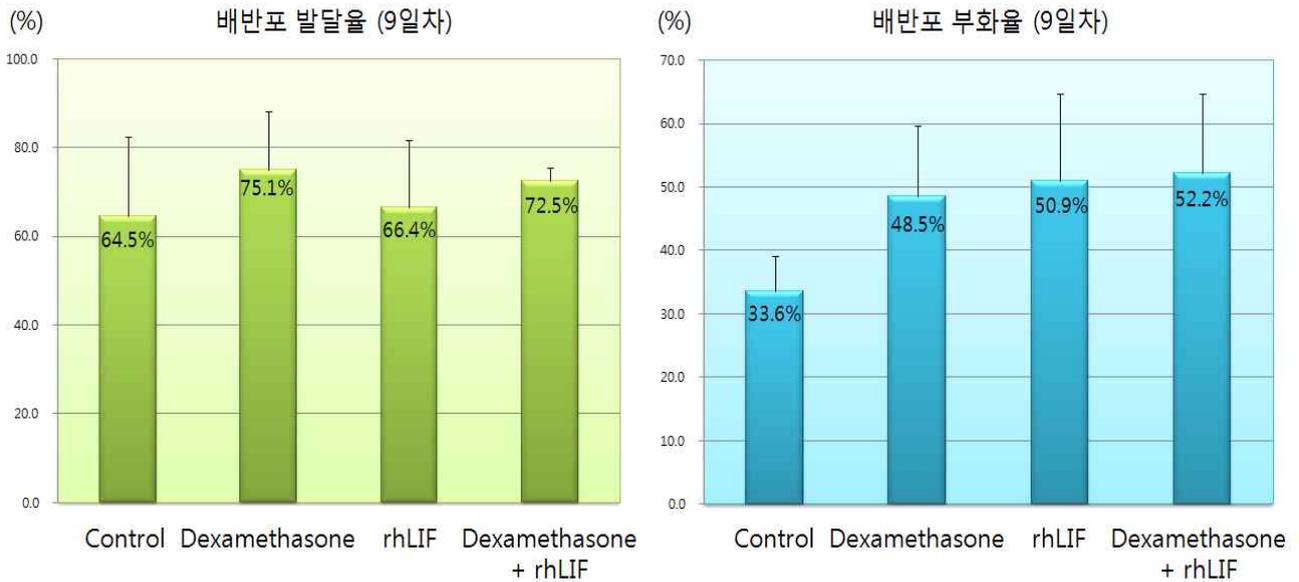


그림 28. Dexamethasone 및 rhLIF 첨가 후 배반포 발달 및 부화율

(다) PGF2a의 존재 하에서 dexamethasone 및 rhLIF의 첨가 후 배반포 발달 및 부화율 검토

프로스타글란딘 PGF2a 증가에 의해 수정란이식 시 배반포의 발달, 부화 및 착상을 저하하는 것으로 보고되었다. 따라서 본 연구에서 체내 조건과 같은 높은 농도의 PGF2a의 존재 하에서 dexamethasone과 rhLIF를 첨가 시 배반포 발달 및 부화율을 향상시킬 수 있는지 알아보았다. 본 연구결과 PGF2a의 존재 및 억제제를 처리했을 때도 배반포 발달율은 정상적으로 나타났지만, PGF2a의 존재 하에서 상실배기부터 배반포 부화단계까지 배양 시 부화율이 33.6%로 아주 낮게 나타났다 (그림 29, 30). 이러한 결과는 체내에서와 같이 체외에서도 PGF2a에 의해 부화가 저하 되는 것으로 판단된다. 또한 PGF2a의 억제제인 dexamethasone과 rhLIF를 단독 또는 병합해서 처리 시 정상적으로 부화가 발생된 것으로 나타났다. 이 결과는 체외에서 부화율 저하를 향상시킬 수 있으며, 체내에서도 동일한 효과를 나타낼 것으로 판단되며, 부화율의 향상은 착상 및 임신율의 향상을 가져오므로 수정란이식 생산효율이 증가 될 것으로 판단된다.

