

최 종
연구보고서

체세포 핵이식에 의한 hFSH 형질전환
젖소의 생산

Production of hFSH Transgenic Clone Cow
by Somatic Cell Nuclear Transfer

엠빅스 바이오테크놀러지(주)

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “체세포 핵이식에 의한 hFSH 형질전환 젓소의 생산” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2004 년 10월 18일

주관연구기관명 : 엠빅스바이오테크놀러지(주)

총괄연구책임자 : 심 호 섭

세부연구책임자 : 심 호 섭

연 구 원 : 양 흥 석

연 구 원 : 김 대 진

연 구 원 : 김 중 현

연 구 원 : 정 지 연

협동연구기관명 : 대구가톨릭대학교

협동연구책임자 : 김 태 완

요 약 문

I. 제 목

체세포 핵이식에 의한 hFSH 형질전환 젖소의 생산

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 인간난포자극호르몬(human follicle-stimulating hormone; hFSH) 형질전환 복제 젖소의 생산을 목적으로 하였다. 즉, 젖소의 체세포에 hFSH 유전자를 도입하고 핵이식에 의하여 복제 수정란을 생산, 대리모에 이식하여 복제소를 생산한다. 고부가가치 의약품인 hFSH의 bioreactor 역할을 할 수 있는 복제 젖소 생산기술의 개발을 통하여 축산생산성을 향상시키고, 생명공학 지식 및 기술의 발전을 도모한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

형질전환동물 생산기술과 체세포 핵이식기법을 결합하여 hFSH를 유전에서 분비하는 형질전환 젖소를 생산하기 위하여 hFSH 유전자가 도입된 젖소섬유아세포(fibroblast) 핵을 이식한 난자의 수정란이식을 통해 복제소를 생산하고, 이를 통하여 고부가가치의 hFSH를 다량 함유한 유즙을 분비하는 젖소를 생산하여 치료용 단백질의 생산성 향상을 시도하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구과제는 인간난포자극호르몬(hFSH) 유전자를 도입한 체세포의 핵이식에 의하여 유전에서 고부가 가치 호르몬을 분비하는 형질전환 젖소의 생산을 목표로 하여 수행되었다. 1차년도에 hFSH 유전자의 cloning과 single-chain hFSH transgene construct의 작성을 완료하였고, 2차년도에 체세포내 hFSH 유전자의 도입, Chinese hamster ovary(CHO) 세포에서의 발현 및 체세포 복제수정란에서 hFSH유전자의 전이를 확인하였다. 2차년도 말-3차년도에 걸쳐 31두의 대리모에 hFSH 형질전환 복제 수정란을 이식하였으며 그 중 1두의 대리모는 7개월까지 임신이 유지되었으나 유산하였고, 현재 2두의 대리모가 GFP와 hFSH를 동시에 형질전환시킨 복제태아의 임신을 유지하고 있다. 책정된 예산을 3차년도에 모두 투입하여 수정란이식을 실시하였으나 연구과제가 종료되는 시점까지 목표로 하였던 hFSH 형질전환 복제젖소의 생산에는 이르지 못하였고, 현재 임신 중인 2두의 대리모에서 출산을 기다리고 있다. 그러나 1

차년도에 복제한우를 생산하였던 경험에 미루어 비슷한 숫자의 수정란 이식이 이루어진 만큼 조만간 hFSH 형질전환 복제젖소의 생산을 기대하고 있다. 대리모의 임신기간이 다른 종에 비하여 긴 것을 감안할 때 연구기간이 짧았던 아쉬움이 있다. 그러나 본 연구과제의 수행으로 single-chain hFSH gene construct의 구축, 외래유전자 발현율의 향상, CHO 세포에서 hFSH 분비의 확인 등 목표 이상의 결과를 얻은 점과, 체세포의 핵이식에 의한 형질전환 젖소생산의 전반적인 과정에 대한 기술을 확립할 수 있었다. 조만간 hFSH 형질전환 복제젖소의 생산이 이루어지면 이를 특허출원하고 관련 산업계로 형질전환 복제젖소 및 이의 생산기술을 이전하여 산업화 할 예정이다.

SUMMARY

Human follicle-stimulating hormone (hFSH) is a pituitary glycoprotein that plays an essential role in the regulation of follicular development and ovulation. Clinically, hFSH has been used to induce follicular growth in infertile women. The hormone was composed of heterodimers including a common α subunit among gonadotropin family and hormone-specific β subunit. Since assembly of the heterodimer is often a rate-limiting step in the production of functional hormone from cultured cells and transgenic animals, nuclear transfer was attempted using fibroblasts carrying single-chain hFSH transgene. Genes encoding α and β subunit of hFSH were linked using C-terminal peptide (CTP) sequence from β subunit of human chorionic gonadotropin. To test a secretion of hFSH prior to nuclear transfer experiment, hFSH gene under the regulation of rat β actin promoter was introduced into Chinese hamster ovary (CHO) cells. In subsequent enzyme-linked immunosorbent assay, production of hFSH from CHO cells was verified. Bovine fibroblasts were transfected with a gene construct including β casein promoter and single-chain hFSH sequences. Fibroblasts carrying hFSH transgene were transferred to enucleated oocytes, and an existence of transgene in nuclear transfer embryos was confirmed by polymerize chain reaction. Transfers of embryos to recipients to produce cloned calves carrying single-chain hFSH are currently in progress.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	8
Section 1. Objectives	8
Section 2. Rationale	8
1. Technical aspect	9
2. Economical and industrial aspect	10
3. Social and cultural aspect	10
Section 3. Contents and scopes	11
Chapter 2. Status of technology	12
Section 1. Transgenic animals	12
Section 2. Somatic cell nuclear transfer	13
Chapter 3. Experimental results and discussion	14
Section 1. Experimental methods	14
1. Construction of vectors and transgenesis	14
2. Somatic cell nuclear transfer	15
3. Genotyping and phenotyping clone animals	15
Section 2. Experimental scheme	16
Section 3. Experimental results	16
1. Cloning of hFSH gene	16
2. Transgene construct	18
3. Enhancement of transgene expression	22
4. Transgene expression in CHO cells	30
5. Efficiency of nuclear transfer	32
6. Production of clone calf	36
7. Transgenesis of somatic cells	39
8. Production of hFSH transgenic fibroblasts	41
9. Production of hFSH transgenic clone embryos	43
10. Transfer of hFSH transgenic clone embryos	44

Chapter 4. Achievements and contributions	45
Section 1. Research objectives and points of evaluation	45
Section 2. Achievements and contributions	46
1. Achievements	46
2. Publications	46
3. Contributions to related fields	47
Chapter 5. Applications of experimental results	48
Section 1. Applicable areas	48
Section 2. Types and plans of applications	48
Chapter 6. References	49

목 차

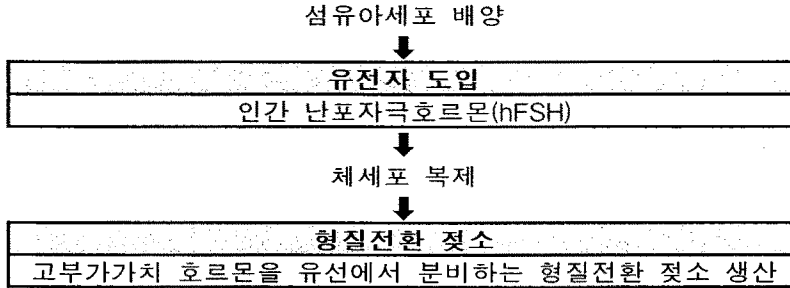
제 1 장 연구개발과제의 개요	8
제 1 절 연구개발의 목적	8
제 2 절 연구개발의 필요성	8
1. 기술적 측면	9
2. 경제·산업적 측면	10
3. 사회·문화적 측면	10
제 3 절 연구개발의 범위	11
제 2 장 국내외 기술개발 현황	12
제 1 절 형질전환동물	12
제 2 절 체세포복제	13
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과	14
제 1 절 연구방법	14
1. 외래유전자 발현백터의 제작 및 체세포 내 도입	14
2. 체세포핵이식	15
3. 체세포 복제 형질전환 젖소의 유전형 및 표현형 조사	15
제 2 절 연구내용	16
제 3 절 연구결과	16
1. 인간 난포자극호르몬 유전자의 cloning	16
2. 외래유전자 construct의 작성	18
3. 외래유전자 발현율의 제고	22
4. 세포주에서 hFSH 외래유전자의 발현	30
5. 체세포핵이식의 효율성 제고	32
6. 체세포 복제송아지의 생산	36
7. 체세포 내 외래유전자의 도입	39
8. Single-chain hFSH 형질전환 체세포의 생산	41
9. Single-chain hFSH 형질전환 체세포 복제수정란의 생산	43
10. hFSH 형질전환 복제수정란의 이식	44

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	45
제 1 절 연구목표 및 평가의 착안점	45
제 2 절 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	46
1. 목표달성도	46
2. 연구실적	46
3. 관련분야에의 기여도	47
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	48
제 1 절 활용분야	48
제 2 절 활용유형 및 활용방안	48
제 6 장 참고문헌	49

제 1 장 연구개발과제의 개요

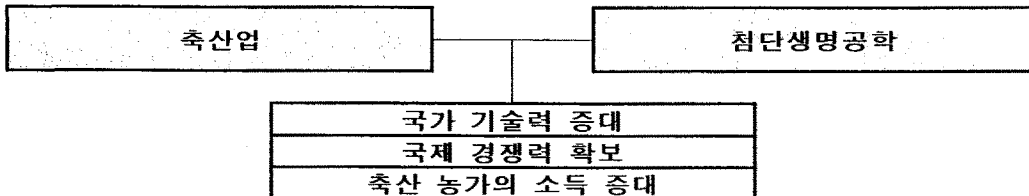
제 1 절 연구개발의 목적

본 연구는 인간난포자극호르몬(hFSH) 유전자를 도입한 체세포의 핵이식에 의하여 유선에서 고부가 가치 호르몬을 분비하는 형질전환 젖소의 생산을 목적으로 하였다.

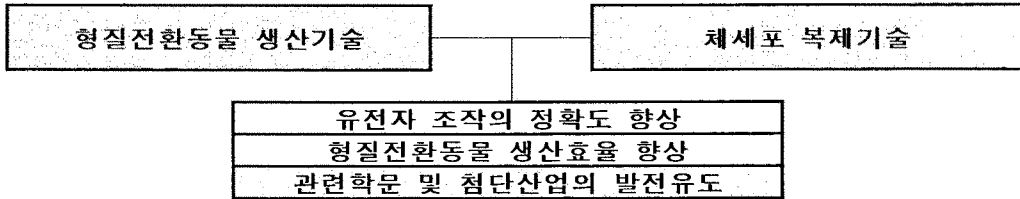


제 2 절 연구개발의 필요성

우루과이라운드 타결, WTO 출범 등과 같은 국제교역요구의 증대 및 강대국의 배타적 이익 추구에 따라 국내 산업 전 분야에 걸친 수입개방 압력이 점차 가중되고 있으며 이에 대한 국내 산업 각 분야의 생산효율성 증대가 시급히 요구되고 있다. 특히 축산업 분야의 경우 지금까지의 보호무역정책에서 과감히 탈피하여 국제화를 통한 생산성 향상 및 국제기술 경쟁력 확보가 이루어져야 한다. 이는 고부가가치의 첨단기술개발을 통하여서만 이루어질 수 있으며, 최근 주목받고 있는 유전자조작기술에 의한 복제 및 형질전환동물 생산기술은 고전적 방법인 가축육종에 의한 생산성 향상의 한계를 극복할 수 있는 대안이다. 현재, 선진각국에서는 이와 같은 기술을 이용한 각종 생리활성물질의 대량생산에 많은 진전이 이루어지고 있으며, 국내 축산업계 또한 이 분야에 대한 연구의 필요성이 커지고 있다. 이러한 연구는 기존의 축산업을 고부가가치 창출의 첨단산업으로 발전시키는 계기가 되어, 다가오는 21세기를 위한 국가의 전략적 산업재편 및 기술첨단화에 크게 기여할 것이다. 유용 유전자가 도입된 형질전환 젖소의 생산을 통하여 각종 생리활성물질의 대량 생산이 도모될 수 있을 뿐만 아니라 축산농가의 소득증대에 기여할 것이다.



또한 이러한 첨단기술의 개발을 위하여 유전자재조합 기술과 복제동물 생산기술의 결합이 필요하며 이는 국가의 생명공학 기술수준의 향상 및 분자생물학, 유전학, 발생학, 생명공학 등 제반 학문분야의 동반적 발전을 유도할 것이다.



