

최 중
연구보고서

한우 태아 체세포주 개발과 이를 이용한 태아시기 근육발달 및
분화에 관여하는 성장조절제의 효능 분석

Analysis effect of growth regulation factors on embryonic muscle
development with immortal Hanwoo embryonic somatic cell line

고려대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “한우 태아 체세포주 개발과 이를 이용한 태아시기 근육발달 및 분화에 관여하는 성장조절제의 효능 분석” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 5월 24일

주관연구기관명 : 고려대학교
총괄연구책임자 : 김형기 교수
세부연구책임자 : 유승권 교수
연 구 원 : 오세영, 오명주
손영우, 박재여
문재희, 김보나
김현정
협동연구기관명 : 서울대학교
협동연구책임자 : 최윤재 교수

요 약 문

I. 제 목

한우 태아 체세포주 개발과 이를 이용한 태아시기 근육발달 및 분화에 관여하는 성장조절제의 효능 분석

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

한우 태아 체세포주를 확립하고 이의 특성을 규명하며, 한우 태아시기 근육성장 및 분화에 영향을 미치는 다양한 성장조절제의 검증을 위한 세포주로 사용여부를 가늠할 수 있는 in vitro model system을 확립하고 이들 성장조절제들의 상호 효능규명 및 지방세포로의 전변에 관여하는 성장조절제를 선별하는 것이 본 연구의 목적이다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

- 1) 한우 고급육생산을 위한 사양 및 관리 프로그램은 개발되어 있으나 보다 효율적인 프로그램의 개발을 위해서는 한우 근육의 생성에 대한 보다 심층적인 연구가 필요하다.
- 2) 근육세포의 성장 및 발달은 발생초기 (태아시기)에 가장 왕성하게 진행되며 출생후 이들 근육세포 성장이 급격히 감소하는 것으로 알려져 있으나, 태아시기의 근육성장 및 발달에 대한 연구가 상대적으로 적은 편이다.
- 3) 확립된 세포주를 이용한 근육생성 관련 연구는 마우스나 rat에서 유래한 세포주를 이용하여 많은 연구가 진행되어 왔으나 이들 단위동물과 반추동물인 한우와는 에너지원이나 대사계가 전혀 달라 마우스나 rat의 실험결

과를 그대로 적용하는데는 한계가 있다.

- 4) 한우의 세포주를 이용하여 근육의 성장 및 분화에 대한 관련유전자들의 상호작용기작에 관한 연구는 거의 이루어져 있지 않으며 현재 이루어지고 있는 연구들은 모두 초대배양세포를 이용하고 있어 초대배양세포가 갖는 분열능력의 한계로 인해 실험을 지속할 수 있는 기간이 매우 한정되어 있고 결과의 재현성을 검증하기가 어렵다.
- 5) 한우 태아 체세포를 이용한 근육성장 및 분화에 대한 연구가 활발하게 수행되기 위해서는 마우스나 rat과 같이 지속적으로 분열할 수 있는 불멸화된 세포주의 개발이 매우 절실한 상황이며 확립된 한우 태아 체세포주를 활용하여 한우 근육조직의 분화모델을 확립하게 되면 한우의 육량 및 육질에 직접적인 연관이 있는 근육 생리와 관련된 심층적인 연구에 활용할 수 있어 학문적인 기여도가 매우 클 것으로 예상된다.
- 6) 특히, 한우 태아 체세포주를 활용하여 한우 태아시기 근육조직의 성장, 분화에 영향을 미치는 다양한 성장조절제의 효능을 검증하는 model system을 확립하는 것은 좋은 분석도구로 사용되어 향후 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

나. 경제, 산업적 측면

- 1) 고급육생산을 위한 성장조절제의 사용은 필연적으로 생산비의 증가를 유발하게 되므로 사용하고자 하는 성장조절제를 선택하기 위해서는 그 효능을 검증할 수 있는 model system이 필요하다.
- 2) 확립된 한우 태아 체세포주는 특허를 통한 새로운 부가가치의 창출이 가능할 것으로 예상되고 국내 자원의 해외유출을 방지할 수 있을 것으로 예상된다.
- 3) 성장조절제는 사료첨가제 및 호르몬 등 매우 광범위한 개념으로 관련산업의 규모도 매우 커서 새로운 성장조절제의 개발시 한우 태아 체세포주를 이용하여 이의 효능을 검증할 수 있다면 개발비용을 절감할 수 있는 효과가 있다.

다. 사회, 문화적 측면

- 1) 한우 태아 체세포주를 이용한 한우근육의 심층연구는 고유한 유전자원인 한우의 보전, 개발에 필수적인 사항이다.
- 2) 시장개방으로 인한 수입육과의 무한경쟁에서 한우의 경쟁력확보를 위해 시급히 추진되어야 할 과제로서 수입육 안전성 문제를 극복할 수 있는 기반 연구사업으로 사료된다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 한우 태아 근육유래 체세포주의 개발 및 특성 규명

가. 한우 태아 체세포의 분리 및 배양기술.

나. 한우 태아 근육유래 체세포의 확립된 세포주로 유도

다. 한우 태아 체세포주의 세포특성규명 및 유전자 발현 프로그램 규명

2. 한우 태아 체세포주 확립에 관련된 유전인자의 클로닝 및 발현조절 벡터의 구축

가. 근육세포의 특성유지에 관련된 유전자의 클로닝 및 발현조절벡터의 구축.

나. 한우 체세포의 증식에 관련된 유전인자의 선발 및 발현조절 벡터의 구축.

다. 한우 태아 체세포의 확립에 관련된 유전인자의 클로닝 및 발현조절 벡터의 구축.

라. 한우 근육 성장 및 분화 관련 유전자의 클로닝 및 발현조절 벡터의 구축.

3. 한우 근육성장 및 분화관련 호르몬 및 성장조절제의 효능 규명

- 가. 한우 근육 발달 및 분화 관련 호르몬 (GH, IGFs, IGFBP-3, thyroid hormone, steroid hormone)을 확보한다.
- 나. 한우 근육 발달 및 분화 관련 성장조절제 (transferrin, β -adrenergic agonist, chromium picorinate, vitamin A and C, IL-3, TNF- α , TZD)를 확보한다.
- 다. 이들 성장조절제 및 호르몬이 한우 초대배양 체세포의 성장·발달 및 분화에 미치는 영향을 세포생물학적방법 (세포증식속도 측정, 세포성장억제 측정, 세포분화율 측정)을 이용하여 조사한다.
- 라. 이들 성장조절제 및 호르몬이 불멸화된 한우 체세포주의 성장·발달 및 분화에 미치는 영향을 세포생물학적 방법 (세포증식속도 측정, 세포성장억제 측정, 세포분화율 측정)을 이용하여 조사하고, 근육 성장·발달 및 분화 marker 유전자 (Actin, myosin, troponin T, actin-binding filament conffilin)의 발현 양상을 RT-PCR과 같은 분자생물학적 방법에 의해 확인 한다.
- 마. 위에서 언급한 성장조절제 및 호르몬의 복합처리방법을 통해 한우 체세포주의 성장·발달 및 분화에 영향을 미치는 상호작용 효능을 세포증식속도 측정, 세포성장억제 측정, 세포분화율 측정을 통해 규명하고 또한 근육 성장·발달 및 분화 marker 유전자 (Actin, myosin, troponin T, actin-binding filament conffilin)의 발현 양상을 RT-PCR에 의해 확인한다.
- 바. 성장조절제에 의해 한우 근육전구세포주가 지방세포로 분화되는 현상을 세포생물학적 방법인 형태학적 고찰 및 Oil-red-O 염색을 통해 확인하고, 다양한 지방분화 관련 유전자 (aP-2, adipsin, LPL, PPAR- γ)의 발현 양상을 RT-PCR과 같은 분자생물학적 방법에 의해 확인한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

본 연구에서는 먼저 세포의 불멸화 유도 기법을 이용하여 한우 태아 체세포주를 확립하고 이의 특성을 규명하며, 한우 태아시기 근육성장 및 분화에 영향을 미치는 다양한 성장조절제의 검증을 위한 세포주로 사용여부를 가늠할 수 있는 *in vitro model system*을 확립하고 이들 성장조절제들의 상호 효능규명 및 지방세포로의 전변에 관여하는 성장조절제의 선발을 시도하였다.

한우 태아에서 유래한 체세포를 대상으로 연속적인 계대배양 및 다양한 불멸화 관련 유전자들(hTERT, p53DD, c-myc, cyclinD, CDK4, AKT, E2F1, 와 E2F2)을 도입하여 불멸화를 유도한 결과, 세포의 연속 계대배양을 통하여 자발적으로 불멸화에 도달한 세포주 (BEFS), p53DD (BEF-p53DD) 및 hTERT (human telomerase)의 발현을 통하여 불멸화에 도달한 세포주 (BEFT)등 3종류의 불멸화된 세포주를 확립하였다.

이들 세포는 1) 초대배양세포에 비하여 세포성장속도가 약 2배 정도 가속화되는 양상을 보였고, 2) 형태적인 측면에서 초대배양세포와 유사한 형태학적 특징을 유지하고 있음이 확인되었으며, 3) p53과 Rb pathway를 확인한 결과 모든 세포주에서 이러한 pathway가 다소 소실 됨을 관찰되었으며, 5) soft agar assay를 통한 암세포적 특징 보유 여부를 검정한 결과, BEF-p53DD를 제외한 BEFS와 BEFT는 암세포가 아닌 불멸화된 세포주임을 최종적으로 확인 할 수 있었다.

한편, 확립된 3종 불멸화세포주에 근육성장 및 분화에 관여하는 유전자들(MyoD, Myf5, myogenin, MRF4)를 도입하여 근육세포로의 분화를 유도한 결과 p53과 Rb pathway가 다소 소실된 BEFS세포에서 MyoD에 의한 근육분화를 관측할 수 있었다. 또 MRF4를 BEFS 세포주에서 과발현 시켰을 때 세포들의 성장이 촉진되는 것을 관측했다. 발생학적인 측면에서 MRF4는 myotome에서 일시적으로 발현한다고 발표된 적이 있지만 그 작용에 대해서는 밝혀진 적이 없다. MRF4에 대한 진일보 연구를 통하여 MRF4가 세포의 분열을 촉진하는 기작이 MyoD 및 p21^{Waf1} pathway와 밀접한 관계가 있음을 처음으로 밝혔다.

다음으로는, 본 연구를 통해 확립된 불멸화세포주를 활용하여 다양한 성장조절제들의 처리를 통하여 한우 태아시기 근육성장과 분화에 미치는 영향을 관측했다. 결과적으로 여러 가지 생리현상들을 관측할 수 있었다.

이상의 결과를 토대로, 세포의 연속적인 계대배양을 통하여 자발적으로 불멸화

를 유도하는 기법은 동물유래 태아체세포의 효율적인 불멸화기법의 하나임을 확인하였으며, 또한 이들 불멸화된 세포주가 MyoD와 같은 유전자를 도입했을 때 근육전구세포로의 전변을 유도할 수 있으며 다양한 성장조절제의 효능을 검증하는 유용한 세포모델로 사용될 수 있음을 증명했다.

2. 연구개발 결과 활용에 대한 건의

본 연구를 통해 확립된 3종의 한우 태아 체세포유래의 불멸주인 BEFS, BEF-p53DD, 와 BEFT는 근육성장 및 분화 관련 유전들을 도입 시 다양한 분화양상을 보여주었고, 특히 BEFS에 MyoD 유전자를 도입 시 근육전구세포로 전변될 수 있었을 뿐만 아니라 여러 가지 성장조절인자에 의하여 여러 가지 생리적반응을 보여주었다. 따라서 한우 태아시기 근육성장 및 분화에 영향을 미치는 다양한 성장조절제의 검증을 위한 세포주로 사용여부를 가늠할 수 있는 *in vitro model system*로 충분히 사용할 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 본 연구를 통해 개발된 세포주와 관련기술의 산업적 활용을 용이하도록 하기 위해서는 다음과 같은 사항에 대한 면밀한 검토가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

현재 이용되고 있는 대부분의 세포주 확립기법은 암을 유발할 수 있는 바이러스에서 유래된 유전자 (SV40 T-antigen이나 HPV E6/E7)들을 이용하는데, 이들 유전자들은 세포 성장 억제인자들의 기능을 억제하는 것 외에 또 다른 기능을 가지고 있어서 이런 바이러스 단백질에 의해 생산된 불멸화 세포들은 세대(계대)가 지속된 경우 암세포로서의 특성을 보이게 된다 (Hahn 등, 1999; Hahn 등, 2002). 정상세포에 비해 암세포는 전혀 다른 세포 생리적 및 생화학적 특성을 가져서 세포의 특성 규명을 위한 유전자의 기능 검증이나 생리활성물질 효능 검증을 위한 동물세포주로는 적합하지 않다.

또 본 연구의 실험결과로부터 p53DD나 hTERT와 같은 유전자들은 세포의 불멸화유도에 관여하는 외에 근육분화와 같은 기작에 있어서 다른 유전자들을 조절할 수 있는 기작들이 존재할 것으로 사료되지만 아직 그 기작이 명확하지 않다. 그러므로 p53DD 및 hTERT와 같은 세포불멸화 유전자들과 세포분화에 대한 연구가 더욱 활성화 되어야 한다고 사료된다.

SUMMARY

Availability of in vitro myogenic cell models that simulates in vivo myogenic conditions has greatly improved our understanding of myogenic biological processes and is useful to screen myogenic reagents such as several growth factors. But many essential aspects of myogenic differentiation have been reproduced in primary cell culture systems and in a few immortalized cell culture systems.

Skeletal myogenesis is regulated by the basic helix-loop-helix myogenic regulatory transcription factors (MRFs) including MyoD, Myf5, myogenin and MRF4. One of the unique properties of the MRFs is that their ectopic expression in nonmuscle cells can initiate the myogenic program and convert nonmuscle cells into myogenic lineage.

In this study, we established three immortal bovine embryonic fibroblast (BEF) cell lines, including spontaneous immortalized (BEFS), p53DD-mediated immortalized (BEF-DD) and hTERT-mediated immortalized (BEFT) cells. All immortal cells were the losses of functional Rb (retinoblastoma) or p53 proteins. Among the immortal cell lines, BEF-p53DD cell line was shown to be transformed phenotype.

Next, we introduced several myogenic regulatory transcription factors into the three immortal BEF cell lines. MyoD induced differentiation of the BEFS cell line to desmin-positive myotube. However, MRF4 dramatically accelerated the BEFS cell proliferation involved inhibition of MyoD/p21Waf1 cell growth arrest pathway. Furthermore, MyoD overexpressing BEFS cells and other immortal BEF cells had shown to be several responses by many growth factors.

Taken together, we successfully established a in vitro myogenic cell model to use screening myogenic reagents, that involved cell immortalization and myogenic regulatory factors transfection process.

CONTENTS

Chapter1 Introduction	17
Section1 Object	17
Section2 Necessity	17
Chapter2 Background	19
Section1 Primary cells and immortal cells	19
Section2 Telomere and immortalization	19
Section3 Myogenic cell lines	20
Chapter3 Substances and results	25
Section1 Substances and results in 1st year	25
1. Establishment and characterization of bovine embryonic fibroblast cell line (part1 in subject)	26
가. Object	26
나. Method	26
다. Results	26
1) Primary culture of Hanwoo embryonic somatic cells	26
2) Life span of Hanwoo embryonic somatic cells	27
2. Gene cloning and Retroviral vector construction (collaboration1 in subject)	30
가. Object	30
나. Method	30
다. Results	31
1) MRFs cloning and Retrovial vector construction	31

2) Cell cycle positive regulators cloning and Retroviral vector construction	32
3. Analysis effect of growth regulation factors and hormones on cell proliferation and differentiation (part2 in subject)	42
가. Object	42
나. Method	42
다. Results	42
1) Selection of myogenic reagents	42
2) Analysis effect of growth regulation factors	42
Section2 Substances and results in 2nd year	50
1. Establishment and characterization of bovine embryonic fibroblast cell line (part1 in subject)	51
가. Object	51
나. Method	51
다. Results	51
1) Stress-induced immortalization	51
2) Cell cycle positive regulators mediated immortalization	52
3) Telomerase and its regulators mediated immortalization	52
4) p53DD mediated immortalization	53
2. Gene cloning and Retroviral vector construction (collaboration1 in subject)	59
가. Object	59
나. Method	59
다. Results	59
1) Telomerase and c-myc cloning and Retroviral vector construction	59
2) p53DD cloning and Retroviral vector construction	61
3. Analysis effect of growth regulation factors and hormones on cell proliferation and differentiation (part2 in subject)	73
가. Object	73

나. Method	73
다. Results	73
1) Analysis effect of EGCC	73
Section1 Substances and results in 3rd year	86
1. Establishment and characterization of bovine embryonic fibroblast cell line (part1 in subject)	87
가. Object	87
나. Method	87
다. Results	87
1) Characterization of cell cycle regulators in immortal BEF cells ...	87
2) Characterization of cell differentiation	88
3) Soft agar assay	89
4) Analysis effect of MRFs overexpressin in immortal BEF cells ...	89
2. Gene cloning and Retroviral vector construction (collaboration1 in subject)	111
가. Object	111
나. Method	111
다. Results	111
1) MRF4 cloning and Retrovial vector construction	111
2) Myf5 cloning and Retrovial vector construction	133
3. Analysis effect of growth regulation factors and hormones on cell proliferation and differentiation (part2 in subject)	121
가. Object	121
나. Method	121
다. Results	121
1) Effect of Insulin on myogenic differentiation	121
2) Effect of Cr on myogenic differentiation	121
3) Effect of PPAR ligands on myogenic differentiation	122
4) Effect of growth regulation factors and hormones on myogenic differentiation	122
5) Effect of growth regulation factors and hormones on adipogenic	

differentiation	122
Chapter4 Achievement of research goal and its contribution	132
Section1 Achievement of research goal in years	132
Section2 Contribution of research	136
Chapter5 Application plan of research results	137
Chapter6 External technical information during research	138
Chapter7 References	139

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	17
제 1 절 연구개발의 목적	17
제 2 절 연구개발의 필요성	17
제 2 장 국내·외 기술개발 현황	19
제 1 절 초대배양세포와 불멸화에 의한 확립된 세포주의 관계	19
제 2 절 염색체 말단인 telomere와 확립된 세포주의 관계	19
제 3 절 근육관련 세포주 확립 현황	20
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과	25
제 1 절 1차년도 연구개발수행 내용 및 결과	25
1. 한우 태아 근육유래 체세포주의 개발 및 특성 규명 (주관연구 및 제 1 세부과제)	26
가. 실험목적	26
나. 실험방법	26
다. 실험결과	26
1) 한우 태아 체세포의 분리 및 배양기법확립	26
2) 분리된 초대배양세포의 배양상 세포수명 측정	27
2. 한우 태아 체세포주 확립에 관련된 유전인자의 클로닝 및 발현조절 벡터 의 구축 (제 1 협동과제)	30
가. 실험목적	30
나. 실험방법	30
다. 실험결과	31
1) 한우 태아 근육유래 체세포의 분화유도에 관련된 유전인자의 클로닝	

및 발현조절벡터의 구축	31
2) 한우 태아 근육유래 체세포의 증식에 관련된 유전인자의 선발 및 발 현조절벡터의 구축	32
3. 한우 근육성장 및 분화관련 호르몬 및 성장조절제의 효능 규명 (제 2 세 부과제)	42
가. 실험목적	42
나. 실험방법	42
다. 실험결과	42
1) 한우 근육발달 및 분화관련 성장조절제의 선발	42
2) 한우 초대배양 태아 체세포들을 이용한 성장조절제의 효능검정	42
제 2 절 2차년도 연구개발수행 내용 및 결과	50
1. 한우 태아 근육유래 체세포주의 개발 및 특성 규명 (주관연구 및 제 1 세부과제)	51
가. 실험목적	51
나. 실험방법	51
다. 실험결과	51
1) 세포 생리적 조절을 통한 자발적 세포주 확립 유도	51
2) 세포분열촉진 유전자의 과발현을 통한 세포주 확립 유도	52
3) 세포무한분열유도 유전자의 과발현을 통한 세포주 확립 유도	52
4) 세포분열억제 유전자의 발현 억제에 의한 세포주 확립 유도	53
2. 한우 태아 체세포주 확립에 관련된 유전인자의 클로닝 및 발현조절 벡터 의 구축 (제 1 협동과제)	59
가. 실험목적	59
나. 실험방법	59
다. 실험결과	59
1) 세포무한분열유도 유전자의 클로닝	59
2) p53DD유전자 클로닝	61
3. 한우 근육성장 및 분화관련 호르몬 및 성장조절제의 효능 규명 (제 2 세 부과제)	73
가. 실험목적	73

