

발간등록번호

11-1541000-001395-01

과제번호 : 109188-3

실험용 Midget 미니돼지의 개발 및
산업화에 관한 연구

Customization and development of
midget miniature pig as a laboratory
animal

한경대학교 산학 협력단

농림수산식품부

최 종 보 고 서

제 출 문

<p>주 의 (편집순서 8)</p>	<p>과제번호 109188-3 신원영 Midget 미니돼지의 개발 및 산업화에 관한 연구</p>	<p>발간등록번호 11-1541000-001395-01</p>	<p>과제번호 : 109188-3</p>
	<p>실험용 Midget 미니돼지의 개발 및 산업화에 관한 연구</p> <p>Customization and development of midget miniature pig as a laboratory animal</p> <p>한경대학교 산학협력단</p> <p>농림수산식품부</p>		

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “실험용 Midget 미니돼지의 개발 및 산업화에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

제1세부연구과제 : 실험동물용 Midget 미니돼지의 유전자원 보존 및 관리

제1협동연구과제 : 실험동물용 Midget 미니돼지의 개량 시스템 개발

제2협동연구과제 : 실험동물용 Midget 미니돼지의 생산 표준화

2012 년 04 월 09 일

주관연구기관명 : 한경대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 윤 중 택

세부연구책임자 : 윤 중 택

연 구 원 : 김 상 환

연 구 원 : 김 대 승

연 구 원 : 강 현 아

연 구 원 : 박 윤 혜

협동연구기관명 : 순천대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 서 강 석

협동연구기관명 : 메디키네틱스(주)

협동연구책임자 : 이 명 섭

요 약 문

I. 제 목

실험동물용 Midget 미니돼지의 개발 및 산업화
(Customization and development of midget miniature pig as a laboratory animal)

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

- 실험동물 산업에서 국내외 실험동물 및 연구개발 정책 동향 (동물보호법 및 실험동물법, 신성장동력 바이오제약[자원] 및 의료기기 분야)에 부합하고 국내외 시장 규모 (국내 약 100억 규모)를 충족시키는 실험동물용 Midget 미니돼지 (체장 65 cm 이하, 체중 20 Kg 이하)를 개발
- 시장 지향적 연구개발과 계약생산을 통하여 농림 분야의 불안정성을 해소하고 기존 실험동물의 한계를 극복하는 신제품을 개발하여 수입대체 및 수출 전략 산업으로 육성
- 참여기업에서 보유하고 있는 미니돼지 생산 system을 기반으로 개량, 번식 및 사양관리 system을 정립하여 실험동물용 Midget 미니돼지를 시장에 공급함으로써 단시간 내에 실험동물로 상용화

2. 연구개발의 필요성

- 국내 실험동물생산 산업규모는 국내생산과 수입을 포함하여 2005년 기준 89억 9백만원이고 판매규모는 110억 3천3백만원으로 집계되었음 (한국바이오산업협회 자료).
- 국내에서 SPF 미니돼지를 생산 및 판매하는 업체는 참여기업이 유일하며, 2006년 판매량은 300두를 기록하였음.
- 2006년 국내 실험동물사용량은 SPF는 300두, 일반은 약 500두(실험동물산업육성방안과 국내 복지상황조사연구; 건국대 최양규, 2007)인 것으로 조사되었는데, 주요 실험동물 구매처는 대학이 28%, 산업체와 연구기관이 각각 25%, 의료기관이 15%로 조사되었음 (실험동물생산업체방문조사 결과보고서; 국립수의과학검역원 동물보호과, 2007).
- 참여기업의 싱가포르법인과 미국 계열법인의 시장 수요 조사에 따르면 싱가포르의 바이오폴리스, 미국, 유럽, 동아시아에서 SPF 중형 실험동물 수요가 보고되고 있으며 이미 2005년 이후 SPF 미니돼지를 싱가포르 수출하여 주로 심혈관 연구, 치과 임플란트 연구, 연골 및 뼈 세포치료제 연구, 줄기세포 연구에 활용되고 있음.
- 현재 실험동물로 주로 사용되고 있는 설치류보다 돼지의 생체 시스템이 사람과 많이 흡

사하기 때문에 사람 대신 약물에 대한 정확한 검증을 이루어 낼 수 있는 실험동물로서 미니돼지가 관심을 끌고 있음.

- 이상에서 언급되어진 국내외 시장 현황과 현재 확보하고 있는 참여기업의 기술을 고려해 볼 때 아직 시도되고 있지 않고 또한 그 수요가 급속도로 증가할 틈새시장으로 본 연구의 성공 가능성은 매우 높음.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 연구개발 내용

- 실험동물로 활용이 될 수 있도록 시장에서 요구하는 실험동물 조건에 부합하는 표준 생산 (개량, 번식, 사양관리) system을 구축한다.
- 시험 생산된 Midget 미니돼지의 실험동물 규격화를 위하여 Pilot test를 실시한다.
- 실험동물용 Midget 미니돼지 Genetic resource bank를 운용하여 개발된 Genetic resource를 보존 및 관리한다.

2. 연구개발 범위

1. 실험동물용 Midget 미니돼지의 유전자원 보존 및 관리
 - 가. Midget 미니돼지 유전자원 은행 준비
 - 나. Midget 미니돼지 유전자원 은행 운영
 - 다. 실험동물용 Midget 미니돼지 유전자원 은행
2. 실험용 Midget 미니돼지의 개량 시스템 개발
 - 가. 기존 미니돼지 집단에 대한 유전 특성 규명
 - 나. Midget 미니돼지 개량 시스템 운용
 - 다. 실험동물용 Midget 미니돼지 개량 시스템 운용
3. 실험동물용 Midget 미니돼지의 생산 표준화
 - 가. 종돈의 선발, 교배 와 개량 라인 조성
 - 나. Midget 미니돼지 시험 생산 및 규격화
 - 다. 실험동물용 Midget 미니돼지의 표준 생산

IV. 연구개발결과

1. 실험동물용 Midget 미니돼지의 유전자원 보존 및 관리

가. Midget 미니돼지의 유전자원 보존

미니돼지의 유전자원을 보존하기 위하여 협동과제에서 제공받은 미니돼지의 생식기관을 외과 수술 방법을 이용하여 총 암컷 26두의 난소, 수컷 4두의 정소 및 임신 30일 경 미니돼지에서 적출한 7마리의 태아를 채취하였으며, 세포배양용 조직은 실험실에서 제조한 37℃의 생리식염수에 담았으며, paraffin block을 위한 조직은 액체질소(LN2)에 담아 실험실로 이동 후 유전자 보존 실험을 실시하였다. 면역분석 및 RNA probe를 이용한 hybridization이 용이하게 하기 위하여 DNAase와 RNAase를 제거한 fix solution에 조직 절편을 넣어 고정한 후 paraffin block을 제작 하였고, 난소 26개 자궁 20개 난관 20개 태아조직 7개 정소 4개로 총 77개의 조직 paraffin block을 제작했다.

나. 유전자는행을 이용한 돼지 Autophagy marker인자 클로닝

미니돼지 유전자는행을 이용하여 세포의 생리학적 중요성이 대두되고 있는 세포사멸기전의 하나인 autophagy를 규명하기 위한 marker인자인 MAP1LC3A를 클로닝 하였다. 먼저 기존에 밝혀진 MAP1LC3A의 정보를 기초로 총 980bp 염기서열과 188개의 아미노산으로 구성되어 있는 돼지 MAP1LC3A의 subunit를 복제하였으며, 돼지 MAP1LC3A의 유전자가 다른 포유동물의 MAP1LC3A인자들과 98%이상의 상동성을 나타내고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 본 유전자의 ORF(open reading frame)의 Gly-120 구간의 C-말단 부분을 제외하곤 동일 염기 서열을 나타낸 것으로 보아 포유류에서 기능하는 MAP1LC3A와 동일한 기능을 가지고 있음을 확인하여 돼지의 MAP1LC3A로 명명하고 GenBank(NO. GU272221)에 등록하였다.

돼지 MAP1LC3A를 이용하여 미니돼지 난구세포에서의 autophagy의 발현양상을 immunofluorescence와 western blotting 방법을 이용하여 분석한 결과 아무것도 처리하지 않은 난구세포의 세포질에 autophagy의 발현을 확인 할 수 있었으며, rapamycin 처리군에서 autophagy marker인자들의 발현이 더욱 높아지는 것을 확인 할 수 있었다.

이러한 결과로 LC3A가 돼지 난포세포에서 autophagy의 작용이 나타나는 것으로 확인 할 수 있었으며, 돼지의 난포세포의 발달 및 재구성 시스템에 중요한 역할을 할 수 있을 것이라 사료 되었다. 따라서 본 연구를 통하여 돼지의 난포발달에 대한 세포사멸사의 기전을 설명할 수 있는 중요한 결과로 사료된다.

다. Midget 미니돼지의 생식세포(정자)의 보존

미니돼지의 정액을 TFGE, TLE, LEY 동결 보존액으로 동결한 후 37℃에서 20초, 45초와

75℃에서 5초 동안 용해하였을 때 생존성 및 정자의 침체 정상성은 Table 1과 같다. 37℃에서 20초간 동결 용해 하였을 때 TLE 동결보존액은 동결 용해 후 정자의 생존율이 $57.4 \pm 1.8\%$ 이었고 정자의 침체의 정상성은 $58.5 \pm 1.8\%$ 이었다. TFGE 보존액은 정자의 생존율이 $42.4 \pm 1.8\%$, 침체 정상은 $50.5 \pm 1.6\%$ 이었고 LEY 보존액은 정자의 생존율이 $38.6 \pm 1.8\%$, 침체 정상성은 $44.2 \pm 2.6\%$ 이었다. 37℃에서 45초간 동결 용해 하였을 때 TLE 동결보존액은 동결 용해 후 정자의 생존율이 $58.3 \pm 2.1\%$ 이었고 정자의 침체 정상성은 $57.3 \pm 1.4\%$ 이었다. TFGE 보존액은 정자의 생존율이 $43.2 \pm 2.1\%$, 침체 정상은 $48.3 \pm 1.4\%$ 이었고 LEY 보존액은 정자의 생존율이 $38.4 \pm 2.1\%$, 침체 정상성은 $41.5 \pm 1.4\%$ 이었다. 75℃에서 5초간 동결 용해 하였을 때 TLE 동결보존액은 동결 용해 후 정자의 생존율이 $61.3 \pm 2.4\%$ 이었고 정자의 침체의 정상성은 $62.2 \pm 2.2\%$ 이었다. TFGE 보존액은 정자의 생존율이 $60.3 \pm 2.4\%$, 침체 정상은 $58.6 \pm 2.2\%$ 이었고 LEY 보존액은 정자의 생존율이 $50.2 \pm 2.4\%$, 침체 정상성은 $54.5 \pm 2.2\%$ 이다. 동결 보존액이나 용해 방법 간에 있어서 TLE 동결보존액이 다른 동결보존액에 비하여 동결 용해 후 생존성이나 정자의 침체 정상성이 유의적으로 ($p < 0.05$)을 높은 결과를 나타내었다.

라. Midget 미니돼지 난자의 체외성숙 및 동결보존

미니돼지의 난자세포를 보관하기 위하여 혈청배양배지와 새롭게 제조한 IVM 배양배지를 이용하여 미니돼지 난자의 성숙율을 비교분석하였고, 호르몬이 성숙에 미치는 영향을 분석하였다. 분석결과 혈청배양액에서는 $75.2 \pm 2.3\%$ 의 난구세포 팽화율을 보였으며, $72.5 \pm 1.8\%$ 의 제 1극체 방출을 확인 할 수 있었다. 새롭게 제조된 porcine IVM-medium에서의 난구세포 팽화율은 $77.1 \pm 1.4\%$ 였고, 제 1극체 방출은 $75.3 \pm 1.6\%$ 로 두 배양 배지간의 유의적 차이는 없었으나 porcine IVM-medium이 혈청첨가 배양배지 보다 약간 높은 성숙율을 나타냈다. 또한 호르몬이 미니돼지 난자의 성숙율에 미치는 영향을 분석하기 위하여 새롭게 제조한 배양배지에 FSH, LH 그리고 FSH+LH 호르몬을 첨가하여 분석한 결과 FSH+LH 호르몬에서 난구세포의 팽화 및 제1극체의 출현율이 높게 나타났다. 위의 결과를 이용하여 성숙된 미니돼지 난자는 난구세포를 제거하고, 0.25cm straw에 load한 후 동결하여 LN2 유전자 보관통에 보관하였다.

마. Midget 미니돼지 정자의 동결-용해 후 기저막분해효소(MMPs) 발현 및 수정률

동결보존액에 따른 미니돼지 정자의 MMPs의 발현양상 및 수정률을 비교분석하여 Tea-N-tris의 효과를 증명한 결과 미니돼지 정자의 동결 전 4℃ 온도 저하에서 Tea-N-tris가 첨가되지 않은 LEY에서 $40.3 \pm 2.8\%$ 의 활력도와 $60.3 \pm 1.3\%$ 생존율을 나타내었고 TLE에서 $65.5 \pm 2.8\%$ 의 활력도와 $85.5 \pm 1.3\%$ 의 생존율을 보였고, TFGE에서의 경우 $55.3 \pm 2.8\%$ 의 활력도와 $73.3 \pm 1.3\%$ 를 나타내었다. 동결용해 정자의 활력 및 생존성은

TLE에서 $57.4 \pm 1.8\%$, $65.6 \pm 4.6\%$ 으로 유의적으로 가장 높은 결과를 보였다. 이에 따른 동결정액의 DNA fragment를 평가한 결과 LEY이 가장 높게 fragment가 형성되어 있었으며, TLE를 이용한 동결희석제에서 가장 낮은 fragment를 보였다. 체외수정에서 배반포 발달까지의 결과를 확인해본 결과 LEY의 경우 배반포 발생률이 낮게 나타났으나 유의적인 차이는 없었고, TLE와 TFGE에서의 발생률은 비슷하였다.

MMPs의 발현양상 분석은 모든 그룹에서 MMPs의 활성을 확인할 수 있었으며, pro-MMP가 active MMPs에 비하여 낮은 발현을 보이고 있었고, MMP-9의 경우 LEY에서 가장 높은 활성을 나타내고 있었다. MMP-2의 결과도 MMP-9의 결과와 비슷했으며, Tea-N-tris 첨가 보호제인 TFGE와 TLE에서는 LEY보다 낮은 활성 MMPs를 관찰 할 수 있었고 그중 TLE가 가장 낮은 MMPs의 활성을 나타내고 있었다. 따라서 본 연구 결과 Tea-N-tris을 첨가하여 동결한 미니돼지 정자가 MMPs의 발현 및 DNA 손상을 줄여주는 역할을 하여 정상적인 동결에 좋은 효과를 줄 수 있을 것이라 사료된다.

바. 돼지 난자 성숙에 따른 기저막분해효소(MMPs) 발현 및 수정률

돼지 난자의 성숙에 따른 세포외 기저막 분해효소의 발현양상을 통하여 난자의 성숙에 미치는 영향을 분석하기 위해 24시간, 36시간 및 48시간 동안 성숙되어진 돼지의 난자와 난구세포의 mRNA와 proteins에서 발현양상을 분석한 결과 대체적으로 cumulus cell에서의 발현양상이 두드러지게 나타나고 있음을 확인하였으며, 난자에서도 유전자의 발현을 확인할 수 있었다. MMP-2의 경우 36시간의 난구세포에서 발현이 나타났으며, 그에 따라 inhibitor인 TIMP-2도 높게 발현되었다. 난자의 경우에는 48시간에 MMP-2의 발현이 가장 많이 나타났으며, 난구세포에서의 반응은 미미하였다. 또한 이시기에 TIMP-2의 발현도 낮게 나타났다. MMP-9의 경우 24시간에서 48시간까지 난구세포에서 큰 변화 없이 발현되었고, inhibitor인 TIMP-3의 경우 48시간째에 급격하게 증가하였다. 난자의 경우에는 24시간째에 MMP-9의 발현이 가장 많이 나타났으나, TIMP-3의 경우 큰 폭 없이 발현되다가 48시간째에 MMP-9의 발현과 비슷하게 발현되었다. 따라서 본 연구 결과 MMP-2가 난구세포 및 난자에서 ECM 억제제 농도를 조절하여 정상적인 성숙과 발전을 유지하는 역할을 하는 것으로 사료된다.

2. 실험용 Midget 미니돼지의 개량 시스템 개발

본 연구는 Midget 미니돼지의 체중(BW)과 체장(BL)에 대한 성장 곡선 매개 변수를 통하여 미니돼지 개량 시스템을 개발하기 위하여 성장 곡선 매개 변수를 Gompertz, Logistic 와 von Bertalanffy 방법을 사용하여 비선형 회귀 모델을 통해 추정하였다. 총 25마리의 새끼돼지의 체중과 체장을 측정하기 위하여 생시 후 두 달 간격으로 일곱 번씩 측정하여 분석하였으며, 분석 결과 체중(신체 길이)에 대한 예상 평균값은 성장 체중(A)인 31.83 kg (58.77 cm)으로 추

정되었고, 성장 비율(β)에 대한 추정값은 3.06 (1.74) 이었으며, 성장속도에 대한 추정값(κ)은 0.28 (0.52)으로 측정되었다. Midget 미니돼지 25두의 평균 변곡점은 매월 최대 성장속도에 비례하여 체중이 3.97kg 일 때 11.70cm인 반면, 체장은 1.06kg에 21.61cm로 추정되었다. 게다가 Sire 1 Group 체중과 체장의 성장속도 추정치는 각각 0.22와 0.40인 반면 Sire 2 Group은 0.34와 0.39였다. 반면에 Dam 1, Dam 2, Dam 3의 그룹들의 체장은 0.43, 0.37, 0.38일 때 체중 성장 속도는 각각 0.26, 0.28 그리고 0.33이었다. 따라서 본 연구를 통하여 높은 변곡점은 성숙 체중 값과 체장의 성장 속도 사이의 음성 관계를 나타낸 것으로 확인 되었으며, 체장의 결과는 성장 체장의 값과 성장속도 사이의 관계가 양성관계로 높은 변곡점 결과를 보였다. 본 연구 결과를 통하여 미니 돼지의 성장 능력은 성장 단계에 걸쳐 다양하게 표현될 수 있지만 본 연구결과에서 나타난 예상 성장 곡선 매개 변수를 사용하면 미니 돼지의 유전적 특성을 향상시킬 수 있을 것이라 사료된다.

3. 실험동물용 Midget 미니돼지의 생산 표준화

실험동물용 Midget 미니돼지의 생산 연구는 생리학 및 양리학적 연구와 비임상용 실험에 용이한 Micropig 군에서 작은 종의 miniature pig를 발굴하여 번식, 육종 시스템을 이용하여 초소형 miniature pigs군을 개발하기 위하여 수행하였다. Miniature pig를 소형화하기 위하여, 우리는 작은 miniature pigs을 선택하고 선발된 종돈은 혈통, 건강상태, 체격, 혈족의 과거번식 성적 등을 참고하여 선발한다. 선발 시기는 3개월령일 때이고, 이후 성성숙에 이를 때까지 중후보로 해서 육성한다. 또한 육성 중에 어떠한 이상이라도 발견될 때에는 조속히 후보에서 제외시켜 선발하였으며, 선발된 소형종의 근교교배를 통하여 초소형 미니돼지를 생산하였다. 초소형 miniature pigs는 출생 후 체중은 전자 체중계로 이유 후 (8주령)부터 2개월 단위로 측정하여 기록하고, 체장은 줄자로 이유 후 (8주령)부터 2개월 단위로 측정하여 기록하여 소형종의 발생 및 성성숙 이후 성장률을 추정하였다.

초소형 miniature pig는 2두의 부계 계통과 3두의 모계 계통이 miniature pigs의 초소형화를 향상시킬 수 있는 계통으로 확인되어 선발 되었으며, 이를 통한 근교교배의 개선도를 분석한 결과 일부 계통에서 근교교배 이후 유전적 문제점이 없는 정상적인 초소형 miniature pig를 생산할 수 있었다. 따라서 본 연구를 통하여 2011에 본 협동과제인 메디키네틱스에서 생물 의학적 연구를 위한 실험동물로 초소형 미니돼지(Midget miniature pig)를 생산할 수 있었으며, 미니돼지의 모색과 크기에 대한 유전자 분석을 완료하였으며, micro pig 무리에 대한 성장 및 발육 상태와 번식 시스템을 위한 맞춤 생산 시스템을 개발할 수 있었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

의약품 분야는 기존의 사업 환경의 변화가 급속히 진행되고 있는데 한미 FTA의 체결등의 제품 및 기술 개발의 선진화 요구에 따라 국내 제약사들은 바이오 신약을 비롯한 다양한 형태의 신약 개발에 매진하고 있으며 정부에서도 다부처간 연계를 통하여 제약 산업의 성장을 지원할 계획이다. 특히 특허가 만료되는 의약품의 제네릭 제품을 비롯한 개량 신약의 개발이 활발히 진행될 계획이며 바이오의약품(국내 13조원 시장 규모)과 천연물신약(국내 3,500억원 시장 규모)의 개발에 매진하고 있다. 특히 효능성 시험 분야에 대한 needs가 증가하고 있어 본 과제를 통하여 개발된 초소형 미니돼지의 활용성을 높이는 기회가 되고 있으며 이미 8두의 개체는 비임상 연구 등에 활용되어 사업화를 조기에 가시화할 수 있는 기반이 되고 있다. 이를 기반으로 Midget 미니돼지의 의약품 개발 분야 활용성을 증진시키는 영업 및 마케팅 활동을 강화하여 기존의 실험동물을 활용한 비임상 시험의 한계를 극복하고 신약 개발의 효율성과 시급성을 충족시키는 비임상 모델로서 활용하고자 한다. 본 과제를 통하여 지식재산 분야에서도 대중소기업 상생법에 따른 기술입치 2건을 등재하여 사업화를 위한 특허 취득을 위한 준비가 완료되었다.

