

# 노화모델 활용을 위한 Klotho 유전자 녹아웃 돼지 생산 최종보고서

2017. 11. 8.

주관연구기관 / 서울대학교 산학협력단

농림축산식품부  
농림식품기술기획평가원

## 2. 제출문

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “노화모델 활용을 위한 Klotho 유전자 녹아웃 돼지 생산”(개발기간 : 2014.9.25 ~ 2017.9.24)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 11. 8.

주관(세부)연구기관명 : 서울대학교 산학협력단 (대표자)



주관연구책임자 : 박세창

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

### 3. 보고서 요약서

#### 보고서 요약서

과제고유번호	114059-3	해당단계 연구기간	2016.09. 25 - 2017. 09. 24 (12개월)	단계구분	3/3
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업			
	사업명	생명산업기술개발사업			
연구과제명	대과제명	해당 없음			
	세부과제명	노화모델 활용을 위한 Klotho 유전자 녹아웃 돼지 생산			
연구책임자	박세창	해당단계 (3차년도) 참여 연구원 수	총: 7 명 내부: 2 명 외부: 5 명	해당단계 (3차년도) 연구개발비	정부:100,000천원 민간: 천원 계:100,000천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 13 명 내부: 2 명 외부: 11 명	총연구개발비	정부:300,000천원 민간: 천원 계:300,000천원
연구기관명 및 소속부서명	서울대학교 산학협력단			참여기업명	
위탁연구	연구기관명: 해당없음			연구책임자:	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 본 연구를 통해 Klotho 유전자 과발현 미니돼지 세포주 확립하였다.</li> <li>2. Klotho/RFP 과발현 미니돼지 세포주 이용하여 Klotho 과발현에 따른 유전자 발현 및 복제 수정란을 생산하고 발달을 분석하였다.</li> <li>3. 유도발현 시스템이 적용된 Klotho 발현 조절 미니돼지 세포주를 확립하여 복제 수정란을 생산, 분석하였다.</li> <li>4. Klotho 유전자 녹아웃 미니돼지 세포주 확립하고 Klotho 유전자 녹아웃에 따른 유전자 발현 및 녹아웃 복제 수정란을 생산, 분석하였다.</li> <li>5. 유도발현 시스템을 추가 적용한 Klotho 녹아웃 미니돼지 세포주 확립하고, 복제수정란의 발달을 분석하였다.</li> <li>6. Klotho 유전자 녹아웃 세포주를 이용한 미니돼지 복제수정란을 이식후 임신된 대리모로부터 태아세포주를 확립하였다.</li> <li>7. Klotho 유전자 녹아웃 미니돼지 생산을 위해 17마리 대리모에 복제 수정란 체내 이식을 진행하였으며, 64.7%의 임신률을 보였다.</li> <li>8. 본 과제의 결과를 통해 'Klotho 유전자 녹아웃 질환모델 동물 및 이의 용도 (출원번호: 10-2017-0127415)'의 특허를 출원하였다.</li> </ol>				<p>보고서 면수</p> <p>54페이지</p>	

#### 4. 국문 요약문

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	본 연구는 유도발현 시스템이 적용된 Klotho 과발현 미니돼지 세포주 및 최신 유전자가위 기법을 이용하여 Klotho 유전자 녹아웃 (knock-out) 미니돼지 세포주를 확립하여, Klotho 유전자 녹아웃 복제수정란 생산 및 이식을 통해 인간의 노화 및 관련 질환의 기전 연구 및 질병 정복을 위한 <b>Klotho 유전자 녹아웃 노화모델 미니돼지를 개발</b> 하는 것이 최종 목표이다.					
연구개발성과	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 본 연구를 통해 Klotho/RFP 과발현 미니돼지 세포주를 확립하였다.</li> <li>2. 유도발현 시스템이 적용된 Klotho 발현 조절 미니돼지 세포주를 확립하였다.</li> <li>3. 최신 유전자가위 기법을 이용하여 Klotho 유전자 녹아웃 미니돼지 세포주를 확립하였다.</li> <li>4. 유도발현 시스템을 적용한 Klotho 녹아웃 미니돼지 세포주를 확립하였다.</li> <li>5. Klotho 유전자 녹아웃 미니돼지 생산을 위하여 Klotho 유전자 녹아웃 세포주를 이용하여 미니돼지 복제수정란 생산하였으며, 체내 이식 기반을 구축하였다.</li> <li>6. Klotho 유전자 녹아웃 미니돼지 유래 세포주를 확립하여 체세포복제기법을 이용하여 미니돼지의 생산 가능성을 타진하였다.</li> </ol>					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 본 연구의 결과는 체세포 핵이식을 이용한 형질전환 동물의 생산을 이용하여 다양한 인간 질환 대상 모델 실험동물 생산할 수 있는 기술로 활용이 기대된다.</li> <li>2. 본 연구에서 생산되어진 세포는 노화로 인해 야기되는 퇴행성 질환의 세포단위의 연구에 활용이 기대된다.</li> <li>3. 클로소 녹아웃 돼지의 활용으로 노화 병인의 기전연구와 노화 관련 만성질환의 전임상 시험 및 치료제 개발에 활용이 가능할 것으로 기대된다.</li> <li>4. 기술적 측면에서 설치류보다 인간에 더 근접한 돼지의 특성을 활용함으로써 기존의 마우스 모델의 한계를 극복 할 수 있을 것으로 기대된다.</li> <li>5. 단순 녹아웃 모델이 아니라 필요에 따라 유전자 발현을 조절할 수 있기 때문에 병인유전자의 역할을 규명하는 연구에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.</li> <li>6. 세포 및 장기 생산용 돼지모델 개발에 본 기술을 활용함으로써 의료 치료분야로의 확대가능성이 있을 것이다.</li> <li>7. 기존의 소형 동물 중 중심의 실험동물 시장과 차별화되는 틈새시장 개척을 통해 고수익모델 상품화모델을 개발 할 수 있을 것으로 기대된다.</li> <li>8. 미래 전략산업 종자로서의 국내 미니돼지의 자원화 및 활성화 도모하고 돼지를 활용한 생물자원 개발로 축산업의 기존 이미지 제고할 수 있을 것으로 기대된다.</li> </ol>					
중심어 (5개 이내)	노화	클로소 유전자	녹아웃	유도발현	질환모델	

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

		코드번호	D-02
Purpose& Contents	1) To establish porcine cell lines inducibly expressing Klotho gene, 2) To establish Klotho knock-out porcine cell lines using the latest engineered nuclease, 3) To produce Klotho knock-out minipig as ageing model for studying mechanism of human ageing and related-disease		
Results	A) Establishment of porcine cell lines expressing Klotho ○ Establishment of Klotho/RFP overexpression porcine cell lines ○ Establishment of porcine cell lines inducibly expressing a human Klotho gene  B) Establishment of Klotho knock-out porcine cell lines ○ Establishment of Klotho knock-out porcine cell lines ○ Establishment of Klotho knock-out porcine cell lines inducibly expressing a human Klotho gene  C) Production of Klotho Knock-out minipig ○ Establishment of system for producing and transferring cloned porcine embryos derived from Klotho knock-out fibroblasts ○ Establishment of Klotho knock-out porcine cell lines derived from Klotho knock-out fetuses and the attempt to produce Klotho knock-out minipig		
Expected Contribution	A. Application plan  1) Application field ○ Animal cell line development using gene recombinant technology ○ Transgenic animal development using somatic cell nuclear transfer ○ Animal model development for human disease  2) Application plan ○ Provision of animal model for studying degenerative diseases of ageing ○ Application to studying mechanism of ageing ○ The feasibility of application to preclinical test for chronic diseases		

	<p>related to ageing</p> <p>B. Expected effects</p> <p>1) Technical aspects</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Overcoming the limitations of mouse model using porcine model more closed to the human</li> <li>○ The feasibility of basic research on genetic disorder due to application of inducible system to knock-out model</li> <li>○ The feasibility of expansion of medical field by application of this example to development of pig model for xenotransplantation</li> </ul> <p>2) Economic and industrial aspects</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ The feasibility of development of product with high profit by discriminating with small animal market</li> <li>○ Utilization of domestic minipig as the future business strategy</li> <li>○ Improvement of image of livestock industry by development of animal resource</li> </ul>				
Keywords	ageing	Klotho gene	Knock-out	inducible expression	disease model

## 6. 영문목차

### **Chapter I. Outline and objective of the research**

Verse I. Purpose of the research development

Verse II. Necessity of the research development

Verse III. Range of the research development

### **Chapter II. Domestic and foreign research current state**

Verse I. Current state of the research on development and analysis of aging models

### **Chapter III. Results**

Verse I. Establishment of porcine cell lines expressing Klotho

Verse II. Production and analysis of cloned embryos expressing Klotho

Verse III. Establishment of Klotho knock-out porcine cell lines

Verse IV. Production of Klotho Knock-out minipig

Verse V. Strategy and system for the research development

Verse VI. Schedule for the research development

### **Chapter IV. Achievement and level of contribution into interest fields**

### **Chapter V. Attainment of research and plan for utilization of outcome**

### **Chapter VI. Collected foreign science technology informations during research development**

### **Chapter VII. Security level for research development outcome**

### **Chapter VIII. The current status of research facility and equipment enrolled in national science and technology information system**

### **Chapter IX. The implement result of laboratory safety management**

### **Chapter X. The representative outcomes of research development**

### **Chapter XI. Further informations**

### **Chapter XII. References**

## 7. 본문목차

### < 목 차 >

제 1 장. 연구개발과제의개요 .....	
제 1 절. 연구개발 목적 .....	
제 2 절. 연구개발의 필요성 .....	
제 3 절. 연구개발 범위 .....	
제 2 장. 국내외 기술개발 현황 .....	
제 1 절. Aging 모델 개발 및 분석연구현황 .....	
제 3 장. 연구수행 내용 및 결과 .....	
제 1 절. Klotho 과발현 및 유도발현 세포주 완성 .....	
제 2 절. Klotho 과발현 복제수정란 생산 및 분석 .....	
제 3 절. Klotho 유전자 녹아웃 미니돼지 세포주 확립 .....	
제 4 절. Klotho 유전자 녹아웃 미니돼지 생산 .....	
제 5 절. 연구개발 추진 전략 및 추진체계 .....	
제 6 절. 연구개발 추진 일정 .....	
제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	
제 5 장. 연구결과의 활용계획 등 .....	
제 6 장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	
제 7 장. 연구개발성과의 보안등급 .....	
제 8 장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	
제 9 장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	
제 10 장. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	
제 11 장. 기타사항 .....	
제 12 장. 참고문헌 .....	

<별첨> 자체평가의견서



# 제 1 장. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

## 제 1 절. 연구개발 목적

본 연구는 유도발현 시스템이 적용된 Klotho 과발현 미니돼지 세포주 생산, 최신 유전자가 위 기법을 이용하여 Klotho 유전자 녹아웃 (knock-out) 미니돼지 세포주 확립, Klotho 유전자 녹아웃 미니돼지 세포주를 이용하여 복제수정란 생산 및 이식을 통해, 인간의 노화 및 관련 질환의 기전 연구 및 질병 정복을 위한 Klotho 유전자 녹아웃 노화모델 미니돼지를 개발하는 것이 목적이다.

## 제 2 절. 연구개발의 필요성

### 1. 기존 질환모델의 한계점

- 가. 마우스와 같은 설치류는 생체 기전과 해부학적 구조가 인간과 확연히 다르기 때문에 다양한 형질전환 마우스 질환모델에서의 표현형이 인간과 일치하지 않을 수 있는 단점이 있다. (예) 알츠하이머병의 경우 대뇌 피질 내  $\beta$ -amyloidosis와 neurofibrillary tangle의 관찰되는 반면 노령의 설치류에서는 그러한 병변이 전혀 관찰되지 않음 (Cork et al., 1988; Nelson et al., 1994).
- 나. 영장류의 경우, 보다 긴 수명, 동물 중 자체의 희소성 및 사육관리의 비용 등의 어려움으로 인해 극히 제한된 분야에서만 질환 연구에 활용 가능한 제약이 있는 단점이 있다.

### 2. 노화 모델 돼지의 필요성

- 가. 번식시준이 따로 없어 교배에 어려움이 없고 평균 산자 수가 많다 (10~12 마리/어미 1두).
- 나. 심혈관계, 소화 시스템, 중추 신경계, 골격, 섭식 등 해부학적/생리학적 특성에서 다른 가축보다 인간에 더 유사하다.
- 다. 유전학적 특성 (유전자 및 단백질 염기서열)이 설치류에서보다 더 인간과 유사함이 인정된다.
- 라. 특히, 가축 동물 중에서 유전자 조작 기술이 가장 잘 발달되어 있어 마우스에서나 가능했던 유전자 적중 기술이 돼지에 적용 가능해졌으며, 마우스 모델에서는 표현형이 나타나지 않는 cystic fibrosis의 경우 (Fisher et al., 2011) 돼지 모델에서는 인간과 동일한 증상이 나타나는 등 (Rogers et al, 2008; Rogers et al., 2008)), 돼지의 생체의학 모델로서의 가능성 증명하였다.

## 제 3 절. 연구개발 범위

### 1. Klotho 유전자 과발현 미니돼지 세포주 확립

- 가. Klotho/RFP 과발현 미니돼지 세포주 작성
- 나. 유도발현 시스템이 적용된 Klotho 발현 조절 미니돼지 세포주 작성

### 2. Klotho 유전자 녹아웃 미니돼지 세포주 확립

- 가. Klotho 유전자 녹아웃 미니돼지 세포주 작성
- 나. 유도발현 시스템을 적용한 Klotho 녹아웃 미니돼지 세포주 작성

### 3. Klotho 유전자 녹아웃 미니돼지 생산

가. Klotho 유전자 녹아웃 세포주를 이용한 미니돼지 복제수정란 생산 및 체내 이식  
나. Klotho 유전자 녹아웃 미니돼지 생산 및 세포주 확보

## 제 2 장. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

### 제 1 절. Aging 모델 개발 및 분석연구현황

#### 1. 국내에서의 Aging 모델 개발현황

국내에서는 자연발생 노화모델을 대상으로 연구를 진행하고 있으며 노화와 관련된 동물 생산 연구는 드문 편이고, 노화회복 기전 혹은 이를 통한 신약 개발연구를 진행하고 있다.

가. 국내 연구팀이 HGPS 환자 노화를 개선하는 약물을 발굴하고, 그 약물로 노화 회복 메커니즘을 규명하였다 (10배 빨리 늙는 조로증 환자 노화 회복 메커니즘 국내서 첫 규명, 경제신문 디지털타임스, 2017. 03.23).

나. 동물노화를 설명하는 가설 가운데 염증 축적에 의한 결과라는 '염증유도 노화설'이 알려졌지만, 실체가 규명되지는 않았다. 하지만 '염증에 의한 동물노화설'이 국내 연구진에 의해 밝혀졌다 ("노화를 막아라"...전남대 의대팀 염증 유도 '동물노화설' 규명, 연합뉴스, 2017.01.05.).

다. 국내 연구팀에서 독일 막스플랑크연구소 노화생물학 연구팀과 공동으로 척추동물인 '터콰이즈 킬리피쉬 (African Turquoise Killifish, 학명 : Nothobranchius furzeri)'가 노화의 분자적, 유전적 기전 연구에 적합한 모델이라는 사실을 새롭게 증명하였다 (대구경북과학기술원 보도자료, 2016.02.05.).

라. 국내특허: 국내에서 2016년도에 'STK32C 유전자가 결실된 노화 촉진 동물모델의 제조방법 및 이의 용도'의 특허가 출원되었다 (1020160099458 (2016.08.04.)). 또한 2003년도에 '노화-관련 장애 또는 질환의 진단 또는 치료를 위한 녹아웃된 p62 유전자를 포함하는 형질전환성 마우스 및 이를 이용한 노화 관련 장애 또는 질환에 대응하는 화합물의 스크리닝 방법'과 관련된 특허가 출원된 바가 있다 (1020047018453 (2003.05.14.)).

#### 2. 국외의 유전자 녹아웃을 통한 노화 모델생산 및 분석 현황

가. RecQ-like DNA helicase Wrn 녹아웃 (Human Werner syndrome) 동물 생산을 통한 노화 연구

90년대까지만 해도, 유전적으로는 Wrn knockout이지만 표현형으로는 정상인 마우스 밖에 존재하지 않았다. 하지만 Wrn knockout 마우스와 종양 억제 역할을 하는 P53 knockout 모델을 교배시킨 결과, 수명 감소가 나타나는 것을 볼 수 있었다 (Lombard DB et al., 2000). 또한, Wrn knockout 유전자 자체에서 telomerase complex를 knockout 시킨 결과, 사람에서 Warner's syndrome과 비슷한 양상을 나타냈다. (Chang S et al., 2004).