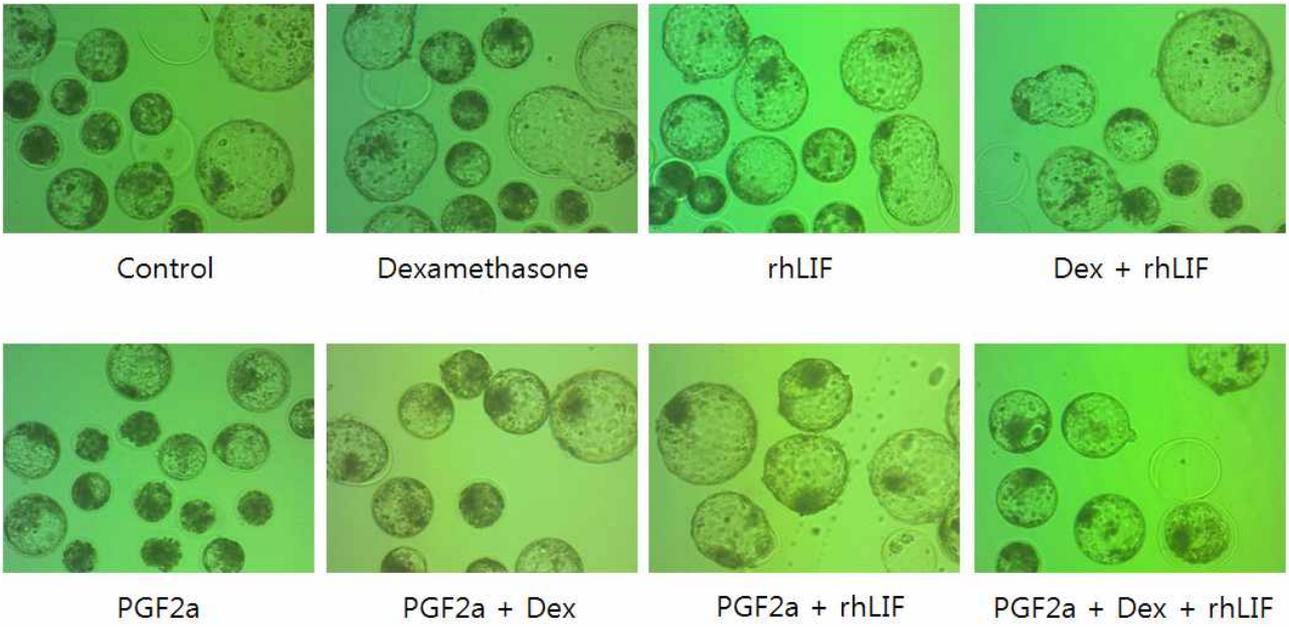


그림 29. Dexamethasone 및 rhLIF 첨가 후 한우 배반포의 체외발달 및 부화양상

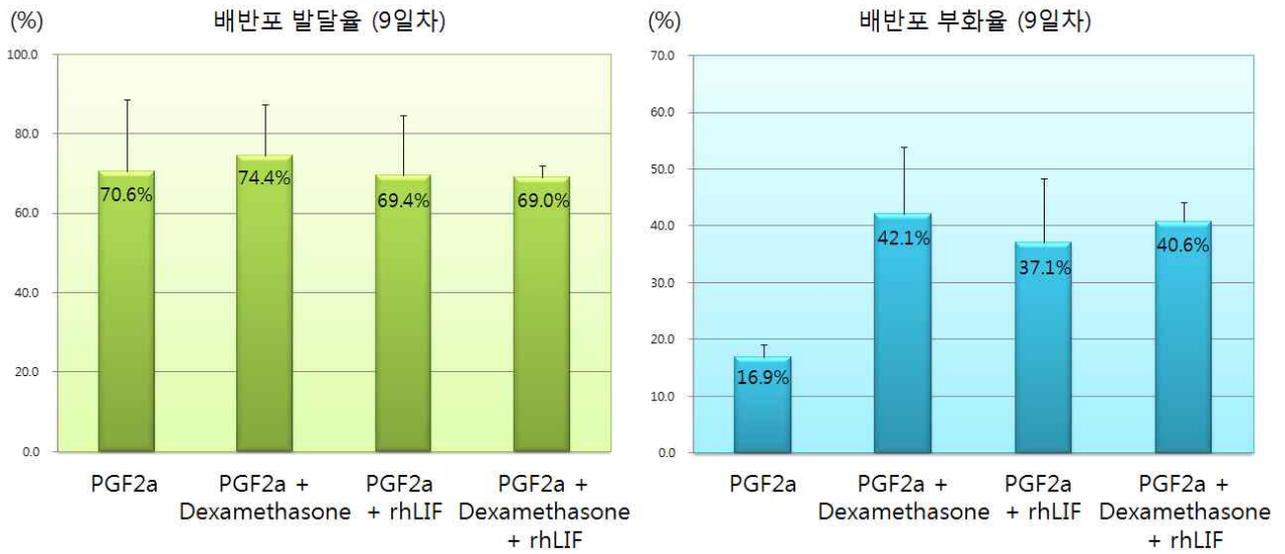


그림 30. Dexamethasone 및 rhLIF 첨가 후 한우 배반포의 체외발달 및 부화율

라. 염증반응 억제를 통한 수정란이식 효율 향상기법 개발 (수정란이식을 통한 임상시험)

(1) Dexamethasone과 rhLIF가 첨가된 수정란이식용 배양액을 이용한 수정란이식

수정란이식 시 염증에 의해 발생하는 급격한 PGF2a의 증가는 체내,외 수정란이식 시 낮은 착상율, 임신율 및 산자생산 효율을 나타내는데 본 연구에서는 앞서 체외에서 효과가 확인되고 수정란 자체에 부작용을 나타내지 않는 dexamethasone과 rhLIF 동시 처리방법을 이용하여 수정란이식을 실시하였다 (그림 31). 그림에서와 같이 수정란이식 시 배반포기 단계의 수정란을 dexamethasone과 rhLIF가 첨가된 수정란이식용 배양액에 침지한 후 수정란이식용 straw를 제작하여 자궁내로 직접 배반포와 염증억제제를 같이 첨가하였다.