SUMMARY

1. Genetic resource conservation and management of Midget miniature pigs

Part 1.

To reserve the genetic material of minipigs provided by Medikinetics, the reproductive organs were surgically removed from a total of 26 females and 4 males. In addition, 7 embryos at approximately 30 days in pregnancy were extracted. Tissues that would be used for in vitro culture were placed in 37°C home made saline. Tissues for paraffin section were frozen in liquid nitrogen (LN2). To facilitate immunological analyses and RNA probe hybridization, solutions used for block fixation were prepared to be free of DNase and RNase. Total of 77 tissues including 26 ovaries, 20 uterus, 20 oviducts, 4 testis and 7 embryos were Tissue sections were embedded in paraffin blocks.

Part 2.

In this study, we determined the full-length nucleotide sequence of MAP1LC3A (LC3A) cDNA from porcine ovary. Mixed-base oligonucleotide primers were designed based on previously cloned LC3A. The open reading frame of porcine LC3A cDNA consists of 980 bp (encoding 121 amino acids). Based on homology to the human gene (98%), this novel cDNA was identified as porcine MAP1LC3A and submitted to GenBank (Accession No. GU272221). The MAP1LC3A gene contains 4 exons and 3 introns. To map the promoter region and to investigate the presence of *cis*-regulatory elements, we cloned the 1051-bp fragment upstream to the transcription start site. We identified 3 TATA box and 4 CAAT box sequences in this region. There also was 23 CpG dinucleotides as potential methylation sites within this 1051-bp region. The luciferase reporter assay demonstrated that transcription factors CRE-BP, HSF, and ADR1 play pivotal roles in the expression of porcine MAP1LC3A. Indirect immuno-fluorescence with the MAP1LC3A fusion protein showed that the subcellular localization of porcine MAP1LC3A and ATG5 exhibit a punctate pattern in the cytoplasm of porcine follicular cells under stress conditions. These results indicate that MAP1LC3A can be used as an autophagosomal marker of pig follicular cell. We propose that autophagy plays a role in the maintenance of follicular development at least partially by regulating the remodeling

system in porcine follicular cells.

Part 3

The objective of this study is to estimate the effect of adding TES to LEY and FGE freezing extender for the sperm viability, acrosomal morphology and DNA fragmentation from miniature pig sperm, we evaluated sperm characteristics in TFGE, TLE and LEY with various thawing condition (37°C for 20 sec, 45 sec and 75°C for 5 sec, respectively), and in different concentration of glycerol at 1%, 1.5%, 3%. The sperm viability and normal acrosome intact (NAI) in TFGE (Viability : 60.3 ± 2.4 , NAI : $58.6 \pm 2.2\%$), TLE (61.3 ± 2.4 , $62.2 \pm 2.2\%$) extender significantly ($p < 0.05$) increased than that in LEY (50.2 ± 2.4 , $54.5 \pm 2.2\%$) extender thawed at 75°C for 5sec. According to the results from glycerol concentration, the viability and NAI of miniature pig sperm in 1.5% glycerol TLE (66.1 ± 3.2 , $66.2 \pm 1.0\%$) was highest among the experimental groups. In accordance with this, DNA fragmentation rates was the lowest in TLE ($43.3 \pm 0.5\%$) while that in LEY ($63.5 \pm 2.3\%$) is the highest. Therefore, these results suggest that TLE extender method for freezing-thawing of miniature pig sperm increased the viability after thawing.

Part 4.

The objective of this study is to analyzed the effect of BIVM and PIVM invitro maturation medium for the oocyte maturation, Cumulus oophorus and extrusion rates of 1st polar body (pb) from the midget miniature pigs oocytes. And estimation of effect in the hormones (Adding hormones (FSH, LH and FSH+LH to PIVM) to oocyte maturation. The oocytes cumulus oophorus and extrusion rates of 1st pb in PIVM (Cumulus Oophorus : $77.1 \pm 1.4\%$, Extrusion rates of 1st pb : $75.3 \pm 1.6\%$), medium highest increased than that in BIVM ($75.2 \pm 2.3\%$, $72.5 \pm 1.8\%$). According to the results from holmones effect, the oocytes cumulus oophorus and extrusion rates of 1st pb of Midget miniature pig oocytes in FSH+LH medium (PIVM+FSH+LH) was highest among the experimental groups. Also we used maturation method for oocytes invitro maturation in Midget miniature pigs, after stored freezing in LN2 box. and removed the cumulus cell from maturation oocytes, and freezing was the stored in LN2 box to the oocytes load in 0.25mm straw. Therefore, these results suggest the PIVMFL (PIVM+FSH+LH) invitro maturation medium for oocytes maturation of Midget miniature pig oocytes increased the maturation.

Part 5.

The main purpose of this study is to estimate the effect of adding Tea-N-Tris to the freezing buffer for minipig sperm. In particular, we attempted to identify the association between the MMPs expression and the survival and viability of sperms. Prior to freezing, sperms in LEY without Tea-N-Tris showed $40.3 \pm 2.8\%$ viability and $60.3 \pm 1.3\%$ survival rate at 4°C. After freezing, sperms stored in LEY with Tea-N-Tris (=TLE) showed the highest viability ($57.4 \pm 1.8\%$) and survival rate ($65.6 \pm 4.6\%$). In accordance with this, DNA fragmentation was the highest among sperms frozen in LEY while the lowest fragmentation was observed among sperms frozen in TLE. When these sperms were used for *in vitro* fertilization (IVF), the LEY group showed lower rate of blastocyst development, although the difference was not statistically significant. Meanwhile the rate of blastocyst development appeared similar when sperms from TLE and TFGE (Tea-N-Tris+Fructose+Glucose+Egg yolk) group were used for IVF. We observed MMPs expression in all sperm groups, with pro-MMP showing lower expression than active MMPs. The expression of MMP-9 and MMP-2 was the highest in sperms frozen in LEY. Meanwhile, sperms from the TFGE and TLE group showed lower level of MMP-9 and MMP-2 expression in the order of TLE being the lowest. Together, these results indicate that adding Tea-N-Tris to the sperm freezing buffer would not only suppress MMPs expression but also minimize DNA fragmentation, providing a mean to improve the success rate in the in vitro manipulation of minipig sperms.

Part 6.

Matrix metalloproteinases (MMP) play important roles in extracellular matrix (ECM) remodeling during ovarian follicular development, oocytes development and ovulation. In an attempt to investigate the effect of MMP activation in development cumulus-oocytes complexes, we examined the localization and expression of MMP, and monitored MMP expression profile. Cumulus-oocytes complexes were collected and matured in vitro for 24hr, 36hr and 48hr. A mRNA expression of MMP-2, MMP-9, TIMP-2 and TIMP-3 was detected in all culture medium regardless of CC, OC and COCs. Activity of MMP-2 in the OC progressively was increased from 24hr to 48hr. But MMP-9 was not detected in all culture medium. The localization of MMP-2 was also measured by immunohistochemistry analysis. The MMP-2 and

TIMP-2 was detected in cumulus cell and oocyte zona pellucida. Expression of MMP-2 protein in the COCs was progressively increased from 24hr to 48hr. However, MMP-9 protein was progressively decreased from 24hr to 48hr. And TIMP-2 protein was most highly expressed in the COCs 36hr. Expression of TIMP-3 protein in the COCs was progressively increased from 24hr to 48hr. In conclusion, these results suggest that MMP-2 plays a role in maintaining normal maturation and development by controlling the ECM inhibitor concentration on cumulus cell and oocytes.

2. Development of improved systems of Midget miniature pigs

This study was conducted to estimate the growth curve parameters for the body weight (BW) and the body length (BL) of miniature pig in Korea.

Growth curve parameters were estimated through nonlinear regression modeling using Gompertz, Logistic and von Bertalanffy methods. A total of 25 piglets were measured seven times with two months interval to estimate both body weight and length.

Results showed that the estimated average values for the body weight (body length) were 31.83 kg (58.77) for the mature weight (A), 3.06 (1.74) for the growth ratio (β), and 0.28 (0.52) for the maturing rate (κ). Average inflection points showing maximum growth rate estimated each month for body weight were 3.97 kg and 11.70 cm, while for the body length were 1.06 kg and 21.61 cm. Moreover, the estimated maturation rates of the body weight and length for the Group of Sire 1 were respectively about 0.22 and 0.40, whereas for the Group of Sire 2 these values were 0.34 and 0.39. On the other hand, for the Groups of Dam 1, Dam 2, and Dam 3, maturation rates for their body weights were respectively about 0.26, 0.28 and 0.33, while for their body lengths these values were 0.43, 0.37 and 0.38. The study also indicated a negative relationship between the values of mature weight and maturity rate for the body weight will result to a higher inflection point which is in contrast for the body length where results show that a positive relationship between the values of mature length and the maturity rate will result to a higher inflection point.

Furthermore, the growth performance of miniature pig varies across stages but using these estimated growth curve parameters could improve the genetic traits of miniature pig.

3. Standardize the production of Midget miniature pigs

This study was conducted to develop the midget minipig from the Micropig herds for pharmacological studies and nonclinical trials. To downsize minipig, we selected tiny minipigs and mated them. After births, the body weight and body length of offspring were measured periodically and estimated. The midget minipig herds were composed of 5 strains that were two sire's lines and three dam's lines. To improve the downing rate, some lines were mated among the midget minipig herds and produced genetically normal offsprings. From 2011, Medikinetics has customized the midget minipigs as laboratory animals for biomedical researches. By genetic analysis of hair coat color and size, some data for the status and breeding plan of micropig herds were acquired and the customized production system was developed.

CONTENTS

SUMMARY	9
CONTENTS	13
Chapter 1. Introduction	17
1. Scope of Research	17
2. Significance of Research	17
3. Utilization and performance expectations	18
Chapter 2. Current States on Domestic and Foreign Technology	20
1. Domestic production and Market Status	20
2. Foreign associated (similar) production and market status of the product	20
Chapter 3. Experimental Methods and Results	21
1. Genetic resource conservation and management of Midget miniature pigs	21
A. Genetic resource conservation of Midget miniature pig	21
B. Pigs Autophagy marker cloning using the gene bank	25
C. Conservation of germ cells in Midge miniature pig	29
D. In vitro maturation of Midget miniature pig oocyte and freezing	34
E. MMPs expression and fertility after freeze-thawing of Midget miniature pig	37
F. MMPs expression and Fertility according to pig oocyte maturation	42
2. Development of improved systems of Midget miniature pigs	47
A. Devise of the breeding plan for the foundation stock composition, and select candidate pigs	47
B. Estimation of growth curve parameters of Midget miniature pigs	50
C. Growth trend of growth in Midget miniature pig line	60
3. A breeding pig selection, breeding and improved lines composition	65
A. Selection and mate of breeding Swine	65
B. Specifications and delivery management of pregnant pig	65
C. Parturition and feeding management of the piglets	65
D. The verification of improve the line	66
E. Final results of research performed	67
Chapter 4. Achievement and Contribution	69
1. Attainment against targets foreign	69
2. Results against targets	69
3. Quantitative result	70
Chapter 5. Application plan	72
1. Research and development results	72
2. Utilization of research results	73
Chapter 6. Foreign scientific information	73
Chapter 7. Reference	74

목 차

<p>제 1 장 서 론17</p> <p> 제 1 절 연구개발의 목적17</p> <p> 제 2 절 연구의 필요성17</p> <p> 제 3 절 활용방안 및 기대성과18</p> <p> 1. 기대 성과18</p> <p> 2. 상품화 및 사업화 방법18</p> <p>제 2 장 국내외 기술개발 현황20</p> <p> 제 1 절 국내 제품생산 및 시장 현황20</p> <p> 제 2 절 국외 관련(유사)제품의 생산 및 시장 현황20</p> <p>제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과21</p> <p> 제 1 절 실험동물용 Midget 미니돼지의 유전자원 보존 및 관리21</p> <p> 1. Midget 미니돼지의 유전자원 보존21</p> <p> 2. 유전자은행을 이용한 돼지 Autophagy marker인자 클로닝25</p> <p> 3. Midget 미니돼지의 생식세포의 보존29</p> <p> 4. Midget 미니돼지 난자의 체외성숙 및 동결보존34</p> <p> 5. Midget 미니돼지 정자의 동결-융해 후 기저막분해효소(MMPs) 발현 및 수정률37</p> <p> 6. 돼지 난자 성숙에 따른 기저막분해효소(MMPs) 발현 및 수정률42</p> <p> 제 2 절 실험동물용 Midget 미니돼지의 개량 시스템 개발47</p> <p> 1. 기초축 조성을 위한 교배 계획 수립 및 후보축 선발47</p> <p> 2. 미니돼지 계통의 조성 및 성장 표현형 측정50</p> <p> 3. 계통별 생육 성장의 추이60</p> <p> 제 3 절 종돈 선발, 교배와 개량 라인 조성65</p> <p> 1. 종돈의 선발 및 교배65</p> <p> 2. 임신돈의 사양 및 분만 관리65</p> <p> 3. 분만돈 및 자돈의 사양 관리65</p> <p> 4. 개량 라인의 규결 검증66</p> <p> 5. 최종 연구 수행 결과67</p>	<p>제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도69</p> <p> 제 1 절 목표대비 대외달성도69</p> <p> 제 2 절 목표대비 연구결과69</p> <p> 제 3 절 정량적 성과(논문게재, 특허출원, 기타)를 기술70</p> <p> 1. 연구 성과 정량적 목표70</p> <p> 2. 연구 정량적 성과70</p> <p> 3. 전문 학술지 논문 게재70</p> <p> 4. 학술회의 게재71</p> <p> 5. 특허 출원 및 등록71</p> <p> 6. 유전자원 등록71</p> <p> 7. 인력 성과71</p> <p> 8. 연구 성과 활용71</p> <p>제 5 장 연구개발결과의 활용계획72</p> <p> 제 1 절 연구 개발결과72</p> <p> 1. 핵심기술72</p> <p> 2. 연구결과별 기술적 수준72</p> <p> 3. 각 연구결과별 구체적 활용계획72</p> <p> 4. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)72</p> <p> 제 2 절 연구 개발결과 활용계획73</p> <p> 1. 연구결과의 활용 계획73</p> <p>제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보73</p> <p>제 7 장 참고문헌74</p>
---	---

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적

- 실험동물 산업에서 국내외 실험동물 및 연구개발 정책 동향 (동물보호법 및 실험동물법, 신성장 동력 바이오계약[자원] 및 의료기기 분야)에 부합하고 국내외 시장 규모 (국내 약 100억 규모)를 충족시키는 실험동물용 Midget 미니돼지(체장 65 cm 이하, 체중 20 Kg 이하)를 개발
- 시장 지향적 연구개발과 계약생산을 통하여 농림 분야의 불안정성을 해소하고 기존 실험동물의 한계를 극복하는 신제품을 개발하여 수입대체 및 수출 전략 산업으로 육성
- 참여기업에서 보유하고 있는 미니돼지 생산 system을 기반으로 개량, 번식 및 사양관리 system을 정립하여 실험동물용 Midget 미니돼지를 시장에 공급함으로써 단시간 내에 실험동물로 상용화

제 2 절 연구의 필요성

- 기존 미니돼지를 활용한 연구는 바이오이종장기의 개발을 위한 장기적 연구과제로 산업화와의 거리가 매우 멀다. 또한 중장기적인 관점에서 단계적인 미니돼지의 활용이 매우 중요한데 시장 친화적인 제품의 개발과 국제적 흐름에 부응하는 연구가 필요하다고 할 수 있다. 이에 이미 형성되어 있는 계약업계의 실험동물용 Midget 미니돼지 수요를 고려하고 정책적 지원이 우호적인 추세라는 점으로 보아 본 연구는 시장 전망이 매우 밝은 분야로 자리 잡을 것임을 확신하며 도출되어진 성공적인 결과는 농림업 분야의 새로운 고부가가치 산업모델이 될 것임을 확신한다.
- 참여기업에서 이미 확보하고 있는 SPF 미니돼지와 관련 기술 및 시설들은 최소로 보아도 아시아에서는 독보적이며 세계적인 수준이기 때문에 이를 기반으로 실험동물용 Midget 미니돼지의 개발을 추진하면 적은 투자와 적은 시간으로도 충분히 경쟁성이 있는 개발 결과를 도출해 낼 수 있다.
- 국내 및 국외시장 분석결과 실험동물용 Midget 미니돼지의 생산 및 판매가 이루어지지 않는 상황이며 본 연구를 통하여 신개념의 실험동물을 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획이다.
- 제약업계의 발전과 더불어 급증하게 될 실험동물용 Midget 미니돼지의 수요에 대비할 수 있는 적기라고 판단되며 주로 제약 분야의 약물 유효성 및 안전성 검증에 널리 이용될 수 있다.

제 3 절 활용방안 및 기대성과

1. 기대 성과

가. 기술적인 측면 : 국내외 실험동물로 생산 및 판매하고 있는 기존의 설치류 및 비설치류 실험동물을 대체하는 신개념의 실험동물을 참여기업의 미니돼지 둔군을 기반으로 개량 program을 도입하여 단시간 내에 개발한다. 실험동물용 번식 및 사양관리 program을 개발하고 pilot test를 통하여 실험 조건 적합성을 검증한다. 실험동물용 Midget 미니돼지의 genetic resource는 보존 및 관리 측면에서 주관기관에 Cell 및 DNA 형태로 동결 보존하며 생명공학 적, 분자생물학적 분석을 통하여 특성을 파악한다. 식용 시장만을 목표로 하는 양돈 산업의 한계를 극복하고 품질 및 시장적합성 면에서 부가가치가 높은 신제품을 개발하는 기술을 축적한다. 국외에서 수입되는 고급 실험동물을 국내 기술만으로 개발하여 수입대체 효과와 실험동물 분야의 기술적 도약을 가시화한다.

나. 경제산업적 측면 : 실험동물용 Midget 미니돼지는 pharmacology 분야의 nonclinical efficacy, safety test에 주로 활용되어 agriculture와 pharmacology 분야의 상생 발전에 이바지하며 새로운 개념의 실험동물 개발을 통하여 실험동물 산업의 경제적, 산업적 도약을 이룰 수 있다. 또한 고가로 수입되는 외산 실험동물의 수입대체 효과와 수출전략산업 육성 효과를 얻을 수 있으며 pharmacology 및 agriculture 분야의 결합이라는 새로운 business model을 통하여 산업간 synergy 효과를 기대할 수 있다. 유럽 등 선진국과 국내에서 이미 시행되고 있는 반려동물 보호 관련법 (동물보호법) 및 실험동물 대체법의 대안으로 신개념의 중소형 실험동물을 개발하고 기존의 설치류가 가지는 실험동물로서의 한계를 극복할 수 있다.

2. 상품화 및 사업화 방법

실험동물용 Midget 미니돼지의 생산 기술과 품질 검증 기술을 표준화하여 특허 등록할 계획이며 국내외 유명 학술지에 연구 결과를 등재할 계획이다. 또한 본 연구를 통해 생산된 실험동물용 Midget 미니돼지는 참여기업의 국내외 영업 및 마케팅 networks를 활용하여 주로 약물의 nonclinical efficacy, safety test에 사용되며 pilot test를 통하여 실험동물로서의 가치 평가가 확인되면 계약생산 후 공급할 계획이며 부가 기자재 및 기술적인 컨설팅을 통하여 저변을 확대할 계획이다.

1) 개발 제품 정보

	Tiny (개발 전)	Midget (개발 후)
12 개월령 체중 (Kg) (유전력 30 ~ 40%)	25 ~ 35 kg	20 kg 이하
체장 (cm) (유전력 50 ~ 60%)	66 ~ 84	65 이하
적용 범위	Biomedical study	Pharmacology & Toxicology

2) 영업 및 판매 방안

① 참여기업 기존 SPF 미니돼지 영업 및 판매 네트워크 활용

- 참여기업인 피더블유제네틱스코리아(주)는 현재 싱가포르에 현지 법인을 두고 SPF 미니 돼지 실험시설도 갖추고 있는 상태로 향후 아시아권 수출이 증대될 경우 현지 법인을 통한 마케팅 지원이 가능하다.
- 또한 2000년부터 국내 실험동물 시장에서 영업 활동을 해 오면서 의약학 분야 학계 및 기업, 의료기관 네트워크를 충분히 쌓은 상태로 특히 제약 분야에 다양한 활용성이 증대되고 있다.

② 제품의 적용 분야 확장 및 신속한 고객 needs 반영

- 현재 의약학 분야 CRO service에 국한되어 SPF 미니돼지 사업의 적용 분야를 제약 분야의 약리 및 독성 분야로 넓혀 시장 규모를 점차 확대하며 단기, 대량 판매에 역점을 둔다.
- 실험동물에 대한 정책 방향에 따라 비설치류 중형동물 시장을 공급 목표로 우선 설정하고 기존 공급 업체와의 연계를 통하여 영업 및 마케팅 방안을 지속적으로 도출한다.
- 기존의 공동 연구 네트워크를 적극 활용하여 개발된 제품에 대한 고객의 needs를 반영하고 홍보 및 마케팅을 위한 기본 실험 자료를 확보한다.
- 다양한 정보 습득과 주 소비층인 제약 관계자 및 관련 업계, 학계와의 활발한 교류를 위해 주기적인 학술 활동, 세미나, 워크샵 등에 적극 참여한다.