나. 실험방법	73
다. 실험결과	73
1) EGCC가 한우 태아 체세포주에 미치는 영향	73
제 3 절 3차년도 연구개발수행 내용 및 결과	86
1. 한우 태아 근육유래 체세포주의 개발 및 특성 규명 (주관연구 및 제 1 세부과제)	87
가. 실험목적	87
나. 실험방법	87
다. 실험결과	87
1) 세포분열조절인자의 작용양상을 규명	87
2) 세포의 분화양상 비교	88
3) Soft agar assay	89
4) 불명화 세포들에서의 근육분화유도 유전자의 과발현 효과검증	89
2. 한우 태아 체세포주 확립에 관련된 유전인자의 클로닝 및 발현조절 벡터 의 구축 (제 1 협동과제)	111
가. 실험목적	111
나. 실험방법	111
다. 실험결과	111
1) MRF4 유전자 클로닝	111
2) Myf5유전자 클로닝	113
3. 한우 근육성장 및 분화관련 호르몬 및 성장조절제의 효능규명 (제 2 세 부과제)	121
가. 실험목적	121
나. 실험방법	121
다. 실험결과	121
1) Insulin이 근육분화에 미치는 영향	121
2) Cr이 근육분화에 미치는 영향	121
3) PPAR ligand들이 근육분화에 미치는 영향	122
4) 성장조절제들과 호르몬들이 근육분화에 미치는 영향	122
5) 성장조절제들과 호르몬들이 지방분화에 미치는 영향	122

제 4 장	연구개발목표의 달성도 및 기술발전 기여도	132
제 1 절	연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도	132
제 2 절	기술발전 기여도	136
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	137
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	138
제 7 장	참고문헌	139

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

한우 태아 체세포주를 확립하고 이의 특성을 규명하며, 한우 태아시기 근육성장활용하여 및 분화에 영향을 미치는 다양한 성장조절제의 검증을 위한 세포주로 사용여부를 가늠할 수 있는 in vitro model system을 확립하고 이들 성장조절제들의 상호 효능규명 및 지방세포로의 전변에 관여하는 성장조절제를 선별하는 것이 본 연구의 목적이다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

한우 고급육생산을 위한 사양 및 관리 프로그램은 개발되어 있으나 보다 효율적인 프로그램의 개발을 위해서는 한우 근육의 생성에 대한 보다 심층적인 연구가 필요하다. 근육세포의 성장 및 발달은 발생초기 (태아시기)에 가장 왕성하게 진행되며 출생후 이들 근육세포 성장이 급격히 감소하는 것으로 알려져 있으나, 태아시기의 근육성장 및 발달에 대한 연구가 상대적으로 적은 편이다. 확립된 세포주를 이용한 근육성장 관련 연구는 마우스나 rat에서 유래한 세포주를 이용하여 많은 연구가 진행되어 왔으나 이들 단위동물과 반추동물인 한우와는 에너지원이나 대사계가 전혀 달라 마우스나 rat의 실험결과를 그대로 적용하는 데는 한계가 있다. 한우의 세포주를 이용하여 근육의 성장 및 분화에 대한 관련유전자들의 상호작용기작에 관한 연구는 거의 이루어져 있지 않으며 현재 이루어지고 있는 연구들은 모두 초대배양세포를 이용하고 있어 초대배양세포가 갖는 분열능력의 한계로 인해 실험을 지속할 수 있는 기간이 매우 한정되어 있고 결과의 재현성을 검증하기가 어렵다. 한우 태아 체세포를 이용한 근육성장 및 분화에 대한 연구가 활발하게 수행되기 위해서는 마우스나 rat과 같이 지속적으로 분열할 수 있는 불멸화된 세포주의 개발이 매우 절실한 상황이며 확립된 한우 태아 체세포주를 활용하여 한우 근육조직의 분화모델을 확립하게 되면 한우의 육량 및 육질에 직접적인 연관이 있는 근육 생리와 관련된 심층적인 연구에 활용할 수 있어

학문적인 기여도가 매우 클 것으로 예상된다. 특히, 한우 태아 체세포주를 활용하여 한우 태아시기 근육조직의 성장, 분화에 영향을 미치는 다양한 성장조절제의 효능을 검증하는 model system을 확립하는 것은 좋은 분석도구로 사용되어 향후 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

2. 경제·산업적 측면

고급육생산을 위한 성장조절제의 사용은 필연적으로 생산비의 증가를 유발하게 되므로 사용하고자 하는 성장조절제를 선택하기 위해서는 그 효능을 검증할 수 있는 model system이 필요하다. 확립된 한우 태아 체세포주는 특허를 통한 새로운 부가가치의 창출이 가능할 것으로 예상되고 국내 자원의 해외유출을 방지할 수 있을 것으로 예상된다. 성장조절제는 사료첨가제 및 호르몬 등 매우 광범위한 개념으로 관련산업의 규모도 매우 커서 새로운 성장조절제의 개발시 한우 태아 체세포주를 이용하여 이의 효능을 검증할 수 있다면 개발비용을 절감할 수 있는 효과가 있다.

3. 사회·문화적 측면

한우 태아 체세포주를 이용한 한우근육의 심층연구는 고유한 유전자원인 한우의 보전, 개발에 필수적인 사항이다. 시장개방으로 인한 수입육과의 무한경쟁에서 한우의 경쟁력확보를 위해 시급히 추진되어야 할 과제로서 수입육 안전성 문제를 극복할 수 있는 기반 연구사업으로 사료된다.

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

제 1 절 초대배양세포와 불멸화에 의한 확립된 세포주의 관계

1. 생체에서는 줄기세포, 생식세포 또는 신경세포 등과 같은 일부를 제외하고 대다수의 체세포는 노화의 과정을 거치며 한정된 수명을 지니고 있다. 즉, 정상적인 체세포는 일정 수의 세포분열 후 세포의 성장이 멈추는 세포 노화 단계에 도달하기 때문에 무한하게 증식할 수 없다 (Hayflick과 Moorhead, 1961; Campisi, 2001).
2. 확립된 세포주는 생체에서 분리한 세포가 인위적인 체외배양 조건하에서도 일반적으로 세포노화의 과정을 극복하고 지속적으로 세포증식의 특성을 보이는 세포를 일컫는다.
3. 현재 일반적으로 설명되고 있는 세포 노화 기작은 세포 증식 시 필연적으로 생성되는 세포 내생 독성산화물질(Reactive oxygen species; O^2 , H_2O_2)이 세포에 손상을 줌으로써 이런 손상을 인식해서 세포의 증식을 억제하는 유전자 발현과 활성이 증가하여 세포의 무한 증식을 억제한다는 것이다 (Sherr과 DePinho, 2000) (그림 1. 참조). 따라서 내생 독성산화물질의 세포 내 축적을 억제할 수 있는 다양한 항산화제(MnSOD나 catalase)들의 발현을 증가시킴으로써 체외배양조건에서 세포의 분열횟수를 증가시켰으며 (Kim 등, 2004), 세포 성장 억제유전자의 기능을 직접적으로 억제할 수 있는 바이러스 (SV40, HPV)에서 유래된 유전자를 이용하여 정상세포를 불멸화 세포로 전변시킬 수 있었다 (Hahn 등, 1999).

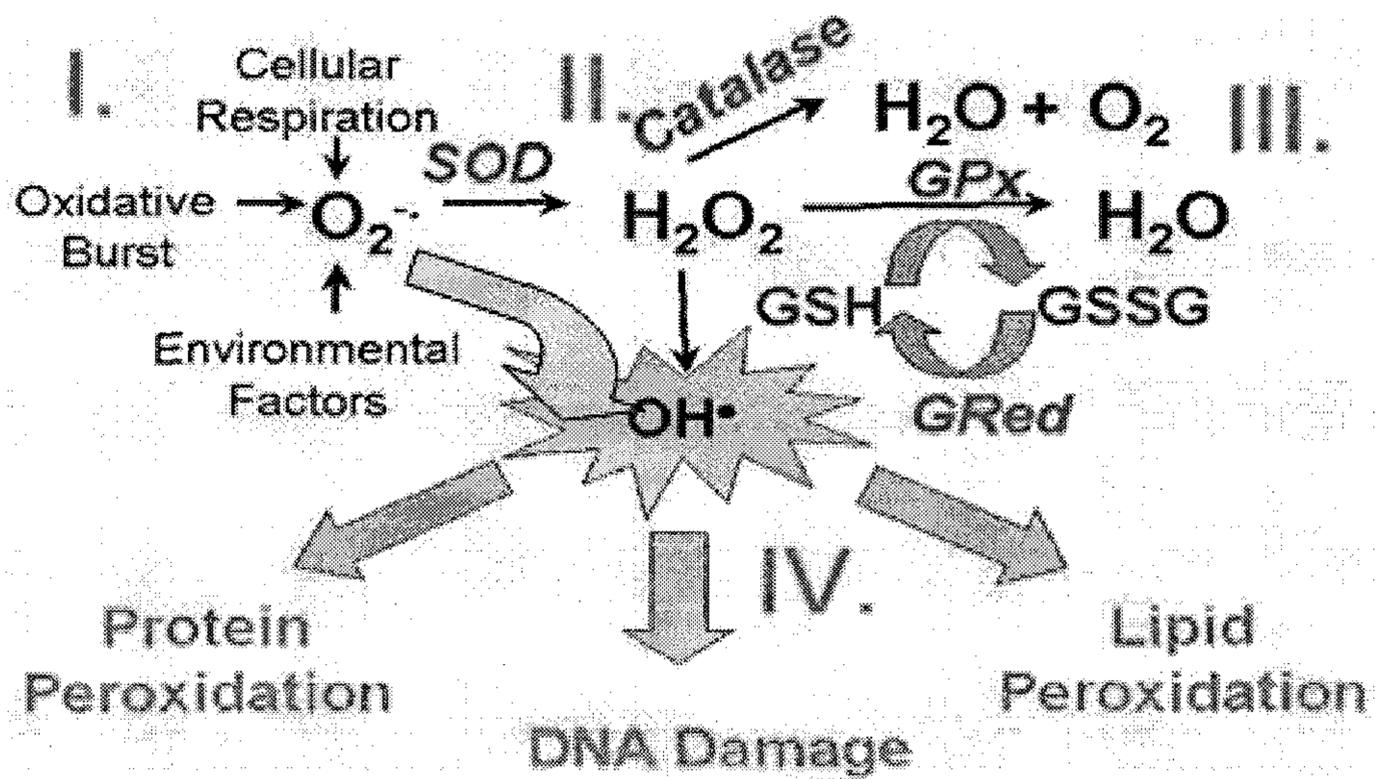
제 2 절 염색체 말단인 telomere와 확립된 세포주의 관계

1. 진핵세포의 염색체는 선형으로 이루어져 있어 세포분열이 거듭되면서 DNA 복제가 반복됨에 따라 DNA의 말단을 완벽하게 복제할 수 없는 end-replication problem(그림 2.)에 의해 염색체 말단이 지속적으로 줄어들어 유전자가 손상을 입게되고, 결국 세포내 존재하는 유전자 손상인식인자에 의해 세포의 성장이 억제된다는 것이다. (Greider와 Blackburn, 1989; Itahana 등, 2001).

2. 염색체 말단의 손실을 방지하는 효소인 telomerase를 인위적으로 조절함으로써 정상세포가 노화단계를 거치지 않고 불멸화 세포로 전변시킬 수 있었다 (Bodnar 등, 1998; Dickson 등, 2000; Kim 등, 2002b). 불멸화 이전에 직접적으로 관련이 있는 telomerase 효소는 발생단계에서 활발하게 발현되나 성체가 되면 발현이 되지 않고 생식세포 및 줄기세포에서만 발현이 되는 것으로 알려져 있다 (Mauro와 Foster, 2002)(그림 3.).

제 3 절 근육관련 세포주 확립 현황

1. 현재까지 근육관련 체세포주는 설치류에서 확립된 9 종류의 세포주와 메추리에서 확립된 1종류의 세포주만이 보고되고 있다(표 1.). 근육세포와 같은 기능성 세포는 세포 자체의 기본 생리적 특성 (근육세포의 특성 보유)과 세포분열특성 (일정 회수의 세포분열 후 세포성장이 억제되고 분열이 억제된 세포들의 융합에 의해 근육세포가 형성이 됨)을 가지고 있는 독특한 세포생리·생화학적 성격을 가지고 있다. 따라서 이러한 특성이 세포배양기법 측면에서 연구의 발전을 저해하고 있다.



by G.P.Eckert
www.biozentrum.uni-frankfurt.de/Pharmakologie/index.html

그림 1. 세포 내생 독성산화물질(Reactive oxygen species; O_2^- , H_2O_2)이 세포에 주는 영향.

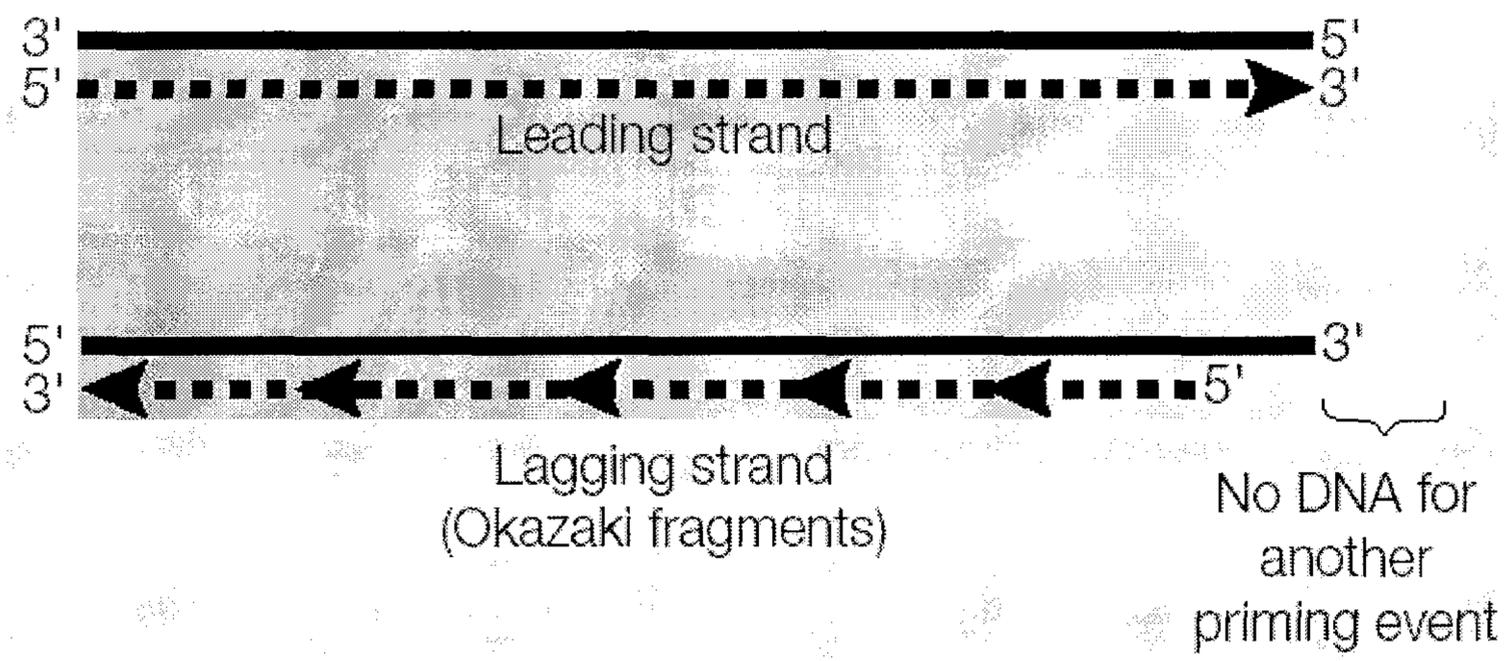


그림 2. DNA의 end-replication problem

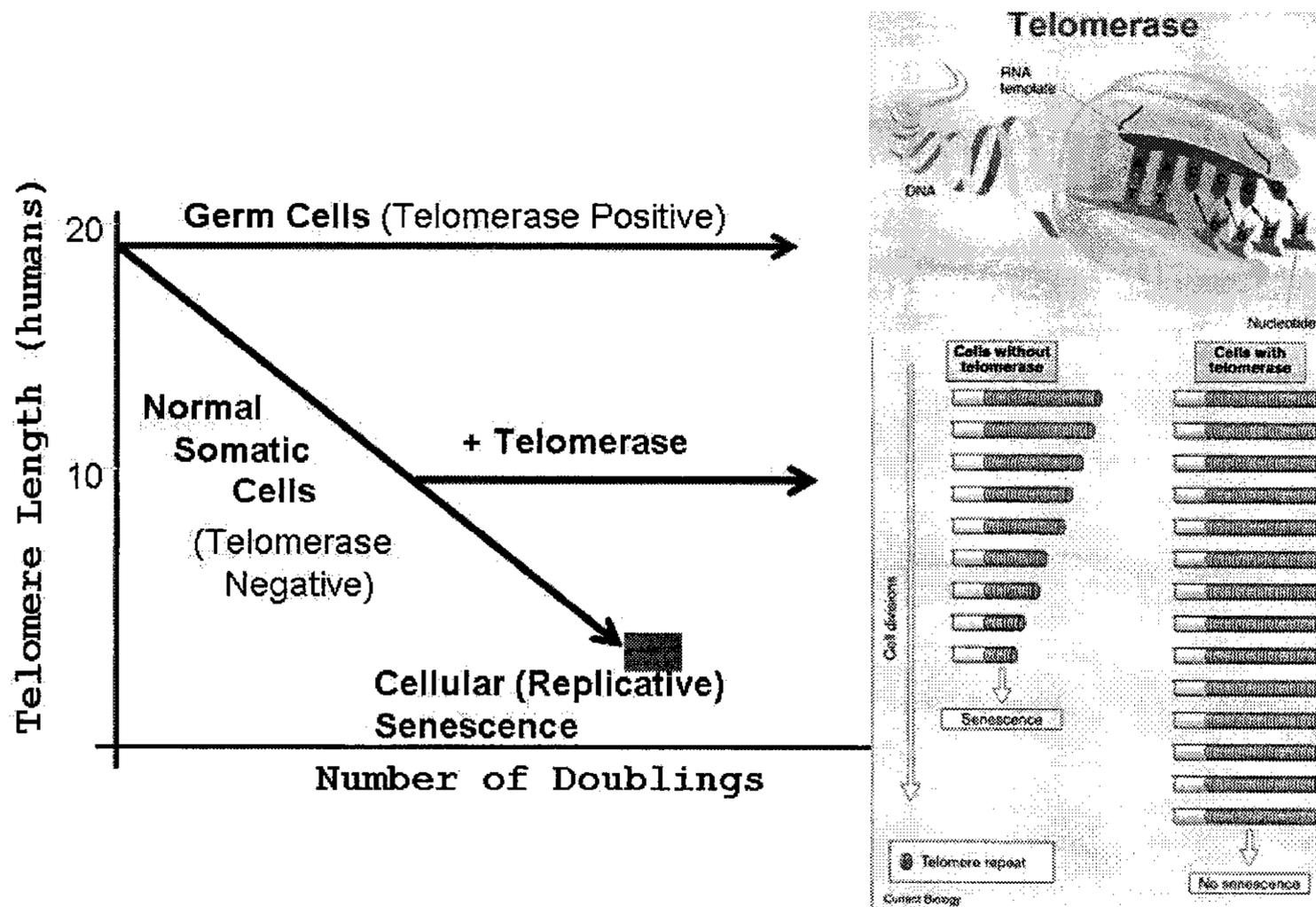


그림 3. Telomere와 telomerase

표 1. 현재 상용화되고 있는 근육관련 세포주 목록

Name	Origin	Reference
L6	Rat skeletal muscle	Rechle and Yaffe, 1970
L-8	Rat skeletal muscle	Rechle and Yaffe, 1970
A-10	Rat embryonic thoracic aorta	Kime and Brandt, 1976
H9c2(2-1)	Rat embryonic heart tissue	Kime and Brandt, 1976
C2C12	Dystrophic mouse muscle	Yaffe and Saxel, 1977
G-7	Mouse skeletal muscle	Christian et al., 1977
G-8	Mouse skeletal muscle	Christian et al., 1977
Sol8	Mouse skeletal muscle	Daubas et al., 1988
QM7	Quail fibrosarcoma	Antin and Ordahl, 1991

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1 절 1차년도 연구개발수행 내용 및 결과

본 연구과제의 1차년도 연구개발의 목표와 내용은 표 2.과 같다.