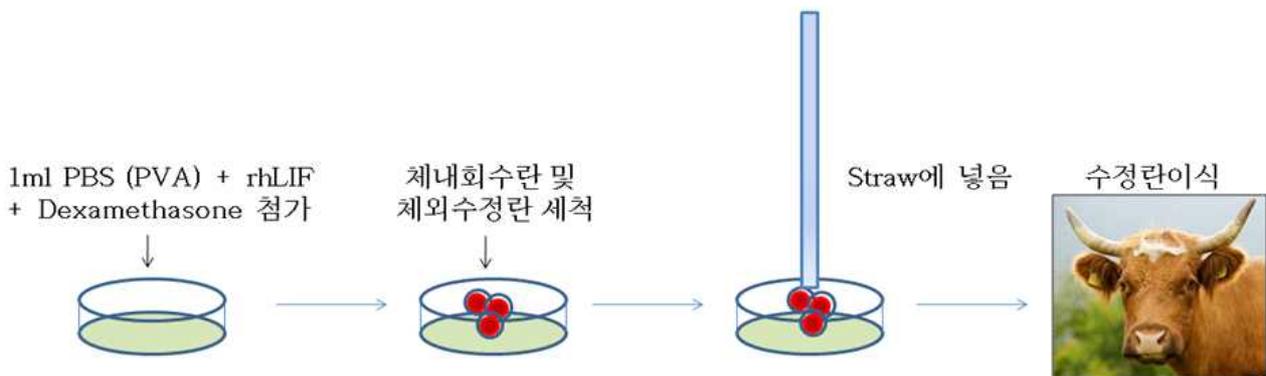


그림 31. 수정란이식용 straw에 dexamethasone과 rhLIF 첨가용액에 수정란을 침지하는 과정

(2) 개발된 수정란이식용 배양액을 이용한 수정란이식 후 임신율

수란우는 모두 미경산우를 이용하였으며, 수정란이식 시기는 2010년 9월에서 10월말까지 신선란과 체외수정란을 같이 이식하였으며, 이티바이오텍(주) 및 장수유전자뱅크와 공동으로 진행하였다. 임신감정은 이식 4-6개월에 실시하였다. 대조군에서는 총 75두를 이식하여 42두가 임신되어 임신율은 56%로 나타났으며 본 연구에서 개발된 배양액을 이용한 실험군에서는 총 126두 이식하여 86두가 임신, 68.3% 임신율을 나타내어 체외모델로 제시한 실험과 같이 체내에서도 dexamethasone과 rhLIF를 병행처리 시 염증반응을 억제한다는 것을 알 수 있으며 수정란이식 후 임신율 자체도 세계적으로도 매우 높은 수준의 결과이다 (표 28). 현재 개발된 내용을 정리하여 특허출원을 진행하는 과정에 있다.

표 28. 염증억제제를 이용해 수정란이식 후 임신율

구분	이식두수	임신두수	임신율
대조구	75	42	56%
첨가구	126	86	68.3%

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표의 달성도

연구목표 및 내용	연구개발 수행 내용 및 결과	달 성 도
한우 체외수정란유래 배아줄기세포 생산	한우 체외생산 배반포를 이용한 배아줄기세포 확립 및 대량생산 (60계대 이상 증식 중인 세포주 16개 확보)	목표치 달성
소 단위발생 및 체세포핵이식 유래 배아줄기세포 생산	1. 한우 체세포 핵이식 배반포 유래 배아줄기세포주의 수립 및 대량생산 (60계대 이상 증식 중인 세포주 9개 확보) 2. 한우 단위발생 배반포 유래 배아줄기세포주의 수립 및 대량생산 (60계대 이상 증식 중인 세포주 4개 확보)	목표치 달성
배아줄기세포의 동결보존 및 용해 후 분석	동결보존 및 용해 후 생존율 향상기법 확립 (Thiazovivin 처리에 의한 동결용해 후 생존 및 계대유지 효율 향상)	목표치 달성
각종 배아줄기세포의 체내외 특성 검증	전능성 줄기세포의 다양한 분자세포생물학적 특성 체외분석 및 누드마우스 내 세포접종 후 테라토마 조직생성 유도를 통한 체내분석 실시 및 결과제시	목표치 달성
줄기세포 관련 첨단 발생공학기법 연구	1. 소 배아줄기세포 모델을 이용한 조직공학 응용연구의 예비연구로서 마우스 배아줄기세포를 이용한 뼈 및 연골 재생모델 개발 2. 마우스 핵이식 및 동정생식 배아줄기세포 생산 3. 후속연구로 한우 유도만능줄기세포 생산 진행 중 4. 인간치수 유래 만능줄기세포 생산 진행중	목표치 달성
배아발생 관련 발생생물학 기전 연구	1. 마우스 핵이식 배아 발생효율 향상기법 개발 (TSA의 효과 규명) 2. 포유동물 초기배아의 배아축 형성기전 규명 연구 (2세포기 배아의 지질분포와 발생 중 축형성과의 관계 규명)	목표치 달성
개체별 체외수정 프로그램 확립 및 생산	개체별 체외수정 프로그램을 통한 한우 및 젖소 대리모를 이용한 수정란이식 프로그램 개발 및 보급	목표치 달성
확립된 수정란이식 프로그램에 의한 후대 송아지의 특성검정	개체별 이력추적 시스템으로 수정란이식을 실시한 한우의 비육성적 결과 제시 및 동결용해 후 수정란을 이용한 수정란이식 후의 수태실적 제시	목표치 달성
수정란이식 후 임신율 향상기술 개발	텍사메타손과 LIF를 이용하여 모체 염증반응 억제를 유도하는 수정란이식용액 개발 및 이를 이용한 수정란이식 후 수태율 향상 프로그램 개발 (특허 출원)	목표치 달성