나. LMNA mutation (Hutchinson-Gilford progeria) 생산을 통한 노화 연구

LMNA mutation이 있으면 짧은 mRNA가 형성되어 progerin을 읽게 되는데, Hutchinson-Gilford progeria환자에서 이러한 progerin이 축적되게 된다. 최근, progerin을 과발현하는 transgenic 마우스가 개발 되었는데, 이 마우스는 조기 노화와 탈모 증상을 보였다. (Animal Models of Aging Research: Implications for Human Aging and Age-Related Diseases\* Annual Review of Animal Biosciences/Volume 3, 2015/Mitchell, pp 288).

다. TERT 녹아웃 (Dyskeratosis congenita) 모델 생산을 통한 연구 현황

Dyskeratosis congenita가 있는 동물은 짧은 telomere를 가지고 있으며 telomere complex를 읽는 TERT에 mutation을 가지고 있다. TERT가 overexpression 될 경우 Wnt 회로를 활성화 시킬 수 있고 생리학적 변화는 wnt 회로에 아무 영향을 주지 않는다는 것을 밝혔다 (Strong et al., 2011).

라. Klotho 녹아웃 모델 생산을 통한 aging연구 현황

미국에서 1997년 Klotho 마우스의 발견을 시작으로 (Kuro-o et al., 1997), 2003년 Klotho knockout 마우스가 생산되었으며 (Tsuji-kawa et al., 2003), 그 후로 Klotho monoallelic knockout 또는 biallelic knockout 마우스를 이용하여 Klotho와 그로 인하여 발생하는 증상과의 상관관계에 대한 연구들이 진행되고 있다.

(1) 기억상실 (Shin et al., 2013)

쥐에서 Janus kinase 2 (JAK2)와 signal transducer and activator of transcription 3 (STAT 3)를 감소시킨 결과, 해마에서 klotho mutant를 지니고 있는 마우스가 탄생되었다. 이런 마우스에서는 의식, 그리고 기억력에 관련된 M1 mAChR의 활동 감소가 있었다.

(2) Wound healing(Yamauchi et al., 2016)

마우스 피부 이식을 통해 연구한 결과, 염증에 관여하는 mRNA, IL-1beta와 TNF-alpha가 Klotho knockout 마우스 모델에서 wild type 마우스 보다 더 높게 측정 된 것을 파악할 수 있었다.

(3) 조직의 칼슘화 및 수명(Leibrock et al., 2016)

Klotho는 혈관의 석회화를 억제하며, 나이에 따른 질병을 억제한다. Klotho가 저발현된 마우스에는 심각한 수준의 혈관 석회화와 aging이 관찰되었다. 이러한 질병이 있는 마우스에서 음수에 acetazolamide 0.8g/l를 첨가한 결과, 장애를 복구 하였으며 수명을 거의 3배 가까이 늘렸고 trachea, lung, kidney stomach 등 다양한 장기의 석회화를 억제하였다.

마. 관련 특허: 유럽에서 Klotho 유전자로 구성된 Skin-activating 물질을 스크리닝하는 키트 및 이를 스크리닝하는 방법에 대한 특허가 등록되었다 (02634262 (2017.05.31.)). 또한, 일본에서 석회화 조직의 치료를 위해 soluble Klotho, FGF23, 그리고 FGFR의 복합체 형성 메커니즘을 활용하는 적용법에 대한 특허가 등록되었다 (05927782 (2016.05.13.)).

### 3. 연구결과의 국내외 기술개발 현황에서 차지하는 위치

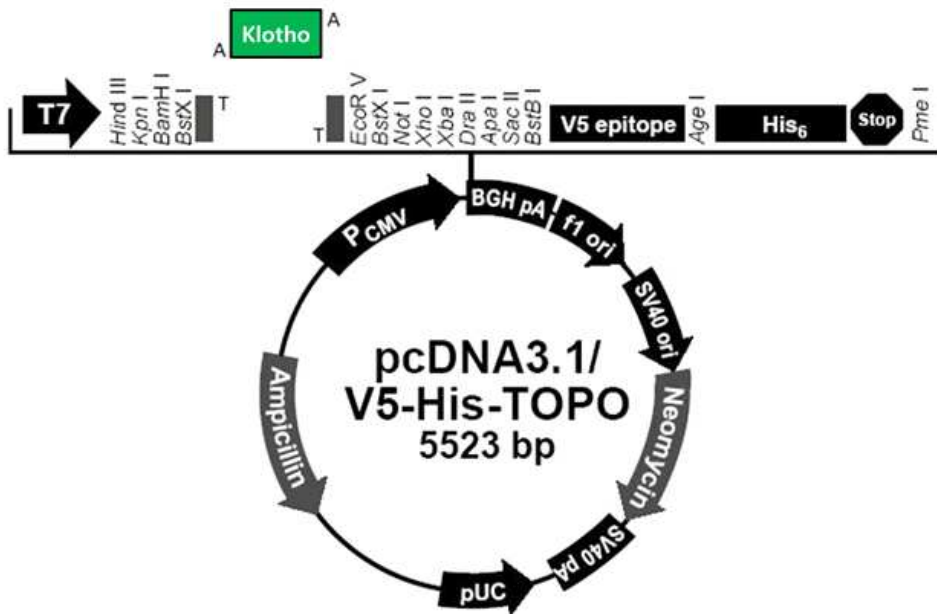
기존까지는 Klotho 마우스 모델을 이용하여 Klotho 연구를 진행하였으나, 인간과 더욱 해부, 생리학적으로 유사한 대형동물 모델의 세포주 및 모델이 부재되어 있었다. 이 연구에서는 최초로 인간과 해부, 생리학적으로 유사하다고 평가되는 돼지를 이용한 모델을 만들었다는 부분에서, 이를 이용하여 추후의 인간의 노화 및 관련 질환의 기전 연구를 진행할시 기존 마우스 모델이 갖는 한계를 극복할 수 있을 것으로 생각된다.

### 제 3 장. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

#### 제 1 절. Klotho 과발현 및 유도발현 세포주 완성

##### 1. Klotho 유전자 스크리닝 및 합성



Modified image from pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Life technologies, CA, USA) [www.addgene.org](http://www.addgene.org); (Plasmid #17712 )

그림 1. Addgene에서 구입한 human Klotho plasmid의 일러스트

인간 Klotho 유전자가 포함된 plasmid (plasmid # 17712)를 [www.addgene.org](http://www.addgene.org)에서 bacterial stock의 형태로 구입하여 확보하였다(그림 1). 구입한 bacterial stock을 ampicillin이 포함된 plate에 streaking을 통해서 single colony를 확보하였고, colony 3개를 확보하여 broth 배양으로 증폭한 후, 제한효소 (BamHI and XhoI)를 통해서 해당 colony가 Klotho를 가지고 있는 colony인 것을 확인하였다.

##### 2. Klotho 과발현 및 유도발현 벡터 제작

가. Klotho 과발현 vector의 제작

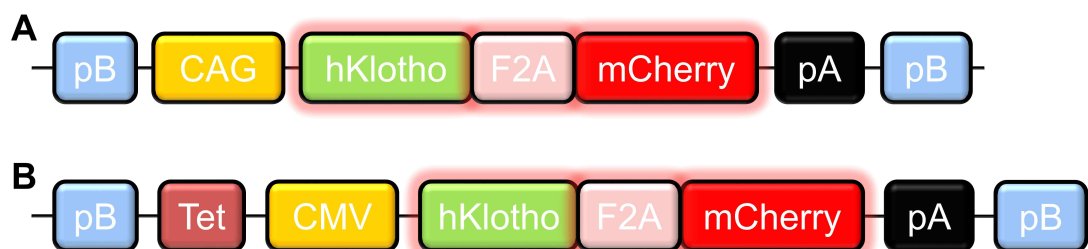


그림 3. Destination vector의 일러스트. A. pB-CA-Klotho-2A-mCherry의 모식도, B. pB-Tet-Klotho-2A-mCherry의 모식도

먼저, Destination vector로 piggybac sequence를 가지고, CAG promoter에 의해서 작동하는 pB-CA vector를 선정하였다. 이렇게 선정된 vector에 Klotho 유전자와 mCherry 유전자를 FMD virus에서 유래한 F2A sequence를 이용하여 연결하면서 동시에 In-Fusion cloning kit (Clontech, CA, USA)를 이용하여 삽입하는 전략을 사용하기로 하였다 (그림 2).

이를 위해, Klotho 유전자를 forward primer (TTTTGGCAAAGAATTATGCCCCGCCAGCGCCCCG)와 reverse primer (TCCTGTACAGATATCTTTGTAAC TTCTTCTGCCTTT)를 이용하여 증폭 정제하고, mCherry 유전자를 forward primer (GATATCTGTAC AGGATCCG)와 reverse primer (AGAGGGAAAAAGA TCTTACTTGTACAGCTCGTCC)를 이용하여 증폭 정제하여 준비하였다. 이렇게 준비된 두 PCR fragment들을 미리 BglIII와 EcoRI으로 double digestion을 해둔 pB-CA vector에 In-Fusion cloning을 진행하여 해당 유전자가 삽입된 colony를 restriction enzyme 중 AflIII를 이용해서 cutting하여 확인하였다. 추가적으로 sequencing의 방법으로 최종적으로 확인하였다. 이렇게 얻어진 vector의 이름은 pB-CA-Klotho-F2A-mCherry라 명명하였다.

#### 나. Klotho 유도발현 vector의 제작

이번에는 destination vector로 piggybac sequence를 가지고, tetracycline 계열의 약물이 들어갔을 경우에만 발현을 하는 CMV promoter를 가진 pB-Tet vector를 사용하였다. pB-Tet vector는 BsrGI을 이용해서 미리 잘라두었고, 기존에 만들어둔 pB-CA-Klotho-F2A-mCherry에서 Klotho-F2A-mCherry 부분을, forward primer (ATCACAAGTTTGTACATGCCCCGCCAGCGCCCCG)와 reverse primer (ATCACCACTTTGTACTTACTTGTACAGCTCGTCC)를 통해 증폭 정제된 PCR product와 In-Fusion cloning을 진행하여 최종 pB-Tet-Klotho-F2A-mCherry라고 명명한 유도발현 vector를 제작하였다. 역시 마찬가지로 restriction enzyme 중 EcoRI을 이용해서 cutting하였고, 추가적으로 sequencing의 방법을 통해서 해당 유전자의 삽입여부를 확인하였다.

### 3. 벡터 도입에 의한 Klotho 과발현 및 유도발현 미니돼지 세포주 작성

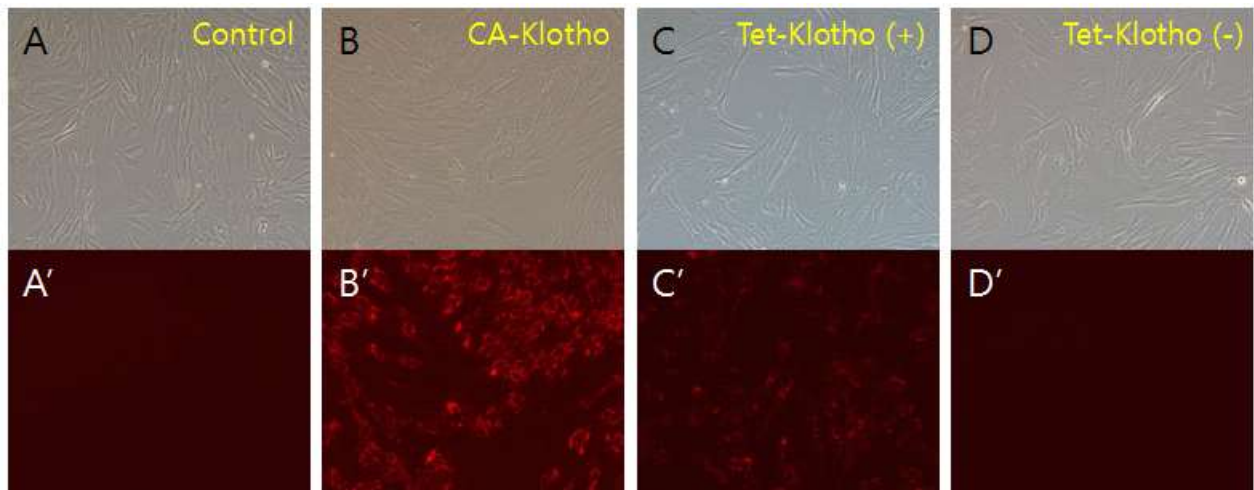
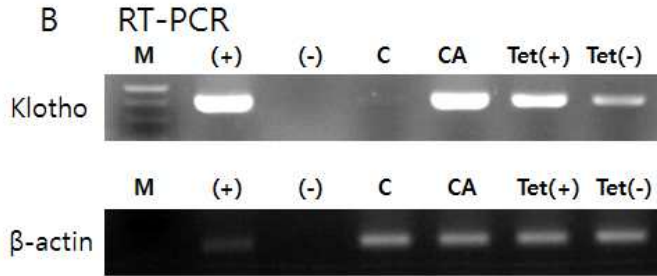
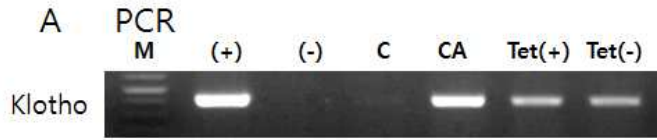


그림 3. Klotho 과발현 및 유도발현 세포의 일반사진 (A-D) 및 형광사진 (A'-D')

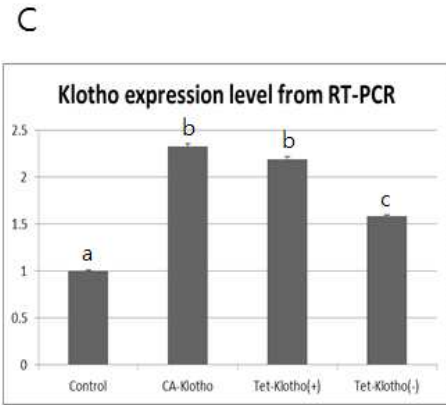
아무 유전자도 넣어주지 않은 control 세포 (A and A')에서는 mCherry의 expression이 전혀 detection되지 않았으나, pB-CA-Klotho-2A-mCherry를 형질전환해주고 selection까지 끝낸 세포, CA-Klotho라 명명, (B and B')와 pB-Tet-Klotho-2A-mCherry를 형질전환해준 세포, Tet-Klotho라 명명, (C and C')에서는 발현을 확인할 수 있었다 (그림 3). 특히 Tet-Klotho (C and C', D and D') 중에서는 doxycycline을 처리한, Tet-Klotho(+)로 명명, (C and C')에서는 mCherry의 발현이 확인되는 반면, 항생제를 이용한 선별을 마친 뒤 doxycycline을 처리하지 않은 세포, Tet-Klotho(-)로 명명, (D and D')에서는 mCherry의 발현이 억제된 것을 확인할 수 있다 (그림 3). 이를 통해서 세포주에 정상적으로 destination vector가 삽입된 것을 가시적으로 확인하였고, 일부 세포를 이용해서 유전자 발현 분석을 통한 최종적인 세포주 검증의 시료로 사용했다. 하지만 그림에서도 볼 수 있듯이, Tet-Klotho(+)의 발현은 CA-Klotho의 발현에 비해서 현저하게 낮은 것을 확인할 수 있고, 이를 통해서 이론적으로는 F2A sequences에 의해 연결되어 있기 때문에 mCherry와 완전히 동일한 양으로 발현할 것으로 예상되는 Klotho의 발현이 Tet-Klotho에 비해서 CA-Klotho에서 확연히 높을 것이라고 예상할 수 있다.