1. 기술적 측면

형질전환동물 생산기술과 체세포 핵이식을 통한 복제동물 생산기술의 상호결합은 기존의 형질전환동물 생산법의 한계성을 극복하여 다수의 체세포 배양을 통한 유전자조작 효율성 증대 및 형질전환동물의 무한정 생산을 가능케 한다. 지금까지의 형질전환동물 생산은 수정란의 전핵내 외래유전자의 미세주입(pronucleus microinjection)을 통하여 이루어져 왔다. 이러한 외래유전자 도입기술은 몇 가지의 한계성을 가지고 있는 바, 첫째, 낮은 형질전환동물 생산효율성 둘째, 외래유전자 도입조절의 난이성, 그리고 셋째, 기존유전자의 파괴(loss of function) 및 치환(change of function)의 불가능 등이 지적되고 있다. 이에 따라 외래유전자의 도입부위에 따른 발현을 차이 및 유전자 발현정도를 예측할 수 없으며, 산업적 가치가 있는 특정형질 보유개체의 생산이 어려운 실정이다. 1997년 복제양 돌리의 탄생으로 비롯된 체세포 복제기술은 생명의 분화과정을 역행시킬 수 있다는 경이로운 생물학적현상의 발견인 동시에 기존의 형질전환동물 생산체계의 혁신적 개선 가능성을 제시하였다. 체세포 복제기술은 외래유전자의 전핵내주입술과 달리 체세포의 계대배양과정 중에 외래유전자를 도입하므로, 유전자조작 체세포의 선별이 용이하고 선별된 체세포를 이용한 핵이식(nuclear transfer)을 가능하게 한다. 이 기법을 통하여 얻을 수 있는 여러 가지 이점들을 표에 제시하였다.

형질전환 소의 개발에 있어서 미세주입법과 복제 기술의 효율성 비교

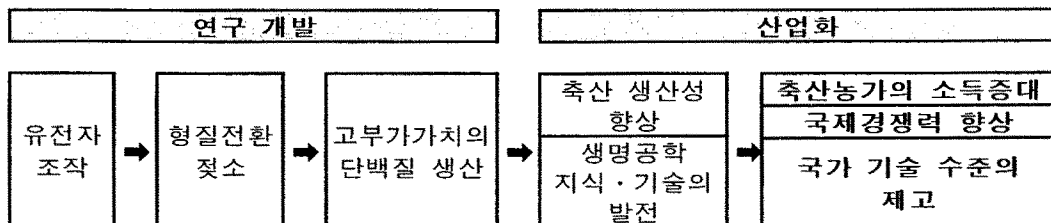
구 분	체세포 복제기술	미세주입법
대상세포	체세포	전핵기 수정란
유전자 도입방법	형질전환 세포주 이용	전핵내 주입
형질전환 빈도	모든 산자 (100%)	산자 중 10% 미만
산자의 성조절	조절가능	조절 불가능
연구개발 소요기간	3~5년	5~10년
산업화까지의 소요기간	5~10년	10~15년

따라서 본 연구과제는 형질전환동물 생산기술과 체세포 핵이식복제기법을 결합하여 고능력 형질전환 젖소를 생산함을 그 목적으로 하였다. 즉, 인간의 난포자극호르몬(human follicle-

stimulating hormone; hFSH) 유전자가 도입된 젖소의 섬유아세포(fibroblast) 핵을 이식한 난자를 작출하고 수정란이식을 통해 복제소를 생산한다. 이를 통하여 고부가가치의 hFSH 유전자를 가진 젖소를 생산하여 생리활성물질의 생산성을 향상시킨다.

2. 경제 · 산업적 측면

배란촉진제로 쓰이는 hFSH는 고가의 의약품(1000 unit당 500달러)이며 현재 전 세계적으로 연간 약 3000 억원(3억달러)의 시장이 형성되어 있으나, 최근의 생식의학기술 발전으로 인하여 그 수요는 기하급수로 증가하고 있다. 지금까지는 연간 약 60만명의 폐경기 여성으로부터 얻은 1억 2천만 리터의 소변으로부터 추출하였으나 최근 유전자조작 동물세포를 이용하여 제품생산이 가능하게 되었다 (recombinant FSH; rFSH). 그러나 이러한 제품은 인간의 FSH와 생화학적 구조가 상이하며 값이 비싼 단점이 있다. 체세포 복제기술을 이용하여 hFSH를 대량함유한 유즙을 분비하는 형질전환 젖소가 생산되면 막대한 경제적 이득(동물세포를 이용한 재조합단백질의 생산에 비하여 투자대비 약 200배의 생산효율향상)을 얻을 수 있음과 동시에 의약품 생산공장(bioreactor)으로서의 축산업의 새로운 위상정립이 가능하게 될 것이다. 형질전환동물과 체세포 복제기술은 장래 국내축산업의 국제경쟁력을 좌우할 가장 중요한 기술이다. 따라서 보다 독자적인 기술개발 및 핵심 첨단기술의 확보가 시급하다. 본 연구의 성공적 수행으로 축산분야 첨단생명공학 기술을 확립할 수 있을 것이며 산학협동의 강화를 통한 국가 과학기술력의 증대가 예상된다. 이는 축산농가 소득증대, 축산업의 생산성향상 및 고도의 산업화를 유도할 것이며, 생명공학 기술향상을 통한 타 분야로의 발전파급효과 또한 기대할 수 있다.



3. 사회 · 문화적 측면

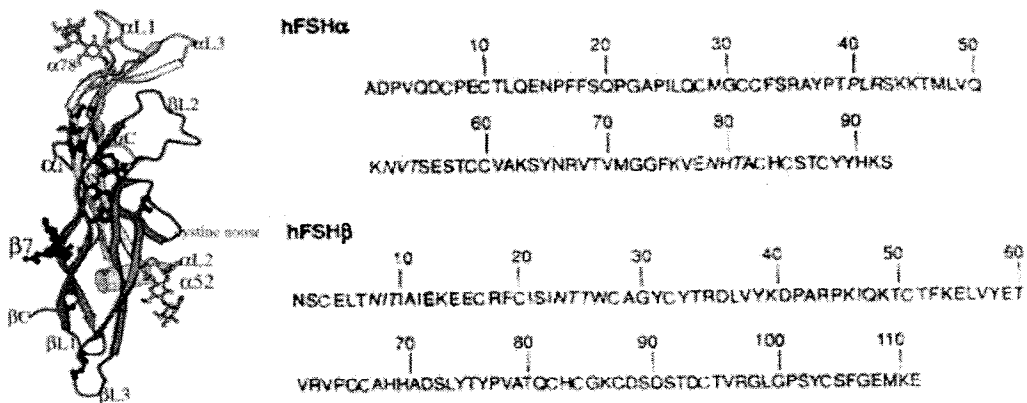
현재 국내의 약 15 만호의 농가에서 280만여 두의 소를 사육하고 있으며 타 농업분야에 비하여 높은 소득수준과 안정된 생활기반을 유지하고 있다. 축산인들은 대체로 학력 수준이 높고 진취적 사고를 지니고 있으므로 첨단기술 및 산업환경에 대한 적응이 빠르다. WTO출범 및 우루과이라운드에 의한 국내 축산업의 기반붕괴가 우려되는 시점에서 '체세포 복제에 의한 형질전환동물 생산' 연구과제는 축산업을 단순일차산업에서 첨단부가가치 산업으로 도약할 수 있는 발판을 제공함과 동시에 더 나아가 농촌의 안정적 산업기반 확립 및 농촌공동화 현상의 방지도 일조할 수 있을 것이다. 또한 고부가가치의 의약품 생산을 통해 국민건강에 기여, 그리고 축산업과 생명공학이 결합된 신산업 확립을 통한 고용증진에도 기여할 것이다.

제 3 절 연구개발의 범위

인간 난포자극호르몬(human follicle-stimulating hormone, hFSH)은 세계적으로 연간 3억 달러의 시장이 형성되어 있는 여성 배란촉진제로서 주로 폐경기 여성(연간 약 60만 명)의 소변으로부터 추출하고 있으나 그 양이 매우 적고 고가인 단점이 있다(1,000unit당 약 500달러). 최근 hFSH 유전자를 도입한 동물세포를 이용하여 재조합 난포자극호르몬(recombinant follicle-stimulating hormone, rFSH)이 생산되고는 있으나 인간의 FSH와 생화학적 구조가 상이하며 가격 또한 비싼 편이다.

본 연구과제는 형질전환동물 생산기술과 체세포 핵이식기법을 결합하여 hFSH를 유전에서 분비하는 형질전환 젖소를 생산함을 그 목적으로 하였다. 즉, hFSH 유전자가 도입된 젖소섬유아세포 (fibroblast) 핵을 이식한 난자의 수정란이식을 통해 복제소를 생산하고, 이를 통하여 고부가가치의 hFSH를 다량 함유한 유즙을 분비하는 젖소를 생산하여 치료용 단백질의 생산성 향상을 시도하였다.

본 연구에 의해 동물세포를 이용한 rFSH의 생산에 비하여 투자대비 약 200배의 생산효율을 향상시킬 수 있어 저렴한 가격으로 수요자에게 공급할 수 있을 것이다. 또한 축산분야 첨단생명공학기술 확립의 계기가 될 것이며 산학협동의 강화를 통한 국가 과학기술력의 증대가 예상된다. 이는 축산농가 소득증대, 축산업의 생산성향상 및 고도의 산업화를 유도할 것이며, 다양한 생명공학 기술향상을 통하여 타 분야로의 발전 과급효과를 기대할 수 있다.



인간 난포자극호르몬(human follicle-stimulating hormone)의 구조

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 형질전환동물

1980년 Gordon 등에 의해 형질전환 생쥐 (transgenic mouse) 의 생산이 최초로 보고되었으며 가축에서도 유전자재조합 기술을 이용한 각종의 노력이 시도되어졌다. 특히, 가축의 유즙에 함유된 유용단백질의 대량생산 시도가 계속되어져 현재 최소 50종 이상의 재조합 단백질이 형질전환된 양, 염소, 돼지, 소 등에서 생산되었다. 이들 중 α 1-antitrypsin, antithrombin III, protein C 등은 임상실험을 거쳤으며 Genzyme Transgenics 의 antithrombin III는 FDA의 승인을 거쳐 조만간 시판될 예정이다. 특히 소의 경우는 lactoferrin 을 생산하는 형질전환 젖소가 네덜란드 및 한국에서 보고된 바 있다. 최근 국내외의 주요 형질전환동물 개발사례는 다음과 같다.

연도	국가	연구자	기술 개발 내용
1991	영국	PPL Therapeutics	α 1-antitrypsin을 면양의 유즙에서 생산. 현재 임상실험 진행중
1991	네덜란드	Pharming	소의 우유에서 인간 락토페린 발현
1991	미국	Ebert 등	Tissue Plasminogen Activator 형질전환 산양
1992	미국	DNX	인간 헤모글로빈을 생산하는 돼지
1992	미국	DNX	돼지의 유즙에서 Protein C 생산, 현재 임상실험중
1993	스위스	Sandoz	Interleukin-2를 발현하는 토끼
1994	미국	Genzyme Transgenics	항 트롬빈 형질전환 산양, 임상실험 완료
1995	미국	Genzyme Transgenics	단일클론 항체생산 산양
1995	네덜란드	Pharming	젖소에서 인간 콜라젠 생산
1996	미국	Nextran	돼지에서 장기이식 거부반응이 억제된 간장 생산, 임상실험
1997	영국	PPL Therapeutics	Factor IX 형질전환 복제 양
1997	미국	Paleyahda 등	Factor VIII 형질전환 돼지
1997	미국	Korhonen 등	Erythropoietin(EPO) 형질전환 토끼
1998	영국	Immutran	인간 DAF를 발현하는 돼지, 원숭이에 이식거부 반응 실험 진행중
1998	한국	생명공학연구소/ 한미약품/KAIST	인간 G-CSF가 도입된 재래흑염소 생산
1999	호주	CRC	Keratin유전자에 번이를 유도한 면양
1999	미국	Wheeler 등	IGF-I 형질전환 돼지
1999	캐나다	Nexia Biotechnologies	거미줄을 생산하는 산양
2000	영국	PPL Therapeutics	유전자적중에 의한 α 1-antitrypsin 형질전환 면양
2000	미국	Chan 등	GFP 형질전환 원숭이
2002	한국	축산기술연구소	인간 EPO를 생산하는 형질전환 돼지

제 2 절 체세포복제

Wilmot 등(1997)이 복제양 돌리의 생산을 보고한 후 지금까지 양, 염소, 소, 돼지, 고양이, 생쥐 등에서 체세포 복제가 이루어졌으며 소의 경우 다수의 연구자들이 섬유아세포, 근유세포, 피부세포등을 이용하여 체세포 복제에 성공하였다. 우리나라에서도 젓소 및 한우의 복제가 보고된 바 있다 (표 참조).