제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

본 연구에서 도출된 소 수정란, 단위발생란 및 핵이식란에서의 배아줄기세포주 수립 성공결과는 국내에서 최초로 검증에 성공한 것일 뿐만 아니라 동시에 세가지 세포주를 안정적으로 확보한 연구그룹으로는 세계 최초로서 대동물에서의 줄기세포 연구 및 관련기술 발전에 크게 기여하였으며 추후 세포주 등록을 통해 타 연구자가 관련 연구를 위해 세포주를 필요로 할 경우 이를 공유할 계획으로 있다. 특히 소의 배아줄기세포는 인간배아줄기세포 및 마우스 배아위관 줄기세포와 매우 유사한 성상을 보이고 있으며 본 연구진은 후속연구로 유도만능줄기세포에 관한 연구를 이어가고 있기 때문에 향후 인간배아줄기세포와 만능줄기세포의 유사점 및 차이점에 관한 연구를 하는데 있어 사전연구에 필요한 연구재료로서도 널리 활용이 가능할 것으로 생각된다. 또한 이러한 연구성과를 바탕으로 국제공동연구도 활발히 수행할 계획이며 이와 관련하여 다수의 국내외 연구그룹이 관심을 보이고 있다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 논문게재 성과 (SCI 급) 및 예정

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2011	Promoted expression of IGF-I, DNMT3a and OCT-4 in the parthenogenetic murine blastocysts developed in an oil-free microtube culture system may support stem cell generation	최영주, 강호인	노상호	성지혜, 홍성두, 민병무	Tissue Engineering and Regenerative Medicine	8(1)	국내	SCIE (IF: 3.158)
2011	Extended exposure to trichostatinA after activation alters the expression of genes that important for early development in the nuclear transfer murine embryos	강호인	노상호	-	Journal of Veterinary Medical Science	73(5)	국외	SCI (IF: 0.713)
2012	Lipid-Rich Blastomeres in the Two-Cell Stage of Porcine Parthenotes Show Bias toward Contributing to the Embryonic Part	김기영	노상호	박상규	Animal Reproduction Science	130(1)	국외	SCI (IF: 1.792)
2012	Insulin-like growth factor 2 promotes osteogenic cell differentiation in the parthenogenetic murine embryonic stem cells	강호인	노상호	성지혜, 정홍문, 홍성두, 우경미	Tissue Engineering Part A	18(3)	국외	SCI (IF: 4.667)
현재 투고중 또는 투고예정인 논문 (SCI 급, 아래)								
	A simplified one-step nuclear transfer procedure alters the gene expression pattern and developmental potential of cloned porcine embryos	박상규	노상호	-	Theriogenology	Under review	국외	
	Promoted chondrogenic differentiation of parthenogenetic murine embryonic stem cells by insulin-like growth factor 2 treatment under the three dimensional culturing environment	강호인	노상호	정영단	Tissue and Cells	Under review	국외	
	Efficient production of bovine embryonic stem cell lines by the treatment of various small molecules	박상규, 김대환	노상호	김세웅, 정연길	Cellular Reprogramming	투고 예정	국외	
	Generation of embryonic stem cell lines from somatic cell nuclear transfer bovine embryos in Korean beef cattle	김대환	노상호	박상규, 김세웅, 정연길	Stem Cell and Development	투고 예정	국외	