### 4. 유전자 발현 분석을 통한 세포주 검증





M ; Marker  
 (+); Plasmid vector (pB-CA-Klotho-2A-mCherry) or cDNA from other pig for  $\beta$ -actin  
 (-); Negative control  
 C; 홍천-1 cell gDNA  
 CA; 홍천-1, pB-CA-Klotho-2A-mCherry transfected  
 Tet(+); 홍천-1, pB-Tet-Klotho-2A-mCherry transfected with doxycycline  
 Tet(-); 홍천-1, pB-Tet-Klotho-2A-mCherry transfected without doxycycline

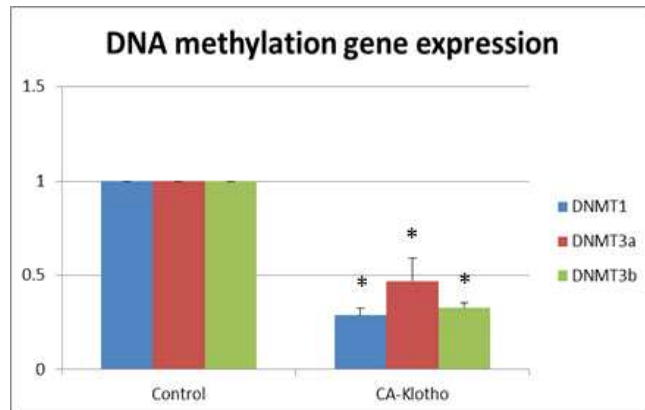
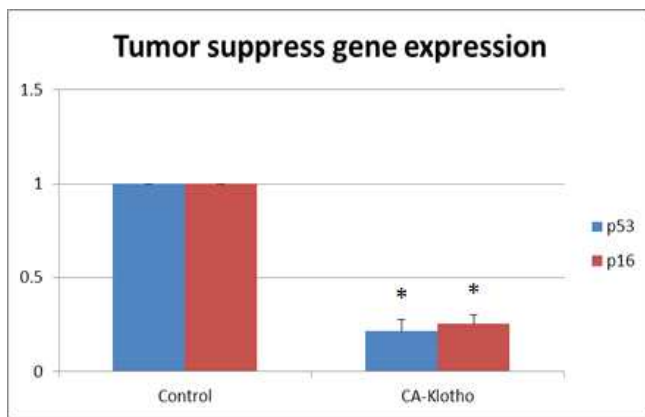
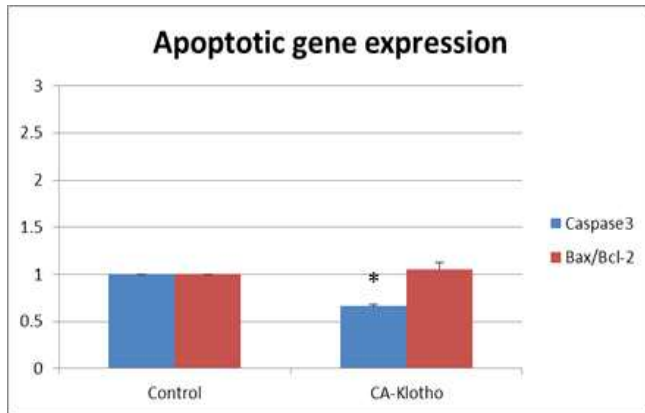


One-way ANOVA  
 Repeated measures ANOVA  
 Tukey's multiple comparison test ( $p < 0.001$ )

그림 4. 유전자 발현 분석을 통한 형질전환 세포주의 검증. A. PCR results of genomic DNA, B. RT-PCR results, C. Relative expression level of Klotho from RT-PCR results

해당 유전자가 세포의 genomic DNA 속에 삽입되어서 발현 여부를 확인하기 위하여, PCR, RT-PCR 방법을 사용하였다.

먼저, 그림 4의 A에서 확인할 수 있듯이, control 세포를 제외한 나머지, Klotho 과발현 및 유도발현 세포에서는 Klotho의 삽입을 확인할 수 있었다. 또한 이 Klotho 유전자의 전사 여부를 RT-PCR을 통해서 그림 4의 B에서 확인하였다. 이렇게 진행한 RT-PCR의 결과를 ImageJ program을 통하여 상대적인 발현양의 정도를 그림 4의 C에서 비교하여 보았다. 그 결과, control의 발현정도를 1로 잡았을 경우, CA-Klotho는  $2.33 \pm 0.03$ , Tet-Klotho(+)는  $2.19 \pm 0.03$ , 그리고 마지막으로 Tet-Klotho(-)는  $1.59 \pm 0.01$ 로 그림 4의 C에 표시한 것과 같은 유의적 차이를 보이고 있었다.



Paired t test (\*;  $p < 0.05$ )

그림 6. Real-time PCR을 통한 Klotho 과발현 및 유도발현 세포에서 관련 유전자 변화양상 파악

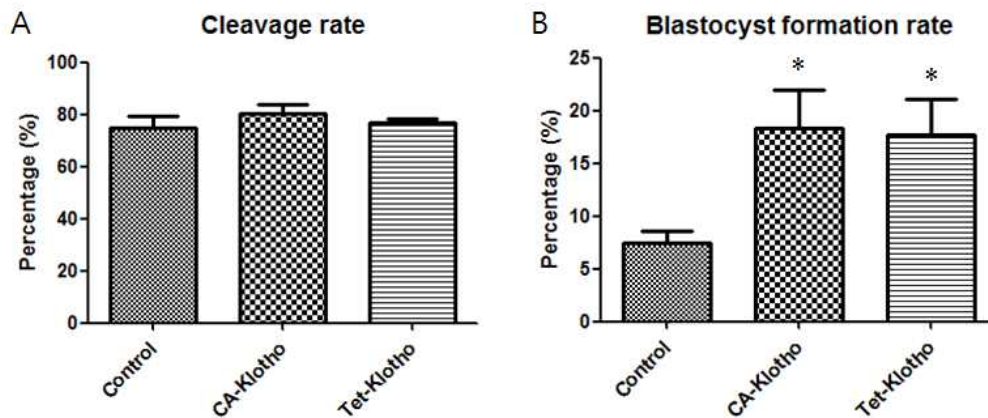
대조군과 Klotho 과발현 세포를 모두 동일한 계대 (passage no. 12)로 통일한 다음, 각각에서 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 이용하여, cell cycle과 관련이 있는 p53과 p16의 발현여부, DNA methylation과 관련이 있는 DNMT1, DNMT3a 그리고 DNMT3b의 발현여부, 마지막으로 apoptosis와 관련이 있는 caspase3, Bax 그리고 Bcl-2 유전자의 발현 양상을 서로 비교하였다.

Klotho 과발현 세포의 경우 cell cycle을 조절하는 기전인 p53과 p16이 모두 유의적으로 감소한 것을 확인하였다. DNMTs (DNMT1, DNMT3a 그리고 DNMT3b)의 경우는 Klotho

유전자가 과발현 하면 모두 유의적으로 감소한 것을 확인하였다. Apoptosis와 관련된 유전자인 caspase3의 경우 Klotho 과발현 세포에서 유의적으로 감소하였고, Bax와 Bcl-2의 ratio는 Klotho 과발현 세포에서 대조군에 비해서 유의적 차이가 없었다(그림 5).

## 제 2 절. Klotho 과발현 복제수정란 생산 및 분석

### 1. Klotho 과발현 미니돼지 세포주 유래 복제수정란 생산 및 분석



One-way ANOVA, Repeated Measures ANOVA, Tukey's multiple comparison test (\*\*,  $p < 0.01$ )  
 → No significant differences in **total cell numbers** of blastocysts.

그림 7. Klotho 과발현 및 유도발현 세포를 이용한 초기 배아 발달을 비교 실험

대조군 세포, CA-Klotho 그리고 Tet-Klotho 세포를 각각 이용하여, 체세포 핵이식 실험을 진행하고, 배아의 발달을 비교한 실험에서는 실험 진행 2일 후에 측정된 난할율에서는 모든 실험군에서 차이를 보이지 않았지만, 배반포 발달율은 대조군에 비해서 CA-Klotho와 Tet-Klotho 세포를 이용한 실험군에서 유의적으로 높은 것을 확인할 수 있었다. 하지만 모든 실험군에서 배반포의 총 세포수는 유의적 차이가 없었다(그림 6).

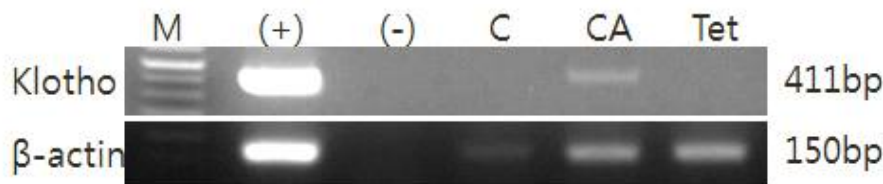


그림 8. 배반포에서 RT-PCR을 통한 Klotho 전사 여부 확인

대조군 세포, CA-Klotho 그리고 Tet-Klotho 세포에서 유래된 배반포에서 진행한 RT-PCR의 결과에서 CA-Klotho 세포 유래의 배반포 실험군에서는 Klotho 유전자의 전사가 확인되었지만, Tet-Klotho를 이용한 실험군에서는 Klotho 유전자가 확인되지 않았다. 이

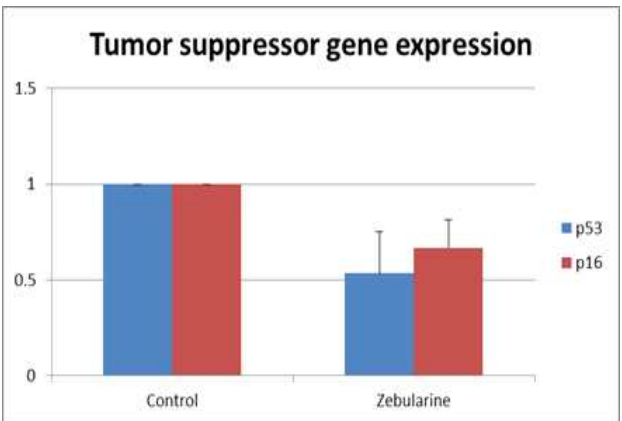
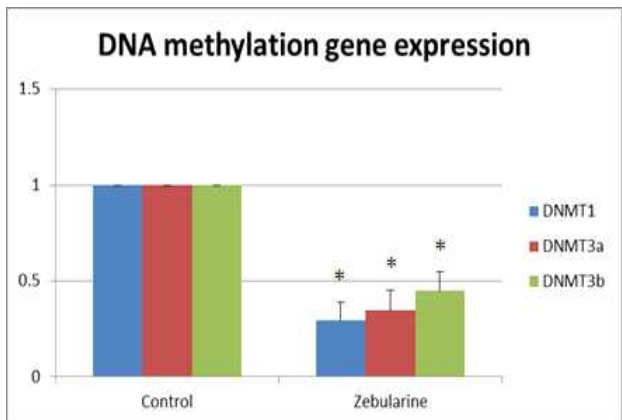
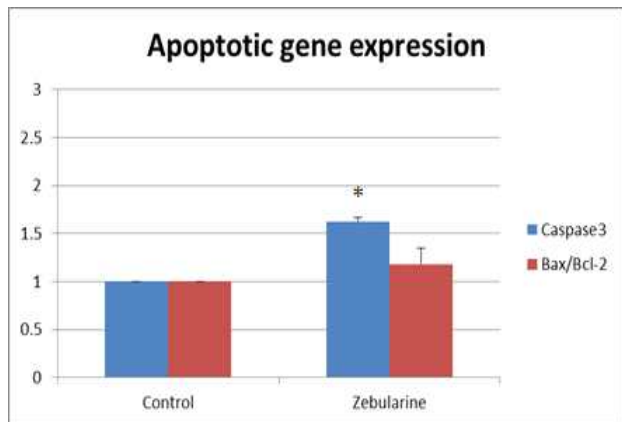
러한 이유는 Tet-Klotho가 배반포에서 발달하는 7일의 기간 동안 doxycycline을 처리하지 않았기 때문에 7일 후에 RT-PCR로 검출이 되지 않은 것으로 추정된다 (그림 7).

Klotho 과발현 및 유도발현 세포주 작성 및 이를 이용한 복제수정란의 생산 및 분석까지의 결과를 (2017, Establishment of Transgenic Porcine Fibroblasts Expressing a Human klotho Gene and Its Effects on Gene Expression and Preimplantation Development of Cloned Embryos, Lee S, Moon JH, Song K, Taweechaipaisankul A, Jo YK, Oh HJ, Park SC, Lee BC., **DNA and Cell Biology**, 36(1), 국외, SCI, 10.1089/dna.2016.3482.)에 논문 게재하였다.

## 2. Zebularine 처리를 통한 Klotho 과발현 배반포 생성을 상승의 원인 규명

### 가. Real-time PCR 결과

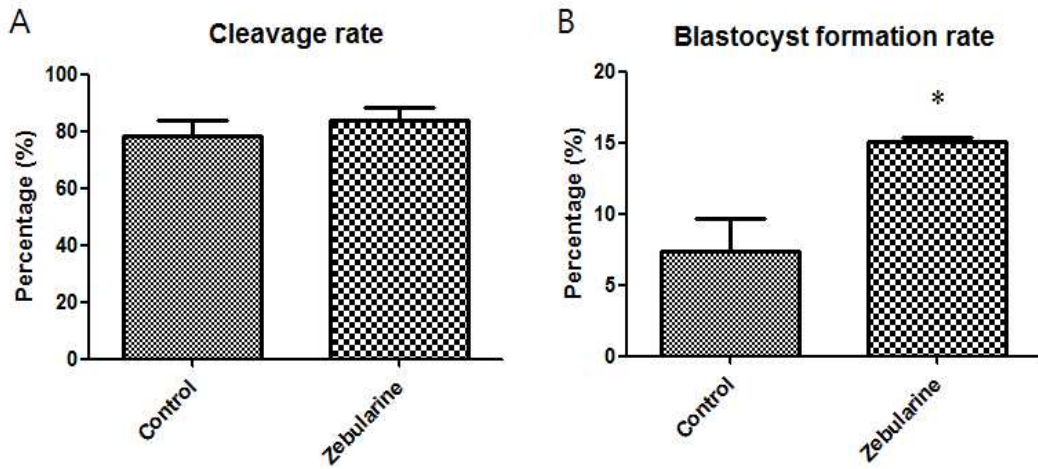
Klotho 과발현 및 유도발현과 관련된 실험에서 Klotho의 발현이 DNMTs를 down-regulation한다는 사실을 발견하였다. 그리고 이러한 현상으로 인해서 초기 배아발달에 긍정적인 영향을 주는 것으로 생각된다. 그래서 이러한 내용을 확인해보기 위해서 DNMT inhibitor인 zebularine을 세포에 50 uM로 24 시간 처리한 후, 동일한 유전자를 분석하여 보았다. Klotho가 과발현된 세포와는 달리, p53과 p16에는 유의적인 차이가 관찰되지 않았지만, DNMT1, DNMT3a 그리고 DNMT3b 모두에서 유의적인 감소를 확인하였다. 하지만 이러한 zebularine의 처리로 인한 caspase3의 증가를 추가로 확인하였고, 세포 역시 체세포 핵이식에 사용하기 전 대조군에 비해서 상당수 죽어있는 것을 확인하였다 (Data not shown).



Paired t test (\*;  $p < 0.05$ )

그림 9. Zebularine (DNMT inhibitor)를 처리한 세포에서의 관련 유전자 변화양상

나. Zebularine 처리 미니돼지 세포주 유래 복제수정란 생산 및 분석



Unpaired t test, (\*; P<0.05)

그림 10. Zebularine 처리 세포를 이용한 체세포 핵이식 결과

체세포 핵이식에 50 uM의 zebularine을 24시간 처리한 세포를 사용하였을 경우, 대조군에 비해서 난할율에는 차이가 없지만, 배반포 발달율에는 유의적인 차이가 나타나는 것을 확인하였다. 이를 통해서 Klotho 과발현 세포에서 나타나는 배반포 발달율이 증가하는 원인 중에 하나로 Klotho 과발현에 의한 DNMT1, DNMT3a 그리고 DNMT3b의 저하를 통해 세포 자체에서 일어나는 demethylation이 하나의 중요한 역할을 하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 9).

