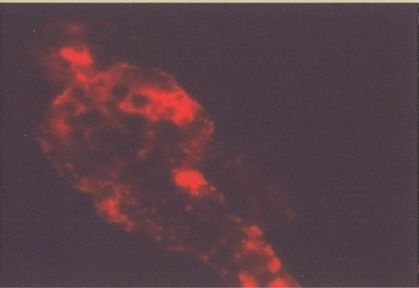


# 형질전환 수산동물 개발 및 이용을 위한 사전조사 연구



2009. 11

농림수산식품자료실



0018551

농어업 · 농어촌 특별대책위원회

**『형질전환 수산 동물 개발 및 이용을 위한  
사전 조사』에 관한 연구용역  
최종 보고서**

2009. 11.

부경대학교

**농어업·농어촌특별대책위원회**



## 제 출 문

농어업·농어촌 특별대책위원장 귀하

본 보고서를 “형질전환 수산 동물 개발 및 이용을 위한  
사전조사 연구”의 최종보고서로 제출합니다.

2009년 11월 25일

연구책임자 : 부경대학교 김 동 수

공동연구원 : 부경대학교 남 윤 권

공동연구원 : 부경대학교 윤 문 근



# 요 약 문

## I. 연구과업명

형질전환 수산 동물 개발 및 이용을 위한 사전조사 연구

## II. 연구목적

자유무역·무한경쟁 시대에서 우리나라 수산 증양식 분야의 국제경쟁력 확보를 위해서는 수산분야의 산업구조 개편(1차 산업 → 2차 및 3차 산업)을 주도할 수 있는 첨단 생명공학 기술군의 접목과 세계 시장을 공략할 수 있는 초일류 상품의 개발이 필요하며 이를 위해서는 수산분야에서도 종래의 고전육종 또는 선발육종의 기술적 한계를 극복할 수 있는 재조합 형질전환 수산동물의 이용 방안이 적극적으로 검토되어야 한다. 그러나 그간 우리나라의 경우 형질전환 수산 동물 개발을 위한 대형 연구개발 투자가 전무하였기 때문에 신규 분야에 대한 초기 R&D 투자의 효율 증대와 목표 달성 가능성을 극대화하기 위해서는 사전 조사와 기획 평가 연구를 통한 전략적 로드맵 마련이 우선적으로 필요하고, 이에 본 연구는 형질전환 수산 동물 생물반응기 (Bioreactor · Biofactory) 등 신기능성 수산 품종 개발을 위한 사전 조사와 투자계획안을 마련함을 목적으로 한다.

### III. 주요 연구내용

#### 1. 형질전환 수산 동물 관련 기술 현황 분석

1) 형질전환 유전자 조작 및 유전자 도입 기술의 경우 현재 까지 주로 척추동물인 어류를 중심으로 방법론들이 평가된 상태이며, 미세현미주입법, 전기천공법, 리포솜처리법, 정자운반법, 직접주입법, 리트로바이러스매개법, 체세포핵이식, 생식시원세포 이식법 및 DNA 코팅 입자 전달법들이 여러 어종에 사용되어 각각의 장단점들이 보고된 바 있으나, 아직 많은 연구들에서 미세현미주입법에 의존하고 있는 실정임. 무척추 수산동물의 경우 상기 방법론들에 대한 일부 시도가 실험적으로 이루어지고 있는 상태로서 그 완성도가 높지 못한 실정인데 이는 작은 크기의 접합자 및 배우자, 생식 기구에 대한 연구 부족, 일부 종들의 경우 체외 수정 및 출산등이 주요 원인으로 여겨지고 있음.

2) 형질전환체 분석 기술의 경우 어류를 대상으로는 유전체 정보 수집 규모에 따라 상대적으로 완성도 높은 형질전환 계통의 분석 기술이 접목될 수 있는 수준으로서 유전자 삽입 구도 분석, 도입 유전자좌위(locus)의 안정성 분석, 도입 유전자 발현 정량 분석, 내재 유전자의 차등발현에 미치는 영향, 조직 및 기관의 표현형적 변화, 도입 기능 및 기타 연관 기능의 변화 등이 일부 형질전환 어류 계통에서 보고되어 있음. 반면 무척추동물

의 경우(패류 및 갑각류)는 기능성 형질전환 계통 확립 자체가 미흡하여 다양한 분석기술이 활용된 사례가 극미한 실정으로서 유전자 전달 성공 유무를 분석하는 수준임.

3) 형질전환 어류 계통 확립 기술의 경우 고속성장 형질전환 계통을 중심으로 다양한 계통 확립 정보가 개발되어 있으며, 일부 기타 형질에 대한 연구가 진행 중임. 무척추동물의 경우(패류 및 갑각류)는 아직 기능성 형질전환 계통 확립 사례는 극미한 상태임. 어류의 경우 일부 어종들에서 단순 교배프로그램이 아닌 염색체 공학을 이용한 추가 육종 계통의 개발이 보고된 바 있으며, 이에 대한 확대 개발이 예상되어 불임 배수체 형질전환 어류, 자성발생성 형질전환 어류, 음성발생성 형질전환 어류, 잡종 및 잡종 3배체 형질전환 어류, 동형접합 clonal 형질전환 어류 계통의 확대 개발이 예상된다.

## 2. 국내외 신기능성 형질전환 동물 연구개발 사례 분석

1) 양식생산성 향상을 위한 형질전환 어패류 연구개발 사례 분석

현재까지 고속성장 형질전환 어류가 가장 많은 연구개발이 되어 있으며, 대부분 성장호르몬 유전자를 이식하는 방식을 이용하고 있음. 다양한 분류군에서 개발되었거나 개발 중에 있고



그 대표 사례로서 연어목 어류(무지개송어 및 대서양 연어 등), 잉어목 어류(이스라엘잉어, 미꾸라지, 인도잉어), 농어목 어류(나일틸라피아, 잡종 틸라피아 등), 메기목 어류(차넬메기 등)등이 있음. 이들 형질전환 어류의 경우 다양한 수준에서의 성장 가속 현상이 보고되고 있으며, 이는 사용한 유전자(조절부위 포함), 도입 유전자 donor 와 recipient 숙주와의 근연 관계 그리고 사용한 숙주의 계통에 따라 서로 다른 결과를 나타내고 있음. 성장호르몬 유전자 이식외 양식생산성 향상을 위한 형질전환 시도로서 관상애완용(소형 어류에 형광 단백질 유전자 이식 등), 질병저항성 (lysozyme, cecropin 등 항균 펩타이드 유전자 이식 등), 저온내성 (anti-freeze protein 및 desaturase 유전자 이식 등), 영양대사 개선(비타민 C 생합성 및 탄수화물 소화 이용 관련 유전자 이식 등), 불임유도(RNA interference 기술을 기반으로 한 성숙 단백질의 발현 억제 등)이 시도되고 있으나 일부 사례를 제외하고는 아직 산업화 단계에는 이르지 못하고 있음.

## 2) 형질전환 생물반응기 연구개발 사례 분석

형질전환 동물 생물반응기는 재조합 동물로 하여금 목적 단백질(식이약 단백질 등)을 직접 발현토록 함으로써 그간 미생물 등 시스템으로는 효과적인 발현과 생산이 불가능하였던 단백질들을 직접 동물이 생산하도록 하는 기술임. 생물반응기를

위해서 다양한 생물 platform들 (박테리아, 효모, 진균류, 동물 배양세포, 식물 및 동물)이 그 이용 가능성을 타진 받고 있으나 개발속도, 단가, 산물의 활성, 대량생산 가능성 등을 고려 시 동물을 이용하는 방식이 가장 높은 잠재력을 보유한다고 여겨지고 있다. 아직 어류를 platform으로 이용하고자 하는 연구는 매우 초기 단계로서 일부 실험적인 연구들만이 보고되고 있으나, 어류 자체가 보유한 다양한 장점에 힘입어 형질전환 생물 반응기 platform으로서 그 가능성이 타진 되고 있음. 어류는 (1) 비교적 낮은 negative feedback regulation 강도를 나타내므로 외래 단백질의 과발현 용이하고, (2) 높은 자손 생산력(산란력)으로 인해 개발된 생물반응기 어류로부터 대량의 형질전환 자손 생산 용이할 뿐만 아니라, (3) 염색체 공학 등 추가 육종 기술 접목 용이하여 계통 확립, 순계의 대량 복제, 외부 환경조절에 의한 생물반응기 작동 조절이 유리하고, (4) 변온 동물 특성 상 냉수성 어종을 이용할 경우 외래 단백질의 저온생산이 가능하며, (5) 포유류/조류 platform과 비교 시 병원체 공유 정도 매우 낮을 뿐만 아니라 포유류에 비해 윤리적 문제 논란이 낮다는 장점이 있음. 그러나 반면 아직 전세계적으로 완벽한 시험 성공 사례가 없고 연구개발은 개념 정립 단계로서 대형 축산 동물에 비해 현존하는 대부분 양식어류의 성체 크기가 제한 적이며 축산에서 사용하고 있는 milk/urine 등의 platform을 사용할 수

없다는 단점을 극복해야만 함. 현재까지 무지개송어의 난을 이용, luteinizing hormone을 생산하거나 틸라피아를 이용하여 human clothing factor 또는 insulin을 생산하고자 하는 연구들이 시도된 바 있음.

### 3. 재조합 수산 동물 생물반응기 개발 로드맵 및 투자 계획

#### 1) 형질전환 어류 생물반응기 개발 기본 전략

생물반응기로서 형질전환 어류 시스템을 이용하기 위해서는 상기 주요 기술사항에 대한 문제점을 해결하기 위한 연구개발이 우선적으로 수행되어야 함. 첫째, 어류 새로운 발현 시스템을 개발하기 위해서는 조직특이적 유도발현 및 외래 유전자의 인위적 switching 등에 관한 기술이 정립되어야하고, 이는 대상 어류의 다양한 유전체 연구와 유전자 발현 조절에 관한 다양한 biotic 및 abiotic factor들의 영향에 관한 연구가 이루어져야만 함. 둘째, 현실적으로 사용가능한 중대형 양식어류 역시 포유류에 비해서 개체크기가 크지 않으므로 dual transgenic 기법을 이용, giant 거대 어류를 1차 형질전환으로 확립하고, 이로부터 giant 어류로 하여금 2차 형질전환을 통해 생물반응기 기능을 수행케 하는 방법이 요구됨. 셋째, 어류는 포유류에서 일반적으로 사용하는 유즙 및 뇨를 단백질 분리 조직으로 사용할

수 없기 때문에 개체를 죽이지 않고 사용할 수 있는 대체 조직으로서 난괴(Egg mass)가 그 대상물로서 가능성을 타진 받고 있으며, 또한 포유류와는 달리 어류는 수많은 자손을 대량번식시킬 수 있다는 점에서 근육 역시 생물반응기 생산 조직으로서 생각해볼 수 있음. 넷째, 외래 단백질 축적형 형질전환 모델이 거의 전무하기 때문에 단백질의 분리 정제가 가능한 수준의 형질전환 모델 어류들을 우선적으로 개발, 외래 단백질의 분리에 대한 경험을 시급히 축적할 필요성이 있음. 이에 상기 개발전략들을 유기적으로 연계함으로써, 거대 고속성장 형질전환 어류 platform을 구축하고, 이들에게 2차 형질전환을 통해 생물반응기 기능을 부여하며, 개발된 생물반응기의 분자유종 및 복제 집단을 육성하고, 이들로부터 최적 단백질 분리 정제 기법을 확립해나가는 전략이 적절함.

2) 형질전환 어류 생물반응기 개발을 위한 핵심 기술군 도출  
제1기술군으로서 “중대형 giant 어류 platform 개발 기술”은 목적어류의 생물 조작, giant 어류 유도 벡터개발, 그리고 platform으로 활용하기 위한 최적 계통의 확립 및 육종을 중점적으로 수행하며, 제2기술군으로서 “외래 유전자의 어류 내 정밀 발현 제어 기술”은 생물반응기 작동을 위해 요구되는 유전자의 인위적 발현 조절 및 이를 기반으로 한 신규 발현벡터

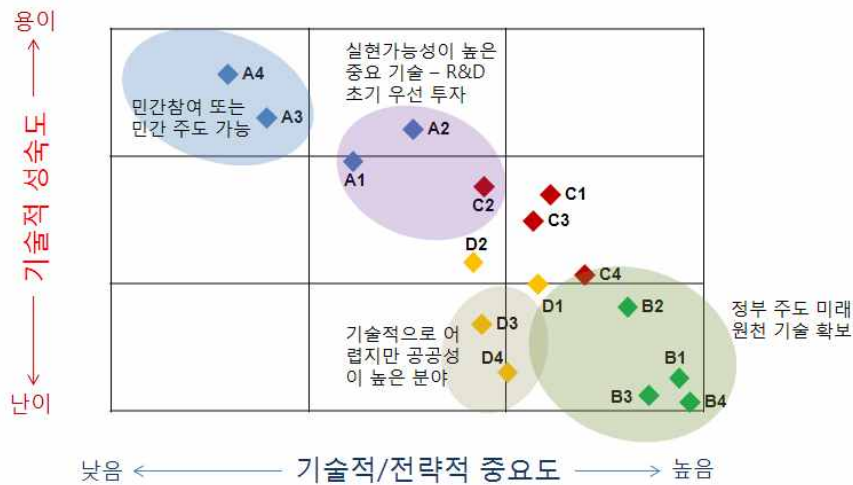
시스템을 확보하고, 제3기술군으로서 “외래 단백질 축적형 giant 형질전환 어류 개발”에서는 dual transgenic을 통해 상기 확보된 giant 어류 platform(제1기술군)에 생물반응기 발현 벡터를 이식(제2기술군)함으로써 어류 생물반응기를 가시화 시키는 연구를 수행하며, 그리고 제4기술군인 “형질전환 어류 기능 극대화 및 실용화 기술”에서는 확보한 생물반응기의 기능성을 극대화시키고 실용화를 위한 바이오 안전성을 확보하는 것에 주력함. 이들 4개 기술군으로부터 목표 달성을 위해 아래의 16개의 세부 요소 기술군을 도출함.

제1기술군	제2기술군
<b>A1</b> 생물 조작/생산 및 유전자도입 <b>A2</b> 속성장/giant 유도 발현 벡터 <b>A3</b> 동형접합성 형질전환 계통 <b>A4</b> 대량생산 및 최적 계통의 분자유종	<b>B1</b> 기능성 조절부위 대량 발굴 및 평가 <b>B2</b> 어류 조직특이적 발현 시스템 <b>B3</b> 외래 발현 switching 시스템 <b>B4</b> Chimera 프로모터 조절 기술
제3기술군	제4기술군
<b>C1</b> 최적 발현 벡터 <b>C2</b> bioreactor test 모델 어류 <b>C3</b> 외래 단백질의 고효율 분리 <b>C4</b> Giant bioreactor 어류	<b>D1</b> 분자유종 및 계통간 stacking <b>D2</b> 대량 분리 정제 및 활성 평가 <b>D3</b> LMO의 물리적 격리 및 안전시설 <b>D4</b> LMO 환경 위해성 평가

### 3) 요소 기술군들의 portfolio 분석

상기 4개의 기술군으로부터 도출된 16개 세부 기술들에 대하여 portfolio 분석을 실시함으로써 개발 전략의 기본 방향을 수립하고 이를 기반으로 매크로 및 마이크로 로드맵 작성하였음. Portfolio 분석은 기술적 성숙도(성공 가능성)와 기술적/

전략적 중요도(기술의 파급효과 및 목적 달성을 위한 중요도)를 두 개의 축으로 하여 16개 기술군을 분석하였고, 성공가능성(즉, 기술적 성숙도) 정도에 의거 정부/민간 참여 정도, 그리고 실현 가능성에 따라 우선적인 초기 R&D 투자가 이루어 질수 있는 부분, 그리고 기술적으로는 어려우나 공공기반 성격이 강하여 정부 주도로 원천 및 미래 기술을 확보해나가야 하는 부분 등으로 아래와 같이 clustering을 수행하였음.



#### 4) 매크로 및 마이크로 로드맵 마련

기술의 필요 우선 순위에 의거하여 platform 개발 및 발현 제어 기술 개발은 프로젝트 개시점부터 각각 5년 및 7년간의 연구개발을 수행함으로써 생물반응기를 가시화시키기 위

한 기반기술을 정립하도록 하며 상기 기반 기술 정립을 바탕으로 2013년부터 생물반응기 giant 어류를 실현시키기 위한 연구 개발을 6-7년간 실시함으로써 기반기술 확립 분야와 4-5년 동안의 연계를 실시한 후, 2년간의 독자 진행을 통해 최종 완성도 높은 어류 생물반응기를 개발함. 어류 생물반응기 개발이 진행됨에 따라 이들에 대한 기능성 극대화 및 실용화 기술을 2016년부터 준비하고, 이와 함께 바이오 안전성 확보를 위한 LMO 격리시설 및 위해성 평가 기술 개발을 수행함.



마크로 로드맵에 의거, 각 기술군별 도출된 세부 요소 기술들에 대한 마이크로 로드맵을 구축한다. 각각의 요소 기술에 대하여 기술적 priority, 실현 가능성 및 그 개발 전략 부여한다.



연구투자는 10년간 총액 56,600백만원(국고: 48,400백만원 85.5% 및 민간 8,200백만원 14.5%)으로서 연구 개발은 2011년부터 개시하는 것이 적절함.

#### IV. 결론

국내외 환경변화와 여건 악화로 인해 우리나라 수산업의 경쟁력은 점차 약화되고 있는 실정으로서 종래의 노동집약적 구조를 기반으로 더 이상의 국제경쟁력을 확보하기 어렵고, 따라서 새로운 활로 개척과 시장 확대를 위해서는 첨단



생명공학을 접목한 새로운 도전과 노력이 요구된다. 이에 수산 동물을 대상으로 그간 단순 식량 위주의 개발에서 나아가 재조합 형질전환기술을 바탕으로 한 새로운 부가가치 창출과 국제 시장의 진출이 필요하며, 특히 고가의 식의약 단백질을 수산 동물이 직접 생산토록 하는 생물반응기 이용 기술은 차세대 수산 생명공학 기술 경쟁의 핵심 key word로 대두될 것은 자명한 사실이다. 따라서 우리나라는 미래 수산분야 기술 및 시장 개편에 능동적으로 대처하기 위해서 수산동물, 특히 어류 생물반응기 개발에 요구되는 원천 및 핵심기술의 확보가 요구되며, 동시에 유전자변형수산생물의 바이오안전성을 확보할 수 있는 평가 및 심사체계를 시급히 마련해야 한다.

## V. 기대효과

1. 자유무역시대 우리나라 수산분야 국제경쟁력 제고를 위한 핵심 기술 및 전략 도출
2. 초일류 수산생명공학 상품을 이용한 국제시장 공략
3. 수산생명공학 산물의 안전하고 건전한 이용을 위한 제도적 지원 기틀 마련
4. 수산 생명공학분야 젊은 과학자 육성 및 학문간 연계를 통한 융합 분야 육성 기대
5. 노동집약적 1차 수산업 구조의 선진화 유도

## 목 차

제출문 .....	i
요약문 .....	iii
목차 .....	1
I. 과업의 개요 .....	3
1. 연구 과업명 .....	3
2. 목적 및 배경 .....	3
3. 범위 및 내용 .....	4
II. 조사 연구 결과 .....	7
1. 형질전환 수산 동물 관련 기술 현황 분석 .....	7
1) 유전자 조작 및 도입기술 .....	7
2) 형질전환체 분석 기술 .....	26
3) 형질전환 계통 확립 기술 .....	33
2. 신기능성 형질전환 수산 동물 연구개발 사례 분석··	47
1) 형질전환 어패류 연구개발 사례 분석 .....	47
2) 형질전환 생물반응기 연구개발 사례 분석 .....	85
III. 추진 계획(안) 마련 .....	115

---

1. 연구개발 로드맵 .....	115
1) 핵심 기술군의 도출 .....	115
2) 요소 기술들의 portfolio 분석 .....	118
3) 마크로 로드맵 .....	121
4) 마이크로 로드맵 .....	123
2. 연구개발 투자계획(안) 및 중장기 발전을 위한 필 요 사항 .....	127
1) 예산 투자 계획(안) .....	127
2) 사업 추진 방식 .....	128
3) 기타 중장기 발전계획(안) 제언 .....	130
IV. 참고문헌 .....	133

## I. 과업의 개요

### 1. 연구 과업명

- 형질전환 수산 동물 개발 및 이용을 위한 사전 조사

### 2. 목적 및 배경

- 자유무역·무한경쟁 시대에서 우리나라 수산 증양식 분야의 국제경쟁력 확보를 위해서는 수산분야의 산업구조 개편(1차 산업 → 2차 및 3차 산업)을 주도할 수 있는 첨단 생명공학 기술군의 접목과 세계 시장을 공략할 수 있는 초일류 상품의 개발이 필요함
- 이를 위해서는 수산분야에서도 종래의 고전육종 또는 선발육종의 기술적 한계를 극복할 수 있는 재조합 형질전환 수산동물의 이용 방안이 적극적으로 검토되어야 함
- 그러나 그간 우리나라의 경우 형질전환 수산 동물 개발을 위한 대형 연구개발 투자가 전무하였기 때문에 신규 분야에 대한 초기 R&D 투자의 효율 증대와 목표 달성 가능성을 극대화하기 위해서는 사전 조사와 기획 평가 연구를 통한 전략적 로드맵 마련이 우선적으로 필요함
  - 형질전환 수산 동물 개발을 위한 요소 기술군의 분석 및 기술 로드맵 마련

- 형질전환 수산 동물 생물반응기(Bioreactor · Biofactory) 등 신기능성 수산 품종 개발 및 이용 가능성 분석
- R&D 투자(예산 및 기간) 계획(안) 마련

### 3. 범위 및 내용

- 형질전환 수산 동물 관련 기술 현황 분석
  - 형질전환 유전자 조작 및 유전자 도입 기술
    - 형질전환 유전자 소재 발굴 및 조작(발현벡터 등) 기술 분석
    - 어패류 세포내 유전자 전달 및 이식 기술 분석
  - 형질전환체 분석 기술
    - 형질전환 유전자좌위 및 유전자형 평가 기술 분석
    - 형질전환 유전자 발현 및 기능 평가 기술 분석
  - 형질전환 계통 확립 기술
    - 후대 생산 및 안정 계통 확립 기술 분석
    - 형질전환 계통의 유전육종 기술 분석
- 국내외 신기능성 형질전환 동물 연구개발 사례 분석

- 양식생산성 향상을 위한 형질전환 어패류 연구개발 사례 분석
  - 양식형질 개선용 형질전환 어류 연구개발 사례 분석
  - 양식형질 개선용 형질전환 패류 및 갑각류 연구개발 사례 분석
  - 문제점 및 개선 방향 분석
- 형질전환 생물반응기 연구개발 사례 분석
  - 형질전환 생물반응기 축산 품종 사례 비교 검토
  - 형질전환 생물반응기 수산 동물 연구개발 사례 분석
  - 수산 동물 생물반응기 개발의 장단점 및 가능성 분석
- 재조합 수산 동물 개발 로드맵 및 투자계획(안) 마련
  - 로드맵 마련
    - 매크로 기술 로드맵 마련
    - 마이크로 기술 로드맵 마련
  - 연구개발 투자계획(안) 마련
    - 단계별(전기, 중기, 후기; 총 10년간) 정부 및 민간 예산 투자 계획(안) 제시
    - 연구개발 추진 방식 제시

- 관련 요소 기술군들의 성숙도 및 파급효과를 고려하여 전략적 우선 개발 분야 제시
- 중·장기 발전방향 제시
  - 수산 동물 형질전환 이용 분야의 중장기 발전(인프라 확충 등)을 위해서 요구되는 연구 인력 확보, 홍보 및 교육, 안전성 확보 등에 대한 시사점 및 정책 방향 제언

## II. 조사 연구 결과

### 1. 형질전환 수산 동물 관련 기술 현황 분석

#### 1) 유전자 조작 및 도입기술

##### 가) 사용 유전자 소재들

형질전환 동물을 생산하기 위한 연구는 1980년 미국의 고든 등이 DNA단편을 생쥐의 수정란에 주입시켜 만든 형질전환형태의 동물을 생산하는 실험적인 시도로 처음 태동하였으며(Gordon et al., 1980), 그 후 1982년에 재조합DNA를 수정란의 전핵내로 미세주입(microinjection)하는 방법으로 유전자변형 생쥐를 개발하면서 유전자도입기법을 이용한 본격적인 연구가 수행되었다(Palmiter et al., 1982). 반면, 수산동물을 대상으로 실시되고 있는 형질전환연구는 이보다 늦은 1984년 무지개 송어 수정란에 미세현미주입 조작을 통해 외래유전자 이식의 시도를 기점으로 하여 어류 유전자 이식 연구가 태동하였다(Maclean & Talwar, 1984).

최근 생명공학기술의 발전으로 유전자 조작 및 유전자 도입 기술을 향상시켰으며, 유전자 소재의 대량 발굴이 가능해 짐에 따라 포유류등 여타 동물에 비해 상대적으로 일천한 역사를 갖고 있음에도 불구하고 비교적 빠른 발전 속도를 보이고 있다. 어류를 대상으로 실시한 유전자 이식 연구는 주로 양식 산업의 생산성 향상을 위해 수행되었으며, 수산동물의 형질



전환 연구 중의 대부분을 차지하고 있을 정도로 매우 중요시되고 있다. 이러한 연구로는 고속 성장 형질전환어류, 특정 질병에 대한 저항성이 향상된 어류, 저온에 내성을 지니는 어류들이 형질전환 기법을 통해 연구되어지고 있거나 이미 개발되었다. 현재, 어류 뿐만 아니라 갑각류, 패류와 같은 무척추동물을 대상으로 한 형질전환기술이 개발되고 있으며, 양식 산업의 생산성 향상에 국한되지 않고 난치병 치료를 위한 고부가가치의 신약 개발, 산업적 응용분야, 오염물질에 민감하게 반응하는 센서개발과 같은 환경 분야에 까지 그 적용 분야가 확대되고 있다.

유전자변형 동물을 생산하기 위한 외래유전자는 동물의 세포내에서 과발현하거나 조건적으로 발현할 수 있도록 유전자 발현을 조절하는 DNA 단편들을 연결시키는 재조합 과정을 거쳐야 한다. 일반적으로 수행되고 있는 DNA 재조합과정을 보면 유전자의 발현을 유도하는 발현 조절 부위인 프로모터(promoter)를 외래유전자의 앞부분에 연결시키고 각종 목적에 따라 사용될 DNA단편 즉, 구조유전자들을 유전자의 앞뒤에 연결함으로써 완성된다. 어류의 경우 유전자 이식의 초창기에는 일부 어종(연어과, 잉어, 틸라피아, 차넬메기 및 금붕어)에 국한되어 이루어졌고, 어류 유전자 자원의 탐색 및 활용기술이 확립되어 있지 않아 어류 세포에서 효과적으로 외래유전자 발현을

유도할 수 있는 어류유래 발현벡터 및 유전자들의 개발이 이루어지지 못하였으며 대부분 포유류 또는 미생물 기원의 조절부위 및 구조 유전자들이 이용되었다. 그 후 1990년 중반부터 분자생물학 및 생물정보학의 기술적인 발전으로 인해 어류에 대한 유전자 정보가 대량으로 발굴되기 시작하게 되었고, 이러한 결과는 어류 자체 유전자 및 조절부위에 대한 대량의 유전정보를 획득할 수 있게 되어 어류유래 유전자를 이용한 다양한 형질전환어류를 만들 수 있게 되었다. 특히, 이러한 연구결과를 토대로 연어과 어류에서 어류유래 성장 호르몬 유전자를 이식하여 획기적인 성장 가속화를 보이는 형질전환체 개발을 성공하였으며(Devlin et al., 1994), 그 후 여러 어종에서 성장 형질을 개선하고자 하는 연구가 유전자이식연구를 통해 활발히 개시되기 시작하였다. 최근에는 형질전환 대상 종과 동일종의 유전물질만으로 이루어진 초고속 성장이 가능한 형질전환 기술이 개발되는데 까지 이르렀다(Nam et al., 2001a, 2001b, 2001c, 2002).

지난 20여 년 동안 약 35종 이상의 다양한 어류에서 형질전환 연구가 이루어져 왔으며, 주로 성장호르몬과 관련된 유전자들의 대상으로 효율적인 유전자 이식 방법 개발 및 재조합 유전자설계에 관한 연구가 이루어져 왔다.