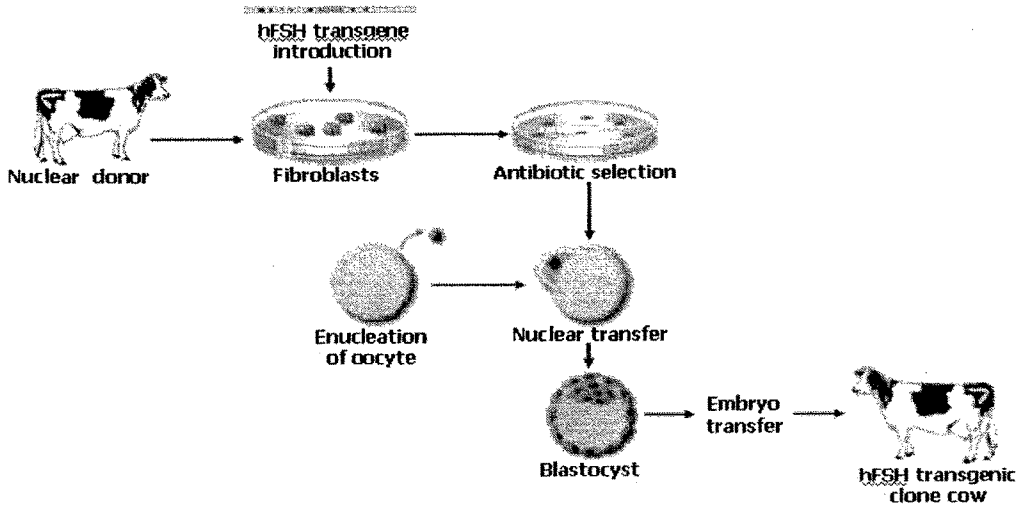
체세포복제술을 이용한 형질전환동물 생산의 예는 human coagulation factor IX를 생산하는 양 (Schnieke 등, 1997) 및 human antitrypsin을 생산하는 염소(Baguisi 등, 1999) 등이 있다. 소에서는 marker gene 인 β -galactosidase-neomycin resistance fusion gene 발현 복제소가 생산되었으나 (Cibelli 등, 1998) 체세포 복제를 통하여 인간에 유용한 재조합 단백질 생산이 가능한 소는 아직 보고되지 않았다. 현재 주목을 받고있는 유전자적중 형질전환 가축생산은 1999년 PPL Therapeutics 에 의한 유전자적중 복제양의 생산이 보고된 바 있다(McCreath 등, 2000). 본 연구과제에서는 체세포복제기술을 이용하여 hFSH 형질전환 체세포 복제소의 생산을 시도하였다.

연도	국가	연구자	기술 개발 내용
1997	영국	Wilmot 등	면양의 유선상피세포를 이용하여 최초로 체세포 복제
1997	영국	Schnieke 등	체세포 복제에 의해 Factor IX 형질전환 면양생산
1998	미국	Cibelli 등	소의 태아 섬유아세포로부터 복제소 생산
1998	미국	Wakayama 등	생쥐 난구세포를 복제하여 생쥐생산
1998	일본	Kato 등	소의 난관 상피세포 및 난구세포에서 복제소 생산
1999	뉴질랜드	Wells 등	난소 과립막세포 유래의 복제소 생산
1999	프랑스	Renard 등	피부의 섬유아세포로부터 복제소 생산
1999	한국	황 등	자궁세포로부터 젓소의 복제에 성공
1999	한국	황 등	체세포 복제한우 생산
1999	미국	Baguishi 등	인간 항 트롬빈을 생산하는 형질전환 복제 산양 생산
1999	미국	Yang 등	노화된 소의 피부세포로부터 복제소 생산
1999	일본	Shiga 등	근육세포로부터 복제 화우 생산
2000	영국	McCreath 등	유전자적중 복제양 생산
2000	영국	Polejaeva 등	체세포 핵이식에 의한 복제돼지생산
2001	미국	ACT사	체세포 핵이식에 의한 야생소 Gauer의 보존
2002	미국	PPL사	galT 유전자적중 복제돼지 생산
2002	미국	Hematech사	인간항체를 생산하는 형질전환 체세포복제소 생산
2002	한국	김 등	체세포 복제돼지 생산
2003	한국	박 등	GFP 형질전환 복제돼지 생산

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1 절 연구방법

본 연구과제의 전반적인 기술개발 과정은 아래 그림에서 보는 바와 같다.



1. 외래유전자 발현벡터의 제작 및 체세포 내 도입

Keene 등(1989)의 방법에 따라 human FSH (follicle-stimulating hormone) α 와 β subunit을 encoding하는 유전자를 뇌하수체에서 유래한 human cDNA library로부터 screening 한 후 이를 cloning한다. β -casein promoter의 조절 하에 hFSH를 발현하는 vector를 제작한다. Vector는 C-terminal peptide (CTP) linker를 이용하여 β -casein promoter-hFSH β subunit-linker-hFSH α subunit의 순서로 구성된 transgene construct를 작석함으로써 hFSH의 α 와 β subunit을 하나의 promoter의 조절 하에 발현하는 single-chain hFSH를 생산도록 디자인하였다. 별도로 promoter부분만 CMV로 치환된 동일한 vector를 작성하고, Chinese hamster ovary(CHO) cell에 도입한 후 single-chain hFSH의 발현양상을 immunoassay에 의하여 확인하였다. 세포주에서 hFSH의 발현을 확인한 후 β -casein promoter의 조절 하에 hFSH를 발현하는 vector를 젖소의 섬유아세포에 transfection과 항생제에 의한 1차 선별을 실시한다. hFSH 유전자가 도입된 섬유아세포는 다수의 colony들을 clonal culture에 의하여 증식시킨 후 체세포 핵이식에 사용될 clone들을 PCR에 의하여 재차선별한다. 선별된 세포들을 계대배양 및 동결보존하고 필요시에 용해 및 배양한 후 체세포 핵이식의 공여핵 세포로 사용한다.

hFSH transgene construct

goat β -casein promoter	hFSH β subunit	CTP linker	hFSH α subunit
-------------------------------	----------------------	------------	-----------------------

2. 체세포 핵이식

핵이식의 전반적인 과정은 Kato 등(1998)의 방법을 따른다. 도축우로부터 난소를 회수하여 3~8mm의 난포로부터 난자를 채란하여 1층 이상의 난구세포층이 있고 세포질이 균일한 것을 선발한다. 선발된 난포란을 0.4% BSA가 첨가된 HEPES-buffered TCM199에서 3회 세정한 후 10% FBS, 35ug/ml FSH, 1ug/ml estradiol-17 β 가 첨가된 TCM199 (Sigma Chemical Co., USA) 배양액 500ul에 30~50개의 난포란을 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 95% 공기 및 포화습도 상태의 배양기 내에서 20~22시간 체외성숙시킨다. 성숙된 난자는 0.5% hyaluronidase 효소가 첨가된 HEPES buffered TCM199에서 mouth pipetting하여 난구세포를 제거한다. 공여핵은 형질전환시킨 젖소의 섬유아세포를 핵이식 15분전 trypsin 처리하여 준비한다.

난자의 탈핵은 Nikon TE-300 독립현미경에 장착된 micromanipulator(Narishige, Japan)를 이용하여 실시한다. 성숙된 난자의 제1극체가 3시 방향을 향하도록 한 후 holding pipette으로 고정시키고 핵을 제거하기 위하여 injection pipette을 투명대 내로 진입시켜 제1극체와 그 주위에 위치하는 제2감수분열 중기의 염색체를 원형질막에 싸여진 채로 흡입하여 제거한다. 탈핵 후 0.5ug/ml Hoechst 33342 (Sigma)가 첨가된 TCM199에서 10분간 염색 후 형광현미경으로 탈핵 여부를 확인한다. 섬유아세포를 미세 pipette으로 흡입한 후 이를 미세조작으로 탈핵된 난자의 perivitelline space에 주입한다. 작성한 핵이식란의 융합은 3.2-mm 간격으로 마주한 2개의 전극막대로 이루어져 있는 fusion chamber(3.2 mm)에 융합배지를 채운 후, 전류방향과 직각이 되도록 수핵란과 공여핵의 위치를 조정하고, BTX Electro Cell Manipulation 2001(Genetronics, USA)을 사용하여 1.1 kV/cm 직류(DC) 전류를 30 usec로 1회 통전하여 실시한다. 통전 후 핵이식란은 제2극체 방출을 억제하기 위해 7.5 ug/ml cytochalasin B가 함유된 CR1aa 배지에서 2시간 동안 배양한다. 이후 5 uM ionomycin에서 5분간, 2 mM 6-dimethyl-aminopurine (6-DMAP)에서 4시간 배양하여 핵이식란의 활성화를 유도한다. 활성화된 핵이식란을 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 포화습도 배양기내 CR1aa drop 배지에서 7~8일간 배양한 후 이를 발정이 동기화된 수란우에 이식한다.

3. 체세포 복제 형질전환 젖소의 유전형 및 표현형 조사

체세포 핵이식으로 태어난 송아지로부터 피부 및 혈액샘플로부터 DNA를 추출하여 microsatellite (MS) analysis를 실시하고 이를 공여핵 세포의 MS pattern과 비교하여 복제소 여부를 검정한다. 복제송아지로부터 채취된 피부 및 혈액의 DNA에 대하여 hFSH β subunit 특이적인 primer를 이용하여 polymerization chain reaction을 실시하고 hFSH β subunit primer를 사용하여 Southern blot을 시행하여 외래 유전자의 존재 여부를 확인한다. 외래유전자

의 발현을 조사하기 위하여 체세포 복제소의 유선조직이 성숙된 후 조직샘플을 채취하고 Northern blot에 의해 hFSH의 발현을 관찰하고 또 생산된 유즙 내의 hFSH β subunit의 농도를 immunoassay에 의해 측정한다.

제 2 절 연구내용

연도별 주요개발 내용은 다음 표와 같다.

구 분	주요 개발내용 및 범위
1차년도	hFSH 유전자의 cloning 및 transgene construct의 개발
	소 섬유아세포의 계대배양, 외래유전자 도입 및 형질전환 세포의 분리기술 개발
2차년도	형질전환 체세포 핵이식배의 외래유전자 발현
3차년도	수정란 이식 및 hFSH 형질전환 복제송아지의 생산

제 3 절 연구결과

1. 인간 난포자극호르몬(human follicle-stimulating hormone; hFSH) 유전자의 cloning

hFSH α 와 β subunit을 encoding하는 유전자를 뇌하수체에서 유래한 human cDNA library로부터 screening 한 후 이를 cloning하였다. 또한 체세포에 각각의 subunit을 모두 도입해야 하는 문제점을 보완하는 동시에 single-chain으로 이루어진 hFSH를 생산하기 위하여 C-terminal peptide (CTP) linker를 이용하여 hFSH β subunit-linker-hFSH α subunit 유전자의 cloning을 완료하였다. Cloning을 완료한 cDNA의 크기는 α subunit이 396bp, β subunit이 454bp, CTP linker로 연결한 single-chain hFSH는 852bp였다. CTP linker를 포함한 single-chain hFSH의 염기서열은 Fig. 1에서 보는 바와 같다.

AAGCTTAGGATGAAGACACTCCAGTTTTTCTTCCTTTTCTGTTGCTGGAAAG
CAATCTGCTGCAATAGCTGTGAGCTGACCAACATCACCATTGCAATAGAGAA
AGAAGAATGTCGTTTCTGCATAAGCATCAACACCACTTGGTGTGCTGGCTAC
TGCTACACCAGGGATCTGGTGTATAAGGACCCAGCCAGGCCAAAATCCAGA
AAACATGTACCTTCAAGGAACTGGTATACGAAACAGTGAGAGTGCCCCGGCTG
TGCTACCATGCAGATTCTTGTATAACATACCCAGTGGCCACCCAGTGTCACT
GTGGCAAGTGTGACAGCGACAGCACTGATTGTACTGTGCGAGGCCTGGGGCCC
AGCTACTGCTCCTTTGGTGAAATGAAAGAAAGATCTTCCTCCTCTTCCTCAA
AGGCCCTCCCCGAGCCTTCCAAGTCCATCCCGACTCCCGGGGCCCTCGGACA
CCCCGATCCTCCCACAAAGCATCGATGCTCCTGATGTGCAGGATTGCCAGAA
TGCACGCTACAGGAAAACCCATTCTTCTCCCAGCCGGGTGCCCAATACTTCA
GTGCATGGGCTGCTGCTTCTCTAGAGCATATCCCCTCCACTAAGGTCCAAGA
AGACGATGTTGGTCCAAAAGAACGTCACCTCAGAGTCCACTTGCTGTGTAGC
TAAATCATATAACAGGGTCACAGTAATGGGGGGTTTCAAAGTGGAGAACCAC
ACGGCGTGCCACTGCAGTACTTGTTATTATCACAAATCTTAAATGTTTTACC
AAGTGCTGTCTTGATGACTGCTGATTTTCTGGAATGGAAAATTAAGTTGTT
TAGTGTTTATGGCTTTGTGAGATAAACTCTCCTTTTCTTACCATAACCACT
TTGACACGCTTCAAGGATATACTGCAGCTTACTGCCTTCCTCCTTATCCGG
ATCC

Fig 1. DNA sequence of hFSH β subunit-linker-hFSH α subunit

2. 외래유전자 construct의 작성

FSH를 비롯한 여러 gonadotropin과 thyrotropin은 α 와 β 의 두 개의 subunit가 비공유성 결합으로 결합되어 있으며(Pierce와 Parsons, 1981), 동일 종에서는 각 호르몬의 α subunit는 공통적인 것으로 나타나나, β subunit는 여러 형태를 가지고 있어서 이로 인해 각각의 다른 생물학적인 특징을 나타내게 된다. 이와 같이 subunit으로 구성된 호르몬을 단일사슬로 변형시키는 연구는 단백질의 안정성과 활성을 증가시키기 위해 몇몇의 실험실에서 시도되었다(Arora 등, 1994; Sano 등, 1992). 이러한 연구에서 linker sequence는 각 subunit의 가장 적절한 배열을 위해 사용되었으며, 이 linker의 사용은 호르몬의 유연성, 친수성, protease에 대한 저항성을 제공하게끔 design되어 결과적으로 단일 사슬의 생물학적 안정성에 기여하는 것으로 보고되어 있다(Sugahara 등, 1995; Matzuk 등, 1990). 본 과제에서는 hCG(human chorionic gonadotropin)의 β subunit의 113에서 145 잔기에 해당하는 CTP(carboxyl-terminal extension with four serine-linked oligosaccharides) sequence를 이용하여 FSH 유전자의 α 와 β fragment를 연결하여 FSH-CTP (FSH $_{\beta}$ -CTP-FSH $_{\alpha}$ 를 지칭)를 cloning함으로써 FSH의 분비와 signal transduction의 조절, hormone-specific post-translational modification의 효율을 증대시키고자 하였다(Muyan and Boime, 1998). 또한 재조합한 FSH $_{\beta}$ -CTP-FSH $_{\alpha}$ sequence를 유선조직에서 특이적으로 발현되는 vector system인 pBC1의 goat β -casein promoter의 downstream에 cloning하여 plasmid pBC1-FSH-CTP를 구축하였다. 유전자 전이의 확인을 위하여 pBC1-FSH-CTP에 marker gene으로 puromycin resistance gene을 도입하여 pBC-FSH-CTP- β -puro-A vector를 구축하였다. 이와 더불어, 재조합된 FSH 유전자의 전이와 발현을 retroviral vector system을 이용하여서 확인하고자 하였는데 이 system은 backbone이 되는 vector의 size가 크지 않고 retrovirus 고유의 특성인 감염에 의한 유전자 전이가 효율적으로 일어나므로 재조합 유전자의 발현을 손쉽게 확인할 수 있다. 이에, glycoprotein의 합성시 사람의 뇌하수체에서 분비되는 경우와 유사한 형태로 oligosaccharide의 부가가 이루어지는 것으로 알려진 CHO(Chinese hamster ovary) 세포를 표적세포로 하여 FSH-CTP 유전자를 가진 retrovirus를 감염시켜 *in vitro*에서 재조합 FSH의 발현을 확인하였다.