표 2. 1차년도 연구개발 목표와 내용

연구개발 목표	연구개발 내용
1. 한우 태아의 근육조직으로부터 체세포의 분리	1. 한우 태아의 근육조직으로부터 체세포 분리
2. 한우 태아 체세포의 초대배양기술 확립	2. 분리된 초대배양세포의 배양상 세포수명 측정
3. 근육세포 특성유지에 관련된 유전자의 클로닝	3. 분화유도에 관련된 유전인자의 클로닝 및 발현 조절백터의 구축
4. 근육세포 특성유지에 관련된 유전자의 발현백터구축	- MyoD 및 myogenin 유전자의 클로닝 - 레트로바이러스-유전자 전이 발현백터구축
5. 체세포의 증식에 관련된 유전자의 클로닝	- 근육분화관련표지유전자의 RT-PCR용 primer 작성
6. 체세포의 증식에 관련된 유전자의 발현백터구축	4. 체세포의 증식에 관련된 유전인자의 클로닝 및 발현조절백터의 구축
5. 한우 근육발달 및 분화관련 성장조절제의 선발	- Cyclin D, cyclin-dependent kinase 4, E2F family, protein kinase B(AKT) 유전자의 클로닝 - 레트로바이러스-유전자 전이 발현백터구축
6. 한우 초대배양 태아 체세포들을 이용한 성장조절제의 효능검정	5. 근육발달 및 분화관련 호르몬확보 및 효과연구 - GH, IGFs, IGFBP-3, thyroid hormone, steroid hormone
	6. 근육발달 및 분화관련 성장조절제 확보 및 효과연구 - Transferrin, β -adrenergic agonist, chromium picorinate, vitamin A and C, IL-3, TNF- α , TSD
	7. 근육발달 및 분화관련 성장조절제 및 호르몬이 한우 초대배양 태아 체세포의 성장·발달 및 분화에 미치는 영향을 세포생물학적방법을 이용하여 조사
	- 세포증식속도 측정 - 세포성장억제 측정 - 세포분화율 측정

1. 한우 태아 근육유래 체세포주의 개발 및 특성 규명 (주관연구 및 제 1 세부과제)

가. 실험목적

- 1) 한우 태아의 근육조직으로부터 체세포의 분리
- 2) 한우 태아 체세포의 초대배양기술 확립

나. 실험방법

- 1) 한우 태아 체세포의 분리 및 배양기술

도축된 한우 성축의 태아를 회수하여 0.3-0.4% collagenase를 이용한 효소적 세포분리방법 분리한 후 100 um nylon mesh를 이용한 물리적 세포분리방법을 이용함으로써 상대적으로 세포크기가 큰 분화된 근육세포를 제거한다.

- 2) 분리된 초대배양세포의 배양상 세포수명 측정

분리된 초대배양세포를 DMEM/F12-10% FBS 혹은 DMEM 10% FBS 배지에서 배양하여 배양조건을 선택한다. 선택된 배양조건에서 이들 세포들의 배양상 세포수명을 3T3 및 3T12 세포계대방법을 이용하여 조사한다. 이때 분리된 초대배양세포는 세포분화결정 유전인자 (MyoD 또는 myogenin)에 의해 근육세포의 특성을 가진 세포로 전변될 수 있다

다. 실험결과

- 1) 한우 태아 체세포의 분리 및 배양기법확립

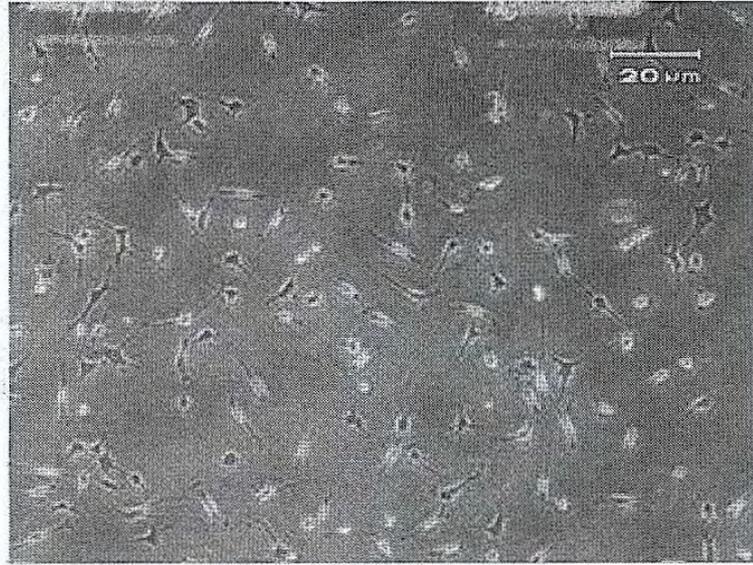
한우 태아 체세포의 분리, 배양은 앞서 소개한 연구수행방법에 의하여 수행하

였다. 그림 4.은 분리한 한우 태아 체세포의 사진 (그림 4A.) 과 배양조건을 선정하기 위한 세포성장곡선을 보여주고 있다. 한우 태아 체세포는 전형적인 섬유아 세포모양을 갖고 있으며 세포가 상대적으로 작았다. 초대배양세포의 배양조건을 확립하기위하여 두 가지 조합(즉 DMEM/F12-10% FBS 혹은 DMEM 10% FBS)의 배지에서 배양하여 성장속도를 비교하였다(그림 4B.). 결과 두 가지 조건에서 비슷한 성장성적을 보여주었고 또 세포의 형태학적인 변화가 없었으므로 보다 경제적인 DMEM 10% FBS를 선택하여 향후 실험에서의 배지로 선택했다.

2) 분리된 초대배양세포의 배양상 세포수명 측정

그림 5.는 세포수명을 측정한 결과이다. 연속배양을 실시한 결과 Passage 15에서 Passage 16으로의 전환기에서 분열이 활발히 일어나는 소수의 primary cell이 생겨남을 관찰할 수 있었다. Passage 15에서 세포는 거의 성장을 하지 못하는 상태로 유지가 되었으나 계대후 분열이 활발한 소수의 세포가 증식하기 시작하여 일련의 선발과정이 일어났음을 알 수 있었다. Passage 19에서 다시 속도가 느려지고 있는 추세였으나 Passage 23에서 다시 성장속도가 빨라지면서 현재는 안정한 세포주로 구축되었다. 이러한 양상은 다른 연구자들이 primary 세포의 불멸화를 유도했던 과정에서 일어나는 변화와 매우 유사한 양상이다.

A



B

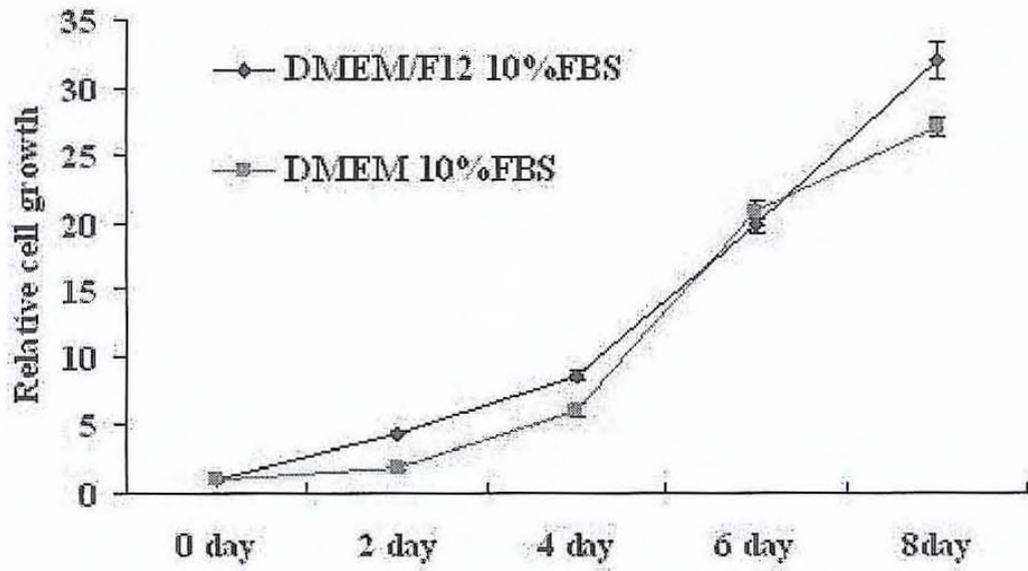


그림 4. 한우 태아 체세포 현미경 사진 및 배지조건 확립

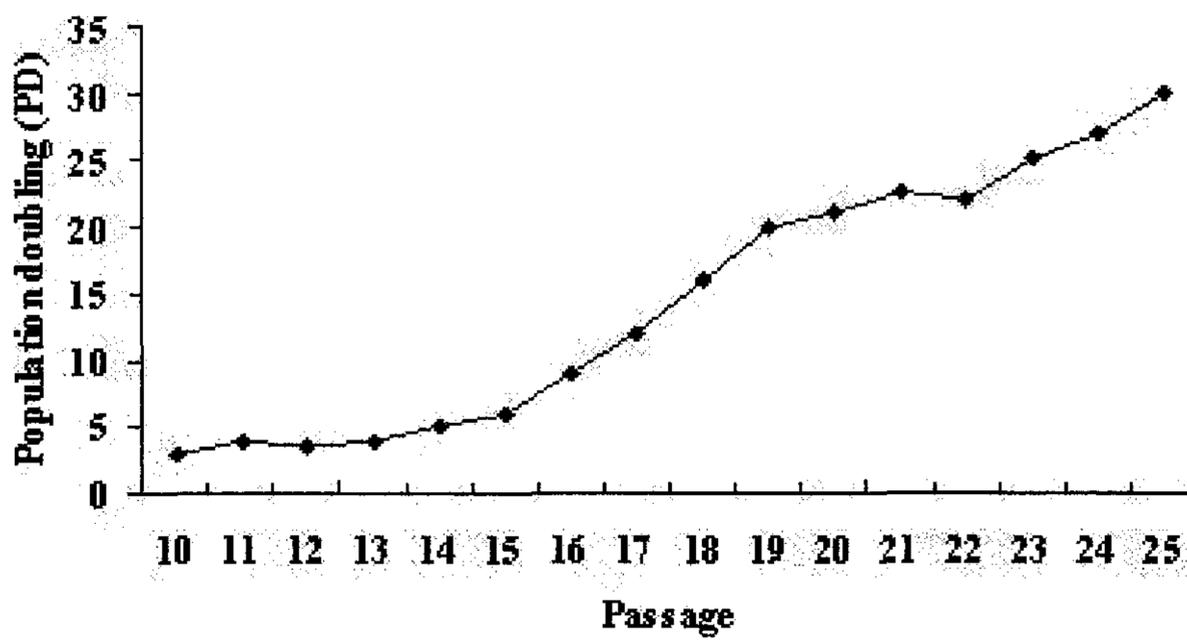


그림 5. 초대배양세포의 배양상 세포수명

2. 한우 태아 체세포주 확립에 관련된 유전인자의 클로닝 및 발현조절 벡터의 구축 (제 1 협동과제)

가. 실험목적

- 1) 근육세포 특성유지에 관련된 유전자의 클로닝
- 2) 근육세포 특성유지에 관련된 유전자의 발현벡터구축
- 3) 근육분화관련표지유전자의 RT-PCR용 primer 작성
- 4) 체세포의 증식에 관련된 유전자의 클로닝
- 5) 체세포의 증식에 관련된 유전자의 발현벡터구축

나. 실험방법

- 1) 한우 태아 근육유래 체세포의 분화유도에 관련된 유전인자의 클로닝 및 발현조절벡터의 구축

근육세포 특성유지에 관여하는 MyoD 및 myogenin 유전자를 GenBank에 보고된 sequence를 바탕으로 하여 RT-PCR을 통하여 클로닝한다. 클로닝된 MyoD 및 myogenin 유전자는 TA cloning 과 제한효소 cutting을 통하여 레트로바이러스-유전자 전이 발현벡터에 삽입한다. MyoD와 myogenin의 발현은 Western blot혹은 RT-PCR을 통하여 확인한다. 또한 다양한 근육분화관련유전자의 RT-PCR용 primer를 작성하여 근육분화관련유전자를 측정한다.

- 2) 한우 체세포의 증식에 관련된 유전인자의 선발 및 발현조절 벡터의 구축

체세포의 증식에 관여하는 유전인자 (cyclin D, cyclin-dependent kinase 4, E2F family 및 protein kinase B 또는 AKT)들을 GenBank에 보고된 sequence를 바탕으로 하여 RT-PCR을 통하여 클로닝한다. 클로닝된 MyoD 및 myogenin 유전자는 TA cloning 과 제한효소 cutting을 통하여 레트로바이러스-유전자 전이 발현벡터에 삽입한다. 클로닝된 유전자들의 발현은 RT-PCR을 통하여 확인한

다.

다. 실험결과

1) 한우 태아 근육유래 체세포의 분화유도에 관련된 유전인자의 클로닝 및 발현 조절벡터의 구축

가) MyoD 및 myogenin 유전자의 클로닝

그림 6. 근육세포의 분화유도에 관련된 유전인자 MyoD 와 myogenin를 RT-PCR을 통하여 클로닝한 결과이다. 각 유전자에 해당하는 NCBI GenBank ID와 본 실험에서 클로닝한 유전자의 크기를 표 3.에 요약하였다.

나) 레트로바이러스-유전자 전이 발현벡터구축

RT-PCR을 통하여 얻은 PCR product들은 TA-cloning을 거쳐 sequencing했다. sequencing 결과를 Blast search를 통해 각각의 sequence를 확인했다. 그림 7. Cloning한 각각의 불멸화유도 유전자를 레트로바이러스 벡터시스템인 pBabe vector에 sub-cloning하고 구축된 vector를 제한효소 절단 후 전기영동을 통해 최종 확인한 결과이다.

다) 유전자 과발현확인

위에서 구축한 레트로바이러스 발현벡터를 한우 태아 체세포에 retroviral system을 이용한 transduction을 실시하고 그 발현을 western blot과 RT-PCR을 통하여 확인했다. 클로닝한 MyoD 및 myogenin의 발현을 확인한 결과는 그림 8. 서 보여주는 바와 같다. 그림에서 Puro는 vector control이다. Western blotting 및 RT-PCR을 통하여 transduction을 통해 한우 태아체세포에 도입한 각 MyoD 및 myogenin이 안정적으로 발현이 유지됨을 확인하였다.

라) 근육분화관련유전자의 RT-PCR용 primer를 작성 및 확인

한우근육분화 관련유전자인 MyoD, myf5, myogenin, MRF4의 mRNA를 확인할 수 있는 primer를 primer3프로그램을 통하여 작성했다(표 4.). 이러한 primer

가 정확히 작동하는 지를 확인하기 위하여 소의 근육조직으로부터 mRNA를 분리하여 RT-PCR을 통하여 확인했다. 그 결과는 그림 9.서 보여주는 바와 같다.

2) 한우 태아 근육유래 체세포의 증식에 관련된 유전인자의 선발 및 발현조절벡터의 구축

가) Cyclin D, cyclin-dependent kinase 4, E2F family, protein kinase B (AKT) 유전자의 클로닝

그림 10.체세포의 증식에 관련된 유전인자 Cyclin D, cyclin-dependent kinase 4, E2F family, protein kinase B (AKT)들을 RT-PCR을 통하여 클로닝한 결과이다. 각 유전자에 해당하는 NCBI GenBank ID와 본 실험에서 클로닝한 유전자의 크기를 표 3.에 요약하였다.

나) 레트로바이러스-유전자 전이 발현벡터구축

RT-PCR을 통하여 얻은 PCR product들은 TA-cloning을 거쳐 sequencing했다. sequencing 결과를 Blast search를 통해 각각의 sequence를 확인했다. 그림 11. Cloning한 각각의 불멸화유도 유전자를 레트로바이러스 벡터시스템인 pBabe vector에 sub-cloning하고 구축된 vector를 제한효소 절단 후 전기영동을 통해 최종 확인한 결과이다.

다) 유전자 과발현 확인

위에서 구축한 레트로바이러스 발현벡터를 한우 태아 체세포에 retroviral system을 이용한 transduction을 실시하고 그 발현을 RT-PCR을 통하여 확인했다. 클로닝한 Cyclin D, cyclin-dependent kinase 4, E2F family, protein kinase B (AKT)의 발현을 확인한 결과는 그림 12.서 보여주는 바와 같다. 그림에서 Puro는 vector control이다. RT-PCR을 통하여 transduction을 통해 한우 태아체 세포에 도입한 각 유전자들이 안정적으로 발현이 유지됨을 확인하였다.

표3. 클로닝한 유전자의 sequencing결과와 일치한 GenBank ID와 크기

Gene name	GenBank ID	Size (bp)
MyoD	NM_010866	1785
myogenin	NM_031189	855
CyclinD	NM_007631	3057
CDK4	NM_009870	1345
AKT	NM_009652	2212
E2F1	NM_007891	1787
E2F2	NM_177733	1897