어류의 성장은 성공적인 어류 생산을 위한 매우 중요

한 경제 형질 중에 하나이다. 양식어류에 있어서 이들의 성장 촉진능력 향상은 단위노력당 생산성을 높일 수 있으며 사료효율의 향상 및 생산 가용량 제어에 따른 경제성 향상에 매우 중요하다. 이러한 이유로 형질전환 어류에 대해 보고되어진 대부분의 연구결과가 재조합된 성장호르몬 유전자이식을 통한 성장 촉진에 관한 것이었다. 이러한 형질전환어류의 개발은 어류의 성장호르몬에 대한 유전정보가 1986년 무지개 송어로부터 알려진 후부터 가능해 졌으며, 아울러 성장호르몬의 발현조절 부위에 대한 연구도 함께 발전되었다. 어류 유전자 이식을 위해 가장 초창기에 사용되었던 발현조절 부위로는 주로 포유류유래 특히, 쥐 중금속 해독 유전자인 metallothionein (MT) 프로모터를 사용하였으며, 그밖에 로우스 육종 바이러스(rous sarcoma virus, RSV) 및 사이토메갈로 바이러스(cytomegalovirus, CMV)와 같은 바이러스 기원 프로모터를 주로 사용하였다. 또한 구조 유전자로는 주로 인간(human) 또는 소 (bovine) 등의 포유류 유래의 성장호르몬 유전자를 사용하였다. 그러나 어류와 유연관계가 먼 종으로부터 유래한 발현조절 프로모터와 구조유전자들은 어류 세포내 발현효율이 낮게 나타나는 문제점을 안고 있었다. 연구자들은 이상의 연구결과를 통해 대상 숙주종과의 유연관계가 너무 먼 공여자유래 유전자들이 이식될 경우 형질의 변화가 유도되는 데에는 한계가 있음을 인식하게 되었고, 이를 극

복하고자 어류자체 유전자 조절 부위 및 구조유전자를 확보하기 위한 연구들이 진행되었으며, 다양한 유전자가 어류로부터 분리되어 이들에 대한 형질전환어류개발을 위한 적용가능성을 확인하기 위한 연구가 활발히 진행되었다. 실제로 Du 등(1992)은 북태평양 왕연어(*Chinook salmon, Oncorhynchus tshawytscha*)에 ocean pout (*Macrozoarces americanus*)로부터 분리한 항동결 단백질 유전자(antifreeze protein; AFP)를 프로모터로 하여 왕연어유래 성장호르몬 유전자와 결합시켜 만든 재조합 유전자(GH transgene)를 이식하는데 성공함으로써 “all-fish” 발현 백터를 성공시킨바 있다. 그 후 나일틸라피아(Rahman et al., 1998), 대서양 연어(Du et al., 1992), 태평양에 서식하고 있는 연어속 어류에서 AFP를 프로모터로 사용한 재조합 유전자를 이식시킨 형질전환 어류가 개발되었다(Devlin et al., 1995). 이러한 유전자 변형 방식은 어류 유래의 유전물질을 이용하여 유전자변형어류를 개발하는 방식으로써 앞서 소개한 방식 보다 월등히 우수한 성장가속 현상이 유도되는 것으로 보고되었다. 또한 1994년에는 홍연어(Sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*)유래 metallothionein-B (MT-B)를 프로모터와 성장호르몬 유전자를 이용한 재조합 유전자를 은연어(Coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*)에 이식시킨 “all-salmon” 형질전환어류를 생산하게 되었다(Devlin et al., 1994). 최근 형질전환어류 연구에 있어서 대단히 중요한

연구결과가 보고되었는데 미꾸라지유래 베타 액틴 유전자를 프로모터로하여 동종에서 얻은 성장호르몬 유전자와 결합시킨 재조합 유전자를 이식시켜 만든 소위 “all-mud loch”라 불리는 고속성장 형질전환 미꾸라지가 만들어 졌다 (Nam et al., 1999, 2001a, 2001b, 2001c). 이는 형질전환 유전자의 구성 요소 모두를 동일종의 유전물질만을 이용하는 자가종 유전자이식 (autotransgenic) 방식이 다른 종의 유전물질을 이용하여 형질전환체를 유도하는 방식(allotransgenic)보다 양식 어류의 성장형질 개선에 있어서 매우 효과적임을 보여주는 것으로서 시사하는 바가 크다. 이 후 미꾸라지 연구결과와 같이 자가종 유래 프로모터와 구조유전자를 이용한 형질전환연구기법은 여타 어종 특히, 잉어(Fu et al., 2005), coho salmon(Devlin et al., 2004) 및 기타 어종에서 시도되고 있다.

최근에는 분자생물학적 기법의 발전으로 인해 대량의 유전자에 대한 유전정보를 단시간에 획득할 수 있게 되어 유전자 이식을 위한 다양한 형질전환 유전자 소재들의 탐색이 가능하게 되었다. 실제로 가자미(winter flounder) 또는 등가시치과 어류(Ocean pout)로부터 저온내성에 관련된 항동결 단백질 유전자가 탐색되었으며, 이를 이용하여 담수 및 온수성 어종들에 대한 안정적인 형질전환 계통이 개발되기도 하였다. 현재 어류로부터 신규 유전자 발굴 프로젝트는 EST (expressed sequence

tags) 발굴을 중심으로 신규유전자를 찾아내기 위한 연구가 진행되고 있으며, 다양한 genome 분석 연구들과 연계됨으로써 향후 상기 성장호르몬 유전자 이식 일색인 어류의 형질전환 연구는 생식 및 성 성숙, 질병저항성, 면역증강, 특정 물질 대사의 개선 등과 같은 여타 양적 형질과 관련된 다양한 형질전환 유전자 소재를 이용한 연구가 이루어질 것으로 사료된다.

## 나) 유전자 도입 기술

### (1) 미세현미주입(microinjection)

미세현미주입법은 유전자를 수정난의 핵에 직접 주입하는 방법으로써 주입된 유전자는 세포분열 과정에서 염색체의 어느 한 부분에 무작위로 삽입되어 형질을 나타낸다. 이 방법은 최초의 유전자변형 동물인 고속성장생쥐의 생산에 이용된 이후 대부분의 유전자변형동물을 생산하는데 이용되고 있다. 어류의 경우 역시 외래유전자를 이식하는 방법으로써 현재 어류의 수정난에 직접 DNA 용액을 주입하는 미세현미주입 방법론이 가장 널리 이용되고 있다. 미세현미주입방법은 현미경 하에서 미세조작기를 사용하여 수정 직후의 수정난에 주입하는 것으로, 먼저 수정난을 고정용 피펫으로 움직이지 않게 하고 재조합 DNA가 들어있는 아주 미세한 주입 피펫을 수정난에 밀어 넣는 방법이다. 외래유전자를 주입시 가장 먼저 고려되어야 할 사항

은 난의 생존율을 우선시 되어야 하는데 특히 미세현미주입 기술은 단위시간당 처리할 수 있는 수정난의 수가 한정되어 있는 하지만 생존율이 가장 높은 것으로 조사 되었다.

미세현미주입기술은 양서류 및 포유류의 수정난의 세포질에 효율적으로 재조합 DNA를 주입하기 위한 가장 확실한 방법론으로 알려져 있으나, 어류의 경우 사용하는 난의 종류에 따라 각기 다른 기술적인 방법과 장비를 요구하게 됨은 물론 어종에 따라 미세현미주입에 매우 민감하게 반응하기 때문에 수정난의 생존율에 관한 제한요인으로 작용하는 경우도 있다. 특히, 어류의 경우 난에 축적되어 있는 불투명한 난황물질로 인해 포유류에서처럼 수정난의 전핵(pronuclei)의 직접적인 관찰이 용이하지 못하기 때문에 주로 세포질내로 유전자를 주입하는 방법이 대부분 사용되고 있다. 이러한 방법은 유전자이식의 성공률을 낮추는 주원인이 되기도 할 뿐만 아니라 F0 어류의 모자이시즘을 증가시키는 원인이 되기도 한다. 또한 일부 어종의 경우 수정난을 둘러싸고 있는 단단한 난각은 미세현미주입 자체를 불편하게 함으로써 난각을 제거하기 위한 화학약품의 처리나 해부기법을 통한 물리적인 제거방법이 함께 사용되기도 하였다.

세포질내로 주입된 유전자가 숙주세포의 염색체와 재조합이 되어야 복제와 세포분열을 통한 원활한 유전자의 발현

을 기대할 수 있지만 주입된 유전자가 세포질내에 그대로 존재하게 되면 추 후 배발생과정을 거치면서 모자이크가 극대화 될 수 있다. 따라서 모자이크(mosaicism)을 최소화시키고 효율적으로 다음세대에 외래유전자를 전달시키기 위해서는 2세포기 이전에 미세현미주입을 수행해야만 함으로 실제 외래유전자를 주입할 수 있는 시간이 제한되어 있다. 따라서 제한된 짧은 시간 내에 많은 수의 수정란에 유전자를 주입할 수 있는 방법론의 개발이 요구되고 있으며, 이는 발생속도가 빠른 온대 및 열대산 어종에서 더욱 큰 제한요인으로 작용한다.

외래 DNA를 미세현미주입방법으로 이식한 난의 생존율은 연구보고에 따라 어종마다 매우 다양하게 나타나고 있어 난질이 미세현미주입된 난의 생존율에 매우 큰 영향을 미침을 시사하고 있다. 이는 어종에 따른 미세현미주입 방법을 달리 적용하는 것이 보다 성공적인 형질전환어류를 생산할 수 있음을 제시해준다. 따라서 미세현미주입을 통한 유전자이식 어류의 생산은 이를 통제할 수 있는 숙련된 기술을 요한다. 최근 몇몇 연구자들에 의해 미세현미주입법을 대치할 수 있는 보다 간편하고 대량 처리가 가능한 유전자이식 방법론이 제시되고 있다. 그러나 미세현미주입방법은 이상에서 언급한 다양한 문제점들이 존재하지만 외래유전자를 주입한 후 나타나는 생존율은 타 방법들 보다 높기 때문에 안정적인 유전자이식 형질을 확보하



기 위해 현재까지 가장 널리 사용하고 있는 방법이다.

## (2) 전기천공(electroporation)

전기천공방법은 조직배양된 세포에 유전자를 이식하기 위한 가장 표준화된 방법이다(Neumann et al., 1982). 전기천공방법의 원리는 짧은 전기적 충격에 의해 세포막의 일부를 열리게 하고 이때 DNA와 같은 거대 분자가 세포 내로 주입되도록 하는 방법으로서 정자 또는 난자 및 수정란 모두 사용할 수 있고 대량처리가 가능하다는 장점이 있다. 이러한 이유로 전기천공방법으로 잉어, 메기, 및 틸라피아를 대상으로 실시한 유전자 이식이 성공적으로 이루어진 사례들을 많이 볼 수 있다. 또한 미꾸라지와 비단잉어의 수정란에 전기천공 방법을 적용, 유전자이식의 효율과 주입된 유전자 수가 증가된다는 보고도 있다. 비록 전기천공방법은 난의 생존율이 미세현미주입보다 낮지만 약 60%정도의 생존율을 보이는 것으로 보고되고 있다. 그러나 지금까지 보고된 전기천공방법에 의한 유전자 이식 결과들은 전기천공을 위한 조건들이 매우 다양하고, 발생단계별 최적조건이 확실히 적립되지 않았으며, 염색체 상의 삽입과 발현에 관한 연구가 보고된바가 없다. 또한 전기천공방법은 이식 유전자 이외에 배양수내에 함유하고 있는 단백질 또는 다양한 물질들이 섞여 들어갈 수 있기 때문에 주의를 요해야 한다

(Yamaha et al., 1988).

### (3) 리포솜처리법(lipofection)

리포솜은 세포막의 구성성분인 인지질로서 약물이나 기타 단백질등 다양한 외래 물질을 세포내에 이식하는데 훌륭한 운반체로 사용된다. 리포솜은 DNA와 반응하여 DNA를 둘러싼 복합체 형태를 이루게 됨으로서 운반체인 리포솜이 세포막과 융합됨으로서 자연스럽게 세포내로 주입되는 효과가 있다. 어류의 경우, 리포솜과 유전자가 함유된 용액에 난각을 제거한 초기 배를 섞어주는 방법으로 재조합 유전자를 이식해 왔다. 리포솜을 이용하여 이상의 방법으로 외래유전자를 정자에 이식한 후 수정시키는 방법이 수행된바가 있었지만 수정 이후에는 염색체 상의 삽입율이 현저히 낮은 것으로 나타났다.

### (4) 정자운반법(sperm-mediated)

정자와 난자의 수정과정에서 정자를 유전자의 운반체로 사용하는 방법으로 주로 전핵을 볼 수 없는 유전자변형 조류의 생산이나 유전자 변형 효율이 낮은 가축에서 사용하기 위하여 개발되었다. 이 방법은 정자를 매개체로 이용하기 때문에 보다 자연스러운 방법으로 대량의 DNA를 난자에 이식할 수 있는 유전자 이식기술로 인식되어지고 있다(Lavitrano et al.,

1989). 정자와 DNA간 상호작용에 대해 정확한 기작은 밝혀지지 않았지만 정자의 특징 중 하나가 외부 유전물질인 DNA를 흡착할 수 있는 것만은 확실시 되어 보인다(Arezzo, 1989). 이와 같은 정자의 특징을 이용한 방법은 포유류 및 조류의 유전자 이식에서 널리 시도된 바 있고 재조합 DNA와 정자를 혼합하여 유전자 이식이 가능함을 zebrafish를 대상으로 처음 밝혀진 이래로 다양한 어류에서도 시도되고 있다. 본 방법은 처리방법이 매우 간편하고 생존율에 큰 영향 없이 유전자 이식의 대량 처리가 가능한 장점이 있지만 한 개의 정자에 이식될 수 있는 DNA 분자수의 제한성, 그리고 정자와 혼합한 DNA 분자들이 정자의 핵 내로 이식되기 보다는 정자의 세포막 표면에 단순히 결합한 상태이기 때문에 안정적인 염색체 상의 삽입이 매우 힘들다는 단점들이 밝혀지고 있다. 뿐만 아니라 원활한 수정을 위해서는 1개의 난에 수많은 정자가 비례로 요구되므로 유전자 이식 효율을 앞서 설명한 방법들만큼 유지하기 위해서는 최적 정자 수 및 유전자이식에 참여할 수 있는 정자의 확률이 어느 정도인지에 대한 검토가 우선적으로 이루어져야 할 것이다. 최근에는 몇몇 학자에 의해 본 방법을 이용한 유전자이식을 시도한 결과 이상에서 언급한 이유들로 인해 재현성이 떨어진다는 문제점과 아울러 이 기술의 유용성에 대한 많은 논란이 보고되고 있다. 이상의 문제점을 해결하기 위한 노력의 일환으로 외래유

전자를 전기천공방법을 이용하여 정자에 삽입시키는 방법이 시도 되었지만 대부분의 외래유전자가 정자표면에 그대로 남아 있음을 확인하게 되어 이 또한 실효성이 인정되지 못하였다. 최근에는 미성숙 단계의 정조·정자세포에 바이러스를 이용하여 유전자를 이식한 후 여기에서 성숙된 정자를 활용하는 방법들이 개발되고 있다. 그러나 이 역시 포유류나 조류에서 시도되고 있을 뿐 어류에서의 유전자이식을 위해 시도되었다는 보고는 없다.

#### (5) 직접주입법(direct injection)

직접주입법은 근육과 같은 생체의 조직내로 plasmid (재조합 DNA) 용액을 직접 주입하는 방법으로서 포유류 (생쥐)를 대상으로 처음 소개된 기술이다. 어류의 경우 Hansen 등 (1991)이 잉어를 대상으로 동일한 방법을 적용하여 외래유전자를 이식한 바 있다. 그 외에도 무지개송어, 넙치 및 zebrafish 등 많은 어종에서 성공적인 유전자 발현이 보고된 바 있다. 물론 생식 세포내 유전자 이식을 수행하지 않는다면 다음 세대로의 전달을 기대하기 어려우나 본 방법은 기술적으로 매우 간편하며 조직 내 정량화된 DNA의 주입이 가능하고 조직으로 주입된 유전자의 발현 빈도가 비교적 높다는 장점이 있다. 따라서 이식된 유전자의 효율조사가 용이하며, 어류의 유전자 백신 및 유전

자 치료 등의 연구를 위한 유용성이 매우 높아 주목 받고 있다.

(6) DNA 코팅입자 전달법(particle bombardment)

이 방법은 DNA를 미세한 금등과 같은 미세한 금속 입자에 coating 시킨 후 물리적인 압력을 이용하여 세포벽 및 세포막을 통과시켜 유전자를 이식하는 방법으로 주로 식물을 대상으로한 유전자이식연구에 주로 이용되고 있다. 본 방법으로 미꾸라지, zebrafish 및 무지개송어의 수정란에 외래유전자를 이식한 결과 이식된 개체들의 대부분이 유전자의 일시발현 현상 (Transient expression)만이 관찰되었으며, 더욱이 어종에 따라 비정상적인 기형율과 사망률이 매우 높은 것으로 나타났다.

(7) 리트로바이러스 매개법(retroviral-mediated)

레트로바이러스(Retrovirus)는 자신의 유전물질인 RNA를 역전사효소를 이용하여 DNA로 전환시킨 후 감염된 숙주세포의 염색체 내로 무작위적으로 삽입, 이를 숙주의 물질과 기전을 이용하여 증폭시켜 다량의 바이러스를 생산하는 방법으로 증식한다. 이러한 레트로바이러스의 특성을 이용하여 만든 벡터는 세포의 염색체 내로 삽입되는 특성만 남겨두고 이외의 기전을 담당하는 유전자를 제거한 후 외부 유전자를 재조합하여 수정란에 감염시킴으로서 안정적으로 외래유전자를 염색체

와 융합시켜 발현을 유도할 수 있고, 다음 세대까지 유지될 수 있는 장점이 있다. 이 방법은 바이러스의 강력한 감염 경로를 통하여 재조합유전자를 삽입하게 되므로 유전자 이식 효율 (transfection efficiency)이 미세현미주입방법에 비해 매우 높은 카피의 유전자만 삽입된다는 장점이 있다(Hackett & Alvarez, 2000; Amsterdam & Becker, 2005; Tafalla et al., 2006). 또한 전사가 활발한 염색체상에 선택적으로 유전자를 삽입시키는 특징을 갖고 있어 삽입된 유용 유전자의 발현 가능성이 높고, 숙주유전자 내의 재배열도 거의 일어나지 않아 큰 기대를 모으고 있다. 반면 재조합유전자의 크기가 15kb 이하인 것만 사용할 수 있어 길이가 긴 프로모터나 유전자는 사용하기 어려운 단점이 있으며, 안전성 문제로 상업적인 목적으로는 사용되지 않고 있다. 뿐만 아니라 Ivics 등(1993) 이 zebrafish를 대상으로 유전자이식연구에 적용하여 유전자 삽입을 조사결과 미세현미주입보다 향상됨을 보고한 바가 있지만 아직 어류 특이적인 레트로 바이러스들이 개발되지 않아 더 이상의 큰 진전을 거두지 못하고 있다.

#### (8) 체세포 핵이식(somatic nuclear transfer)

최근 체세포 핵이식 방법은 1977년 영국의 월머트 등이 복제면양 “돌리(dolly)”를 생산한 이후 대부분의 포유동물

복제에 성공하면서 복제기술이 유전자변형 동물을 생산하는 데 폭넓게 활용되고 있다. 특히, 이 기술은 복제동물을 생산하는 과정에서 외래유전자를 공여세포에 쉽게 주입하고 확인할 수 있어서 유전자변형 동물을 보다 효율적으로 생산할 수 있다는 장점이 있다. 복제동물의 생산과정은 먼저 복제하려는 체세포를 공여핵으로 사용할 수 있는데, 이들 세포를 배양하면서 외래유전자를 삽입하거나 또는 세포내 유전자를 삭제 또는 저발현시킨 다음 각종 표시인자나 약물처리에 의한 세포의 선별과정을 통하여 유전형질이 변형된 세포들만을 공여세포로 사용한다. 그리고 핵이 제거된 수정란에 선별된 세포를 주입함으로써 유전자가 이식된 형질전환 동물을 생산한다. 포유동물의 경우 이러한 방법으로 매우 높은 유전자변형 성공률을 기록하지만 대리모에게 이식되었을 경우 임신이 저조하고 임신 중에 유산 등이 많이 일어나 복제효율성 자체가 낮다는 단점이 있다. 그러나 유전자의 과발현, 조건적 발현, 저발현 및 제거된 유전자변형 동물을 생산할 수 있는 방법이기 때문에 유전자변형 동물 생산에서 가장 많이 이용되고 있다.

어류의 경우 포유류와 달리 대리모의 자궁내에 재이식이 필요가 없기 때문에 유전자변형동물을 생산하기 위한 복잡한 기술을 요하지 않는다. 실제로 그동안 포유류에서만 수행되었던 체세포핵이식방법을 처음으로 어류에서 성공한 사례들

이 속 속 보고되고 있다. 한 예로, 장기 배양 zebrafish의 섬유아세포(fibroblast)에 해파리에서 유래한 녹색 형광단백질인 GFP (green fluorescent protein)가 융합된 재조합 유전자를 이식하여 만든 형질전환 체세포를 탈핵한 zebrafish 난자에 이식하는 기법인 핵이식 방법을 통한 수정란을 만들었으며, 형질전환 복제어가 생식능력이 존재하여 F1 및 F2세대까지 전달이 가능한 형질전환 계통을 확립하였다(Lee et al., 2002).

#### (9) 생식시원세포이식법(PGC-mediated)

최근 일본에서는 무지개 송어의 체세포가 아닌 유전자변형 생식시원세포(primordial germ cell)를 이용하여 갯 부화한 산천어(masu salmon)를 대리모로 하여 복강에 현미주입하여 (그림 1) 무지개 송어 자치어를 얻는 방법을 성공시켰다 (Yoshizaki et al., 2003, 2004).



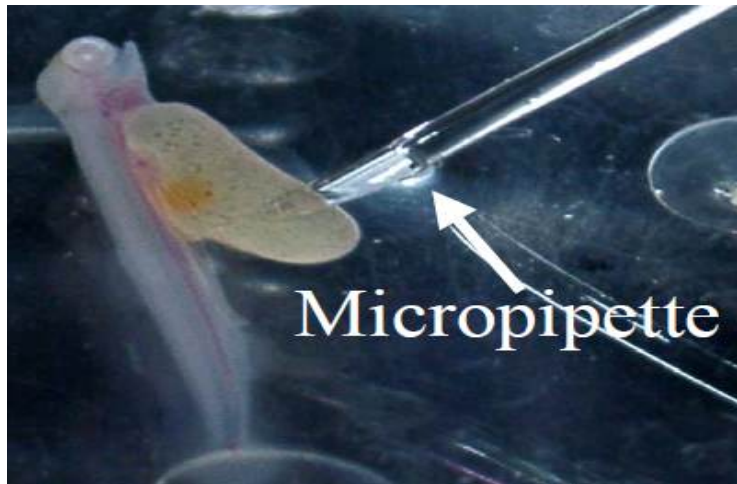


그림 1.

PGC를 산천어의 복강에 미세현미주입하는 사진

(출처: <http://www.jspsusa-sf.org/junba>).

결국, 이러한 방법은 고부가가치 유용어류생산 및 멸종어류 보존을 위해 필요로 하는 대리모인 친어를 자연계에서 흔히 찾아볼 수 있는 어종으로 대체함으로써 친어의 대량사육을 위한 막대한 사육경비를 절약할 수 있는 방법으로 매우 유용할 것이며 유전자 변형 어류가 아니기 때문에 환경에 대해 위해성이 없는 장점을 가지고 있다. 지금까지의 연구결과들은 본 방법의 가능성만을 제시해 주었을 뿐 매우 초보적인 단계에 머무르고 있으며, 소수의 어종에 한정되었기 때문에 다양한 어종간(근연종 혹은 그 이상의 종간) 이식 가능성 여부에 대한 폭넓은 연구가 수행되어야 할 것이다.

(10) 배아줄기세포이식법(embryonic stem cell-mediated)

현재 배아줄기세포이식법은 사람과 생쥐를 비롯한 몇몇 동물에서는 유전자와 관련하여 질환모델이나 연구모델연구를 위해 이미 확립된 상태이지만 어류의 경우 medaka (Hong et al., 1998), zebrafish (Chunguang et al., 2001)에서 처음으로 시도되었다. 줄기세포는 다른 수정란 세포와 응집되었을 때 태아로의 발달과정에서 줄기세포도 여러 조직으로 분화하게 되어 키메라 개체 발생에 기여할 뿐만 아니라, 다음 자손 세대에서 줄기세포 유래의 산자가 생산될 수 있다. 따라서 줄기세포를 배양하면서 특정유전자를 제거하기 위한 재조합유전자를 삽입시킨 다음 이를 선별하여 배반포 단계의 수정란에 주입하고 대리모에 이식하여 키메라 동물을 생산한다. 이렇게 생산된 키메라들에서 줄기세포 유래의 정자와 난자가 생산되면 이들을 이용하여 다시 교배시켜 태어난 다음 세대에서는 키메라가 아닌 정상적인 유전자 제거 동물이 생산된다. 어류에서 줄기세포를 이용한 키메라 생산에 관한 연구는 1992년에 이미 송어와 zebrafish를 대상으로 시작되었고 1993년에는 medaka를 대상으로 한 연구가 보고되었다. 이들은 모두 배양되지 않은 세포주로부터 유도된 키메라였다. 그 후 세포배양기술의 향상에 힘입어 장기간 배양한 줄기세포주(cell line)에서 키메라 개체 생산에 성

공하기에 이르렀다. 장기간 배양된 Medaka의 배반포(blastulae)에서 적출한 줄기세포의 경우 90% 이상의 키메라 생산 성공률을 보였다(Hong et al., 1998). 또한 2001년에는 zebrafish 배아세포를 무지개 송어의 체세포에 배양한 후 대리모에 이식하여 다음세대에 까지 유전자가 전이됨을 밝혀 세포를 매개체로 유전자 이식의 가능성을 보고하였다(Chunguang et al., 2001). 이상의 연구결과를 종합해 보면 medaka와 zebrafish에서 개발된 줄기세포는 생쥐의 배아줄기세포와 비슷한 유전자이식능력을 가지고 있어 어류를 대상으로 하는 다양한 연구에 사용되어 질 가능성을 잘 보여준 연구이다.

## 2) 형질전환체 분석 기술

### 가) 형질전환유전자좌위 분석

형질전환체의 유전자분석은 도입 유전자의 효능 이외에 유전적인 변화가 일어났는지 여부를 파악하는데 중요한 자료를 제공해 준다. 이러한 분석은 형질전환에 대한 깊은 이해를 필요로 하기 때문에 다년간 전문성을 쌓아온 연구자들이 수행해야 한다. 주로 형질전환체 분석은 형질전환유전자좌위의 도입 유무, 도입유전자 cassette의 온정성 확인, 도입 유전자의 복제(copy)수 확인, genomic DNA상의 위치 확인을 위해 사용되어진다. 분석방법으로는 PCR-기반 분석법, blot hybridization 기

반 분석법, kit을 이용한 정성 단백질 분석법등이 사용되어지고 있다.

### (1) PCR-기반 분석법

PCR방법은 도입유전자 cassette의 온전성 확인을 위해 사용하며, 이를 위해 주로 left border와 right Border 부위 염기서열의 존재 여부, vector backbone의 삽입여부, 유전자 cassette 일부의 결실 여부 등을 확인한다. 또한 도입 유전자의 genomic DNA 상의 위치 확인에 주로 사용된다. 방법으로는 inverse PCR(염기서열을 알고 있는 DNA의 양 옆에 서열을 알지 못하는 영역의 염기서열정보를 알고자 할 때 사용), genome walker, tailing PCR 등을 통한 genomic DNA 상의 도입 인접 부위의 염기서열을 확보한 후 이를 숙주 genome 정보분석과 비교분석함으로써 숙주내 도입위치를 확인할 수가 있다. 비의도적 생성과 소멸 유전자의 발현 여부 확인은 주로 reverse transcriptase-PCR (RT-PCR)을 사용하게 되는데, 도입 유전자 cassette에서 비의도적인 산물의 생성여부, 인접 유전자의 발현 조사, 숙주와의 비교 확인, 도입 유전자 cassette에 의한 새로운 ORF의 생성 여부 확인할 수 있다.

### (2) Blot hybridization 기반 분석법

Blot hybridization 기반 분석법은 도입 유전자의 복제 수 확인 및 비의도적 생성과 소멸 유전자의 발현 여부 확인에 주로 사용되고 있다. 도입 유전자의 복제수 확인은 숙주 특이성 single copy 내재 유전자를 선정하고 다양한 제한효소로 절단하여 내재 양성 대조유전자를 Southern blotting 방법(그림 2)을 이용하여 평가대상 계통의 복제 수를 확인하여 수행한다. 또한 비의도적으로 생성된 유전자의 발현은 northern blotting 방법을 사용할 수 있다.