### 제 3 절. Klotho 유전자 녹아웃 미니돼지 세포주 확립

#### 1. 돼지 Klotho 유전자 대상 RGEN 제작 후 활성 비교를 통해 최적의 RGEN 선별

RGEN	RGEN Target	Position	Direction	Out-of-frame Score	INDEL ratio
klotho ex2 aRG1	AAAACCTCAAGGTTGGTCCAAAGG	289	-	70.78906631	32.00%
klotho ex2 aRG2	GTTATACTCAAGGTCAATCCAGG	376	-	73.37560163	36.20%
klotho ex2 aRG3	TATTTATTGTAGAAAACGGCTGG	409	+	75.55305737	1.00%
klotho ex3 aRG1	ACGTCATTGGATACACGGCCTGG	21	+	64.04733264	3.90%
klotho ex3 aRG2	CTACATCGACTTCTAAGCCAGG	100	+	84.29937326	0.50%
klotho ex3 aRG3	TAGAACAAGGCTGAAGACTTCGG	137	-	61.935213	56.80%
klotho ex3 aRG4	TATCAGCTTTTGGTAGAACAAAGG	150	-	63.18849712	13.30%

그림 11. 돼지 Klotho 유전자 KO을 위한 RGEN 선정 및 최적의 RGEN 선별

돼지 Klotho 유전자 sequence를 pubmed, ensemble 등을 통해 검색하여 exon을 구별한 다음, 비교적 앞쪽에 위치하면서 크기가 커서 여러 개의 sgRNA를 디자인할 수 있는 exon을 선택하였다. 돼지 Klotho 유전자 exon2를 타겟으로 하는 sgRNA 3개, exon3을 타겟으로 하는 sgRNA 4개를 선정 및 제작 (Klotho exon2 active RGEN (aRG) 1, 2, 3 및 exon3 aRG 1, 2, 3, 4) 하였다.

3x10<sup>5</sup> cells/well, passage5의 porcine fetal fibroblasts에 Neon transfection system (Life Technologies, CA, USA)을 이용하여 1400V, 30ms, 1pulse의 조건으로 7개의 sgRNA/Cas9 ribonucleoproteins (RNPs)를 delivery한 결과, Klotho exon2 aRG1, exon2 aRG2, exon3 aRG3에서 높은 INDEL ratio를 보였으며 (각각, 32.0%, 36.2% 및 56.8%) 가장 효율이 좋은 Klotho exon3 aRG3을 선별하였다 (그림 10).

## 2. 선별된 RGEN으로 Klotho KO 미니돼지 세포주 작성 및 분석

### 가. Single cell 유래 Klotho KO 미니돼지 세포주 작성 및 분석

```
#A.2
CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTTGCCGAAGCTTCAGCCTTGTCTACCAAAAGCTGATAGAGAAAAAT (WT)
CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAG-----TTGTTCTACCAAAAGCTGATAGAGAAAAAT (-21)

#A.5
CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTTGCCGAAGCTTCAGCCTTGTCTACCAAAAGCTGATAGAGAAAAAT (WT)
CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTT-----GCCTTGTCTACCAAAAGCTGATAGAGAAAAAT (-13)

#A.8
CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAG-----TTGTTCTACCAAAAGCTGATAGAGAAAAAT (-21)

#A.11
CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTT-----GCCTTGTCTACCAAAAGCTGATAGAGAAAAAT (-13)
CTTTCTAAGCCAGGATAAGA-----AGCCTTGTCTACCAAAAGCTGATAGAGAAAAAT (-19)

#A.12
CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTTGCCGAAGCTTCAGCCTTGTCTACCAAAAGCTGATAGAGAAAAAT (WT)
CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAG-----AGCCTTGTCTACCAAAAGCTGATAGAGAAAAAT (-17)
CTTTCTAAGCCAGGATAAGA-----AGCCTTGTCTACCAAAAGCTGATAGAGAAAAAT (-19)
```

그림 12. 첫 번째 세포주 (A)로 작성한 Klotho KO cell line의 deep sequencing 결과

Neon transfection system을 이용하여 Klotho exon3 aRG3/Cas9 RNPs delivery를 한 후, single cell culture를 통하여 single cell 유래 colony를 확보하여 점차 계대배양을 하여 세포수를 확보하였다. 두 가지 서로 다른 세포주를 사용하였으며, 첫 번째 세포주 (A)로 작성한 12개의 cell line (#A.1-12) 중 deep sequencing 결과를 통하여 5개 (#A.2,5,8,11,12)의 mutation을 확인하였으며, 그 중 2개의 line (#A.8,11)이 biallelic KO임을 확인하였다 (그림 11).

#B.3  
 CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTTGCCGAAGTCTTCAGCCTTGTCTACCAAAGCTGATAGAGAAAAAT (+1)

#B.4  
 CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTT-----GCCTTGTCTACCAAAGCTGATAGAGAAAAAT (-13)  
 CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTTGC-----CTTCGGCCTTGTCTACCAAAGCTGATAGAGAAAAAT (-6)

#B.5  
 CTTTCTAAGCCAGGATAAGAA-----TCTTCAGCCTTGTCTACCAAAGCTGATAGAGAAAAAT (-13)  
 CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTTGCCGAAG---CAGCCTTGTCTACCAAAGCTGATAGAGAAAAAT (-4)

#B.7  
 CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTTGCCGAAGTCTTCAGCCTTGTCTACCAAAGCTGATAGAGAAAAAT (WT)  
 CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTTGCCGA-----TGTTCTACCAAAGCTGATAGAGAAAAAT (-12)

#B.9  
 CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTT-----GCCTTGTCTACCAAAGCTGATAGAGAAAAAT (-13)  
 CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTTGCCGAAGGTCTTCAGCCTTGTCTACCAAAGCTGATAGAGAAAAAT (+1)

그림 13. 두 번째 세포주 (B)로 작성한 Klotho KO cell line의 deep sequencing 결과

두 번째 세포주 (B)로 작성한 9개의 cell line (#B.1-9)중 deep sequencing 결과를 통하여 5개 (#B.3,4,5,7,9)의 mutation을 확인하였으며, 그 중 4개의 line (#B.3,4,5,9)에서 biallelic KO임을 확인하였다 (그림 12).

나. Fetus 회수를 통한 Klotho KO 미니패지 세포주 작성 및 분석

Recipient	No. of transferred cloned embryos	Pregnancy	No. of recovered fetuses	Absorbing	Ongoing
1	173	No	-	-	-
2	240	No	-	-	-
3	163	No	-	-	-
4	178	No	-	-	-
5	182	Yes	16	9	7

그림 14. Klotho KO 복제수정란의 대리모 이식 및 fetus 회수 결과



(A)



(B)

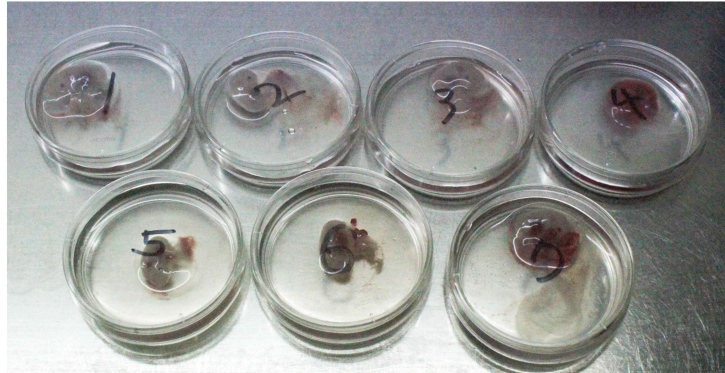


그림 15. (A) Klotho KO 복제수정란 이식 후 28일째의 대리모의 자궁 사진. (B) 살아있는 fetus 사진

Wild type genomic DNA		
	CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTTGCCGAAGCTTCAGCCTTGTCTACCAAAGCTGATAGAG	
Monoallelic modifications		
Fetus A4	CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTTGCCGAAG-CTTCAGCCTTGTCTACCAAAGCTGATAGAG	-1bp
Fetus A5	CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTT-----GCCCTGTCTACCAAAGCTGATAGAG	-13bp
Fetus A6	CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTTGCCGAAG--TTCAGCCTTGTCTACCAAAGCTGATAGAG	-2bp
Fetus A9	CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTTGCC-----GATAGAG	-30bp
Fetus O1	CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTTGC-----CTTCAGCCTTGTCTACCAAAGCTGATAGAG	-6bp
Fetus O2	CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTTGC-- <b>AACTTCTACCA</b> ---TTCTACCAAAGCTGATAGAG	-17bp,+12bp
Fetus O3	CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTTGCCGAAG-CTTCAGCCTTGTCTACCAAAGCTGATAGAG	-1bp

그림 16. 선별하지 않은 Klotho KO 세포를 이용하여 생산된 태아의 Klotho 유전자 exon3의 유전자 편집 모식도. Fetus A; Absorbing fetus, Fetus O; Ongoing fetus.

Single cell 유래 colony로 cell line을 확립하면서 체세포 핵이식 및 분석에 필요한 세포 수 확보를 목적으로 한 계대과정에서 다수의 colony가 senescence에 빠져 cell line이 유지가 어려웠으며, 세포의 계대수가 상당히 (11계대, 9계대) 높아졌다. 세포 수 또한 복제수정란 생산 및 분석 (유전자 및 단백질 발현)에 사용하기에 부족하다고 판단되었다. 따라서, 전략을 수정하여, 복제수정란 생산에 사용하기 적절한 낮은 계대의 porcine fetal fibroblasts에 sgRNA/Cas9 RNPs를 delivery한 직후에, 세포의 선별없이 체세포핵이식을 하여 대리모에 embryo transfer를 한 후, 28일 전후로 하여 fetus를 회수하여, T7E1 및 deep sequencing을 통하여 KO여부를 분석한 후, primary culture를 통해 확보한 Klotho KO cell line을 이용하여, recloning하는 방향으로 전략을 수정하였다. 총 5번, 대리모에 이식하였으며, 그 중 1마리의 대리모에서 임신을 확인하였고 (그림 14), 28일째 태아를 회수하였다 (그림 14). 총 16마리의 태아 중 9마리는 흡수 중이었으며, 7마리가 살아있었고, 이 살아있는 태아를 이용하여 일차배양을 통해 세포주를 확립하였다. Deep sequencing 결과

분석을 통해 흡수중인 9마리의 태아에서 4마리 및 살아있는 7마리의 태아 중 3마리에서 monoallelic KO이 되었음을 확인하였다 (그림 15). 살아있는 7마리로부터 확립한 세포주 중, Fetus O1, O2 및 O3에서 monoallelic KO이 확인 되었으며, 그 중 Frame Shift가 발생한 Fetus O2 및 O3를 이용하여 추후 실험을 계획하였다 (그림 15).

선별하지 않은 Klotho KO 세포를 이용하여 태아 생산 및 이를 이용하여 확립한 태아 유래 **Klotho 녹아웃 세포주의 결과를 특허 출원**하였다. (출원: 2017, Klotho 유전자 녹아웃 질환모델 동물 및 이의 용도, 서울대학교 산학협력단, 대한민국, 출원번호:10-2017-0127415)

### 3. Klotho KO 미니돼지 세포주 유래 복제이식란 생산 및 분석

가. 선별하지 않은 Klotho KO 세포를 이용한 Klotho KO 미니돼지 복제수정란 생산 및 분석

NT groups	No. oocytes		No. of embryos developed to (%)		Mutated Blastocysts (%)
	Injected	Fused (%) *	≥ 2-cells**	Blastocyst ***	
Non treated	61	58(95.1)	46(75.4)	6(9.8)	-
Transfected	219	195(89.0)	149(68.0)	20(9.1)	13/20 (65.0)

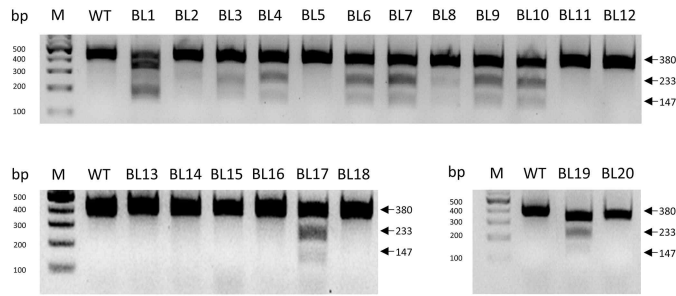
\*Percentage of the number of injected oocytes.

\*\* Percentage of the number of fused oocytes undergo cleavage.

\*\*\* Percentage of the number of fused oocytes developed to blastocysts.

그림 17. Klotho exon3 aRG3을 transfection한 donor cell을 이용한 체세포 핵이식 결과

(A)



(B)

Wild type genomic DNA		
	C T T T C T A A G C C A G G A T A A G A A G T T G T T G C C G A A G C T T C A G C C T T G T T C T A C C A A A A G C T G A T A G A G	
Monoallelic modifications		
BL3	CT----- <b>TCAGCCTGT</b> -----TCCTCAGCCTTGTCTACCAAAGCTGATAGAG	-32bp,+10bp
BL4	C T T T C T A A G C C A G G A T A A G A A G T T G T T -----G C C T T G T T C T A C C A A A A G C T G A T A G A G	-13bp
BL6	C T T T C T A A G C C A G G A T A A G A A G T T G T T -----G C C T T G T T C T A C C A A A A G C T G A T A G A G	-13bp
BL7	C T T T C T A A G C C A G G A T A A G A A G T T G T T -----G C C T T G T T C T A C C A A A A G C T G A T A G A G	-13bp
BL8	C T T T C T A A G C C A G G A T A A G A A G T T G T T G C C G A A --C T T C A G C C T T G T T C T A C C A A A A G C T G A T A G A G	-2bp
BL9	C T T T C T A A G C C A G G A T A A G A A G T T G T T -----G C C T T G T T C T A C C A A A A G C T G A T A G A G	-13bp
BL16	C T T T C T A A G C C A G G A T A A G A A G T T G T T G C C G A A G <b>T</b> C T T C A G C C T T G T T C T A C C A A A A G C T G A T A G A G	+1bp
BL19	C T T T C T A A G C C A G G A T A A G A A G T T G T T -----G C C T T G T T C T A C C A A A A G C T G A T A G A G	-13bp
Biallelic modifications		
BL1	C T T T C T A A G C C A G G A T A A G A A G T T G T T -----G C C T T G T T C T A C C A A A A G C T G A T A G A G	-13bp
BL2	C T T T C T A A G C C A G G A T A A G A A G T T G T T G ----- <b>CTT</b> -----T T G T T C T A C C A A A A G C T G A T A G A G C T T T C T A A G C C A G G A T A A G A A G T T G T T G C C G A A G <b>T</b> C T T C A G C C T T G T T C T A C C A A A A G C T G A T A G A G	-15bp,+3bp +1bp
BL10	C T T T C T A A G C C A G G A T A A G A A G T T G T T -----G C C T T G T T C T A C C A A A A G C T G A T A G A G C T T T C T A A G C C A G G A T A A G A A G T T G T T G C C -----G C C T T G T T C T A C C A A A A G C T G A T A G A G	-13bp -10bp
BL15	C T T T C T A A G C C A G G A T A A G A A G T T G T T G C C G A A G -C T T C A G C C T T G T T C T A C C A A A A G C T G A T A G A G	-1bp
BL17	C T T T C T A A G C C A G G A T A A G A A G T T G T T G C C G A A -----G T T C T A C C A A A A G C T G A T A G A G	-12bp

그림 18. 선별되지 않은 Klotho exon3 aRG3을 transfection한 donor cell을 이용한 체세포 핵이식을 통해 생산된 Klotho 녹아웃 배반포의 분석. (A) T7E1 분석 결과. (B) Deep sequencing 분석 결과

먼저 대조군 세포, Klotho exon3 aRG/Cas9 RNPs가 transfection된 세포의 2개 군에 대해서 난할율과 배반포 발달률을 조사하였다. 대조군 세포 및 transfection된 세포를 이용하여 재구성된 배아의 배반포 발달률은 차이가 없었다 (그림 16; 각각, 9.8% 및 9.1%). 또한 transfection된 세포를 이용하여 재구성된 배반포에서 T7E1 그리고 deep sequencing을 통해서 Klotho 유전자의 KO 여부를 확인하였다. 전체 20개의 배반포 중, 13개 (65.0%)가 mutation이 일어났으며, 그 중 5개 (38.5%)가 biallelic KO으로 높은 효율을 보였다 (그림 17).