가. pBC-FSH-CTP-β-puro-A vector의 구축

Marker gene으로 사용하는 *puromycin resistance* gene의 promoter로는 pIRV의 rat β-actin promoter를 사용하였다. pIRV를 HindIII, Klenow fragment, BglII 순으로 처리하여 340 bp의 β-actin promoter를 분리하였으며 이 fragment를 Xho I, Klenow fragment, BamH I 순으로 효소처리한 pGEM-11Zf에 도입하였다(Fig. 2). *Puromycin resistance* gene과 poly A sequence는 pPUR vector에서 분리하여 pGEM-11Zf vector에 도입하였다(Fig. 2).

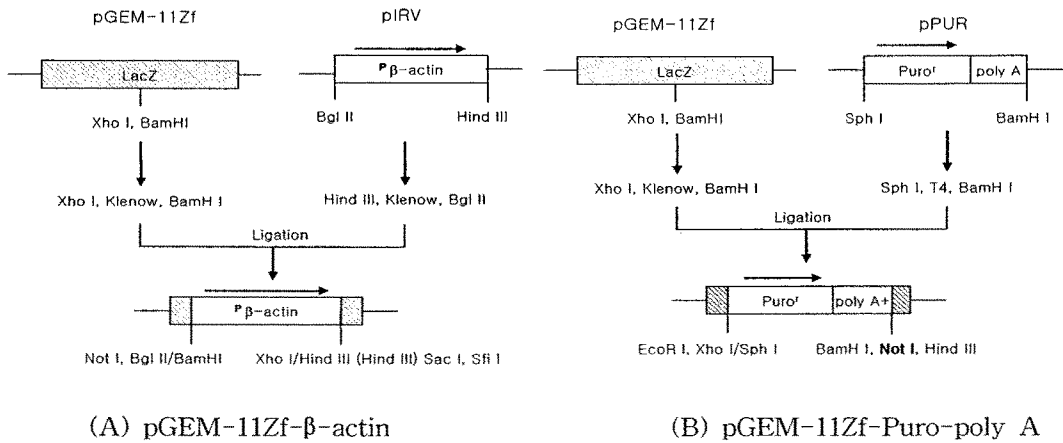


Fig. 2. Strategies of pGEM-11Zf-β-actin (A) and (B) pGEM-11Zf-Puro-poly A vector. ^Pβ-actin, rat β-actin promoter; Puro^r, puromycin resistance gene; poly A+, SV40 polyadenylation signal. Length of each sequence is not drawn to scale.

이상에서 재조합된 pGEM-11Zf-β-actin과 pGEM-11Zf-Puro-poly A vector를 각각 EcoR I /Klenow fragment, EcoR I /HindIII/Klenow fragment를 처리하여 β-actin promoter의 downstream 위치에 Puro-poly A를 도입하여 pGEM-11Zf-β-puro-polyA를 구축하였고(Fig. 3), 이 plasmid의 β-actin promoter-Puro-poly A fragment를 전년도에 cloning한 pBC1-FSH-CTP vector의 Not I site에 cloning하여 결과적으로 *puromycin resistance* gene을 marker gene으로 가진 pBC-FSH-CTP-β-puro-A를 재조합하였다(Fig. 4).

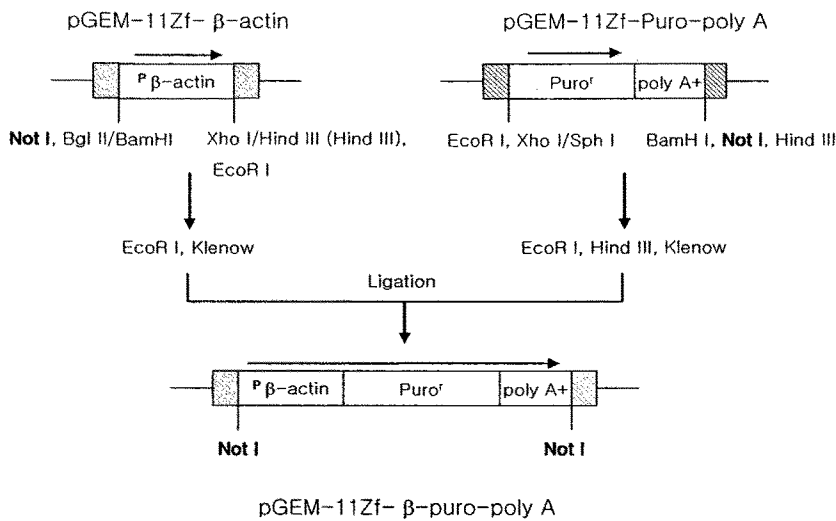


Fig. 3. Strategy of pGEM-11Zf-β-puro-poly A vector. P^{β} -actin, rat β-actin promoter; Puro^r, puromycin resistance gene; poly A+, SV40 polyadenylation signal. Length of each sequence is not drawn to scale.

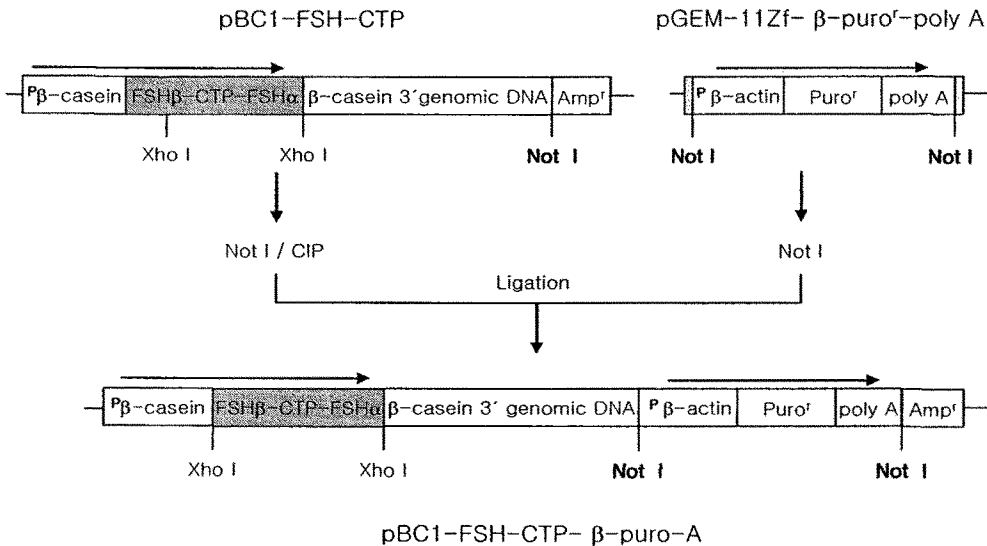


Fig. 4. Strategy of pBC-FSH-CTP-β-puro-A vector. P^{β} -actin, rat β-actin promoter; Puro^r, puromycin resistance gene; poly A+, SV40 polyadenylation signal; CTP, carboxyl-terminal extension with four serine-linked oligosaccharides gene; FSH-α, follicle-stimulating hormone-alpha gene; FSH-β, follicle-stimulating hormone-beta gene; P^{β} -casein, goat β-casein promoter. Length of each sequence is not drawn to scale.

나. Retrovirus vector의 구축

구축한 pGEM-Teasy-FSH-CTP에서 약 1 Kb의 FSH-CTP fragment를 분리하여 retroviral vector인 pLNβZ의 LacZ gene의 위치에 cloning하였다(Fig. 5). 새로 재조합된 pLNβ-FSH-CTP는 Qiagen maxiprep kit을 이용하여 대량 분리한 후 다음 실험에 사용하였다.

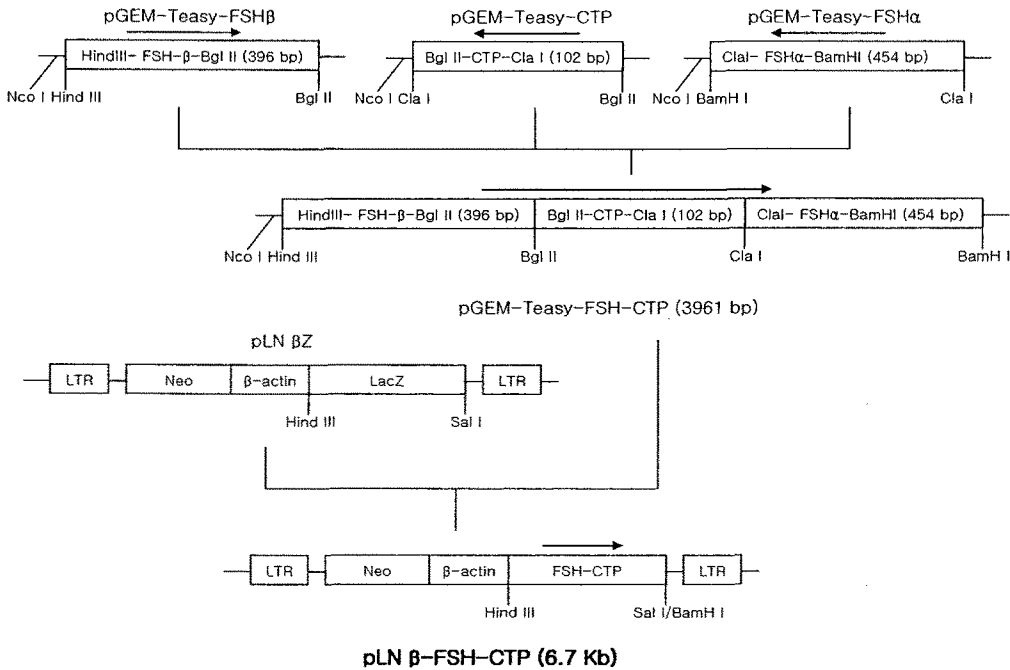


Fig. 5. Strategy of retrovirus vectors. LTR, long terminal repeat; Neo, G418 resistant gene; β -actin, rat β -actin promoter; CTP, carboxyl-terminal extension with four serine-linked oligosaccharides gene; FSH- α , follicle-stimulating hormone-alpha gene; FSH- β , follicle-stimulating hormone-beta gene. Length of each sequence is not drawn to scale.

재조합된 retroviral vector는 PT67에 calcium phosphate 방법으로 transfection하여 G418(500 μ g/ml)이 첨가된 선별용액으로 2주간 선별하였으며 형성된 Neo^R(G418 resistant) PT67 cell의 pool을 DMEM/FBS(10%)에서 48시간 배양한 후 virus stock을 수확하였다. 이 virus를 packaging cell line인 293mGPHy(Kim 등, 2001)에 감염시켜 G418(600 μ g/ml)이 첨가된 선별용액으로 2주간 선별하였다. 선별된 Neo^R(G418 resistant) 293mGPHy-LN β Z 세포에 calcium phosphate 방법으로 20 μ g의 pHCMV-G를 transient transfection하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건에서 8시간 배양 후 새 배양액으로 갈아주었다. 48시간이 경과한 후 retrovirus가 포함된 배양액을 수확하였다.