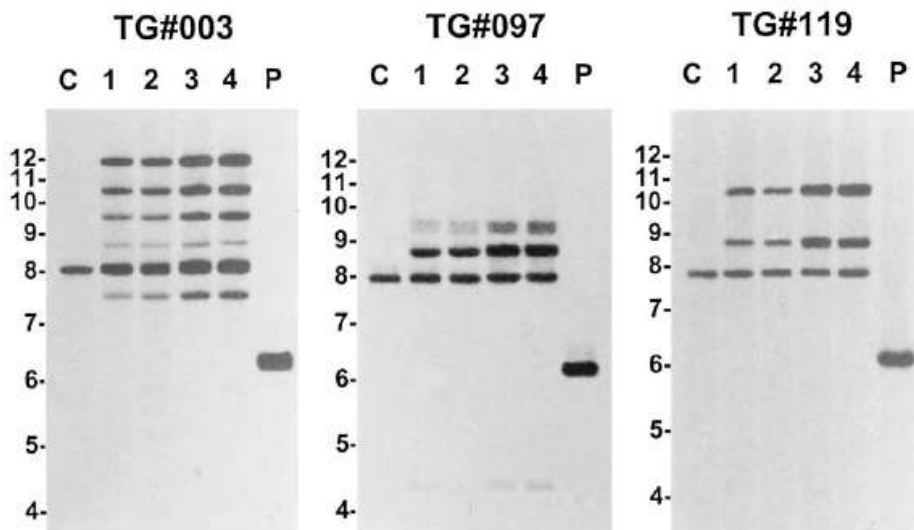


그림 2.

Southern blot hybridization을 통한 도입유전자 검출 예

(출처: Nam et al., 2002).

### (3) 기타 분석법

이상에서 언급한 형질전환체 분석방법 이외에 immunohistochemistry를 기반으로 한 다양한 정성 및 정량 단백질 분석법들이 사용되고 있으며 이는 도입유전자 발현 단백질 특이항체를 주로 이용한다. 도입유전자의 존재 유무를 검출하는 kit은 사용방법이 매우 간단하고 휴대하기에 편리하기 때문에 주로 현장에서 사용하고 있다. 그러나 가공제품(식품)에는 효과적으로 적용할 수 없고, 도입단백질의 발현이 없는 형질전환생물에 대해서는 검사가 불가능하는 단점이 있다.

## 나) 형질전환 발현 및 기능변화 분석

### (1) 도입유전자 mRNA 발현 분석

형질전환체에 도입된 재조합유전자가 염색체상에 성공적으로 삽입되어 목적유전자의 발현이 성공적으로 이루어졌는지를 우선적으로 판단해야 한다. 일반적으로 도입된 유전자의 발현을 분석하는 방법은 PCR기법(RT-PCR)이나 northern blotting, DNA칩으로 도입유전자의 mRNA수준에서 이들의 함량을 정량화하는 방법이 있다. RT-PCR은 크게 mRNA를 역전사 효소를 통해 cDNA로 합성한 후 일반적인 PCR과정을 수행하는 것으로서 mRNA 수준을 보다 빠르고 정확하게 분석할 수 있는 방법이다. 주로 형질전환대상개체들의

신체 장기(시엽, 소뇌, 정소, 난소, 간)를 해부를 통해 적출한다. 적출한 조직은 액체 질소에 담가 급냉시키거나 추출시약에 침지시켜 변성을 최소화 한 후 mRNA를 추출한다. mRNA의 확보는 다양한 추출방법 및 kit가 개발되어 있어 그다지 어렵지 않게 추출할 수 있다. 각 조직에서 추출한 mRNA를 RT-PCR을 통해 증폭한 후 전기영동하여 젤 이미지 사진을 확인하여 도입된 유전자의 조직별 유전자 발현 유무, 발현정도를 확인하거나 (그림 3), 추출된 mRNA를 전기영동하여 이미지 확인 후 이에

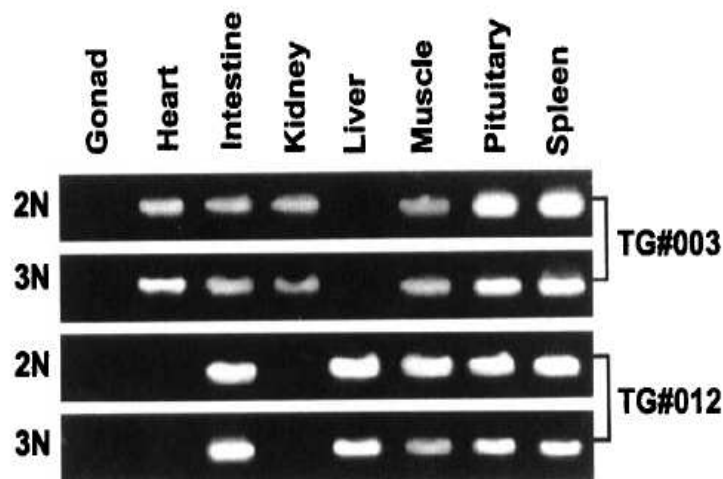


그림 3.

RT-PCR을 이용하여 형질전환미꾸라지의 조직별 도입유전자검출 사진 예  
(출처: Nam et al., 2001b).

사용된 젤에 나일론 막으로 blotting 하여 도입유전자 발현 유무를 분석한다.

## (2) 도입유전자 단백질 발현 분석

미국 Los Alamos 연구소의 Waldo 연구팀은 1999년 세포 내의 발현 단백질 폴딩 및 용해도를 단백질의 특성 및 종류에 관계없이 측정할 수 있는 간단하면서도 효율적인 방법을 고안하였다. 이 방법은 목표 단백질에 리포터 단백질을 결합시켜 발현시킴으로서 매우 간단하게 단백질발현정도를 정량적으로 측정할 수 있게 하였다. 일반적으로 가장 많이 쓰는 방법으로는 형광단백질인 GFP를 목표 단백질의 N-terminal에 결합시켜 발현시켰을 때 세포내 GFP 발현 형광도를 측정함으로써 관찰할 수 있게 만들 수 있다. 이밖에 리포터 단백질로 항생제 저항성 단백질을 이용하는 방법으로 1999년 Maxwell 등에 의해 CAT (chloramphenicol acetyltransferase)를 이용하여 단백질의 세포 내 발현정도를 측정할 수 있음을 발표하였다. 이외에도 도입유전자 단백질 발현 분석에는 단백질 특이항체를 이용하는 western blotting 및 ELISA를 통해 분석하는 방법, 단백질 단위체의 분자량을 결정하고, 정제된 단백질의 단위체 구성을 알기 위해 널리 사용되고 있는 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하는 방법이



주로 사용되고 있다(그림 4; 형질전환생쥐로부터 얻은 소의 Beta-Casein 발현분석).

### (3) 도입유전자 표현형적 변화 분석

형질전환 수산동물의 도입 유전자의 발현유무를 확인하는 방법으로는 이상에서 언급한 Northern blot 분석에 의한 mRNA의 합성여부 조사, 단백질 immunoblotting, radioimmunoassay 등이 사용되고 있으며, 세균유래 유전자를 사용할 경우, 발현된 효소를 정량화하거나 조직학적 방법이 이용이 쉽게 접목 될 수 있다. 또한 도입유전자의 성격에 따라 표현형적 변화요인을 분석하는 방법이 사용되어야 하는데 예를 들어 성장호르몬 유전자를 이용할 경우, 체중, 체장을 측정하거나, 체내 장기들의 크기, 모양의 측정을 통해 유전자 발현여부를 조사하기도 한다. 그러나 수산생물의 경우, 유전자의 발현을 시사하는 여러 보고들은 상기의 방법들 중 일부만 가지고 사용하여 외래유전자 발현 여부를 확인한 경우가 일반적이며 완전한 성체에서 유전자발현을 분석하거나 다음세대로의 지속적인 유전자의 발현을 보고한 연구결과는 단지 몇몇에 지나지 않는 실정이다. 또한 도입유전자의 과발현 등에 의해서 내재 유전자들이 차등발현을 통해 표현형적 변화가 유발될 수 있으나 아직 이들에 관한 연구는 매우 초기 단계에 머물고 있다.

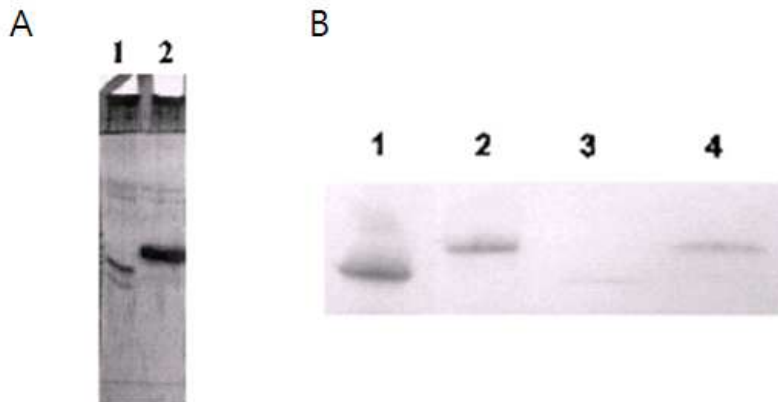


그림 4.

SDS-PAGE (A)와 Western blotting (B)

(출처: Choi et al., 2001).

### 3) 형질전환 계통 확립 기술

#### 가) 유전자 전달 및 후대 생산 기술

##### (1) Germ-line transmission 가계 분석

이상에서 기술한 유전자 이식방법으로 형질전환 어류가 다음세대로 전달되는 경우가 몇몇 연구결과들에서 보고되어 있다. 잉어와 무지개 송어에서는 재조합 형질이 F1까지 전달된 보고가 있으며, 비교적 한 세대의 길이가 짧은 zebrafish에서는 F2까지의 후대 전달 가능성이 보고되어 있다. 잉어를 대상으로 한 연구결과에서는 무지개송어의 성장호르몬 유전자가 이식된 잉어에서 모자이시즘을 수반하는 germ-line transmission이 관

찰된 바 있다. 또한 이들 연구진들은 교배에 의해 얻어진 F1 자손들에서 개체마다 이식된 유전자의 빈도가 다양하게 나타남으로써 유전자가 이식된 세포들이 생식세포에서도 어느 정도의 모자이시즘이 존재할 수 있음을 시사 하였다. 아울러 F0에서 F1으로 전달과정에서 이식된 유전자의 일부분 혹은 형태의 변화가 일어날 수 있음을 보고하였다. Penman 등(1991)은 무지개송어에서 생식세포 자체의 모자이시즘으로 인해 F1 개체 내에서 외래유전자의 빈도가 다양하게 관찰됨을 보고하였다. 그 외 일부 어종들에서 F1 및 F2까지 멘델 유전법칙을 일반적으로 따르는 형질전환 계통이 보고된 바 있으나 지속적인 형질전환 유전자가 F2 또는 그 후대에까지 안정적으로 전달 가능성에 관한 자료는 아직 부족한 실정이다. 따라서 안정적인 형질전환 계통을 확립하기 위해서는 모자이시즘을 배제하기 위한 선발육종계획이 반드시 수행되어야 하며 유전자가 이식된 F1 개체들만을 손쉽게 선별할 수 있는 유전자 마커의 개발이 중요시되고 있다. Nam 등(1999)의 연구결과는 미꾸라지에 외래유전자를 이식하여 F3까지 외래유전자가 전달되는 양상을 다양한 유전자이식 계통에서 보고하였고, 다양한 pattern의 유전자 전달 방식이 형질전환 계통별로 나타날 수 있음을 시사한 바 있다.

## (2) 후대 발현 및 기능 평가 분석

유전자이식 어류의 후대 발현 및 기능을 평가하기 위해 외래유전자의 발현은 Northern blot 분석에 의한 mRNA의 합성여부의 조사, 단백질 immunoblotting, radioimmunoassay 등이 사용되고 있으며, 세균유래 유전자를 사용할 경우, 발현된 효소를 정량화하거나, 조직학적 방법 등이 이용되고 있다. 또한 성장호르몬 유전자를 이식한 경우에는 이와 관련된 형질인 체중, 체장의 측정을 통해 유전자 발현여부를 조사하기도 한다. 그러나 지금까지 유전자의 발현을 시사하는 여러 보고들은 상기의 방법들 가운데 단지 1가지만을 사용하여 외래유전자 발현 여부를 확인한 것이 대부분이며, 완전한 성체에서 유전자발현을 분석하거나 다음세대로의 지속적인 유전자의 발현을 보고하는 연구결과는 거의 극히 소수에서 보고되었을 뿐이다. 거의 대부분이 이식한 형질전환 벡터가 어류 세포에서 작동할 수 있는지의 여부만을 확인하는 연구들이 주를 이루었으며, 이 또한 발생 초기 일시적으로 발현되는(transient expression) 점을 확인하는 수준에 머물러 있었다.

어류 세포내에서 유전자 발현의 기작은 아직까지 명확히 규명되지 않았지만 현재까지 보고된 연구결과들을 토대로 형질전환어류의 유전자 발현이 사용한 프로모터에 따라 각기 다르게 나타났으며, 어류를 기원으로 한 프로모터가 보다 높은 양상의 발현을 유도할 수 있음을 보여주었다. 또한 유전자발현

을 어느 정도 기대하기 위해서는 일정 copy수 이상의 외래유전자가 염색체상에 삽입되거나 또는 강력한 전사발현을 유도할 수 있는 높은 활성을 필요로 한다.

일반적으로 형질전환 어류계통에서는 성숙된 형질전환어류와 대조군과 교배시킨 후 PCR 방법을 이용하여 스크리닝 한 결과 다음 세대에 반 접합체 (hemizygous) 상태로 존재하는 형질전환 유전자좌위(transgenic locus)등이 재조합되거나 감수분열과정 중에 소실될 수 있음이 밝혀진바 있다. 그러나 분명한 사실은 이상의 연구결과를 종합해 보면 형질전환어류는 교배대상에 관계없이 이식된 유전자를 다양한 형태로 다음세대에 전달할 수 있음을 의미한다. 따라서 형질전환 계통과의 교배를 통해서 얻어진 다양한 가계들은 표현형질 및 유전형질이 다양하게 존재할 것이며 후대로의 전달양상 역시 각기 다르기 때문에 보다 안정적인 계통의 확립을 위해서는 가계별 유전형질을 파악하는 일이 우선시 되어야 할 것이다. F1 세대에서 이식된 형질전환 유전자가 염색체상에서 안정적으로 융합되었는지 또는 발현 정도가 어느 정도인지를 반드시 파악해야 한다. 또한 일련의 이러한 복잡한 과정을 통해 얻어질 F1 세대를 이용한 연속적 형질전환 계통을 확립하기 위해서는 F1세대에 대한 유용 유전형질(표현형 및 유전자형) 파악을 위한 육종 연구가 선행되어야 할 것이다. 아울러 그 이후 세대들에 대한 이식유전자

의 존재 유무 또는 발현양상을 지속적으로 모니터링 해야 할 것이다.

#### 나) 형질전환 계통의 유전육종 기술

새로운 형질과 기능을 획득한 형질전환 어패류를 실용화하거나 생물산업에 이용하기 위해서는 여러 가지 전제조건들이 충족되어야 한다. 첫째, 획득된 유전형질과 기능을 안정적이고 지속적으로 후대에 전달이 가능한 안정적인 계통 확립이 이루어져야 하고, 둘째, 다양한 형질전환 계통들을 대상으로 목적에 부합하는 가장 바람직한 형질이 발현되는 형질발현이 가능한 최적의 계통을 선발해야 한다. 셋째, 선발된 계통들은 육종학 기법을 통해 더욱더 극대화 시켜야 한다. 넷째, 이들로부터 매년 형질전환체들을 선별할 필요가 없도록 동형접합성 형질전환 순계가 확보되어야 한다. 이상의 문제점들을 해결하고 형질전환 어패류의 유용성을 극대화하기 위한 방법으로는 현재 염색체 조작 기술과 분자유종 기술이 도입되어 형질전환어패류 연구와 접목하려는 시도가 진행되고 있으며, 실제로 어류의 경우 염색체 조작기술이 접목된 분자유종기술을 이용하여 형질전환어류의 안정적인 계통을 생산하기 위한 연구가 시도되었다 (Kinoshita et al., 1996; Rahman et al., 1998; Nam et al., 2001a, 2001b; 2002).

## (1) Sister-brother mating에 의한 동형접합성 계통 확립

Sister-brother mating에 의한 형질전환 어류의 동형접합성 계통 확립에 대한 연구는 CAT유전자를 이식한 형질전환 medaka (Kinoshita et al., 1996) 및 미꾸라지(Nam et al., 2000)의 안정적인 동형접합성 계통을 개발한 보고가 있었으며, 성장호르몬 유전자를 이식한 틸라피아(Rahman et al., 1998)에서도 보고되었다. 특히, Nam 등(2000)은 형질전환된 미꾸라지를 sister-brother mating 기법을 이용하여 모두 동형접합성 개체들을 유도하였다. F2세대 슈퍼미꾸라지 full-sibling 암, 수로부터 잉어 뇌하수체와 HCG를 이용하여 인공 성성숙을 유도한 후, 확보된 배우자간 인공수정을 수행하여 얻은 수정란(F3)의 수정율, 부화율 및 초기 생존율을 분석하였다. 이들의 연구결과에서는 동형접합성으로 인한 생존율 감소는 관찰되지 않았으며 자손내 형질전환된 어류의 빈도를 조사한 결과 형질전환 F2세대의 수컷과 암컷을 대조군과의 교배시 54.3%와 51.9%로 각각 나타났으며, sister-brother mating은 평균 75%를 보임으로서 멘델 유전 방식을 잘 보여 주었다. Sister-brother mating 방법으로 개발된 동형접합성 개체(F3)들 모두가 다음세대(F4)로 100% 유전자 전달을 나타내지는 못하였다. 계통에 따라 100%의 유전자 전달이 확인된 개체들이 존재하는 한편, 혹은 90~98%의 유전자 전달 빈도를 보이는 것으로 보아 선발교배시 자손 검정을 통한

재조사가 필요한 것으로 나타났다.

## (2) 인공처녀생식에 의한 동형접합성 계통 확립

최근 염색체 공학을 이용하여 동형접합성 계통을 생산하려는 연구가 형질전환어류에서 보고되기 시작하였다. 안정적인 계통 확립과 우량형질의 동형접합성 확립을 위한 형질전환 어류의 분자 육종은 인공 처녀생식기술과 형질전환 기술과의 접목을 통해 이루어진다. 인공 처녀생식 방식을 이용하여 형질전환 유전자좌위뿐만 아니라 모든 유전자좌위를 동형접합화시키고, 모든 형질전환 자손들이 동일한 유전형질을 갖도록 하는 동형접합성 형질전환 복제집단 개발이 가능하다. 이 기술은 부모의 한쪽 성의 유전물질만으로 개체를 생산하는 처녀생식을 바탕으로 한다. 형질전환 배우자 중 한 쪽의 유전물질을 불활성화 시키고 남은 한쪽성의 유전물질을 복제하는 방식이다. 난(egg)의 유전물질만으로 개체를 생산하는 형질전환 자성발생성 이배체(transgenic gynogenetic diploid), 또는 정자(sperm)의 유전물질만으로 개체를 유도하는 형질전환 음성발생성 이배체(transgenic androgenetic diploidy) 생산이 가능하다.

Nam 등(2000)은 염색체 공학 기법 중 인공처녀생식(induced parthenogenesis)기법을 슈퍼미꾸라지 형질전환 기술에 접목함으로써 생산된 isogenic 형질전환 동형접합체 계통을



최초로 보고하였다. 이들은 발현유전자로 CAT유전자가 삽입되어 있는 형질전환 미꾸라지 계통을 대상으로 자성발생성 이배체 유도기술(induced gynogenesis), 웅성발생성 이배체 유도 기술(induced androgenesis)과 같은 인공처녀생식을 통한 isogenic line을 성공시켰으며, 이 과정에서 얻어진 최적 유도조건 기술들은 추후 다양한 형질전환 계통의 isogenic 동형접합체 계통을 생산하는데 중요한 자료로 이용될 수 있다. 특히 형질전환체로부터 인공처녀 생식을 이용 동형접합체를 육성하는 기술은 이론적으로 전통 교배를 이용 동형접합체를 확립하는 방법보다 동형접합 형질전환체의 선발 등에 요구되는 시간을 절약할 수 있을 뿐만 아니라 형질전환 유전좌위와 함께 모든 유전좌위를 동시에 동형접합화 할 수 있다는 특징이 있다.

이상에서 얻어진 기술들을 바탕으로 웅성발생성 처녀 생식을 통해 동형접합성 isogenic 슈퍼미꾸라지를 유도하여 100% germ line transmission을 통한 자가종 유전자이식 (autotransgenic) 고속성장 집단 생산의 가능성을 최초로 보고하였다(Nam et al., 2002). (그림 5).

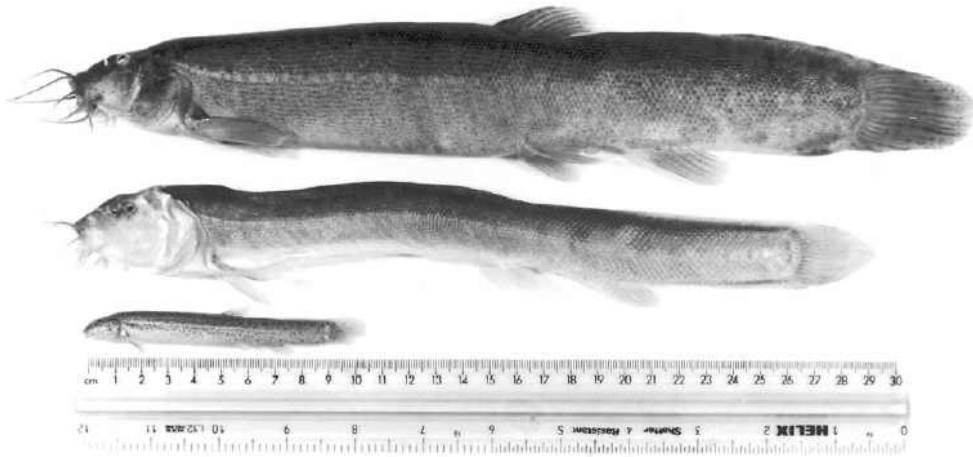


그림 5.

F5세대 형질전환 미꾸라지 형태비교

(상; 이형접합성 미꾸라지, 중; 처녀생식기법을 이용한  
동형접합성 미꾸라지, 하; 일반 미꾸라지)

(출처: Nam et al., 2002).

### (3) 동형접합성 형질전환 복제 계통 생산

동형접합성 형질전환 복제 계통은 Nam 등(2002)에 의해서 앞서 설명한 처녀생식방식을 2회 순차적으로 실행함으로써 최초로 유도되었다. 처녀생식을 통해 동형접합체를 유도하는 데에는 오직 단 1세대의 기간만 요구되는데 반해 일반적인 교배법을 이용할 시에는 최소 10대 이상의 장기간의 노력이 필요하므로 처녀생식을 통한 동형접합체 유도방법은 매우 효율적

인 방법이라 하겠다. 이러한 기술은 형질전환 어류의 우수 형질을 다음세대에 바로 고정하고 이를 통해 우량 형질이 대량 축적된 친어와 종묘확보가 가능하다. 아울러 우량형질이 대량 복제된 계통이 단시간에 생산될 경우 형질전환체의 생물산업 이용 측면에도 큰 잠재력을 갖고 있을 것으로 사료된다(Nam et al., 2002).

#### (4) 배수체 및 잡종 형질전환 집단 육종

어류 배수체 공학은 반수체(haploid) 또는 이배체(diploid)를 개체에 증가시키거나 제거함으로써 새로운 유전형질을 획득시키는 기술을 뜻하며 필요에 의해 인위적인 배수체(polyploidy)를 유도하거나 동형접합성 순계 또는 복제 계통을 확립하는데 주 목적을 갖는다(Arai, 2001). 배수체 기술의 주 핵심 목표중 하나는 어패류로 하여금 염색체 감수분열 억제를 통해 정상적인 생식기능을 갖지 못하게 하는 불임화 효과를 획득시키는 것이다(Kim et al., 2001). 이러한 과정을 통해 얻어진 불임화 특성은 고성장 어류의 환경학적 안전성을 확보하기 위해 사용되는 매우 중요한 전략으로 여겨지고 있다(Razak et al., 1999; Nam et al., 2001a, 2001b). 뿐만 아니라 개체로 하여금 불임성을 획득시킴으로써 성성숙으로 인해 나타나는 원하지 않는 생체 현상(사료전환효율 감소, 성장둔화, 체색 및 상품성 저하,

사망)을 억제시킬 수 있으며 이를 바탕으로 성숙기 동안 원할한 양식생산과 관리 그리고 고품질의 생산물을 유도할 수 있다 (Kim et al., 2001). 불임 어패류는 제2감수분열 억제를 통한 3배체가 생산된 이래 많은 어패류 종에서 유도되어 그 생산성 개선효과가 보고된 바 있으며 현재까지 온도 자극에 의해 세포분열을 억제시키는 기술이 가장 널리 이용되고 있다. 그 외에도 수압 처리, 화학적 처리 및 전기자극등 역시 이용되고 있다. Nam 등(2001)은 불임 고속성장 미꾸라지 3배체 계통을 최초로 어류에서 생산하였음을 보고하였으며(그림 6), 3배체 유도에 따른 유전자 발현양상, 성장 가속정도 체내 장기의 형태등을 분석하였다.

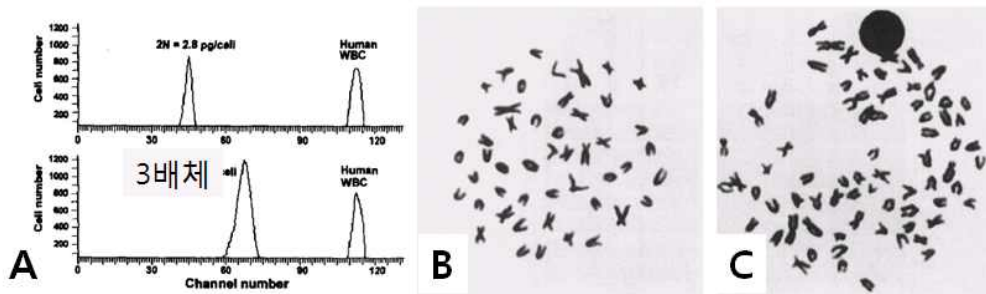


그림 6.

### 3배체 유도확인 분석

(A, flow cytometry 수행결과; B, 이배체 염색체; C, 3배체 염색체) (출처: Nam et al., 2001b).

3배체의 성장호르몬 발현량을 조사한 결과 일반 고속 성장 어류와 비슷하게 나타났으며, 3배체 형질전환 어류는 사료 전환효율역시 기존의 고속성장 어류와 비슷하게 나타났는데 이는 정상어류보다 1.8~2배정도 높은 수치이다. 특히 주목할 점은 체내 장기중 생식소의 발달이 이배체에 비해 현저히 억제됨으로써 고속성장 어류의 생물학적 격리에 유용한 하나의 방안이 될 수 있을 것으로 판단된다 (그림 7).

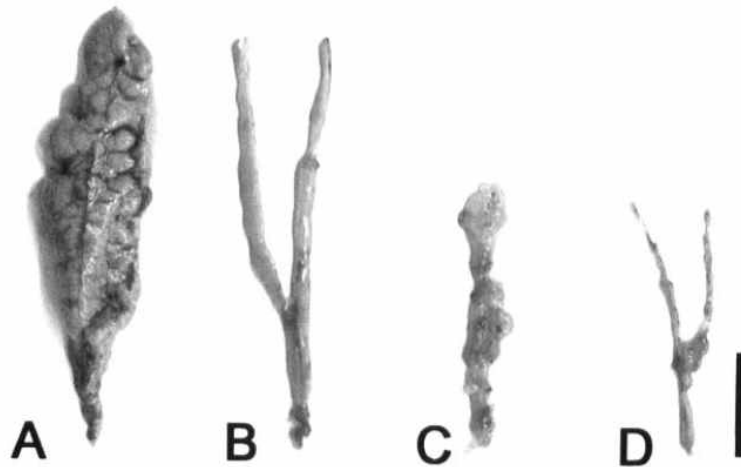


그림 7.

고속성장형질전환 미꾸라지의 생식소형태

(A, 이배체 암컷; B, 이배체 수컷; C, 3배체 암컷; D, 3배체 수컷)

(출처: Nam et al., 2001b).