나. Single cell 유래 Klotho KO 세포를 이용한 Klotho KO 미니돼지 복제수정란 생산 및 분석

**A**

NT group	No. of oocytes		No. of embryos developed to (%)		Mutated Blastocysts (%)***
	Injected	Fused (%)*	≥ 2-cells**	Blastocyst**	
#9 cell line	25	24(96)	18(72.0)	2(8.3)	2(100)

**B**

#9  
 CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTT-----GCCTTGTTCTACCAAAAGCTGATAGAGAAAAAT (-13)  
 CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTTGCCGAAGGTCTTCAGCCTTGTTCTACCAAAAGCTGATAGAGAAAAAT (+1)

BL1  
 CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTT-----GCCTTGTTCTACCAAAAGCTGATAGAGAAAAAT (-13)  
 CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTTGCCGAAGGTCTTCAGCCTTGTTCTACCAAAAGCTGATAGAGAAAAAT (+1)

BL2  
 CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTT-----GCCTTGTTCTACCAAAAGCTGATAGAGAAAAAT (-13)  
 CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTTGCCGAAGGTCTTCAGCCTTGTTCTACCAAAAGCTGATAGAGAAAAAT (+1)

그림 19. #B.9 cell line을 이용한 체세포 핵이식 결과 및 배반포의 deep sequencing을 이용한 Klotho KO 검증

차선책으로 체세포핵이식에 적합하지 않지만, 위에서 만든 homozygous KO cell line 중 세포 모양과 세포 수가 가장 괜찮은 #B.9 cell line을 이용하여 체세포핵이식을 진행하였다. 약 8.33%의 배반포형성률을 보였으며, deep sequencing으로 검증한 결과 #B.9 cell line과 같은 INDEL의 결과를 보여 single cell 유래 homozygous Klotho KO cell line도 차선책으로 사용할 수 있는 가능성을 확인하였다. 이후 이 세포주 명을 Klotho 9번으로 명명하였다 (그림 18).

Single cell 유래 Klotho 녹아웃 세포주 생산 및 이를 이용한 복제수정란의 생산 및 분석까지의 결과를 (2016, Production of homozygous klotho knockout porcine embryos cloned from genome-edited porcine fibroblasts, Lee S, Jung MH, Oh HJ, Koo OJ, Park SC, Lee BC., **Journal of Embryo Transfer**, 31(3), 국내, 비SCI, 110.12750/JET.2016.31.3.179.)에 논문 게재 하였다.

#### 4. Klotho KO 미니돼지 세포 내 유도발현 벡터 도입을 통한 세포주 작성 및 분석



그림 20. 1차년도에 기제작한 유도발현 벡터의 모식도

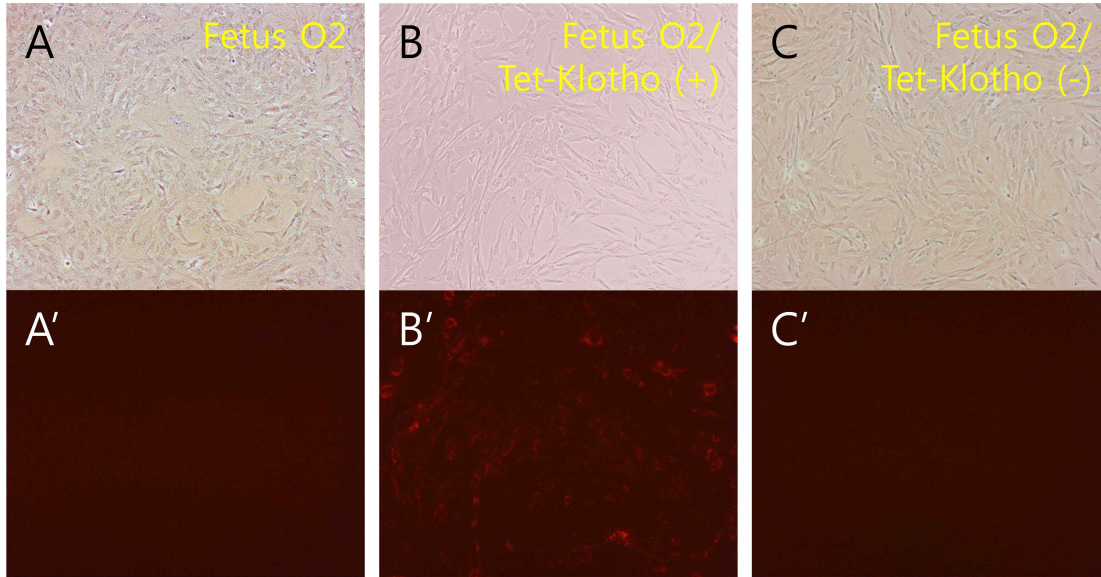
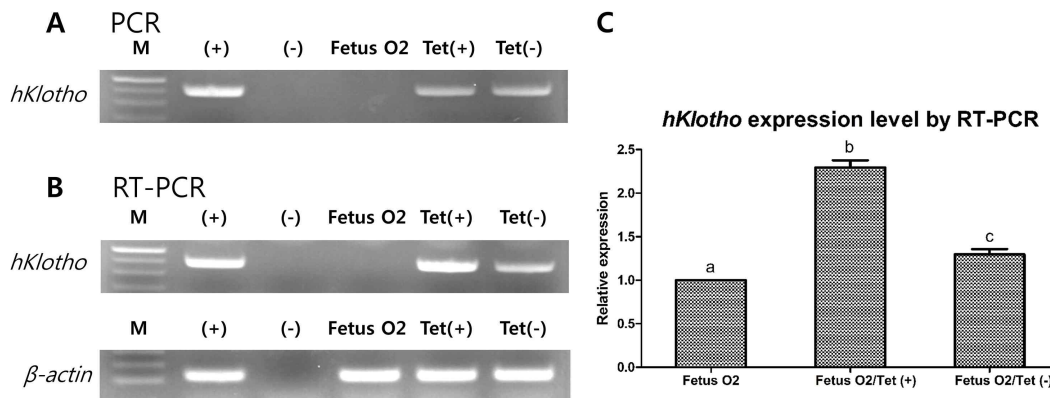


그림 21. Fetus O2 (WT/-17bp,+ 15bp) 세포주에 hKlotho 유도발현 벡터를 도입한 세포의 일반사진 (A-C) 및 형광사진 (A'-C')



M ; Marker  
 (+) ; Plasmid vector (pB-Tet-*hKlotho-2A-mCherry*) or cDNA from other pig for  $\beta$ -actin  
 (-) ; Negative control  
 Fetus O2 ; Ongoing fetus2 cell line  
 Tet(+); Ongoing fetus2, transfected with pB-Tet-*hKlotho-2A-mCherry*. With doxycycline  
 Tet(-); Ongoing fetus2, transfected with pB-Tet-*hKlotho-2A-mCherry*. Without doxycycline

그림 22. 유전자 발현 분석을 통한 형질전환 세포주의 검증. A. PCR results of genomic DNA, B. RT-PCR results, C. Relative expression level of *hKlotho* from RT-PCR results

1차년도에 확립한 유도발현 벡터 pB-Tet-Klotho-F2A-mCherry plasmids를 이용 (그림 19)하여 Fetus O2 (WT/-17bp,+12bp)에 transfection 후 Neomycine으로 선별하였으며, doxycycline을 처리하여 hKlotho유전자가 유도 발현되는지를 PCR, RT-PCR 및 mCherry 발현으로 검증하였다 (그림 20). PCR을 통해서 유도발현 hKlotho 유전자의 삽입을, RT-PCR을 통해서 hKlotho 유전자의 전사를 확인하였다 (그림 21).

5. 유도발현 벡터가 적용된 Klotho KO 미니돼지 세포주 유래 복제수정란 생산 및 분석

NT groups	No. of embryos cultured	No. of embryos developed to (%)	
		≥ 2-cells**	Blastocyst***
Fetus O2	109	91(83.2 ± 6.3)	14(12.7 ± 2.3) <sup>a</sup>
Fetus O2/Tet-hKL	116	99(85.3 ± 1.9)	22(19.2 ± 2.8) <sup>b</sup>

\* Percentage of the number of fused oocytes undergoing cleavage.

\*\* Percentage of the number of fused oocytes developed into blastocysts.

그림 23. 유도발현 벡터가 적용된 Klotho KO donor cell을 이용한 체세포 핵이식 결과

유도발현 벡터가 적용된 Klotho KO 세포주를 이용하여 복제수정란을 생산하였으며, Klotho KO 세포 및 유도발현 벡터가 적용된 Klotho KO 세포를 통해 유래된 복제배아의 체외 발달을 비교하였다. 1차년도 결과와 유사하게, hKlotho가 유도발현된 세포를 이용한 그룹에서 배반포형성률이 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 22). Single cell 유래의 Klotho KO 세포주 (Klotho 9), fetus 유래의 Klotho KO 세포주들 (Fetus O2 및 O3)과 함께, 이 세포주 역시 복제수정란을 대량 생산하여 Klotho KO 돼지 생산을 위해 발동기화 된 대리모 이식에 사용되었다.

## 제 4 절. Klotho 유전자 녹아웃 미니돼지 생산

### 1. 유도발현 벡터가 적용된 Klotho 녹아웃 세포주 유래 복제수정란 체내 이식

유도발현 벡터가 적용된 Klotho KO 세포주 (Fetus O2/Tet-hKL)을 3회에 걸쳐 발정동기화 된 대리모에 3회 체내 이식하였으며 1회 임신되었으나, 임신 중 유산되었다.

### 2. Klotho 녹아웃 미니돼지 생산

Date (Place)	Recipient	Cell line	Type (genotype)	Embryos transferred	Pregnancy	No. of viable cloned piglet
161028 (안성)	28-72	Fetus O3	monoallelic (WT/-1bp)	205	-	-
161124 (안성)	35-94	Fetus O3	monoallelic (WT/-1bp)	240	-	-
161215 (안성)	60-85	Fetus O3	monoallelic (WT/-1bp)	246	-	-
170105 (오산)	Y167-38	Klotho 9	biallelic (+1bp/-13bp)	208	+(abortion)	-
170203 (오산)	Y166-88	Klotho 9	biallelic (+1bp/-13bp)	125	-	-
170210 (안성)	76-186	Klotho 9	biallelic (+1bp/-13bp)	115	-	-
170303 (안성)	71-15	Fetus O2	monoallelic (WT/-17bp,+12bp)	247	-	-
170324 (오산)	Y166-63	Fetus O2	monoallelic (WT/-17bp,+12bp)	276	+(abortion)	-
170414 (오산)	Y166-66	Fetus O2	monoallelic (WT/-17bp,+12bp)	212	+(abortion)	-
170510 (오산)	Y170-62	Fetus O2	monoallelic (WT/-17bp,+12bp)	176	+(abortion)	5주차 개복, 3군데 확장 부분 조직 sampling
170609 (오산)	Y171-33	Fetus O2	monoallelic (WT/-17bp,+12bp)	204	+(개복)	4주차 개복, 11개의 태반, 자궁 조직 sampling (3개 정상)
170728 (오산)	Y168-56	Fetus O2	monoallelic (WT/-17bp,+12bp)	104	+(abortion)	-
170825 (오산)	Y168-74	Fetus O2	monoallelic (WT/-17bp,+12bp)	92	+(abortion)	-
170908 (오산)	Y167-35	Fetus O2	monoallelic (WT/-17bp,+12bp)	86	+(abortion)	-
170616 (오산)	Y166-84	Fetus O2 +Fetus O2/Tet-hKL	monoallelic (WT/-17bp,+12bp) /hKlotho	289 (173+116)	+(abortion)	-
170623 (오산)	Y166-86	Fetus O2 +Fetus O2/Tet-hKL	monoallelic (WT/-17bp,+12bp) /hKlotho	129 (65+64)	+(abortion)	-
170629 (오산)	Y167-3	Fetus O2 +Fetus O2/Tet-hKL	monoallelic (WT/-17bp,+12bp) /hKlotho	282 (178+104)	+(abortion)	-

그림 24. Klotho KO 세포주 유래 복제수정란의 체내 이식 결과 표

Single cell 유래의 Klotho KO 세포주 (Klotho 9), fetus 유래의 Klotho KO 세포주들 (Fetus O2 및 O3) 및 유도발현 벡터가 적용된 Klotho KO 세포주 (Fetus O2/Tet-hKL)를 이용하여 복제수정란을 대량 생산하였으며, Fetus O3 (3회), Klotho 9 (3회), Fetus O2 (8회) 및 Fetus O2 세포주와 FetusO2/Tet-hKL 세포주를 같이 사용 (3회) 하여, Klotho KO 미니 돼지 생산을 위해 총 17회 체내 이식을 진행하였다. 64.7% (11/17)의 높은 임신률을 달성하였으나, 안타깝게도 모두 유산되었다. 임신 5주차에 유산되는 경향을 보이고 있어, Klotho 유전자와 임신간의 상관관계에 대한 참고문헌을 조사하였으며, 최근 연구에서, 사람 임신중독증 (임신과 합병된 고혈압성 질환을 말하며, 부종, 고혈압증, 단백뇨의 세 가지 증세가 주증세로 되고, 조산이나 유산을 일으킬 가능성이 높은 질병) 발병 시 태반에서 Klotho의 발현이 현저히 감소한다는 연구가 있었다 (Cecatil et al., 2016). 이로보아, 임신유지와 Klotho의 상관관계에 대하여 의심이 된다. 마우스 모델의 경우 Klotho monoallelic 및 biallelic KO 모델이 문제없이 생산되었으나, 마우스와 돼지는 해부학적으로 태반의 구조에 차이가 있기 때문에 돼지에서 Klotho KO 모델을 생산하기 어려울 가능성이 존재할 것으로 생각 된다. 마우스의 경우 혈액용모성태반으로 모체의 단백질이 태반을 통과하나, 돼지의 경우 상피용모성태반으로 모체의 단백질이 태반을 통과하기 어려운 구조이며, 이로 인하여 Klotho KO 태아의 태

아 유래 태반에서 감소된 Klotho가 모체에 의해 보상되지 않아 임신 유지가 어려울 가능성이 있다. Klotho 발현이 감소될 경우, Klotho에 의한 Insulin/Insulin Growth Factor (IGF)-1 signaling이 억제되어 감소하며, 이로 인하여 활성화된 Insulin/IGF1 signaling이 FOXO1을 억제하여 FOXO1에 의해 조절되는 항산화 관련 유전자인 MnSOD 및 CAT의 발현 역시 감소하게 된다. 이로 인하여 세포의 세포사멸화가 증가 되어 태반이 손상을 받게 되고, 모체 쪽 Klotho의 보상이 없으면 임신 유지가 어려운 것으로 생각된다. 이 가설을 아래의 4) Klotho 녹아웃 미니페지의 유전자 발현 분석 등 검증 부분에서 분석하였다.

### 3. 태아 및 산자 유래 Klotho 녹아웃 세포주 확보

Wild type genomic DNA		
	CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTTGCCGAAGCTTCAGCCTTGTCTACCAAAGCTGATAGAG	
Monoallelic modifications		
Fetus O1	CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTTGC-----CTTCAGCCTTGTCTACCAAAGCTGATAGAG	-6bp
Fetus O2	CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTTGC-- <b>AACTTCTACCA</b> ---TTCTACCAAAGCTGATAGAG	-17bp,+12bp
Fetus O3	CTTTCTAAGCCAGGATAAGAAGTTGTTGCCGAAG-CTTCAGCCTTGTCTACCAAAGCTGATAGAG	-1bp

그림 25. 태아 유래 Klotho 녹아웃 세포주

앞서 진행한 Fetus 회수를 통한 Klotho KO 미니페지 세포주 작성 및 분석 전략에서, 회수한 살아있는 7 마리의 태아로부터 일차배양 및 Deep sequencing 분석을 통하여 3 개 (Fetus O1, O2 및 O3)의 태아유래 Klotho monoallelic KO 세포주를 확보하였다 (그림 24).

### 4. Klotho 녹아웃 미니페지의 유전자 발현 분석 등 검증



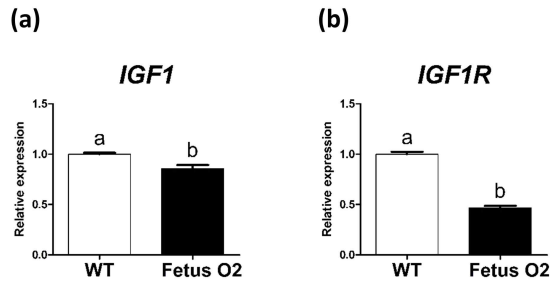
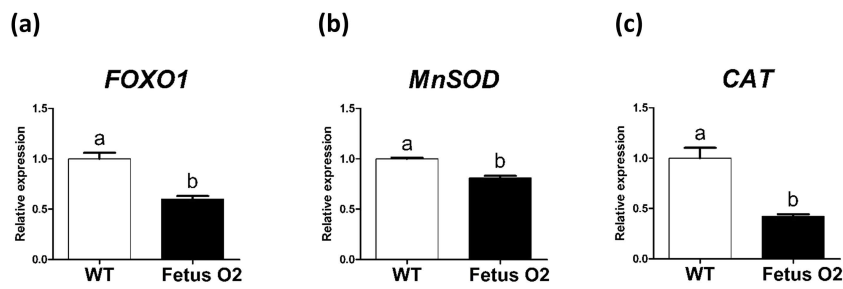
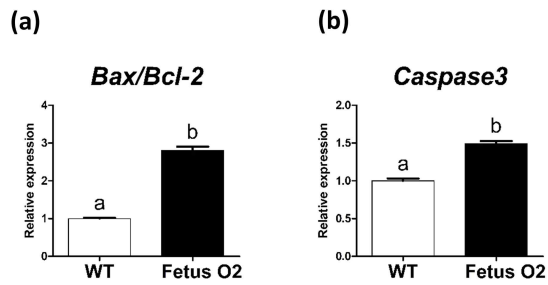
**A****B****C**

그림 26. Real-time PCR을 통한 Klotho KO세포에서 관련 유전자 변화양상 파악. Fetus O2; Klotho monoallelic KO fetal cell line (WT/-17bp,+15bp).