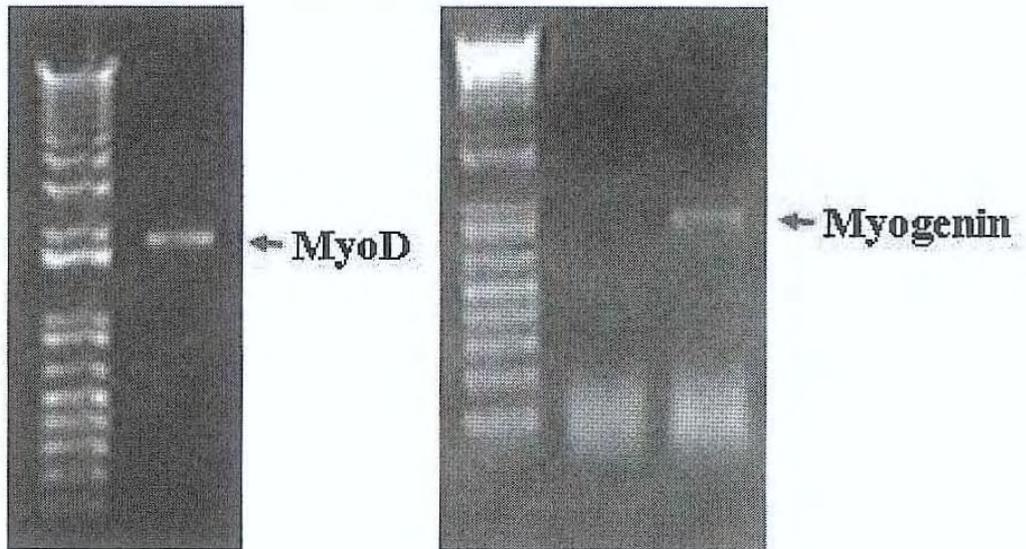


그림 6. MyoD 및 myogenin 유전자 클로닝을 위한 RT-PCR 결과

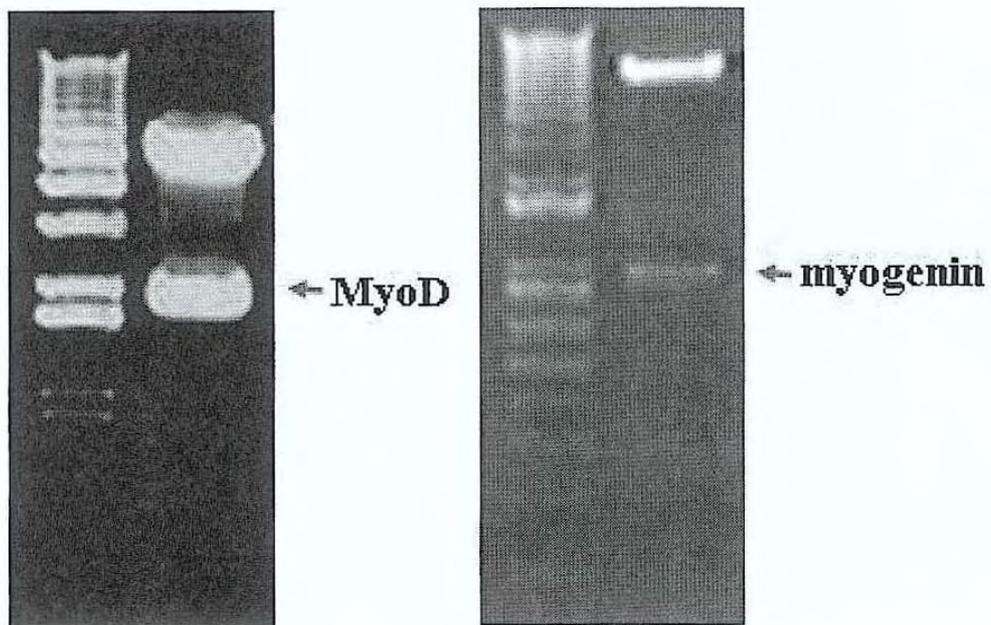


그림 7. 구축된 레트로바이러스-유전자 전이 발현벡터의 제한효소를 이용한 확인

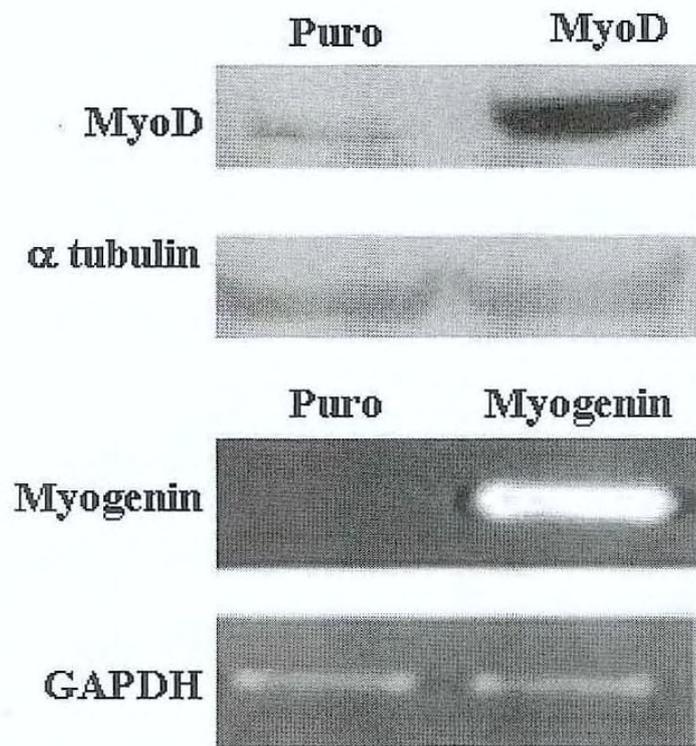


그림 8. 한우 태아 체세포에서 클로닝한 유전자들의 과발현확인

표 4. 한우근육분화관련 유전자의 primer

Gene name	Origin	GenBank ID	Region	Size	Primer	
MyoD	bovine	AB110599	445	254	F	atcctgcgcaacgccatccgctatatcg
			699		R	ctcgctgtagtaagtgcggtcgtagcagt
myf5	bovine	NM_174116	528	245	F	ctcaggaatgccatccgctacattgaga
			773		R	atccaagctggataaggagctttatccg
myogenin	bovine	AF091714	156	313	F	gaagcgcagactcaagaaggtgaatga
			469		R	tctgtagggtccgctgggagcagatgat
MRF4	bovine	AB110601	308	275	F	aaggaggaggctaaagaaaatcaacg
			583		R	tggaatgatcggaacacttggccactg

MyoD Myf5 Myogenin MRF4

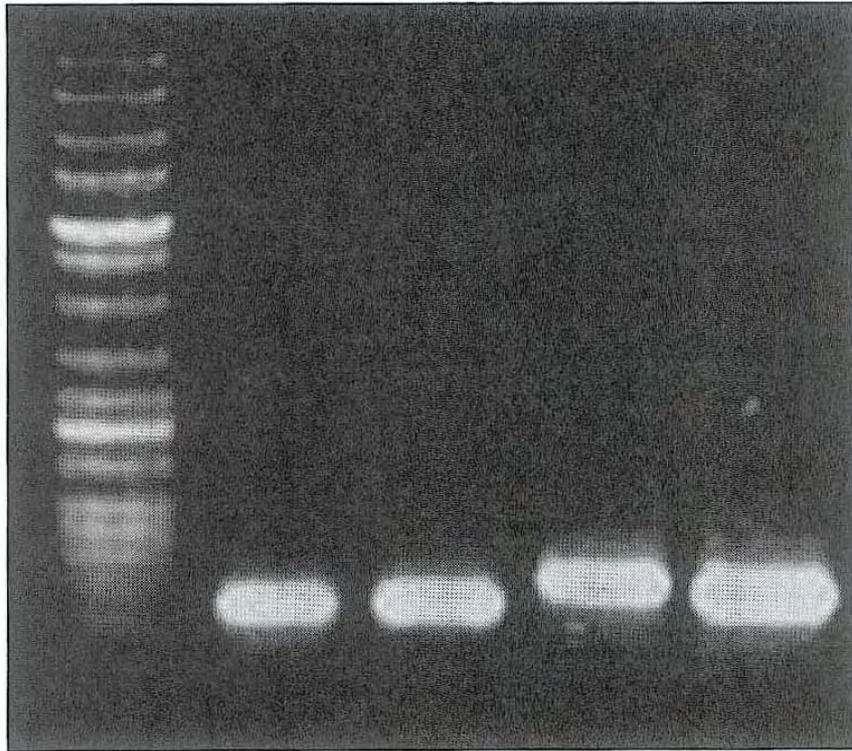


그림 9. 근육분화관련 유전자의 primer 효율확인

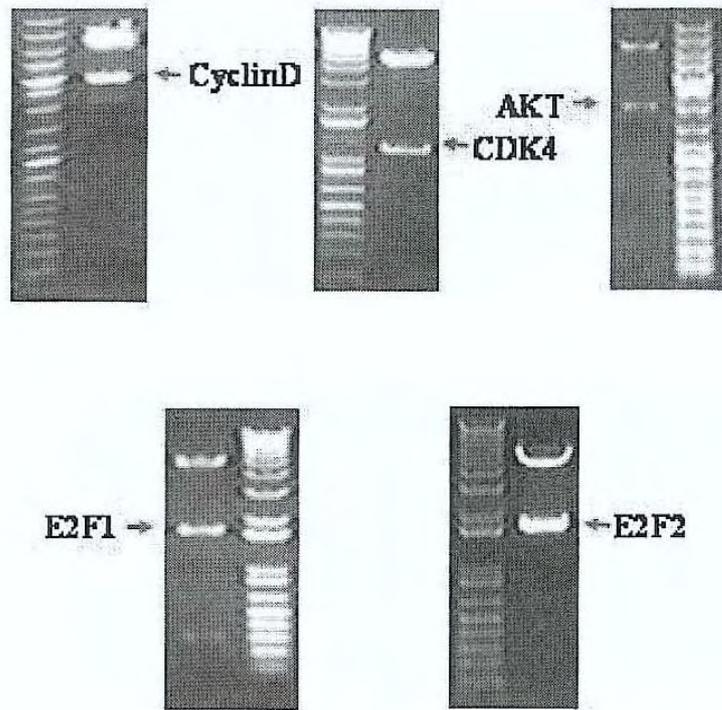


그림 10. Cyclin D, cyclin-dependent kinase 4, E2F family, protein kinase B (AKT) 유전자 클로닝을 위한 RT-PCR 결과

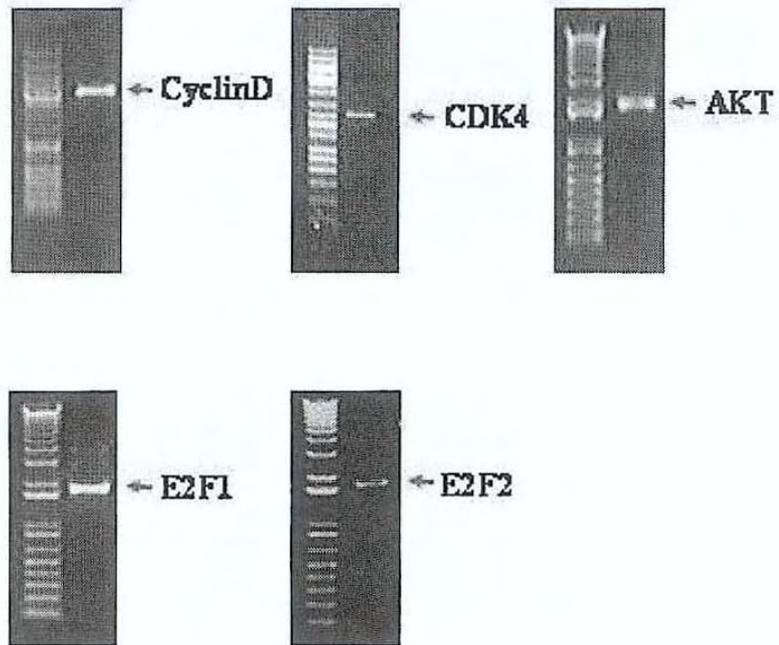


그림 11. 구축된 레트로바이러스-유전자 전이 발현벡터의 제한효소를 이용한 확인

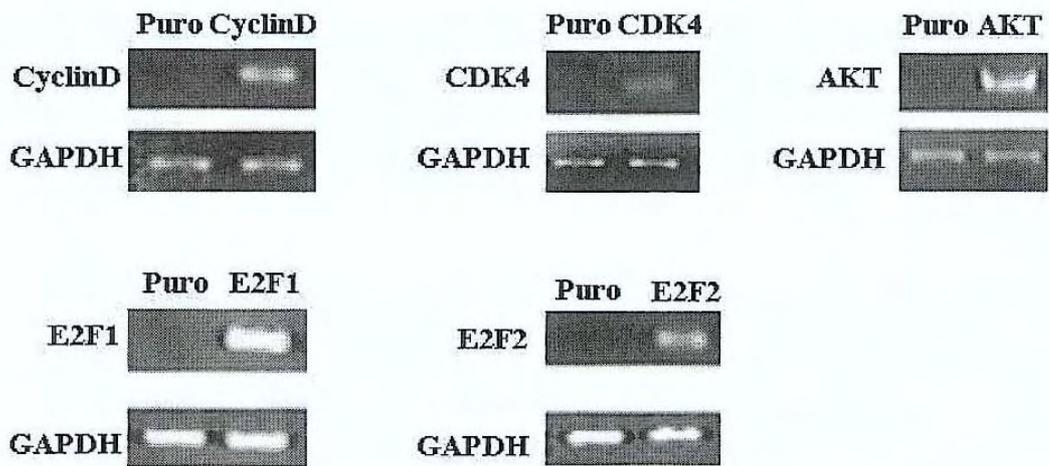


그림 12. 한우 태아 체세포에서 클로닝한 유전자들의 과발현확인

3. 한우 근육성장 및 분화관련 호르몬 및 성장조절제의 효능 규명 (제 2 세부과제)

가. 실험목적

- 1) 한우 근육발달 및 분화관련 성장조절제의 선발
- 2) 한우 초대배양 태아 체세포들을 이용한 성장조절제의 효능검정

나. 실험방법

- 1) 한우 근육 발달 및 분화 관련 호르몬 (GH, IGFs, IGFBP-3, thyroid hormone, steroid hormone)을 확보한다.
- 2) 한우 근육 발달 및 분화 관련 성장조절제 (transferrin, β -adrenergic agonist, chromium picorinate, vitamin A and C, IL-3, TNF- α , TZD)를 확보한다.
- 3) 이들 성장조절제 및 호르몬이 한우 초대배양 체세포의 성장·발달 및 분화에 미치는 영향을 세포생물학적방법 (세포증식속도 측정, 세포성장억제 측정, 세포분화율 측정)을 이용하여 조사한다.

다. 실험결과

- 1) 한우 근육발달 및 분화관련 성장조절제의 선발

본 실험에서는 성장 및 분화에 관련된 호르몬이 한우 초대배양 체세포의 성장 및 분화에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. 우선, 한우에서 분리된 세포를 배양하면서 안정적인 초대배양 체세포를 확립하였고 (그림 13.), 이 세포의 성장 및 분화를 조절하기 위한, 성장 및 분화관련 호르몬으로, 성장호르몬 (growth hormone), insulin-like growth factor I 및 II (IGF-I, II), IGFBP-3, thyroid hormone (TH) 및 steroid hormone (SH)등을 확보하였다.

- 2) 한우 초대배양 태아 체세포들을 이용한 성장조절제의 효능검정

확보된 성장관련 호르몬의 한우 초대배양 체세포에 미치는 성장 효과를 조사하기 위하여, GH, IGF-I, II, IGFBP-3, TH 및 SH등을 여러 농도로 처리한 후, 최적 농도를 정하였다 (표 5.). 확정된 최적 농도를 이용하여, 각각의 성장관련 호르몬들의 성장 조절 효과를 조사하였다.

대표적인 성장관련 호르몬이라 할 수 있는 성장호르몬 (GH)의 효과는 처리하지 않은 비교군에 비하여 2배 정도의 성장 촉진을 유도하였고, IGF-I, II, IGFBP-3 및 TH, SH등과 함께 처리한 경우에는, 2배 이상의 성장 촉진을 유도하였다 (그림 14.). IGF-I 및 II의 경우에는, 2배 정도의 성장 촉진을 유도하였으나, IGFBP-3와 함께 처리한 경우에는, 성장이 감소하는 것을 관찰 할 수 있었다 (그림 15.).

한우의 근육발달 및 분화와 관련된 후보 성장 조절제인 β -adrenergic agonist, IL-3 및 TNF- α 의 세포성장 증식 및 억제 효과를 위하여 다음의 그림과 같은 농도를 근육 전구세포에 처리하였다(그림 16, 그림 17.).

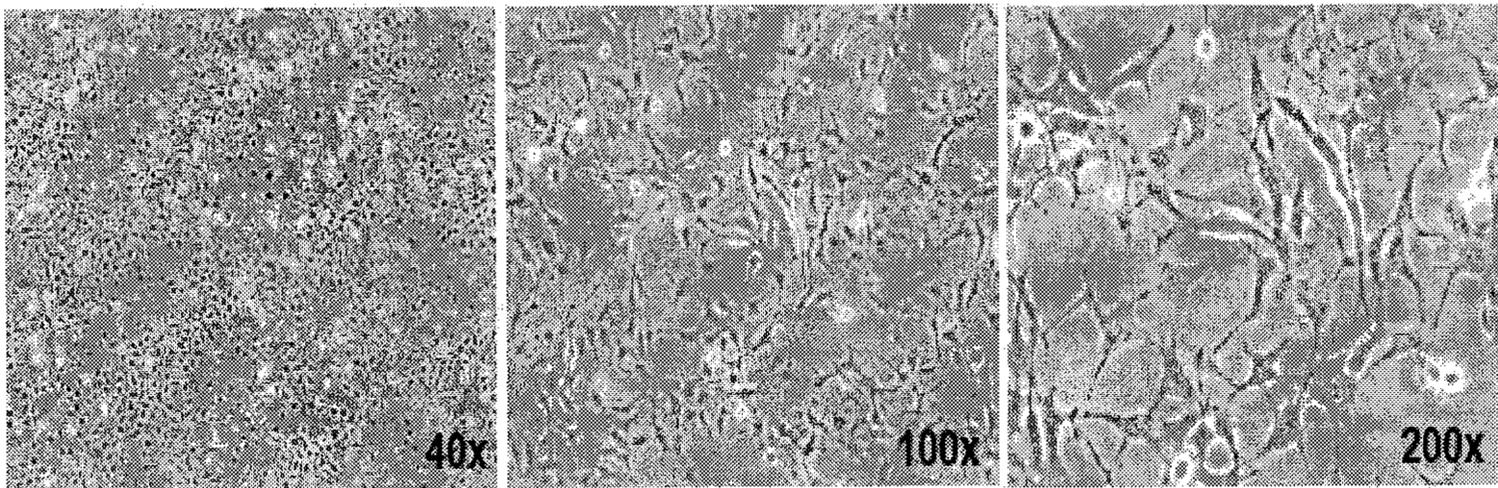


그림 13. 한우로부터 분리된 초대배양 체세포

표 5. 성장관련 호르몬들의 최적농도

호르몬	최적농도
GH	300 ng/ml
IGF-I	1 μ g/ml
IGF-II	1 μ g/ml
IGFBP-3	10 μ g/ml
TH	500 ng/ml
SH	500 ng/ml

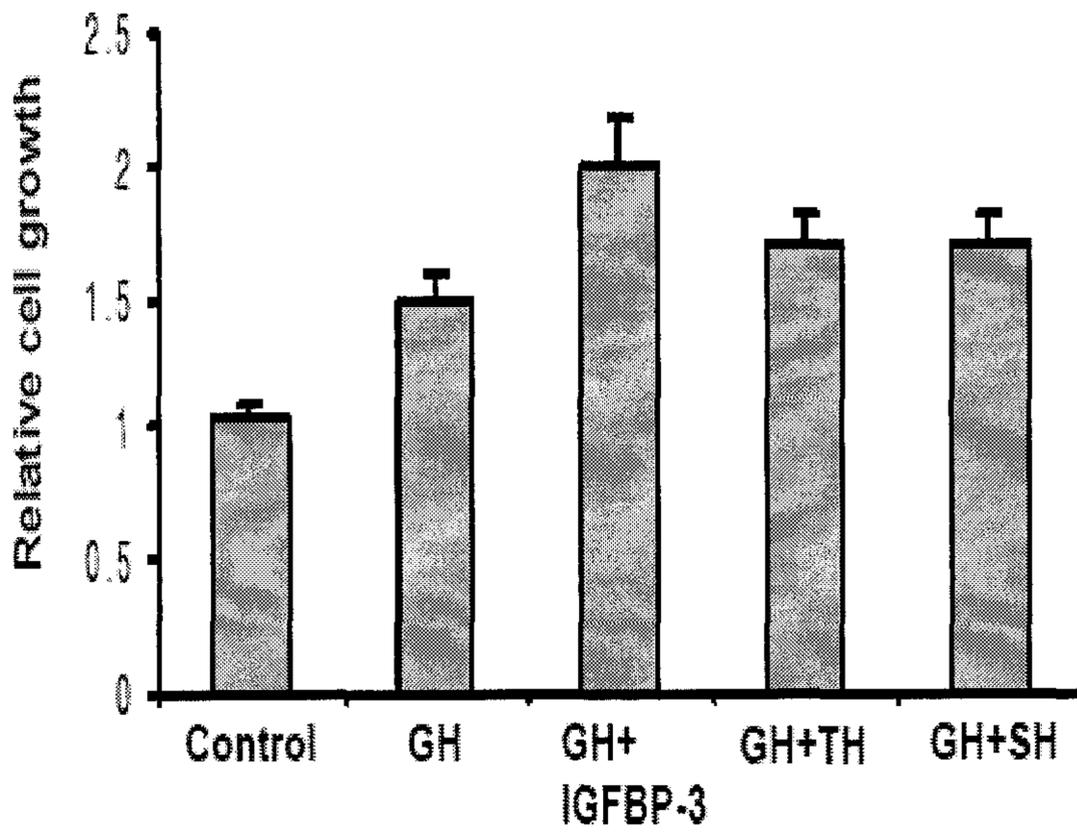
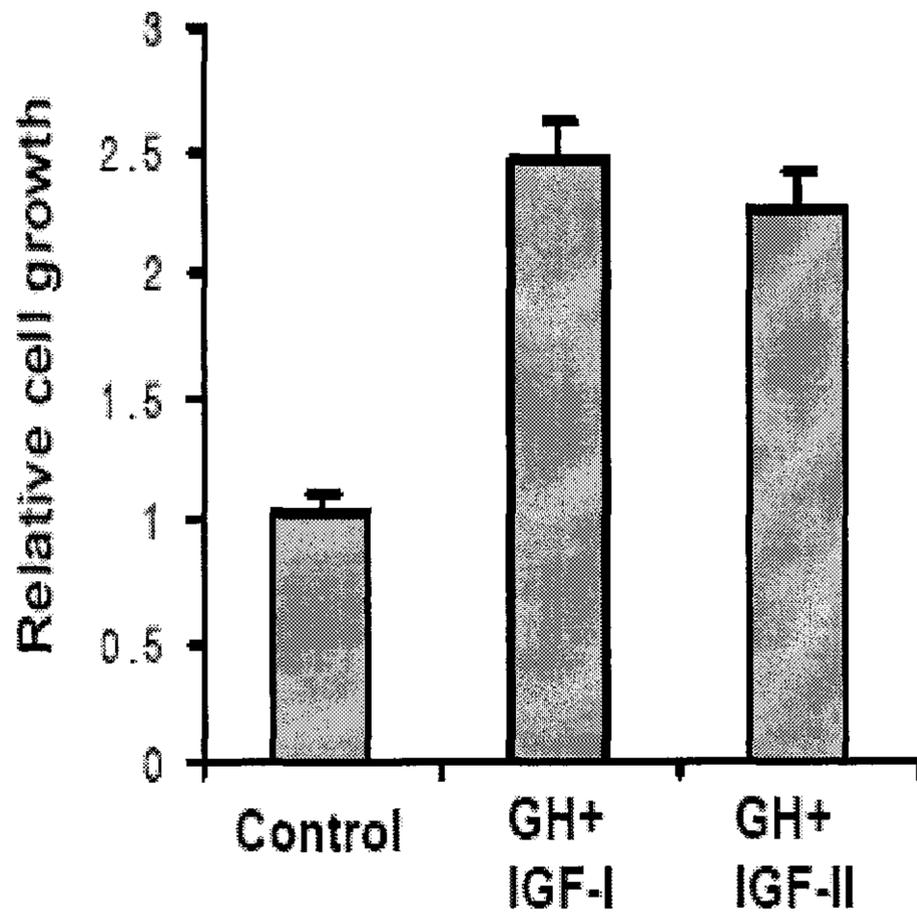