이상의 결과들은 3배체 어류의 불임 특성상 생태계 안정성을 보장 할 수 있을 뿐만 아니라 고속성장형질의 유지가 가능하고 상품성역시 일반 미꾸라지와 외부 또는 내부적인 형태학적 차이가 적기 때문에 충분할 것으로 사료된다. 그러나 유용성이 입증된 3배체를 현장에 적용하기 위해서는 매번 물리적 또는 화학적 처리를 수행해야 하는 번거로움과 100% 3배체 유도를 보장할 수 없다는 단점을 극복해야 한다. 이에 4배체 (Tetraploid) 기술이 무지개 송어 및 미꾸라지에서 처음 소개되어 4배체로부터 얻은 2배체 배우자를 이용하여 일반 교배법 만으로도 3배체를 대량 생산할 수 있음이 증명되었다(Chourrout et al., 1986; Nam et al., 2002) (그림 8). 그러나 생존력과 생식 능력을 갖춘 4배체를 유도하기에는 아직 해결해야할 많은 기술적 어려움이 있고 이에 현재까지 4배체 유도 기술이 효과적으로 확립된 어종은 수종에 불과한 실정이다. 또한 Nam 등(2004)은 고속성장 미꾸라지의 특성을 유지하면서 3배체가 갖고 있는 단점(3배체 수컷의 일부 제한적인 정자 생산)을 극복할 수 있는 방안으로 미꾸라지의 근연종인 미꾸리(*Misgurnus anguillicaudatus*)간의 중간 잡종 및 잡종 3배체 형질전환 미꾸라지 계통을 개발하여 이들에 대한 다각적인 기능 평가가 시도되었다. 이 들 모두 동형접합체 수컷으로부터 100% 형질전환 전달이 일어났다.

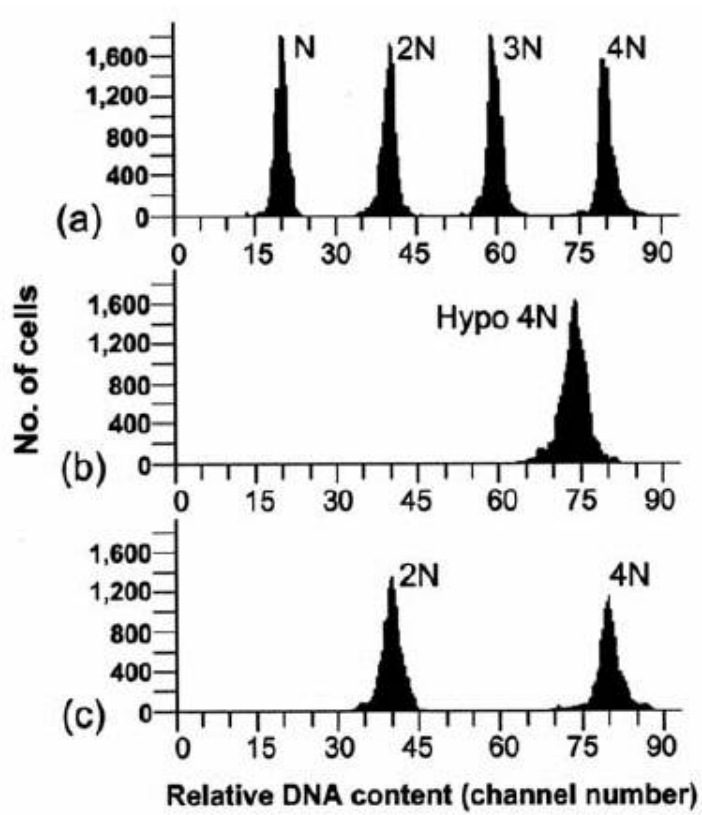


그림 8.

유도된 4배체 미꾸라지의 DNA 함량분석

(출처: Nam et al., 2001a)

## 2. 신기능성 형질전환 수산 동물 연구개발 사례 분석

### 1) 형질전환 어패류 연구개발 사례 분석

#### 가) 고속성장 어류 개발 사례

##### (1) 유전자 및 발현 백터

1971년 Vielkind 등에 의해 어류의 세포내에 외래 DNA의 이식 가능성이 처음으로 보고된 후 1984년 영국의 한 연구진에 의해 무지개송어(Rainbow trout, *Oncorhynchus Mykiss*) 생식계통으로의 외래유전자 이식이 성공적으로 이루어졌다(Maclean & Talwar., 1984). 1985년에는 중국의 한 연구진에 의해 금붕어(Goldfish, *Carassius Auratus*)를 대상으로 한 외래유전자 이식이 정식학술논문으로 게재되면서 어류 유전자변형 연구가 본격적으로 태동하게 되었다(Zhu et al., 1985). 이후 현재 까지 35종이 넘는 어류들을 대상으로 유전자변형이 시도되었다. 지금까지 어류를 대상으로 실시한 유전자변형 연구는 주로 척추동물의 발생 및 유전자 발현기작 연구와 아울러 양식 산업의 생산성 향상을 위해 주로 시도되었다. 특히, 고속성장이 가능한 유전자변형 어류의 경우 앞에서 언급했듯이 단위시간당 상품화 되기까지의 성장률을 높일 수 있기 때문에 이는 결국 생산성 향상에 도움을 줄 수 있을 것이며, 사료효율의 향상으로 인한 경제적 이점 또한 피할 수 있는 장점을 가지고 있다. 이러한 목적으로 많은 연구자들이 다양한 어류에서 고속성장이 가능한



유전자변형어류 계통을 개발하려는 연구들이 수행되었다(그림 9).

이와 같이 성장형질 개선을 위한 유전자변형 어류의 개발은 그동안 다양한 유전자변형 방법을 통해 시도되었고, 이러한 방법들은 기술적, 학문적발전이 어느 정도 진전 된 후에야 가능하게 되었다. 공여자유래 발현조절부위 즉 프로모터와 성장호르몬 유전자를 융합하여 제작한 발현 벡터와 숙주종과의 유연관계에 따라 유전자변형 방법은 크게 6종류의 방식으로 구분할 수 있다(표 1).

#### 바이러스유래 프로모터와 포유류유래 성장호르몬을 이용한 유전자변형방식(그룹-1)

성장형질 개선을 위한 초창기 형질전환어류를 생산하는 방법으로는 앞에서 언급하였듯이 유전자 소재확보의 어려움과 어류 유전자 기능에 대한 정보 부족으로 인해 어류와 유연관계가 먼 RSV, CMV와 같은 바이러스 기원의 프로모터와 인간이나 소의 성장호르몬 유전자가 재조합된 유전자를 주로 이용한 형질전환방식이 주를 이루었다. 특히, 잉어와 차넬메기의 경우 이들 유전자변형어류 계통에서는 안정적인 외래유전자 삽입과 전달이 관찰되었음에도 불구하고 유전자변형어류에서의 성장 가속 현상은 거의 없는 것으로 나타났거나, 간혹 성장 가

속 현상이 보이는 개체에서는 최대 성장 가속도가 일반어에 비해 2배를 넘지 못하는 것으로 나타났다.

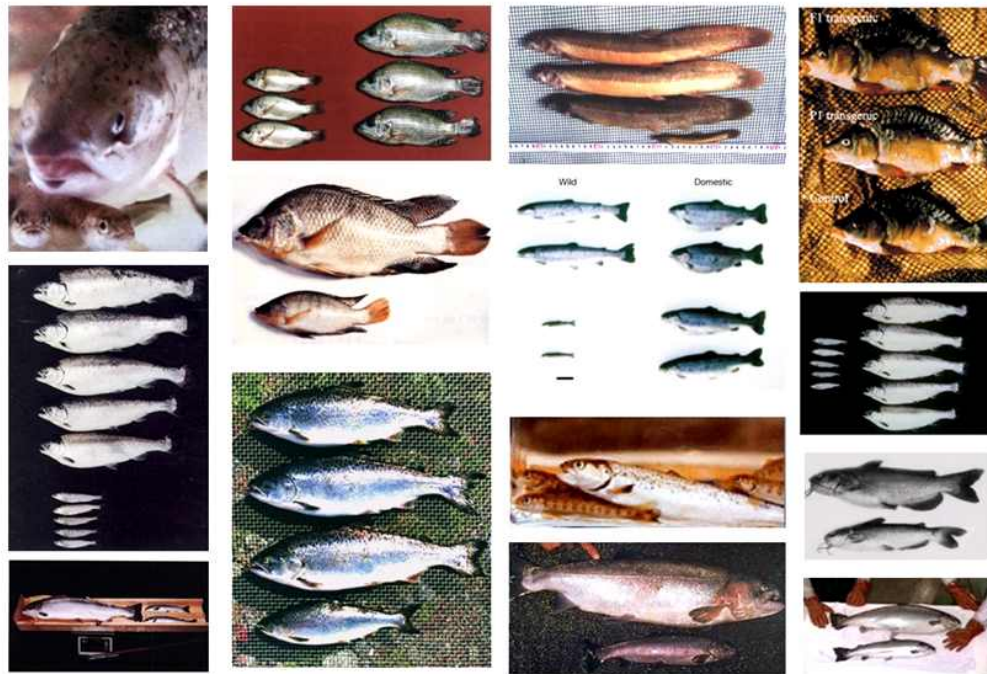


그림 9.

고속성장 어류 개발사례

표 1. 변형된 유전자의 공여자와 숙주와의 유연관계에 따른 성장가속 효과(출처: Nam et al., 2008)

그룹	숙주종	프로모터		GH유전자 공여자	성장 가속도
		유전자	공여자		
그룹-1	Common carp ( <i>Cyprinus carpio</i> )	MT	Mouse ( <i>Mus musculus</i> )	Human	1.5배
	Hybrid tilapia ( <i>Oreochromis honorum</i> )	IEP	Cytomegalovirus (CMV)	Tilapia	1.8배
	Northern pike ( <i>Esox lucius</i> )	LTR	Rous sarcoma virus (RSV)	Bovine	1.3배
	Channel catfish ( <i>Ictalurus punctatus</i> )	LTR	RSV	Rainbow trout	1.3배
그룹-2	Cyprinid loach ( <i>Misgurnus anguillicaudatus</i> )	AFP	Ocean pout ( <i>Macrozoarces americanus; Perciformes</i> )	Chinook salmon	2배
	Nile tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	AFP	Ocean pout	Chinook salmon	3배
	Ayu ( <i>Plecoglossus altivelis</i> )	b-act	Common carp	Rainbow trout	2배
	Indian catfish ( <i>Heteropneustes fossilis</i> )	ZP	Winter flounder ( <i>Pseudopleuronectes americanus; Pleuuronectiformes</i> )	Yellow progy ( <i>Acanthopagrus latus; Perciformes</i> )	1.6배

표 1. 변형된 유전자의 공여자와 숙주와의 유연관계에 따른 성장가속 효과-계속

그룹	숙주종	프로모터		GH 유전자 공여자	성장 가속도
		유전자	공여자		
그룹-2	Silver sea bream ( <i>Rhabdosargus sarba</i> )	b-act	Common carp	Rainbow trout	2배
그룹-3	Atrantic salmon ( <i>Salmo salar</i> )	AFP	Ocean pout	Chinook salmon	5배
	Coho salmon ( <i>Oncorhynchus kistuch</i> )	AFP	Ocean pout	Chinook salmon	10배
	Rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	AFP	Ocean pout	Chinook salmon	3배
	Cutthroat trout ( <i>Oncorhynchus clarki</i> )	AFP	Ocean pout	Chinook salmon	6배
그룹-4	Coho salmon	MT	Sockeye salmon ( <i>Oncorhynchus nerka</i> )	Sockeye salmon	11배
	Arctic charr ( <i>Salvelinus alpinus</i> )	MT	Sockeye salmon	Sockeye salmon	14배
그룹-5	Common carp	b-act	Common carp	Grass carp	3배

표 1. 변형된 유전자의 공여자와 숙주와의 유연관계에 따른 성장가속 효과-계속

그룹	숙주종	프로모터		GH 유전자 공여자	성장 가속도
		유전자	공여자		
그룹-5	Rohu ( <i>Labeo rohita</i> )	b-act	Grass carp ( <i>Ctenopharyngodon idella</i> ; <i>Cypriniformes</i> )	Rohu	5배
	Chinook salmon ( <i>Oncorhynchus tshawytscha</i> )	AFP	Ocean pout	Chinook salmon GH cDNA	6배
그룹-6	Mud loach ( <i>Misgurnus nizolepis</i> )	b-act	Mud loach	Mud loach GH	35배
	Mud loach	C-lect	Mud loach	Mud loach GH	7배
	Common carp	b-act	Common carp	Common carp GH	10배
	Nile tilapia	b-act	Nile tilapia	Nile tilapia GH	5배

MT, Metallothionein; IEP, Immediate Early Promoter; LTR, Long-terminal Repeat; AFP, Antifreeze Protein; b-act, beta-actin; ZP, Zona pellucida Protein; C-lect, C-type lectin

## 타가종유래 프로모터와 성장호르몬을 이용한 유전자변형방식 (그룹-2)

그 후 유전자변형어류를 개발하기 위해 타가종 어류로부터 유래한 프로모터와 성장호르몬 유전자를 이용한 유전자변형어류를 개발하는 방식이 시도되었다. 즉, 연어과 성장호르몬 유전자를 잉어과 어류에 이식하는 등의 유전자변형방식으로 이러한 방식이 다양한 어류에서 시도된 바 있다. 이들 유전자변형 방식의 경우 비록 타가종유래 재조합 유전자를 사용하였지만 앞서 설명한 바이러스유래 프로모터와 포유류유래 성장호르몬을 사용한 방법보다 월등히 높은 성장가속 현상이 유도되는 것으로 보고되고 있으며, 특히 ocean pout에서 얻어진 항동결단백질유전자(AFP) 프로모터와 왕연어의 성장호르몬 유전자를 융합하여 제작한 벡터 (opAFPcsGHc)가 이식된 유전자변형 틸라피아의 경우 실험실수준의 일정규모의 수조탱크에서만 아니라 실외에서 성장시켰을 때 대조구(Non-transgenic)보다 성장가속현상이 유의적으로 나타났다(Rahman et al., 1998). 또한 유전자변형틸라피아에 대한 표현형질을 조사하기 위해 선발한 계통들의 경우 2~4배 이상의 성장가속 현상이 관찰되었고, 사료효율역시 20%이상 개선되었다고 보고하였다(Rahman et al., 2001). 또한 미꾸리과(Cobitidae)에 속하는 미꾸리(Cyprinid Loach, *Misgurnus Anguillicaudatus*)의 정자내에 전기천공법으로

이상에서 언급한 동일한 벡터를 주입시켰을 때 2배의 성장가속 형질을 획득한 연구결과가 보고되기도 하였다(Tsai, 2000). 비록 opAFP 프로모터 및 잉어(common carp) 유래 베타액틴프로모터( $\beta$ -actin)와 무지개송어 성장호르몬유전자로 구성된 벡터 (opAFPcsGHc, ca $\beta$ A-rtGHc)를 사용한 결과 역시 비슷한 연구결과가 은어(*Ayu, Plecoglossus altivelis*) 및 silver sea bream (*Rhabdosargus sarba*)에서도 확인되었다(Cheng et al., 2002). yellow porgy (*Acanthopagrus latus*) 유래 성장호르몬 유전자 또는 무지개송어유래 성장호르몬 유전자와 winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*)의 zona pellucida프로모터와 융합한 벡터 (zp $\beta$ -ypGHc, zp $\beta$ -rtGHc)가 이식된 Indian catfish (*Heteropneustes fossilis*)역시 일반 대조구와 비교했을 때 1.6배에서 1.8배의 성장속도차이를 보였다(Sheela et al., 1999).

### 타가종유래 프로모터와 근연종 성장호르몬을 이용한 유전자 변형방식(그룹-3)

또한 프로모터는 유연관계가 먼 종에서 유래하였지만 성장호르몬 유전자는 근연종으로부터 이용하는 방식이 개발되어 주로 연어과어류의 성장형질을 개선시키는데 사용되었다. 대서양연어에 ocean pout AFP 프로모터와 근연종인 왕연어유래 성장호르몬 유전자를 분리하여 제작한 재조합 유전자를 이용한

백터를 이용하여 2~6배에 달하는 성장속도를 보인 연구결과가 발표되었다. 은연어의 경우 동일한 방법으로 형질전환체를 만들었으며, 이들은 3~10배정도 빠른 고속성장속도를 기록하였으며, 왕연어는 6배, 무지개송어의 경우 3배의 성장속도를 보였다.

#### 근연종유래 프로모터와 성장호르몬을 이용한 유전자변형방식 (그룹-4)

앞서 설명한 세 종류의 방식에 이어서 프로모터 및 성장호르몬 유전자 모두 유연관계가 가까운 근연종에서 이용하는 방식으로 연어종의 성장호르몬 및 프로모터들을 이용하여 변형된 유전자를 다시 다른 연어과 어종에 이식하는 사례들이 소개되었다. 홍연어의 성장호르몬 유전자 (GH type-I)와 역시 홍연어 증금속 해독 유전자(MT-B) 프로모터를 포함하는 “all-sockeye salmon” 백터 (OnMTGH1)를 근연종인 은연어에 이식한 결과 일반 은연어에 비해 평균 11배 이상의 성장가속 현상이 관찰되었고, 가장 성장이 빠른 형질전환체에서는 무려 30배 이상의 고속성장 형질을 확인할 수 있었다(Devlin et al., 1994). 무지개송어 등 일부 연어과 어종을 대상으로 동일한 백터를 사용하여 유전자변형결과 매우 유의적인 성장가속 현상이 관찰되었고, 10~30배에 달하는 빠른 성장과 일부 개체들에서는 그 이상의 성장가속 현상도 보고된 바 있다. 특이한 점은 그동



안 유의적인 성장차를 보인 유전자변형 어류들은 주로 cDNA 유래 성장호르몬을 사용하였지만 이상의 연구들은 인트론이 포함된 genome 수준의 성장호르몬(GH type-I)을 사용한 것으로서 획기적인 성장가속효과를 얻을 수 있었다. 물론 정확한 과학적 근거는 제시되지 않았지만 적어도 하나 혹은 그 이상의 인트론 부위가 포함된 재조합 유전자를 이식한 어류의 성장률이 비교적 높게 나타났으며, 이러한 결과로 유추해 볼 때, 어류의 성장속도와 인트론은 비교적 높은 상관관계가 있을 것으로 추측된다. 홍연어 유래 성장호르몬 유전자와 histone-3 유래 프로모터로 재조합된 유전자를 이식한 유전자변형 arctic charr (*Salvelinus alpinus*)에서도 대조구와 비교했을 때 14배 정도의 고속성장을 보였다(Pitkanen et al., 1999). 이상의 연구결과를 통해서 숙주와 보다 가까운 근연종들의 유전물질을 이용함으로써 상동을 보다 높은 유전자변형 벡터(Very homologous construct)의 유용성을 입증하게 되었다.

#### 동일종 프로모터와 타종성장호르몬/동일종성장호르몬과 타종 프로모터를 이용한 유전자변형방식(그룹-5)

고속성장이 가능한 유전자변형어류를 개발하기 위한 또 다른 방법으로서 조절부위 또는 성장호르몬 유전자 중 한 가지 유전물질을 동일종에서 이용하는 방식이다. 이러한 방식은

주로 잉어과 어류에서 적용한 사례들을 찾아볼 수 있다. 중국의 한 연구그룹은 잉어(Common carp)에서 획득한 베타액틴프로모터와 근연종인 초어(Grass carp, *Ctenopharyngodon idella*)의 성장호르몬을 융합한 벡터(ca $\beta$ A-gcGH)인 “all-cyprinid”를 제작하여 잉어에 이식한 결과 대조구보다 2배정도 빠른 성장형질을 확인하였음을 보고하였다. ca $\beta$ A-gcGH를 이식한 잉어는 동그룹에서 개발한 포유류 유래 재조합 유전자(mMT-hGH)를 이식한 잉어보다 성장이 월등히 빠른 것으로 보고하였다(Wang et al., 2001). 또한 인도의 한 연구그룹에서는 indian major carp rohu (*Labeo rohita*)에 초어의 베타액틴프로모터 또는 바이러스유래 프로모터인 hCMV와 Indian major carp rohu의 cDNA 성장호르몬 융합 벡터 (gc $\beta$ A-roGHc/hCMVroGHc)를 제작하여 이식시킨 사례가 보고되었으며, 이들의 성장속도는 대조구보다 약 4배에서 6배정도 빠르게 나타났다고 보고하였다(Venugopal et al., 2002, 2004; Pandian & Venugopal, 2005). 틸라피아 유래 성장호르몬 유전자와 CMV프로모터로 제작한 재조합 유전자를 이용하여 틸라피아를 대상으로 실시한 형질전환 연구역시 대조구보다 빠른 약 1.7배정도의 성장속도를 보였다(Martinez et al., 1996, 1999).

## 동일종 프로모터와 성장호르몬을 이용한 유전자변형방식 (그룹-6)

1999년 어류의 성장호르몬 유전자 이식에 있어 최초로 동일종 자체의 유전물질만을 이용하여 숙주와 변형된 유전자와의 상동성을 극대화시킨 자가종 형질전환이 보고되었는데, 당시 연구진은 미꾸라지 베타액틴 프로모터와 미꾸라지 성장호르몬 유전자를 이용하여 유전자변형 벡터(ml $\beta$ actGH)를 구축하였으며, 이를 미세현미주입을 통해 미꾸라지의 수정란에 이식하여 성공적인 고속성장이 가능한 형질전환어류를 개발함으로써 자가종 형질전환을 통한 고속성장 유전자변형 어류를 태동시켰다(Nam et al., 1999, 2001a, 2001b, 2001c). 자가종 형질전환 미꾸라지의 대표적인 특징들을 보면 F<sub>1</sub> 세대에 어체중이 9개월째 일반 대조군 보다 30배 이상의 빠른 성장가속을 보였고, 최대 400g 이상의 어체중 및 40cm 전장으로 자연계에서는 거의 관찰되지 않는 어체 크기의 거대화가 관찰되었다(그림 10). 또한 자가종 형질전환 계통의 미꾸라지의 경우 여타 형질전환방법을 통한 어류와 같이 대조군에 비해 높은 사료전환 효율을 보였다. 근육 성분의 경우는 대조군보다 단백질 성분비율이 증가되었으며, 대사효율 역시 증가함을 보였다. 이러한 연구결과는 일반적으로 대조군이 상품크기까지 성장하는 데에는 적어도 6개월의 시간이 필요한데 비해 자가종 형질전환 미꾸라지의 경우 한 달



그림 10.

자가종 형질전환 미꾸라지와 일반 대조구와의 형태비교

(출처: Nam et al., 2001a)

이면 충분한 것으로 나타났다. 앞서 설명하였듯이 이들 자가종 형질전환을 통한 유전자변형 미꾸라지의 선발계통은 이미 불임 유도를 위한 배수체화, 인공 잡종화 및 처녀생식을 통한 동형접합화 등의 다양한 유전육종 기술들이 접목되어 개발된 유전자 변형어류들이 보다 우수한 계통으로 육종될 가능성이 보고되었다. 미꾸라지의 성공을 기점으로 잉어 및 나일 틸라피아등에서 자가종 형질전환 기술을 이용한 고속성장 유전자변형어류 계통을 개발하는 연구들이 진행되어 왔으며 실제로 잉어의 경우 대조군보다 10배가 빠른 고속성장 현상이 관찰되었다. 나일틸라피아의 경우 타가종 형질전환방식보다 월등한 고속성장 형질이 획득되었으며, 일반 대조구보다 5배의 성장가속 현상을 나타내는 것으로 알려져 있다. 그러나 이러한 자가종 형질전환방법이

모든 어류에서 나타나지는 않았다. 은연어의 경우를 대상으로 자가종 형질전환방법을 실시한 결과 치어시기에는 대조구와 비교했을 때 고속성장 현상을 보이다가 성장 후에는 일반 대조구와 비슷한 성장차를 보이는 것으로 나타났다. 자가종 형질전환 어류에 대한 연구는 아직 미비한 단계에 머물러 있기 때문에 종마다 서로 다른 효과를 보이는 지에 대한 원인은 아직까지 제시되지 못하고 있는 실정이다. 따라서 이에 대한 심도 있는 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다. 그러나 분명한 것은 지금까지의 연구결과로 미루어볼 때 유전자변형어류의 성장속도가 종마다 차이를 보이는 이유가 성장형질이 종마다 서로 다르고 숙주의 항상성 조절 또는 피드백 조절 등에 의한 성장호르몬 유전자의 발현능력이 종마다 서로 다르기 때문일 것으로 판단된다.

이상에서 설명한 유전자변형방식에 따른 성장가속 효과에 대한 사례로 유추해 볼 때 비록 종에 따라 종 특이적인 차이가 있지만, 성장형질 개선용 유전자변형 어류를 생산하기 위해서는 최대한 근연종 혹은 근연종 유래의 유전자변형 유전자(발현조절부위 및 성장호르몬 유전자)를 이용하는 것이 그렇지 않은 방식보다 우수한 결과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

## (2) 주요 대표 종 사례

본 절에서는 대서양 연어, 잉어, 틸라피아, 미꾸라지와 이외의 기타 어류를 대상으로 이상에서 설명한 유전자변형방법을 통해 생산된 고속성장 형질전환 어류 계통에 대한 연구개발 현황에 대해서 언급하고자 한다.

### 대서양 연어

국제연합 식량농업기구(Food and Agriculture Organization of the United Nations; FAO)의 통계자료에 의하면 대서양 연어는 전 세계 생산고가 2004년을 기점으로 100만 톤을 훨씬 넘어서고 있으며, 양식 생산금액은 약 35억 달러에 해당하는 고급 어종이다. 이러한 이유로 이 종에 대해 연구자들은 염색체 공학(chromosome engineering), 잡종화(hybridization) 전략, 유용 유전인자의 축적을 피하는 선발육종(selective breeding), 유전학적 성전환(genetic sex reversal), 유전자 이식(gene transfer)기법과 같은 다양한 생명공학 기법을 통한 생산성 향상을 위해 오래전부터 연구해 왔다. 1980년대 후반부터 시작된 형질전환연구는 주로 성장에 관련된 유전자를 이식하여 단위시간당 어류의 성장을 촉진시키기 위한 연구가 전 세계 많은 연구진들에 의해 현재까지 이루어지고 있다. 1990년대 중반부터 대서양 연어에 관한 유전자변형은 틸라피아에서

도 그 효과가 입증된 항동결 단백질 유전자 (AFP) 프로모터와 근연종인 왕연어에서 획득한 성장호르몬 cDNA (GH cDNA) 융합 유전자(opAFPGHc)를 이용하여 고속성장 연어 개발이 주를 이루어 왔다. 2006년에는 미국과 캐나다 합작 회사인 AquaBounty Technology™에서 고속성장 유전자변형 연어의 양식 산업화를 추진하기 위해 미국 FDA에 승인심사를 요청한 상태이다. 형질전환된 고속성장 대서양 연어 계통의 특징은 초기 성장이 일반 대조군에 비해 2~3배 빠르며, 10%의 개선된 사료 전환 효율을 보인다. 이들 유전자변형 어류는 시간당 높은 산소 소비율을 보였지만, 빠른 성장률로 동일 크기에 도달하는데 소비하는 산소의 총 절대소비량은 대조군에 비해 유의적으로 적은 것이 특징이다. 또한 유전자변형 연어는 일반 연어에 비해 2배 이상 많은 사료를 섭취하는 것으로 확인되었다. 이는 장내소화를 담당하는 장기역시 일반 대조군보다 크기 때문에 표면적 증가로 인한 것으로 확인되었다. 고속성장을 하는 형질전환 연어의 경우 어체중에 차지하는 수분의 함량이 일반대조군에 비해 약 10%정도 많은 것으로 나타났다. 일반적으로 형질전환어류의 경우 체조성이 고단백 및 저지방 양상을 보이지만 연어의 경우에는 그와는 반대로 단백질함량이 적게 나타나는 것이 특징이다(Cook et al., 2000). 형질전환연어의 경우 나타나는 대표적인 특징 중의 하나로서 삼투압 조절능력(해수적응력)이 향상

되었다.

## 잉어

잉어는 전 세계 많은 지역에서 양식되고 있으며 세계 양식생산량기준으로 매우 중요한 어종 중에 하나이다. 중국에서는 가장 많이 소비되는 어종으로서 오래전부터 양식을 통해 수요를 해결하기 위한 노력을 해 왔다. 잉어에 대한 유전자변형 어류개발은 중국이 가장 주도적인 역할을 해왔다. 특히 중국의 한 연구그룹은 2001년에 유전자변형 잉어계통 중 초어의 성장 호르몬 유전자(gcGH)를 잉어 베타액틴 프로모터와 융합시킨 “all-cyprinid” 형태의 발현벡터 (ca $\beta$ A-gcGH)를 잉어의 수정란에 미세현미주입방법을 이용하여 성공적인 형질 전환 계통을 확립시켰다(Wang et al., 2001). 이들은 형질전환잉어계통은 대조구에 비해 2배 이상의 고속성장 형질을 보유하고 있으며 형질전환 유전자의 안정적인 후대전달 계통을 관찰하였음을 보고하였다(Wu et al., 2003; Fu et al., 2005). 이상의 방식으로 개발된 형질전환계통은 현장실험을 통해 성장률, 생식소지수, 사료효율을 대조구와 비교해본 결과 대조구보다 42%높은 성장률을 보였으며, 일반 대조군 잉어가 상품크기까지 도달하는데 6-10개월 이상의 사육기간이 필요한데 반해 대부분의 유전자변형개체들은 5개월 이내로 나타났다. 사료효율(총사료공급량/어체증가량)



역시 유전자변형 잉어의 계통은 1.10이고 대조구의 경우는 1.35로 나타났다. 이는 형질전환방법을 통해 사료전환효율을 20% 이상 개선할 수 있는 효과를 볼 수 있다. 특징적으로 고속성장어류에서는 생식소 속도 지수(Gonadosomatic index; GSI)가 일반 대조군보다 낮고, 성성숙이 대조구에 비해 늦게 일어났으며, 어린개체에서의 성성숙이 전혀 일어나지 않았다.