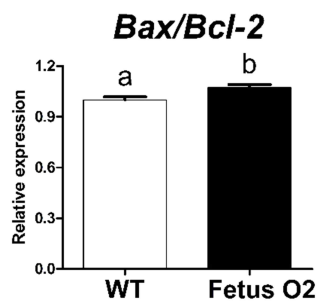
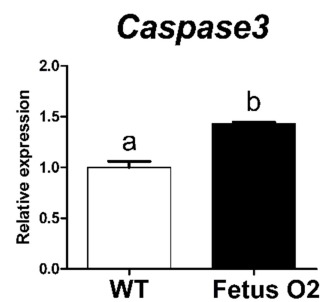
**A****B**

그림 27. Real-time PCR을 통한 Klotho KO세포주 유래 복제수정란에서의 관련 유전자 변화양상 파악. Klotho monoallelic KO fetal cell line (WT/-17bp,+15bp).

Klotho KO 미니돼지 유래 세포주 (Fetus O2; Klotho monoallelic KO fetal cell line (WT/-17bp,+15bp))를 이용하여 유전자 발현 분석을 진행하였다. IGF1 signaling과 관련이 있는 IGF1과 IGF1R의 발현여부, FOXO1 및 항산화와 관련이 있는 FOXO1, MnSOD 그리고 CAT의 발현여부, 마지막으로 apoptosis와 관련이 있는 Bax/Bcl-2 ratio 및 Caspase3 유전자의 발현 양상을 서로 비교하였다.

Klotho KO 세포의 경우, IGF1 signaling에 관여하는 IGF1 과 그의 수용체인 IGF1R의 유전자 발현이 모두 유의적으로 감소한 것을 확인하였다. 이는 Klotho에 의한 억제되고 있는 IGF1이 Klotho 녹아웃에 따라 활성화됨에 따라 보상적인 반응으로 생각된다. 또한, IGF1 signaling의 활성화에 의하여 FOXO1의 발현이 억제 되었고, FOXO1에 조절을 받는 항산화제 유전자인 MnSOD 와 CAT의 발현 역시 감소된 것으로 생각된다. 결과적으로, 내재하는 항산화 유전자의 발현감소로 인해 apoptosis와 관련된 유전자인 Bax/Bcl-2 ratio의 유의적 증가 및 Caspase3 유의적 감소로 반영되었다. 이는 Klotho의 KO으로 apoptosis가 증가되었음을 보여준다 (그림 25). 이 Klotho KO 세포주를 이용하여 배반포를 생산하였으며, 이를 이용하여 apoptosis와 관련된 유전자 발현 분석을 진행하였다. 세포에서의 발현 양상과 마찬가지로, 배반포에서도 Bax/Bcl-2 ratio 발현이 증가하였으며 Caspase3의 발현이 유의적으로 감소하였다 (그림 26).

결과적으로, Klotho의 KO으로 인하여 Klotho에 의해 억제 되던 IGF1 signaling이 활성화 되고, 이로 인하여 항산화 유전자 (MnSOD 및 CAT)의 발현을 조절하는 FOXO1이 억제 되어, 항산화 유전자의 발현 감소로 이어지게 되며, 이로 인해 세포 뿐만 아니라 세포를 이용하여 생산한 배반포에서도 apoptosis의 증가로 이어지게 되는 것으로 보인다. 모체 뿐만 아니라 태아에서도 태아 유래 태반이 형성되기 때문에, 배반포에서의 apoptosis 증가는 태아 유래 태반의 정상적 발달에 영향을 줄 것으로 판단되며, 특히 해부학적으로 상피용모성태반을 갖고 있는 돼지에서 Klotho KO 태아의 부족한 Klotho가 모체에 의해 보상되지 않는다면 이것이 5주차에 발생하는 유산의 주요한 원인이 될 것으로 생각된다. 따라서, 대리모 2두로부터 회수한 Klotho 녹아웃 태반을 이용하여 Klotho 녹아웃이 태반에 미치는 영향에 대하여 분석을 계획하고 있다.

## 제 5 절. 연구개발 추진 전략 및 추진체계

### 1. 추진전략 · 방법

#### 가. 추진전략

- (1) 국내외 관련학술지의 문헌조사와 인터넷을 이용한 정보검색과, 관련분야 학술대회 참가를 통한 연구자와의 교류를 통해 최신 연구동향을 파악함으로써, 최종목표인 “항노화 유전자 녹아웃 세포주 확립 및 노화모델 미니돼지 개발”에 필요한 가장 효율적인 접근 방법을 확보하였다
- (2) 외부전문기관((주)틀젠, (주)옵티팜)과 컨소시엄을 구성해서, 주기적 회의 진행을 통해 연구 진행 상황을 점검하고, 본 과제의 수행에 필수적 요소이지만 본 연구팀에서 현재

보유하고 있지 않으며 단시간 내 확보가 어려운 기술은 최적의 외부 인프라를 이용함으로써 최상의 결과 도출을 위해 노력하였다.

## 나. 추진방법

### (1) 유전자 클로닝 및 발현 벡터

- (가) 돼지 Klotho 유전자와 reporter 유전자 (형광단백질 또는 항생제 선별)를 gateway PCR을 하여 발현 벡터를 완성하였다.
- (나) 클로닝을 위하여 유전자 양쪽에 recombination이 일어날 수 있는 primer를 준비, BP, LR recombination을 통하여 효과적으로 유전자를 발현시킬 수 있는 시스템을 적용하였다.
- (다) 완성된 벡터는 DH5a competent E. coli를 이용하여 transformation을 실시, miniprep을 통해 positive colony 선별하였다.
- (라) 완성된 DNA는 transfection을 위해 Maxiprep을 실시하여 연구에 사용하였다.

### (2) 유전자 발현 벡터의 세포내 도입

- (가) 완성된 벡터를 세포내로 도입하기 위하여 electroporation을 이용하였다.
- (나) Transfection 이틀 전에 세포를  $3 \times 10^5$  cells/60mm dish에 배양하였다.
- (다) 80% confluency 상태의 세포를 trypsin 처리 후, DNA 1 ug가 포함된 용액과 혼합하고 Neon으로 electroporation한 후 새로운 60mm dish에 도포하였다.
- (라) 24시간 이내 배양액을 교체한 후 이틀 뒤 선별 과정을 통한 계대 배양하였다.

### (3) 세포 배양 및 분석

- (가) 세포 배양을 위한 기본 배지로는 DMEM, 10% FBS, 1% penicillin/ streptomycin, 1% NEAA, 100 mM beta-mercaptoethanol을 이용하며, 항생제 선별 시에는 FBS의 비율을 15%로 높여서 사용하였다.
- (나) 면역염색
  - ① PBS로 3회 세정 후 4~8% paraformaldehyde를 이용하여 fixation (약 20분)하였다.
  - ② 0.1% Triton X로 permeabilization (약 20분) 실시 하였다.
  - ③ 10% goat serum으로 blocking (약 1시간) 실시하였다.
  - ④ 적정 희석된 primary antibody를 적용 (냉장고, overnight)하였다.
  - ⑤ 적정 희석된 secondary antibody를 적용 (약 2시간)하였다.
  - ⑥ conterpart staining으로 DAPI 염색을 실시하여 세포의 특성을 규명하였다.
  - ⑦ 그림 27은 본 연구팀의 다른 연구 결과로서, 세포의 특성을 규명하기 위해 면역염색한 결과 위의 염색 방법이 잘 확립되어져 있음을 반영하였다.
- (다) RT-PCR 및 real-time PCR

- ① total RNA를 뽑아서 cDNA를 합성, RT-PCR 및 real-time PCR을 이용하여 유전자 발현을 분석을 실시하였다.
- ② 목적유전자인 Klotho 외에도 세포가 노화되면서 변하는 대표적인 유전자인 p53, p16, DNMT와 같은 유전자의 발현을 측정비교하였다.
- ③ 이후 변화된 유전자 패턴을 가진 세포를 이용하여 핵이식 복제배아 생산에 이용하고 효율을 평가하였다.

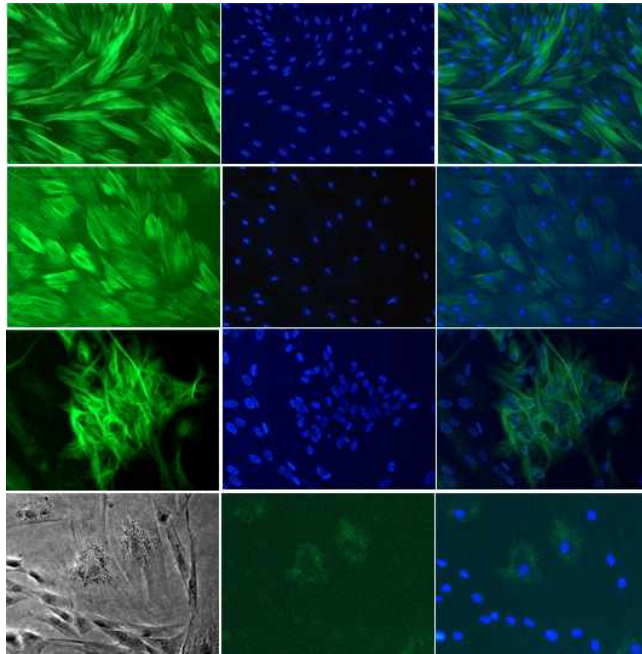


그림 28. Immunostaining of various cell types.

(라) Single-derived colony 확보

- ① Klotho 유전자 과발현 및 녹아웃 세포들 중에서 동일 유전정보를 가진 세포들로만 구성된 colony를 확보하기 위해, 세포 희석액을 96well plate에 도포하거나, 100개의 세포를 100 mm<sup>2</sup> 배양디쉬에 plating한 후 각 colony를 회수하여 sequencing하여 확인하였다.

(4) 유도발현 시스템 벡터 적용

(가) Klotho 유전자의 발현을 임의로 조절할 수 있게 하기 위해 Tetracycline inducible system을 이용한 벡터를 제작하였다.

- ① 항생제 조절 발현을 위해서는 transfection한 후 약 30시간 지나 doxycycline 1~2 ug/ml를 세포배양액에 첨가하였다.
- ② 그림 28은 본 연구팀의 다른 연구 결과로서, 항생제가 있는 상황에서만 단백질이 발현되는 것을 면역 염색을 통해 확인한 결과이다.

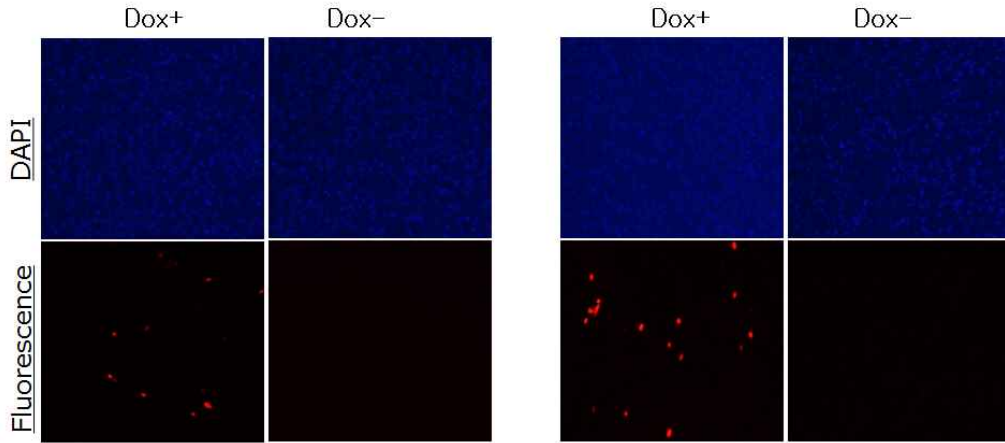


그림 29. Nuclear transcription factors의 항생제 조절에 의한 발현을 면역 염색을 통한 검증.

(나) 조직/장기별 발현 양상에 대한 연구 필요성이 대두될 경우, 특이적 promoter (Ksp-cadherin promoter, BRDT promoter 등)를 이용하여 발현벡터를 제작할 수 있다.

(5) Klotho 유전자 제거용 RGEN 제작

(가) Infomatics를 이용하여 돼지 Klotho 유전자 구조를 확인하고 다수의 RGEN을 제작, 리포터 유전자를 이용하여 활성을 평가하였다.

- ① 형광단백질이 발현되는 리포터 유전자를 RGEN과 동시에 세포내 주입하여 RFP/GFP 발현 여부를 통해 RGEN의 효능의 검증이 가능하였다.
- ② 그림 29는 본 연구팀에서 수행 중인 다른 연구과제의 내용으로, T7E1으로 TALEN에 적합한 리포터 유전자 제작 관련 테스트 결과

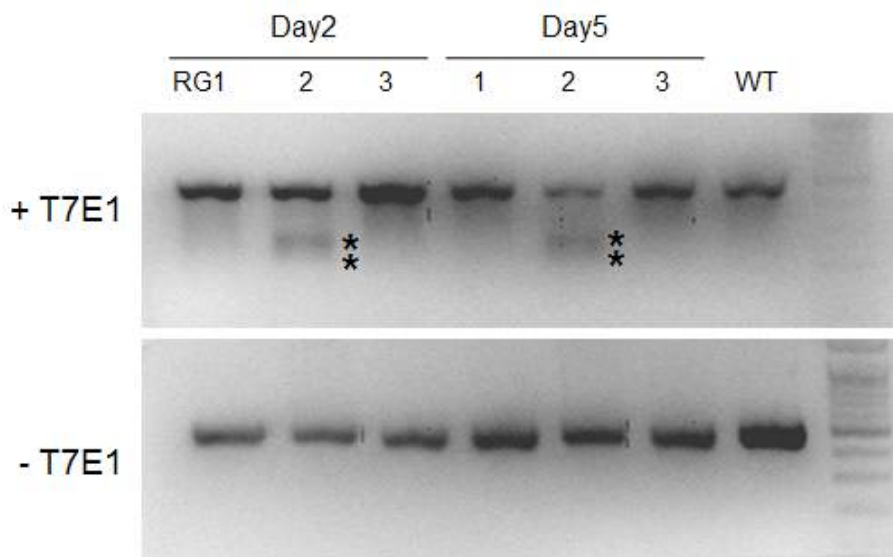


그림 30. TALEN 리포터 유전자 선별.

(나) 연구 수행의 효율을 높이기 위해 RGEN 제작은 전문기관에 의뢰하여 수행하였다.

(6) 체세포핵이식 복제수정란 생산

(가) Klotho 과발현 및 녹아웃 세포주가 완성되면, 이 세포를 공여핵세포로 하여 기 확립된 방법 (Song 등, Mol Reprod Dev, 2009)으로 체세포핵이식에 이용하였다.

- ① 도축장 유래 돼지 난자를 40시간 체외성숙 시킨 후 난구세포를 제거하여 제2극체가 방출된 성숙난자를 선별한다.
- ② Confluency 상태의 세포를 트립신 처리로 분리하여 준비한다.
- ③ Bisbenzimidide 염색 및 cytochalasin B 처리를 통하여 성숙난자의 핵을 제거한다.
- ④ 탈핵난자에 공여세포를 주입한 후 전기적 자극으로 융합 유도한다.
- ⑤ 전기적 활성화를 거친 후 체외배양 실시한다.

(나) 착상 가능한 배반포 단계 수정란에서 유전자 발현 패턴을 분석하여 세포주 검증하였다.