③ 가격경쟁력 확보

- 현재 수입 중동물이 형성하고 있는 높은 가격과 국내산의 낮은 품질을 고려하여 적정 가격 확보에 필요한 요소를 조사 및 보완하여 사업성의 기반을 마련한다.
- 지나친 수요 예측에 따른 재고 부담을 피하기 위하여 계약 생산에 따라 조성된 계통군의 계획 교배를 실시하고 필요하면 SPF 미니돼지 생산 기관에 위탁 생산한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 제품생산 및 시장 현황

○ 국내 실험동물생산 산업규모는 국내생산과 수입을 포함하여 2005년 기준 89억 9백만원이고 판매규모는 110억 3천3백만원으로 집계되었음(한국바이오산업협회 자료).

○ 국내에서 SPF 미니돼지를 생산 및 판매하는 업체는 참여기업이 유일하며, 2006년 판매량은 300두를 기록하였음.

○ 2006년 국내 실험동물사용량은 SPF는 300두, 일반은 약 500두(실험동물산업육성방안과 국내 복지상황 조사연구; 건국대 최양규, 2007)인 것으로 조사되었으며, 주요 실험동물 구매처는 대학이 28%, 산업체와 연구기관이 각각 25%, 의료기관이 15%로 조사되었음(실험동물 생산업체 방문조사 결과보고서; 국립수의과학검역원 동물보호과, 2007).

제 2 절 국외 관련(유사)제품의 생산 및 시장 현황

○ 참여기업의 싱가포르법인과 미국 계열법인의 시장 수요 조사에 따르면 싱가포르의 바이오폴리스, 미국, 유럽, 동아시아에서 SPF 중형 실험동물 수요가 보고되고 있으며 이미 2005년 이후 SPF 미니돼지를 싱가포르 수출하여 주로 심혈관 연구, 치과 임플란트 연구, 연골 및 뼈 세포 치료제 연구, 줄기세포 연구에 활용되고 있음.

○ 현재 실험동물로 주로 사용되고 있는 설치류보다 돼지의 생체 시스템이 사람과 많이 흡사하기 때문에 사람 대신 약물에 대한 정확한 검증을 이루어 낼 수 있는 실험동물로서 미니돼지가 관심을 끌고 있음.

따라서, 이상에서 언급되어진 국내외 시장 현황과 현재 확보하고 있는 참여기업의 기술을 고려해 볼 때 아직 시도되고 있지 않고 또한 그 수요가 급속도로 증가할 틈새시장으로 본 연구의 성공 가능성은 매우 높음.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 실험동물용 Midget 미니돼지의 유전자원 보존 및 관리

1. Midget 미니돼지의 유전자원 보존

미니돼지의 유전자원을 보존하기 위하여 협동과제에서 제공받은 미니돼지의 생식기관을 외과 수술 방법을 이용하여 총 암컷 26두의 난소, 수컷 4두의 정소 및 임신 30일 경 미니돼지에서 적출한 7마리의 태아를 채취하였으며, 세포배양용 조직은 실험실에서 제조한 37℃의 생리식염수에 담았으며, paraffin block을 위한 조직은 액체질소(LN2)에 담아 실험실로 이동 후 유전자 보존 실험을 실시하였다. 면역분석 및 RNA probe를 이용한 hybridization이 용이하게 하기 위하여 without DNAase and RNAase를 첨가한 fix solution에 조직 절편을 넣어 고정한 후 paraffin block을 제작 하였고(Fig. 1-1), 난소 26개 자궁 20개 난관 20개 태아조직 7개 정소 4개로 총 77개의 조직 paraffin block을 제작했다(Table 1-1).



Fig. 1-1. Paraffin block으로 제작하여 보관중인 Midget 미니돼지의 조직 sample 사진.

Table 1-1. 조직은행에 보관중인 Midget 미니돼지 조직 type별 보관현황

	Paraffin product					Total Paraffin Block
	Ovary	Uterus	Oviduct	Fetus	Testis	
Tissues type	26	20	20	7	4	77

이후 제작된 paraffin block을 이용하여 면역 분석 및 in-situ hybridization을 실시한 결과 Fig. 1-2, 1-3와 같았다. H&E staining 분석을 통해 고정조직의 선명도 및 조직을 상태를 확인한 결과 난소의 모양과 난포조직의 모양이 뚜렷했으며, 세포의 모양 및 분포도의 관찰이 용이하였다(Fig. 1-3). H&E staining 실험을 통하여 IHC(Immunohistochemistry) (Fig. 1-2B), in-situ hybridization(Fig. 1-2A)등의 분석결과에서도 문제점을 발견 하지 않았으며, 조직 내 면역분석 실험 및 RNA probe의 보합분석에도 용이 했음을 확인할 수 있었다.

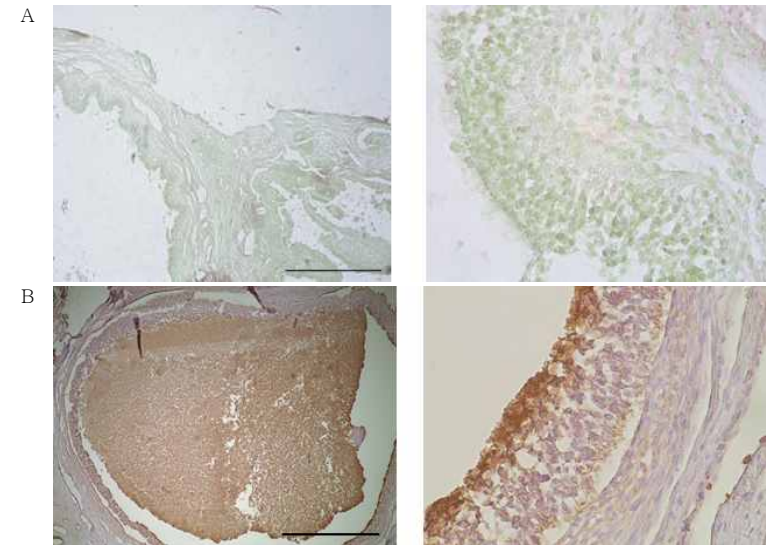


Fig. 1-2. 미니돼지 난소의 paraffin block에서 단백질 발현양상 분석실험.

A: 미니돼지 난포에서 RNA probe를 이용한 In-situ Hybridization.

B: 미니돼지 난포에서 Anti body를 이용한 Immunohistochemistry.

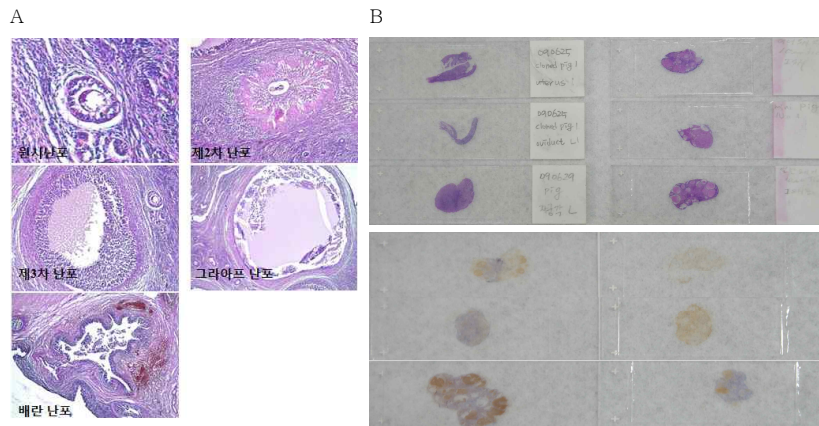


Fig. 1-3. 미니돼지 난포의 발달 단계별 H&E staining 분석.

A: 미니돼지 조직의 H&E staining 분석.

B: 분석을 완료한 slide.

유전자의 보관성을 확인하기 위하여 동결보존된 조직과 paraffin block으로 제작된 조직에서 total RNA를 추출하여 순도 및 농도를 nano-spectrometer에서 분석한 결과 protein contamination (260/280 ratio)의 순도결과에서 동결조직에서 RNA 순도가 1.8이었으며, paraffin 조직의 RNA 순도는 1.78로 purity가 좋았다. 농도는 동결조직은 1120ug/ul이었고, paraffin 조직은 1011ug/ul로 차이가 없었다(Table 1-3). 이후 paraffin 조직에서의 RIN(RNA Integrity Number) 분석을 하기 위하여 RNA 상태를 객관적으로 판단 할 수 있게 28s와 18s, 주변의 peak값을 계산하여 1- 10까지 수치화 시킨 것으로 10에 가까울수록 RNA 상태가 좋은 것으로 확인 할 수 있는데 paraffin 조직에서 RIN값이 7.3이상으로 나타났다(Fig. 1-4).

Table 1-2. 유전자 분석을 위한 Protein, DNA, RNA와 세포의 보관현황

	Genetic Resources					
	Total sample	Protein	RNA	DNA	Cell type	
					Cell	Sperm
Micro Pigs	23	20	11	20		
Midget miniature pig	10	10	10	10	6	5

Table 1-3. 조직보관 생체에 따른 RNA 추출 결과

	Wavelength Absorbance			A260/A280	Conc
	260nm	280nm	320nm		
생 조직	0.058	0.032	0.001	1.81	1120ug/ul
Block 재 추출 RNA	0.253	0.150	0.018	1.78	1011ug/ul
RNA동결 후 해동	0.439	0.243	0.007	1.80	900ug/ul

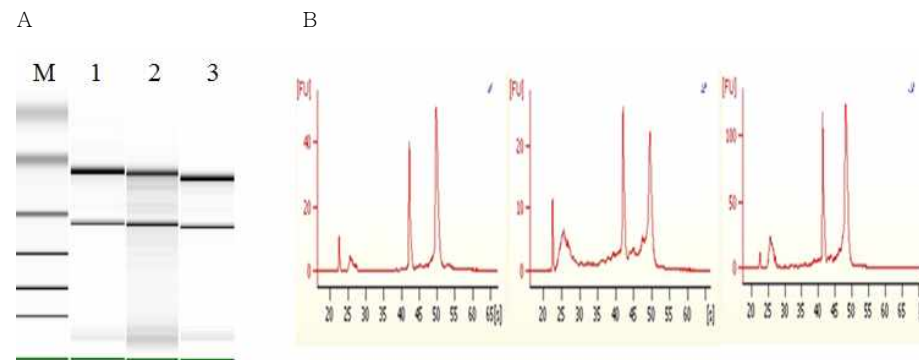


Fig. 1-4. 재추출 RNA의 상태분석을 위한 전기영동 및 RNA Integrity Number 분석.

A: Total RNA 전기영동 결과.

B: RNA Integrity Number 분석 결과.

M: 100bp marker , 1: LN2 보관 생조직 , 2: Paraffin block로 보관된 조직, 3: 기존 추출하여 동결 보관한 RNA를 한 달 이후 해동하여 분석.

2. 유전자은행을 이용한 돼지 Autophagy marker인자 클로닝

미니돼지 유전자은행을 이용하여 세포의 생리학적 중요성이 대두되고 있는 세포사멸기전의 하나인 autophagy를 규명하기 위한 marker인자인 MAP1LC3A(Mizushima, 등. 2001)를 클로닝 하였다. 먼저 기존에 밝혀진 MAP1LC3A의 정보를 기초로 총 980bp 염기서열과 188개의 아미노산으로 구성되어 있는 돼지 MAP1LC3A의 subunit를 복제하였으며, 돼지 MAP1LC3A의 유전자가 다른 포유동물의 MAP1LC3A인자들과 98%이상의 상동성을 나타내고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 본 유전자의 ORF(open reading frame)의 Gly-120 구간인 C-말단 부분(Seidenbecher, 등. 2004)을 제외하곤 동일 염기 서열을 나타낸 것으로 보아 포유류에서 기능하는 MAP1LC3A와 동일한 기능을 가지고 있음을 확인하여 돼지의 MAP1LC3A로 명명하고 GenBank(NO. GU272221)에 등록하였다.

NP_115903.1	1	MPSDR	DRF	DRCKEVOOIR	CHP	KIPVIERYKGEKQLPVLDK	50
XP_001159668.1	1	MPSDR	DRF	DRCKEVOOIR	CHP	KIPVIERYKGEKQLPVLDK	50
XP_534391.2	1	MPSDR	DRF	DRCKEVOOIR	CHP	KIPVIERYKGEKQLPVLDK	50
NP_001039640.1	1	MPSDR	DRF	DRCKEVOOIR	CHP	KIPVIERYKGEKQLPVLDK	50
NP_080011.1	1	MPSDR	DRF	DRCKEVOOIR	CHP	KIPVIERYKGEKQLPVLDK	50
NP_955794.1	1	MPSDR	DRF	DRCKEVOOIR	CHP	KIPVIERYKGEKQLPVLDK	50
XP_417327.2	1	MPSDR	DRF	DRCKEVOOIR	CHP	KIPVIERYKGEKQLPVLDK	50
NP_999904.1	1	MPSDR	DRF	DRCKEVOOIR	CHP	KIPVIERYKGEKQLPVLDK	50
NP_115903.1	51	KFLVPD	HVNMS	ELVNI	RRRLQLNPTQ	AFFLLVNHSMVSVSTP	100
XP_001159668.1	51	KFLVPD	HVNMS	ELVNI	RRRLQLNPTQ	AFFLLVNHSMVSVSTP	100
XP_534391.2	51	KFLVPD	HVNMS	ELVNI	RRRLQLNPTQ	AFFLLVNHSMVSVSTP	100
NP_001039640.1	51	KFLVPD	HVNMS	ELVNI	RRRLQLNPTQ	AFFLLVNHSMVSVSTP	100
NP_080011.1	51	KFLVPD	HVNMS	ELVNI	RRRLQLNPTQ	AFFLLVNHSMVSVSTP	100
NP_955794.1	51	KFLVPD	HVNMS	ELVNI	RRRLQLNPTQ	AFFLLVNHSMVSVSTP	100
XP_417327.2	51	KFLVPD	HVNMS	ELVNI	RRRLQLNPTQ	AFFLLVNHSMVSVSTP	100
NP_999904.1	51	KFLVPD	HVNMS	ELVNI	RRRLQLNPTQ	AFFLLVNHSMVSVSTP	100
NP_115903.1	101	SEKDEDG	FLM	VYASQETFG			121
XP_001159668.1	101	SEKDEDG	FLM	VYASQETFG			121
XP_534391.2	101	SEKDEDG	FLM	VYASQETFG			121
NP_001039640.1	101	SEKDEDG	FLM	VYASQETFG			121
NP_080011.1	101	SEKDEDG	FLM	VYASQETFG			121
NP_955794.1	101	SEKDEDG	FLM	VYASQETFG			121
XP_417327.2	101	SEKDEDG	FLM	VYASQETFG			121
NP_999904.1	101	SEKDEDG	FLM	VYASQETFG			121

Protein Acc.	Organism
NP_115903.1	Homo sapiens
XP_001159668.1	Pan troglodytes
XP_534391.2	Canis lupus familiaris
NP_001039640.1	Bos taurus
NP_080011.1	Mus musculus
NP_955794.1	Rattus norvegicus
XP_417327.2	Gallus gallus
NP_999904.1	Danio rerio

Fig. 1-5. 포유류에서의 MAP1LC3A 유전자의 아미노산 염기서열 상동성 분석.

```

1  GTTACCTCCC CGAGCCGCGG CCGCTGGGCT CAGCGCGAGC CCGAGAGCC TTAGAGGGGA GACCGGAGC CCCCAGACC 80
81  CCCCAGCCAC AGCCACTCC CCGCTGGGCG CGAGCCGGAG CCCCAGCCCT CGCGCTCCCG CCGGCTCTGT CGATGCCCTC 160
                                         M P S
161 AGACCGCGCT TTCAAGCAGC GCGGAGCTT CCGCAGCCG CGTAAGGAGG TGCAGCAGAT CCGCGACCAC CACCCTAGCA 240
    D R P F K Q R R S F A D R R K E V Q Q I R D Q H P S
241 AGATCCCGGT GATCATCGAG CCTACAAGG GTGAGAACA GCTGCCAGTC CTGGACAAGA CCAAGTTCCT GGTCGCCAGC 320
    K I P V I I E R Y K G E K Q L P V L D K T K F L V P D
321 CATGTCAACA TGAGCGAGT GGTCAAGAT ATCCGGCGCC GCGTCAAGT GAACCCGACG CAGGCCCTCT TCCTGCTGGT 400
    H V N M S E L V K I I R R R L Q L N P T Q A F F L L V
401 GAACCAGCAC AGCATGTGA GCGTGTCCAC GCCATCCGG GACATCTATG AGCAGGAGAA GGATGAGGAT GCCTTCCTCT 480
    N Q H S M V S V S T P I A D I Y E Q E K D E D G L Y
481 ACATGGTCTA CCGCTCCAG GAAACCTTCG GCTTCTGAG CAGCAGTAGG GGGTGTGGC TGGGAGTCCG GGGCCCTGTC 560
    M V Y A S Q E T F G F * *
561 AGGCTCTGCC CAGGGAGCTC CTGGCACTGG AACTAAGCTG TCTCTGCCCC TGCCCTGGT GGGTTGGACA GGGATGCTGC 640
641 CACCCAGCCA GAGGCCACT ATCACCCCTA CTCGCCCTCT GGATGGATTC TGCCCCAGTC ATATTAGGCT TGCCCTCCG 720
721 GGTGCTGGCT GGGAGGGGGA AGAGTGGGAA GCAGCCGCGA GCACCCCTGC CCGTGTGGCT TTGCTTTTT TTAGACCCC 800
801 TGCTGTCTG CCCACTGCTC CTOCCCAAC CTGAGGGCGT GCCATCGCT GGATCTGCC ACCCCTGAAG GACTGGCTCC 880
881 TGGCTCACCT GGTCTTGACA TGGTGTATGG CTCTGTGGTC ATTGTCCTT TGCAGATAA AGATTGCTCA GGCTGCCGTC 960
961 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
    
```

Fig. 1-6. Porcine MAP1LC3A 유전자의 염기서열분석.

Accession	Entry name	Protein names	Organism	Gene
Q9H492-1	MLP3A_HUMAN	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A (Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha) (MAP1A/1B light chain 3 A) (MAP1A/MAP1B LC3 A) (MAP1 light chain 3-like protein 1) (Autophagy-related protein LC3 A) (Autophagy-related ubiquitin-like modifier LC3 A)		MAP1LC3A
Q91VR7	MLP3A_MOUSE	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A (Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha) (MAP1A/1B light chain 3 A) (MAP1A/MAP1B LC3 A) (MAP1 light chain 3-like protein 1) (Autophagy-related protein LC3 A) (Autophagy-related ubiquitin-like modifier LC3 A)		Map1k3a
Q2HJ23	MLP3A_BOVIN	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A (Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha) (MAP1A/1B light chain 3 A) (MAP1A/MAP1B LC3 A) (MAP1 light chain 3-like protein 1) (Autophagy-related protein LC3 A) (Autophagy-related ubiquitin-like modifier LC3 A)		MAP1LC3A

```

Q9H492-1  MPSDRFFKQRRSFADRCKEVQQTIRDQHPISKIPVIIERYKGEKQLPVLDRKTKFLVPDHNVM
Q91VR7    MPSDRFFKQRRSFADRCKEVQQTIRDQHPISKIPVIIERYKGEKQLPVLDRKTKFLVPDHNVM
PIG       MPSDRFFKQRRSFADRCKEVQQTIRDQHPISKIPVIIERYKGEKQLPVLDRKTKFLVPDHNVM
Q2HJ23    MPSDRFFKQRRSFADRCKEVQQTIRDQHPISKIPVIIERYKGEKQLPVLDRKTKFLVPDHNVM
.....
Q9H492-1  BELVKIIRRRRLQLNPTQAFLLVNHSMVSVSTPIADIYEQEKDEDDGFLYMVYASQETFG
Q91VR7    BELVKIIRRRRLQLNPTQAFLLVNHSMVSVSTPIADIYEQEKDEDDGFLYMVYASQETFG
PIG       BELVKIIRRRRLQLNPTQAFLLVNHSMVSVSTPIADIYEQEKDEDDGFLYMVYASQETFG
Q2HJ23    BELVKIIRRRRLQLNPTQAFLLVNHSMVSVSTPIADIYEQEKDEDDGFLYMVYASQETFG
.....
Q9H492-1  121  MLP3A_HUMAN
Q91VR7    121  MLP3A_MOUSE
PIG       121
Q2HJ23    121  MLP3A_BOVIN
    
```

Fig. 1-7. 분석된 porcine MAP1LC3A 아미노산 서열과 인간, 쥐 그리고 소와의 염기서열 상동성 분석.

돼지 MAP1LC3A의 발현을 조절하는 프로모터 영역을 분석하기 위하여 chromosome re working방법을 이용하여 총 1,000bp의 구간을 찾았으며, 그 구간에서의 프로모터를 분석한 결과 프로모터 염기서열 내에 3개의 TATA box와 4개의 CAAT box가 존재하고 있음을 확인 할 수 있었으며, 23개의 CpG dinucleotides가 포함되어 있음을 확인 할 수 있었다. 또한 MAP1LC3A의 총 염기서열 내의 Intron과 exon구간을 분석한 결과 4개의 exons과 3개의 introns으로 구성되어 있음을 확인 했다. 본 결과를 토대로 프로모터 작용을 위한 promotor-binding factor를 분석한 결과 CRE-BP(Fernandes, 등. 1994), HSF(Benbrook, 등. 1994) 그리고 ADR1(Cheng, 등. 1994)의 binding factor가 전사 조절인자로 작용할 것 이라 추정할 수 있었다.



Fig. 1-8. Porcine MAP1LC3A 유전자의 프로모터 염기서열과 exon 및 intron 염기서열분석. 약 1051bp의 프로모터 작용부위의 복제와 3개의 intron 그리고 4개의 exon을 알 수 있었음.