국내연구진(부경대학교)에서는 성장호르몬 유전자 이식에 있어 동일종 자체의 유전물질만을 이용하여 개발한 자가종 형질전환방법을 사용하여 고속성장 이스라엘 잉어의 형질전환 계통을 확립하게 되었다(그림 11).

자가종 형질전환에 의해 개발된 유전자변형 잉어는 잉어의 베타액틴( $\beta$ -actin)과 잉어 성장호르몬 유전자를 융합하여 제작한 발현 벡터를 이용하였으며, 미세현미주입방법을 통해 수행되었다. 개발된 유전자변형 잉어 계통은 일반 대조군 잉어에 비해 최대 10배의 초기 성장을 보였고 고속성장 계통들의 경우 9개월 간의 성장률 역시 10배 이상의 고속형질이 관찰되었다. 특히, 많은 유전자변형 잉어 개체들이 부화 후 9개월 이내에 5kg 이상의 어체중에 도달하는 것으로 나타났다. 이는 상품크기 도달 시기까지 걸리는 시간을 획기적으로 단축시킬 수 있고 당년사육이 가능해 월동에 필요한 연료, 도구 및 시설이 필요가 없기 때문에 경제성 또한 매우 높을 것으로 사료된다. 또한 유

전자변형 잉어의 경우 일반 잉어와 비교해 봤을 때 체고가 높고 가식부위가 증가하는 뚜렷한 경향을 나타냄으로써 잉어 양식에 있어서 그 유용성은 더욱 높으리라 판단된다.

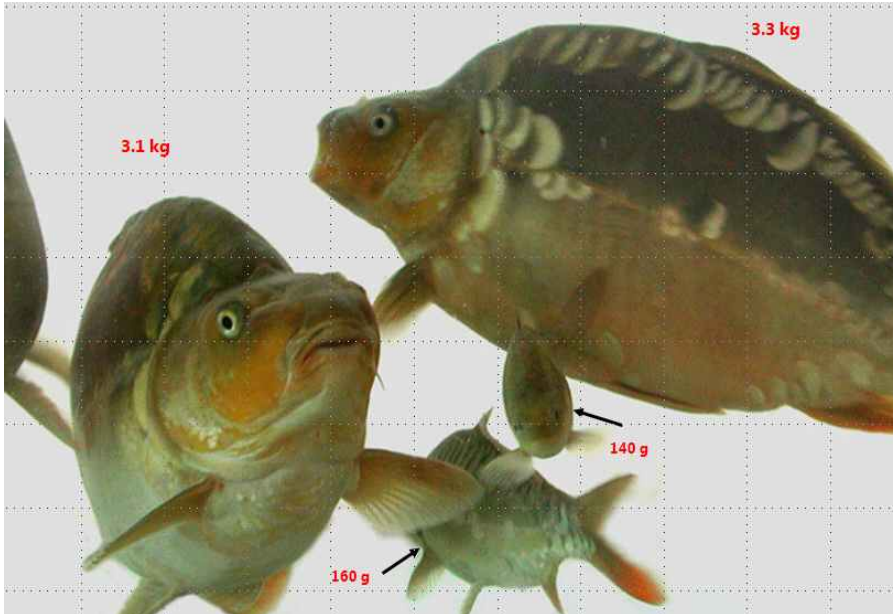


그림 11

고속성장 유전자변형잉어

### 틸라피아

틸라피아는 전세계적으로 잉어 다음으로 가장 많이 양식되는 품종중의 하나이다. 주로 아시아전역, 유럽일부, 중남미 지역에서 활발히 양식되고 있다. 틸라피아는 종묘 생산기술이 쉽고, 질병에 대한 저항성이 강하며, 6개월이면 성성숙이 이

루어지는 비교적 빠른 성장과 환경변화에 잘 적응하는 장점이 있다. 고속성장 틸라피아의 유전자변형 연구는 쿠바와 영국에서 주로 이루어지고 있다. 쿠바에서는 서로 다른 틸라피아종간(*O. hornorum* × *O. aureus*) 잡종계통을 대상으로 고속성장 틸라피아를 개발하였다. 사용한 발현벡터는 틸라피아 성장호르몬(tiGH) cDNA와 바이러스유래 CMV프로모터를 융합한 형태로서 잡종 틸라피아에 이식하여 고속성장 유전자변형 계통의 생산과 다양한 표현형 변화를 보이는 것으로 보고되었다. 특히, 몇몇 연구 결과에서 잡종계통 유전자변형 어류들에서는 성장호르몬 mRNA 발현량과 성장과의 상관관계가 매우 적은 것으로 보고하였다(Martinez et al., 1996; Hernandez et al., 1997).

또 다른 고속성장 유전자변형 틸라피아계통이 영국의 연구진들에 의해 개발되었는데 주로 항동결 단백질인 AFP를 프로모터로 사용하였고 왕연어의 성장호르몬 cDNA가 융합된 벡터를 이용하여 고속성장 틸라피아 계통을 생산한 연구가 보고되었다. 이들은 발현벡터 구축에서 사용한 프로모터유전자가 진화적으로 거리가 먼 어종에서 유래했음에도 불구하고 틸라피아에서 우수한 고속성장 형질(형질전환계통은 일반 대조구보다 2-3배 빠른 성장형질을 유지하였음, 그림 12)이 유도될 수 있음을 보고하였다. 또한 형질전환계통들은 20% 이상 개선된 사료 전환 효율을 보임으로서 단백질 및 에너지 이용 효율이 일반

대조구보다 좋은 것으로 나타났다(Rahman et al., 1998, 2001; Rahman & Maclean, 1999). 최근에는 앞서 설명한 유전자변형 방식인 자가종 형질전환 방식을 이용한 고속성장 형질전환 계통을 개발하기 위한 연구가 진행중에 있다.



그림 12.

고속성장 유전자변형 틸라피아 (좌측)

(출처: Rahman et al., 2001)

## 미꾸라지

미꾸라지는 비교적 소형종인 담수어종으로서 우리나라 주요 양식어종이다. 특히, 이 종은 짧은 세대교번(3-5개월)을 하며, 투명하고 빠른 배발생, 단산란 기법(25℃에서 24시간)이 확립되어 있으며, 수정난의 확보가 용이(마리당 한 번에 산란하는 알의 수가 10,000개)하여 염색체공학, 유전자공학과 같은 유전학연구 및 유전자변형연구에 매우 적합한 실험생물(model system)로서 이용되고 있다.

유전자변형 미꾸라지의 조작은 1990년대 중반부터 시작되어, 2006년 현재까지 비교적 다양한 표현형의 조작이 이루어졌다. 특히, 성장호르몬 유전자 이식을 통해 개발된 고속성장 유전자변형 미꾸라지는 미꾸라지 자체 유전물질만을 이용한 자동형질전환방식으로 생산된 유전자변형 어종이다. 또한 많은 계통으로부터 유전자 분석과 표현형 분석을 통해 안정적 후대생산용 계통이 확립되었다. 이러한 계통은 일반 미꾸라지가 상품 크기까지 생산하는데 소요되는데 걸리는 시간이 6개월이 걸리는데 비해 2개월 이내로 단축이 가능하고 사료전환 효율 역시 2배 가까이 개선되는 것으로 나타났다. 체성분 분석을 통한 결과는 단백질 함량 증가와 지방 감소가 관찰되어 이 역시 양식에 있어서 매우 유용한 것으로 판단된다.

이상에서 언급한 형질전환 미꾸라지는 자가종형질전

환을 통해 개발되어진 최초의 유전자변형 어류이다. 당시 연구진은 미꾸라지 베타액틴 프로모터와 미꾸라지 성장호르몬 유전자를 이용한 벡터(ml $\beta$ actGH)를 미세현미주입으로 수정란에 이식하는 방법으로 개발하였다. 자가종형질전환 미꾸라지는 9개월째 일반 대조군보다 35배 빠른 획기적인 성장가속을 하였고, 어체크기의 거대화가 관찰되었다. 그러나 일부 고속성장을 보이는 계통에서 성장호르몬의 과발현등으로 인해 원치 않는 비정상적 형질들이 관찰되었다. 예를 들면 연골의 과도한 발달, 체색의 변화, 아가미 및 두부의 비대화 등이다. 이는 실제 양식산업에서는 그다지 유리하지 못한 형질들로서 이에 대한 개선을 목적으로 하는 또 다른 형태의 자가종 형질전환을 이용한 유전자변형 미꾸라지 계통을 생산할 필요성이 대두되었다. 이를 위해 종래 사용한 프로모터보다 안정적인 렉틴유전자를 탐색하게 되었고, 이를 프로모터로 한 새로운 형태의 발현벡터를 제작하여 이용하였다. 렉틴 프로모터를 이용한 형질전환계통은 종래의 초고속 성장을 보이던 유전자변형 미꾸라지 계통과는 달리 안정적 성장개선 효과를 보이는 새로운 자가종 형질전환 미꾸라지로서 성장호르몬 과발현에 의한 비정상적인 형질들이 거의 없었으며, 성장가속 역시 일반대조군보다 7배 이상을 보였다. 특히, 일반적 미꾸라지의 크기를 벗어나는 거대화 현상이 완전히 해소될 수 있음을 보임으로서 최적표현형어류 계통을 다양한 강도조절

기법을 통해 인위적으로 개량할 수 있음을 시사하고 있다(그림 5, 그림 7 참조).

## 나) 기타 신기능성 형질전환 어류 개발 사례

### (1) 관상용 어류 개발 사례

실제로 형질전환 어류가 상품화되어 시중에 유통되는 경우가 있는데 GFP와 같은 형광 단백질 유전자의 이식을 통해 다양한 색깔을 표현토록 만든 소형 어류로써 이들은 주로 관상용을 목적으로 개발 되었다. 당초에는 형광 단백질 유전자 이식된 형질전환 어류는 환경에 유해한 물질들을 탐지하거나 발생 생물학 연구재료, 질병 모델생물로서 개발되었으나 육안으로 충분히 판별할 수 있는 형광이 방출됨에 따라 유전자변형동물로는 처음으로 관상용으로 개발되었다. 개발과정 초기에는 해파리의 발광 단백질(GFP)을 소형 어류에서 대량 발현시키는 방법을 사용하였고 그러다 최근에는 다양한 생물소재로부터 추출된 다양한 색깔을 나타내는 형광단백질 유전자를 사용하기에 이르렀다. 이러한 형질전환어류의 개발은 인류 최초로 유전공학 재조합 애완동물을 개발 하여 제품화하기에 이르게 된다. 또한 다양한 형광단백질들을 동시에 발현시킴으로서 생성되는 다양한 색깔의 형광을 나타내는 관상용 어류가 싱가포르의 타이콩사로부터 개발되어 졌다. 관상용으로 개발된 형질전환어류는 지난

2004년 미국 텍사스주 오스틴 소재 요크타운 테크놀러지사가 산호로부터 추출한 붉은색 형광단백질유전자가 삽입된 형질전환 zebrafish를 상품명 “Goldfish”로 미국과 대만에서 출시되어 일부 국가에서 소비자를 대상으로 판매되고 있다(그림 13).



그림 13.

요크타운 테크놀러지사가 개발한 관상용어류

(출처: [www.glofish.com](http://www.glofish.com))



## (2) 질병저항성 어류 개발 사례

현재 어류로부터 다양한 유전자 발굴 및 기능 연구가 활발히 진행됨에 따라 질병내성에 관련된 유전자를 이용한 형질전환 어류의 가능성이 보고되고 있다. 따라서 이러한 연구 성과들은 성공적인 양식을 위해 가장 중요한 요인 중에 하나인 질병저항성 향상을 위해 형질전환기술에 대한 중요성을 시사하고 있다. 물론 지금까지 어떠한 유전자가 세균, 곰팡이, 바이러스 유래 질병에 대한 내성을 보이는지에 대한 명확한 연구가 되어있지 않고 있지만 몇몇 선행연구의 사례를 보면 질병 내성 어류 개발에 높은 잠재 효과를 인정받는 연구 보고도 속속들이 나타나고 있다. 1995년 Hew 등은 무지개송어의 라이소자임(lysozyme) 유전자를 이식한 대서양연어에서 병원체에 대한 1차 방어기능 개선효과를 입증함을 증명함으로써 형질전환을 통한 질병내성 어류의 개발 가능성을 제시해 주었다(Hew et al., 1995). 그 후 누에나방(silkmoth)으로부터 분리한 항균 단백질(anti-bacterial peptide)인 세크로핀(cecropin) 유전자를 이식한 메기의 형질전환 계통에서 실제로 항균 단백질의 발현을 관찰한 보고가 있다(Dunham et al., 2002). 세크로핀은 몇몇 곤충으로부터 생성되는 대표적인 항균 단백질로서 광범위한 세균에 대한 항균성을 보이는 특징이 있다. 또한 인간의 락토페린(lactoferrin) 유전자가 이식된 형질전환 잉어에서는 출혈성 바이

러스에 대한 저항성이 크게 증가한다는 연구보고가 있다(Zhong et al., 2002). 뿐만 아니라, 역전사 RNA (antisense RNA)기술을 이용한 병원성 RNA의 번역(translation) 억제기술의 이용가능성이 보고되어졌으며, 특정 바이러스 또는 세균의 병원성 RNA를 파괴할 수 있는 리보자임(ribozyme) 유전자 이식 등이 실험적으로 시도되고 있다(Zbikowska, 2003). 이중 특히 캐나다 겨울가자미(winter flounder)에서 탐색된 항균성 펩타이드인 pleurocidin은 앞서 언급한 cecropin과 같이 광범위한 병원성 세균에 대해 항균 또는 살균효과를 보일 뿐 아니라 담수에서 해수까지 넓은 염분 농도에서도 그 활성이 유지될 수 있음이 알려져 있어서 만약 본 유전자를 이용한 적절한 형질전환 기술이 수반될 경우 여러 어종에서 질병내성 어류 개발에 높은 잠재효과를 인정받고 있다.

### (3) 저온 내성 어류 개발 사례

잉어 또는 금붕어와 같이 온대성 어류가 저온에 견딜 수 있는 능력에 따라 이들에 대한 양식 성공여부가 결정되는 매우 중요한 부분이다. 거의 대부분이 겨울 시즌동안 특히, 중국에서는 비교적 따뜻한 지역인 양쯔강 유역에서 대단위로 잉어양식을 주로 하는데 겨울철 시즌에 대량 폐사가 일어나곤 하여 막대한 손실을 보고 있다. 이에 중국의 몇몇 과학자들은 항

동결 단백질 유전자를 이용한 형질전환 어류의 가능성에 대한 연구를 꾸준히 하고 있다(Wu et al., 1998; Wang et al., 1995).

한편으로 영하의 극한 지방에서 서식하는 어류들로부터 항동결 단백질 유전자를 분리하여 이를 연어류 등에 이식함으로써 겨울철 수온이 영하로 내려가는 추운 지역에서 어류 양식을 가능케 하고자 하는 연구가 수행되었다. 겨울가자미 또는 등가시치과 어류로부터 분리된 항동결 단백질을 대서양 연어에 안정적인 형질전환 계통이 개발된바 있다(Fletcher et al., 1992; Hew et al., 1995, 1999). 그러나 아직 형질전환 어류들에서 발현하는 혈청내 항동결 단백질 수준이 생체를 영하의 저온으로부터 보호할 만큼의 수준에는 이르지 못하고 있다.

#### (4) 영양 대사 개선 어류 개발 사례

최근 들어 많은 신기능성 형질전환 어류 개발 프로젝트들이 많이 진행되고 있는데 그 중에 하나가 연어과 어류와 같이 탄수화물을 에너지원으로 효과적으로 사용하지 못하는 어종들에 대해 탄수화물 대사를 개선하기 위한 형질전환기술 개발을 위한 연구가 시도되고 있다(Pitkanen et al., 1999; Krasnov et al., 1999). 연어과 어종들은 대부분이 육식성이기 때문에 사료에 어분단백질을 충분히 공급해야 하지만 이는 사료에 첨가할 어종들의 무분별한 남획에 따른 생태계 파괴를 야기할 수

있다. 연어양식이 이루어지는 바다 연안에서는 실제로 연어의 사료에 첨가하기 위한 남획에 따른 어종들의 자원량이 현저히 감소되어 생태계에 문제점을 야기한 경우가 빈번하게 일어나고 있다(Holmes, 1996). 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 사료내 탄수화물 원료를 증가시키고 어분단백질의 함량을 줄여야 한다. 따라서 연어과 어종들의 원활한 성장을 위해서는 탄수화물 대사를 우선적으로 개선해야 할 필요성이 대두되고 있다. 최근에는 탄수화물 대사를 개선하기 위해 인간유래 glucose transporter (hGluT1) 및 생쥐유래 hexokinase type II (rHKII) 유전자와 CMV 프로모터가 융합된 재조합 유전자의 이식이 시도되고 있다.

#### (5) 불임 유도 어류 개발 사례

형질전환 어류는 생식에 의한 동종간 외래 유전자의 전이가능성으로 인해 생태학적인 위해성을 야기할 수 있기 때문에 이를 해결하기 위해서는 형질전환어류의 불임화가 필요하다. 어류의 불임은 형질전환 어류를 산업화하기 위해서 꼭 필요한 생태학적 안정을 위한 장치중의 하나이다. 원치 않는 사고나 방출로 자연생태계에 형질전환 어류가 유출된다면 동종 또는 근연종 간의 교배에 의한 유전자 오염으로 인해 예측하기 힘든 생태계 변화를 일으킬 수 있다. 형질전환 어류의 생식학적 격리

(reproductive confinement) 방법으로 사용되어질 불임화 기술은 앞서 언급했듯이 염색체 조의 증가를 통해 감수분열을 억제하는 3배체 형질전환체를 이용하는 것이 그 가능성을 인정받고 있다. 3배체 어류 생산은 1970년대 초반 실험적으로 시도된 이래 많은 어류 종에서 수행되어 불임효과가 보고 된 바 있으며, 이미 형질전환 틸리피아, 형질전환 미꾸라지, 형질전환 연어종에서 다양한 방법의 3배체 불임집단이 개발되어 고성장 형질전환 어류의 생식 격리 가능성을 보고하였다(Nam et al., 2004).

이상에서 언급한 분자유종기법외에 형질전환어류의 불임을 위한 방법으로는 특정 안전시설과 관리 아래에서는 형질전환 어류가 생식능력을 갖지만 자연계 등으로 노출되었을 때 정상적인 생식능력을 갖지 못하거나 교배에 의해 생산된 자손들이 생존하지 못하도록 하는 생식제어기술이 개발되고 있다. 이 기술은 특정 화합물 유도체 등을 이용하여 유전자 발현의 스위치 전환과 유전자 발현억제기술을 기반으로 한다(Rocha et al., 2004). 불임어류를 개발하기 위한 획기적인 기술로서 성숙에 관여하는 호르몬의 발현을 RNA 수준에서 저해하여 생산된 RNA가 단백질로 전환되지 못하게 하는 기술이다. 특히 성숙샘 자극호르몬 또는 성숙샘 자극호르몬 방출호르몬을 이용한 연구가 대표적인 사례인데 이들의 유전자를 이용한 이유는 호르몬간의 상호작용에 의해 불임 혹은 유도가 이루어지기 때문

에 인위적 제어가 용이하기 때문이다. 즉 정상 시에는 형질전환 어류내에서 GnRH의 제어를 위한 상시 유전자 발현을 유도한다면 GnH가 분비되지 못하여 결국 생식소 발달이 억제될 수 있고, 반대로 형질전환 어류를 친어로 사용하기 위해 GnH를 인위적으로 투여하면 생식소 발달과 함께 성숙을 다시 유도할 수 있는 방법이다. 이러한 방법을 가역 불임화 기술이라고도 하며, 이는 역전사 RNA (antisense RNA) 기술을 이용하여 성 성숙에 관련된 호르몬 유전자를 제어하는데 매우 유용하다. 현재까지 무지개송어(Uzbekova et al., 2000)과 틸라피아(Maclean et al., 2002)에서 이상의 방법을 이용하여 불임화가 시도되었다.

#### (6) 환경 오염 검출 어류 개발 사례

최근에는 형질전환어류를 이용하여 수서생태계 오염을 정밀하게 검출하고 이를 모니터링 하고자 하는 연구들이 활발히 진행되고 있다. 어류는 외부 오염 또는 스트레스 자극에 대해 육상동물에 비해 훨씬 민감한 반응을 나타냄이 보고되기 시작하면서 생태계 및 환경오염 지표 생물로서 큰 관심을 받고 있다. 지금까지 어류를 이용한 바이오표지 방법들이 다양하게 개발되어 왔지만 이들은 주로 내재성 단백질 또는 유전자의 발현정도를 이용하는 것으로서 다양한 기술적 한계를 노출하고 있다. 어류 분자표지에 가장 많이 사용되고 있는 특정 효소의

활성 측정법은 그 분석법의 특성상 개체간 변이가 매우 크고 오염 초기의 낮은 스트레스 수준에서는 정밀 검출이 불가능하다. 또한 바이오표지에 사용되는 효소 중 대부분이 isotypes 형태로 존재하는 점과 특정효소에 대한 class들 역시 다량 존재하기 때문에 특정 isotype의 특이변화를 검출하기가 매우 어려운 단점이 있다. 어류에 존재하는 내재유전자의 발현유무를 이용할 경우 대부분 바이오표지들이 생체내 다단계 경로(Signal pathway) 또는 길항작용(Feed-back조절)을 거치기 때문에 자극원에 반응하는 강도가 희석될 가능성이 존재하게 된다. 즉 외부로부터 전달된 오염원 또는 스트레스 자극원의 강도와 목적 유전자의 발현과의 정량적 비례관계가 성립되지 못하는 현상이 나타나곤 한다. 이상의 문제점을 해결하기 위해서는 생체의 내재된 복잡한 신호전달체계의 지배를 받지 않는 인위적인 분자표지가 필요하고 그 분자 표지와 동일한 기질을 공유하는 여러 효소들이 생체내에 함께 존재하지 않아야 하며 발현에 있어서 자가 억제하는 조절작용을 크게 받지 않는 표지 시스템이어야 한다. 또한 발현산물이 생체내 다른 효소들에 의해 간섭받지 않아야 하여 발현 양을 쉽게 검출할 수 있는 기법들이 정착되어야 한다. 따라서 상기 요구조건들을 모두 충족시키기 위해서는 오염원에 반응하는 인위적인 특이 표지의 발현 기능을 획득시켜 줄 수 있어야 함으로 유전자이식기술을 이용한 형질전환연

구 전략이 어류에서 시도되고 있다.

환경모니터링용 연구 분야의 첫 번째 연구전략은 오염 노출시 특이적인 발현 변화를 보이는 유전자의 조절부위와 손쉽게 발현 여부를 알 수 있도록 표지가 가능한 리포터유전자 등과 융합하여 제작한 발현벡터들을 이용, 형질전환 어류를 제조함으로써 오염에 반응한 결과로 발현되는 양을 측정하여 특정 오염원의 존재 및 증감 유무를 모니터링 하는 것이다. 이 상에서 언급했듯이 종래에 주로 사용되고 있는 내재유전자의 발현정도를 파악하는 방법으로는 바이오마커로서의 감도와 정밀도가 낮기 때문에 형질전환어류를 통해 이를 극복하고자 하는 것이다. 이 전략은 외래유전자 산물을 바이오마커로 이용하여 생체에 내재된 복잡한 신호전달 및 음성 피드백 조절을 최소화시키고, 동시에 발현 산물이 생체내 다른 효소 등에 의해 쉽게 분해되거나 다른 회로에 이용되지 않게 함으로써 그 도입된 형질전환 유전자의 표지 효과를 보다 정량적이고 정밀하게 얻고자 하는 전략이다. Blechinger 등(2002)은 GFP 유전자가 삽입된 zebrafish를 이용하여 미량의 중금속에 민감하게 반응하는 형질전환 어류를 제작하여 환경오염원 검출을 위한 센서로서 이용될 수 있음을 처음으로 증명하였다. Zeng 등(2005)은 GFP 유전자가 삽입된 송사리를 이용하여 수서생태계내 오염된 스테로이드성 호르몬, 내분비 장애물질을 정밀하게 검출할 수 있음



을 실험적으로 입증하였다. Kurauchi 등(2008)과 Salam 등(2008)은 코리오제닌(choriogenin) 프로모터와 녹색형광 단백질(GFP) 유전자가 융합된 재조합 유전자를 이식한 후 확립된 유전자변형 송사리를 이용하여 수중내 여성호르몬인 에스트로젠(estrogen-17b)의 오염에 대한 반응을 송사리의 간 조직에서 형광발현을 확인함으로써 환경오염물질 및 스트레스등을 모니터링할 수 있는 새로운 방법을 제시해 주었다.

#### 다) 패류 및 갑각류 연구개발 사례

1990년대 초반부터 행하여진 유전자이식 사례들은 대부분 몇몇 모델어종(zebrafish 및 송사리)와 일부 유용 양식어종(잉어, 메기, 연어류, 송어, 미꾸라지)등이 대상이었다. 최근에는 패류 및 갑각류가 수산양식 생산량에 차지하는 비중이 점차 높아지고 고품질의 단백질원으로 인식되어 짐으로써 이들의 형질 개선을 위한 유전자 이식 연구가 시도되고 있다(표 2).

표 2. 지금까지 개발된 형질전환 패류 및 갑각류 연구개발 사례

종	도입 유전자		유전자 이식방법	인용문헌
	조절부위	구조유전자		
Red abalone ( <i>Haliotis rufescens</i> )	Drosophila $\beta$ -actin promoter	$\beta$ -Galactosidase reporter gene	Electroporation	Powers et al. (1995)
	Abalone actin promoter	Coho salmon Gh cDNA	Electroporation	Powers et al. (1997); patent #US5675061
Japanese abalone ( <i>Haliotis diversicolor supertexta</i> )	Ocean pout AFP promoter	Chinook salmon GH cDNA	Electroporation	Tsai et al. (1997, 2000)
Oyster ( <i>Crassostrea gigas</i> )	Drosophila heatshock protein 70; cytomefalo virus (CMV) promoter	Lusiferase reporter gene	Particle bombardment	Cadoret et al. (1997)
Pearl oyster ( <i>Pinctada macima</i> )	Common carp $\beta$ -actin promoter	Grass carp GH gene	Electroporation	Hu et al. (2000)

표 2. 지금까지 개발된 형질전환 패류 및 갑각류 연구개발 사례  
-계속

종	도입 유전자		유전자 이식방법	인용문헌
	조절부위	구조유전자		
Pearl oyster ( <i>Pinctada fucata martensii</i> )	Mollusc prism protein and mantle protein promoters	Green fluorescent protein (GFP) fusion gene	Direct microinjection into gonad (adenovirus vector used)	Keizabro et al. (2005); Patent #US2005198697
Tiger shrimp ( <i>Penaeus monodon</i> )	CMV promoter	Bacterial alkaline phosphatase gene	Electroporation	Tseng et al. (2000)
Giant freshwater prawn ( <i>Macrobrachium rosenbergii</i> )	CMV promoter	Green fluorescent protein (GFP) gene	Spermatophore microinjection	Li & Tsai (2000)
Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> )	Shrimp $\beta$ -actin promoter	Taura syndrome virus coat protein (sense or antisense)	Microinjection Electroporation	Sun et al. (2003); #WO03048325

표 2. 지금까지 개발된 형질전환 패류 및 갑각류 연구개발 사례  
-계속

종	도입 유전자		유전자 이식방법	인용문헌
	조절부위	구조유전자		
Shrimp ( <i>Litopenaeus schmitti</i> )	CMV promoter	$\beta$ -Galactosidase reporter gene	Electroporation (nuclear localizing sequence of SV40 T antigen involved)	Arenal et al. (2004)

(출처: Nam, 2007)

패류와 갑각류는 어류와 같이 체외수정을 하므로 배우자 조작이 용이하고, 수산양식기술의 발달로 정자와 난자를 대량으로 얻을 수 있는 장점이 있어 형질전환연구에 쉽게 접근할 수 있다. 그러나 패류 및 갑각류는 어류에 비해 성장이 저조하며 질병에 취약하고 생존력이 떨어지는 경향이 있다. 특히, 갑각류의 경우 탈피를 이용한 성장을 하기 때문에 성장률개선을 위한 기술적 어려움이 뒤따른다. 이와 같이 패류 및 갑각류의 형질전환 유도를 위해서는 풀어야할 문제점이 있는 것도 사실이다. 특히 패류의 경우 수컷 배우자를 얻기가 매우 어렵고 갑각류에서는 인위적인 생식조절이 매우 어려우며, 무엇보다도

유전정보가 매우 제한적이기 때문에 이들에 대한 형질전환기술이 제한 적일 수밖에 없다(Harper et al., 2003). 그러나 어류에서 성공적으로 성장형질을 개선한 일련의 사례로 알 수 있듯이 패류 및 갑각류에서도 유전자 이식을 통한 형질전환 연구는 성장률 및 생존률을 증가시키기 위한 중요한 전략으로 사용되어질 수 있다. Powers 등(1995, 1997)은 패류에 유전자 이식을 통한 형질전환체를 개발하여 처음으로 무척추동물에서 형질전환을 성공시켰다. 이들은 초파리유래 베타액틴( $\beta$ -actin)유전자와 전복유래 actin 유전자를 프로모터로 하여  $\beta$ -Galactosidase와 연어유래의 성장호르몬을 각각 융합하여 재조합 유전자를 전기천공(electroporation) 방법으로 red abalon (*Haliotis rufescens*)의 수정란에 이식하는 방법으로 형질전환을 유도하는데 성공했다. 이들의 연구결과는 무척추동물의 형질전환체를 만들기 위한 유전자 이식기술개발의 가능성을 보고하였다. 같은 해에 Gendreau 등(1995)은 luciferase 유전자를 갑각류인 알테미아 (Brine shrimp, *Artemia franciscana*)에서 DNA 코팅입자 전달법을 이용하여 이식하여 일시적인 발현현상(Transient gene expression)을 관찰하였다. 1996년에는 최초로 바이러스유래 유전자들(Moloney murine leukemia virus long terminal repeat, MMLV-LTR; Rous sarcoma virus long terminal repeat, RSV-LTR)과 질병관련 저항성 유전자(Heparitis B surface

antigen, Neomycin resistant gene,  $\beta$ -galactosidase)들과 융합된 벡터를 이매패인 Dwarf surf clam (*Mulinia lateralis*)에 안정적으로 이식한 연구가 보고되었다(Lu et al., 1996).