3. 외래유전자 발현율의 제고

외래 유전자의 발현 증대를 위한 효율적인 유전자 전이 체계를 구성하는 요소는 여러 가지가 있는데 본 연구에서는 외래 유전자에 대한 promoter와 전사 후 조절 요소 중의 하나인 WPRE(woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element)를 대상으로 하였다. 구체적으로, 본 연구에 사용되는 유전자 전이 체계인 retrovirus vector system에 있어서 비교적 사용 빈도가 높은 RSV(*Rous sarcoma virus*), UbC(Ubiquitin), β -actin, CMV(cytomegalovirus) promoter를 대상으로 하여 GFP 유전자의 발현 정도를 여러 종류의 표적세포에서 비교하였으며 WPRE를 각 promoter별로 구축한 vector 상에 도입하여 그 존재 여부에 따른 외부 유전자의 발현 증가 정도를 검정하였다.

가. WPRE의 cloning

외래유전자의 발현을 증강시키는 것으로 알려진 WPRE는 WHV clone의 cDNA를 주형으로 + strand primer 5'TCTGTTCCCTGTTAATCAACCTCTGG3'와 - strand primer 5'GAGCCCGAGGCGAAACAG3'를 이용하여 PCR을 수행함으로써 cloning하였으며, 619 bp 크기의 단편으로 sequencing 결과는 Fig. 6에서 보는 바와 같다.

이 단편은 PCR 산물을 cloning하는 전용 vector인 pGEM-T easy(Promega, USA)에 도입하여 pGEM-T easy-WPRE를 재조합하였다. WPRE는 α , β , γ 의 세 개의 subunit으로 구성되어 있으며, 이는 기능적으로 유사한 인자로서 두 개의 subunit으로 이루어진 HBVPRE (Hepatitis B virus Posttranscriptional Regulatory Element)보다 효율적으로 유전자의 발현율을 증가시키는 것으로 알려져 있다. WPRE에 의한 외부 유전자의 발현 촉진은 adenovirus, adeno-associated virus, lentivirus, retrovirus에서 이미 그 효과가 증명되었다. WPRE는 세포의 종류나 promoter, 그리고 vector의 종류에 대해서 비의존적인 활성을 나타내며 WPRE가 존재하지 않는 대조구에 비해서 유전자의 발현을 3-5배 증가시키는 것으로 알려져 있다.


```

1 GGGCGAATTG GGCCCGACGT CGCATGCTCC CGGCCGCCAT GCGGGCCGCG GGAATTCGAT
61 TCTGTTCCT GTTAATCAAC CTCGGGATTA CAAAATTGT GAAAGATTGA CTGGTATTCT
121 TAACTATGTT GTCCTTTTA CGCTATGTGG ATACGCTGCT TTAATGCCTT TGTATCATGC
181 TATTGCTTCC CGTATGGCTT TCATTTTCTC CTCCTTGAT AAATCCTGGT TGTGTCTCT
241 TTATGAGGAG TTGTGGCCCG TTGTCAGGCA ACGTGGCGTG GTGTGCACTG TGTTGCTGA
301 CGCAACCCCG ACTGTTGGG GCATTGCCAC CACCTGTCAG CTCCTTTCCG GGACTTTCGC
361 TTTCCCCCTC CCTATTGCCA CGGCGGAAC CATCGCCGCC TGCCTTGCCC GCTGCTGGAC
421 AGGGGCTCGG CTGTTGGGCA CTGACAATTC CGTGGTGTG TCGGGGAAGC TGACGTCCTT
481 TCCATGGCTG CTCGCCTGTG TTGCCACCTG GATTCTGCGC GGGACGTCCT TCTGCTACGT
541 CCCTTCGGCC CTCAATCCAG CGGACCTTCC TTCCCGCGGC CTGCTGCCGG CTCTGCGGCC
601 TCTTCCGCGT CTTCGCCTC GCCCTCAGAC GAGTCGGATC TCCCTTTGGG CCGCCTCCCC
661 GCCTGTTTCG CCTCGGGCTC AATCACTAGT GAATTCGCGG CCGCCTGCAG GTCGACCATA

```

Fig. 6. Nucleotide sequence of the WPRE. The sequences of cDNA primers used in RT-PCR are shaded.

나. Retrovirus vector의 구축

각각의 promoter와 WPRE를 이용한 여러 종류의 retrovirus vector의 구축은 다음의 순서로 진행되었다.

1) pLNRG와 pLNRGW

RSV promoter는 pLXRN(Clontech, USA)을 HindIII와 Klenow로 순서대로 처리하여 평활 말단으로 만든 후 이를 다시 Xho I으로 절단함으로써 준비하고, 이를 BamHI, Klenow, Xho I의 순으로 처리한 pEGFP-N1(Clontech, USA)과 결합시켜 pRSVpro-EGFP-N1을 구축하였다. 구축한 pRSVpro-EGFP-N1을 Xho I, Not I, Klenow순으로 처리하여 RSV promoter와 *GFP* 유전자를 분리한 후 이를 BamHI, HindIII, Klenow 순으로 처리하여 CMV promoter를 제거한 pLNCX에 도입하여 pLNRG를 구축하였다. pGEM Teasy-WPRE를 EcoRI와 Klenow를 순서대로 처리하여 양 말단이 평활말단인 WPRE 서열을 분리하였으며 이를 HpaI과 CIP(calf intestinal alkaline phosphate)를 처리한 pLNRG와 연결시켜 pLNRGW를 구축하였다.

2) pLNUG와 pLNRGW

UbC promoter는 FUGW(Lois 등, 2002)를 PacI과 T4 DNA polymerase를 순서대로 처리하고 이를 다시 AgeI으로 절단함으로써 준비하였다. 이를 XhoI, Klenow, AgeI 순으로 처리하여 RSV promoter를 제거한 pLNRG에 도입하여 pLNUG를 구축하였다. 또한 pLNUGW는 RSV promoter를 제거한 pLNRGW에 UbC promoter를 도입하여 구축하였다.

3) pLNCG와 pLNCGW

pEGFP-N1(Clontech, USA)에 AgeI, NotI, Klenow를 처리하여 *GFP* 유전자를 분리한 후 이를 pLNCX에 HindIII, Klenow를 처리하여 결합시켜서 pLNCG를 구축하였으며, pGEM T easy-WPRE를 EcoRI와 Klenow로 처리하여 양 말단이 평활말단인 WPRE 서열을 분리하였으며 이를 HpaI과 CIP를 처리한 pLNCG와 연결시켜 pLNCGW를 구축하였다.

이상에서 구축한 vector의 구조는 Fig. 7과 같다.

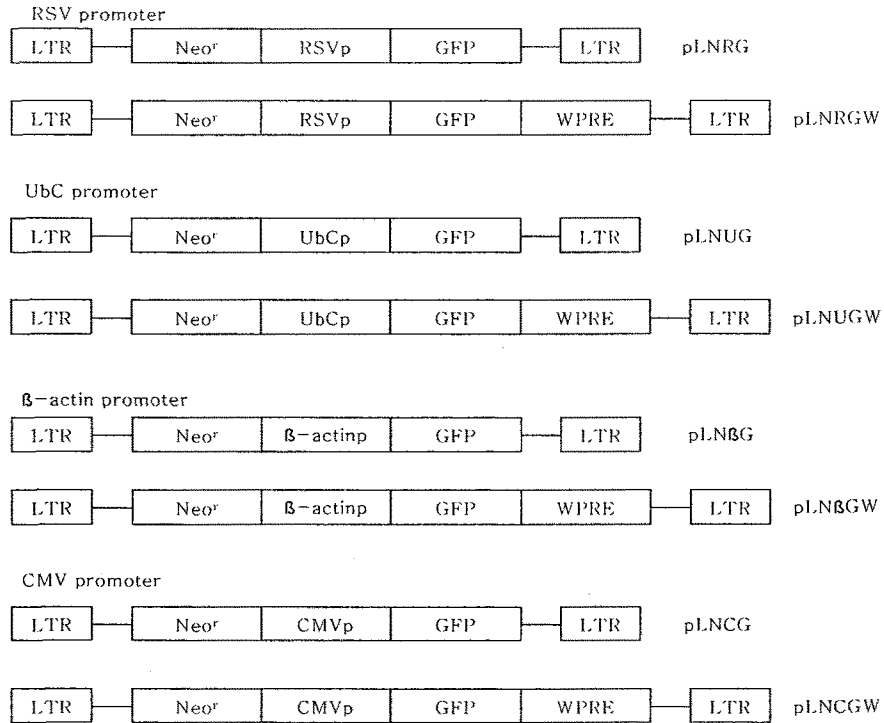


Fig. 7. Construction of retrovirus vector. LTR, long terminal repeat; Neo^r, Neomycin resistant gene; RSV, *Rous sarcoma virus* promoter; UbC, Ubiquitin promoter; β-actin, chicken β-actin promoter; CMV, cytomegalovirus promoter; GFP, green fluorescence protein gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element

다. Retrovirus vector의 생산

PT67 세포에 20 μg의 각각의 vector plasmid를 calcium phosphate 방법으로 transfection하여 다음날 새 배양액으로 갈아주고 48시간 후 virus stock을 수확하였다. 이 virus를 *gag*와 *pol* 유전자를 가지고 있는 GP293(Clontech, USA)에 각각 감염 시켜서 G418 (600 μg/ml)이 첨가된 배양액으로 2주간 선별하였다. 선별된 Neo^R(G418 resistant) GP293-LNRG, GP293-LNRGW, GP293-LNUG, GP293-LNUGW, GP293-LNβG, GP293-LNβGW, GP293-LNCG, 그리고 GP293-LNCGW 세포에 *VSV-G* 유전자를 도입하기 위하여 20 μg의 pHCMV-G를 calcium phosphate 방법으로 transfection하였다. 37°C, 5%의 CO₂ 조건에서 8시간 배양 후 PBS로 수세한 후에 새 배양액으로 갈아주었다. 48시간이 경과한 후 retrovirus가 포함된 배양액을 각각 0.45 μm pore-size의 cellulose acetate filter를 이용해 수확하였다. 수확한 virus stock (LNRG, LNRGW, LNUG, LNUGW, LNβG, LNβGW, LNCG, LNCGW)은 표적세포

(HeLa, CEF, PFF)에 감염시켰으며 각 세포에서 Neo^R titer를 측정한 결과, 세포주에 따라 약간의 차이를 보이나 $4 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5$ Neo^R CFU/ml (clony forming unit/ml)의 감염가를 나타내었다.

라. GFP 유전자의 발현확인

구축한 각각의 세포는 GFP 전용 filter(460-490 nm excitation, 510-550 nm emission)가 장착된 epifluorescence stereomicroscope(Olympus szx12)을 통하여 GFP의 발현을 확인하였다. 이 세포를 48시간 배양한 후 sonication buffer(50mM Na₂HPO₄, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 200mM NaCl)를 이용하여 초음파 분쇄로 전단백질을 분리하였으며 Bradford 방법으로 정량하였다. 이 단백질을 이용하여 fluorometry와 western blotting을 실시하여 GFP 유전자의 발현 정도를 확인하였다.

Fluorometry를 실시한 결과 감염되지 않은 HeLa, CEF, PFF 정상세포에서는 330~390 rlu/100 μ g(단백질 100 μ g당 relative light unit)값을 나타내는데 비해서 GFP 유전자가 전이된 표적세포들에서는 세포주에 따라서 10배에서 100배 이상의 증가된 값을 나타내었다(Fig. 3).

Promoter 순으로 GFP 유전자의 발현 정도를 살펴보면, 모든 세포주에서 RSV와 CMV promoter가 UbC와 β -actin promoter보다 더 높은 것으로 나타났다. 그 중에서도 HeLa와 CEF 세포에서는 RSV promoter가 가장 높은 효율을 보였고, PFF에서는 RSV보다 CMV promoter가 더 높게 나타났다(Fig. 8). 본 연구에서 사용하는 네 가지 promoter 중에서 RSV와 CMV promoter는 실제 많은 연구에서 사용되고 있다.

다음 실험에서는 네 가지 promoter 중 비교적 높은 효율을 나타내는 RSV와 CMV promoter를 도입한 vector를 대상으로 WPRE의 효과를 확인하였다. WPRE가 도입된 vector system에 의해 GFP 유전자가 도입된 세포들에서는 대부분 WPRE가 존재하지 않는 경우보다 높은 GFP의 발현을 나타내었으며 CEF를 제외한 두 가지 세포주에서는 promoter에 관계없이 WPRE의 효과를 볼 수 있었다(Fig. 9). 예외적으로 CEF에서 RSV promoter의 경우 WPRE를 도입한 것보다 도입하지 않은 것이 좀더 강한 발현을 보였는데 이는 그 차이가 매우 미미할 뿐만 아니라 두 경우 모두 그 발현 정도가 매우 높아서 절대적인 비교가 어려웠으므로 실험상의 오차로 생각해도 무방할 것으로 보인다. WPRE에 의한 GFP 유전자의 발현 증대는 Fluorometry 뿐만 아니라 western blotting과 현미경 상에서도 확인할 수 있었으며 모든 결과가 일치하였다(Fig. 10, 11).