그림 14. 한우 초대배양 체세포에 미치는 성장관련 호르몬 의 효과

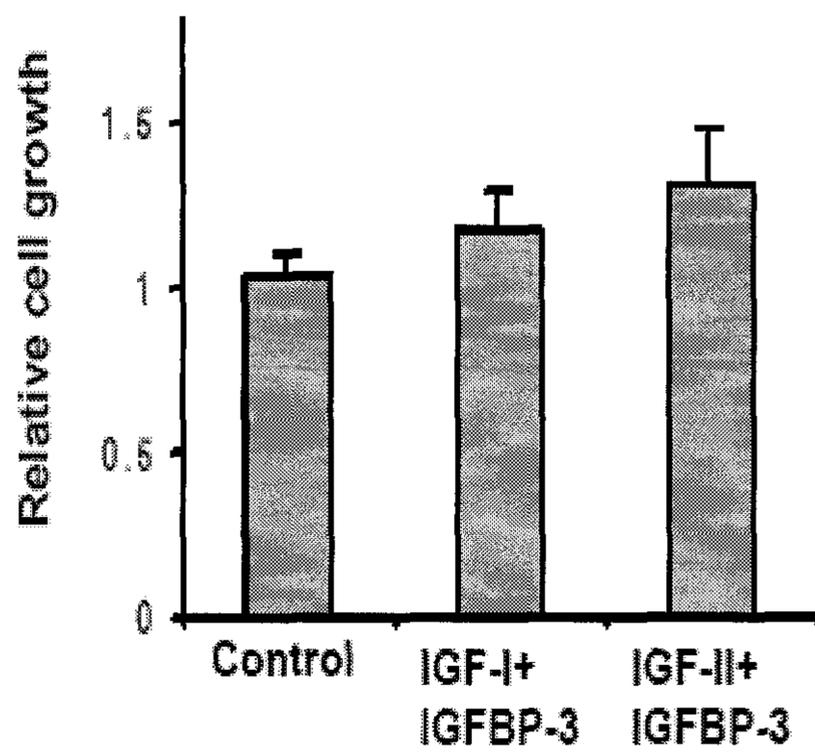
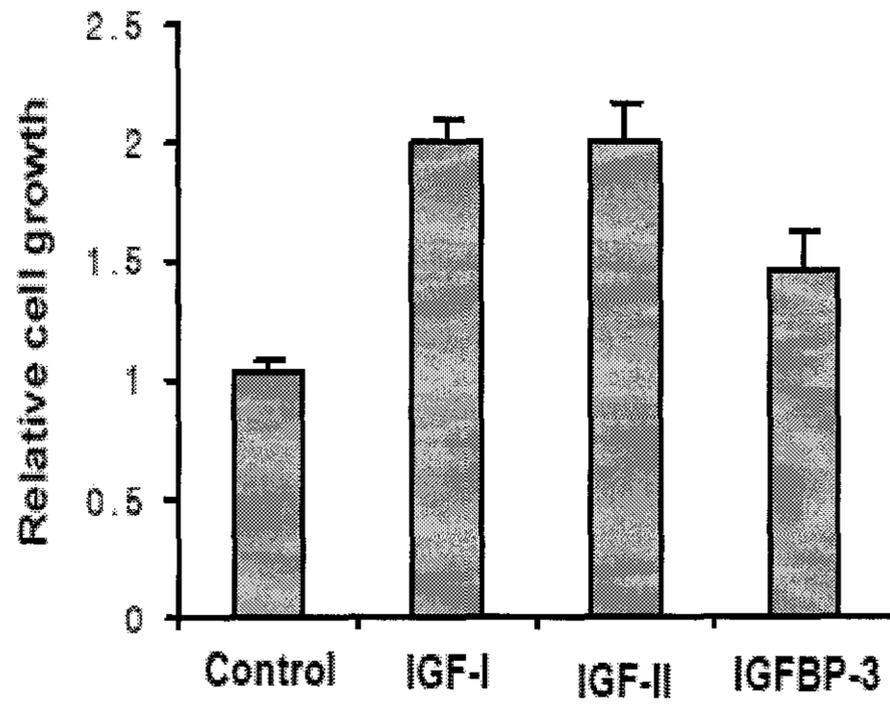


그림 15. 한우 초대배양 체세포에 미치는 성장관련 호르몬 (IGF-I, II 및 IGFBP-3)의 효과

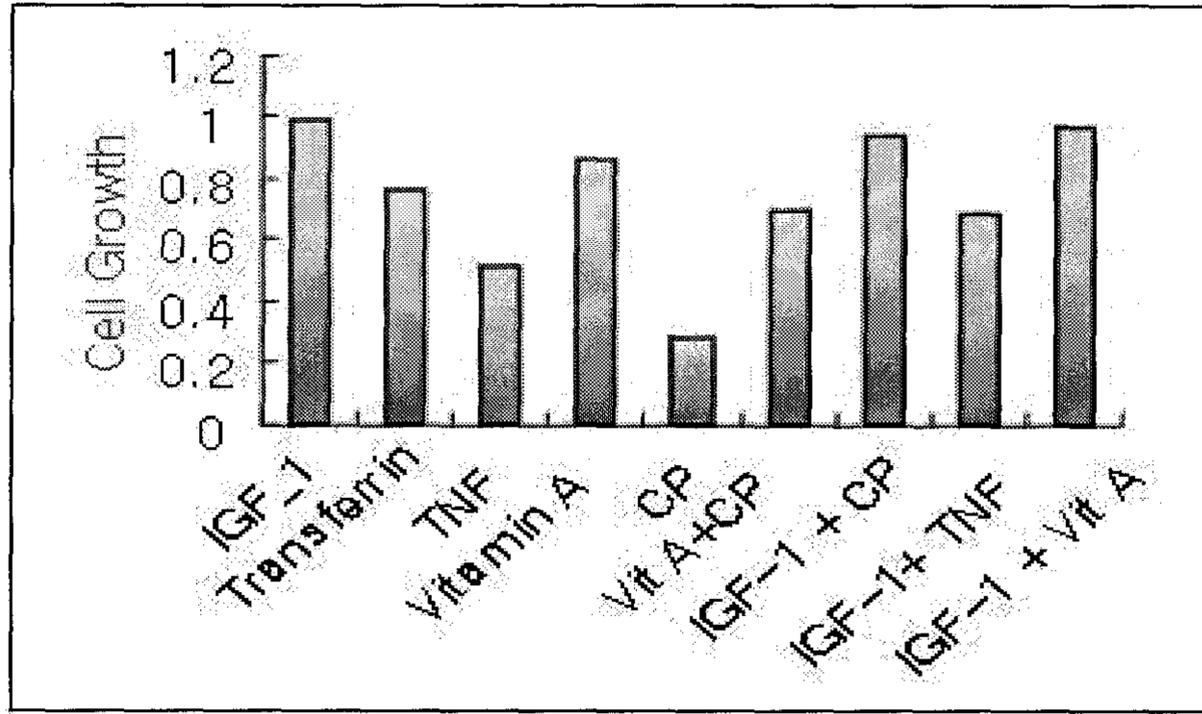


그림 16. 한우 초대배양 체세포에 미치는 분화관련 성장조절제 (IGF-I, Transferrin, TNF- α , vitamin A, CP)의 세포증식 및 억제 효과

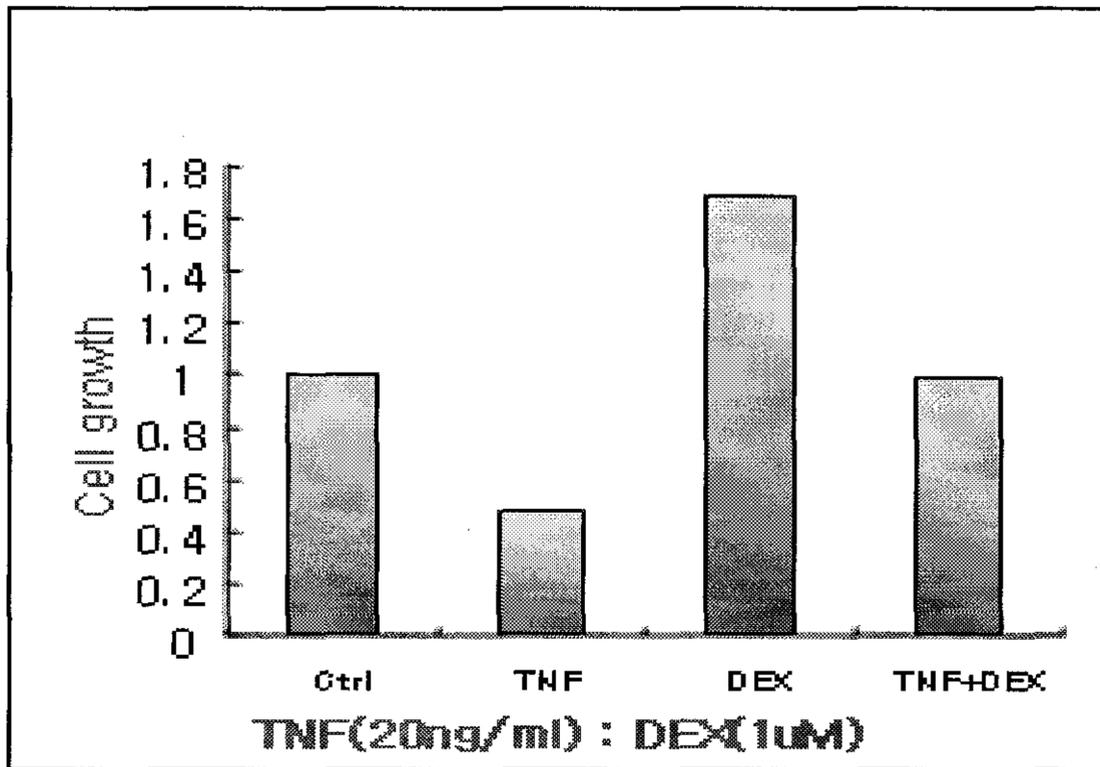
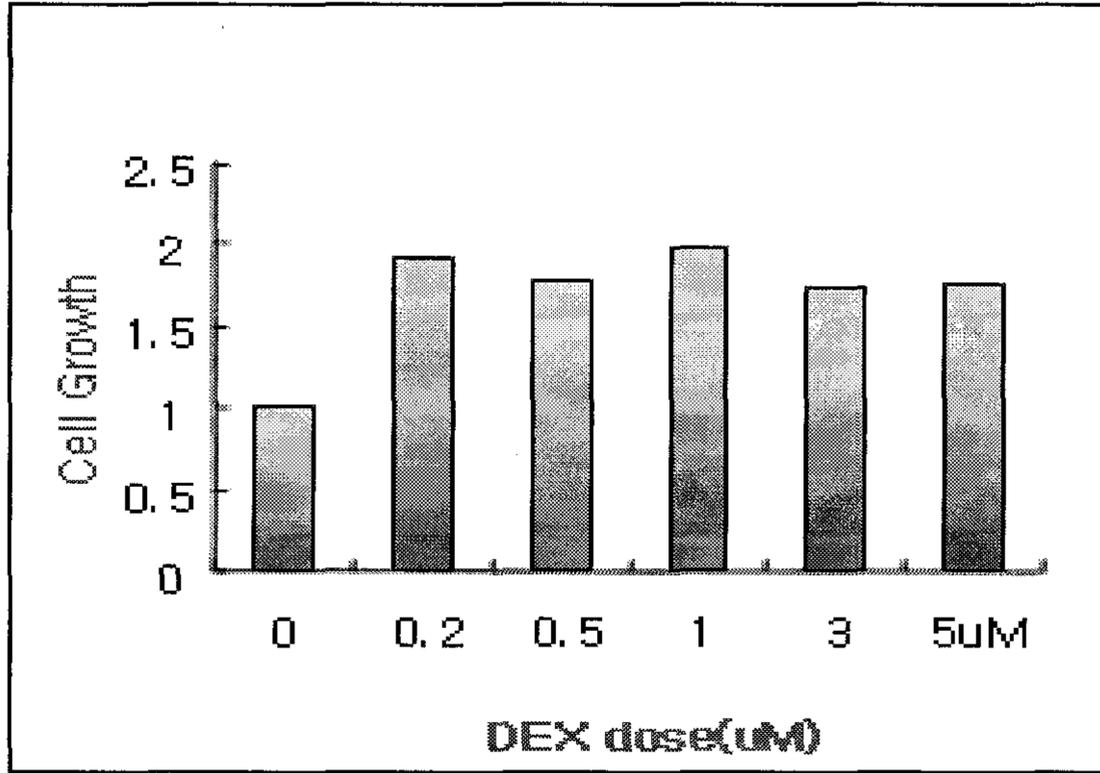


그림 17. 한우 초대배양 체세포에 미치는 분화관련 성장조절제 (Dexamethasone, TNF- α)의 세포증식 및 억제 효과

제 2 절 2차년도 연구개발수행 내용 및 결과

본 연구과제의 2차년도 연구개발의 목표와 내용은 표 6.과 같다.

표 6. 2차년도 연구개발 목표와 내용

연구개발 목표	연구개발 내용
<p>1. 한우 태아 체세포의 불멸화 유도</p> <p>3. 한우 태아 체세포주 확립에 관련된 유전자의 클로닝</p> <p>4. 한우 태아 체세포주 확립에 관련된 유전자 발현조절벡터의 구축</p> <p>5. 한우 태아 체세포주의 성장에 미치는 성장조절제의 효능규명</p> <p>6. 한우 태아 체세포주의 근육세포로의 분화에 미치는 성장조절제의 효능규명</p>	<p>1. 1차년도에 분리한 초대배양세포를 확립된 체세포주로 전변</p> <ul style="list-style-type: none"> - 세포생리적조절을 통한 자발적유도 - 세포분열촉진유전자의 과발현을 통한 유도 - 세포무한분열유도유전자의 과발현을 통한 유도 - 세포분열억제유전자의 발현억제에 의한 유도 <p>2. 한우 체세포주 확립에 관련된 유전인자의 클로닝 및 발현조절 벡터의 구축</p> <ul style="list-style-type: none"> - Telomerase 및 c-myc유전자의 클로닝 - p53DD유전자의 클로닝 - 레트로바이러스-유전자 전이 발현벡터구축 - RT-PCR 및 western blot방법을 이용하여 전이된 유전자의 발현확인 <p>3. 한우 근육발달 및 분화관련 성장조절제 및 호르몬이 한우 태아 체세포주의 성장·발달 및 분화에 미치는 영향을 세포생물학적방법을 이용하여 조사하고 근육성장·발달 및 분화 marker 유전자의 발현 양상확인</p> <ul style="list-style-type: none"> - 세포증식속도 측정 - 세포성장억제 측정 - 세포분화율 측정 - Actin, myosin, troponin T, actin-binding filament confilin유전자의 발현양상을 RT-PCR방법등을 이용하여 확인

1. 한우 태아 근육유래 체세포주의 개발 및 특성 규명 (주관연구 및 제 1 세부과제)

가. 실험목적

한우 태아 체세포의 불멸화 유도

나. 실험방법

- 1) 세포 생리적 조절을 통한 자발적 세포주 확립 유도 (Stress-induced immortalization)
- 2) 세포분열촉진 유전자 (Cell cycle positive regulators)의 과발현을 통한 세포주 확립 유도
- 3) 세포무한분열유도 유전자 (Telomerase and its regulators)의 과발현을 통한 세포주 확립 유도
- 4) 세포분열억제 유전자 (Cell cycle checkpoint regulators)의 발현 억제에 의한 세포주 확립 유도

다. 실험결과

- 1) 세포 생리적 조절을 통한 자발적 세포주 확립 유도 (Stress-induced immortalization)

Stress-induced immortalization (혹은 spontaneous immortalization)은 연속적인 계대 배양을 통하여 immortal cell을 구축하는 방법이다. 일반적으로 초대배양 세포는 계대를 통하여 분열이 활발한 세포들이 일련의 선발과정을 거쳐 안정한 세포주로 선발된다. 그림 18A.는 stress-induced immortal cell 사진이다. 이 세포

들의 형태를 보면 BEFS (spontaneous immortal BEF cells)는 한우 태아 체세포의 형태를 잘 보여주고 있으며 또 안정적인 성장을 하고 있었다. 그림 18B.는 10% 와 0.5% FBS에서 세포들의 성장속도를 비교한 그림이다. 세포들을 구분하기 위하여 초대배양세포인 Passage18의 한우 태아 체세포를 BEFE로 명명하였고 Spontaneous immortalization이 되었다고 생각하는 Passage78의 한우 태아 체세포는 BEFS로 명명했다. BEFS는 초대배양세포 BEFE에 비하여 10%FBS에서는 빠르게 성장하지만 0.5% FBS에서 BEFE와 비슷하게 느린 성장을 보여주면서 cell-cycle arrest에 도달한다는 것을 제시하고 있다. 이러한 결과는 향후 근육으로 한우 태아세포를 유도하는 실험에 있어서 긍정적인 효과라고 사료된다.

2) 세포분열촉진 유전자 (Cell cycle positive regulators)의 과발현을 통한 세포주 확립 유도

그림 19.는 세포분열 촉진 유전자인 cyclin D, cyclin-dependent kinase 4, E2F family 및 protein kinase B 또는 AKT 들을 과발현 시킨 후 세포들의 현미경사진이다. 사진에서 보면 세포들의 형태가 한우 태아 체세포의 형태와 다르다는 것을 알 수 있다. 이러한 형태적인 변화는 우리가 목표로 하는 근육세포로의 분화에 사용하기 적합하지 않으므로 향후 실험을 추진 않기로 결정했다.

3) 세포무한분열유도 유전자 (Telomerase and its regulators)의 과발현을 통한 세포주 확립 유도

유전자도입을 통하여 immortalization을 유도하는 방법 중에서 많이 사용하고 있는 유전자는 Telomerase이다. Telomerase는 염색체의 말단에 있는 telomere의 길이를 유지시켜주어 세포의 염색체를 안정화 시키는 작용을 한다. 그림 20A.는 telomerase를 과발현 시킨 BEFT의 사진이다. BEFT는 한우 태아 체세포의 형태를 잘 보여주고 있으며 또 안정적인 성장을 하고 있었다. 그림 20B.는 10% 와 0.5% FBS에서 세포들의 성장속도를 비교한 그림이다. BEFT는 초대배양세포 BEFE에 비하여 10%FBS에서는 빠르게 성장하지만 0.5% FBS에서 BEFE와 비슷하게 느린 성장을 보여주면서 cell-cycle arrest에 도달한다는 것을 제시하고 있다. 이러한 결과는 향후 근육으로 한우 태아세포를 유도하는 실험에 있어서 긍정적인 효과라고 사료된다.