패류 및 갑각류를 대상으로 유전자이식에 관련하여 유전자의 전달 및 발현에 대한 이상과 같은 선구적 연구결과가 보고된 이후로 지금까지 다양한 재조합 유전자가 벡터로 개발되었고 이들을 다양한 종에서 적용 가능성이 지속적으로 보고되고 있다.

## 2) 형질전환 생물반응기 연구개발 사례 분석

### 가) 현재 연구개발 형질전환 생물반응기의 대표적 특징

#### (1) 축산 동물 사례 및 특징

형질전환생쥐가 탄생된 계기로 다양한 유전자가 이식된 동물을 생산하기 위한 유전자 변형기술이 급속히 발전하면서 형질전환생물이 농·축산업뿐만 아니라 바이오의학기술에도 기여할 수 있는 가능성을 제시해 주었다. 우량가축의 능력 개량 및 바이오신약, 치료용 단백질생산, 바이오의학으로의 이용 등은 향후 10년 이내에 실용화될 것으로 전망된다. 현재까지 형질전환기술을 동물에 적용하여 치료용 단백질생산을 위한 연구가 주로 수행되어 왔으며, 이는 의약품으로서 바이오 신약에 속하는데 이때 사용되어진 형질전환동물을 생물반응기개념의

bioreactor로서 사용되어진다. 기존의 단백질 의약품은 효모, 미생물, 동물세포, CHO (chinese hamster oocyte) 세포 등의 세포배양을 통하여 생산하였는데 이러한 세포배양은 막대한 설비투자가 필요하며, 대량으로 나오는 배양액은 산업폐기물로 처리해야 하므로 상당한 처리비용이 소요된다. 이러한 고가의 생산단가를 해결할 수 있는 방법 중 하나가 유전자변형동물을 이용하는 것으로 고가의 설비투자를 요하는 세포배양보다 단지 유전자변형동물의 수를 늘리면 생산규모가 확장되기 때문에 경제적이라 할 수 있다.

치료용 단백질 중에는 공급이 부족한 것 외에도 생산원가가 비싼 것들이 대부분이다. 이들 중 일부는 혈액을 정제하거나 세균 또는 효모를 이용해 생산하는 방법이 있다. 그러나 앞서 언급하였듯이 이런 방법으로는 순수한 단백질을 얻기 위해 필요한 정제단계를 거쳐야 되는데 매우 어렵거나 생산비용이 너무 비싸 실용성이 낮다(그림 14). 이를 해결하기 위해 동물을 생물반응기로서 형질전환을 통해 대량의 단백질을 얻고자 하는 연구가 시도되고 있다(표 3).

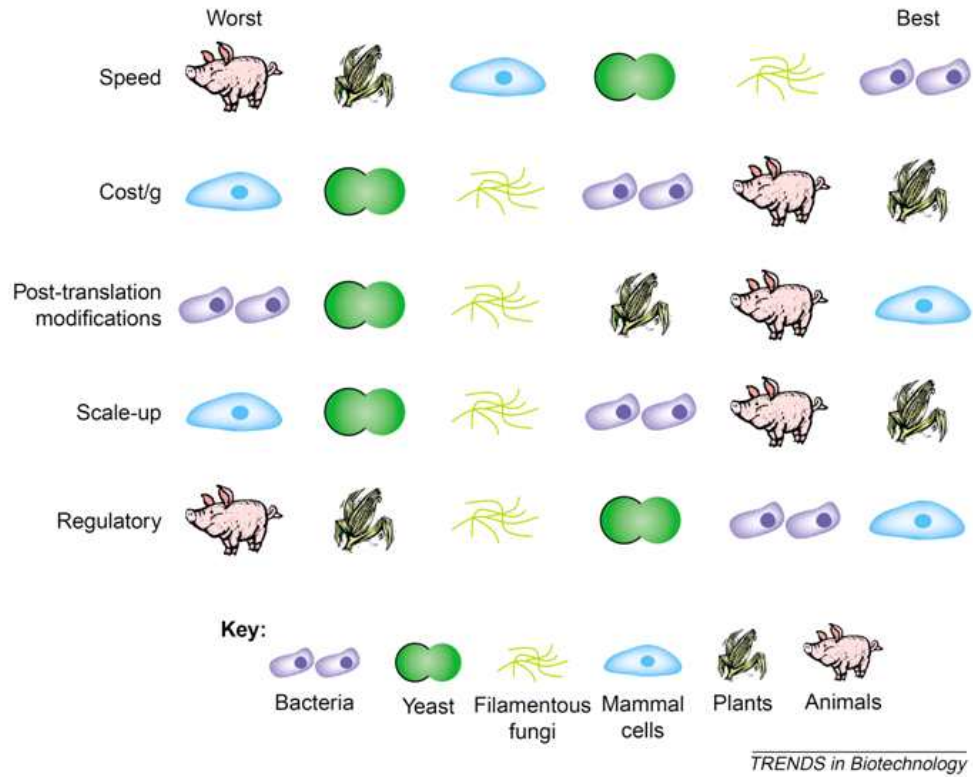


그림 14.

다양한 생물반응기의 특징

(출처: Dyck et al., 2003)

폐기종 치료제로 쓰이는 안티트립신 a-1, 혈전 생성을 억제하는 단백질 C, 안티트롬빈 III, 화상이나 창상 치료에 필요한 인간 혈청알부민, 혈전 치료제인 푸로유로키나제, 혈우병 치료제인 혈액응고인자, 백신 생산을 위한 항원 등의 단백질이 형



질전환기술을 이용하여 동물에서 생산하는 것에 성공을 하였으나, 산업적으로 이용된 예는 아직 미흡하다. 혈청알부민의 경우 연간 수요가 600톤 이상이 되므로 이를 형질전환과 복제기법을 접목시켜 젖소의 우유에서 추출이 가능하게 만들어 저렴하면서도 대량생산이 가능함을 실험적으로 증명한 예가 있다.

표 3. 단백질 의약품 생산에 이용된 동물 생물반응기

동물명	재조합 단백질명	이용
Sheep	Alpha1 anti trypsin	Deficiency leads to emphysema
Sheep	CFTR	Treatment of cystic fibrosis
Sheep	Tissue plasminogen activator	Treatment of thrombosis
Sheep	Factor VIII, IX	Treatment of hemophilia
Sheep	Fibrinogen	Treatment of wound healing
Pig,	Tissue plasminogen activator	Treatment of thrombosis
Pig	Factor VIII, IX	Treatment of hemophilia
Goat	Human protein C	Treatment of thrombosis
Goat	Antithrombin 3	Treatment of thrombosis
Goat	Glutamic acid decarboxylase	Treatment of type 1 diabetes
Goat	Pro542	Treatment of HIV
Cow	Alpha-lactalbumin	Anti-infection
Cow	Factor VIII	Treatment of hemophilia
Cow	Fibrinogen	Wound healing
Cow	Collagen I, Collagen II	Tissue repair, treatment of rheumatoid arthritis
Cow	Lactoferrin	Treatment of GI tract infection, Treatment of infectious arthritis
Cow	Human serum albumin	Maintains blood volume
Chicken, Cow, Goat	Monoclonal antibodies	Other vaccine production

단백질 의약품은 대부분 동물의 유선을 이용한다. 유선은 세포배양법보다 최고 1,000배 높은 세포밀도를 갖고, 동물의 종에 따라 차이는 있지만 유즙 1리터당 최고 1~10g의 단백질을 지속적으로 분비할 수 있다. 단백질의 3차원 구조 중에서 중요한 부분 중 하나가 당화(glycosylation)인데, 당화의 양과 위치 등에 의하여 단백질 구조가 변성되거나 약리 효과에서 상당한 차이를 낼 수 있다. 신약의 가치는 당화된 것이 인간의 단백질과 어느 정도 유사한가에 따라 크게 영향을 받으며, 동물을 이용하여 단백질 의약품을 생산하면 이러한 당화가 인간과 유사할 가능성이 높은 것으로 알려져 있다. 동물의 유선을 이용하여 산업적으로 이용한 예가 최근에 발표되었는데, 2006년 미국의 GTC사가 항 혈액응고제인 안티트롬빈 III를 유전자 변형 유산양의 젖에서 추출하여 유럽에서 신약으로 승인받는 데 성공하였다. 이것은 유전자변형동물 유래의 최초의 신약으로, 앞으로 바이오신약의 새로운 장을 열어나갈 획기적인 계기가 될 수 있음을 주장한 바 있다. 이후, GTC사는 동물의 유즙에서 다양한 재조합 단백질을 생산하기 위한 연구가 추진되었고 약 60종류 이상의 단백질에 대해서도 연구개발을 추진하고 있다. 현재 유럽에서 판매되고 있는 재조합 단백질로는 안티트롬빈 III 외에도 Factor VII, AntiCD137 항체 및 말라리아 백신 등을 생산하는 유전자변형 유산양을 개발하여 단백질 의약품에 대한 연

구를 진행 중이다.

Hematech사도 생물반응기로써 형질전환동물을 이용하여 인간항체를 대량으로 생산하는 목적으로 연구를 진행하고 있는 대표적인 회사중에 하나이다. 이 회사의 핵심기술은 소에서 인간의 폴리클론항체를 생산하는 연구이다. 이 회사는 인간 세포로부터 얻은 염색체 조각으로 제작한 인공염색체를 벡터로 이용하여 원하는 유전자를 크기에 제한 없이 이식할 수 있는 시스템을 개발하였다. 최근 염색사 전달법(chromatin transfer)이란 기술을 통해 인간항체를 생산하는 데 성공하였으며, 이들 폴리클론항체는 암이나 항생제저항성이 생긴 감염질환, 면역결핍, 자가면역질환 등 난치병 치료에 사용될 수 있다.

미국 Viragen사의 경우 영국의 Oxford Biomedica사와 공동으로 영국 로슬린 연구소와 닭에 대한 유전자변형 연구를 지원한 결과 렌틴바이러스 벡터 (Lentiviral vector)를 이용하여 계란의 난백에서 인터페론 베타 및 항체를 생산하는데 성공하였다(그림 15). 또한 미국의 Abgenix사는 인간의 항체유전자를 지닌 메가베이스 크기의 YAC (Yeast artificial chromosome)를 생쥐에 주입하여, 생쥐에서 인간의 항체를 생산하는 데 성공하였으며, 이 외에도 다수의 항체가 임상 중이다.

국내에서도 형질전환 동물을 유용물질의 대량 생산을 위한 연구가 시도되고 있으나 상업화된 사례가 거의 없다. 한미약

품은 유전자변형 재래산양의 젖이나 닭의 계란으로부터 항암제로 쓰이는 G-CSF, 항체 등을 생산하는 연구를 하고 있고, 농촌진흥청 축산과학원에서는 빈혈치료제인 EPO 및 혈우병치료제인 cWF를 돼지의 젖에서 생산하는 데 성공하여 분리 정제하는 단계에 있다. 그 밖에 (주)엠젠은 백혈병 치료제를 유선에서 분리하는 돼지를 개발하는 데 성공한 사례가 있다.

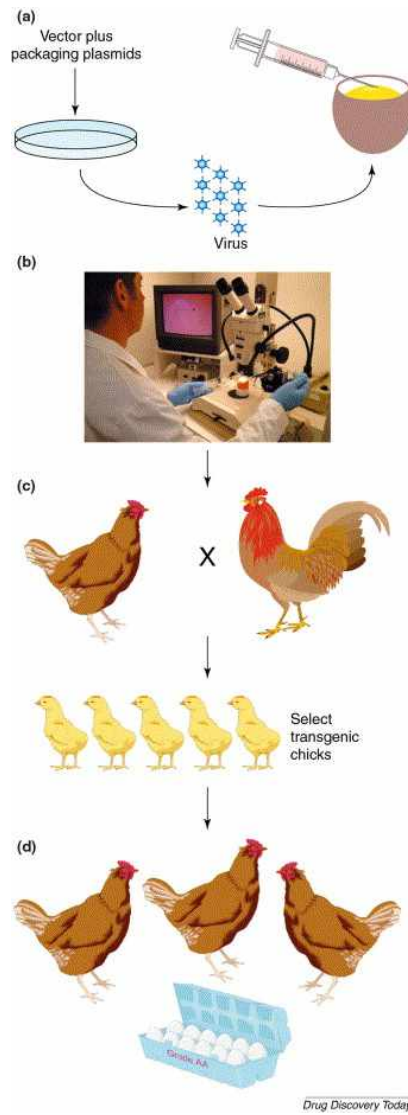


그림 15.

렌틴바이러스벡터를 이식한 형질전환 닭에서의 단백질생산  
(출처: Lillico et al., 2005)

## (2) 식물 사례 및 특징

식물을 대상으로 형질전환연구는 분자 생물학의 급속한 발전에 따라 완성도가 높아지고 있다. 진단과 치료를 목적으로 하는 유용 단백질의 수요가 날로 증가하고 있는 반면 단백질 생산량은 턱없이 부족한 실정이다. 많은 연구자들이 식물의 무한 잠재성을 인식하여 다양한 형질전환기법을 통해 유용 단백질을 생산함으로써 이상의 문제점을 해결하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

식물 시스템을 이용하여 바이오의약품, 산업용 소재를 생산하는 식물공장(plant factory) 또는 분자 농업(molecular farming)은 식물체를 하나의 생물반응기(Bioreactor) 개념으로 인식하는 것으로써 식량 생산기능 농업을 산업화 소재 생산기능 농업으로 그 패러다임을 전환시킬 수 있는 미래형 기술이라 평가되고 있다. 특히, 의약품에 사용할 재조합 단백질을 생산하기 위해 식물을 bioreactor로 이용할 경우 엄청난 양을 일시에 생산할 수 있는 장점을 가지고 있다.

또한 식물을 bioreactor로 사용할 경우 무엇보다도 시설 투자비 또는 개발비가 저렴하여 경제적 측면에서 실용화 가능성이 매우 높고, 식물시스템을 이용하여 바이오의약품을 생산할 경우 생산된 물질들은 바이러스 등과 같은 인수공통전염병의 잠재적 위험성이 없는 안전한 의약품 공급을 가져올 수 있

다는 장점이 있다. 또한 단백질은 외부환경으로부터 영향을 쉽게 받을 수 있기 때문에 단백질 생산시 각별한 주의가 요하지만 식물의 경우 씨앗, 덩이줄기, 열매 등이 있어 안전하게 단백질을 보관할 수 있는 최상의 재료가 존재한다. 셋째, 세균의 경우 유전자 발현이 불안정하여 특정 단백질을 생성하지 못하는 경우가 있으나 식물의 경우 매우 안정하게 목적 단백질을 생성할 수 있는 장점을 지니고 있다. 식물시스템을 활용하여 생산되는 유용 단백질은 동물시스템과 비교시 생산량 측면에서 볼 때 크게 우위성을 나타내고 있다.

형질전환 식물체를 이용한 의료용 단백질 생산은 1989년 Hiatt 등이 담배에서 단클론항체를 생산할 수 있다는 연구결과를 보고한 이후 많은 관심을 받기 시작하였다. 단클론항체는 관절염에서 암까지의 다양한 질병에 대한 치료제로 사용되고 있으며, 지금까지는 주로 동물세포에서 생산되어 이용되는데 식물에서 생산이 가능함으로써 생산단가를 획기적으로 낮출 수 있다는 것과 동물세포를 이용하였을 때 생길 수 있는 광우병과 같은 동물유래 질병원인 단백질 또는 병원균과 같은 동물성 병원균으로부터 비교적 안전할 수 있다는 데 큰 의미가 있다. 형질전환 식물을 이용한 경구백신은 Haq 등(1995)이 enterotoxigenic *E. coli*의 heat-labile toxin B subunit (LTB) 단백질을 감자에 발현시키고 이 감자를 쥐에 경구 투여하여 효율



적인 면역반응을 유도한 결과를 발표하였다. 이후 Shchelkunov 등(2006)은 최초로 실험동물에서 HIV 와 HBV바이러스에 면역 반응을 나타낼 수 있는 경구 백신을 생산하였고, Li 등(2006)은 cholera toxin B subunit (CTB)유전자를 당노관련 유전자등과 융합한 재조합 유전자를 담배에 이식하여 단백질생성을 유도하였으며, 경구 백신으로서 당노를 예방하거나 치료효과 가능성을 제시해 주었다. 이밖에도 많은 종류의 형질전환 식물을 이용한 경구백신이 연구되었고 현재 임상실험 중인 것도 있다. 항원 유전자를 발현시킨 형질전환 식물체를 이용한 경구백신은 현재 상품화된 것은 없지만 닭의 뉴캐슬 병을 예방할 수 있는 가축 백신이 미국 농업부에서 승인을 받았으며, 담배를 이용한 B형 간염백신이 쿠바에서 승인을 받았다.

이밖에 식물을 bioreactor로서 활용한 몇몇의 연구결과는 이미 시장에 진입하여 상업화에 성공한 사례가 있다 (표 4). 또한 현재 18개의 식물 유래 의약품(plant-made pharmaceuticals, RX), 백신(*Escherichia coli* heat-labile toxin, *Vibrio cholerae* HBsPMP)이 치료용을 목적으로 시장에 진입하기 위해서 임상실험이 진행되고 있으며, 대표적 연구들로는 항체 (CaroRX, IgG, Fv antibodies, RhinoAg, LT-B vaccine, TGE vaccine, Norwalk virus capsid, Newcastle vaccine, Viral vaccine mixture, Cancer vaccine), 및 치료용 단백질(Gastric

lipase, Human intrinsic factor, Galactosidase, Interferon, Lactoferrin, Apolipoprotein AI)등이 있다.

주로 유전자변형 식물을 이용하여 이상과 같은 유용 단백질을 생산하는 경우 아그로박테리움 관련 벡터를 이용하여 유전자를 전달하는 방법이 가장 많이 사용되는데 사용화 가능성이 가장 높은 것은 경구용 백신, 즉 먹는 백신 등을 들 수 있다. 이러한 경구백신 생산을 위한 식물의 선정에는 백신의 종류에 따라 식물백신의 저장에 따른 문제점, 이용하는 식물의 부위 등이 고려되어야 한다. 이러한 고려 요인 중에서 저장 및 유통의 문제점과 이용 부위의 광범위성을 고려하여 주목을 받고 있는 식물은 현재 바나나, 감자, 토마토, 옥수수, 벼, 밀, 보리 등을 들 수 있고 특히 동물용 경구백신을 위한 식물로는 사료용 식물인 알파파, 옥수수 등이 있다.

식물을 bioreactor로 활용하여 바이오의약품생산을 하고자하는 세계적인 추세와 국내 단백질의약품 개발 현황을 비교하여 보면, 국내에서도 1990년대에 들어 동물세포 및 미생물 시스템을 활용하여 인터페론, 성장호르몬, 조혈 촉진인자, 콜로니 자극인자 등이 국내 자체 기술로 개발되어 시판되고 있고, 국내 단백질의약품의 시장규모는 2003년도에 약 1조원에서 20~30%씩 성장하고 있다. 이러한 바이오의약품의 상승적인 시장규모에도 불구하고 식물을 공장으로 활용하여 치료용 단백질

의약품을 생산하고자 하는 국내 현황은 아직 본격적인 상용화 단계에는 진입하지 못한 채 대부분 연구단계에 머물러 있으나, 가까운 시일내 이들 식물 biofactory 제품이 국내에서도 가시화 될 것으로 예상된다.

표 4. 형질전환식물 시스템을 이용하여 상용화된 단백질

상품	상품명	원료작물	도입 유전자	제조사
Avidin	Recombinant avidin	Transgenic corn	Chicken	ProdiGen (USA)
Aprotinin	AproliZean	Transgenic corn	Cow	ProdiGen (USA)
Aprotinin	AproliZean	Modified viral vectors in tobacco	Cow	Large Scale Biol. (USA)
$\beta$ -Galactosidase	N/A	Transgenic corn	Bacteria	ProdiGen (USA)
Trypsin	TypZean	Transgenic corn	Cow	ProdiGen (USA)
Lactoferrin	N/A	Transgenic rice	Human	Ventria Biosc. (USA)
Lysozyme	N/A	Transgenic rice	Human	Ventria Biosc. (USA)
Thyroid-stimulating hormon receptor	N/A	Transgenic Oriental melon	Human	Nexgen (Korea)

표 4. 형질전환식물 시스템을 이용하여 상용화된 단백질-계속

상품	상품명	원료작물	도입 유전자	제조사
Hantaan and puumala viral antigens	N/A	Transgenic Oriental melon	Virus	Nexgen (Korea)
Peroxidase	N/A	Transgenic corn	Fungus	Applied Biotechnology Institute (USA)
Laccase	N/A	Transgenic corn	Fungus	Applied Biotechnology Institute (USA)
Cellulase	N/A	Transgenic corn	Fungus	Applied Biotechnology Institute (USA)

(출처: Pervin &amp; Emilio, 2008)

## 나) 생물반응기 대상 수산 동물로서 어류의 장단점

## (1) 장단점 분석

어류를 이용하여 기능성 단백질을 대량으로 생산할 수 있는 시스템, 즉 생물반응기로서 현존하는 포유류 시스템과 비교시 많은 잠재적 장점들을 보유하고 있다. 첫째, 어류는 매우 높은 산란력(high fecundity)을 보유하고 있으므로 개발된 단일의 유전자변형 생물반응기로부터 대량의 자손 번식을 통한 생산을 꾀할 수 있다. 둘째, 어류는 포유류에서 사용하기 어려운 염색체 조작(chromosome manipulation)이 비교적 손쉽게 이루어질 수 있으므로 개발된 유전자변형 생물반응기 개체로부터 염색체조작을 통한 동형접합성 순계 및 처녀생식을 통한 복제 계통을 대량으로 생산할 수 있다. 셋째, 어류는 포유류 실험동물의 생산단가보다 가격이 싸고 일반적으로 생활사가 비교적 짧아 성숙연령에 도달하는 시기가 짧으며, 환경조절이나 호르몬 주사 등으로 쉽게 연중산란이 가능하다는 장점이 있다. 넷째, 진화적으로 하등한 어류는 포유류에 비해 훨씬 약한 음성 피드백(negative feedback) 조절을 받기 때문에 외래 단백질의 조직 내 과발현이나 축적이 포유류 생물반응기에 비해 유리하다. 다섯째, 어류의 경우 항온동물인 포유류와는 달리 외부온도에 의해 체내온도가 결정되는 변온동물이므로 다양한 온도조절을 통해서 재조합 단백질 합성을 유도할 수 있다. 예를 들어 냉수성

어종의 조직을 생산시스템으로 이용하면 저온상태에서 재조합 단백질을 합성하거나 축적시킬 수 있다. 여섯째, 고등동물인 포유류에 비해 유전자변형과 이용에 관해 상대적으로 윤리적 논란이 적다는 장점이 있다. 마지막으로 유전공학 및 단백질공학을 통해서 목적물질의 구조와 기능을 인위적으로 조작할 수 있으며, 이를 통해 천연 생체로부터 단순 추출 및 이용하는 방식에서 불가능한 '다양한 유사 재조합 물질의 생합성'을 유도할 수 있다.

그러나 해양생물을 대상으로 한 유전자변형생물체의 개발은 그 경제적 파급효과와 기술적 중요성에도 불구하고 아직 전 세계적으로 완벽한 시험 성공사례가 없고 연구개발은 초기 연구단계인 개념 정립 단계에 머물고 있다. 또한 극히 소수의 어류를 제외한 많은 어종에서 아직까지 이들에 대한 생명현상 및 유전자 기능에 관한 정보 수집이 매우 빈약하기 때문에 생물반응기개발을 위한 유전자 소재의 이용이 극히 제한적이다. 아울러 생물 반응기 작동을 위한 유전자 발현 제어 시스템에 대한 연구 정보 역시 부족한 실정이다. 또한 대형 축산 동물에 비해 현존하는 대부분의 양식 어류의 성체 크기가 제한적이기 때문에 생산량이 역시 제한적일 수밖에 없는 요인이다. 그러나 최근 고속성장형질전환 어류가 개발됨으로써 이러한 문제점이 어느 정도 해결될 수 있으리라 판단된다. 인간과의 유연관계에

서 포유류보다 진화적으로 거리가 멀고, 포유류와는 달리 유즙 또는 뇨(urine) 등을 통하여 체외로 쉽게 생산물을 배출하지 못하기 때문에 외래 단백질의 순수 분리 단계 공정이 추가로 필요하며, 단백질 순수 분리에 관한 기술적 완성도 또한 낮은 상태이다.

## (2) 현재 연구개발 단계의 사례 및 가능성 분석

형질전환 어류를 생물반응기로 이용하고자 하는 연구에 대한 결과는 아직 캐나다의 한 연구진이 2000년 미국특허를 통해 소개한 인간 인슐린을 생산하는 틸라피아를 보고한 이래 극히 소수의 연구진들에 의해서 실험적인 시도들이 이루어지고 있으나 상용화 단계에 이른 예는 보고되지 않고 있다. Morita 등(2004)은 무지개송어의 수정란을 이용하여 금붕어 luteinizing hormone (g<sub>LH</sub>)을 생성한 연구결과를 보고하였다. 이들은 어류를 이용한 시스템이 유전자발현에 적은 비용이 소요되고 낮은 온도에서 재조합 단백질 생산할 수 있으며, 인위적으로 단백질을 조작할 수 있는 장점이 있음을 증명하였다. 이들의 연구는 최초로 어류가 유용물질 생산을 위한 생물반응기로서 충분한 개발 가능성을 제시해 주었다. 같은 해에 캐나다의 연구진이 틸라피아의 수정란에 틸라피아 인슐린유전자중 A chain영역의 일부를 제거한 후 인간 인슐린 유전자를 삽입하여 humanized 돌



연변이체형식의 재조합 인슐린 유전자(desThrB30)를 이식하여 형질전환체를 만든 후 F1세대의 Brockmann bodies에서 생성된 beta cell 및 serum에서 인간형태의 인슐린을 획득하는데 성공하였다(Bill et al., 2004). 이상의 연구결과들을 종합해 보면 재조합단백질 생성에 필요로 하는 어류의 가식부위는 단위체적당 포유동물에 비해 많고 생활사가 짧다(틸라피아의 경우; 6개월~12개월). 또한 틸라피아의 경우 Brockmann bodies를 수거하는데 필요한 경비는 FDA에 등록된 다른 동물들에 비해 100배 정도의 경비절감이 가능하다는 연구결과가 있다(Wright & Pohajdak, 2001). 결국 이러한 이점들은 향 후 어류를 이용한 생물반응기로서의 가능성을 제공해 줄 것이다.