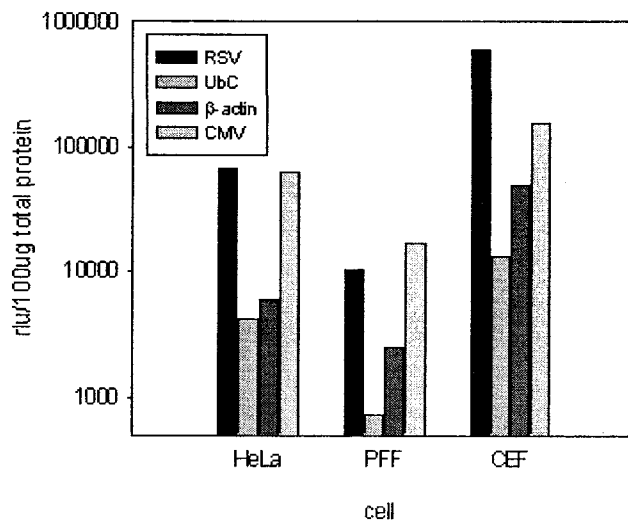


Fig. 8. Fluorescence analyses of GFP expression in various target cells
rlu: relative light unit

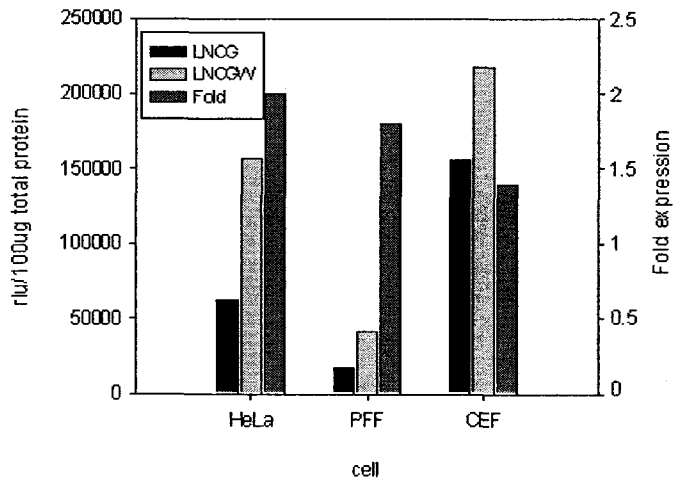
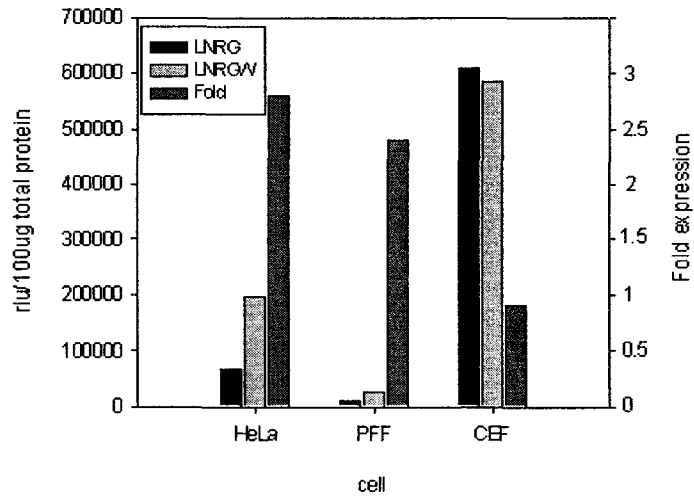


Fig. 9. Effect of WPRE on the GFP expression in various target cells

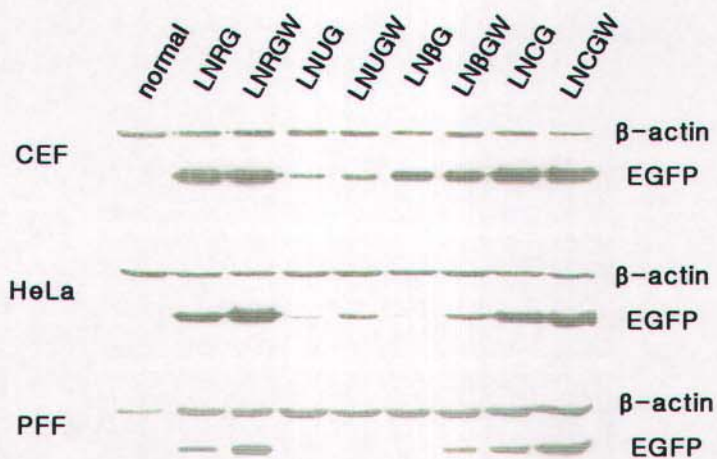


Fig. 10. Western blotting analyses of the GFP expression in various target cells

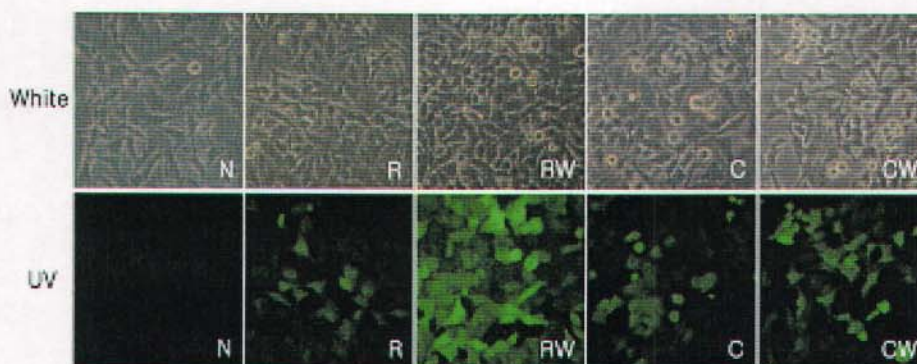


Fig. 11. Expression of the GFP in HeLa cells. N, uninfected; R, infected with LNRG; RW, infected with LNRGW; C, infected with LNCG; CW, infected with LNCGW

본 실험에서는 외래 유전자의 효율적인 발현을 위하여 *GFP* 표지유전자를 이용하여 여러 종류의 promoter를 검정하였다. 또한, retrovirus vector에 WPRE 서열을 도입함으로써 *GFP* 유전자의 발현 증가 여부를 확인하였다. 모든 표적 세포에 있어서 UbC와 β -actin promoter에 비해 RSV와 CMV promoter통제 하의 *GFP*의 발현이 더 강하게 나타났으며, 특히 CEF 세포에서는 RSV promoter가 가장 우수한 것으로 확인되었다. WPRE의 도입으로 인한 발현율의 증가는 대부분의 세포주에서 promoter의 종류에 관계없이 확인되었다. 이상의 결과로 각 세포주는 promoter에 따라 발현 양상이 약간의 차이를 보이고 있으나 RSV와 CMV promoter에서 유전자의 발현이 보다 효율적이며, WPRE 서열이 도입된 경우에 HeLa와 PFF 세포에서 발현이 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 연구에서 보는 바와 같이 외래 유전자의 발현에 대해 적절한 promoter와 WPRE의 도입을 통한 효율적인 retrovirus vector system의 구축은 형질전환동물 생산에 있어서 가장 필수적인 유전자 전이 체계를 제공하는 수단이 될 것이다.

4. 세포주에서 hFSH 외래유전자의 발현

CHO 세포는 치료의 목적으로 재조합된 단백질의 생산에 널리 사용되고, 사람의 CG, FSH, LH와 같은 gonadotropic hormone의 다당류의 구조의 기능을 비롯한 생리학적인 연구에 주로 사용된다(Keene 등, 1989; Hard 등, 1990). 본 연구에서도 FSH-CTP의 *in vitro*에서의 발현 여부를 확인하기 위하여 CHO 세포에 virus를 감염시킨 후 G418 (800 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 첨가한 선별배양액으로 2주간 배양하였다. 감염과 선별과정이 끝난 CHO-LN β -FSH-CTP 세포를 Ham's F-12/FBS 배양액에서 24시간 동안 키운 후 배양액을 수확하여 FSH를 정량하였다. FSH의 정량은 Elecsys FSH reagent kit로 electrochemiluminescence immunoassay(ECLIA) 분석기(Elecsys 2010, Roche)를 사용하여 수행하였다. 대조구로는 virus에 infection되지 않은 CHO 세포의 배양액을 사용하였으며 도출된 결과를 이용하여 FSH-CTP 유전자의 발현 정도를 비교하였다. 그 결과, FSH-CTP가 전이되지 않은 CHO 세포와 FSH α 와 β 가 co-infection된 세포에서는 각각 0.18 mIU/ml, 0.19 mIU/ml로 나타났는데 비하여 CHO-LN β -FSH-CTP의 배양액에서는 3.16 mIU/ml로 나타났다(Fig. 12). 즉, 단일사슬로 재조합된 FSH의 발현이 대조군에 비하여 약 17배의 발현율을 보였으며 이는 두개의 subunit를 linker를 이용하여 연결한 형태의 호르몬 단백질의 분비가 증가함을 나타내는 것이다.

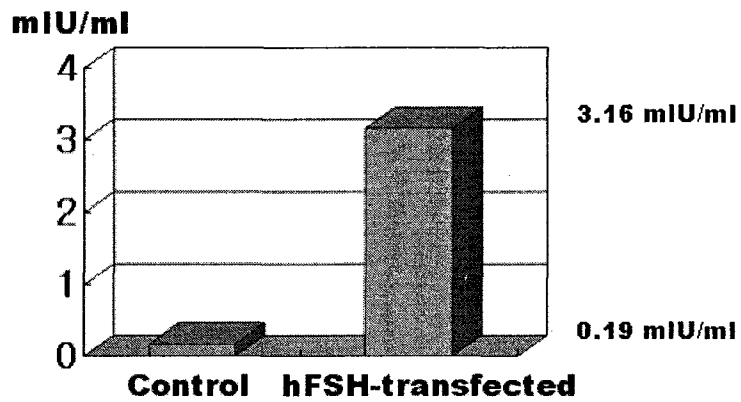


Fig. 12. Measurement of human FSH in culture media of non-transgenic and transgenic CHO cells using ECLIA. Control: non-transgenic hFSH-transfected: CHO cell was infected with FSH-CTP virus. All cell culture media were harvested after 48-hour incubation.

다른 연구에서도 hCG의 β subunit의 CTP를 FSH에 응용한 경우, FSH의 half life를 연장시키는 것으로 알려져 있고(Arora 등, 1994), 또한 체내에 잔존하는 시간이 증가한 것으로 나타났는데 실제, 1992년 Fares 등이 쥐를 대상으로 FSH β 에 CTP를 부가한 form과 wild type FSH를 투여하여 비교해 보았을 때 전자가 *in vivo*에서 오랫동안 생물학적 활성을 나타내며 일정시간 경과 후 혈청에 잔존한 level이 높게 측정된 것으로 보아서 임상적 치료에 있어서도 그 효과가 클 것으로 보인다. 뿐만 아니라 이러한 재조합 FSH는 wild type의 FSH와 *in vivo*와 *in vitro*에 있어서 구조적, 기능적인 유사성을 나타내는 것으로 보고되었으며(Mannaerts 등, 1991) 이러한 일련의 연구 결과에 근거하여 생산된 FSH의 효율적인 순수 정제 방법이 확립된다면 임상예의 응용도 가능하리라 추정된다.

5. 체세포핵이식의 효율성 제고

가. 핵이식 배의 remodeling, reprogramming과정 조사

핵이식에 사용되는 난자의 난활성(activation)을 핵이식 이전과 이후로 구분하여 유도하고 각각의 핵이식 수정란의 premature chromosome condensation(PCC) 및 nuclear swelling, 전핵의 형성 등을 관찰함으로써 핵이식에 사용된 체세포핵의 reprogramming과 remodeling 과정을 조사하였다. 체세포의 세포주기는 flow cytometry에 의하여 G0 또는 G1 stage에 있음을 확인하였고, 확인된 세포를 이용하여 핵이식을 수행하였을 때 핵이식 이후에 난활성을 유도한 수정란이 reprogramming 및 remodeling과정이 원활하고 이후 배반포까지의 배발생률도 훨씬 높은 것이 확인되었다(Table 1, 2, 3).

나. 공여핵이 핵이식의 효율성에 미치는 영향

핵이식의 효율성을 제고하기 위하여 사용되는 체세포의 핵형을 정기적으로 확인하였으며 세포주기, 계대배양 횟수에 따른 배발생률을 조사하였다. 체세포의 핵형은 사용된 체세포를 제공한 개체에 따라 정상핵형의 유지에 있어서 변이를 나타내었으며 이는 핵이식에 있어서 정기적인 핵형검사가 필수적임을 제시하는 것이다(Fig. 13). 사용된 체세포의 세포주기가 G0 또는 G1일 경우 다수의 배반포까지 발생하였으나 발생률에 있어서는 G1인 경우가 더욱 높았다. 그러므로 이식하는 체세포에 있어서 특별히 동기화를 위한 처리가 필요치 않음을 알 수 있었다. 체세포의 계대배양 횟수에 따른 핵이식 배의 발생률은 계대배양이 10-12차례까지는 큰 변화가 없었으나(Table 4), 그 이후에는 배발생률이 유의적으로 감소하였다. 이상에서 밝혀진 최적 조건에서 핵이식을 실시하였을 때 체세포핵이식의 배반포 발생률은 30% 내외로서 일반적인 체외수정의 발생률과 유사하거나, 오히려 다소 높은 경향을 보였다(Table 5).