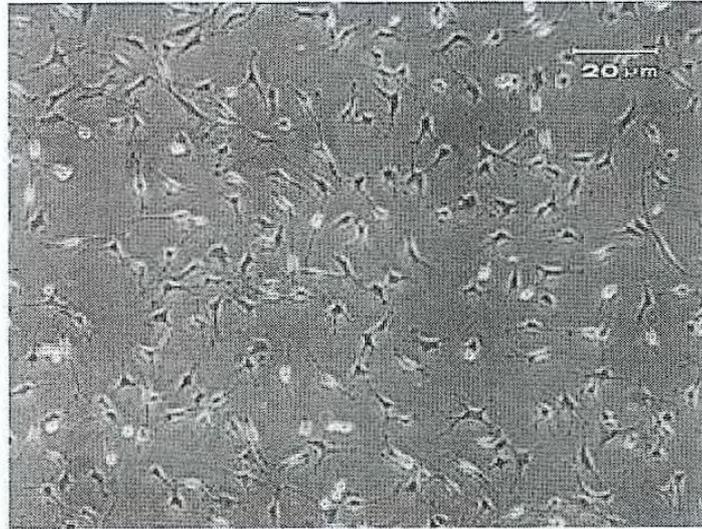
세포무한분열유도 유전자 telomerase의 발현조절인자인 c-myc을 과발현 시켜 유도된 불멸화 세포주(BEF-myc)의 사진은 그림 21A.에서 보여주고 있다. 그림 21B.는 DMEM 10%FBS와 0.5%FBS에서 c-myc유전자를 과발현시킨 불멸화 세

포주(BEF-myc)의 성장성적 이다. 대조구인 BEFS (spontaneous immortal cell line) 와 비교했을 때 10%의 FBS에서 아주 빠른 성장속도를 보여주고 있다. 0.5%FBS에서는 대조구인 BEFS 와 비교했을 때 growth arrest가 진행되지 않고 계속 빠른 성장속도를 보여주고 있었다. 근육세포로 분화되기 위하여서는 낮은 serum에서 growth arrest가 잘 이루어져야한다. BEF-myc의 성장특성은 근육세포의 분화에 적합하지 않은 것으로 사료되어 향후 실험을 추진 않기로 결정했다.

4) 세포분열억제 유전자 (Cell cycle checkpoint regulators)의 발현 억제에 의한 세포주 확립 유도

세포분열억제유전자p53의 기능을 억제할 수 있는 p53DD를 도입하여 불멸화시킨 불멸화 세포주(BEF-p53DD)의 사진은 그림 22A.에서 보여주고 있다. 그림 22B.는 DMEM 10%FBS와 0.5%FBS에서 p53DD유전자를 과발현시킨 불멸화 세포주(BEF-p53DD)의 성장성적 이다. 대조구인 BEFS (spontaneous immortal cell line) 와 비교했을 때 10%의 FBS와 0.5%의 FBS에서 유사한 성장성적을 보여주고 있다. 특히 0.5%FBS에서의 growth arrest는 근육세포로 분화될 수 있음을 시사해주고 있다.

A



B

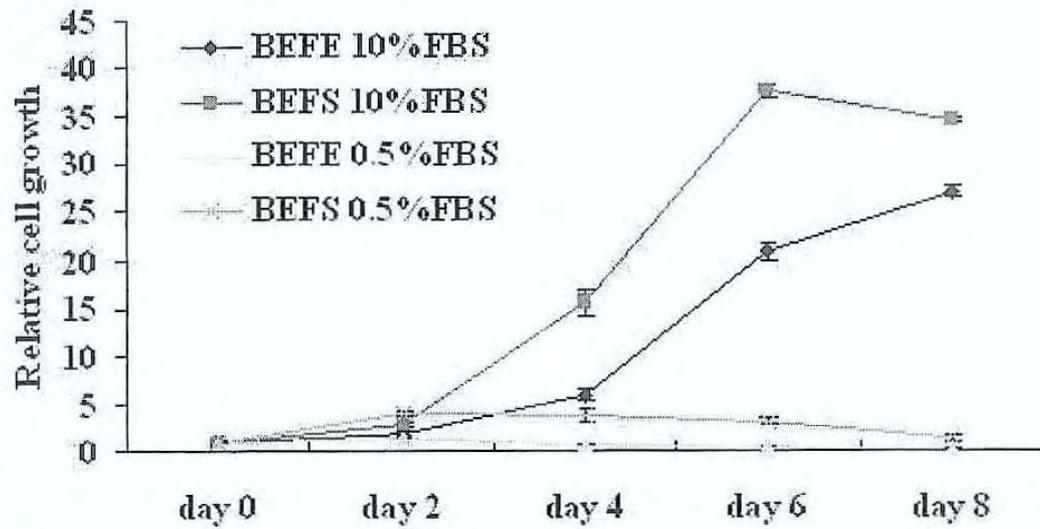


그림 18. 세포 생리적 조절을 통한 자발적 세포주의 사진 및 성장속도

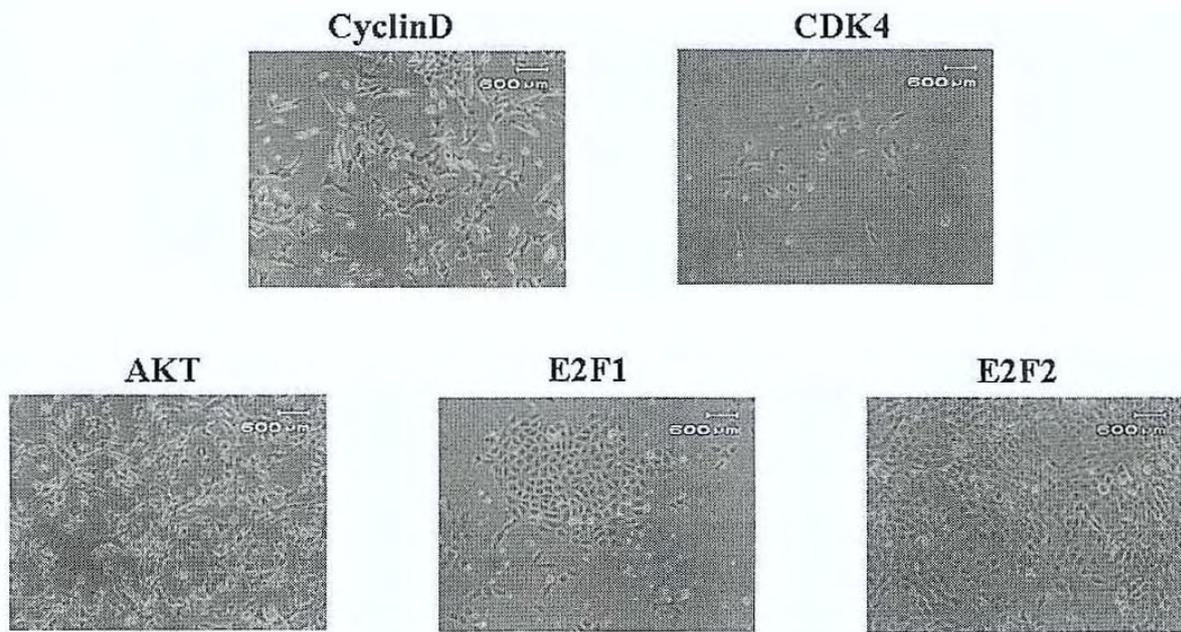
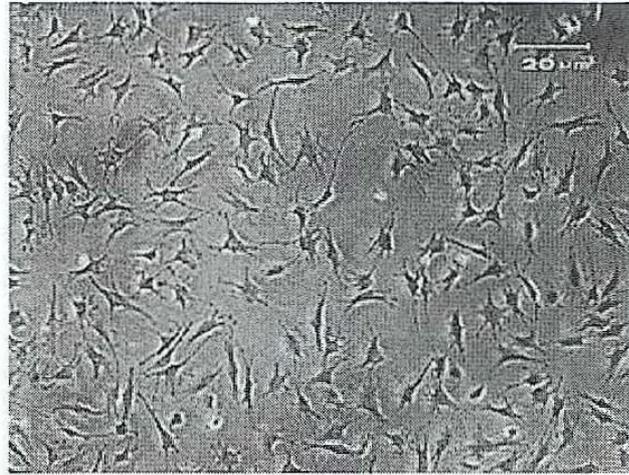


그림 19. 세포분열촉진 유전자 (Cell cycle positive regulators)들을 과발현한 한우 태아 체세포들의 사진

A



B

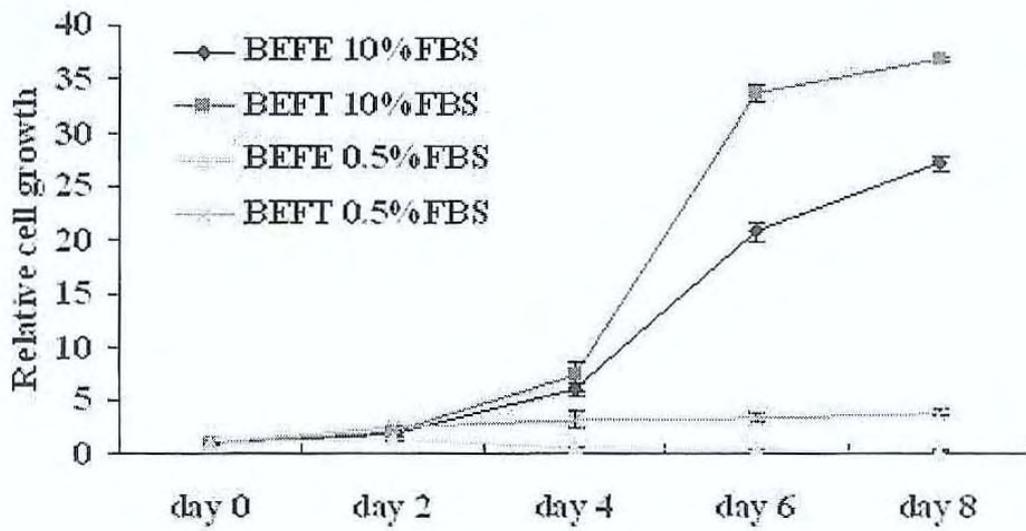
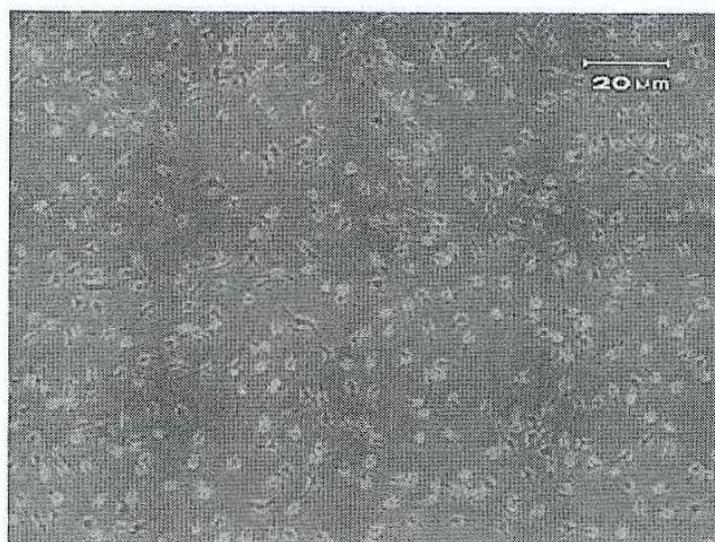


그림 20. Telomerase유전자 도입을 통한 불멸화 세포주의 사진 및 성장속도

A



B

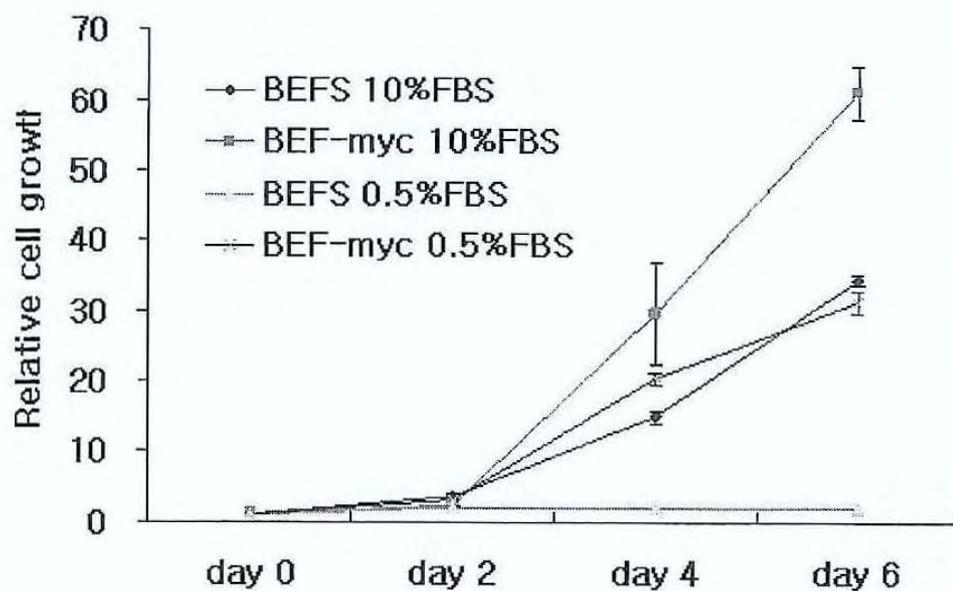
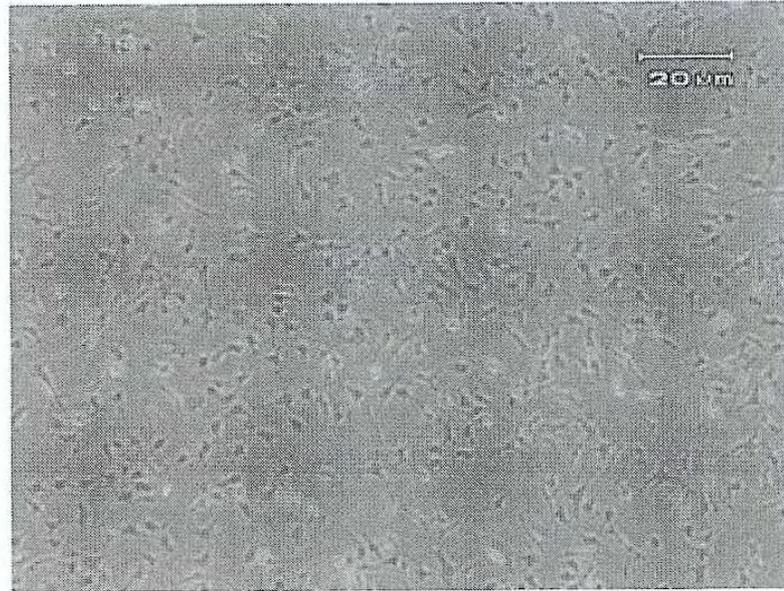


그림 21. C-myc 유전자 도입을 통한 불멸화 세포주의 사진 및 성장속도

A



B

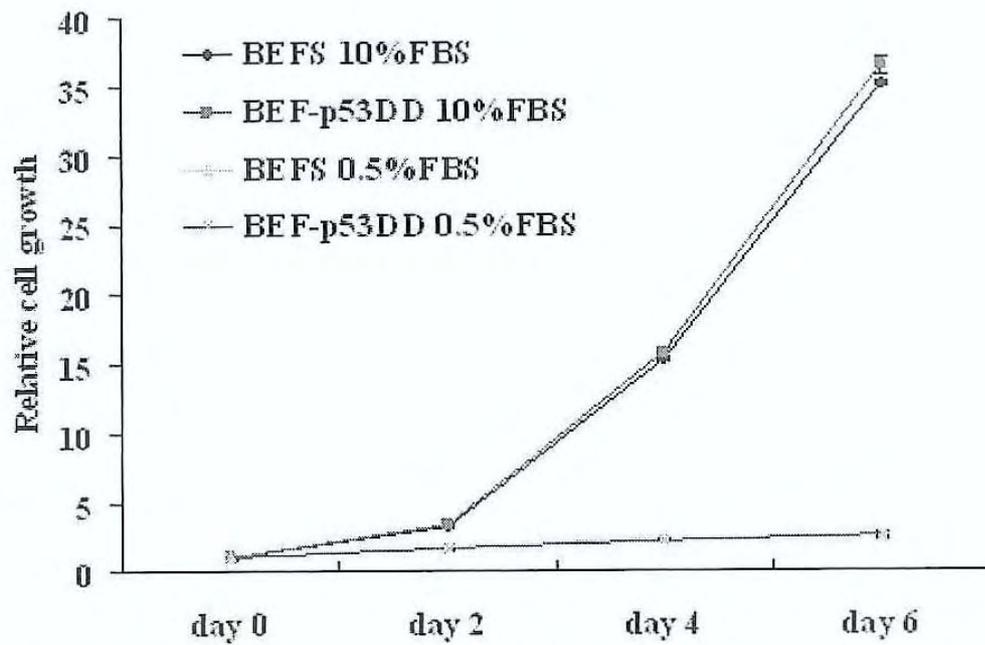


그림 22. p53DD유전자 도입을 통한 불멸화 세포주의 사진 및 성장속도 .

2. 한우 태아 체세포주 확립에 관련된 유전인자의 클로닝 및 발현조절 벡터의 구축 (제 1 협동과제)

가. 실험목적

- 1) 한우 태아 체세포주 확립에 관련된 유전자의 클로닝
- 2) 한우 태아 체세포주 확립에 관련된 유전자 발현조절벡터의 구축

나. 실험방법

- 1) 한우 태아 체세포주 확립에 관련된 유전자의 클로닝

체세포주 확립에 관련된 telomerase, c-myc 및 p53DD 유전자들을 GenBank에 보고된 sequence를 바탕으로 하여 RT-PCR을 통하여 클로닝한다.

- 2) 한우 태아 체세포주 확립에 관련된 유전자 발현조절벡터의 구축

클로닝 된 유전자들은 TA cloning 과 제한효소 cutting을 통하여 레트로바이러스-유전자 전이 발현벡터에 삽입한다.

- 3) 한우 태아 체세포주 확립에 관련된 유전자의 과발현 확인

Telomerase, c-myc 및 p53DD들의 과발현은 RT-PCR을 통하여 확인한다.

나. 실험결과

- 1) 세포무한분열유도 유전자의 클로닝

가) Telomerase 유전자 클로닝

(1) 유전자 클로닝

그림 23.은 세포무한분열유도 유전자 telomerase RT-PCR을 통하여 클로닝한 결과이다. 유전자에 해당하는 NCBI GenBank ID와 본 실험에서 클로닝한 유전자의 크기를 표 7.에 요약하였다.

(2) 레트로바이러스-유전자 전이 발현벡터구축

RT-PCR을 통하여 얻은 PCR product들은 TA-cloning을 거쳐 sequencing했다. sequencing 결과를 Blast search를 통해 각각의 sequence를 확인했다. 그림 24.은 Cloning한 각각의 불멸화유도 유전자를 레트로바이러스 벡터시스템인 pBabe vector에 sub-cloning하고 구축된 vector를 제한효소 절단 후 전기영동을 통해 최종 확인한 결과이다.

(3) 유전자 과발현확인

위에서 구축한 레트로바이러스 발현벡터를 한우 태아 체세포에 retroviral system을 이용한 transduction을 실시하고 그 발현을 RT-PCR을 통하여 확인했다. 클로닝한 Telomerase의 발현을 확인한 결과는 그림 25.에서 보여주는 바와 같다. 그림에서 Puro는 vector control이다. Western blotting 및 RT-PCR을 통하여 transduction을 통해 한우 태아체세포에 도입한 Telomerase가 안정적으로 발현이 유지됨을 확인하였다.

나) C-myc유전자 클로닝

(1) 유전자 클로닝

그림 26.는 세포무한분열유도 유전자 telomerase의 발현조절인자인 c-myc유전자를 RT-PCR을 통하여 클로닝한 결과이다. 유전자에 해당하는 NCBI GenBank ID와 본 실험에서 클로닝한 유전자의 크기를 표 7.에 요약하였다.

(2) 레트로바이러스-유전자 전이 발현벡터구축

RT-PCR을 통하여 얻은 PCR product들은 TA-cloning을 거쳐 sequencing했

다. sequencing 결과를 Blast search를 통해 각각의 sequence를 확인했다. 그림 27.은 Cloning한 각각의 불멸화유도 유전자를 레트로바이러스 벡터시스템인 pBabe vector에 sub-cloning하고 구축된 vector를 제한효소 절단 후 전기영동을 통해 최종 확인한 결과이다.