Autophagy의 발생은 세포 성장에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다(Tanida, 등. 2004). 특히 세포의 변화가 높은 생식기관인 난소에서 난포의 remodeling과 난구세포 발달에 중요할 것이라 사료되어 본 연구에서 등록된 돼지 MAP1LC3A와 기존에 밝혀진 ATG5의 autophagy marker 인자를 이용하여 난구세포에서의 발현을 알아보기 위하여 DMEM배양 배지에서 48시간동안 CO2인큐베이터에서 배양한 난구세포에 autophagy의 발생을 유도하는 것으로 알려져 있는 rapamycin를 첨가하여 배양한 난구세포에서 MAP1LC3A와 ATG5의 발현양상을 확인하기 위하여 immunofluorescence와 western blotting 방법을 이용하여 분석한 결과 아무것도 처리하지 않은 난구세포의 세포질에 autophagy의 발현을 확인 할 수 있었으며, rapamycin 처리군에서 autophagy marker인자들의 발현이 더욱 높아지는 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과로 LC3A가 돼지 난포세포에서 autophagy의 작용이 나타나는 것으로 확인 할 수 있었으며, 돼지의 난포세포의 발달 및 재구성 시스템에 중요한 역할을 할 수 있을 것 이라 사료되었다. 따라서 본 연구를 통하여 돼지의 난포발달에 대한 세포사멸사의 기전을 설명 할 수 있는 중요한 결과라 사료된다.

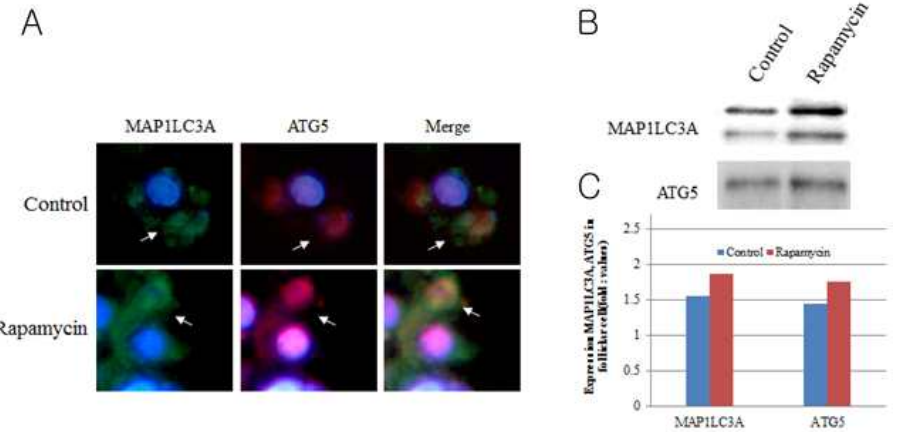


Fig. 1-9. Porcine MAP1LC3A의 발현양상 분석.

A: 미니돼지 난구세포에서의 autophagy marker 유전자인 MAP1LC3A와 ATG5의 in-situ hybridization.

B: 미니돼지 난구세포에서 추출한 단백질에서 MAP1LC3A와 ATG5의 western blotting.

C: 미니돼지 난구세포에서 추출한 RNA에서의 MAP1LC3A와 ATG5의 Real-Time PCR.

3. Midget 미니돼지의 생식세포의 보존

가. Midget 미니돼지 정액의 저온 보존 방법에 따른 생존율 및 침체 정상성

미니돼지 정자의 동결 전 희석액을 사용한 저온 보존성을 분석하기 위하여 Strzezek 1999년과 Fraser와 Strzezek 2004년의 방법을 응용하여 제작한 정액 희석액인 K-3 (69.3 mM fructose, 64.6 mM sodium citrate, 8.0 mM Na₂-EDTA, 14.2 mM potassium acetate, pH 6.8)와 돼지 희석액으로 많이 사용되는 Seminark (NoahBio, Kor)을 사용하였다. Midget 미니돼지의 정액 채취는 의빈대를 이용한 음경수압법으로 채취하여 채취된 정액과 희석액을 1:1 (semen:dialysate)로 섞은 후 16°C에서 1~5일 동안 정자의 생존율 및 일반성상을 분석하였다.

(1) 미니돼지와 일반돼지의 정액량 및 정자농도 비교

미니돼지의 경우 일반 돼지에 비해 정액량 및 정자의 농도가 낮은 것이 일반적인 사실이다. 이에 일반돼지(Duroc)과 미니돼지의 정액량과 정자의 농도를 비교한 결과 Table 1-4과 같다. 미니돼지의 경우 개체별 차이를 보이고 있었으나 평균 정액량은 미니돼지 40±20ml, 일반돼지 130±30ml 정도로 나타났다. 정자의 농도의 경우 5×10⁸±1.8, 일반돼지 6×10⁹±2으로 나타났다.

Table 1-4. 미니돼지와 일반돼지간의 정액량 및 정자의 농도 분석.

	Semen Volume. (ml)	Sperm concentrations (cells/ml)
Midget Mini-Pig(n=3)	40±10	5×10 ⁸ ±1.8
Duroc(n=4)	130±15	6×10 ⁹ ±2

(2) 희석액을 이용한 저온 보존한 미니돼지 정자의 생존율 및 침체 정상성

미니돼지 정자의 원정액 상태(negative)에서의 보관과 희석액 첨가(positive)후 채취 이후 당일, 1일, 3일과 7일 경과 시 생존율은 Leeuw 1991년의 방법을 보완 수정하여 Hoechst33258로 정자를 염색한 후 정자의 두부가 푸른색으로 염색되면 죽은 정자, 염색되지 않은 정자를 살아있는 정자로 판단하여 분석 하였다. 침체 정상성 분석은 Larson과 Miller (1999)의 방법을 보완하여 수행하였으며, 판단 기준은 두부전체에 푸르게 염색된 정자는 침체 정상 정자로 판단하였고, 두부의 주변 및 염색되지 않은 정자는 이상정자로 판단하였다. 생존율과 침체 정상성을 분석은 전체 정자의 400마리를 무작위로 세어 백분율로 환산 하였으며, 4 회 반복 실험하여 평균±S.D로 분석하였다. 각 실험군의 차이점 분석은 SAS package(version 9.1)를 이용하여 ANOVA와 GLM(Generalized linear model)를 적용하여 Duncan의 mul-

tiple range test에 의하여 통계적 유의성(p<0.05)을 분석하였다. 미니돼지 정자의 생존율 및 침체 정상성 분석 결과는 Table 1-5와 같다. 미니돼지의 정액을 원정액 상태로 보관한 결과 당일에는 80.2±2.5%의 생존율을 나타냈고, 85.2±1.5%의 침체 정상성을 보였다. 1일 경과 시에는 생존율이 30.3±1.2%, 침체 정상성이 32.5±1.3%, 3일 경과 시에는 생존율이 10.2±1.4%, 침체 정상성이 20.1±1.4% 이었으며, 7일 경과 시 생존율은 5.3±1.5%, 침체 정상성은 6.6±1.5%로 나타났다. Seminark 희석액을 사용하여 미니돼지의 정자를 저온에서 보관한 결과 당일에는 85.4±1.8%의 생존율을 보였으며, 87.1±1.5%의 침체 정상성을 보였고, 1일 경과 시에는 생존율이 75.0±1.5%, 침체 정상성은 80.2±1.5%, 3일 경과 시 생존율이 70.3±1.4%, 침체 정상성이 71.5±1.4%, 7일 경과 시 생존율이 58.2±1.3%, 침체 정상성은 60.5±1.7%로 나타났다. K-3 희석액을 사용하여 보관한 결과 당일에는 87.3±1.8%의 생존율을 보였고, 침체 정상성은 87.2±1.6% 이었으며, 1일 경과 시 생존율이 80.2±1.4%, 침체 정상성은 83.1±1.5%, 3일 경과 시 생존율은 76.3±1.2%, 침체 정상성은 80.2±1.4%, 7일 경과 시 생존율은 64.3±1.5%, 침체 정상성은 61.2±2.0%이다. 미니돼지 정액의 희석액 간에 있어서 K-3 희석액이 원정액이나 Seminark 희석액을 이용한 저온 보존 보다 생존성이나 정자의 침체 정상이 유의적(p<0.05)으로 높은 결과를 나타내었다. 따라서 당의 첨가가 미니돼지 정자에 좋은 영향을 주는 것으로 사료된다.

Table 1-5. K-3 정액 희석액과 세미나 그리고 원정액을 7일 동안 저온 보관시 정자의 생존율과 침체 정상성

Type of extender	Survival ability							
	0		1		3		7	
	Viability (%)	NAI (%)	Viability (%)	NAI (%)	Viability (%)	NAI (%)	Viability (%)	NAI (%)
Negative	80.2±2.5	85.2±1.5	30.3±1.2	32.5±1.3	10.2±1.4	20.1±1.4	5.3±1.5	6.6±1.5
Seminark	85.4±1.8*	87.1±1.5*	75.0±1.5	80.2±1.5	70.3±1.4	71.5±1.4	58.2±1.3	60.5±1.7*
K-3	87.3±1.8*	87.2±1.6*	80.2±1.4*	83.1±1.5	76.3±1.2*	80.2±1.4*	64.3±1.5*	61.2±2.0*

NAI : Normal Acrosome Intact.

***^a Different letters within the same column represent a significant difference(p<0.05).

나. Midget 미니돼지의 정액의 동결을 위한 동결보존액 개발 및 보관

Midget 미니돼지 정자의 생존성 향상과 우수 종축의 유전자 보존을 위하여 동결 정자의 생존성과 정자의 침체 정상성을 개선하고자 침체와 핵막을 보호하는 것으로 알려진 TES(Garde 등, 2003)가 첨가된 TLE (TES+LEY), TFGE (TES+Fructose+Glucose+Egg Yolk)와 LEY(Westendorf 등, 1973; Roca 등, 2004; Fraser 등, 2007; Sancho 등 2007)를 사용하여 정자의 생존성 및 DNA 손상도를 분석하여 미니돼지에 최적화된 동결보존액을 개발하여 생식세포를 보존하고자 실시하였다.

(1) 동결보존액과 용해 방법에 따른 생존성과 정상성

미니돼지의 정액을 TFGE, TLE, LEY 동결 보존액으로 동결한 후 37℃에서 20초, 45초와 75℃에서 5초 동안 용해하였을 때 생존성 및 정자의 침체 정상성은 Table 1-6과 같다. 37℃에서 20초간 동결 용해 하였을 때 TLE 동결보존액은 동결 용해 후 정자의 생존율이 57.4±1.8%이었고 정자의 침체의 정상성은 58.5±1.8%이었다. TFGE 보존액은 정자의 생존율이 42.4±1.8%, 침체 정상은 50.5±1.6%이었고 LEY 보존액은 정자의 생존율이 38.6±1.8%, 침체 정상성은 44.2±2.6%이었다. 37℃에서 45초간 동결 용해 하였을 때 TLE 동결보존액은 동결 용해 후 정자의 생존율이 58.3±2.1%이었고 정자의 침체 정상성은 57.3±1.4%이었다. TFGE 보존액은 정자의 생존율이 43.2±2.1%, 침체 정상은 48.3±1.4%이었고 LEY 보존액은 정자의 생존율이 38.4±2.1%, 침체 정상성은 41.5±1.4%이었다. 75℃에서 5초간 동결 용해 하였을 때 TLE 동결보존액은 동결 용해 후 정자의 생존율이 61.3±2.4%이었고 정자의 침체의 정상성은 62.2±2.2%이었다. TFGE 보존액은 정자의 생존율이 60.3±2.4%, 침체 정상은 58.6±2.2%이었고 LEY 보존액은 정자의 생존율이 50.2±2.4%, 침체 정상성은 54.5±2.2%이다. 따라서 본 연구결과 동결 보존액이나 용해 방법 간에 있어서 37℃로 20초, 45초 동안 용해한 결과보다 75℃로 5초 동안 용해한 결과가 Almlid와 Johnson(1988)과 최 등(2007)의 결과와 같이 활력 및 침체 정상성이 향상되는 것을 확인 할 수 있었으며, TLE 동결보존액이 다른 동결보존액에 비하여 동결 용해 후 생존성이나 정자의 침체 정상성이 유의적으로 ($p<0.05$)을 높은 결과를 나타내었다.

Table 1-6. 동결 보존액과 해동방법에 따른 미니돼지 정자의 생존율 및 침체 정상성 분석

Type of extender	Survival ability					
	37℃ for 20sec		37℃ for 45sec		75℃ for 5sec	
	Viability (%)	NAI (%)	Viability (%)	NAI (%)	Viability (%)	NAI (%)
TFGE	42.4±1.8	50.5±1.6*	43.2±2.1*	48.3±1.4*	60.3±2.4*	58.6±2.2*
TLE	57.4±1.8*	58.5±1.8**	58.3±2.1*	57.3±1.4**	61.3±2.4** _a	62.2±2.2** _a
LEY	38.6±1.8	44.2±2.6	38.4±2.1	41.5±1.4	50.2±2.4	54.5±2.2

NAI : Normal Acrosome Intact.

***^a Different letters within the same column represent a significant difference($p<0.05$).

(2) Glycerol 농도에 따른 생존성과 정상성

Glycerol 농도가 미니 돼지정자의 동결-용해 후 생존성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 각각의 동결보존액에 glycerol 농도를 1%, 1.5%, 3%하여 동결한 후 75℃에서 5초 동안 용해하여 생존성을 분석한 결과는 Table 1-7와 같다. 1.5% glycerol 첨가된 TLE 보존액에서 동결-용해 후 66.1±3.2%의 생존율과 66.2±1%의 침체 정상성을 나타냈다. TFGE 보존액에서 동결-용해 후 63.2±3.2%의 생존율과 61.2±1%의 침체 정상성을 나타내었다. LEY보존액에서 동결-용해 후 60±3.2%의 생존율과 58.6±1%의 침체 정상성을 나타내었다. 동결보존액에 따른 결과에서 TLE 동결보존액이 다른 동결보존액보다 정자의 생존성과 침체 정상성이 유의적($p<0.05$)높았으며 glycerol 첨가 농도에서는 모든 결과가 유의적인 차이를 보이지는 않았으나, Wilmut와 Polge(1977)에서 밝힌 정자의 생존율은 glycerol의 농도에 따라 정상침체율에 영향을 미친다는 보고에서처럼 본 실험에서 사용된 1.5%첨가 농도가 1% 와 3% 첨가 농도에 비하여 높았다(Table 1-7).

Table 1-7. 동결보존액 별 글리세롤 농도에 따른 동결-융해 이후 미니돼지 정자의 생존율 및 침체 정상성 분석

Type of extender	Glycerol concentration	Viability (%)	NAI (%)
TFGE	3%	58±4.5	57.5±1.8
	1.5%	63.2±3.2*	61.2±1.0*
	1%	43.2±2.1	47.1±2.1
TLE	3%	61.3±4.5*	61.3±1.8*
	1.5%	66.1±3.2**b	66.2±1.0***a
	1%	53.3±2.1	54.2±2.1
LEY	3%	56.2±4.5	52.2±1.8
	1.5%	60±3.2*	58.6±1.0*
	1%	51.2±2.1	50.1±2.1.0

NAI : Normal Acrosome Intact.

*,**,a,b Different letters within same treatments represent significantly difference ($p<0.05$).

(3) 동결보존액에 따른 DNA 손상도

동결보호제가 정자 두부에 미치는 영향을 알아보기 위하여 DNA fragmentation을 분석한 결과는 Fig 1-10과 같다. 동결보존액에 따라 미니돼지 정자의 chromosome DNA상의 손상을 분석한 결과 TLE의 경우 43.3±0.5%의 유의적($p<0.05$)으로 가장 낮은 손상을 보였고, LEY에서 약 63.5±2.3%의 높은 손상을 보였다. TFGE의 경우 약 51.5±1.3%의 손상을 보이고 있어, LEY보단 적은 손상을 나타냈다. 따라서 본 연구결과 TLE 동결보존액을 사용한 정자 동결보존 방법이 미니돼지 정자 동결에 보다 효과적인 것으로 사료된다.

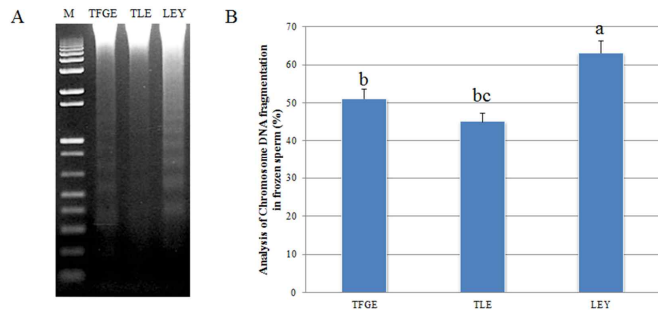


Fig. 1-10. 각 동결보호제로 동결-융해 후 미니돼지 정자의 DNA fragmentation 분석.

A: DNA 전기영동 사진, B: DNA 분절 퍼센트 분석 결과.

a-c Different letters within the same column represent a significant difference ($p<0.05$).

4. Midget 미니돼지 난자의 체외성숙 및 동결보존

가. Midget 미니돼지 난자의 체외성숙 향상을 위한 배양 배지 조성

Midget 미니돼지의 난자의 체외 성숙율을 높이기 위하여 기존에 사용되는 혈청첨가 배양 배지(500μl TCM 199(5%BSA)에 10ng/ml EGF, 0.5mM cysteine, 0.91mM Na pyruvate, 75μg/ml penicillin, 50μg/ml streptomycin 0.5μg/ml FSH, 0.91μg/ml LH)와 본 실험실에서 제조한 porcine New-IVM 배양 배지(New IVM Buffer(500μl TCM 199, 3M NaHCO3, 1mM Citrate, 1.3mM Cysteamine, 40mM Taurine, 1% Anti-bio&myco)에 0.02μg/ml Estradiol, 10ng/ml EGF, 0.5μg/ml FSH)를 사용하여 Midget 미니돼지 난자의 1차 체외 성숙을 38℃, CO2 배양기에서 22시간 동안 유도한 후 혈청과 호르몬이 제거된 2차 성숙 배양 배지에 넣어 38℃, CO2 배양기에서 22시간 동안 배양하여 체외성숙을 완료 하였다. 완료된 성숙난자는 0.5% Hyaluronidase가 첨가된 TCM-199 배양액에 넣은 후 20분 동안 배양한 후 난구세포를 제거 하였다. 그 후 Hoechst33342 1μl에 T-washing 200μl 섞은 다음 hyaluronidase 처리를 한 난자를 옮겨주었다. 배양기에서 20분을 배양한 다음 slide에 옮겨 형광현미경(Ax-70)을 통해서 400배하에서 관찰하였다. 성숙 평가 방법은 먼저 체외성숙이 끝난 후 난구세포가 팽화된 상태의 난자를 육안으로 관찰하였고, 제 1극체의 방출을 형광현미경하에서 관찰하여 백분율로 환산 하였다. 체외성숙 배양 배지에 따른 미니돼지 난자의 체외 성숙을 분석 결과는 Table 와 같다. 혈청배양액에서는 75.2±2.3%의 난구세포 팽화율을 보였으며, 72.5±1.8%의 제 1극체 방출을 확인 할 수 있었다. 새롭게 제조된 Porcine IVM-medium에서의 난구세포 팽화율은 77.1±1.4%였고, 제 1극체 방출은 75.3±1.6%로 두 배양 배지간의 유의적 차이는 없었으나 Porcine IVM-medium이 혈청첨가 배양배지 보다 약간 높은 성숙율을 나타냈다(Table 1-8).

Table 1-8. 난자 성숙 배지에 따른 미니돼지 난자의 난구세포 팽화를 및 제 1극체의 방출

IVM medium	Expansion of Porcine Cumulus Oophorus(%)	Extrusion Rates of 1st pb(%)
BSA medium	75.2±2.3	72.5±1.8
Porcine IVM-medium	77.1±1.4	75.3±1.6

나. 제조한 porcine IVM-medium에 호르몬 첨가에 따른 Midget 미니돼지의 난자의 성숙을 Porcine IVM-medium에 FSH, LH 그리고 FSH+LH 호르몬을 첨가하여 Midget 미니돼지 난자를 성숙시켜 성숙율을 분석한 결과는 Table 1-9, Fig. 1-11와 같다. 호르몬을 처리하지 않은 군에서 난구세포 팽화율은 $60.2 \pm 1.3\%$ 였으며, 제 1극체의 출현율은 $61.5 \pm 1.8\%$ 였다. FSH 호르몬을 처리하여 체외성숙을 유도한 군은 $77.1 \pm 1.4\%$ 의 난구세포 팽화율과 $75.3 \pm 1.6\%$ 의 제 1극체의 출현을 나타냈고, LH처리군은 $77.1 \pm 1.4\%$ 의 난구세포 팽화율과 $73.5 \pm 1.2\%$ 의 제 1극체 출현율을 나타냈다. FSH와 LH 호르몬을 동시에 처리한 군은 $81.2 \pm 1.3\%$ 의 난구세포 팽화율과 $80.5 \pm 1.3\%$ 의 제 1극체 출현율을 나타내어 FSH와LH의 호르몬을 동시에 처리하여 체외성숙을 유도한 처리군이 유의적인 차이는 없었지만 높은 체외 성숙율을 나타냈다.