2. 논문게제 성과 (일반) 및 예정

게제연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외구분	구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2010	Effects of Knockout Serum Replacement in Culture Medium on the Proliferation of Porcine Fetal Fibroblasts In Vitro	김은주, 박정주	노상호	최영주, 박상규	International Journal of Oral Biology	35(1)	국내	학진등재 (KCI)
2010	Piezo-assisted intracytoplasmic sperm injection in cattle	김세웅	노상호	강호인, 성지혜	Journal of Embryo Transfer	25(2)	국내	학진등재 (KCI)
2010	Effect of Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, on the expression of pluripotency and neural crest specific marker genes in murine multipotent skin precursor cells	홍지훈, 박상규	노상호	-	International Journal of Oral Biology	35(4)	국내	학진등재 (KCI)
2010	In Vitro Development of Porcine Parthenogenetic Embryos under the Oil-free Culture System	박상규	노상호	최영주	Journal of Embryo Transfer	25(4)	국내	학진등재 (KCI)
2011	Comparison of the methods of zona pellucida removal and inner cell mass isolation for the generation of parthenogenetic embryonic stem cells in HanWoo cattle	김대환	노상호	박상규, 김세웅, 정연길	Journal of Embryo Transfer	26(2)	국내	학진등재 (KCI)
2011	Optimization of electrofusion condition for the production of Korean cattle somatic cell nuclear transfer embryos	김세웅	노상호	김대환, 정연길	Reproductive and Developmental Biololgy	35(1)	국내	학진등재 (KCI)
2011	Development of reversing the usual order of somatic cell nuclear transfer in mice	강호인	노상호	성지혜	Journal of Embryo Transfer	26(1)	국내	학진등재 (KCI)
2012	Effects of exogenous insulin-like growth factor 2 on neural differentiation of parthenogenetic murine embryonic stem cells	최영주	노상호	박상규, 강호인	Reproductive and Developmental Biololgy	36(1) 예정	국내	학진등재 (KCI)

3. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2011	국소 항염증제를 포함하는 수정란 이식용 용액을 이용한 소의 수정란 이식 방법	서울대학교 산학협력단	대한민국	10-2011-0107543	예정		좌동		

4. 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
6		4	2		3	3	5		1

제 2 절 성과활용계획

⑦ 추가연구 및 타 연구 활용계획

현재 ‘비배아성 만능줄기세포 생산 및 분석을 통한 가축 유전자원의 보존 및 활용’ 이라는 제목으로 농림수산식품기술기획평가원이 지원하는 생명산업기술개발과제를 2011년도 하반기부터 수행중이며 본 연구과제에서 도출된 배아줄기세포의 연구결과를 후속연구의 결과물과 비교분석하는 데 활용할 계획이다.

⑧ 실용화, 산업화 및 교육지도홍보 등 기술 확산 계획

- 고급육 출현 한우 암소 (밀소)의 생산기반 구축을 통한 암수 양측의 한우개량 시도.
- 고능력 한우의 선진화된 수정란 선별 및 수정란 이식 관리 시스템 구축.
- 한우에서 배아줄기세포를 이용한 유전자원 보존기법개발로 새로운 한우유전자 관리시스템 구축 (embryo and stem cell banking).
- 산업체, 학계 및 지방자치단체의 협업에 의한 농업경영효율화 달성 및 축산관련 연구인력의 신규 일자리 창출과 국내 및 국제 경쟁력 강화.

⑨ 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획

- 확보한 배아줄기세포주의 최종 검증 후 (현재 마무리 단계임) 세포주은행에 등록예정.
- 예정된 특허 및 논문은 앞의 연구성과항목에 세부적으로 나열하였음.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구과제를 수행하며 관련연구로 상호교류하게 된 호주 모나시대학교의 세포재프로그래밍/줄기세포 연구그룹과 소 배아줄기세포 및 만능줄기세포와 관련된 정보교환을 수행하였으며 후속 연구를 통해 추가적인 공동연구 및 관련자료 교류를 실행중임. 특히 호주 연구진이 최초로 발표한 소의 유도만능줄기세포를 확보하고 본 연구실 내 연구원의 현지교육을 통해 소에서 만능줄기세포 수립 및 유지관련 노하우 및 기술을 확보하였음 (그림 32 참조).