상기 생물반응기 platform으로서 어류의 장점을 극대화시킬 경우 어류 생물반응기가 현재의 축산동물 생물반응기 기술 수준으로 도달하였을 때 다음과 같은 효과를 기대할 수 있다. 첫째, 개발 속도(speed)의 경우 어류는 포유류에 비해 형질전환체를 유도하기 용이할 뿐만 아니라 다수의 자손을 생산하므로 F0로부터 hemizygote 형질전환체를 동정할 수 있는 확률이 높고, 또한 이들로부터 처녀생식(induced parthenogenesis)등을 이용하여 단 1세대의 육종을 통해 모든 유전좌위(Loci)가 동형접합화(homozygous)된 형질전환 순계를 확보할 수 있을 뿐만 아니라, 나아가 순차적인 인공처녀생식 처리를 통해 동형접합

복제 계통(clonal population)을 대량생산할 수 있다는 장점이 있다. 또한 생물반응기로 활용함에 있어 포유류에 비해 음성피드백 조절이 어류가 낫다는 점을 고려시 효과적인 생물반응기 확보에 훨씬 유리하다고 기대된다. 따라서 '속도' 측면에서 어류는 포유류보다 유리함은 물론, 식물 형질전환 바이오파이오리액터에 견줄만한 장점이 있다고 판단된다.

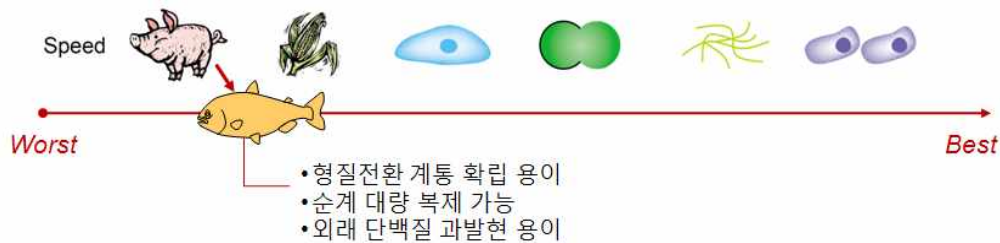


그림 16.

생물반응기 개발 시 개발 속도 측면에서의 형질전환 어류와 타 생물반응기 시스템과의 비교(Dyck et al., 2003에서 그림 인용)

둘째, 생물반응기 이용 '단가(cost)'의 경우 현재 포유류에서 얻어지는 외래 단백질 축적 및 분리 기술에 도달할 경우, 어류 시스템의 장점은 개발된 한 개체로부터 인공종묘생산을 통해 대량의 동일 유전형질을 갖는 형질전환 바이오파이오리액터 그룹을 만들 수 있다는 것이다. 이미 본 연구 용역에서 대상으로 하는 후보 어류 종들 중 일부는 인공종묘생산 및 고밀도 대량

양식기술들이 완전히 정착되어 있는 종들로서 목적 유전형과 표현을 획득한 생체(biomass)를 손쉽게 확보할 수 있으므로, 개체 단위의 생산이 이루어질 수 밖에 없는 포유류에 비해 유리한 장점을 보유하고 있다. 나아가 변온동물이자 하등 척추동물인 어류의 경우 외부 환경 인자의 조절을 통해 유전자 발현을 조절할 수 있는 가능성의 폭이 항온의 고등 포유류보다 훨씬 넓다는 점도 주목해야 한다. 즉 유전자 발현을 *in vivo* 상태에서 증가시킬 수 있는 다양한 환경 조절 조건을 개발할 수 있으며, 바이오리액터 어류의 대량 생산 시 단위 노력당 단가를 절감할 수 있는 다양한 육종기법(염색체 공학 및 단성집단 개발 등)의 접목이 가능하다.

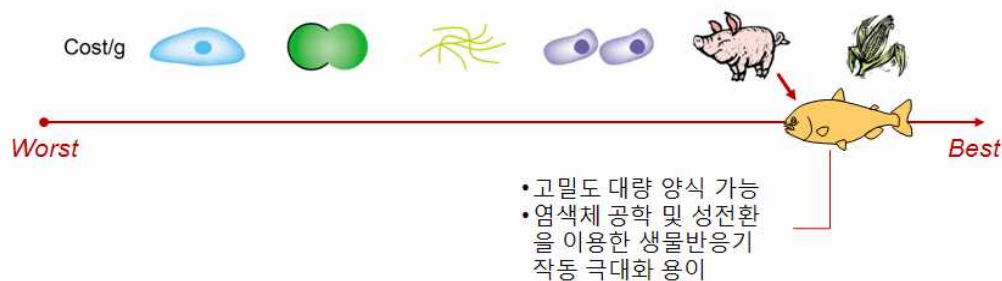


그림 17.

생물반응기 개발 시 단가 측면에서의 형질전환 어류와 타 생물반응기 시스템과의 비교(Dyck et al., 2003에서 그림 인용)

생체에서 생산된 외래 단백질의 post-translation modification의 측면에서는 유사한 기술 수준에 도달하였을 경우 어류와 포유류가 큰 차이를 나타내지 않을 것으로 예측된다. 현재 바이오파브릭을 이용함에 있어 가장 중요시되는 요인 중 하나인 외래 단백질의 활성 유지, 즉 적절한 glycosylation 등은 동물성 단백질(특히, 인체 질환 관련 단백질 등)을 여타 다른 분류군(미생물, 식물, 곰팡이 등)을 platform으로 사용하는데 주요 제한 요인으로 작용하고 있다. 그러나 어류는 척추동물로서, 이미 일부 유전자들의 경우 포유류와 비교 시 기능적, 구조적 synteny 및 conservation이 있음이 많은 선행 연구들을 통해 보고된 바 있으며, 일부 모델 어류등을 이용하여, 인체 단백질이 형질전환 어류에서 기능적으로 발현 가능성이 역시 보고되어 있다.



그림 18.

생물반응기 개발 시 산물의 활성 측면에서의 형질전환 어류와 타 생물반응기 시스템과의 비교(Dyck et al., 2003에서 그림 인용)

셋째, 생산된 bioreactor를 대량생산하고 'scale-up'시키는 것은 바이오리액터의 실용성 및 산업화의 성공 여부를 결정짓는 중요한 인자 중 하나이며, 또한 어류가 차세대 bioreactor platform으로서 중요시 되는 중요한 이유이기도 하다. 대부분의 중대형 어류는 성숙한 1마리의 암컷이 수만에서 수백만개의 알을 동시에 산란할 수 있기 때문에 개발된 단일 바이오리액터 개체로부터 집단을 대량생산하기가 매우 용이하며, 특히 앞서 언급한 바와 같이 순계 복제 계통집단들이 형성될 경우, group mating등을 통해서 수백만의 동일 유전형질을 보유한 바이오리액터 복제 집단을 생산할 수 있다. 따라서 암컷 1마리가 매우 제한적인 자손 생산 능력을 보유하는 포유류에 비해서 어류는 scale-up 측면에서 월등한 장점을 보유하고 있으며, LMO의 안전 사육시스템이 적절히 개발된다면 식물 바이오리액터 시스템과도 견줄 수 있는 수준에 도달할 수 있으리라 기대된다.

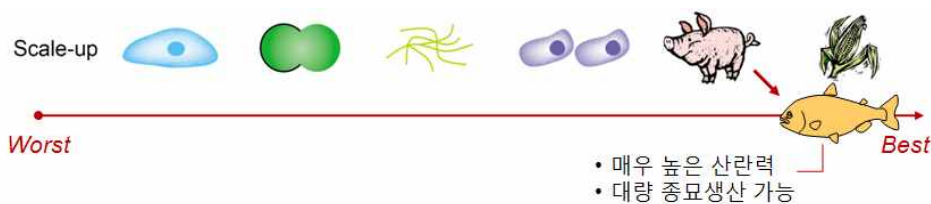


그림 19.

생물반응기 개발 시 대량생산 효율 측면에서의 형질전환 어류와 타 생물반응기 시스템과의 비교(Dyck et al., 2003에서 그림 인용)

마지막으로 윤리적 관점 및 바이오횜터 안전관리에 관한 사항으로서 이는 바이오횜터를 이용, 최종 산물의 확보와 실용화 단계에 매우 중요시되는 사항이다. 포유류의 경우 인간과 질병을 공유하는 인수 공통 질병원이 매우 많기 때문에(특히, 바이러스 질병원 등) 바이오횜터 동물을 이러한 질병원으로 예방하는데 막대한 비용과 고도의 주의가 필요함은 자명한 사실이며, 특히 최종 산물(분리된 의약 단백질)의 감염 유무를 검증 하는데에도 많은 노력이 필요하다. 그러나 어류의 경우 상대적으로 포유류에 비해 인간과의 질병원 공유 정도가 낮으며, 윤리적 문제에서도 상대적으로 유리한 점이 있다. 따라서 'regulatory' 측면에서 어류는 식물 수준에 근접한 위치에 도달할 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 이를 위해서는 이동성이 높은 형질전환 LMO 어류들의 적절한 생물학적 및 물리적 격리 시스템이 사전에 구축되어야 함은 물론이다.



그림 20.

생물반응기 개발 시 안전관리 및 윤리측면에서의 형질전환 어류와 타 생물반응기 시스템과의 비교(Dyck et al., 2003에서 그림 인용)

### (3) 형질전환 어류 생물반응기 개발 기본 전략

생물반응기로서 어류는 상기 많은 장점들을 보유하고 있지만 아직 일천한 연구개발 역사로 인해 이들의 장점을 가시화하기에는 많은 기술적 난제들이 있다. 많은 해결해야할 기술적 난제들 중 대표적인 것들로는 (1) 어류 유전자 발현 제어 시스템 자체에 대한 연구 정보가 매우 부족하고, 현재 형질전환 어류에서 사용하는 발현 체계만으로는 생물반응기를 효과적으로 작동시키기 어렵다는 점, (2) 소, 돼지 등 대동물 형태인 축산 생물반응기에 비하여, 현재 platform으로 사용가능한 양식어류들의 경우 성체 크기 제한이 있어, biomass 확보의 제한 사항에 대한 해결책이 필요하다는 점, (3) 현재 포유류에서는 개체를 죽이지 않고 재조합 단백질을 분리해내기 위해서 유즙(milk 등) 및 뇨(urine)를 사용하고 있으나, 어류의 경우 유즙이 없고, 또한 수중생활을 하는 어류의 생활 습성상 뇨를 수거하기가 매우 어렵다는 점, 그리고 (4) 아직 어류를 대상으로한 생물반응기 유사 형질전환체들의 연구개발 사례가 매우 적어, 형질전환 어류로부터 외래 단백질의 순수 분리 기술에 대한 경험이 매우 제한적이라는 점이다.



그림 21.

어류를 기반으로 한 생물반응기 개발 시 현재의 문제점 및  
해결을 위한 기본 방향

따라서 생물반응기로서 형질전환 어류 시스템을 이용하기 위해서는 상기 4종류의 주요 기술사항에 대한 문제점을 해결하기 위한 연구개발이 우선적으로 수행되어야함은 자명한 사실이며, 때문에 다양한 platform 연구들이 함께 진행되어야한다. 첫째, 어류 새로운 발현시스템을 개발하기 위해서는 조직특이적 유도발현 및 외래 유전자의 인위적 switching 등에 관한 기술이 정립되어야하고, 이는 대상 어류의 다양한 유전체 연구



와 유전자 발현 조절에 관한 다양한 biotic 및 abiotic factor들의 영향에 관한 연구가 이루어져야만 한다. 이를 통해 특정 사육 프로그램 및 생물 자극 프로그램을 도출함으로써 원하는 조직에 원하는 수준의 외래 단백질 발현을 유도할 수 있어야 한다. 둘째, 현실적으로 사용가능한 중대형 양식어류 역시 포유류에 비해서 개체크기가 크지 않으므로 dual transgenic 기법을 이용, giant 거대 어류를 1차 형질전환으로 확립하고, 이로부터 giant 어류로 하여금 2차 형질전환을 통해 생물반응기 기능을 수행케 하는 방법이 요구된다. 중대형 어류로서 양식기술이 완전 정착되어 있는 잉어 및 메기등을 성장호르몬 유전자 이식을 통해 거대 복제하는 방법을 고려해 볼 수 있으며, 또한 보다 대형크기인 철갑상어 종 역시 어류 생물반응기 후보 종으로서 그 가능성이 인정된다. 또한 최근 농수산식품부에서 완전양식기술 개발을 위해 추진 중인 참치와 같은 대형 어류 역시 종묘생산을 포함한 완전양식기술이 확립될 경우, 유용한 형질전환 platform으로 생각해 볼 수 있다. 그러나 철갑상어 및 참치의 경우, 앞서 언급한 바와 같이 유전자 이식 조작을 위한 유전자 발굴 연구, 유전체 연구 그리고 생물조작 조건이 사전에 확보되어야 하므로, 비교적 많은 선행연구와 투자가 이루어져야만 가능한 실정이다. 셋째, 어류는 포유류에서 일반적으로 사용하는 유즙 및 뇨를 단백질 분리 조직으로 사용할 수 없기 때문에 개체를 죽

이지 않고 사용할 수 있는 대체 조직으로서 난괴(egg mass)가 그 대상물로서 가능성을 타진 받고 있으며, 또한 포유류와는 달리 어류는 수많은 자손을 대량번식 시킬 수 있다는 점에서 근육 역시 생물반응기 생산 조직으로서 생각해볼 수 있다. 난괴, 즉 난황(yolk) 단백을 이용할 경우, 어체를 죽이지 않고 인공 산란유도를 통해 얻을 수 있으며, 특히 연중 다산란이 가능한 어류(틸라피아 등)의 경우 보다 효과적인 전략이 될 수 있다. 넷째, 외래 단백질 축적형 형질전환 모델이 거의 전무하기 때문에 단백질의 분리 정제가 가능한 수준의 형질전환 모델 어류들을 우선적으로 개발, 외래 단백질의 분리에 대한 경험을 시급히 축적할 필요성이 있다. 형질전환 기술이 확보된 어류종을 우선적으로 사용하여 근육, 난황 및 기타 여러 조직에서 외래 단백질을 축적할 수 있는 형질전환 계통들을 확보하고, 이로부터 다양한 분리 및 정제 전략을 수립, 실증적 실험결과들을 축적해나가야만 한다. 이에 상기 4가지 개발전략들을 유기적으로 연계함으로써, 거대 고속성장 형질전환 어류 platform을 구축하고, 이들에게 2차 형질전환을 통해 생물반응기 기능을 부여하며, 개발된 생물반응기의 분자육종 및 복제 집단을 육성하고, 이들로부터 최적 단백질 분리 정제 기법을 확립해나가야 할 것이다.

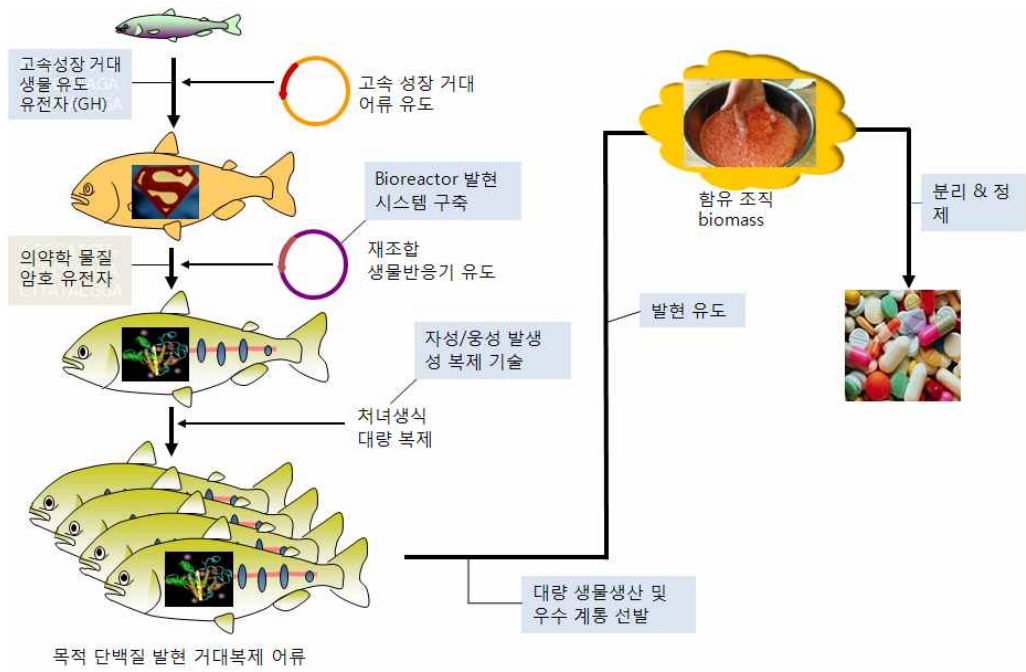


그림 22.

어류 생물반응기 개발을 위한 기본 전략

### III. 추진 계획(안) 마련

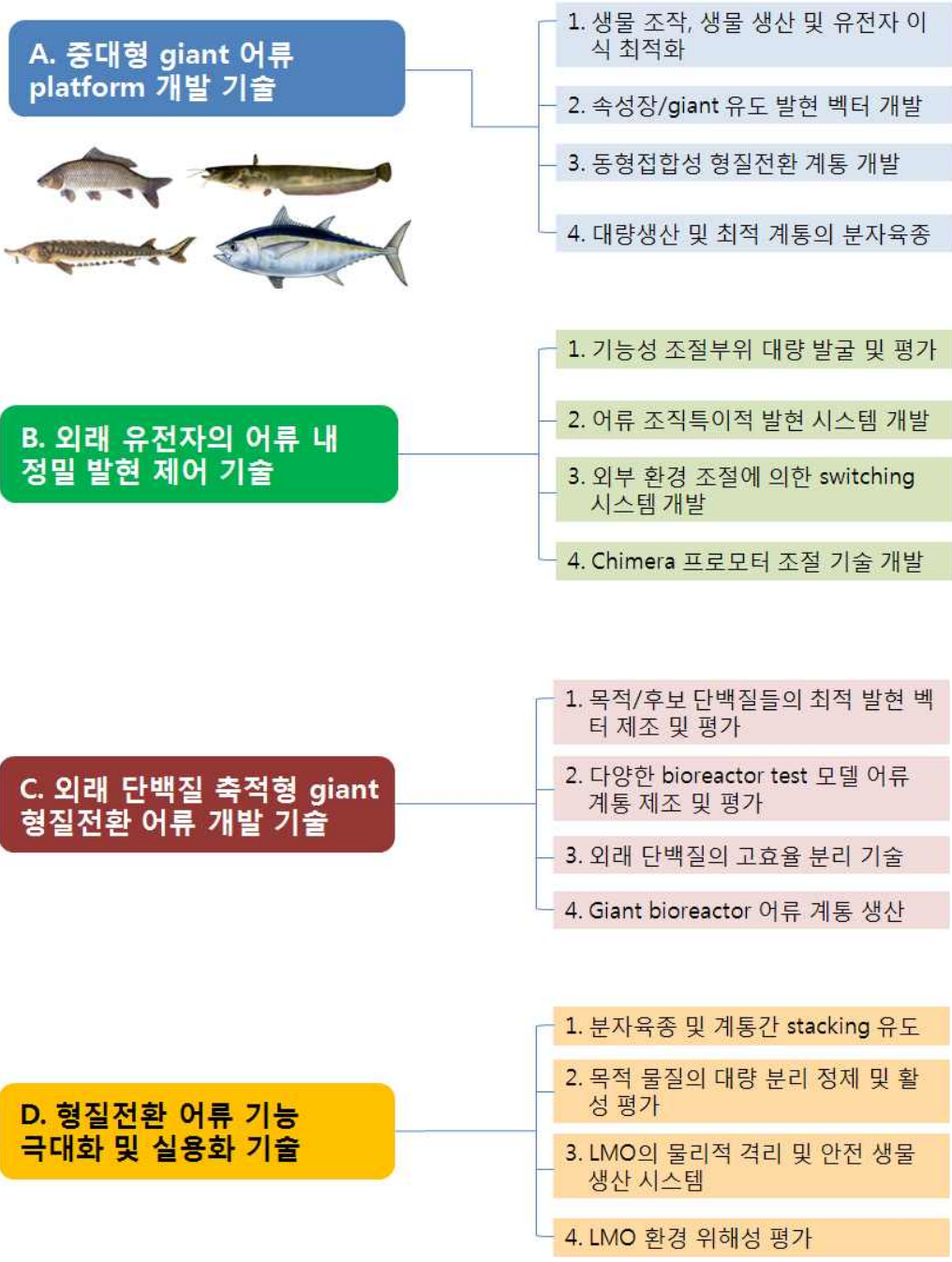
#### 1. 연구개발 로드맵

##### 1) 핵심 요소 기술군의 도출

- 어류를 현재 포유류 수준의 생물반응기로서 이용하기 위해서는 종래의 기술적 한계를 극복할 수 있는 새로운 핵심 기술로서 4개의 중점기술분야 및 16개의 세부 요소 기술들을 도출
- 기술군은 첫째 중대형 giant 어류 platform 개발 기술, 둘째 외래 유전자의 어류내 정밀 발현 제어 기술, 셋째, 외래 단백질 축적형 giant 형질전환 어류 개발 기술 그리고 넷째, 형질전환 어류 기능 극대화 및 실용화 기술군으로 대별됨
- 제1기술군으로서 “중대형 giant 어류 platform 개발 기술”은 목적어류의 생물 조작, giant 어류 유도 벡터 개발, 그리고 platform으로 활용하기 위한 최적 계통의 확립 및 육종을 중점적으로 수행함
- 제2기술군으로서 “외래 유전자의 어류 내 정밀 발현 제어 기술”은 생물반응기 작동을 위해 요구되는 유전자의 인위적 발현 조절 및 이를 기반으로 한 신규 발현벡터 시스템을 확보함
- 제3기술군으로서 “외래 단백질 축적형 giant 형질전환

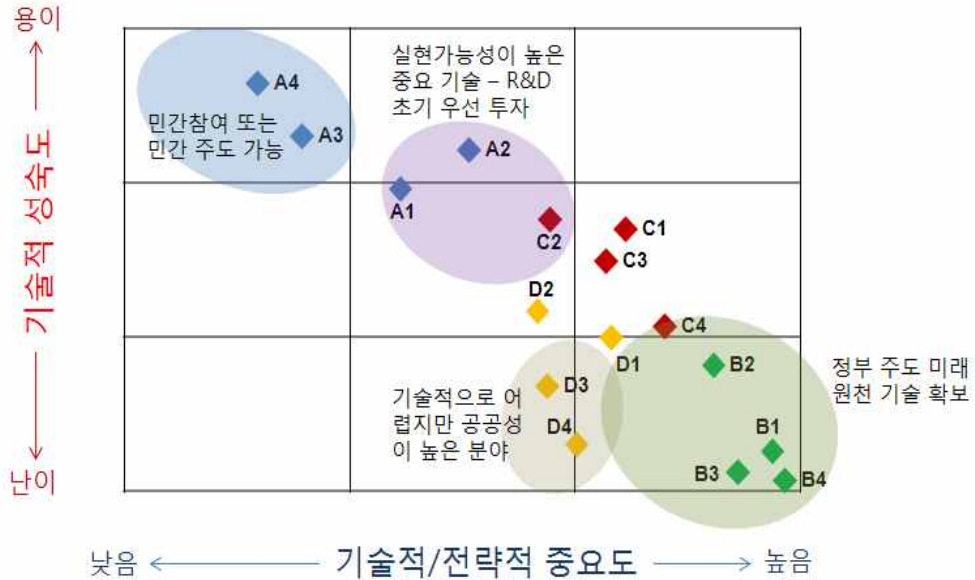
어류 개발”에서는 dual transgenic을 통해 상기 확보된 giant 어류 plasmid (제1기술군)에 생물반응기 발현 벡터를 이식(제2기술군)함으로써 어류 생물반응기를 가시화 시키는 연구를 수행함

- 제4기술군인 “형질전환 어류 기능 극대화 및 실용화 기술”에서는 확보한 생물반응기의 기능성을 극대화시키고 이와 함께 실용화를 위한 바이오 안전성을 확보하는 것을 목적으로 함



## 2) 요소 기술들의 portfolio 분석

- 4개의 기술군으로부터 도출된 16개 세부 기술들에 대하여 portfolio 분석을 실시함으로써 개발 전략의 기본 방향을 수립하고 이를 기반으로 매크로 및 마이크로 로드맵 작성에 활용함
- Portfolio 분석은 기술적 성숙도(성공 가능성)와 기술적/전략적 중요도(기술의 파급효과 및 목적 달성을 위한 중요도)를 두 개의 축으로 하여 16개 기술군을 분석함
- 성공가능성(즉, 기술적 성숙도) 정도에 의거 정부/민간 참여 정도, 그리고 실현 가능성에 따라 우선적인 초기 R&D 투자가 이루어 질수 있는 부분, 그리고 기술적으로는 어려우나 공공기반 성격이 강하여 정부 주도로 원천 및 미래 기술을 확보해나가야 하는 부분 등으로 clustering을 수행하였으며, 그 분석 결과는 아래와 같음



기술 종류	
<b>A1</b> 생물 조작/생산 및 유전자도입	<b>B1</b> 기능성 조절부위 대량 발굴 및 평가
<b>A2</b> 속성장/giant 유도 발현 벡터	<b>B2</b> 어류 조직특이적 발현 시스템
<b>A3</b> 동형접합성 형질전환 계통	<b>B3</b> 외래 발현 switching 시스템
<b>A4</b> 대량생산 및 최적 계통의 분자육종	<b>B4</b> Chimera 프로모터 조절 기술
<b>C1</b> 최적 발현 벡터	<b>D1</b> 분자육종 및 계통간 stacking
<b>C2</b> bioreactor test 모델 어류	<b>D2</b> 대량 분리 정제 및 활성 평가
<b>C3</b> 외래 단백질의 고효율 분리	<b>D3</b> LMO의 물리적 격리 및 안전 시설
<b>C4</b> Giant bioreactor 어류	<b>D4</b> LMO 환경 위해성 평가



- Portfolio 분석에 의해서 생물의 대량생산/분자유종, 그리고 계통 개발(A3 및 A4)은 이미 대상 어류 종에 따라 기술적 완성도가 높은 부분이며, 따라서 형질전환체가 개발된 후 민간과의 공동연구가 가능한 부분임
- 반면, 외래 유전자의 정밀 발현 및 새로운 형질전환 모델을 개발하는 기술들(B1 ~ B4)은 아직 전세계적으로 매우 초기 단계에 있으며, 기술의 성숙도가 낮은 분야이지만 목표 달성을 위해서는 가장 중요시되는 기술들이므로 정부주도에 의해 원천 기술을 확보해나가야 할 부분임
- 또한 LMO의 바이오 안전성 확보분야(D3 및 D4 등)는 개발된 유전자변형생물체의 실용화를 위해서 필수적인 선결 조건이나 아직 기술적 완성도가 낮은 상태이고, 또한 본 해당 분야는 국가의 생태계 보전과 직결되므로 공공기반 형태의 추진이 필요함

3) 마크로 로드맵



- 4개의 핵심 기술군을 대상으로 2011년부터 10년간 2020년까지 R&D를 수행하지만, 기술의 필요 우선 순위에 의거하여 platform 개발 및 발현 제어 기술 개발은 프로젝트 개시점부터 각각 5년 및 7년간의 연구 개발을 수행함으로써 생물반응기를 가시화시키기 위한 기반기술을 정립하도록 함
- 상기 기반 기술 정립을 바탕으로 2013년부터 생물반응기 giant 어류를 실현시키기 위한 연구개발을 6-7년간 실시함으로써 기반기술 확립 분야와 4-5년 동안의 연계를 실시한 후, 2년간의 독자 진행을 통해 최종 완성도 높은 어류 생물반응기를 개발함

- 어류 생물반응기 개발이 진행됨에 따라 이들에 대한 기능성 극대화 및 실용화 기술을 2016년부터 준비하고, 이와 함께 바이오 안전성 확보를 위한 LMO 격리 시설 및 위해성 평가 기술 개발을 수행함. 단 LMO 환경 위해성 평가기술은 평가기관 등을 중심으로 수행토록 하고, 최종 산물의 안전성이 담보되는 시점까지 지속할 필요성 있음

4) 마이크로 로드맵

가) 제1기술군



- 생물 조작/생산 및 유전자 이식 최적화
  - : 목적 어류 종의 배우자, 접합자 조작의 최적 조건 확립
  - : 유전자 도입 조건의 최적화 및 형질전환 기반 정립
- 속성장 giant 유도 발현 벡터 개발
  - : 고속 성장 유도형 유전자 소재 발굴 및 발현 벡터 개발
  - : 거대 어류 유도형 유전자 소재 발굴 및 발현 벡터 개발
- 형질전환 동형접합성 giant 어류 개발
  - : 염색체 공학 및 교배 육종을 통한 동형접합 계통 확립
- 대량 생산 및 최적 계통 선발
  - : 안전 생산 조건 확립 및 안정 germ-line 선발