Table 1-9. 호르몬 첨가에 따른 미니돼지 난자의 체외성숙을 분석

With hormones	Expansion of Porcine Cumulus Oophorus(%)	Extrusion Rates of 1st pb(%)
Control	60.2 ± 1.3	61.5 ± 1.8
FSH	77.1 ± 1.4	75.3 ± 1.6
LH	74.2 ± 2.5	73.5 ± 1.2
FSH+LH	81.2 ± 1.3	80.5 ± 1.3

다. 체외 성숙난자의 동결

IVM이 끝난 난자는 DPBS에 0.1%hyaluronidase를 첨가한 배지에 넣고 30~40초 간 Vortexing을 하여 난구세포를 분리시킨 후 20% FBS를 첨가한 D-PBS (with out Ca^{2+}) (HM)에 넣어 5분 동안 평행화 단계를 수행한다. 그 후 IVM 배지에 7.5 g/mL cytochalasin B를 첨가한 배지에 15분 동안 유리화를 시킨다. 유리화 시킨 난자는 HM 배지에 1.2M ethylene glycol(EG)과 0.89M dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가한 solution에 넣어 1분간 노출 시키고, 다시 HM 배지에 1.6M EG와 1.18M DMSO를 첨가한 solution에 3분 동안 노출한다. 이후 vitrification solution (HM 배지에 2.4M EG+1.77M DMSO=0.5M sucrose)에 40~60초간 정지한 후 0.25cm straw에 load한 후 18℃로 유지 되어있는 순차 동결기에 장착한 후 25분 동안 -7℃가 되도록 한 후 약 5분 후에 면봉을 이용하여 straw에 seeding하여 10분간 정지한다. 이후 1시간 30분 동안 -35℃까지 온도를 저하시킨 후 10분간 정지 후 LN2에 straw를 침치하여 LN2 유전자 보관통에 보관하였다.

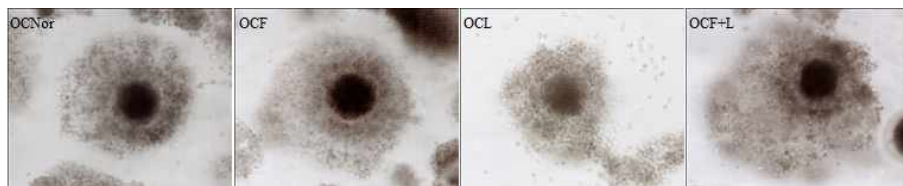


Fig. 1-11. 호르몬 첨가에 따른 난구세포 팽화율 분석.

OCNor : 호르몬 무첨가군 , OCF : FSH호르몬 첨가군 , OCL : LH 호르몬 첨가군 , OCF+L : FSH+LH 호르몬 첨가군.

5. Midget 미니돼지 정자의 동결-융해 후 기저막분해효소(MMPs) 발현 및 수정률

가. Midget 미니돼지 동결-융해 정자의 원형질막 정상성 및 수정율

동결보호제가 정자 두부에 미치는 영향을 분석하기 위하여 정자 원형질막 강도 분석과 수정률을 평가한 결과는 Fig. 1-12, Table 1-10와 같다. 미니돼지의 동결보존액에 따른 HOST 양성 반응을 분석 결과는 Fig. 1-12과 같았다. glycerol 1.5%가 첨가된 TFGE, TLE와 LEY의 동결보존액을 75°C 5초 간 융해한 결과 TFGE와 LEY는 유의적 차이는 나타나지 않았다. 그러나 TLE는 다른 동결보존액에 비하여 유의적($p < 0.05$)으로 높은 HOST 양성 반응율이 나타났고, LEY의 경우 낮은 HOST 양성 반응율이 나타났다.(Fig. 1-12).

정자의 수정능을 평가하기 위하여 일반돼지의 난자를 이용한 수정률 평가를 분석한 결과 TFGE의 경우 체외수정 후 2일차에서 2cell 이상 43.2%의 수정률을 보였으며, 4일 후 2cell 이상의 수정란에서 4cell 이상까지 발달률은 83.5%였고 4cell 이상에서 배반포의 발달률은 42%의 결과를 보이고 있었다. TLE의 경우 수정 후 2일차에서 46%의 수정률을 보이고 있으며, 2cell 이상에서 4cell이상까지의 발달률은 74.8%를 나타내고 있었고, 4cell 이상에서 배반포까지 40%의 발생률을 확인 할 수 있었다. LEY의 경우 체외수정 후 2일차에서 34.2%의 수정률을 확인 할 수 있었으며, 2cell 이상에서 4cell이상까지의 발달률은 67%를 나타내고 있었고, 4cell 이상에서 배반포까지 36%의 발생률을 확인 할 수 있었다(Table 3).

체외수정에서 배반포 발달까지의 결과를 확인해본 결과 LEY의 경우 배반포 발생률이 가장 낮게 나타났으며, TLE와 TFGE에서의 발생률은 비슷하게 나타났다.

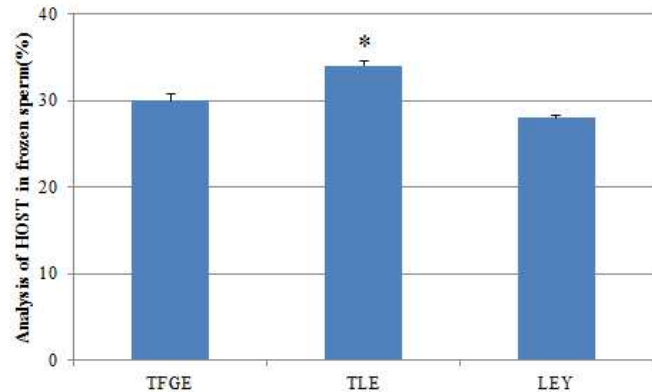


Fig. 1-12. 각 동결보존액으로 동결-융해 후 미니돼지 정자의 HOST분석 결과.

*Different letters within the same column represent a significant difference ($p < 0.05$).

Table 1-10. 각 동결보존액으로 동결-융해한 미니돼지 정자의 체외수정 결과

Type of extender	No. of oocytes	No. of oocyte		
		2 cell	4 cell	Blastocyst
TFGE	238	103(43.2%)	86(83.5%)	36(42%)
TLE	250	115(46%)	86(74.8%)	34(40%)
LEY	266	91(34.2%)	61(67%)	22(36%)

나. Midget 미니돼지 정자의 동결보호제에 따른 세포외기저질 분해효소의 발현양상 및 활성화

미니돼지 정자에서 세포외 기저질 분해효소인 MMP-2,9와 TIMP-2,3의 발현양상을 ELISA와 zymography로 분석한 결과 Fig. 1-13, Fig. 1-14와 같다. 분해효소인 MMPs의 발현양상을 분석한 결과 세포외 기저질에서 작용하는 MMP-2의 경우 TFGE에서 유의적($P < 0.05$)으로 높게 발현되는 것으로 확인되었으며, TLE와 LEY는 큰 차이를 보이지 않았지만 LEY에서 약간 높은 발현을 보이고 있었다. 세포외 기저막에서 작용하는 MMP-9의 경우 LEY에서 유의적으로 가장 높은 발현을 보이고 있었으며, TLE에서 낮은 발현을 나타내고 있었다. MMPs의 억제인자인 TIMPs의 경우 TIMP-2와 3 모두 TFGE와 TLE에서 높은 발현을 나타내고 있고, LEY에서는 유의적으로 낮은 발현을 보이고 있어, MMPs의 발현양상과 상반된 발현이 나타나고 있음을 확인 할 수 있었다.

MMPs의 활성을 분석하기 위하여 zymography를 확인한 결과 모든 그룹에서 MMPs의 활성을 분석할 수 있었으며(Fig. 1-14), pro-MMP가 active MMPs에 비하여 낮은 발현을 보이고 있었고, MMP-9의 경우 LEY에서 가장 높은 활성을 나타내고 있었다. MMP-2의 결과도 MMP-9의 결과와 비슷했으며, Tea-N-tris 첨가 보호제인 TFGE와 TLE에서는 LEY보다 낮은 활성 MMPs를 관찰 할 수 있었고 그중 TLE가 가장 낮은 MMPs의 활성을 나타내고 있었다(Fig. 1-13).

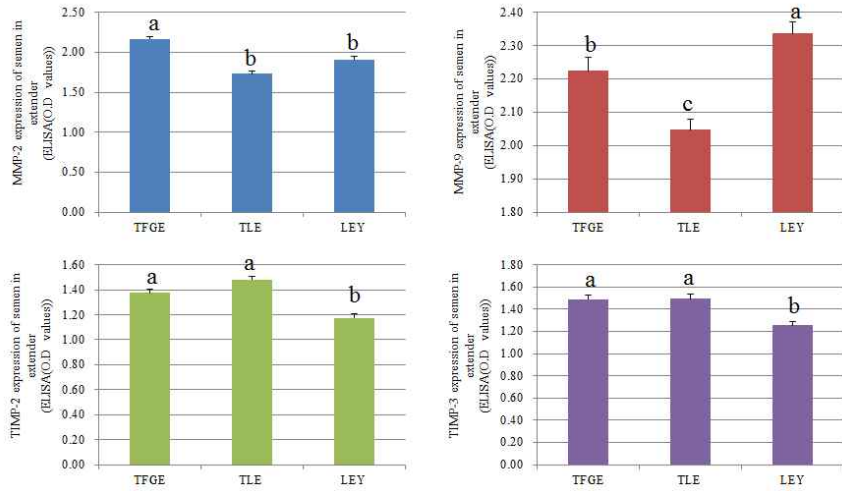


Fig. 1-13. 각 동결보호제로 동결-융해한 미니돼지 정자의 MMP-2, 9 그리고 TIMP-2, 3의 ELISA 분석.

a,b,c Different letters within the same column represent a significant difference (p<0.05)

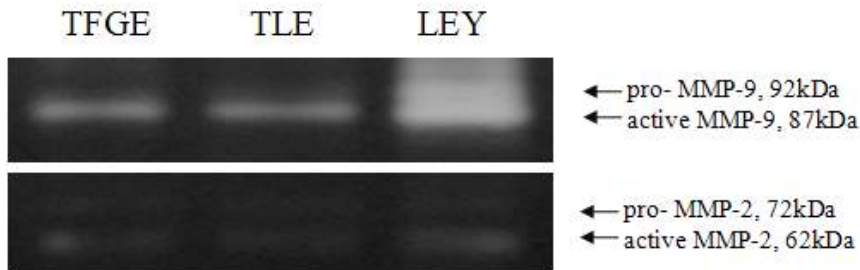


Fig. 1-14. 미니돼지 정자에서 추출한 단백질에서의 MMP-2, 9의 활성도 분석을 위한 zymography 분석.

다. 정자에서 세포외 기질 분해효소 및 억제인자의 발현 및 위치분석

미니돼지 정자에서 세포외 기질 분해효소인 MMP-2, 9과 TIMP-2, 3의 발현 및 위치 분석을 한 결과 Fig. 1-15, Fig. 1-16와 같다. 먼저 MMP-2, 9의 발현양상 분석 결과 정자의 두부에서 발현되고 있음을 확인 할 수 있었는데 MMP-2의 경우 두부의 주변에 주로 발현 높았음을 관찰할 수 있었으며, MMP-9의 경우 두부의 중심부와 중편부, 미부에서 높은 발현이 있음을 관찰 할 수 있었다. 각 동결 보호제 별로 발현양상을 분석한 결과 ELISA의 분석 결과와 같은 양상으로 LEY에서 높은 발현양상을 보이고 있었으며, TLE에서 가장 낮은 발현을 보이고 있었다(Fig. 1-15). TIMPs의 발현양상을 분석한 결과 TIMP-2, 3 모두 정자 두부의 전체에서 발현을 확인 할 수 있었다. 발현양상은 LEY에서는 TIMP-2, 3 모두 미약하게 관찰되었으며, TFGE와 TLE에서 많은 발현을 관찰 할 수 있었으며, 그 중 TLE에서 가장 높은 TIMPs의 발현을 확인 할 수 있었다(Fig. 1-16). 따라서 본 연구 결과는 일반돼지에서 주로 사용되고 있는 동결보호제인 LEY에 Tea-N-tris를 첨가하여 동결한 미니돼지 정자가 MMPs의 발현 및 DNA 손상을 줄여주는 역할을 하여 정상적인 동결에 좋은 효과를 줄 수 있을 것이라 사료된다.

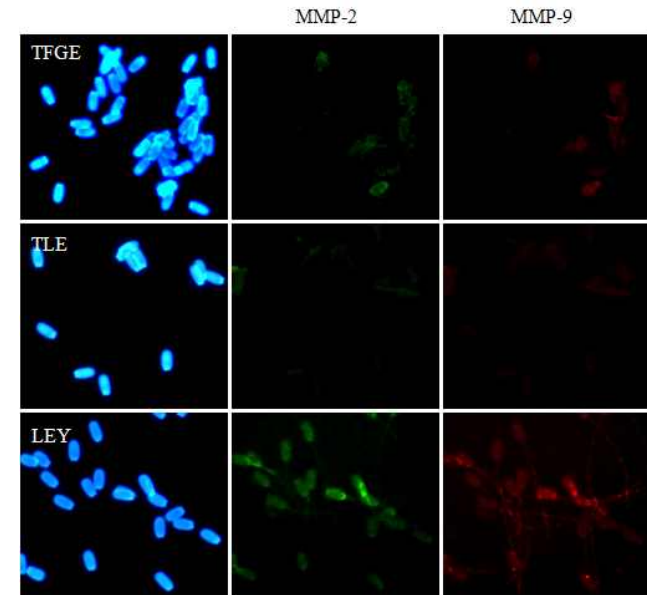


Fig. 1-15. 미니돼지 정자에서의 Immuno-fluorescence 분석을 MMP-2, 9의 발현양상. 형광현미경 200배하에서 분석.

6. 돼지 난자 성숙에 따른 기저막분해효소(MMPs) 발현 및 수정률

가. 돼지 체외성숙란과 난구세포의 mRNA상의 MMPs, TIMPs의 발현양상

24시간, 36시간 및 48시간 동안 성숙되어진 돼지의 난자와 난구세포의 mRNA에서 발현양상을 분석한 결과(Fig. 1-17) 대체적으로 cumulus cell에서의 발현양상이 두드러지게 나타나고 있음을 확인하였으며, 난자에서도 mRNA의 발현을 확인할 수 있었다. MMP-2의 경우 36시간의 난구세포에서 발현이 나타났으며, 그에 따라 inhibitor인 TIMP-2도 높게 발현되었다. 난자의 경우에는 48시간에 MMP-2의 발현이 가장 많이 나타났으며, 난구세포에서의 반응은 미미하였다. 또한 이시기에 TIMP-2의 발현도 낮게 나타났다. MMP-9의 경우 24시간에서 48시간까지 난구세포에서 큰 변화 없이 발현되었고, inhibitor인 TIMP-3의 경우 48시간째에 급격하게 증가하였다. 난자의 경우에는 24시간째에 MMP-9의 발현이 가장 많이 나타났으나, TIMP-3의 경우 큰 폭 없이 발현되다가 48시간째에 MMP-9의 발현과 비슷하게 발현되었다.

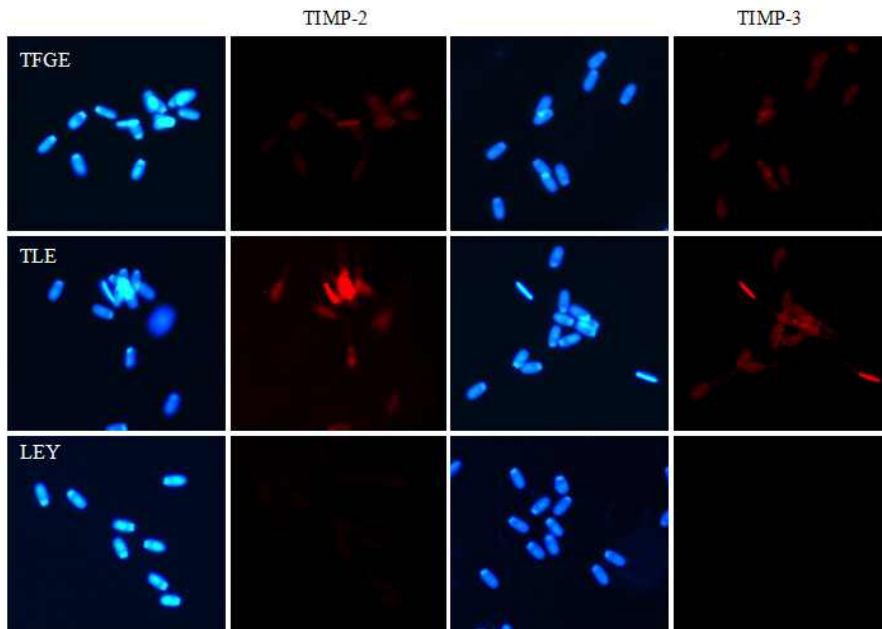


Fig. 1-16. 미니돼지 정자에서의 Immuno-fluorescence 분석을 TIMP-2, 3의 발현양상. 형광현미경 200배하에서 분석.

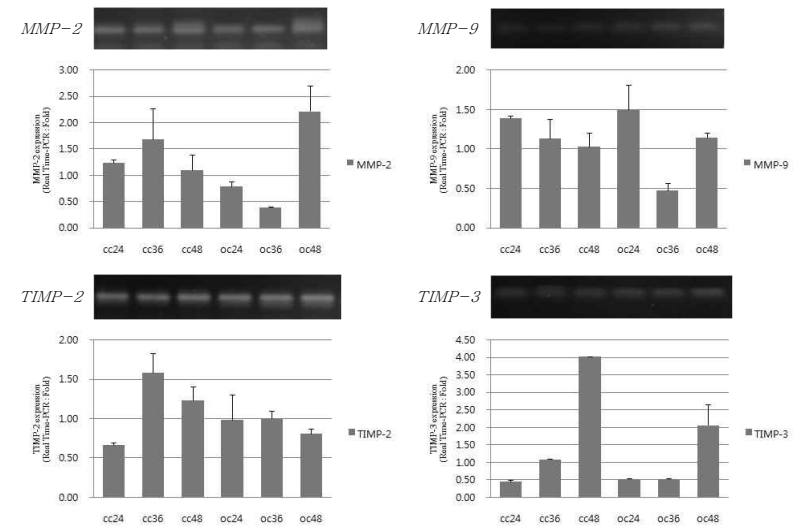


Fig. 1-17. 24, 36, 48시간 동안 성숙된 난구세포와 돼지의 난자의 mRNA 상 MMP-2, MMP-9, TIMP-2, TIMP-3 발현양상.

나. Zymography를 통한 MMP-2 및 MMP-9의 활성화 분석 및 난자에서의 MMP-2, 9의 발현양상

난자 및 난구세포에서 활성화되는 MMP-2와 MMP-9을 분석하기 위하여 성숙배양 배지에서 zymography를 분석한 결과(Fig. 1-3) MMP-2의 활성화는 분석할 수 있었으나 MMP-9의 활성화는 분석할 수 없었다. 먼저 난자만을 배양한 배지에서는 24시간에서 48시간까지 점차 증가하는 것으로 확인할 수 있었으며, 난구세포만을 배양한 배지에서는 48시간에서 가장 많이 활성화되었다. 난자와 난구세포가 균일하게 분포되어 있는 배양액에서는 비슷하게 활성화되고 있었으나, 48시간 때에 MMP-2 활성도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

Zymography의 결과를 토대로 난자와 난구세포에서의 MMP-2와 TIMP-2의 발현위치를 분석하기 위하여 발현이 가장 많이 나타난 36시간의 난구세포가 없는 난자와 난구세포가 균일하게 있는 난자에서 면역염색을 실시하였다(Fig. 1-18). 난자에서의 MMP-2의 경우 투명대부근에서 가장 많이 발현되고 있는 것을 확인할 수 있었으며, TIMP-2의 반응은 투명대에서 발견할 수 있었으나 그 발현은 미미한 편이었다(Fig. 1-19, A, A1). 난구세포에서의 경우 확장되어 있는 난구세포 전반에 걸쳐 발현을 하고 있음을 확인할 수 있었으며, TIMP-2의 반응은 난자에서의와 같이 미미하게 발현되고 있었다(Fig. 1-19, B, B1).



Fig. 1-18. Zymography를 통한 MMP-2 및 MMP-9의 활성화 분석.

Sample list : culture medium of the oocytes(CMOC) , culture medium of the cumulus cell(CMCC) , culture medium of the cumulus-oocyte complexes(CMCOCs). 1) CMOC 24시간 동안 성숙 유도, 2) CMOC 36시간 동안 성숙 유도, 3) CMOC 48시간 동안 성숙 유도, 4) CMCC 24시간 동안 성숙 유도, 5) CMCC 36시간 동안 성숙 유도, 6) CMCC 48시간 동안 성숙 유도, 7) CMCOCs 24시간 동안 성숙 유도, 8) CMCOCs 36시간 동안 성숙 유도, 9) CMCOCs 48시간 동안 성숙 유도.

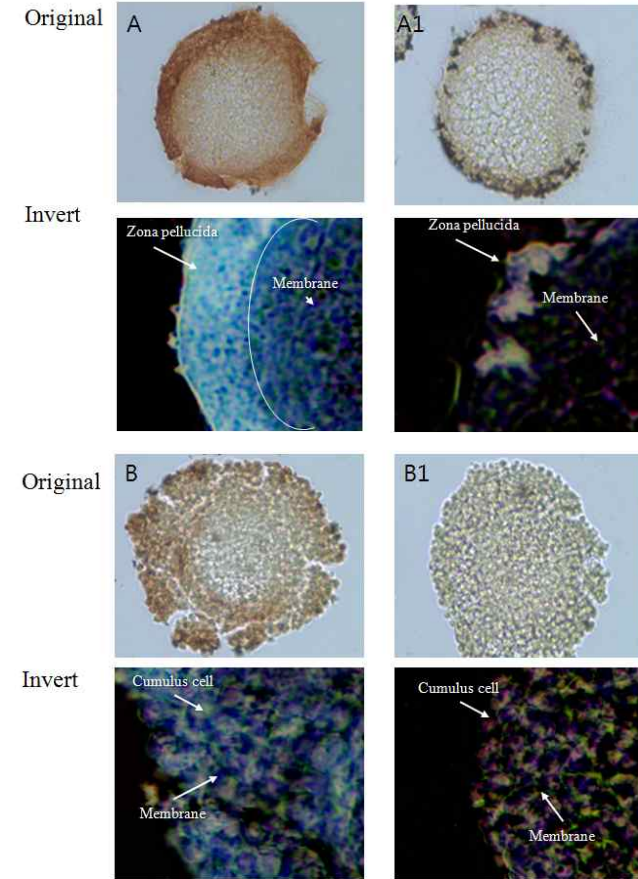


Fig. 1-19. 면역염색방법을 통한 난자와 난구세포에서 MMP-2, TIMP-2의 발현 위치 분석.