Table 1. Chromatin configuration in bovine oocytes 0.5 to 1 h following nuclear transfer

Treatment of oocytes	No. of oocytes fused	No. (%) of oocytes with	
		PCC	Decondensed chromatin
Pre-activated	25	6 (24)	20 (84)
Not activated	35	29 (82)	6 (17)

Table 2. Chromatin configuration of bovine oocytes 3 to 6 h following nuclear transfer

Treatment of oocytes	No. of oocytes fused	No. (%) of oocytes containing		
		1 nucleus	2 nuclei	>2 nuclei
Pre-activated	19	15 (79)	4 (21)	0 (0)
Not activated	58	10 (28)	39 (67)	3 (5)

Table 3. *In vitro* development of bovine oocytes following nuclear transfer

Treatment of oocytes	No. of oocytes fused	No. (%) of oocytes developed to	
		2-cell stage	Morulae/blastocysts
Pre-activated	57	18 (32)	2 (4)
Not activated	612	321 (53)	123 (28)

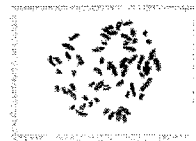
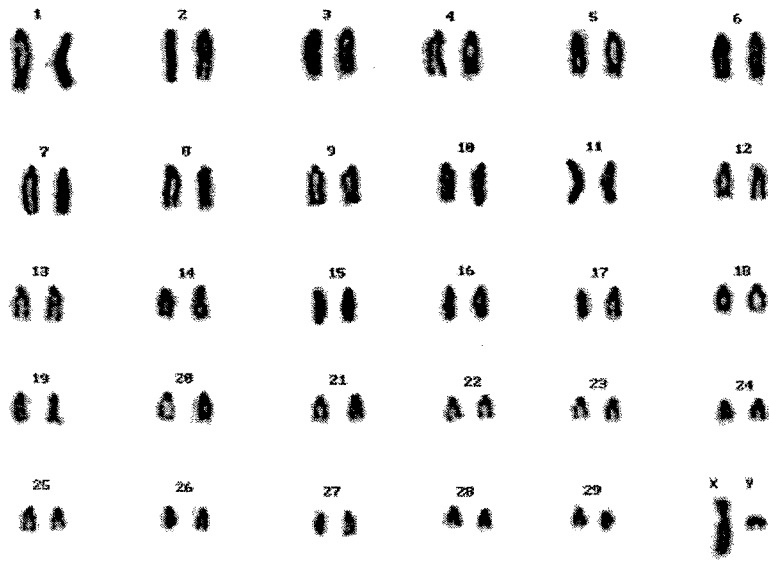


Fig 13. Normal karyotype of bovine fetal fibroblasts

Table 4. Effect of donor cell passages on developmental ability of nuclear transfer embryos

No. of passages	No. of NT embryos	No. (%) of cleaved embryos	No. (%) of morula/blastocyst
6-7	75	54 (72)	20 (27)
10-11	40	30 (75)	10 (25)
Total	115	84 (73)	30 (26)

Table 5. In vitro development of reconstructed embryos by nuclear transfer of fibroblast cells

No. of oocytes	No. (%) of fused oocytes	No. (%) of cleaved oocytes	No. (%) of morula/blastocyst
524	422 (80.5)	277 (65.5)	85 (30.7)

6. 체세포 복제송아지의 생산

형질전환 체세포 복제수정란의 이식기술을 개발하기 위하여, 우선 한우의 복제수정란을 수란우에 이식하였다. 총 26두의 수란우에 41차례에 걸쳐 회당 2-3개의 수정란이식을 시도한 결과 1두의 복제송아지를 생산하였고(Table 6 및 Fig. 14), 생산된 복제송아지는 microsatellite analysis에 의하여 복제소임을 확인하였다(Fig. 15). 성장기의 복제소는 정상적인 한우의 건강상태를 유지하였으며, 기형 또는 별다른 형태의 이상 징후는 발견되지 않았으나 3년차에 급격한 체중감소가 발생하여 도축 후 부검을 실시한 결과(Fig. 16) 지방과사증으로 판명되었으며 현재 혈액, 뇨 및 조직을 분석 중에 있다.

Table 6. Progressive loss of pregnancies after transfer of NT embryos

No. recip's	No. ET	No. NT embryos transferred	No. (%) recip's preg.	No. (%) preg. maintained		
				<2 mo.	>4 mo.	Term
26	41	113	14 (34.1)	11 (78.6)	2 (14.3)	1 (7.1)



Fig. 14. Clone calf from nuclear transfer of fibroblast cell

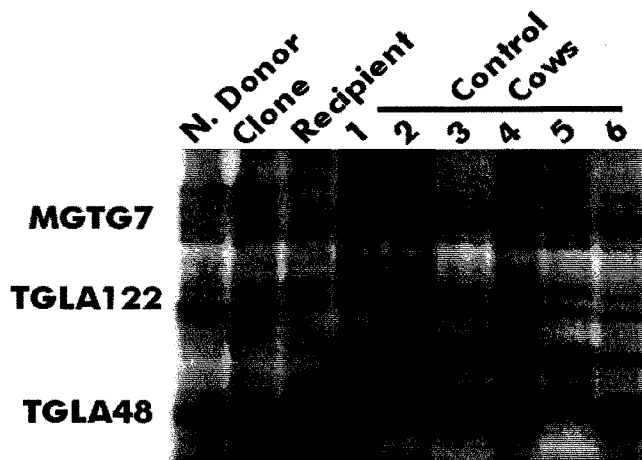


Fig. 15. Microsatellite (MS) analysis of clone calf. Note that the patterns of MS in clone calf and nuclear donor are identical.

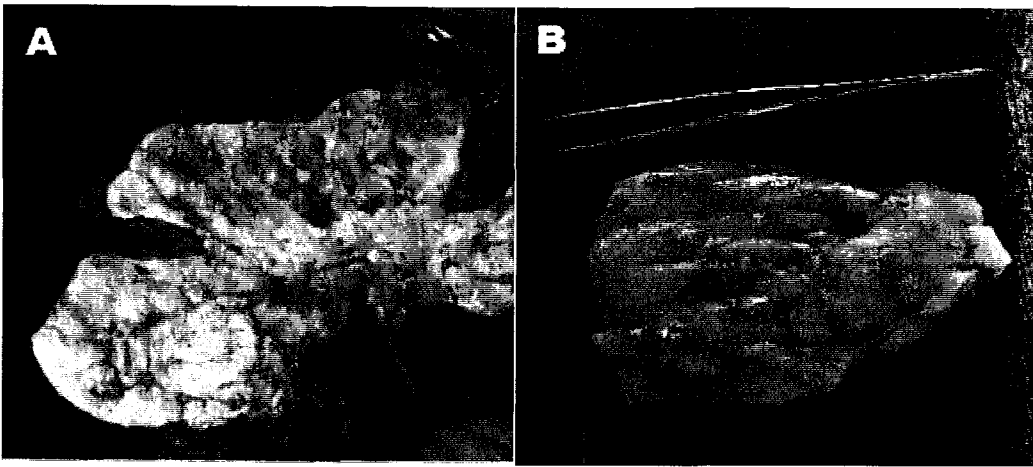


Fig. 16. Autopsy of the bull cloned by nuclear transfer of fibroblast cell.
(A) Tumor intermingled with kidney. **(B)** Tumor removed from duodenum.

7. 체세포내 외래유전자의 도입

체세포 형질전환의 효율성을 조사하기 위하여 green fluorescent protein(GFP)이 도입된 췌소의 섬유아세포(Fig. 17)를 사용하여 체세포핵이식을 실시한 후, 형질전환 복제수정란의 발달률과 형질전환 효율을 조사하였다. Table 7에서 보는 바와 같이 GFP 형질전환 복제수정란의 배반포까지의 발달률은 29.8%(31/104)로 hFSH의 형질전환 복제 수정란에 비하여 다소 높은 경향을 나타내었으나, 통계적인 차이는 발견되지 않았다. 생산된 배반포(Fig. 18) 중 1개를 제외한 모든 수정란에서 형광을 발현함으로써 96.8%의 형질전환 효율을 나타내었다.

Table 7. Development and detection of transgene in nuclear transfer embryos using GFP-transfected fibroblasts

No. of reconstructed oocytes	No. (%) of developed blastocysts	No. (%) of GFP-detected blastocysts
104	31 (29.8)	30 (96.8)



Fig 17. GFP-transfected bovine fibroblasts.

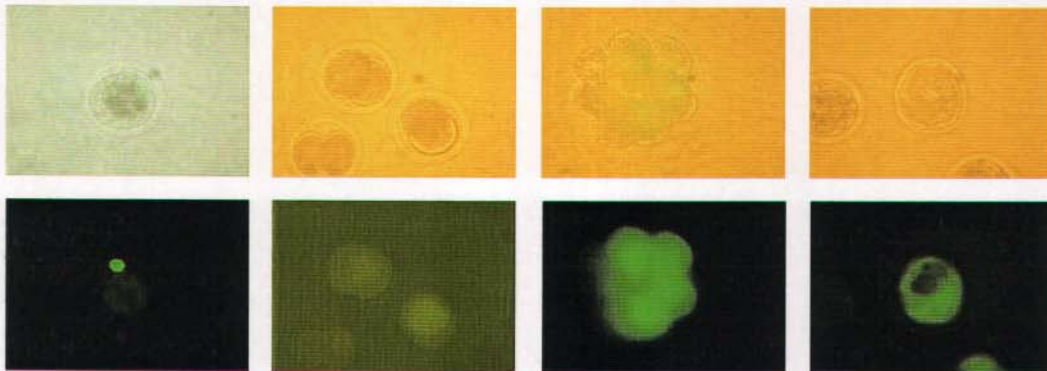


Fig 18. Development and expression of transgene in nuclear transfer embryos using GFP-transfected bovine fibroblasts. Reconstructed oocyte before fusion, 2-cell stage embryos, morulae and blastocysts (from left to right). Top panels: light phase, Bottom panels: dark phase.

8. Single-chain hFSH 형질전환 체세포의 생산

Goat β casein promoter에 의하여 조절되는 hFSH의 α 와 β subunit 유전자가 C-terminal peptide (CTP) linker로 연결되고 neomycin resistant gene cassette를 포함한 vector를 linearization하여 transfection에 사용하였다(Fig. 19).

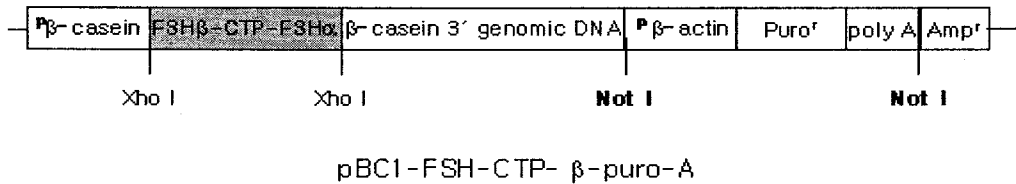


Fig. 19. Single-chain hFSH construct

완성된 hFSH gene construct를 lipofection에 의하여 젯소의 섬유아세포 내로 도입하고 puromycin 및 cloning cylinder를 사용하여 선별하였다. 선별된 세포에서 genomic DNA를 추출하고 pBC1 vector의 multicloning site 양쪽 말단에 특이적인 primer를 이용한 PCR을 수행하여 hFSH gene의 도입 여부를 확인하였다. 사용된 primer sequence는 아래와 같으며 Fig. 20에서 보는 바와 같이 선별이 끝난 3 개 소 섬유아세포의 clone들에서 hFSH 유전자의 존재를 확인하였다. hFSH 유전자의 도입이 확인된 3개의 세포주는 정상적인 핵형을 유지한 상태로 계대배양을 실시하고, 액체질소에 동결보존하여 필요시마다 용해하여 재배양을 실시한 후 체세포핵이식의 공여핵 세포로 사용하였다.

Forward: 5'-GATTGACAAGTAATACGCTGTTTCCTC-3'

Reverse: 5'-CATCAGAAGTTAAACAGCACAGTTAG-3'

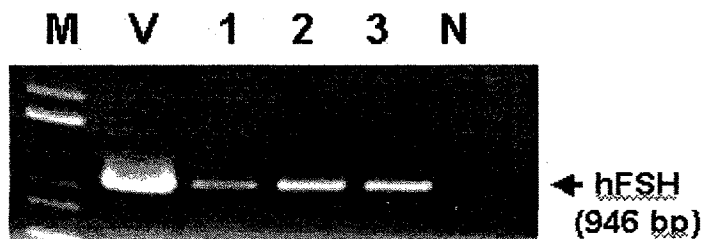


Fig. 20. PCR screening of hFSH-transfected cells. M: size marker, V: pBC-FSH-CTP- β -puro-A vector for positive control, 1-3: hFSH-transfected cells, N: non-transfected cells for negative control.

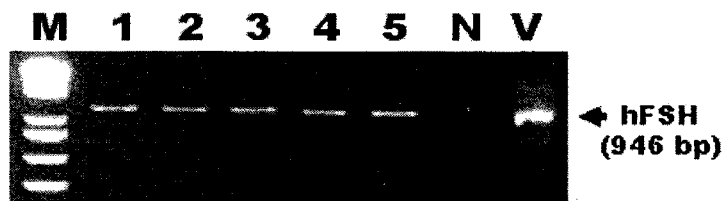


Fig. 21. PCR screening of transgene in blastocysts from nuclear transfer using hFSH-transfected fibroblasts. M: size marker, 1-5: nuclear transfer embryos using hFSH-transfected fibroblast, N: in vitro-derived normal embryo for negative control, V: pBC-FSH-CTP- β -puro-A vector for positive control.