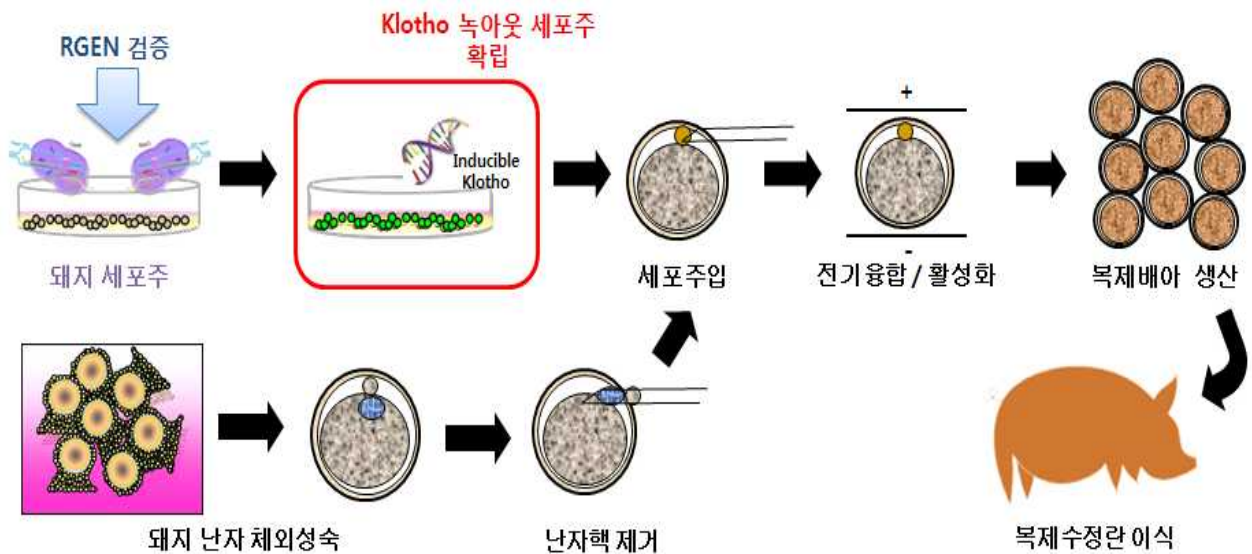


그림 31. Klotho 녹아웃 세포를 이용한 핵이식 수정란 생산 모식도.

(7) 형질전환 복제수정란 이식 및 미니돼지 산자 생산

(가) 생산된 복제수정란은 배란동기화 유도된 대리모에 이식하기 전까지 체외배양과 동일 조건으로 배양한다.

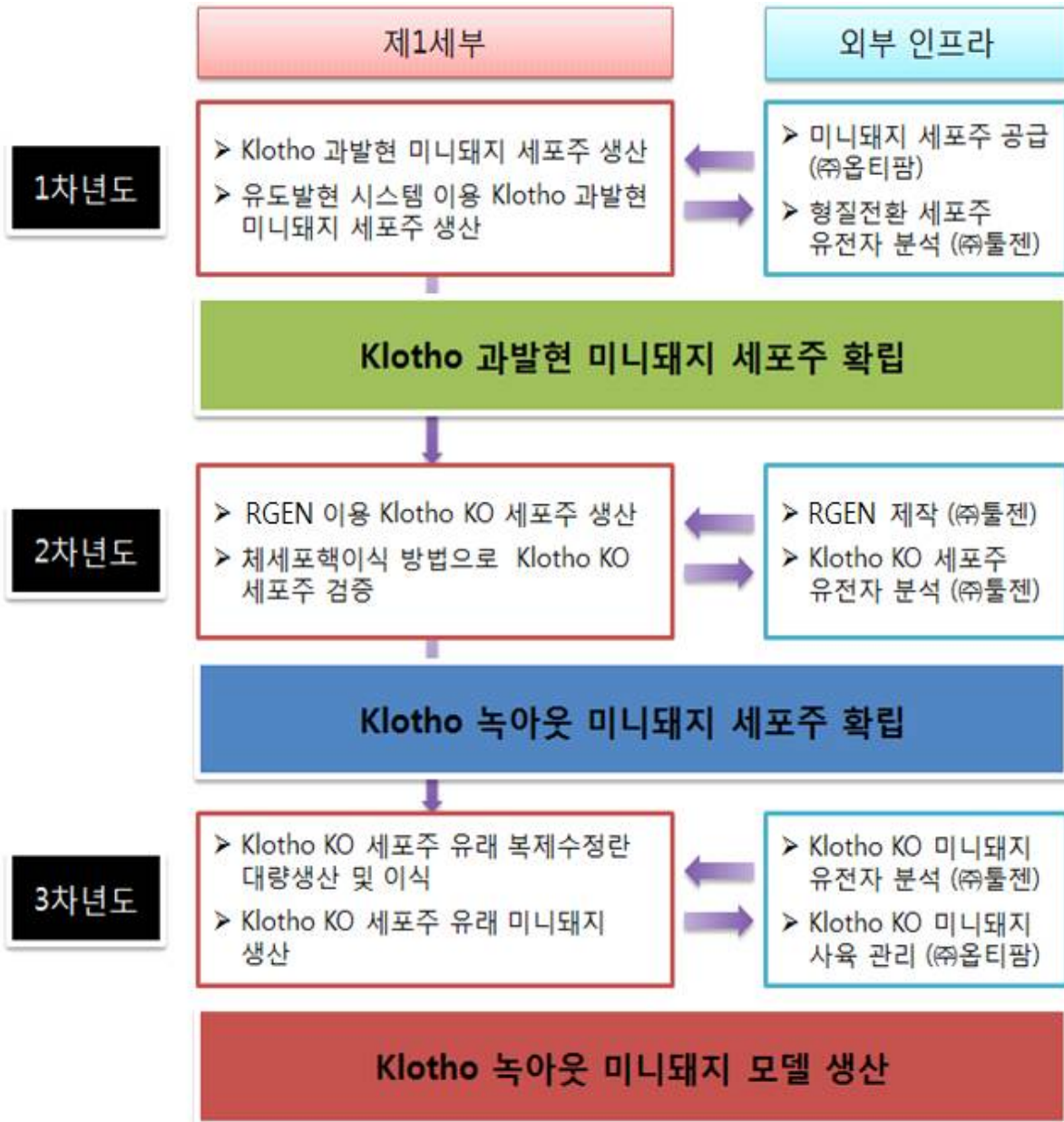
(나) 이식 당일 복제수정란을 이송용 배지에 정치하여 대리모 (자연발정 발현 2일째)가 준비된 이식농장으로 수송한다.

(다) 일반적 외과수술법에 준한 개복을 통해 난소 관찰 후 적합한 경우에만 난관체에 복제수정란을 이식한다.

(라) 체내이식일로부터 4주 후 초음파를 이용하여 대리모의 임신 여부를 확인, 임신된 개체는 주기적으로 임신 유지 여부를 관찰한다.

(마) 이식일 기준으로 114일 후 제왕절개를 통해 미니돼지 산자를 생산한다.

## 2. 추진체계



## 제 6 절. 연구개발 추진 일정

### 1. 1차년도 연구개발 추진 일정

(1)차년도																	
일련 번호	연구내용	추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				
1	돼지 Klotho/RFP 과발현 벡터 제작	■	■	■													
2	벡터 도입으로 Klotho 과발현 미니돼지 세포주 작성 및 분석				■	■	■	■									
3	유도발현 적용된 Klotho 과발현 미니돼지 세포주 작성 및 분석							■	■	■	■						
4	Klotho 과발현 미니돼지 세포주 유래 복제수정란 생산 및 분석								■	■	■	■	■				

### 2. 2차년도 연구개발 추진 일정

(2)차년도																	
일련 번호	연구내용	추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				
1	돼지 Klotho-RGEN 제작 및 최적의 RGEN 선별	■	■	■													
2	Klotho KO 미니돼지 세포주 작성 및 분석				■	■	■	■									
3	Klotho KO						■	■	■	■							



	미니돼지 세포주 유래 복제수정란 생산 및 분석														
4	Klotho KO 세포주 유래 복제수정란 체내 이식														

### 3. 3차년도 연구개발 추진 일정

(3)차년도															
일련 번호	연구내용	추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	유도발현 백터가 적용된 Klotho 녹아웃 세포주 유래 복제수정란 체내 이식														
2	Klotho 녹아웃 미니돼지 생산														
3	태아 및 산자 유래 Klotho 녹아웃 세포주 확보														
4	Klotho 녹아웃 미니돼지의 유전자 발현 분석 등 검증														

## 제 4 장. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06
<b>1. 목표달성도</b>	
가. Klotho 과발현 미니돼지 세포주 완성 (1차년도, Klotho 유전자 과발현 미니돼지 세포주 확립)	
백터 도입으로 Klotho 과발현 미니돼지 세포주를 성공적으로 생산하였으며 PCR, RT-PCR등의 방법을 통해 유전자 삽입여부를 검증하였고, Klotho 과발현에 의한 노화 관련 유전자의 발현 분석등을 하였으므로 가중치 30%의 100% 달성하였다.	
나. Klotho 유도발현 미니돼지 세포주 완성 (1차년도, Klotho 유전자 과발현 미니돼지 세포주 확립)	
유도발현 적용된 Klotho 과발현 미니돼지 세포주를 성공적으로 생산하였으며 PCR, RT-PCR등의 방법 및 doxycycline을 처리하여 mCherry의 발현 여부등을 통해 유전자의 삽입여부를 검증하였으므로 가중치 40%의 100% 달성하였다.	
다. Klotho 과발현 복제수정란 생산 및 분석 (1차년도, Klotho 유전자 과발현 미니돼지 세포주 확립)	
Klotho 과발현 세포주 유래 복제수정란을 성공적으로 생산하였으며 Klotho 과발현에 의한 복제수정란의 발달을 분석하였으므로 가중치 30%의 100% 달성하였다.	
<b>-&gt; 1차년도 100% 달성</b>	
라. Klotho KO 미니돼지 세포주 완성 (2차년도, Klotho 유전자 녹아웃 미니돼지 세포주 확립)	
Klotho 녹아웃 세포주를 single cell culture 또는 fetus 회수 방법으로 성공적으로 생산하였으며, deep sequencing 방법을 통해 mutation 도입을 검증완료 하였으므로 가중치 30%의 100% 달성하였다.	
마. 유도발현 시스템 적용된 Klotho KO 미니돼지 세포주 완성 (2차년도, Klotho 유전자 녹아웃 미니돼지 세포주 확립)	
Klotho 녹아웃 세포주에 유도발현 시스템을 적용한 세포주를 1차년도에 기제작한 유도발현 벡터를 transfection하여 성공적으로 생산하고 PCR, RT-PCR등의 방법 및 doxycycline을 처리하여 mCherry의 발현 여부등을 통해 유전자의 삽입여부를 검증하였으므로 가중치 40%의 100% 달성하였다.	
바. Klotho KO 복제수정란 생산 및 분석 (2차년도, Klotho 유전자 녹아웃 미니돼지 세포주 확립)	
Klotho 녹아웃 복제수정란을 성공적으로 생산 및 복제수정란이 배반포까지 발달한 후 genotype을 분석하여 검증완료 하였으므로 가중치 30%의 100% 달성하였다.	
<b>-&gt; 2차년도 100% 달성</b>	
사. Klotho KO 복제수정란 대량 생산 (3차년도, Klotho 유전자 녹아웃 미니돼지 생산) Klotho 녹아웃 복제수정란을 성공적으로 3,236개 대량 생산하였으며 이를 17회 걸쳐	

동기화된 대리모에 이식하였으므로 가중치 40%의 100% 달성하였다.

아. Klotho KO 미니돼지 1두 이상 생산 (3차년도, Klotho 유전자 녹아웃 미니돼지 생산)

Klotho 녹아웃 미니돼지 생산을 위해 17회 동기화된 대리모에 이식하였으며 64.7%의 높은 임신률을 보였으나 아쉽게도 모두 유산되었으므로 가중치 40%의 50% 달성하였다.

자. Klotho KO 미니돼지 세포주 확보 (3차년도, Klotho 유전자 녹아웃 미니돼지 생산)

7마리의 살아있는 Klotho 녹아웃 복제 태아로부터 3개의 Klotho monoallelic KO 미니 돼지 세포주를 성공적으로 확보하여 가중치 20%의 100% 달성하였다.

**-> 3차년도 80% 달성**

따라서, 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 총합 300% 중, 280%의 목표를 달성하였다.

## 2. 관련분야 기여도

가. 최초의 Klotho 녹아웃 돼지 모델

- (1) 그동안 Klotho 녹아웃 마우스 모델은 있었으나, 마우스와 사람간의 해부 생리학적 차이 등으로 인한 표현형의 차이가 마우스가 인간의 질환 모델로서 한계가 있다는 지적이 꾸준히 야기되었다.
- (2) 이로 인하여 마우스보다 인간에 더 가까운 중대모델 동물의 필요성이 대두되었으며, 돼지는 해부 생리학적으로 인간과 매우 유사하여 인간 질환 모델로서 각광 받고 있다.
- (3) 따라서, Klotho 녹아웃 돼지 모델을 이용한 인간의 노화 및 관련 질환의 기전 연구는 기존 마우스 모델의 한계를 극복할 수 있다는 장점이 있다.

나. 체세포 핵이식에 적합한 태아 유래 유전자 녹아웃 세포주 확립 방법

- (1) 체세포 핵이식을 통하여 유전자 녹아웃 동물을 생산하기 위해서는 유전자가 녹아웃된 세포주가 필요한데, 보통은 single cell유래의 세포주를 여러 계대과정을 통해 확립하였다.
- (2) 이 방법을 통해 확립된 세포주는 확립되는 과정에서 계대수가 체세포핵이식이 적합한 계대수보다 높아지게 된다.
- (3) 하지만, 유전자 녹아웃 효율이 상당히 높은 CRISPR/Cas9 RNPs delivery하여 다른 선별과정 없이 체세포 핵이식 후, 대리모에 체내 이식을 하여도 높은 확률로 유전자 녹아웃 태아를 획득할 수 있음을 확인하였다.
- (4) 이 태아를 회수하여 태아 유래 유전자 녹아웃 세포주를 확립하면, 체세포 핵이식에 적합한 충분히 낮은 계대의 세포주를 획득할 수 있으며, 이 방법을 이용하여 다른 유전자를 타겟 녹아웃 돼지 모델을 만드는 데에도 적용 가능하다.

\* 본 과제는 연구기간은 3년으로 합이 100%로 환산시 가중치에 소주점이 나타나 1년도 연구목표를 100%로 환산하여 종합 3년의 가중치 합을 300%로 하였음.

## 제 5 장. 연구결과의 활용계획

코드번호

D-07

### 1. 노화로 인해 야기되는 퇴행성 질환의 연구에 필요한 모델 세포 또는 동물 공여

가. 설치류보다 인간에 더 근접한 돼지의 특성을 활용함으로써 기존의 마우스 모델의 한계 극복을 할 수 있을 것으로 기대된다.

나. 본 연구에서, Klotho 유전자의 과발현 (human Klotho), 돼지가 지니고 있던 Klotho 유전자를 Cas9에 의해 녹아웃시킨 세포 및 이 세포에 human Klotho 유전자가 유도발현되는 세포주 등 총 3 유형의 세포를 확립하였다. 또한, Klotho KO 미니돼지가 현재 대리모에 임신 중에 있으며, 이러한 노화모델 세포 및 미니돼지를 이용하여 노화로 인해 야기되는 퇴행성 질환의 연구에 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

### 2. 노화 병인의 기전연구에 활용

가. 단순 녹아웃 모델이 아니라 필요에 따라 유전자 발현을 조절할 수 있기 때문에 병인유전자의 역할 규명에 원초적인 연구에 활용할 수 있을 것이다.

나. 본 연구에서, Klotho 유전자의 과발현 (human Klotho) 또는 녹아웃 세포에서 Wild type 과 비교하여 Klotho의 노화 조절에 관여한다고 추정되는 유전자의 발현에 변화가 있었다. 따라서 노화 병인의 기전연구에 Klotho KO 세포 및 동물이 큰 역할을 할 것으로 기대된다.

### 3. 돼지에서의 Klotho 유전자와 임신 유지의 상관관계

가. 본 연구에서, 높은 임신률에도 불구하고 대부분 5주차에 유산이 되는 양상으로 보아, 돼지에서의 Klotho 유전자와 임신 유지 간에는 상관관계가 있을 것으로 사료된다.