A, A1: Oocytes at 36hr.

B, B1: Cumulus-oocyte complexes at 36hr.

다. 면역형광염색을 통해 MMPs와 TIMPs의 발현양상 분석

MMP-2와 MMP-9 및 inhibitor인 TIMP-2, TIMP-3의 발현양상을 형광현미경하에서 분석한 결과(Fig. 1-5, Fig. 1-6), MMP-2는 24시간부터 48시간까지 점차 발현양상이 높아지고 있음을 확인 할 수 있었는데, 24시간에서는 난자 내에서 약간의 발현을 확인할 수 있었으며, 36시간에서는 난구세포 위주로 발현하였다. 그러나 48시간의 난자에서는 극체를 중심으로 난자 내 전체적으로 발현이 나타나고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 1-5, A, B, C). TIMP-2의 경우 36시간 배양 난자에서 가장 많이 발현하고 있었으며, 24시간과 48시간에는 발현양이 미미함을 확인할 수 있었는데, 초기 24시간에서는 난자 내에서의 발현을 관찰할 수 있었지만 이후 36시간 48시간에서는 난자내의 발현을 관찰할 수 없었으며, 난구세포 위주의 발현만을 확인할 수 있었다. MMP-9의 경우 MMP-2와 달리 전체적으로 발현양상을 관찰할 수 없었으나, 24시간 때의 난자 내에서 약간의 발현을 확인 할 수 있었으며, 36시간에는 미약하게 발현하고, 48시간에는 발현양상을 관찰할 수 없었다(Fig. 1-6, A, B, C). MMP-9의 inhibitor인 TIMP-3의 경우 24시간부터 48시간까지 활발한 발현양상을 관찰할 수 있었으며, MMP-9의 발현과 상반되는 발현양상을 나타내고 있었다(Fig. 1-6, D, E, F). 본 결과를 통해 MMPs와 TIMPs의 발현은 난구세포에서만 발현되는 것이 아니라 난자 내에서도 단백질 발현의 양상을 관찰 할 수 있었다. 따라서 본 연구결과에서 MMP-2의 발현은 성숙시간이 늘어날수록 난구세포에서 난자 자체의 발현으로 점차 그 역할이 바뀌어가고 있음을 확인 할 수 있었으며, TIMP-2의 발현은 24시간에서 36시간까지 적절하게 발현하고 있었으나, 48시간에는 MMP-2의 발현에 비해 극히 적은 발현을 보이고 있어 결과적으로 MMP-2는 난자의 성숙이 진행될수록 발현이 극대화하는 것으로 보아, Fiona 등(2000)에서 보고되어 있는 난포의 상태를 볼 수 있는 마커로 사용할 수 있다는 결과와 마찬가지로 난자의 성숙도를 확인할 수 있는 결과라고 말할 수 있다. 다른 점이 있다면 난포의 마커로 사용할 수 있다고 시사되었던 MMP는 MMP-9이라는 것이지만 본 연구 결과와 비교한 결과 성숙이 되는 과정에서 난자 및 난구세포에서 발생되는 MMP-2가 난포에 pro-MMP-9을 자극하여 MMP-9의 활성화를 이루는 것(Birkedal-Hansen 등 1993)이라 추측할 수 있다. 따라서 이상의 결과를 종합할 때 난자의 체외성숙 초기과정부터 성숙이 완료되는 시점까지 MMP-2의 역할은 발달에 있어 결정적인 요인으로 자리 잡을 수 있다는 것이며, 난구세포에서만 분비되는 것이 아니라 난자 내에서도 같이 합성되어 성숙을 완료할 수 있는 것이라 사료된다.

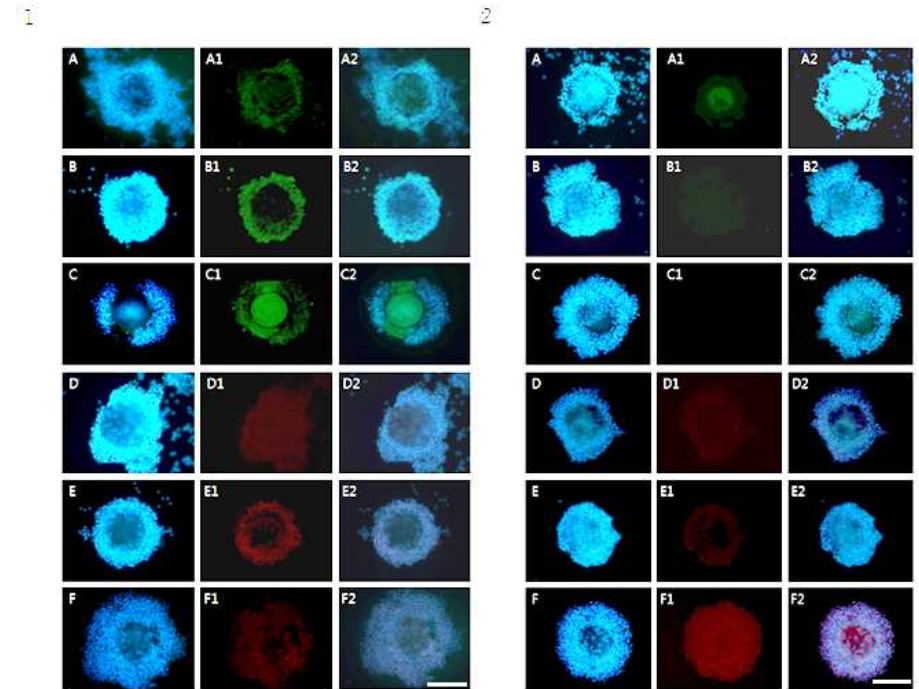


Fig. 1-20. 면역형광염색을 통한 MMP-2, 9과 TIMP-2, 3의 발현양상 분석. 녹색은 MMPs의 발현양상이고, 붉은색은 TIMPs의 발현양상이다.

1: 난자에서의 MMP-2와 TIMP-2의 발현양상 분석.

2: 난자에서의 MMP-9과 TIMP-3의 발현양상 분석.

A, D) 난자의 24시간 성숙배양 , B, E) 난자의 36시간 성숙배양 , C, F) 난자의 48시간 성숙배양.

제 2절 실험동물용 Midget 미니돼지의 개량 시스템 개발

1. 기초축 조성을 위한 교배 계획 수립 및 후보축 선발

가. 기존 축군에 대한 능력 조사 및 후보축 선정

기존 축군에 대한 능력 조사 및 후보 축을 선정하여 Table 2-1과 같이 T형이 M형에 비하여 체중 및 체형이 작은 계통으로, 형의 개체 중 기초 축군 조성을 위한 종돈을 선발하였다. 이계 연간 상호 교배를 하기 위해 수컷 2두와 암컷 10두를 선정하고 암컷 각 5두에 수컷 1두를 우선 교배하였으며, 암태지는 분만 후 수태지를 교대하여 교배 실시하였다.

Table 2-1. MK에서 보유하고 있는 M형과 T형의 체중 및 체형

Type	체중	체장	흉위	체고
M	48.3 ± 7.57	77.1 ± 8.13	81.5 ± 9.62	44.7 ± 4.98
T	36.0 ± 6.91	72.2 ± 6.29	72.0 ± 9.66	37.9 ± 4.30

나. 미니돼지의 모색 분리 양상 조사

미니돼지의 모색 분리 양상을 조사하기 위하여 Table 2-2와 같이 백색과 유색의 수컷과 암컷을 교배하여 조사하였다. 모색 발현 양상을 조사한 결과, 모색은 아직 고정되지 않은 것으로 나타났으며 이를 통하여 아직 미니돼지에 대한 유전적 균일성은 낮은 것으로 사료되었다. 따라서 기초 축은 백색을 기준으로 선발 실시하기로 하였다.

Table 2-2. 미니돼지의 모색 분리 양상

- 백색 (수컷) X 백색 (암컷)

백색				유색				총합			
산자수	평균	표준편차	%	산자수	평균	표준편차	%	산자수	평균	표준편차	%
31	3.1	1.29	66	16	1.6	1.07	34	47	4.7	1.49	100

- 백색 (수컷) X 유색 (암컷)

백색				유색				총합			
산자수	평균	표준편차	%	산자수	평균	표준편차	%	산자수	평균	표준편차	%
26	2.6	1.96	42.6	35	3.5	2.17	57.4	61	6.1	1.97	100

- 유색 (수컷) X 백색 (암컷)

백색				유색				총합			
산자수	평균	표준편차	%	산자수	평균	표준편차	%	산자수	평균	표준편차	%
25	2.5	1.78	42.4	34	3.4	1.89	57.6	59	5.9	1.91	100

- 유색 (수컷) X 유색 (암컷)

백색				유색				총합			
산자수	평균	표준편차	%	산자수	평균	표준편차	%	산자수	평균	표준편차	%
2	0.2	0.63	4.1	47	4.7	1.89	95.9	49	4.9	1.45	100

다. 생산 자돈에 대한 검정 계획 수립

추후 생산하는 자돈의 개량을 위해서 자돈 생산 후 6주 이내에 이유를 실시하였으며 검정 계획으로는 일령 기준으로 검정을 실시하였다. 일반돼지의 경우에는 일반적으로 체중 기준으로 검정계획을 수립하지만 미니돼지의 경우 생육 특성상 일령 기준의 수립이 검정에 유리하다. 자돈 동기군의 평균 생후 60일령에 검정을 실시하였으며 평균 150일령에 검정 종료를 하였다. 검정 개시 후 30일령 마다 체중 및 체형의 조사가 이루어 졌으며 측정은 오전에 공복시 측정하였으며 동기군 설정을 위하여 1일 1회에 조사군 전체에 대한 측정을 실시 하였다. 정확한 조사를 위해 일령에 대한 보정은 NSIF(미국 돼지 개량 협회)의 검정 가이드 라이의 기준에 따라 실시 하였다.

라. Computer simulation을 통한 유전적 개량량 예측

Computer simulation을 위하여 초기 체중은 50 ± 1.0 kg, 유전력 0.3, breeding male 2두, breeding female 10두, 이유율 95%, 생존율 95%의 초중부 년 령 2세, 수태지 도태 년 령 4세, 암태지 도태 년 령 7세와 같은 조건으로 simulation을 실시하였다.

2두의 수태지와 10두의 암태지를 이용하여 집단을 조성하는 경우, 임의 교배를 실시하는 경우 근친도는 6.2% 상승할 것으로 예측되었다. 이는 당초 계획한 10% 이내로 근교라인으로 조성한다는 기준 목표에 부합하는 것으로 나타났다(Fig. 2-1). 하지만 육종가에 의한 선발을 할 경우 10년 후 근친율은 12% 정도로 상승할 것으로 나타났으며 표현형에 의한 선발보다 개량의 효과가 클 것으로 나타났다. 그러나 10년간 2kg 정도가 변화할 것으로 예측되어 유전적 개량량을 높이기 위한 시도가 필요할 것으로 예측된다.



Fig 2-1. Computer simulation을 통한 표현형과 육종가 추정.

마. 검정 성적

평균 생시체중은 500g 내외로 일반돼지에 비해 낮았으며 교배 종모돈과 종빈돈에 대하여 차이를 나타내었다(Table 2-3).

Table 2-3. 생산 자돈의 평균 생시 체중 및 평균 생시 체장

Sire	Dam	자돈수	평균 생시체중(g)	평균 생시 체장(cm)
A	10	5	481.0	26
B	6	5	489.2	26.4
B	9	7	542.6	27.4
평균		5.7	508.8	26.7

2. 미니돼지 계통의 조성 및 성장 표현형 측정

가. 미니돼지 계통 검정

기초 축군에 대해 부돈과 외조모돈에 의해 각각 2라인과 3라인으로 분류하였으며 이를 조합하여 5개의 계통을 조성하였다. 각 계통에 대해서는 매 2개월령 마다 12개월령까지 체중과 체장을 측정하였다(Table 2-4, 2-5).

Table 2-4. 각 계통별 월령별 체중의 평균 및 표준편차

계통	월령	2	4	6	8	10	12
AG1	평균	6.4	11.2	16.6	19.5	26.2	30.5
	표준편차	1.15	2.41	3.55	5.54	6.66	7.16
BG1	평균	8.2	15.0	21.9	24.5	26.3	27.8
	표준편차	1.70	1.63	1.89	1.91	2.50	2.50
BG2	평균	4.8	12.2	18.7	24.2	28.0	31.7
	표준편차	1.00	2.17	2.11	2.05	3.00	4.16
AG2	평균	5.6	9.5	17.3	21.2	24.2	28.8
	표준편차	1.39	1.52	2.25	2.93	4.66	4.85
BG3	평균	4.8	12.6	16.6	20.0	22.4	25.6
	표준편차	0.84	2.41	2.07	2.65	2.61	3.65

Table 2-5. 각 계통별 월령별 체장의 평균 및 표준편차

계통	월령	2	4	6	8	10	12
AG1	평균	35.7	42.2	52.0	53.2	55.2	57.2
	표준편차	3.13	1.64	1.64	3.03	4.97	7.16
BG1	평균	42.5	49.8	57.8	59.3	50.0	50.6
	표준편차	4.43	3.95	4.43	3.86	3.86	3.70
BG2	평균	35.6	43.6	54.0	55.4	57.4	58.6
	표준편차	2.19	3.78	3.39	3.29	3.79	3.16
AG2	평균	38.3	45.3	51.7	53.8	56.0	57.3
	표준편차	1.63	2.07	1.21	1.33	2.74	2.30
BG3	평균	37.4	45.2	48.4	51.4	54.8	56.4
	표준편차	1.82	4.76	4.83	5.18	3.77	3.51

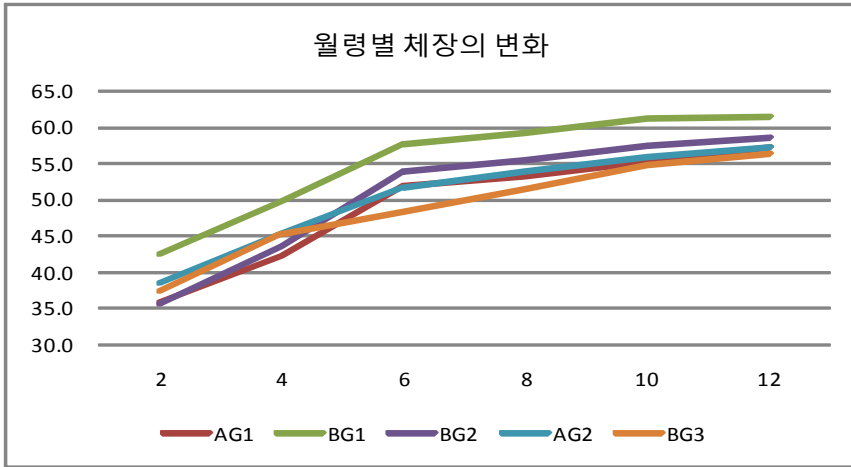


Fig. 2-2. 계통별 월령에 따른 체장의 변화.

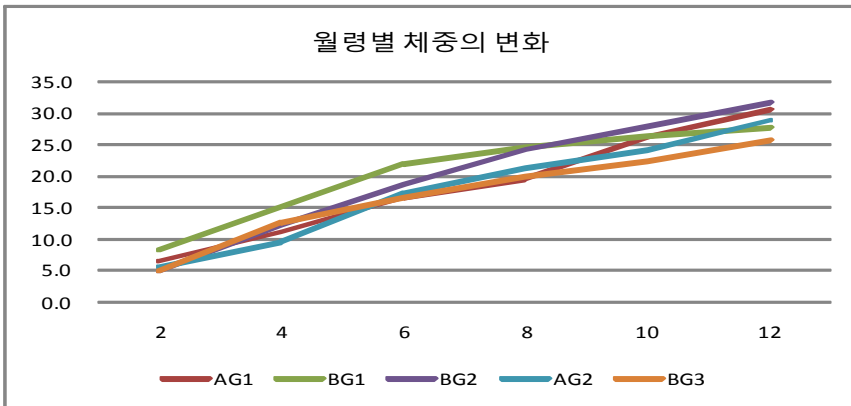


Fig. 2-3. 계통별 월령에 따른 체중의 변화.

각 계통별 체장 및 체중의 변화를 알아보면 체장의 경우 BG1군이 체장 및 체중의 초기 성장치가 높았지만 월령이 지날수록 AG1군의 성장의 속도 및 최종 성장치도 높은 것을 나타냈다. BG1군의 경우 초기 변곡점의 기울기가 큰 것으로 보아 육성기의 사양관리에 따라 육성후기의 성적이 좌우 될 것으로 사료된다(Fig. 2-2, 2-3).

나. 체중 및 체장에 대한 성장곡선 추정

(1) 부계통에 따른 체중의 성장곡선 추정

Von vertalanffy 1957) 방법을 이용하여 각각 추정하였으며 미니페지에 대한 정확한 성장 패턴 확보를 위해 3가지 추정 모형을 사용하였다. 성장곡선의 경우 모형식은 다음과 같다(Table 2-6).

Table 2-6. 성장곡선 추정을 위한 모델식 및 모수

Model	Equation $W_t =$	Mature value	Rate of maturing	Value at inflection
Gompertz	$Ae^{be^{-kt}}$	A	k	.386A
von Bertalanffy	$A(1 - be^{-kt})^3$	A	k	.296A
Logistic	$A(1 + e^{-kt})^{-M}$	A	k	$A(\frac{M}{M+1})^M$

여기서 W_t 는 t월령에서의 성장 추정치이며 A는 성숙체중, b는 성장률 그리고 k는 성숙율의 모수를 의미한다.

Table 2-7. 모형에 따른 체중의 성장곡선 추정치

방법	계통	A	B	k	변곡월령	변곡체중
Gomperz	AG	37.70	3.01	0.22	4.98	13.87
	BG	28.87	3.22	0.34	3.45	10.62
Logistic	AG	32.88	10.70	0.40	5.94	16.44
	BG	27.24	11.45	0.55	4.45	13.62
Von vertalanffy	AG	42.00	0.68	0.16	4.44	12.43
	BG	30.07	0.73	0.27	2.89	8.90

각 모형에 대한 성장곡선 추정 결과로 Von vertalanffy 모형의 BG군이 2.89로 성장이 최대가 되는 시기인 변곡월령이 2.89로 가장 빨랐으며 Logistic의 AG군이 가장 늦은 변곡월령을 나타냈다. 앞으로 지속적인 자돈 생산과 데이터를 축적을 이용하여 성장곡선 추정의 적합한 모델을 선정할 수 있다(Table 2-7).

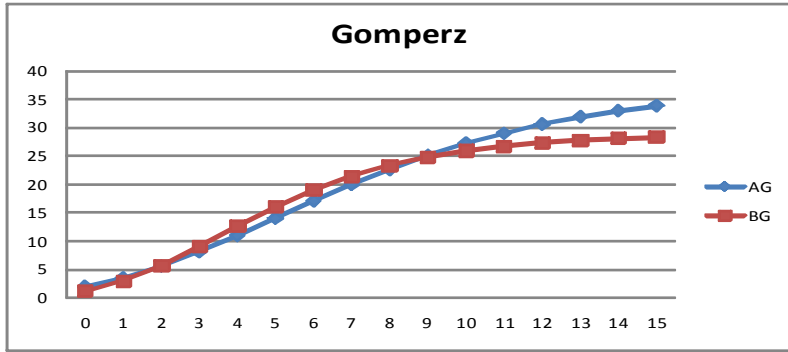


Fig. 2-4. 부계통에 따른 체중의 Gomperz 모형.

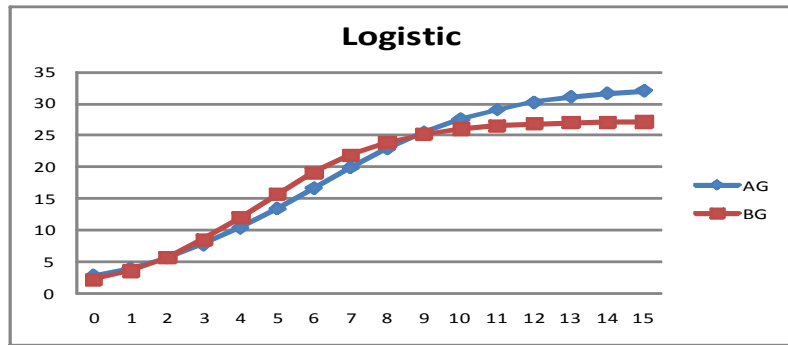


Fig. 2-5. 부계통에 따른 체중의 Logistic 모형.