9. Single-chain hFSH 형질전환 체세포 복제수정란의 생산

체외성숙시킨 난자의 핵을 제거한 후, hFSH 유전자가 도입된 체세포를 이용하여 핵이식을 실시하였다. Table 8에서 보는 바와 같이 hFSH 유전자가 도입된 체세포의 핵이식 후 배반포의 발달률은 28.7%(62/216)로 일반적인 체세포핵이식에 있어서의 배반포기까지의 발생률과 큰 차이가 없었다. 발달한 각 배반포기 수정란으로부터 genomic DNA를 채취한 후, PCR에 의하여 hFSH 유전자의 도입여부를 검정한 결과 약 70.8%(34/48)의 복제수정란에 성공적으로 형질전환이 이루어진 것이 확인되었다 (Fig 21, Table 8). 각각의 복제수정란에 대하여 hFSH 형질전환 여부를 검정하였을 때, 일부 수정란에서 hFSH 유전자의 존재를 확인할 수 없었던 것은 hFSH 유전자가 도입된 세포의 선별이 불충분하였거나, 각 수정란에서 얻은 DNA를 이용한 PCR의 수행에서 오류가 있었던 것으로 생각되며, 이러한 문제점을 보완하기 위하여 hFSH 형질전환 섬유아세포의 재선별 및 PCR 조건에 대한 수정이 진행 중이다.

Table 8. Development and detection of transgene in nuclear transfer embryos using hFSH-transfected fibroblasts

No. of reconstructed oocytes	No. (%) of developed blastocysts	No. (%) of hFSH-detected blastocysts
216	62 (28.7)	34/48* (70.8)

* 14 embryos were lost during preparation for PCR analysis

10. hFSH 형질전환 복제수정란의 이식

2차년도 말 - 3차년도에 걸쳐 hFSH 형질전환 복제수정란을 대리모에 이식하였다, 충남 아산시 소재의 목장에서 20두, 경북 경산시 소재의 목장에서 11두를 합하여 총 31두의 대리모에 각 2-3개씩의 배반포기 형질전환 복제수정란을 이식하였다. 다수의 수정란이 임신초기에 소실되었으나, 1두의 대리모는 7개월까지 임신이 유지하다가 유산하였으며 복제태아는 유실되었다. 현재 GFP와 hFSH를 동시에 형질전환시킨 복제 수정란을 2두의 대리모가 4개월째 임신을 유지하고 있다(Table 9).

Table 9. Transfer of hFSH transgenic cloned embryos

No. recip's	No. ET	No. NT embryos transferred	No. (%) recip's preg.	No. (%) preg. maintained		
				<2 mo.	>4 mo.	>7 mo.
30	31	82	11 (35.5)	8 (72.7)	2 (18.2)	1 (9.1)*

*Aborted

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구목표 및 평가의 착안점

년도	연구목표	평가착안점
1차년도	외래유전자의 cloning 및 유전자 재조합	체세포 핵이식 조건 규명
		유용 유전자 선발 및 cloning
		체세포에 유전자 도입
2차년도	형질전환 복제수정란의 생산 및 이식	형질전환 체세포 핵이식배의 외래유전자 발현
		외래유전자 도입 체세포의 핵이식
		형질전환 복제수정란의 생산 및 이식
3차년도	형질전환 복제젖소의 생산 및 산업화	형질전환 복제송아지의 생산
		체세포 복제 형질전환 송아지의 유전형/표현형 조사 및 검증
		형질전환 복제젖소의 산업화 추진

제 2 절 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 목표달성도

본 연구과제는 인간난포자극호르몬(hFSH) 유전자를 도입한 체세포의 핵이식에 의하여 유선에서 고부가 가치 호르몬을 분비하는 형질전환 젖소의 생산을 목표로 하여 수행되었다. 2차년도까지 계획하였던 목표를 모두 달성하였고, 2차년도 말-3차년도에 걸쳐 31두의 대리모에 hFSH 형질전환 복제수정란을 이식하였으며 그 중 1두의 대리모는 7개월까지 임신이 유지되었으나 유산하였고, 현재 2두의 대리모가 GFP와 hFSH를 동시에 형질전환시킨 복제태아의 임신을 유지하고 있다. 제한된 예산을 3차년도에 모두 투입하여 수정란이식을 실시하였으나 연구과제가 종료되는 시점까지 목표로 하였던 hFSH 형질전환 복제젖소의 생산에는 이르지 못하였고, 현재 임신 중인 2두의 대리모에서 출산을 기다리고 있다. 그러나 1차년도에 복제한우를 생산하였던 경험에 미루어 비슷한 숫자의 수정란 이식이 이루어진 만큼 조만간 hFSH 형질전환 복제젖소의 생산을 기대하고 있다. 대리모의 임신기간이 다른 종에 비하여 긴 것을 감안할 때 연구기간이 짧았던 아쉬움이 있다.

그러나 본 연구과제의 수행으로 single-chain hFSH gene construct의 구축, 외래 유전자 발현율의 향상, CHO 세포에서 hFSH 분비의 확인 등 목표 이상의 결과를 얻은 점과, 체세포의 핵이식에 의한 형질전환 젖소생산의 전반적인 과정에 대한 기술을 확립할 수 있었다.

2. 연구실적

가. 논문

Kwon, M.S., B.S. Koo, B.R. Choi, H.T. Lee, Y.H. Kim, W.S. Ryu, **H. Shim**, J.H. Kim and **T. Kim**. 2004. Development of transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320:442-448.

Kim, Y.H., B.C. Koo, M.S. Kwon and **T. Kim**. 2004. Expression comparison of the GFP gene under the controls of several internal promoters in the retrovirus vector with or without WPRE sequence. *Reprod. Dev. Biol.* 28: 197-202.

Shim, H. 2004. Use of somatic cell nuclear transfer technology to produce human follicle-stimulating hormone (hFSH) transgenic cows. *Korean J. Embryo Transfer* 19(1):39-42. (suppl)

Kwon, M.S., B.C. Koo, **H. Shim**, C.S. Park, S.H. Lee and **T. Kim**. 2003. Transfer and expression of the recombinant hFSH gene in CHO cells and transgenic chicken using retrovirus vector system. *Korean J. Animal Reprod.* 27:197-206.

Park, S.W., M.R. Shin, Y.H. Kim, **H. Shim** and N.H. Kim. 2001. Development of

nuclear transfer embryos using somatic cell nuclei from Korean Native Cattle (Hanwoo) with high genetic value. Korean J. Anim. Reprod. 25:51-62.

나. 특허

김태완, 심호섭. 2004. 재조합 hFSH 유전자 및 이를 내장하는 발현용 벡터(a recombinant hFSH gene, and an expression vector containing thereof). 출원번호 10-2004-007201.

다. 학회발표초록

Yoon, J.Y., M.S. Kwon, J.H. Kang, J.H. Ryu, N.H. Kim, J.H. Kim and H. Shim. 2003. Production of bovine nuclear transfer embryos using fibroblasts transfected with single-chain human follicle-stimulating hormone gene. Proceedings of Transgenic Animal Research Conference IV, Tahoe City, USA, pp 53.

Choi, J.H., N.H. Kim, H. Shim and T Kim. 2002. Expression of recombinant human follicle-stimulating hormone in the chinese hamster ovary cell. 발생공학 국제심포지움 및 학술대회 발표자료집. Seoul National University, Seoul, Korea. pp 100.

3. 관련분야에의 기여도

가. 고부가가치 의약품의 대량생산에 의한 생산성 향상 및 원가절감 효과

나. 가축의 의약품 공장화 체계(bioreactor system)의 수립

다. 수정란의 대량 복제생산

라. 우수종의 쌍태생산을 통한 생산능력 증대

마. 고능력 소의 복제 수정란 이식을 통한 품종개량

바. Single-chain hormone의 생산기법의 개발

사. 세포배양체계에서 고부가가치 의약품의 생산

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 활용분야

1. 복제동물 생산과 관련된 연구 및 산업분야
2. 형질전환동물생산과 연관된 연구 및 산업분야
3. 유전자 제작, 보관, 이용과 관련된 연구 및 산업분야
4. 수정란의 이용효율을 향상을 위한 신기술창출 분야
5. 동결 수정란 생산 및 이식기술과 연관된 산업분야
6. Animal bioreactor system 을 이용하는 첨단산업체
7. hFSH 생산 관련 제약회사
8. hFSH를 사용하는 의료 및 축산분야

제 2 절 활용유형 및 활용방안

1. 확립된 첨단기술의 국내외 학술지 논문발표를 통한 연구 및 산업계 보급
2. 난자 체외성숙, 체세포 형질전환, 체세포 유전자적중, 체세포 핵이식, 형질전환체세포 복제수정란 생산 및 복제수정란 동결기술의 연구기술로서의 이용
3. 현장전문가를 위한 동결보존 형질전환 복제수정란의 용해 이식기술의 교육
4. hFSH 형질전환젖소의 생산 및 산업화
5. 특허권 획득 및 산업계로 특허실시권 이전
6. 국내외 산업계와 형질전환 복제소 생산 및 이용에 대한 공동연구

제 6 장 참고문헌

- Arora, N., L. C. Williamson, S. H. Leppa and J. L. Halpern. 1994. Cytotoxic effects of a chimeric protein consisting of tetanus toxin light chain and anthrax toxin lethal factor in non-neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 269(42): 26165-26171.
- Baguisi A, E. Behboodi, D.T. Melican, J.S. Pollock, M.M. Destrempes, C. Cammuso, J.L. Williams, S.D. Nims, C.A. Porter, P. Midura, M.J. Palacios, S.L. Ayres, R.S. Denniston, M.L. Hayes, C.A. Ziomek, H.M. Meade, R.A. Godke, W.G. Gavin, E.W. Overstrom and Y. Echelard. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol.* 17:456-461.
- Cibelli, J.B., S.L. Stice, P.J. Golueke, J.J. Kane, J. Jerry, C. Blackwell, F.A. Ponce de Leon and J.M. Robl. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280:1256.
- Gordon, J.W., G.A. Scangos, D.J. Plotkin, J.A. Barbosa and F.H. Ruddle. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:7380.
- Hard, K., A. Mekking, J. B. L. Damm, J. P. Kamerling, W. De Boer, R. A. Wijnands and J. F. G. Vliegenthart. 1990. Isolation and structure determination of the intact sialylated N-linked carbohydrate chains of recombinant human follitropin expressed in Chinese hamster ovary cells. *Eur J Biochem.* 193(1): 263-271.
- Kato, Y., T. Tani, Y. Sotomaru, K. Kurokawa, J. Kato, H. Doguchi, H. Yasue and Y. Tsunoda. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282:2095-8.
- Keene, J.L., M.M. Matzuk, T. Otani, B.C. Fauser, A.B. Galway, A.J. Hsueh and I. Boime. 1989. Expression of biologically active human follitropin in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 264:4769-75
- Kim, T., Y. M. Lee, H. T. Lee, Y. T. Heo, H. C. Yom, M. S. Kwon, B. C. Koo, K. Whang, and K. S. Roh. 2001. Expression of the *E. coli LacZ* gene in chicken embryos using replication defective retroviral vectors packaged with vesicular stomatitis virus G glycoprotein envelopes. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 14(2):163-169.
- Matzuk, M. M., A. J. Hsueh, P. Lapolt, A. Tsafiriri, J. L. Keene and I. Boime. 1990. The biological role of the carboxyl-terminal extension of human chorionic gonadotropin beta-subunit. 1990. *Endocrinology* 126(1): 376-383.
- McCreath, K.J., J. Howcroft, K.H.S. Campbell, A. Colman, A.J. Schnieke and A.J. Kind. 2000. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* 405:1066.

Muyan, M., and I. Boime. 1998. The carboxyl-terminal region is a determinant for the intracellular behavior of the chorionic gonadotropin β subunit: effects on the processing of the Asn-linked oligosaccharides. *Mol. Endocrinol.* 12(5):766-772.

Park, S.W., M.R. Shin, Y.H. Kim, H. Shim and N.H. Kim. 2001. Development of nuclear transfer embryos using somatic cell nuclei from Korean Native Cattle (Hanwoo) with high genetic value. *Korean J. Anim. Reprod.* 25:51-62.

Pierce, J. and T. Parsons. 1981. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* 50: 465-495.

Sano, T., A. N. Glazer and C. R. Cantor. 1992. A streptavidin-metallothionein chimera that allows specific labeling of biological materials with many different heavy metal ions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1534-1538.

Schnieke, A.E., A.J. Kind, W.A. Ritchie, K. Mycock, A.R. Scott, M. Ritchie, I. Wilmut, A. Colman and K.H. Campbell. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 278:2130.

Shin, M.R., S.W. Park, H. Shim and N.H. Kim. 2002. Nuclear and microtubule reorganization in nuclear-transferred bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 62:74-82.

Sugahara, T., M. R. Pixley, S. Minami, E. Perlas, D. Ben-Menahem, A. J. W. Hsueh and I. Boime. 1995. Biosynthesis of a biologically active single peptide chain containing the human common α and chorionic gonadotropin β subunits in tandem. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2041-2045.

Wilmut, I., A.E. Schnieke, J. McWhir, A.J. Kind and K.H. Campbell, 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810.