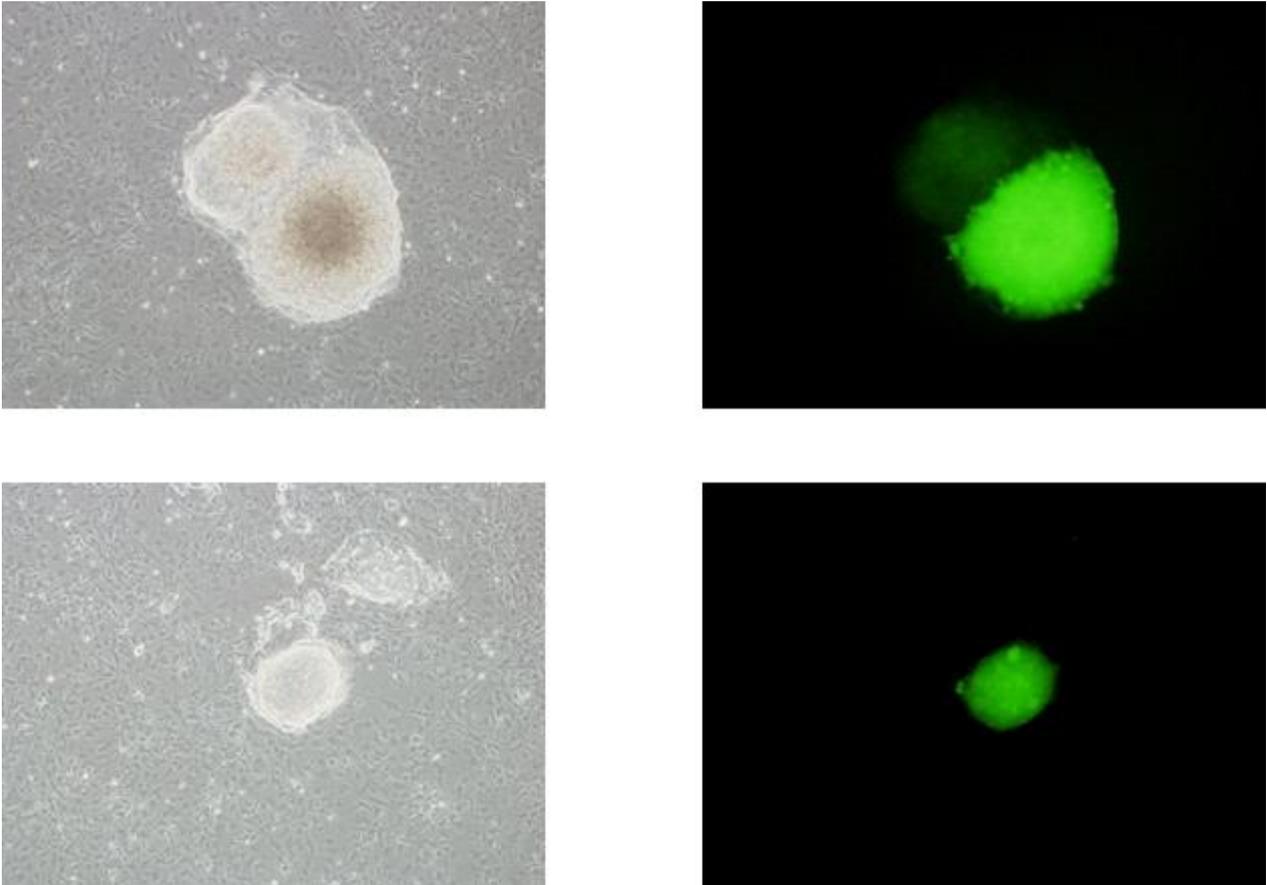


그림 32. GFP 유전자가 삽입된 소 만능줄기세포 colony의 모습 (호주 모나시대학 제공)

제 7 장 참고문헌

Anand T, Kumar D, Singh MK, Shah RA, Chauhan MS, Manik RS, Singla SK, Palta P. 2011. Buffalo (*Bubalus bubalis*) embryonic stem cell-like cells and preimplantation embryos exhibit comparable expression of pluripotency-related antigens. *Reproduction in domestic animals*. 46(1):50-58.