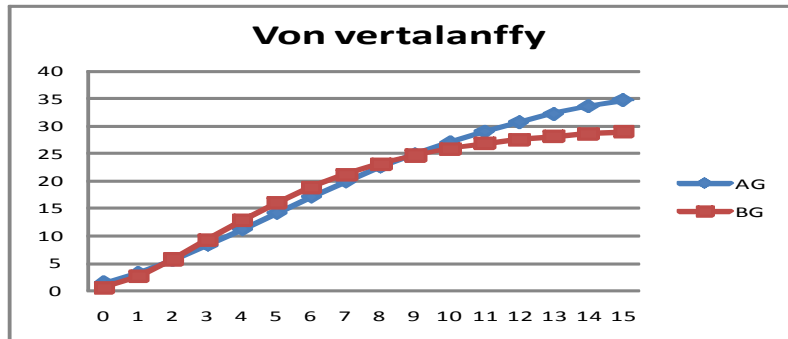


Fig. 2-6. 부계통에 따른 체중의 Von vertalanffy 모형.

위 3가지 모형을 보면 변곡월령은 3개월령 전후에서 일어났으며 변곡체중은 13kg 내외로 나타났다. 또한 AG계통은 계속 성장하는 패턴을 보이고 있으나 BG계통은 12개월령 이후 체중이 고정되고 있는 것을 알 수 있다(Fig. 2-4, 5, 6). 따라서 BG 계통이 더욱 적합한 것으로 나타나며 성장 패턴에 의한 사양관리 계획의 수립이 필요하다.

다. 부계통에 따른 체장의 성장곡선 추정

체장에 대한 성장곡선의 성숙률의 경우 von vertalanffy 모형이 만족성을 나타냈지만 변곡월령이 음수값을 나타내는 것은 위 모형의 모수 수렴도가 매우 낮기 때문인 것으로 사료된다. 변곡 월령의 결과치로 보아 미니돼지의 체장은 생후 1개월 전후로 가장 큰 성장을 보인다(Table 2-8). 조 등(2001)에 의하면 재래돼지 및 랜드레이스가 0.33, 0.35로 미니돼지의 비해 낮은 성숙률을 보고 하였다.

Table 2-8. 모형에 따른 체장의 성장곡선 추정치

방법	계통	A	B	k	변곡월령	변곡체장
Gomperz	AG	60.87	1.07	0.41	0.16	22.39
	BG	58.45	1.04	0.39	0.09	21.50
Logistic	AG	60.14	1.78	0.53	1.09	30.07
	BG	57.71	1.71	0.51	1.04	28.86
Von vertalanffy	AG	61.22	0.30	0.37	-0.25	18.12
	BG	58.80	0.30	0.36	-0.34	17.41

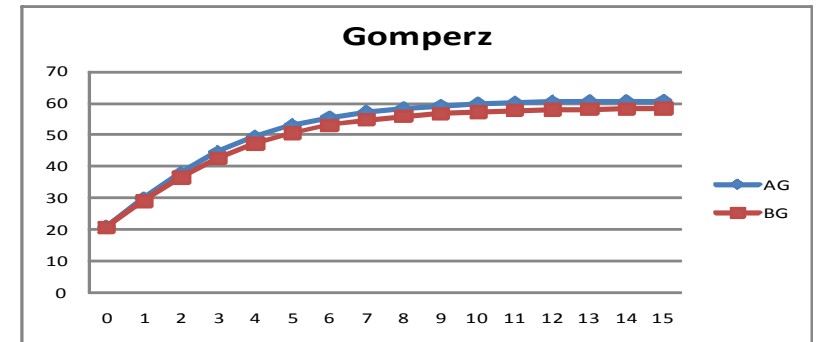


Fig. 2-7. 부계통에 따른 체장의 Gomperz 모형.



Fig. 2-8. 부계통에 따른 체장의 Logistic 모형

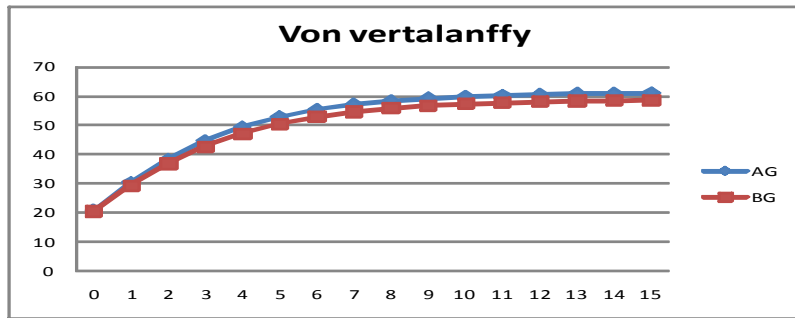


Fig. 2-9. 부계통에 따른 체장의 Von vertalanffy 모형

체중은 방법에 따라 약간의 차이는 있으나 약 9개월령에서 30~35kg을 유지되는 것으로 나타났으며 A, B 계통에 비해 C계통의 성장이 미니돼지에 적합한 것으로 사료된다(Fig. 2-7, 8, 9).

라. 모계통에 따른 체중의 성장곡선 추정

모계통에서 가장 높은 성숙율을 보이는 모계군은 Logistic의 C군으로 0.84 월령에 가장 큰 성장을 보이지만 성숙체중의 경우 성숙속도가 빠른 만큼 성숙 체중은 낮아지는 것으로 나타났다. Logistic A군의 경우 성장률도 높으며 성장체중의 경우 모든 모형 및 군에서 가장 높은 결과를 보였다(Table 2-9).

Table 2-9. 모계통에 따른 체중의 성장곡선 추정치

방법	계통	A	B	k	변곡일령	변곡체장
Gomperz	A	63.73	1.11	0.44	0.25	23.44
	B	58.07	1.04	0.38	0.10	21.36
	C	55.24	0.97	0.39	-0.09	20.32
Logistic	A	64.79	1.90	0.57	1.13	32.40
	B	57.28	1.71	0.49	1.09	28.64
	C	54.51	1.53	0.50	0.84	27.25
Von vertalanffy	A	64.07	0.31	0.39	-0.15	18.97
	B	58.45	0.30	0.34	-0.35	17.30
	C	58.54	0.30	0.31	-0.35	17.33

모계통에서 가장 높은 성숙율을 보이는 모계군은 Logistic의 C군으로 0.84 월령에 가장 큰 성장을 보이지만 성숙체중의 경우 성숙속도가 빠른 만큼 성숙 체중은 낮아지는 것으로 나타났다. Logistic A군의 경우 성장률도 높으며 성장체중의 경우 모든 모형 및 군에서 가장 높은 결과를 보였다. 또한 체장에 있어 A계통이 타 계통에 비해 더 긴 것으로 나타났으며 약 7개월령에서 고정되는 것으로 나타났다(Fig. 2-10, 11, 12).

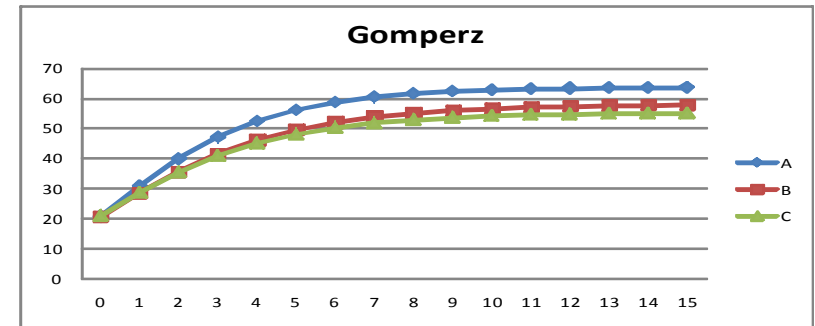


Fig. 2-10. 모계통에 따른 체중의 Gomperz 모형.

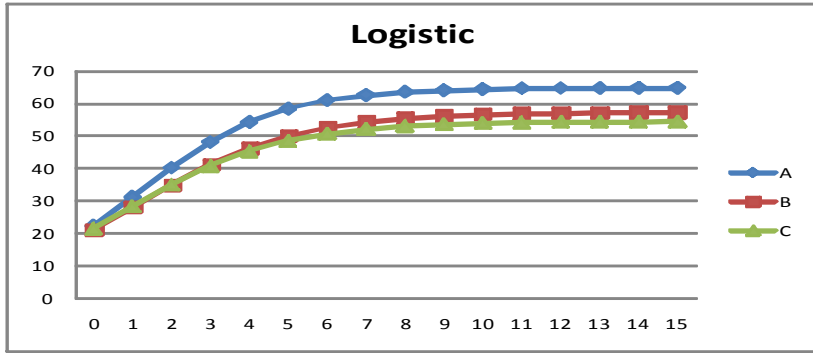


Fig. 2-11. 모계통에 따른 체중의 Logistic 모형.

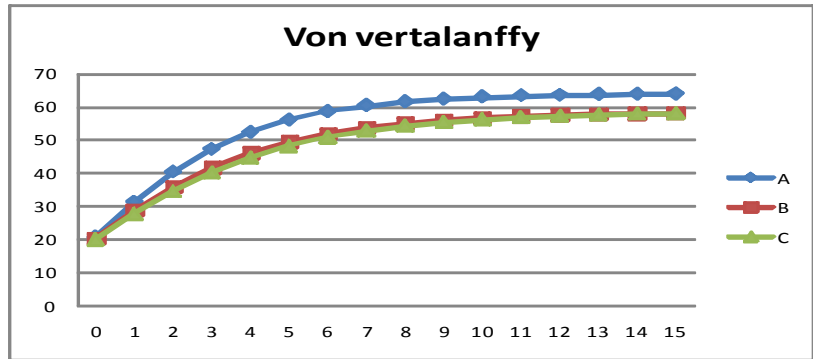


Fig. 2-12. 모계통에 따른 체중의 von Bertalanffy 모형.

마. 전체 집단의 체중 및 체장의 성장곡선 추정

전체군에 대한 모형 및 형질별 성장곡선의 추정은 Logistic 모형이 체중 및 체장에서 높은 성장값을 보였으며 체중 형질 부분에서도 대부분 높은 값을 나타냈다. Von bertalanffy 모형의 경우 오차값이 커서 모형식 및 데이터의 보정이 필요할 것으로 사료되며 일회성 분석이 아닌 계속적인 분석으로 적합한 모형을 찾아 이용, 분석하여야 할 것이다. 모수값은 대부분 비슷한 양상으로 나왔지만 체중의 Logistic 모형의 형우 성장률이 10.68으로 높은 결과값을 나타냈다. 최 등(2008)이 보고한 품종에 대한 체중의 성장 추정치와 비교해 보았을 때 Duroc종 성숙율은 Gompertz, Logistic 및 Von Bertalanffy는 0.015, 0.036 그리고 0.007로 미니돼지가 월등한 성숙율을 보였으며 성장률의 경우에는 204.0, 137.2 그리고 327.4로 일반돼지가 성장률은 더 높게 나타났다(Table 2-10).

Table 2-10. 체중 및 체장의 성장곡선 추정치

형질	방법	A	B	k	변곡일령	변곡값
체중	Gomperz	31.83	3.06	0.28	3.97	11.71
	Logistic	29.25	10.68	0.47	5.02	14.62
	Von vertalanffy	33.87	0.69	0.22	3.38	10.02
체장	Gomperz	58.78	1.74	0.52	1.06	21.62
	Logistic	59.51	1.05	0.40	0.13	29.76
	Von vertalanffy	59.87	0.30	0.36	-0.30	17.72

전체 집단의 체중과 체장에 대한 성장곡선 추정결과 각 방법에 따른 추정치는 체중에서는 유사하게 유전되었으며 체장에 대해서는 Gompertz 방법이 초기 체중은 약간 낮게 추정되었으나 4개월령 이후에는 가는 패턴을 보였다. 체중에 있어서는 각 계통별 추정치에 비해 보다 완곡한 모양을 보였으며 10개월령 이후 30kg 정도에서 일정하게 유지되는 것으로 나타났다. 체장에 대해서는 약 8개월령에 60cm로 고정되는 양상을 보였다. 부계열의 BG계통과 모계열의 C계통이 미니돼지에 적합하였으며 이 두계통을 이용한 상반반복선발법을 적용하여 계통 조성을 하는 것이 좋을 것으로 사료되었다.

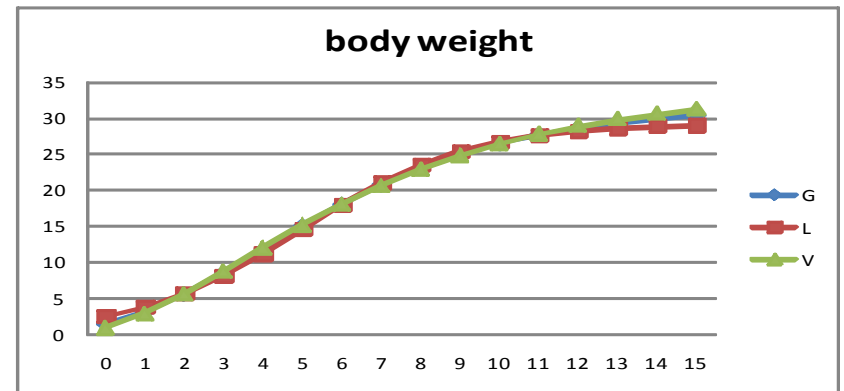


Fig. 2-13. 전체 모형에 대한 체중의 성장곡선.

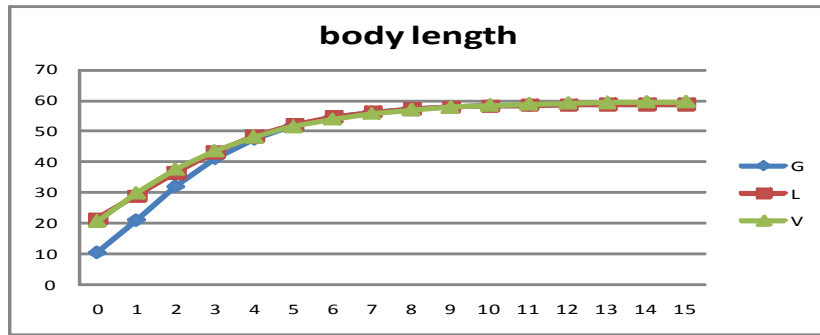


Fig. 2-14. 전체 모형에 대한 체장의 성장곡선.

3. 계통별 생육 성장의 추이

가. 전체 교배군별 기초통계량

체장에 대한 전체 교배군의 성장 추이를 살펴보면 초기 이유 후 체장의 평균은 AG군이 BG군 보다 더 높은 것으로 나타났으며 12개월 검정기간동안 약 2~3cm 정도 높은 성장을 유지하였다 (Table 2-11).

Table 2-11. 월령에 따른 체장의 전체 교배군별 기초통계량

	월령	평균	표준편차	최소값	최대값
AG	0	20	0	20	20
	2	40.18	3.12	36	45
	4	47.36	2.94	42	52
	8	56	5.15	50	63
	10	57.63	4.86	52	66
	12	59.72	5.58	53	71
BG	0	20	0	20	20
	2	38.21	3.94	33	47
	4	45.92	4.66	39	53
	8	53.07	5.53	42	62
	10	55.07	5.06	45	63
	12	57.57	4.27	49	65

체중의 경우 체장과는 약간 상반된 결과로 이유시에는 AG군이 BG군보다 더 높은 평균을 보였지만 4~10개월령 사이에는 BG군이 AG군 보다 높은 평균체중을 유지하였다. 12개월령 검정기간에 서는 다시 AG군이 BG군보다 높은 체중을 나타냈다. 이는 육성기에는 AG군 보다 BG군이 더 성장이 빠르며 성장곡선의 변곡점이 더욱 가파른 것을 볼 때 성숙률 또한 BG군이 높다는 것을 알 수 있다(Table 2-12).

Table 2-12. 월령에 따른 체중의 전체 교배군별 기초통계량

	월령	평균	표준편차	최소값	최대값
AG	0	0.2	0	0.2	0.2
	2	6.34	1.50	4	8.8
	4	10.90	2.46	8	16
	8	17.96	2.84	14.8	23.8
	10	21.45	4.08	17	30
	12	26.54	5.82	21	38
BG	0	0.2	0	0.2	0.2
	2	5.78	1.93	3.5	10.6
	4	13.14	2.31	10	17
	8	18.85	2.87	15	24.4
	10	22.78	2.99	17	26
	12	25.50	3.36	19	31

나. 교배군의 최소자승평균값

본 연구에서 조사한 체장과 체고 형질에 영향을 미치는 교배군, 성별 및 출생년도에 영향을 미치는 효과를 추정하기위해서 최소제곱법(Hartley, 1967)으로 분석하였다(Table 2-13).

$$(\text{개체에 대한 측정치}_{ijk} = \text{전체평균} + \text{교배군}_i + \text{성별}_j + \text{출생년도}_k + \text{임의오차}_{ijk})$$

Table 2-13. 체장에 대한 교배군의 최소자승평균값

월령	교배군				
	AG_1	AG_2	BG_1	BG_2	BG_3
0	20	20	20	20	20
2	42.4 ^a	38.33 ^b	42.5 ^a	35.6 ^b	37.4 ^b
4	49.8 ^a	45.33 ^{ab}	49.75 ^a	43.6 ^b	45.2 ^{ab}
8	61.2 ^a	51.66 ^{cd}	57.75 ^{ab}	54 ^{bc}	48.4 ^d
10	62.2 ^a	53.83 ^c	59.25 ^{ab}	55.4 ^{bc}	51.4 ^c
12	64.2 ^a	56 ^c	61.25 ^{ab}	57.4 ^{bc}	54.8 ^c

교배군별 최소자승평균값을 추정해 보았을 때 이유시에 AG1군과 BG1은 비슷한 성장 양상을 보였으나 그 이후 성장 단계에서는 모든 교배군이 다른 양상을 보였으며, 월령에 따른 교배군의 체중에 대한 성장 양상을 보면 2~4개월에는 비슷한 추정치를 나타냈다(Table 2-14).

Table 2-14. 체중에 대한 교배군의 최소자승평균값

월령	교배군				
	AG_1	AG_2	BG_1	BG_2	BG_3
0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
2	7.26 ^a	5.58 ^b	8.22 ^a	4.82 ^b	4.8 ^b
4	12.6 ^a	9.5 ^b	15 ^a	12.2 ^{ab}	12.6 ^a
8	18.72 ^{ab}	17.33 ^b	21.85 ^a	18.7 ^{ab}	16.6 ^b
10	21.8	21.16	24.5	24.2	20
12	29.4 ^a	24.16 ^{ab}	26.25 ^{ab}	28 ^{ab}	22.4 ^b

다. 전체 미니돼지의 각 형질간 유전력과 상관관계

미니돼지의 유전력 추정을 위해 개체모형(Henderson, 1976)을 이용하였으며

$$y = X\beta + Zu + e \dots \dots \dots \textcircled{1}$$

- y : 각 형질에 대한 관측치 벡터
- X : 고정 효과에 대한 계획 행렬
- β : 임의 효과에 대한 계획 행렬
- u : 임의 효과에 대한 벡터
- e : 임의 환경 효과에 대한 벡터

위의 $\textcircled{1}$ 의 방정식에 대한 우도 함수(likelihood function)의 자연 log는 다음과 같다.

$$\log A = -0.5[(n-p)\log(2\pi) + \log|K'V^{-1}K| - y'K(K'VK)^{-1}K'y]$$

위 방정식에서 고정효과부분(X)를 Z로 흡수(Absorbing)하고 Harville(1977)과 Searle(1979)에 의해 제안된 등가식으로 다시 쓰면 다음과 같다.

$$\log A = -0.5[\text{constant} + \log|R| + \log|G| + \log|C| + y'Py]$$

여기서, C : MME에 대한 Full-rank 계수 행렬이고, P는

$$V^{-1} = V^{-1}X(X'V^{-1}X)^{-1}X'V^{-1}$$

$$R = In$$

G = A + q 으로 나타낼 수 있다.

본 연구에서는 Animal Model에 근거하여 개발된 WOMBAT (Mayer, 1984) 프로그램을 이용하였으며 분산치를 추정하기 위하여 G와 R의 값에 임의의 초기치를 주고 이를 이용하여 유전모수를 추정 하였다. 추정된 분산, 공분산 값을 이용하여 다음과 같이 유전력(h^2) 및 표현형 상관(r_p)을 구하였다(Table 2-15).

Table 2-15. 각 형질별 유전력

	형질			
	체중	체장	흉폭	체고
유전력	0.15	0.46	0.45	0.66

형질의 유전력의 경우 체중을 제외하고 고도의 유전력이 추정되었는데 이는 강 (2011)이 보고한 요크셔종의 체고 및 체장의 유전력인 0.39, 0.43과 부합되는 값을 나타냈다. 미니돼지 혈통의 경우 현재 세대수가 적고 개체수도 작아 통계적 유전력 추정에 정확도가 떨어지지만 종전의 연구결과와 비슷한 양상을 보였다(Table 2-16).

Table 2-16. 각 형질간의 표현형 상관

형질	체중	체장	흉폭	체고
체중	1			
체장	0.86	1		
흉폭	0.85	0.82	1	
체고	0.81	0.86	0.77	1

각 형질간 상관관계의 경우 모든 형질간 정의 상관을 나타냈으면 상관계수가 모두 0.5이상으로 고도의 상관을 보고하였다. 이는 형질간 높은 상관관계로 인해 미니돼지 생육시 성장형질의 한 부분 개량을 하더라도 나머지 성장형질 개량의 용이함을 나타낸다.

제 3절 종돈 선발, 교배와 개량 라인 조성

1. 종돈의 선발 및 교배

종돈은 혈통, 건강상태, 체격, 혈족의 과거번식성적 등을 참고하여 선발한다. 선발 시기는 3개월령 일 때이고, 이후 성성숙에 이를 때까지 종후보로 해서 육성한다. 또한 육성 중에 어떠한 이상이라도 발견될 때에는 조속히 후보에서 제외시킨다. Micropig의 성성숙은 암컷은 평균 5개월령, 수컷은 평균 7개월령이지만, 번식에는 암컷은 8개월령, 수컷은 10개월령 이후에 사용한다. 암컷의 발정징후는 외음부의 발적(發赤)팽창 및 점액의 변화, 요압(腰壓)등을 관찰하여 허용을 확인한다. 즉, 발정전기(發情前期)에는 외음부에 발적, 팽창이 보이지만 행동에 큰 변화는 없고, 수컷의 교미행동을 허용하지 않는다.