나) 제2기술군



- 기능성 유전자 조절 부위 대량 발굴 및 평가
  - : Genome으로부터 유용 프로모터 소재의 대량 발굴
  - : 프로모터의 발현 유도 기능의 평가
- 어류 조직 특이적 발현 시스템 개발
  - : 외래 단백질의 난황 축적형 발현 시스템 개발
  - : 기타 조직특이적 외래 단백질 축적 시스템 개발
- 외부 환경 조절에 의한 발현 switching 시스템 개발
  - : 물리적 자극 조건에 의한 발현 switching 시스템 개발
  - : 화학적 자극 조건에 의한 발현 switching 시스템 개발
- Chimera 프로모터 조절 기술 개발
  - : 융합 프로모터 및 프로모터의 인위적 조작 최적화

다) 제3기술군



- 목적 단백질 최적 발현 벡터 개발
  - : 목적 식의약 단백질 발현 벡터 구축 및 최적화
- 다양한 bioreactor test 모델 개발 및 평가
  - : 실험 모델 어류를 이용한 bioreactor 표현형 확보
  - : Bioreactor의 작동 및 기능 평가
- 외래 단백질 고효율 분리 기술 개발
  - : 난괴에서의 외래 단백질 분리 조건의 최적화
  - : 근육 및 기타 조직에서의 외래 단백질 분리 최적화
- Giant bioreactor 어류 계통 생산
  - : Dual transgenic 어류 생산 및 germ-line 확보
  - : 계통 생산, 계통별 기능적 특징 평가

라) 제4기술군



- 형질전환 분자유종 및 계통간 stacking
  - : 서로 다른 형질전환유전자 copy/locus 보유 계통간의 교배 및 stacking event 유도
  - : 최적 계통의 선발 평가
- 목적 물질의 대량 분리 정제 및 활성화 평가
  - : 물질 분리 효율 및 활성화의 최적화, 경제성 평가
- LMO 물리적 격리 및 안전생물생산 시스템 개발
  - : 안전 격리 사육 시스템 및 장치 개발
  - : Terminator 시스템을 이용한 위해성 저감 기술 개발
- LMO 환경 위해성 평가
  - : LMO 법 및 통합고시에 의한 위해성 평가

## 2. 연구개발 투자계획(안) 및 중장기 발전 제언

### 1) 예산 투자 계획(안)

기 간

- 2011년 ~ 2020년 (10년간)

예 산(안)

- 총액: 56,600백만원

- 국고: 48,400백만원 (85.5%)

- 민간: 8,200백만원 (14.5%)

연도별 투자 계획(안)

(단위: 억원)

증 과 제	재원	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	계
Giant 형질전환 어류 platform 개발	국고	12	15	20	15	10	-	-	-	-	-	72
	민간	-	-	-	3	3	-	-	-	-	-	6
	소계	12	15	20	18	13	-	-	-	-	-	78
외래 유전자의 어류 내 정밀 발현 제어 기술	국고	16	20	20	25	25	20	15	-	-	-	141
	민간	-	-	-	-	3	3	3	-	-	-	9
	소계	16	20	20	25	28	23	18	-	-	-	150
외래 단백질 축적 형 giant 형질전환 어류 개발	국고	-	-	15	18	24	27	30	20	15	-	149
	민간	-	-	-	-	2	3	5	7	10	-	27
	소계	-	-	15	18	26	30	35	27	25	-	176
형질전환 어류 기능성 극대화 및 실용화 기술	국고						15	22	25	30	30	122
	민간						2	5	8	10	15	40
	소계						17	27	33	40	45	162
합 계	국고	28	35	55	58	59	62	67	45	45	30	484
	민간	0	0	0	3	8	8	13	15	20	15	82
	계	28	35	55	61	67	70	80	60	65	45	566



## 2) 사업 추진 방식

### □ 연구단 구성

- (가칭) 형질전환어류연구단
- 산학연관 전문가들로 구성된 연구단 구성

### □ 운영위원회 및 자문위원회

- 기획, 조정 및 자체평가 시스템 구축
- LMO 안전관리를 위한 NGO 및 심사평가 전문가 참여

### □ 연구 지원 방식

- **기획 연구:** 연구개발비의 70%는 연구단 기획연구로 수행(※연구단의 로드맵에 의해 수행)
- **소규모 그룹 공모 연구:** 연구개발비의 20%는 관련 연구주제에 관한 연관 기술군의 확대를 위해 소규모 그룹공동연구(2-3 연구실)로 수행(※중과제 단위의 제안내용에 대한 소규모 연구그룹의 공모 방식)
- **자유공모 연구:** 연구개발비의 10%는 창의적 아이디어를 지원하기 위한 자유공모과제로 수행(※단위 연구실들의 자체 아이디어 공모에 대한 지원 방식)

□ 사업 추진 일정

- 2010. 1 ~ 2010. 12.

: 예산 확보, 세부기획 조정(우선 순위 프로젝트 개발)

- 2011. 1 ~ 2011. 2.

: 연구단 공모 및 선정 평가

- 2011. 3.

: 연구개발 착수

## 3) 기타 중장기 발전계획(안) 제언

## □ 수산용 LMO 실용화를 위한 평가·심사체계의 정립 및 인프라 확충

- 종래 해양수산부에서 2008년 2월, 중앙정부부처 조직 개편에 의해 해양과 수산의 기능이 각각 국토해양부 및 농림수산식품부로 구분되었으며, 이에 국가 LMO 종합안전관리계획(5개년; 2008. 12. 1차 계획 수립)에 의거 수산 LMO의 안전관리는 농림수산식품부 소관 임
- 그러나 현재 농업용 LMO 등 종래 농림수산식품부 (구 농림부) 소관의 LMO에 비해 새로이 편입된 수산 LMO의 안전관리 인프라가 아직 미흡한 실정임
- 양식어류를 이용 형질전환체를 개발, 이용하기 위해서는 안전성 평가가 반드시 담보되어야 하므로, 본 용역 연구에서 제안된 R&D 목표를 달성하기 위해서는 반드시 농림수산식품부내 수산용 LMO와 관련한 평가기관의 지정과 심사위원회의 구성 등 요구되는 행정 지원이 필요함
- 특히 LMO 법에 의거, LMO의 연구개발을 위해서는 소관 부처 및 교육과학기술부(대학의 경우)로부터 연구개발 착수서부터 안전성 확보에 대한 승인 또는 심

사를 받아야 하므로 본 투자계획(안)을 추진하기 위해서는 상기 수산용 LMO 평가 심사체계의 명확한 정립이 우선되어야 함

- 또한 본 투자계획(안)에 의해 개발된 생물반응기 LMO를 빠른 시간 내 실용화하기 위해서는 안전성 심사의 통과를 위해서 다양한 위해성 평가기술이 사전에 확보되어 있어야 하지만, 현재 농림수산식품부내 수산용 LMO 평가기관은 단 1곳도 지정되어 있지 않은 상태임. 따라서 농림수산식품부에서는 평가기관을 빠른 시일 내 지정하고, 지정된 평가기관으로 하여금 해당 LMO 들에 대한 평가 및 안전성 확보 기술들을 확보하도록 지원할 필요 있음

□ 전문 연구인력 중장기 확보 및 우수연구그룹 육성

- 본 용역에서 제안하는 “형질전환 어류 생물반응기 개발 및 이용”은 다양한 학문 영역이 연계한 융합 학문 형태임
- 즉 실용화를 위한 목표 달성을 위해서는 분자생물학, 어류학, 양식학, 의약학, 사회과학(LMO법), 유전육종학, 시스템공학(안전시설 설계), 생태학(환경위해성평가) 등이 유기적으로 연계되어 그룹 연구가 이루어져

야 함

- 이를 위해서는 다양한 관련 학문영역에서 본 연구개발의 목적에 맞게 많은 젊은 과학자(대학원생, 연구생, 학부생 등)들이 양성되어야 하며, 이는 단위 연구실에서 산발적인 교육 형태로는 단기간 내 그 효과를 기대하기 어려움
- 따라서 연구단내 R&D를 중추적으로 담당할 젊은 미래 과학자들을 지속적으로 육성하기 위한 지원이 필요함은 물론, 다양한 분야의 융합을 통한 시너지 창출을 위해서는 우수연구그룹들을 하나의 연구센터 등으로 지원하는 방식을 고려해볼 필요 있음

#### IV. 참고문헌

- Amsterdam, A. & Becker, T. S. (2005). Transgenes as screening tools to probe and manipulate the zebrafish genome. *Developmental Dynamics* **234**, 255-268.
- Arai, K. (2001). Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Aquaculture* **197**, 205-228.
- Arenal, A., Pimentel, R., Garcia, C., Pimentel, E. & Alestrom, P. (2004). The SV40 T antigen nuclear localization sequence enhances nuclear import of vector DNA in embryos of a crustacean (*Litopenaeus schmitti*). *Gene* **337**, 71-77.
- Arezzo F. (1989). Sea urchin sperm as vector for foreign genetic transformation. *Cell Biology International Reports* **13**, 391-404.
- Bill, P., Marc, M., Olga, H., Michael, J. C., Clyton, L. D. & Wright, J. R. Jr (2004). Production of transgenic Tilapia with Brockmann bodies secreting [desThrB30] human insulin. *Transgenic Research* **13**, 313-323.
- Blechinger, S. R., Warren, Jr, J. T., Kuwada, J. Y. & Krone, P. H. (2002). Developmental toxicology of cadmium in

- living embryos of a stable transgenic zebrafish line. *Environmental Health Perspectives* **110**, 1041-1046.
- Cadoret, J. P., Boulo, V., Gendreau, S. & Mialhe, E. (1997). Promoters from *Drosophila* heat shock protein and cytomegalovirus drive transient expression of luciferase introduced by particle bombardment into embryos of the oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Biotechnology* **56**, 183-189.
- Cheng, C.-A., Lu, K.-L., Lau, E.-L., Yang, T.-Y., Lee, C.-Y., Wu, J.-L. & Chang, C.-Y. (2002). Growth promotion in Ayu (*Plecoglossus altivelis*) by gene transfer of the rainbow trout growth hormone gene. *Zoological Studies* **41**, 303-310.
- Chunguang, M., Lianchun F., Rosemaie, G., Niels, B. & Paul C. (2001). Production of zebrafish germ-line chimeras from embryo cell cultures. *Proceedings of the National Academy Science USA* **5**, 2461-2466.
- Choi, J., Lim, H., Nam, D. K., Kim, H. S., Cho, D. Y., Yi, J. W. & Kim, H. C. (2001). Expression of thymidylate synthase in gastric cancer patients treated with 5-fluorouracil and doxorubicin-based adjuvant

- chemotherapy after curative resection. *British Journal of Cancer* **84**, 186-192.
- Chourrout, D., Chevassus, B., Krieg, F., Happe, A., Burger, G., Renard, P. (1986). Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females – potential of tetraploid fish. *Theoretical and Applied Genetics* **72**, 193 - 206.
- Cook, J. T., McNiven, M. A., Richardson, G. F. & Sutterlin, A. M. (2000). Growth rate, body composition and feed digestibility/conversion of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmosalar*). *Aquaculture* **188**, 15 - 32.
- Devlin, R. H., Biagi, C. A. & Yesaki, T. Y. (2004a). Growth, viability and genetic characteristics of GH transgenic coho salmon strains. *Aquaculture* **236**, 607 - 632.
- Devlin, R. H., Yesaki, T. Y., Biagi, C. A., Donaldson, E. M., Swanson, P. & Chan, W.-K. (1994). Extraordinary salmon growth. *Nature* **371**, 209-210.
- Devlin, R. H., Yesaki, Y. T., Donaldson, E. M., Du, S. J. & Hew, C. L. (1995). Production of germline transgenic pacific salmonids with dramatically increased growth



- performance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **52**, 1376-1384.
- Du, S. J., Gong, Z., Fletcher, G. L., Shears, M. A., King, M. J., Idler, D. R. & Hew, C. L. (1992). Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an "all-fish" chimeric growth hormone gene construct. *BioTechnology* **10**, 179-187.
- Dunham, R. A., Warr, G., Nichols, A., Duncan, P. L., Argue, B., Middleton, D. & Liu, Z. (2002). Enhanced bacterial disease resistance of transgenic channel catfish, *Ictalurus punctatus*, possessing cecropin genes. *Marine Biotechnology* **4**, 338-344.
- Dyck, K. M., Lacroix, D., Pothier, F. & Sirard M. A. (2003). Making recombinant proteins in animals-different systems, different applications. *TRENDS in Biotechnology* **21**, 394-399.
- Fletcher, G. L., Davies, P. L. & Hew, C. L. (1992). Genetic engineering of freeze-resistant Atlantic salmon. In: Hew, C. L. & Fletcher, G. L. (eds) *Transgenic Fish*. World Scientific, London, UK, pp.190-208.
- Fu, C., Hu, W., Wang, Y. & Zhu, Z. (2005). Developments in

- transgenic fish in the People's Republic of China. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties* **24**, 299-307.
- Gendreau, S., Lardans, V., Cadoret, J. P. & Miahle, E. (1995). Transient expression of luciferase reporter gene after biolistic introduction into *Artemia franciscana* (Crustacea) embryos. *Aquaculture* **133**, 199-205.
- Gordon, J. W., Scangos, G. A., Plotkin, D. J., Barbosa, J. A. & Ruddle, R. H. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **77**, 380-384.
- Hackett, P. B. & Alvarez, M. C. (2000). The molecular genetics of transgenic fish. In: *Recent Advances in Marine Biotechnology, Volume 4*. (Fingerman, M. & Nagabhushanam, R., eds.) pp. 77 - 145. Enfield, New Hampshire, U.S.A.: Science Publishers Inc.
- Hansen, E., Fernandes, K., Goldspink, G., Butterworth, P., Umeda, P. K. & Chang, K. C. (1991). Strong expression of foreign genes following direct injection into fish muscle. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **290**, 73 - 76.

- Haq, T. A., Mason, H. S., Clements, J. D. & Arntzen C. J. (1995). Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268, 714-716.
- Harper, G. S., Brownlee, A., Hall, T. E., Seymour, R., Lyons, R. & Ledwith, P. (2003). Global progress toward transgenic food animals: a survey of publicly available information. In: *Global Research and Development Targeting Transgenic Food Animals*. CSIRO Livestock Industries, Queensland, Australia.
- Hernandez, O., Guillen, I., Estrada, M. P., Carbrera, E., Pimentel, R., Pina, J. C., Abad, Z., Sanchez, V., Hidalgo, Y., Martinez, R., Lleonart, R. & de la Fuente, J. (1997). Characterization of transgenic tilapia lines with different ectopic expression of tilapia growth hormone. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 6, 364-275.
- Hew, C. L., Fletcher, G. L. & Davies, P. L. (1995). Transgenic salmon: Tailoring the genome for food production. *Journal of Fish Biology* 47,1-19.
- Hiatt, A. C., Cafferky, R. & Bowdish K. (1989). Production of

- antibodies in plants. *Nature* **342**, 76-78.
- Holmes, R. (1996). Blue revolutionaries. *New Scientist* **152**, 32-36.
- Hong, Y., Chen, S. & Scharl, M. (2000). Embryonic stem cells in fish: current status and perspectives. *Fish Physiology and Biochemistry* **22**, 165-170.
- Hu, W., Yu, D. H., Wang, Y. P., Wu, K. C. & Zhu, Z. Y. (2000). Electroporation of sperm to introduce foreign DNA into the genome of *Pinctada maxima* (Jameson). *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* **16**, 165-168.
- Ivics, Z., Izsvak, Zs. & Hackett, P. B. (1993). Enhanced incorporation of transgenic DNA into zebrafish chromosomes by a retroviral integration protein. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **2**, 162-173.
- Keizaburo, M., Johji, M. & Nozomu, I. (2005). Transgenic mollusk and method for producing the same. US Patent (publication #2005198697). Available at *European Patent Office website* <http://ep.espacenet.com/>.
- Kim, D. S., Cho, H. J., Park, I. S., Choi, G. C. & Nam, Y. K. (2001). Cytogenetic traits and gonad development of induced triploidy in far eastern catfish, *Silurus asotus*.

- Korean Journal of Genetics* **23**, 55-62.
- Kinoshita, M., Toyohara, H., Sakaguchi, M., Inoue, K., Yamashita, S., Satake, M., Wakamatsu, Y. & Ozato, K. (1996). A stable line of transgenic medaka (*Oryzias latipes*) carrying the CAT gene. *Aquaculture* **143**, 267-676.
- Krasnov, A., Agren J.J., Pitkanen T.I. & Molsa, H. (1999). Transfer of growth hormone (GH) transgenes into Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) II. Nutrient partitioning in rapidly growing fish. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* **15**, 99-105.
- Kurauchi, K., Hirata, T. & Kinoshita M. (2008). Characteristics of ChgH-GFP transgenic medaka lines, an in vivo estrogenic compound detection system. *Marine Pollution Bulletin* **57**, 441-444.
- Lavitrano M., Camaioni A., Fazio V. M., Dolci S., Farace M. G. & Spadafora C. (1989). Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell* **57**, 717-723.
- Lee, K. Y., Huang, H, Yang, Z. & Lin, S. (2002). Cloned zebrafish by nuclear transfer from long-term-cultured

- cells. *Nature Biotechnology* **20**, 795-799.
- Li, S. S. & Tsai, H. J. (2000). Transfer of foreign gene to giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) by spermatophore microinjection. *Molecular Reproduction and Development* **56**, 149-154.
- Li, H. Y., Ramalingam, S. & Chye, M. L. (2006). Accumulation of recombinant SARS-coV spike protein in plant cytosol and chloroplasts indicate potential for development of plant-derived oral vaccines. *Experimental Biology and Medicine* **231**, 1346-1352.
- Lillico, S. G., McGrew, M., Sherman A. & Sang, H. M. (2005). Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs. *Drug Discovery Today* **10**, 191-196.
- Lu, J. K., Chen, T. T., Allen, S. K., Matsubara, T. & Burns, J. C. (1996). Production of transgenic dwarf surfclams, *Mulinia lateralis*, with pantropic retroviral vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**, 3482-3486.
- Maclean, N. & Talwar, S. (1984). Injection of cloned genes into rainbow trout eggs. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **82**, 187.

- Martinez, R., Estrada, M. P., Berlanga, J., Guillen, J., Hernandez, O., Cabrera, E., Pimentel, R., Morales, R., Herrera, F., Morales, A., Pina, J. C., Abad, Z., Sanchez, V., Melamed, P., Lleonart, R. & de la Fuente, J. (1996). Growth enhancement in transgenic tilapia by ectopic expression of tilapia growth hormone. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **5**, 62-70.
- Martinez, R., Juncal, J., Zaldivar, C., Arenal, A., Guillen, I., Morera, V., Carrillo, O., Estrada, M., Morales, A. & Estrada, M. P. (2000). Growth efficiency in transgenic tilapia (*Oreochromis* sp.) carrying a single copy of an homologous cDNA growth hormone. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **267**, 466-472.
- Macleon, N., Rahman, M. A., Sohm, F., Hwang, G., Iyengar, A., Ayad, H., Smith, A. & Farahmand, H. (2002). Transgenic tilapia and the tilapia genome. *Gene* **295**, 265-277.
- Nam, Y. K., Choi, G. C., Park, D. J. & Kim D. S. (2001a). Survival and growth of induced tetraploid mud loach. *Aquaculture International* **9**, 61-71.
- Nam, Y. K., Cho, H. J., Cho, Y. S., Noh, J. K., Kim, C. G. &

- Kim, D. S. (2001b). Accelerated growth, gigantism and likely sterility in autotransgenic triploid mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Journal of World Aquaculture Society* **32**, 353-363.
- Nam, Y. K., Cho, Y. S. & Kim, D. S. (2000). Isogenic transgenic homozygous fish induced by artificial parthenogenesis. *Transgenic Research* **9**, 463-469.
- Nam, Y. K., Cho, Y. S., Cho, H. J. & Kim, D. S. (2002). Accelerated growth performance and stable germ-line transmission in androgenetically derived homozygous transgenic mud loach, *Misgurnus mizolepis*. *Aquaculture* **209**, 257-270.
- Nam, Y. K., Noh, C. H. & Kim, D. S. (1999). Transmission and expression of an integrated reporter construct in three generations of transgenic mud loach (*Misgurnus mizolepis*). *Aquaculture* **172**, 229-245.
- Nam, Y. K., Noh, J. K., Cho, Y. S., Cho, H. J., Cho, K. N., Kim, C. G. & Kim, D. S. (2001c). Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Transgenic Research* **10**, 353-362.



- Nam, Y. K., Maclean, N., Hwang, G. & Kim, D. S. (2008). Autotransgenic and allotransgenic manipulation of growth traits in fish for aquaculture: a review. *Journal of fish biology* **72**, 1-26.
- Nam, Y. K., Park, I. S. & Kim, D. S. (2004). Triploid hybridization of fast-growing transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis* male to cyprinid loach *Misgurnus anguillicaudatus* female: the first performance study on growth and reproduction of transgenic polyploidhybrid fish. *Aquaculture* **231**, 559-572.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y. & Hofschneider, P. H. (1982). Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* **1**, 941 - 945.
- Palmiter, R. D., Brinster, R. L., Hammer, R. E., Trumbauer, M. E., Rosenfeld, M. G., Birnberg, N. C. & Evans, R. M. (1982). Dramatic growth of mice that develop from eggs micro-injected with metallothionein-growth hormone fusion gene. *Nature* **300**, 611-615.
- Pandian, T. J. & Venugopal, T. (2005). Contribution to transgenesis in Indian major carp *Labeo rohita*. In *Fish*

- Genetics and Aquaculture Biotechnology* (Pandian, T. J., Strussmann, C. A. & Marian, M. P., eds.), pp. 1-20. New Delhi, India: Oxford and IBH Publishing Co.
- Penman, D. J., Iyengar, A., Beeching A. J., Rahman, A., Sulaiman, Z. & Maclean, N. (1991). Patterns of transgene inheritance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Reproduction and Development* **30**, 201-206.
- Pervin, B. & Emilio, R. C. (2008). Plant Molecular Farming: Opportunities and Challenges. *Critical Reviews in Biotechnology* **28**, 153-172.
- Pitkanen, T. I., Krasnov, A., Teerijoki, H. & Molsa, H. (1999). Transfer of growth hormone (GH) transgenes into Arctic charr (*Salvelinus alpinus L.*)I. Growth response to various GH constructs. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* **15**, 91 - 98.
- Powers, D. A., Hereford, L. M., & Gomez-Chiarri, M. (1997). Isolation and characterization of an actin gene from abalone. US Patent (publication # US5675061). Available at European Patent Office website (<http://ep.espacenet.com/>).

- Powers, D. A., Kirby, V. L., Cole, T. & Hereford, L. (1995). Electroporation as an effective means of introducing DNA into abalone (*Haliotis rufescens*) embryos. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **4**, 369-75.
- Rahman, M. A. & Maclean, N. (1999). Growth performance of transgenic tilapia containing an exogenous piscine growth hormone gene. *Aquaculture* **173**, 333-346.
- Rahman, M. A., Mak, R., Ayad, H., Smith, A. & Maclean, N. (1998). Expression of a novel growth hormone gene results in growth enhancement in transgenic tilapia. *Transgenic Research* **7**, 357-369.
- Rahman, M. A., Ronyai, A., Engidaw, B. Z., Jauncey, K., Hwang, G.-L., Smith, A., Roderick, E., Penman, D., Varadi, L. & Maclean, N. (2001). Growth and nutritional trials on transgenic Niletilapia containing an exogenous fish growth hormone gene. *Journal of Fish Biology* **59**, 62-78.
- Razak, S. A., Hwang, G. L., Rahman, M. A. & Maclean, N. (1999). Growth performance and gonadal development of growth enhanced transgenic tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) following heat-shock-induced triploidy.

- Marine Biotechnology* **1**, 533 - 544.
- Rocha, A., Ruiz, S., Estepa, A. & Coll, J. M. (2004). Application of inducible and targeted gene strategies to produce transgenic fish: a review. *Marine Biotechnology* **6**, 118-127.
- Salam, A. MD., Sawada, T., Ohya T. Katuyuki, N. & Hayashi, S. (2008). Detection of environmental estrogenicity using transgenic medaka hatchlings (*Oryzias latipes*) expressing the GFP-tagged choriogenin L Gene. *Journal of Environmental Science and Health* **43**, 272-277.
- Shchelkunov, S. N., Salyaev, R. K., Pozdnyakov, S. G., Rekoslavskaya, N. I., Nesterov, A. E., Ryzhova, T. S., Sumtsova, V. M., Pakova, N. V., Mishutina, U. O., Kopytina, T. V. & Hammond, R. W. (2006). Immunogenicity of a novel, polyvalent, plant-based oral vaccine against hepatitis B and human immunodeficiency viruses. *Biotechnology Letters* **28**, 959-967.
- Sheela, S. G., Pandian, T. J., Mathavan, S. (1999). Electroporatic transfer, stable integration, and

- transmission of pZp beta ypGH and pZp beta rtGH in Indian catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Aquaculture Research* **30**, 233-248.
- Sun, S. S. M., Sun, P. S. & Arakaki, K. L. (2003). Nucleotide sequences of shrimp beta-actin and actin promoters and their use in genetic transformation technology. *World Intellectual Property Organization* (publication number # WO03048325). Available at European Patent Office website (<http://ep.espacenet.com/>).
- Tafalla, C., Estepa, A. & Coll, J. M. (2006). Fish transposons and their potential use in aquaculture. *Journal of Biotechnology* **123**, 397-412.
- Tsai, H. J. (2000). Electroporated sperm mediation of a gene transfer system for finfish and shellfish. *Molecular Reproduction and Development* **56**, 281-284.
- Tseng, F. S., Tsai, H. J., Liao, I. C. & Song, Y. L. (2000). Introducing foreign DNA into tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by electroporation. *Theriogenology* **54**, 1421-1432.
- Uzbekova, S., Chyb, J., Ferriere, F., Bailhache, T., Prunet, P., Alestrom, P. & Breton, B. (2000). Transgenic rainbow

- trout expressed sGnRH-antisense RNA under the control of sGnRH promoter of Atlantic salmon. *Journal of Molecular Endocrinology* **25**, 337-350.
- Venugopal, T., Anathy, V., Pandian, T. J. & Mathavan, S. (2002). Molecular cloning of growth hormone encoding cDNA of an Indian major carp *Labeo rohita* and its expression in *E.coli* and zebrafish. *General Comparative Endocrinology* **125**, 236-247.
- Venugopal, T., Anathy, V., Kirankumar, S. & Pandian, T. J. (2004). Growth enhancement and food conversion efficiency of transgenic fish, *Labeo rohita*. *Journal of Experimental Zoology* **301**, 477 - 490.
- Wang, Y., Hu, W., Wu, G., Sun, Y., Chen, S., Zhang, F., Zhu, Z., Feng, J. & Zhang, X. (2001). Genetic analysis of 'all-fish' growth hormone gene transferred carp (*Cyprinus carpio* L.) and its F1 generation. *Chinese Science Bulletin* **46**, 1174-1177.
- Wang, R., Zhang, P., Gong, Z. & Hew, C.-L. (1995). Expression of the antifreeze protein gene in transgenic goldfish (*Carassius auratus*) and its implication in cold adaptation. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **4**,

- 20-26.
- Wright, J. R. Jr & Pohajdak B. (2001). Cell therapy for diabetes using piscine islet tissue. *Cell Transplant* **10**, 125-143.
- Wu, G., Sun, Y. & Zhu, Z. (2003). Growth hormone gene transfer in common carp. *Aquatic Living Resources* **16**, 416-420.
- Wu, S., Hwang, P., Hew, C. & Wu, J. (1998). Effect of antifreeze protein on cold tolerance in juvenile tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and milk fish (*Chanos chanos*). *Zoological Studies* **37**, 39-44.
- Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Kobayashi, T. & Takeuchi, T. (2003). Primordial germ cell: a novel tool for fish bioengineering. *Fish Physiology and Biochemistry* **28**, 453-457.
- Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Sakatani, S. & Takeuchi, T. (2000). Germ cell-specific expression of green fluorescent protein in transgenic rainbow trout under control of the rainbow trout vasa-like gene promoter. *International Journal of Developmental Biology* **44**, 323-326.
- Zbikowska, H. M. (2003). Fish can be first - Advances in fish

- transgenesis for commercial applications. *Transgenic Research* **12**, 379-389.
- Zeng, Z., Shan, T., Tong, Y., Lam, S. H. & Gong, Z. (2005). Development of estrogen-responsive transgenic medaka for environmental monitoring of endocrine disrupters. *Environmental Science and Technology* **39**, 9001-9008.
- Zhu, Z., Li, G., He, L. & Chen, S. (1985). Novel gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus* L.1758). *Journal of Applied Ichthyology* **1**, 31-34.