(3) 유전자 과발현확인

위에서 구축한 레트로바이러스 발현벡터를 한우 태아 체세포에 retroviral system을 이용한 transduction을 실시하고 그 발현을 RT-PCR을 통하여 확인했다. 클로닝한 c-myc의 발현을 확인한 결과는 그림 28.에서 보여주는 바와 같다. 그림에서 Puro는 vector control이다. Western blotting을 통하여 transduction을 통해 한우 태아체세포에 도입한 c-myc이 안정적으로 발현이 유지됨을 확인하였다.

2) 세포분열억제 유전자의 클로닝

가) p53DD유전자 클로닝

(1) 유전자 클로닝

그림 29.는 p53DD유전자를 RT-PCR을 통하여 클로닝한 결과이다. 유전자에 해당하는 NCBI GenBank ID와 본 실험에서 클로닝한 유전자의 크기를 표 7.에 요약하였다.

(2) 레트로바이러스-유전자 전이 발현벡터구축

RT-PCR을 통하여 얻은 PCR product들은 TA-cloning을 거쳐 sequencing했다. sequencing 결과를 Blast search를 통해 각각의 sequence를 확인했다. 그림 30.은 Cloning한 각각의 불멸화유도 유전자를 레트로바이러스 벡터시스템인 pBabe vector에 sub-cloning하고 구축된 vector를 제한효소 절단 후 전기영동을 통해 최종 확인한 결과이다.

(3) 유전자 과발현확인

위에서 구축한 레트로바이러스 발현벡터를 한우 태아 체세포에 retroviral

system을 이용한 transduction을 실시하고 그 발현을 RT-PCR을 통하여 확인했다. 클로닝한 p53DD의 발현을 확인한 결과는 그림 31.에서 보여주는 바와 같다. 그림에서 Puro는 vector control이다. Western blotting을 통하여 transduction을 통해 한우 태아체세포에 도입한 p53DD가 안정적으로 발현이 유지됨을 확인하였다.

표 7. 클로닝한 유전자의 sequencing결과와 일치한 GenBank ID와 크기

Gene name	GenBank ID	Size (bp)
telomerase	AH007669	3400
c-myc	NM-010849	1464
p53DD	NM-000546	415

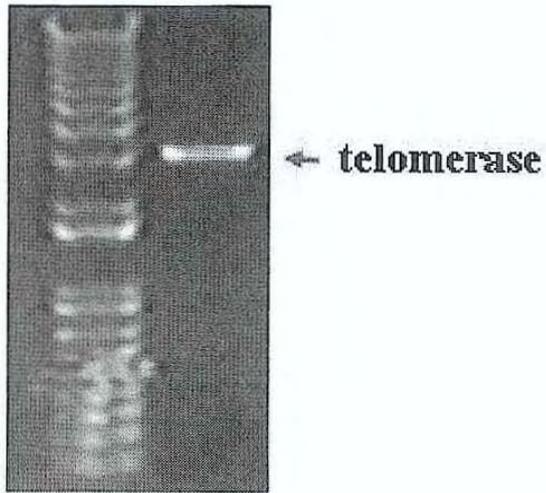


그림 23. Telomerase 유전자 클로닝을 위한 RT-PCR 결과

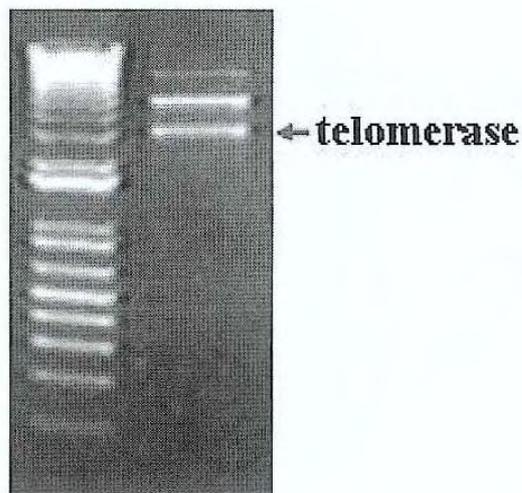


그림 24. 구축된 레트로바이러스-유전자 전이 발현벡터의 제한효소를 이용한 확인

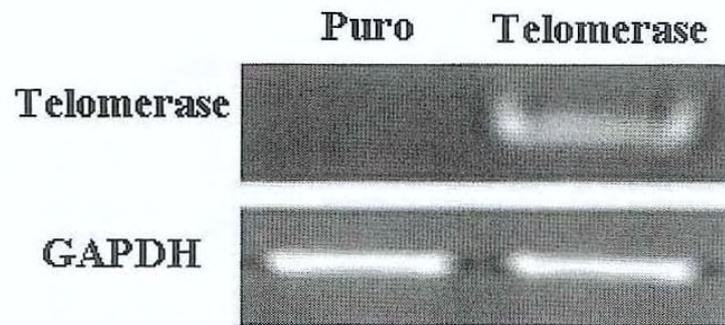


그림 25. 한우 태아 체세포에서 클로닝한 유전자들의 과발현확인

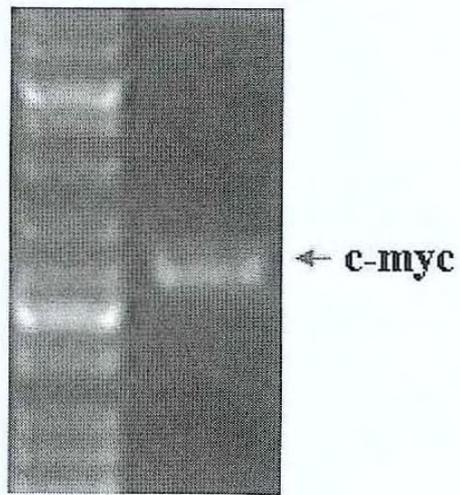


그림 26. C-myc 유전자 클로닝을 위한 RT-PCR 결과

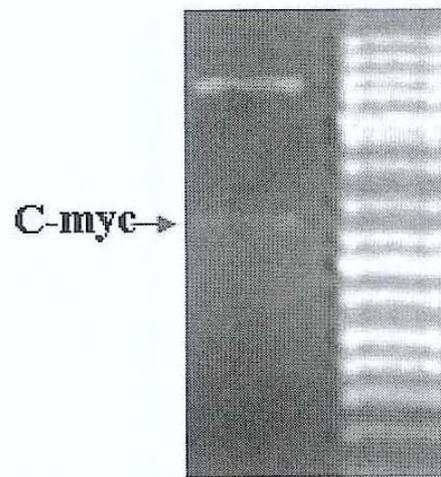


그림 27. 구축된 레트로바이러스-유전자 전이 발현백터의 제한효소를 이용한 확인

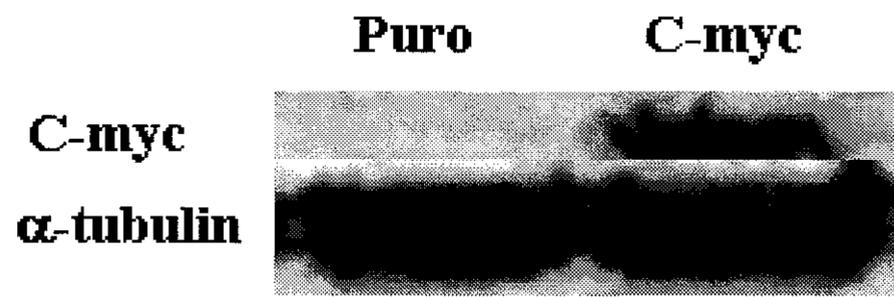


그림 28. 한우 태아 체세포에서 클로닝한 유전자들의 과발현확인

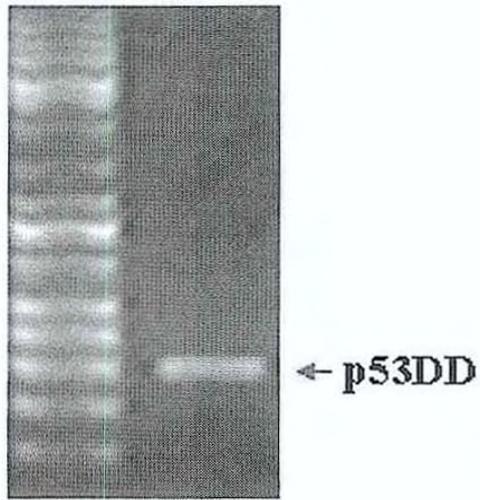


그림 29. p53DD유전자 클로닝을 위한 RT-PCR 결과

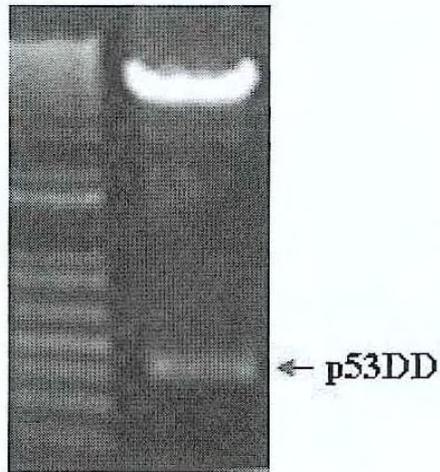


그림 30. 구축된 레트로바이러스-유전자 전이 발현백터의 제한효소를 이용한 확인



그림 31. 한우 태아 체세포에서 클로닝한 유전자들의 과발현확인

3. 한우 근육성장 및 분화관련 호르몬 및 성장조절제의 효능 규명 (제 2 세부과제)

가. 실험목적

- 1) 한우 태아 체세포주의 성장에 미치는 성장조절제의 효능규명
- 2) 한우 태아 체세포주의 근육세포로의 분화에 미치는 성장조절제의 효능규명

나. 실험방법

- 1) 세포증식속도 측정
- 2) 세포성장억제 측정
- 3) 세포분화율 측정
- 4) Actin, myosin, troponin T, actin-binding filament conifilin 유전자의 발현양상을 RT-PCR방법등을 이용하여 확인

다. 실험결과

1) EGCG가 한우 태아 체세포주에 미치는 영향

녹차의 주성분인 EGCG는 지방세포의 성장 및 분화에 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실험에서는 녹차가 체세포의 성장에 미치는 효과를 알아보기 위해 제1세부과제에서 확립한 세포주를 활용하여 EGCG의 효과를 세포의 성장과 관련하여 실험을 수행하였다. 그림 32. 및 그림 33.에서 보여주고 있듯이 EGCG가 태아 유래 체세포의 성장을 억제하는 것으로 나타나고 있다.

그림 34.을 통하여 EGCG가 세포의 성장에 미치는 효과는 MEK/ERK pathway를 통해

세포의 성장을 억제하는 것으로 보여진다.

위의 그림 35. 및 36.을 통하여 EGCG가 MEK/ERK pathway를 통한 세포의 성장을 억제하는 것으로 보이지만 MEK/ERP pathway 혼자로는 세포의 성장 억제 효과가 뚜렷이 나타나지 않음을 알 수 있다. 이러한 결과는 MEK/ERK pathway 이외의 다른 경로를 통해 EGCG가 세포의 성장을 억제하고 있음을 시사해 준다. 따라서 MEK/ERK pathway 이외에도 EGCG는 AKT pathway를 억제하고 있다는 선행 연구 결과를 통해 EGCG와 AKT pathway inhibitor와의 성장능력 억제 실험을 수행하였다 (그림 37. 및 그림 38.).

위의 그림 39.에서와 같이 체세포를 3일간 정해진 농도에서 EGCG를 처리한 후 AKT의 활성화를 western blot을 통해 확인하였다. AKT의 활성도는 EGCG의 농도에 따라 비활성화 되는 것을 알 수 있다. 따라서 이러한 결과를 토대로 AKT pathway inhibitor와 EGCG와의 AKT 비활성화 및 이를 통해 체세포의 성장에 미치는 영향을 그림 40. 및 41.에서와 같이 조사하였다. 아래의 결과와 같이 EGCG는 AKT inhibitor 동등하게 AKT를 비활성화 시킴으로써 체세포의 성장을 억제하는 것으로 보여주고 있다.

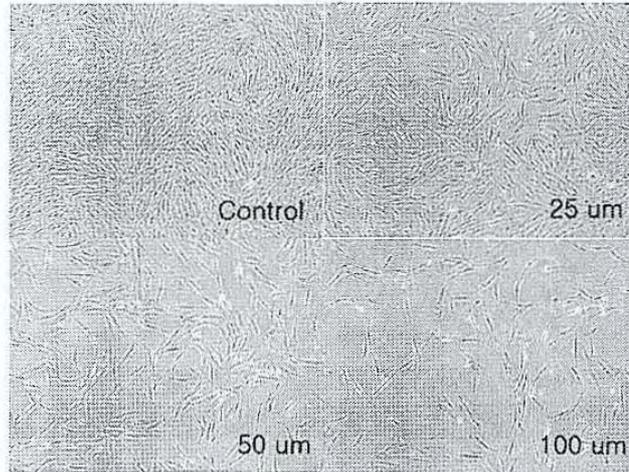
이러한 결과를 토대로 체세포의 성장과 catenin pathway와의 연관 관계를 알아보기 위해 위의 실험과 동일한 조건에서 catenin과 GSK의 활성도를 western blot을 통해 확인하였다. Catenin과 GSK의 활성도는 EGCG의 농도에 의존하여 활성도가 억제되는 것을 보여주고 있다.

또한 이러한 성장에 미치는 효과는 EGCG가 위의 표에서 나타내고 있는 pathway와 별도로 p53 pathway는 억제하지 않지만 pRb의 인산화를 억제함과 동시에 pRb의 단백질 양을 증가시킴으로써 pRb pathway의 활성화를 통해 세포의 성장을 억제하고 있음을 나타내고 있다.

이러한 결과는 위의 그림에서와 같이 체세포의 성장을 억제하는 효과 뿐 아니라 체세포의 이동에도 영향을 미치는지를 알아보기 위해 세포의 이동 실험을 아래에서와 같이 수행하였다.

그림 42.에서와 같이 EGCG는 AKT- MEK/ERK-pathway inhibitors와 동일하게 세포의 이동을 억제하는 것을 보여주고 있다. 이처럼 녹차의 주성분인 EGCG는 체세포의 성장을 억제하는 것을 알 수 있다.