나. 참고문헌에서 인간의 임신중독증과 Klotho의 발현의 상관관계가 밝혀진 바 있으며, 종간의 태반의 해부학적 구조 차이가 있으나, 임신 중의 태반에서의 Klotho의 발현이 임신에 미치는 영향에 대하여 본 연구를 통해 확립한 Klotho KO 세포주를 활용하여 추가연구를 진행한다면, Klotho의 임신 유지 관련의 기전연구 규명에 중요한 근거자료를 제시할 것이다.

## 제 6 장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호	D-08
<p><b>1. 노화모델로서의 Klotho 마우스 모델</b></p> <p>Klotho 유전자는 1997년 형질전환 마우스를 만드는 과정에서 나중에 Klotho라는 명칭을 얻게 되는 unknown 유전자에 우연히 insertional mutation이 일어나면서 발견된다 (Kuro-o et al., 1997). 이 유전자의 프로모터 부분에 mutation이 발생하면서 hypomorphism이 일어나게 됐고, 이 형질전환 마우스는 인간의 노화관련 증상들을 나타내기 시작하며 이 마우스를 Klotho 마우스로 명명하였다. 그 후 2003년 gene targeting 방법을 사용하여 Klotho biallelic 녹아웃 마우스를 생산하였고, 이 마우스는 기존의 Klotho 마우스와 동일한 노화관련 증상들을 나타내며 Klotho 유전자가 노화와 관련된 유전자임이 밝혀지기 시작하였다 (Tsuji-kawa et al., 2003).</p> <p><b>2. Klotho 기전</b></p> <p>Klotho 유전자는 Klotho 단백질을 인코딩하고 있으며, membrane form 과 secreted form 2가지 형태로 존재한다. 아직까지는 Klotho가 노화에 미치는 기전에 대해서는 명확히 밝혀지지 않았으나, 가장 유력한 2가지 가설이 있다. 한가지는 Membrane form은 체내의 FGF 수용체와 FGF23의 co-receptor를 형성하며, 인, 비타민 D, 칼슘의 대사를 조절하여 노화에 영향을 미친다는 것이다. 두 번째는 체내의 존재하는 효소에 의해 membrane form의 Klotho가 일부분이 잘려 secreted form으로 되어 체내를 순환하면서, insulin/IGF-1 signaling pathway를 억제하게 되고, 그에 따라 insulin/IGF-1 signaling에 억제 받던 FOXO1이 활성화되면서 FOXO1에 의해 조절되는 항산화 유전자 MnSOD 및 CAT등의 발현이 증가하여 항노화 효과를 갖게 된다는 것이다 (Kuro-o et al., 2009). 현재까지는 이 2가지 가설이 가장 유력하게 거론 되고 있다.</p> <p><b>3. CRISPR/Cas9 RNPs delivery</b></p> <p>1세대 ZFN, 2세대 TALEN을 넘어 최근 3세대 CRISPR/Cas9 관한 연구들이 진행 중이다. 그중, 가장 많이 사용되고 있는 CRISPR/Cas9은 Cas9 단백질과 guide RNA를 인코딩 하고 있는 플라스미드를 transfection하여 사용하였다. 플라스미드를 사용하는 방법의 단점은 genome에 on-target 또는 off-target site에 모두 integration 될 수 있다는 점이다. 이를 극복하기 위해, 최근 (2014년)부터는 CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins (RNPs), 즉 Cas9 단백질과 guider RNA를 직접 transfection하는 방법이 나오기 시작했으며, 플라스미드를 이용한 방법의 단점을 극복할 수 있었고, 효율 역시 상승하였다 (Kim S et al., 2014; Chen S et al., 2016). Klotho 녹아웃 세포주를 만드는 과정에도 이 방법을 사용 하였다.</p> <p><b>4. 인간에서 Klotho 발현과 임신중독증간의 상관관계</b></p> <p>인간에서 34명의 임신중독증 환자 와 34명의 대조군으로부터 제왕절개시 태반 샘플을 획득한 후, 이 샘플로부터 Klotho mRNA 및 단백질의 발현을 real-time PCR 및 Western blot 방법으로 분석하였다. 임신중독증 환자로부터 얻은 태아측 태반에서 Klotho의 mRNA 및 단백질 발현량이 감소되었으며, 전분화능과 관련된 지표들 (Nanog 및 Oct4)의 발현 및 telomere의 길이도 감소된 것을 확인할 수 있었다 (Cecatil et al., 2016).</p> <p>또한, 최근(2017년)에 여성의 생식발달 및 임신, 태아의 건강 및 호르몬관련 암의 발생들과 밀</p>	

접한 연관이 있다는 리뷰논문이 나오는 등 Klotho와 임신관의 상관성에 대한 관심이 높아지고 있는 것으로 보인다 (Fan et al., 2017).

# 제 7 장. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○		

## 제 8 장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		D-10	
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호



# 제 9 장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행 실적

코드번호 D-11

## (1) 연구활동 종사자 환경안전교육 실시

- (가) 정기 교육 - 이공계 및 미술대 대학원 신입생을 대상으로 년2회 집체교육
- (나) 온라인 교육 - 연구활동 종사자를 대상으로 온라인 안전교육 실시
- (다) 수시 교육 - 실험실 사고 발생, 신입 연구원 채용 등 실험실 안전교육이 필요시 기관의 요청에 의해 실시

## (2) 실험실 안전점검 실시

- 연구실 안전환경 조성에 관한 법률」에 의거 이공계 대학, 연구소 실험실 및 미술대학 작업장을 실험 특성에 따라 유형별로 분류하여 일상점검, 정기점검, 특별안전점검, 정밀안전진단을 실시

- (가) 일상점검 - 연구개발활동에 사용되는 실험 약품 및 장비의 이상 유무 점검
- (나) 정기점검 - 실험실 안전점검 체계에 따라 매년 정기점검실시하고, 그 결과 「서울대학교실험실안전 白書」를 배포하여 부적합 사항에 대하여 개선요구
- (다) 특별안전점검 - 폭발사고, 화재사고 등 연구활동종사자의 안전에 치명적인 위협을 야기할 가능성이 있을 것으로 예상되는 경우에 총장의 지시에 의해 실시
- (라) 정밀안전진단 - 정기점검 실시 후 도출된 위해요인에 대하여 외부 전문기관에 진단을 의뢰하여 위해 요인의 개선방향 및 안전관리방안 수립

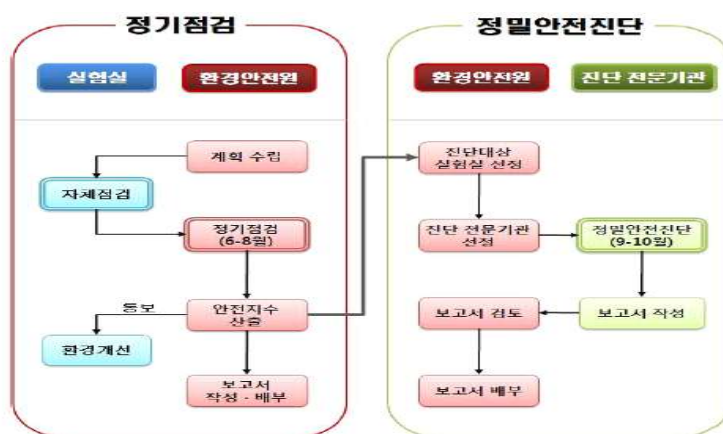


그림 33 실험실 안전점검 체계

## (3) 실험실 안전사고 대응 및 예방

- 완전밀폐형시약장 설치, 실험실 안전사고 대응 및 처리 매뉴얼 보완 및 사고 대응 훈련 실시, 실험실 사고사례 전파, 실험실 사고처리 흐름도 및 비상연락스티커 제작 배포 등이 대응 조직에 의해 진행

(4) 유전자 변형 생물(LMO) 실험실 안전관리

- 「유전자변형생물체 국가간 이동 등에 관한 법률」(2008.1)과 보건복지부 「실험실 생물 안전지침」(2006.12)에 따라 실험실내 생물안전 확보를 위하여 생물실험에 대한 신고·허가/안전교육/안전점검을 「서울대학교 생물안전관리」 체계로 운영

(가) 병원체 및 LMO 실험실 안전교육

- (나) LMO 실험실 안전점검 - 2등급 이상 생물안전연구시설(LMO)에 대하여 미래창조과학부와 공동으로 점검 실시 및 점검 후 개선여부 확인

(5) 연구활동종사자 특수건강검진 실시

- 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 제18조 4항에 따라 「산업안전보건법 시행령」 제29조 및 동법 시행규칙 별표 12의2 「특수건강진단 대상 유해인자」 및 바이러스 등에 노출될 위험성이 있는 연구활동종사자를 모니터링하여 특수건강검진 실시

(6) 연구활동종사자 보험가입

- (가) 매년 정기적으로 보험가입 및 갱신처리를 지속적으로 이행함

- (나) 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 제14조 제1항 및 시행령 제15조 제1항에 의거 의무적 가입

- (다) 가입회사: 교육시설재난공제회

- (라) 가입대상: 학부생, 대학원생, 연구원 (보조연구원 포함)

## 제 10 장. 연구개발과제의 대표적 연구실적

구분 번호 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12		
					Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)	
1	특허	Klotho 유전자 녹아웃 질환모델 동물 및 이의 용도	서울대학 교 산학협력 단	발명자	대한민국		2017.09.29	단독사사	출원번호: 10-2017-01 27415
2	논문	Establishment of transgenic porcine fibroblast expressing a human klotho gene and its effect on gene expression and preimplantation development of cloned embryos	서울대학 교	교신저 자 (박세창 )	DNA and Cell Biology	2.236	2017.01.01	단독사사	SCI/1회 인용
3	논문	Production of homozygous klotho knockout porcine embryos cloned from genome-edited porcine fibroblasts	서울대학 교	교신저 자 (박세창 )	Journal of Embryo Transfer		2016.09.30	단독사사	
4	논문	Melatonin influences the sonic hedgehog signaling pathway in porcine cumulus oocyte complexes	서울대학 교	제1저 자 (이상훈 )	Journal of Pineal Research	10.391	2017.10.01	중복사사	SCI
5	논문	Melatonin regulates lipid metabolism in porcine oocytes	서울대학 교	제1저 자 (김군학 )	Journal of Pineal Research	10.391	2017.03.01	중복사사	SCI

제 11 장. 기타사항-해당없음

코드번호	D-13
○	

## 제 12 장. 참고문헌

코드번호	D-14
○	Fisher JT, Zhang Y, Engelhardt JF., Comparative biology of cystic fibrosis animal models. <i>Methods Mol Biol.</i> 2011 742:311-34.
○	Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, Ostedgaard LS, Rokhlina T, Taft PJ, Rogan MP, Pezzulo AA, Karp PH, Itani OA, Kabel AC, Wohlford-Lenane CL, Davis GJ, Hanfland RA, Smith TL, Samuel M, Wax D, Murphy CN, Rieke A, Whitworth K, Uc A, Starner TD, Brogden KA, Shilyansky J, McCray PB Jr, Zabner J, Prather RS, Welsh MJ., Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. <i>Science.</i> 2008 26;321(5897)
○	Rogers CS, Hao Y, Rokhlina T, Samuel M, Stoltz DA, Li Y, Petroff E, Vermeer DW, Kabel AC, Yan Z, Spate L, Wax D, Murphy CN, Rieke A, Whitworth K, Linville ML, Korte SW, Engelhardt JF, Welsh MJ, Prather RS., Production of CFTR-null and CFTR-DeltaF508 heterozygous pigs by adeno-associated virus-mediated gene targeting and somatic cell nuclear transfer. <i>J Clin Invest.</i> 2008 118(4):1571-7.
○	(10배 빨리 늙는 조로증 환자 노화 회복 메커니즘 국내서 첫 규명, 경제신문 디지털타임스, 2017. 03.23)
○	("노화를 막아라"...전남대 의대팀 염증 유도 '동물노화설' 규명, 연합뉴스, 2017.01.05.)
○	('터콰이즈 킬리피쉬' 노화 연구 새 동물모델로 조명, 대구경북과학기술원 보도자료, 2016.02.05.)
○	(출원: 2016, TK32C 유전자가 결실된 노화 촉진 동물모델의 제조방법 및 이의 용도, 동국대학교 산학협력단, 대한민국, 출원번호:1020160099458)
○	(출원: 2003, TK32C 노화-관련 장애 또는 질환의 진단 또는 치료를 위한 녹아웃된 p62 유전자를 포함하는 형질전환성 마우스 및 이를 이용한 노화 관련 장애 또는 질환에 대응하는 화합물의 스크리닝 방법, 신재균 이한웅 오구택, 대한민국, 출원번호:1020047018453)
○	Lombard DB, Beard C, Johnson B, Marciniak RA, Dausman J, Mutations in the WRN gene in mice accelerate mortality in a p53-null background. <i>Mol. Cell. Biol.</i> 2000 20:3286-91.
○	Chang S, Multani AS, Cabrera NG, Naylor ML, Laud P, Essential role of limiting telomeres in the pathogenesis of Werner syndrome. <i>Nat. Genet.</i> 2004 36:877-82.
○	Animal Models of Aging Research: Implications for Human Aging and Age-Related Diseases* <i>Annual Review of Animal Biosciences/Volume 3, 2015/Mitchell, pp 283-303.</i>
○	Strong MA, Vidal-Cardenas SL, Karim B, Yu H, Guo N, Greider CW., Phenotypes in mTERT <sup>+/-</sup> and mTERT <sup>-/-</sup> mice are due to short telomeres, not telomere-independent functions of telomerase reverse transcriptase. 2011 31(12):2369-79.
○	Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI., Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. <i>Nature.</i> 1997 390(6655):45-51.
○	Tsuji-kawa H, Kurotaki Y, Fujimori T, Fukuda K, Nabeshima Y., Klotho, Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative

- regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Mol Endocrinol.* 2003 17(12):2393-403.
- Shin EJ, Chung YH, Le HL, Jeong JH, Dang DK, Nam Y, Wie MB, Nah SY, Nabeshima Y, Nabeshima T, Kim HC. Melatonin attenuates memory impairment induced by Klotho gene deficiency via interactive signaling between MT2 receptor, ERK, and Nrf2-related antioxidant potential. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014 30;18(6).
  - Yamauchi M, Hirohashi Y, Torigoe T, Matsumoto Y, Yamashita K, Kayama M, Sato N, Yotsuyanagi T. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 473(4):845-852.
  - Leibrock CB, Feger M, Voelkl J, Kohlhofer U, Quintanilla-Martinez L, Kuro-o M, Lang F. Partial Reversal of Tissue Calcification and Extension of Life Span following Ammonium Nitrate Treatment of Klotho-Deficient Mice. *Kidney Blood Press Res.* 2016 41(1):99-107.
  - (출원: 2011, KIT FOR SCREENING FOR SKIN-ACTIVATING SUBSTANCES AND COMPRISING THE KLOTHO GENE, AND METHOD FOR SCREENING FOR SKIN-ACTIVATING SUBSTANCES USING SAME (SKIN-ACTIVATING 물질을 위해 가리고 클로토 유전자 및 이를 이용하여 SKIN-ACTIVATING 물질을 위해 가리기 위한 방법을 포함하기 위한 키트), Amorepacific Corporation, 유럽, 출원번호:02634262)
  - (출원: 2011, 석회화 조직에서 가용화 Klotho, FGF23 및 FGFR 복합체 형성 기구를 이용한 용도 USE APPLICATION UTILIZING COMPLEX FORMATION MECHANISM OF SOLUBLE KLOTHO, FGF23, AND FGFR IN CALCIFIED TISSUE, 國立大學法人廣島大學, 株式會社ラフィーネインターナショナル, 일본, 출원번호:05927782)
  - Kuro-o M., Klotho and aging. 2009 1790(10):1049-58.
  - Kim S, Kim D, Cho SW, Kim J, Kim JS. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.* 2014 24(6):1012-9.
  - Chen S, Lee B, Lee AY, Modzelewski AJ, He L., Highly Efficient Mouse Genome Editing by CRISPR Ribonucleoprotein Electroporation of Zygotes. *J Biol Chem.* 2016 291(28):14457-67.
  - Cecati M, Giannubilo SR, Saccucci F, Sartini D, Ciavattini A, Emanuelli M, Tranquilli AL. Potential Role of Placental Klotho in the Pathogenesis of Preeclampsia. *Cell Biochem Biophys.* 2016 74(1):49-57.
  - Fan C, Tan C, Wang S,  $\alpha$ -klotho: a novel regulator in female reproductive outcomes and hormone-related cancer. *Int J Clin Exp Med.* 2017 10(5):8511-8521.

## 8. 뒷면지

### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.