발정기에는 점액이 분비되고 외음부의 발적팽창은 얼마간 감퇴하며 식욕감퇴 등의 행동변화도 인식된다. 이 시기에는 허리를 손으로 누르면 움직이지 않고, 수컷을 허용하여 교배가 성립한다. 발정 후기에는 발적팽창이 없어지고 수컷을 허용하지 않는다. 교배는 자연교배를 원칙으로 한다. 암컷의 허용상태를 관찰하여 교배적기가 되면 수컷의 돈방으로 이동시켜 허용개시 당일부턴 허용이 종료될 때까지 1일 1회의 빈도로 교배시킨다. 교미시간은 개체차가 커서 1~5분 정도이다.

2. 임신돈의 사양 및 분만 관리

임신진단은 교배 후의 발정의 유무와 초음파 진단법에 의해 행한다. 초음파진단법으로는 교배 후 40일부터 새끼의 확인이 가능하다. 임신후기의 80일을 지나면 어미돼지의 복부가 팽만되기 시작하고, 이 시기부터 새끼의 발육과 자기의 체력축적을 위한 영양이 요구되므로 사료를 증량시켜 투여한다. 어미돼지는 분만예정일 5일 전에 분만 및 포육실로 옮겨 환경에 적응을 시킨다.

분만방은 이동 전에 충분한 수세와 소독을 행하고, 어미돼지는 미온탕(微溫湯)과 약용비누로 전신을 씻어 청결히 한 후 이동시킨다. 분만방의 상(床)에는 멸균한 상갈개(목재 칩)를 깔아놓고, 자돈의 보온용으로 적외선 보온등을 점등하여 분만에 대비한다. 분만은 간호 없이 행한다. 태반이 배출되어 분만이 끝난 것을 확인하면 어미돼지의 유방보호를 위해 새끼돼지의 견치(犬齒)를 소독한 낫으로 잘라낸다. 계속하여 체중, 체고 및 흉위를 측정하고 즉시 어미돼지에게 돌려준다 (필요에 따라 피클링산으로 개체 식별한다).

3. 분만도 및 자돈의 사양 관리

새끼돼지는 생후 3일에 철결뿔 비혈방지를 위해 철분제를 근육 내 투여한다. 분만방 내에는 1일 2회 상갈개의 교환을 행하고 항상 청결을 유지한다. 생후 7일부터는 인공유와 신선한 물을 상에 놓고, 모유와 병용하여 섭취시킨다. 어미돼지의 사료급여량은 분만일로부터 수일간은 통상량으로 하고, 새끼돼지의 모유섭취량이 늘어나는 7일경부터 증량한다. 그 양은 어미돼지나 새끼돼지의 영양상태를 관찰하면서 조정한다.

이유는 1년차에는 생후 5주령에 2년차에는 8주령에 실시하였다. 어미돼지는 분만 및 포육실로부터 종돈실로 옮기고 새끼돼지는 그대로 같은 돈방 내에서 육성한다. 어미돼지는 이유당일에는 물만 주고 사료는 다음날부터 급여한다. 이유부터 3개월간은 한배 새끼들을 군사육(群飼育)하고 성성숙에 달하기 전의 4개월령에 단사케이지로 이동한다.

4. 개량 라인의 규결 검증

체중은 전자 체중계로 생시와 이유 후 1년차에는 (5주령)부터 매주 단위로 2년차에는 (8주령)부터 2개월 단위로 측정하여 기록하였고, 체형은 체고, 체장 및 흉위 등 줄자로 생시와 1년차에는 이유 후 (5주령)부터 매주 단위로 2년차에는 (8주령)부터 2개월 단위로 측정하여 기록한다(Table 3-1).

Table 3-1. 교배실적 및 분만 예정일.

No	Sire	Dam	분만일
1	A	10	2009-10-26
2	B	2	2009-11-08
3	B	6	2009-11-15
4	B	9	2009-11-25
5	B	4	2009-12-17



Fig. 3-1. 교배를 통해 생산된 자돈.

5. 최종 연구 수행 결과

2009년도 하반기부터 기존 Micropig의 소형 라인에서 건강 상태와 번식성, 자돈의 크기등을 주된 판단 지표로 Midget 미니돼지 생산을 위한 교배 후보 종돈을 용돈 2두, 모돈 10두로 선발하여 별도의 사양관리를 실시하였으나 하절기 번식성의 저하 및 생산시설 내 공간확보의 어려움으로 발정의 규모가 낮아 계획한 규모의 생산은 이루지 못하였으나 지속적인 관찰과 사양관리, 번식 유도를 통하여 생산을 시도하였다. 그 결과로 2010년도에 1차 교배를 통한 2개의 부계 라인(AG1, AG2, BG1, BG2, BG3)이 유지되었다. 2011년부터는 체중 및 체장의 개량도를 높이기 위하여 다양한 근교교배(형매교배, 부계교배, 모계교배)를 시행하여 생산 두수, 개체의 정상성 등을 조사하여 근교교배를 통한 개량의 개선도를 검증하였다. 각 개체별 규격을 2개월마다 검증하여 실측치가 개발 목표에 접근하는지를 기록하여 연구팀에 보고하였다. 그 중 8두는 biomedical research 및 관련 CRO에 활용되어 매출을 기록하였으며 23두의 종돈군을 보존하여 소형화 개량을 위하여 근교교배(형매교배, 부계교배, 모계교배)를 실시하여 형매교배의 경우에만 생산 두수의 급격한 감소(2두 이하)를 확인 하였고 부계 및 모계 근교교배의 경우에는 5두 이상 생산되고 모든 근교교배 자돈은 유전적인 기형이 없음을 확인하였다. 이후 2세대 교배를 통하여 소형화된 상용 개체를 생산하고 제약 분야에 대한 영업 활동을 강화할 계획이다. 시장 확대를 통한 참여기업의 사업 영역의 확대와 이를 통한 유관 영농법인(그림 2, 3 라남도 무안에 생산 시설을 설치하여 위탁생산을 실시 중임)에 대한 위탁 생산 물량의 증가로 농가 소득 증대에 기여하고자 한다.



Fig. 3-2. 교배를 통해 생산된 자돈.



Fig 3-3. 유관 영농법인 외부.

또한 다양한 모색 및 크기의 분석을 통하여 Micropig 돈군의 유전적 형태와 현황, 육종 방향에 대한 유용한 연구결과를 얻을 수 있었으며 이를 활용하여 사업화에 필요한 유용 돈군의 육종 체계, 생산시스템을 개발하였다.



Fig 3-4. 유관 영농법인 내부.

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1절 목표대비 대외달성도

세부·협동연구과제	추진목표	달성내용
실험동물용 Midget 미니돼지의 유전자원 보존 및 관리	가. Midget 미니돼지 유전자원 은행 준비	-Midget 미니돼지의 유전자원 보존 -유전자은행을 이용한 돼지 Autophagy marker 인자 클로닝
	나. Midget 미니돼지 유전자원 은행 운영	-Midget 미니돼지의 생식세포(정자)의 보존
	다. 실험동물용 Midget 미니돼지 유전자원 은행	-Midget 미니돼지 난자의 체외성숙 및 동결보존 -생식세포에서의 기저막분해효소(MMPs)의 발현 양상 분석과 수정률 분석
실험용 Midget 미니돼지의 개량 시스템 개발	가. 기존 미니돼지 집단에 대한 유전 특성 규명	-Midget 미니돼지 집단간의 초소형화에 관한 유전적 특성 규명
	나. Midget 미니돼지 개량 시스템 운용	-Midget 미니돼지의 초소형화 개량 시스템 개발
	다. 실험동물용 Midget 미니돼지 개량 시스템 운용	
실험동물용 Midget 미니돼지의 생산 표준화	가. 종돈의 선발, 교배 와 개량 라인 조성	-5 계통의 근교교배 개량 집단 구성 -초소형화 개량 시스템을 이용한 Midget 미니돼지 생산
	나. Midget 미니돼지 시험 생산 및 규격화	-모색 및 체격에 따른 실험용 맞춤 Midget 미니돼지의 생산 및 규격화
	다. 실험동물용 Midget 미니돼지의 표준 생산	- Midget 미니돼지의 표준 생산라인 구성

제 2절 목표대비 연구결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 체장 65 cm 이하, 체중 20 Kg 이하의 미니돼지	체장 및 체중 모두 기준치 이하의 종돈군 형성
② 개량, 번식 및 사양관리 system의 개발	육종, 번식, 사양관리 시스템의 구축 완료
③ Midget 미니돼지의 상용화	Biomedical research 매출 기록(상용화)

제 3절 정량적 성과(논문게재, 특허출원, 기타)를 기술

1. 연구 성과 정량적 목표

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명명칭등록	품종생산수입판매신고	품종보호			SCI	비SCI	
1차년도									1	
2차년도	1							1	2	
3차년도	1	1					1	1	2	
계	2	1					1	2	5	

2. 연구 정량적 성과

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		학술발표	상품화
	출원	등록	품종명명칭등록	품종생산수입판매신고	품종보호			SCI	비SCI		
1차년도							1			1	
2차년도		1							1	1	
3차년도	1	2							2	2	13
계	1	3					1		3	4	13

3. 전문 학술지 논문 게재

구분	저자명	논문제목	게재 학술지명	권 및 쪽수 (년도)	상태
국내	1.김상환 외 6명	돼지 체외성숙난자에서 MMPs와 TIMPs의 발현분석	<i>Reprod. Dev. Biol</i>	32:199-203 (2010)	등재
	2.김상환 외 4명	TES 보존액이 미니돼지 동결 용해 정자의 생존성 및 성장에 미치는 영향	<i>J. Emb. Trans.</i>	27:00-00 (2012)	등재
	3.강현석 외 6명	종돈의 주요 경제형질에 대한 유전모수 및 유전적 변화 추세 추정에 대한 연구	<i>한국동물자원과학회</i>		등재
국외 (SCI)	1.Lee MS et al	Metformin Enhances the Action of Insulin on Porcine Granulosa-Lutein Cells In Vitro	<i>Animal Reproduction Science</i>		Revision
국외 (SCI)	2.Kang HS et al	Estimation of Growth Curve Parameters for Body Weight and Body Length in Miniature Pig	<i>AAAP</i>		심사 중
국외 (SCI)	3.Kim SH et al	Molecular cloning and expression analysis of porcine microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (MAP1LC3A)	<i>J. Bio. Chemi</i>		Reject

4. 학술회의 게재

구분	저자명	발표제목	학술대회명칭	개최기간 및 장소	발표형태
국제	1. 서경석 외 5명	Characterization of pig 20s-HSD homolog gene in the ovary and uterus	발생공학 국제심포지엄	2009.10 충남대	poster
국제	2. 김상환 외 3명	Cloning and expression of porcine MAP1LC3A gene	발생공학 국제심포지엄	2010.10 경북대	poster
국제	3. 김상환 외 3명	Characteristics and viability of normal and miniature pig spermatozoa after addition of Tea-N-tris extender to freezing	발생공학 국제심포지엄	2011.10 전남대	poster
국내	4. 강현아 외 2명	미니돼지와 일반돼지의 난포 발달에 따른 MMPs의 발현 양상 분석	한국 수정란 이식학회	2011.5 충북대	poster

5. 특허 출원 및 등록

구분	등록번호	제목	등록일	등록자	법인등록번호
특허	2010-02-42-0358호	실험동물용 Midget 미니돼지의 생산 기술	2010.12.2	메디키네텍스(주)	159114-0054727
	2010-02-42-0358호	실험동물용 Midget 미니돼지의 생산 기술	2011.11.29	메디키네텍스(주)	159114-0054727
	2012-02-42-0869호	근교계 미니돼지 생산기술	2012.02.15	메디키네텍스(주)	159114-0054727
특허출원	10-2012-0045787	미니돼지 정자의 동결보존방법	2012.04.30	국립한경대학교	2-2005-050930-3

6. 유전자원 등록

구분	등록기관	유전자번호	제목	등록일	등록자
등록	미국국립생물정보센터(NCBI)	GU272221.1	MAP1LC3A	2009.12.20	Kim SH et al

7. 인력지원 성과

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

8. 연구 성과 활용

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	1	5			
	달성	1	13			

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1절 연구 개발결과

1. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	미니돼지의 유전자원 보관 기술
②	초소형 미니돼지 생산 기술
③	근교계 미니돼지 생산 기술

2. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허출원	산업체이전(상품화)	현장으로 해결	정책자료	기타
①의 기술		✓				✓				
②의 기술		✓				✓	✓			
③의 기술	✓					✓				

3. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	Biomedical research 및 약학 비임상 시험 보조에 활용 (미니돼지 사업 매출 향상을 위한 유전자원 정보서비스를 통한 사업화 확대)
②의 기술	Biomedical research 및 약학 비임상 시험에 활용 (매출 증진 효과 및 사업화영역 확대)
③의 기술	Biomedical research 및 약학 비임상 시험에 활용 (매출 증진 효과 및 사업화영역 확대)

4. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명	초소형 및 근교계 미니돼지 생산 기술		
이전형태	<input checked="" type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간		실용화예상시기	
기술이전시 선행조건			

제 2절 연구 개발결과 활용계획

1. 연구결과의 활용 계획

2009년도 하반기부터 기존 Micropig의 소형 라인에서 건강 상태와 번식성, 자돈의 크기등을 주된 판단 지표로 Midget 미니돼지 생산을 위한 교배 후보 종돈을 웅돈 2두, 모돈 10두로 선발하여 별도의 사양관리를 실시하였으나 하절기 번식성의 저하 및 생산시설 내 공간 확보의 어려움으로 발정기의 규모가 낮아 계획한 규모의 생산은 이루지지 못하였으나 지속적인 관찰과 사양 관리, 번식 유도를 통하여 생산을 시도하였다. 그 결과로 2010년도에 1차 교배를 통한 2개의 부계 라인과 5개의 모계 라인이 조성되어 총 31두의 Midget 종돈군이 형성되었으며 5개의 계통 라인(AG1, AG2, BG1, BG2, BG3)이 유지되었다. 2011년부터는 체중 및 체장의 개량도를 높이기 위하여 다양한 근교 교배(형매 교배, 부계 교배, 모계 교배)를 시행하여 생산 두수, 개체의 정상성등을 조사하여 근교 교배를 통한 개량의 개선도를 검증하였다. 각 개체별 규격을 2개월마다 검증하여 실측치가 개발 목표에 접근하는지를 기록하여 연구팀에 보고하였다. 그 중 8두는 biomedical research 및 관련 CRO에 활용되어 매출을 기록하였으며 23두의 종돈군을 보존하여 소형화 개량을 위하여 근교 교배(형매 교배, 부계 및 모계 근교 교배)를 실시하여 형매 교배의 경우에만 생산 두수의 급격한 감소(2두 이하)를 확인하였고 부계 및 모계 근교 교배의 경우에는 5두 이상 생산되고 모든 근교 교배 자돈은 유전적인 기형이 없음을 확인하였다. 이후 2세대 교배를 통하여 소형화된 상용 개체를 생산하고 제약 분야에 대한 영업 활동을 강화할 계획이다. 시장 확대를 통한 참여기업의 사업 영역의 확대와 이를 통한 유관 영농법인에 대한 위탁 생산 물량의 증가로 농가 소득 증대에 기여하고자 한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

○ 현재 실험동물용 Midget 미니돼지의 개량 및 생산기술에 관한 해외과학기술은 보고된바 없음

○ Genetically engineered mammals for use as organ donors의 특허명으로 미국에서 형질 전환 미니돼지의 생산에 관련하여 SPF 미니돼지 사육 시설 및 생산물에 관한 특허가 있음.

○ 싱가포르의 바이오폴리스, 미국, 유럽, 동아시아에서 중형급 미니돼지 수요가 보고되고 있으며 이미 2005년 이후 참여기업에서는 SPF 미니돼지를 싱가포르 바이오폴리스로 수출하고 있으며 주로 심혈관 연구, 치과 임플란트 연구, 연골 및 뼈 세포치료제 연구, 줄기세포 연구에 활용되고 있다.

제 7 장 참고문헌

Almlid T, Johnson LA. 1988. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *J. Anim. Sci.* 66:2899-2905.

Benbrook DM, Jones NC. 1994. Different binding specificities and transactivation of variant CRE's by CREB complexes. *Nucleic Acids Res.* 22:1463-1469.

Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. 1993. Matrix metalloproteinases: A review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4:197-250.

Cheng C, Kacherovsky N, Dombek KM, Camier S, Thukral SK, Rhim E, Young ET. 1994. Identification of potential target genes for Adr1p through characterization of essential nucleotides in UAS1. *Mol. Cell. Biol.* 14:3842-3852.

Fernandes M, Xiao H, Lis JT. 1994. Fine structure analyses of the Drosophila and saccharomyces heat shock factor heat shock element interactions. *Nucleic Acids Res.* 22:167-173.

Fiona H, Mc Caffery, Rosemary L, Simon C, Riley and Evelyn ET. 2000. Culture of bovine preantral follicles in a serum free system: Markers for assessment of growth and development. *Biology of Reprod* 63:267-273.

Fraser L and Strzezek J. 2004. The use of comet assay to assess DNA integrity of

- boar spermatozoa following liquid preservation at 5°C and 16°C. *Folia Histochemica ET Cytobiologica* 42:49–55.
- Fraser L, Dziekońska A, Strzezek R, Strzezek J. 2007. Dialysis of boar semen prior to freezing–thawing: its effects on post–thaw sperm characteristics. *Theriogenology* 67:994–1003.
- Garde JJ, Soler AJ, Cassinello J, Crespo C, Malo AF, Espeso, Gomendio GM, and Roldan ERS. 2003. Sperm cryopreservation in three species of endangered gazelles. *Bio. Reprod.* 69:602–611.
- Gompertz B. 1825. On nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new mode of determining the value of life contingencies. *Phil. Trans. R. Soc.* 115, 513–585.
- Hartley HO and Rao JNK. 1967. Maximum likelihood estimation for the mixed analysis of variance model. *Biometrika* 54: pp. 93.
- Henderson CR. 1985. Best linear unbiased prediction of nonadditive genetic merits in noninbred populations. *J. Anim. Sci.* 60: pp. 111.
- Mayer, K. and R. Thompson. 1984. Biased in variance and covariance component estimators due to selection on a correlated trait. *J. Anim. Breed. Genet.* 101: pp. 33.
- Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki K, Tokuhisa T, Ohsumi Y, Yoshimori T. 2001. Dissection of autophagosome formation using *App5*–deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell. Biol.* 19:657–668.
- Roca J, Gil MA, Hernandez M, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA. 2004. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze–thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *J. Androl.* 25:397–405.
- Sancho S, Casas I, Ekwall H, Saravia F, Rodriguez–Martinez H, Rodriguez–Gil JE, Flores E, Pinart E, Briz M, Garcia–Gil N, Bassols J, Pruneda A, Bussalleu E, Yeste M, Bonet S. 2007. Effects of cryopreservation on semen quality and the expression of sperm membrane hexose transporters in the spermatozoa of Iberian pigs. *Reproduction* 134:111–121.
- Seidenbecher CI, Landwehr M, Smalla KH, Kreutz M, Dieterich DC, Zuschratter W, Reissner C, Hammarback JA, Bockers TM, Gundelfinger ED, Kreutz MR. 2004. Caldendrin but not calmodulin binds to light chain 3 of MAP1A/B: an association with the microtubule cytoskeleton highlighting exclusive binding partners for neuronal Ca(2+)–sensor proteins. *J. Mol. Biol.* 336:957–970.
- Strzezek J, Lecewicz M, Fraser L. 1999. Ostrich egg yolk as a component of an extender for liquid preservation of boar semen at 5°C and 16°C. Abstracts, 3rd Conference of ESDAR, 26–27th November, Anger, France, pp. 86
- Tanida, T. Ueno, E. Kominami., 2004. Human light chain 3/MAP1LC3B is cleaved at its carboxyl–terminal Met121 to expose Gly120 for lipidation and targeting to autophagosomal membranes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36:2503–2518.
- Von Bertalanffy L. 1957. Quantitative laws in metabolism and growth. *Quart. Rev. Biol.* 32:217–231.
- Westendorf P, Richter L, Treu H. 1975. Deep freezing of boar spermatozoa. Laboratory and insemination results using the Hulsenger paillette method. *Dtsch. Tieraztl. Wochenschr.* 82:261–267.
- Wilmot I and Polge C. 1977. The low temperature preservation of boar spermatozoa. 2. The motility and morphology of boar spermatozoa frozen and thawed in diluent which contained only sugar and egg–yolk. *Cryobiology* 14:479–782.
- 강현성. 2011. 돼지의 품종별 산육형질에 대한 유전모수 추정과 육종가 분석 연구. 석사학위 논문.
- 조용민, 윤호백, 이영창, 서강석, 김시동, 박영일. 2001. 개체별 성장곡선 모수를 이용한 재래

돼지와 램드레이스종의 성장 특성에 관한 연구. 한국동물자원과학회지 43:817-822.

최원철, 양미혜, 이용승, 정희태, 양부근, 이동석, 박춘근. 2007. 미니돼지 동결정액의 용해 온도가 정자성상에 미치는 영향. *Reprod. Dev. Biol.* 31:175-179.

최태정, 서강석, 최재관, 김시동, 조광현, 최호성. 2008. 성별에 따른 돼지 체중 및 등지방두께 성장곡선 추정. *한국축산식품학회지.* 28:187-195.

주 의

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