Behboodi E, Bondareva A, Begin I, Rao K, Neveu N, Pierson JT, Wylie C, Piero FD, Huang YJ, Zeng W, Tanco V, Baldassarre H, Karatzas CN, Dobrinski I. 2011. Establishment of goat embryonic stem cells from in vivo produced blastocyst-stage embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 78(3):202-211.

Deahwan Kim., Sewoong Kim, Yeongil Jung, Sangho Roh. 2011. Comparison of the methods of zona pellucida removal and inner cell mass isolation for the generation of parthenogenetic embryonic stem cells in HanWoo Cattle. *J. Emb. Trans.* 26(2):111-115.

Cao S, Wang F, Chen Z, Liu Z, Mei C, Wu H, Huang J, Li C, Zhou L, Liu L. 2009. Isolation and culture of primary bovine embryonic stem cell colonies by a novel method. *Journal of experimental zoology Part A, Ecological genetics and physiology* 311(5):368-376.

Doetschman T, Williams P, Maeda N. 1988. Establishment of Hamster Blastocyst-Derived Embryonic Stem (Es) Cells. *Developmental biology* 127(1):224-227.

Evans MJ, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292(5819):154-156.

Gauthaman K, Fong CY, Bongso A. 2010. Effect of ROCK inhibitor Y-27632 on normal and variant human embryonic stem cells (hESCs) in vitro: its benefits in hESC expansion. *Stem cell reviews* 6(1):86-95.

Munoz M, Diez C, Caamano JN, Jouneau A, Hue I, Gomez E. 2008. Embryonic stem cells in cattle. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 43 Suppl 4:32-37.

Pain B, Clark ME, Shen M, Nakazawa H, Sakurai M, Samarut J, Etches RJ. 1996. Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* 122(8):2339-2348.

Pashaiasl M, Khodadadi K, Holland MK, Verma PJ. 2010. The efficient generation of cell lines from bovine parthenotes. *Cell Reprograming* 12(5):571-579.

Saito S, Strelchenko N, Niemann H. 1992. Bovine Embryonic Stem Cell-Like Cell-Lines Cultured over Several Passages. *Roux Arch Dev Biol* 201(3):134-141.

Sewoong Kim, Deahwan Kim, Yeongil Jung, Sangho Roh. 2011. Optimization of electrofusion condition for the production korean cattle somatic cell nuclear transfer embryos. *Reprod. Dev. Biol.* 35(1):17-22.

Sukoyan MA, Vatolin SY, Golubitsa AN, Zhelezova AI, Semenova LA, Serov OL. 1993. Embryonic Stem-Cells Derived from Morulae, Inner Cell Mass, and Blastocysts of Mink - Comparisons of Their Pluripotencies. *Molecular reproduction and development* 36(2):148-158.

Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4):663-676.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282(5391):1145-1147.

Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP. 1995. Isolation of a Primate Embryonic Stem-Cell Line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(17):7844-7848.

Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Hearn JP. 1996. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biology of reproduction* 55(2):254-259.

Wang L, Duan E, Sung LY, Jeong BS, Yang X, Tian XC. 2005. Generation and characterization of pluripotent stem cells from cloned bovine embryos. *Biology of reproduction* 73(1):149-155.

Wheeler MB. 1994. Development and Validation of Swine Embryonic Stem-Cells - a Review. *Reprod Fert Develop* 6(5):563-568.

Xu Y, Zhu X, Hahm HS, Wei W, Hao E, Hayek A, Ding S. 2010. Revealing a core signaling regulatory mechanism for pluripotent stem cell survival and self-renewal by small molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(18):8129-8134.

Yadav PS, Kues WA, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H. 2005. Bovine ICM derived cells express the Oct4 ortholog. *Molecular reproduction and development* 72(2):182-190.

Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. 2003. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115(3):281-292.

Ying QL, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, Cohen P, Smith A. 2008. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453(7194):519-523.

주 의

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