A



B

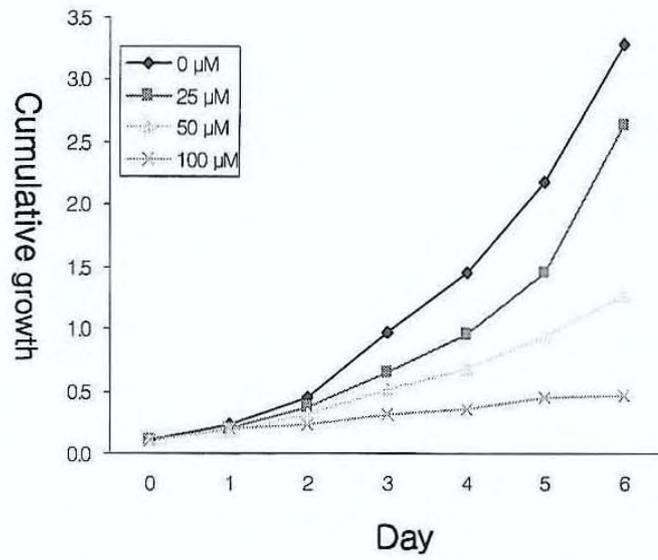


그림 32. EGCG가 세포의 성장에 미치는 효과

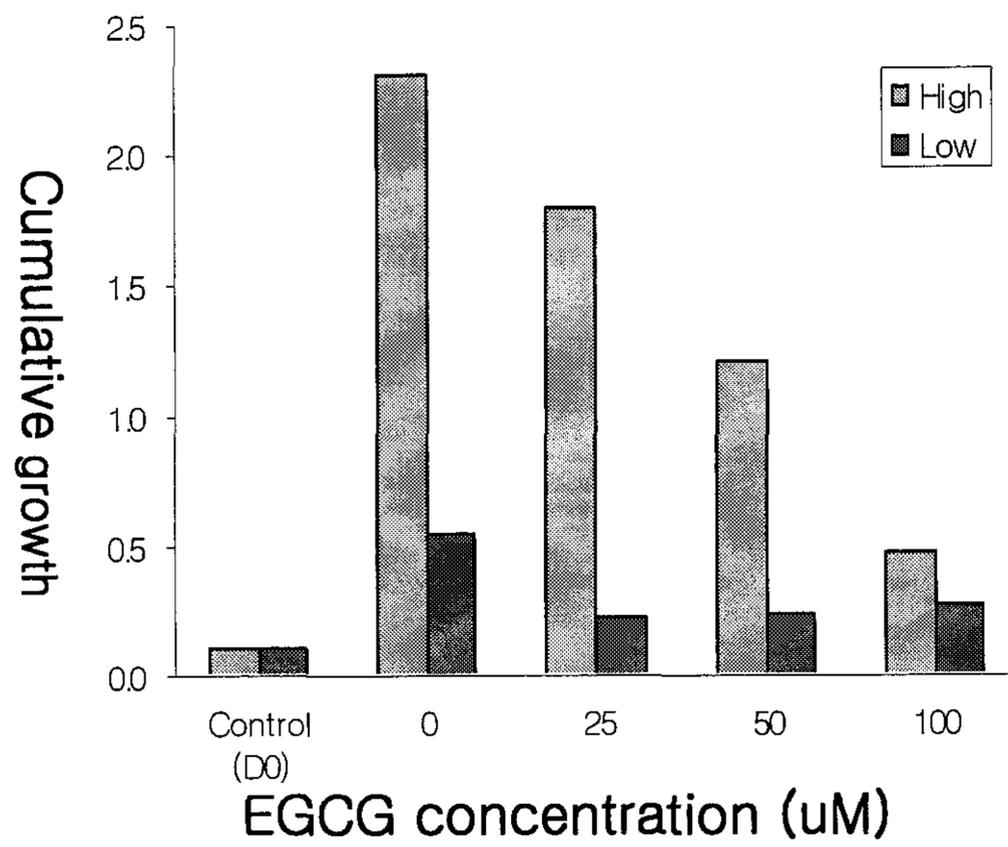


그림 33. 3일간의 세포성장을 통한 EGCG가 체세포의 성장에 미치는 효과

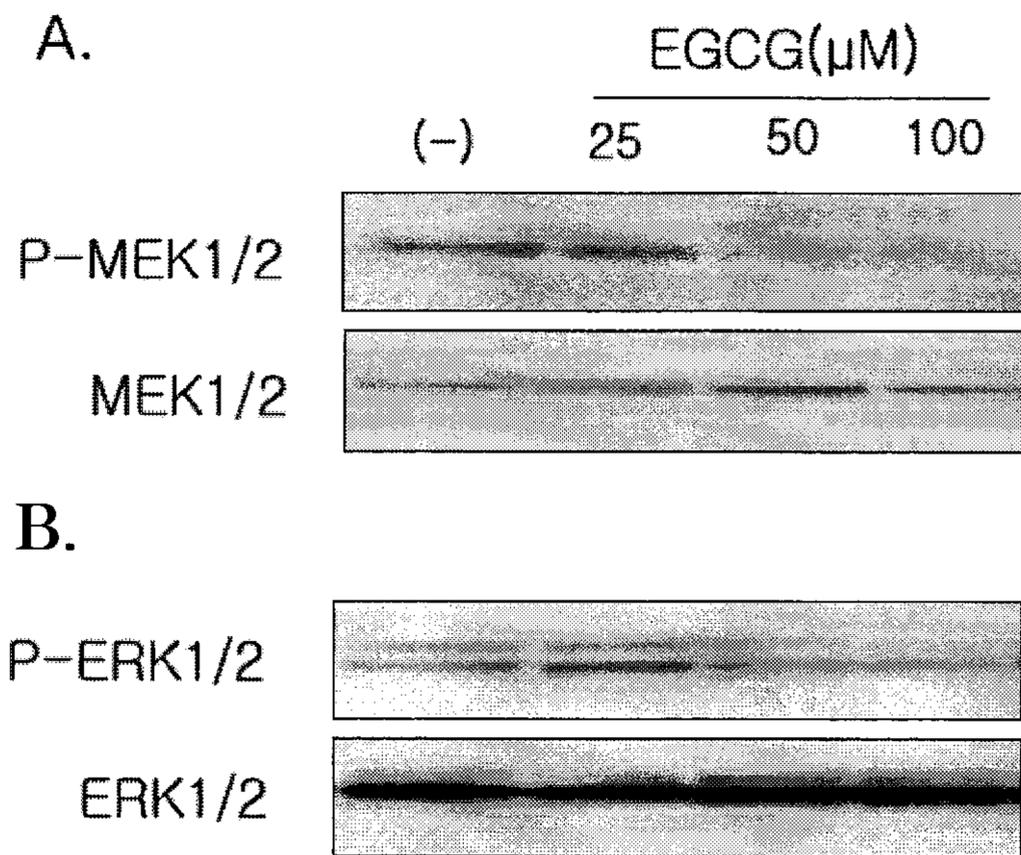


그림 34. EGCG가 MEK-ERK pathway를 통해 세포의 성장을 억제하는 효과

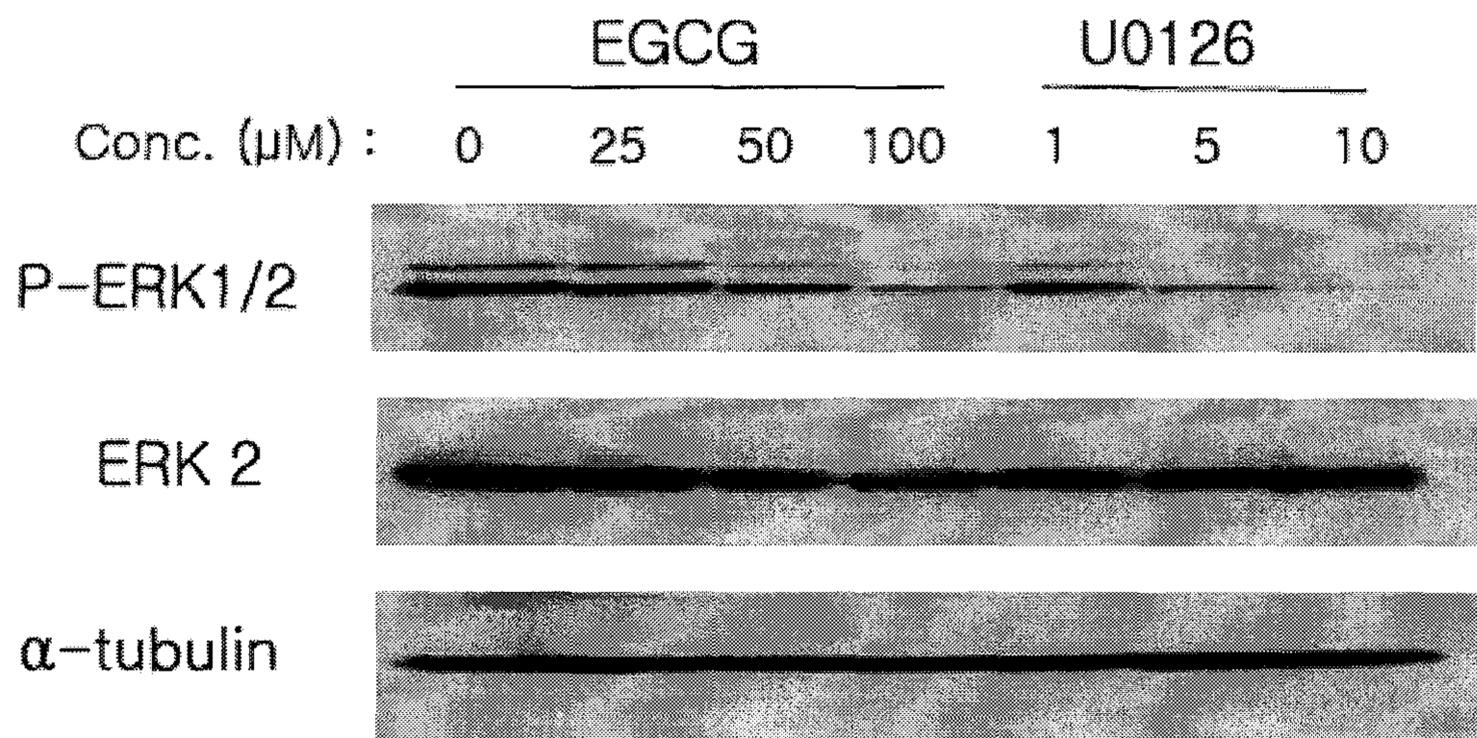


그림 35. EGCG와 MEK-ERK pathway inhibitor와의 ERK 인산화 억제 작용의 비교

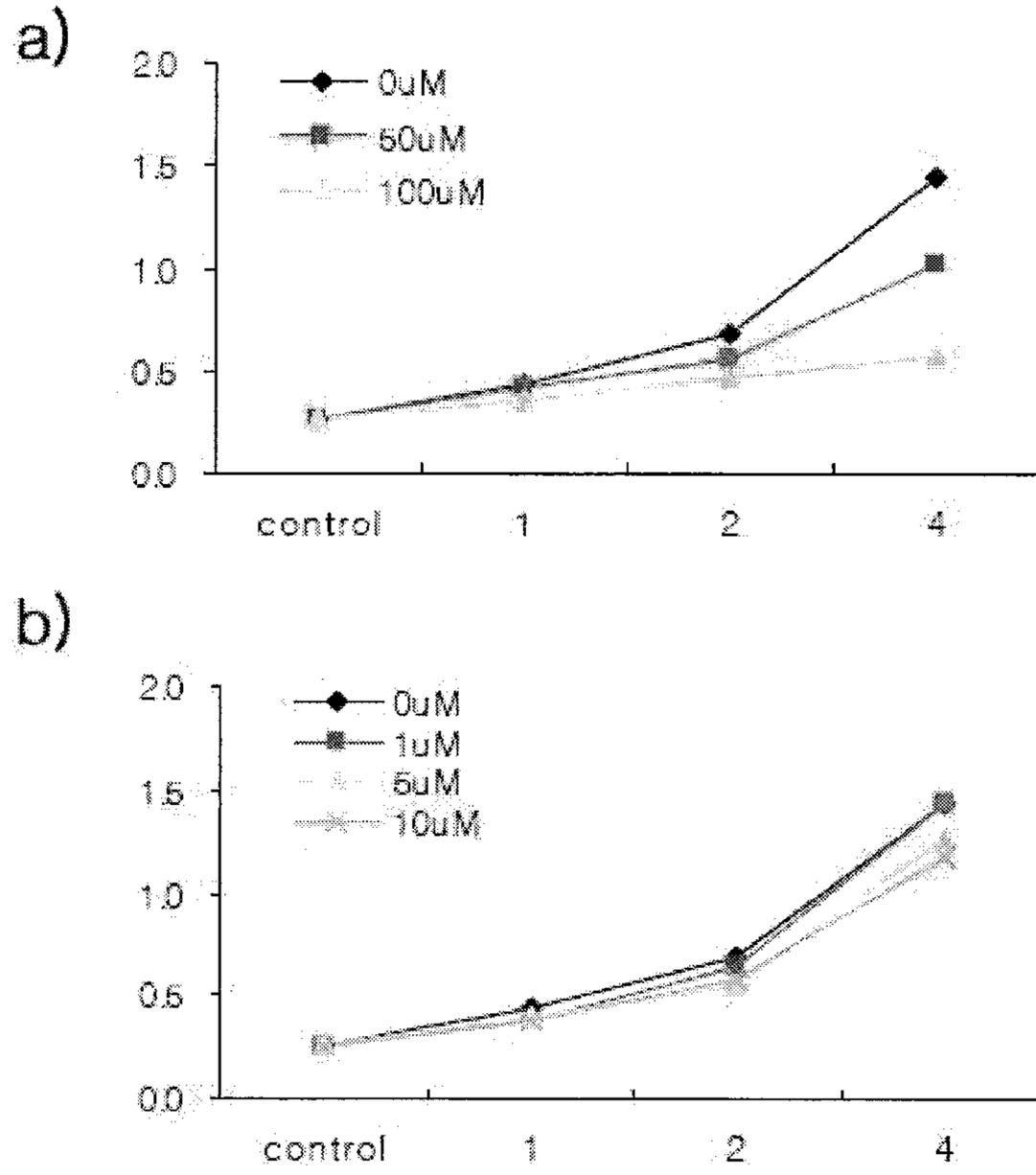


그림 36. EGCG (a)와 MEK-ERK pathway inhibitor(b) 처리에 의한 세포의 성장 억제 실험

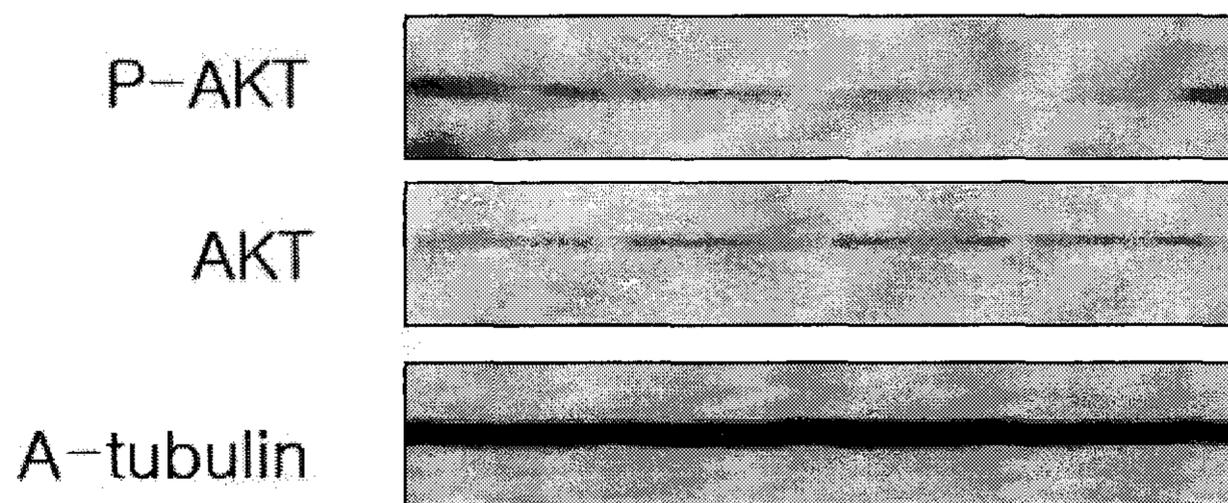


그림 37. EGCG가 AKT pathway를 통해 세포의 성장을 억제하는 효과

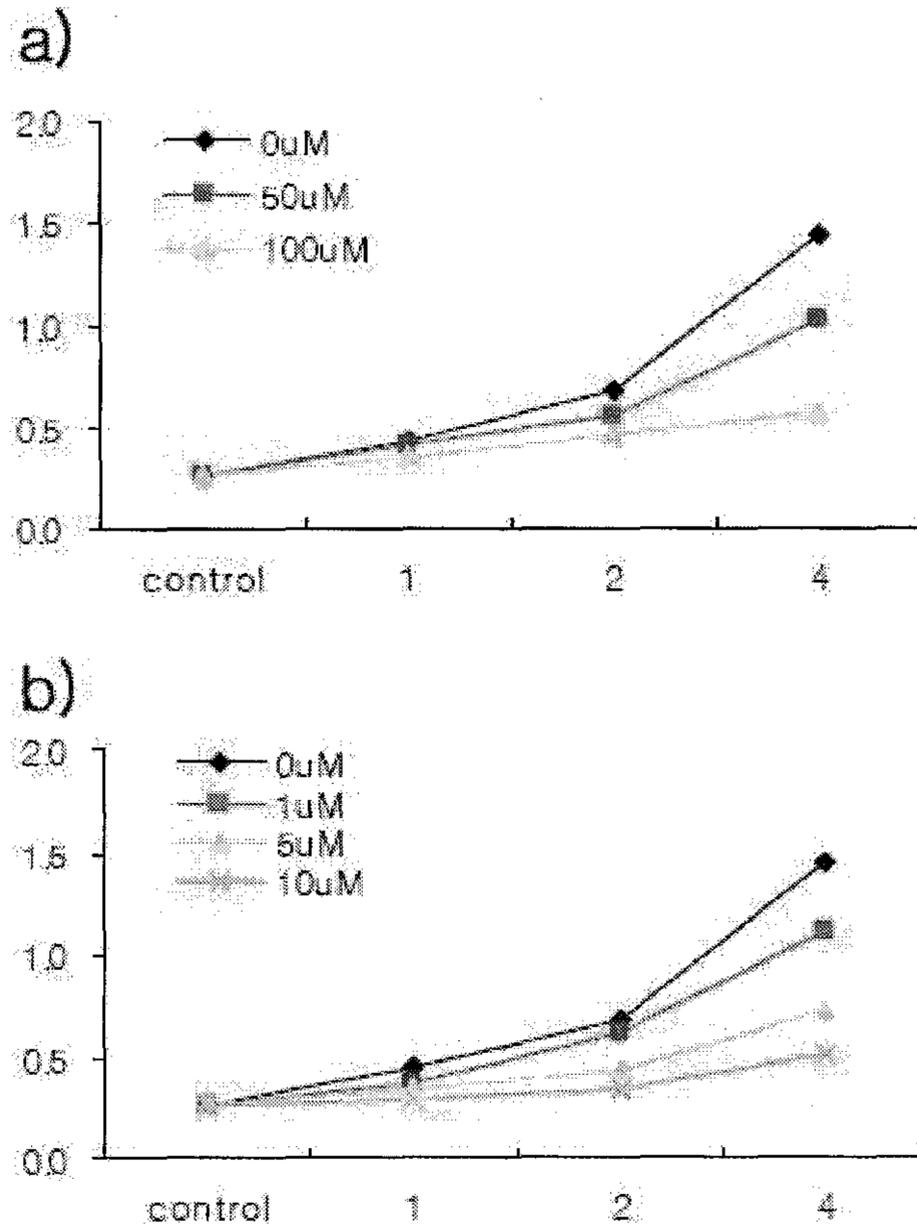


그림 38. EGCG (a)와 AKT pathway inhibitor(b) 처리에 의한 세포의 성장 억제 실험

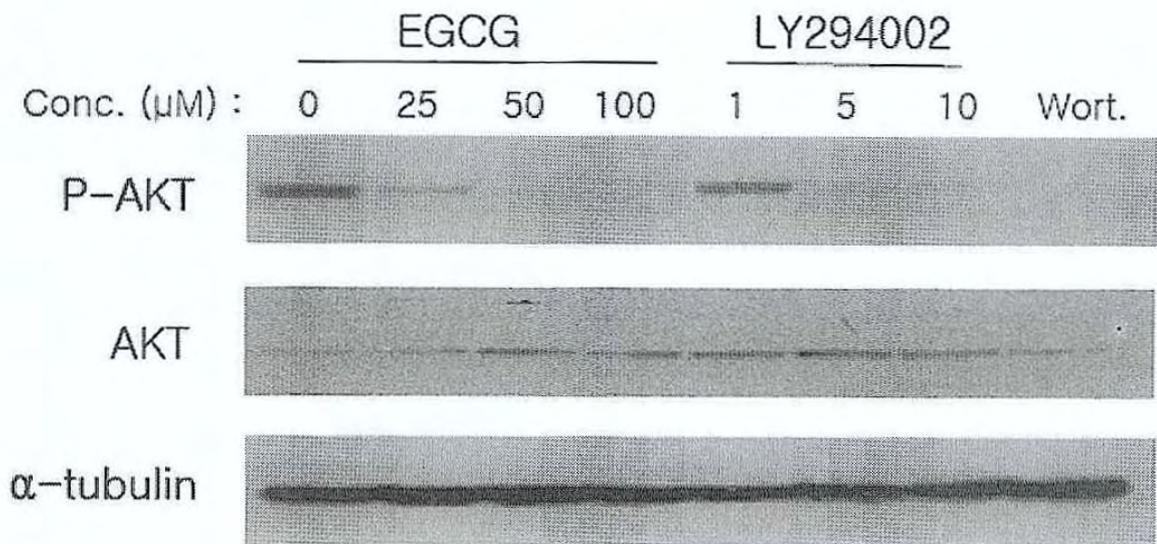


그림 39. EGCG와 AKT pathway inhibitor와의 AKT 인산화 억제 작용의 비교

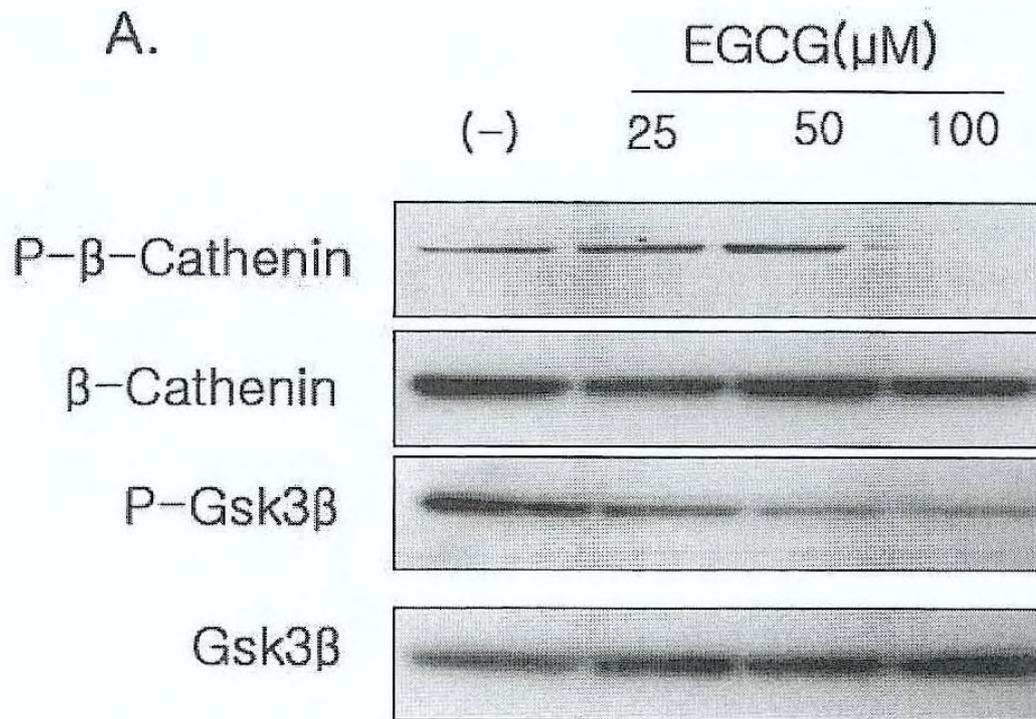


그림 40. EGCG가 catenin 및 GSK3b의 활성을 억제하는 실험

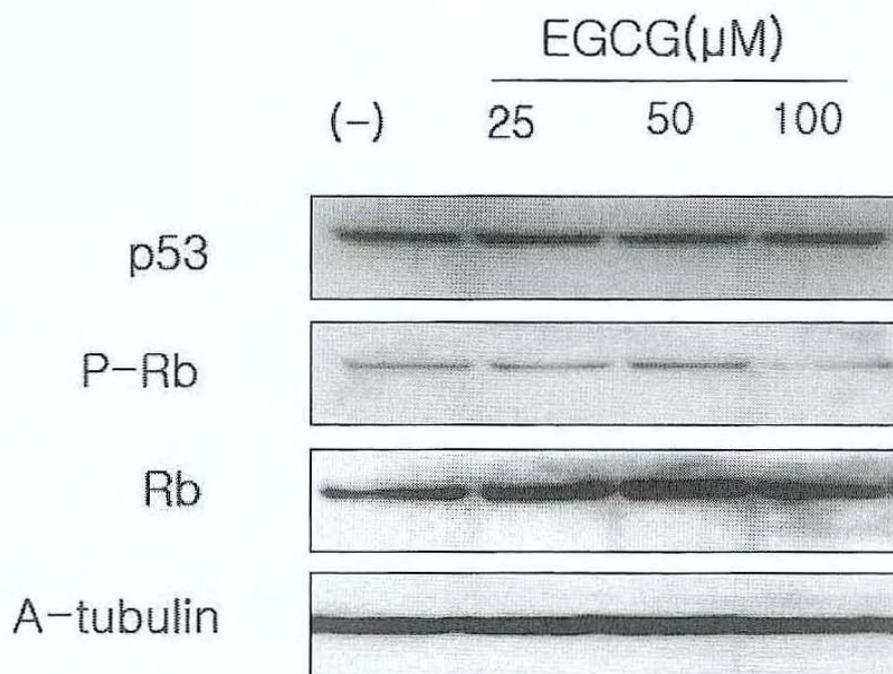


그림 41. EGCG가 Rb 및 p53의 활성화에 미치는 영향

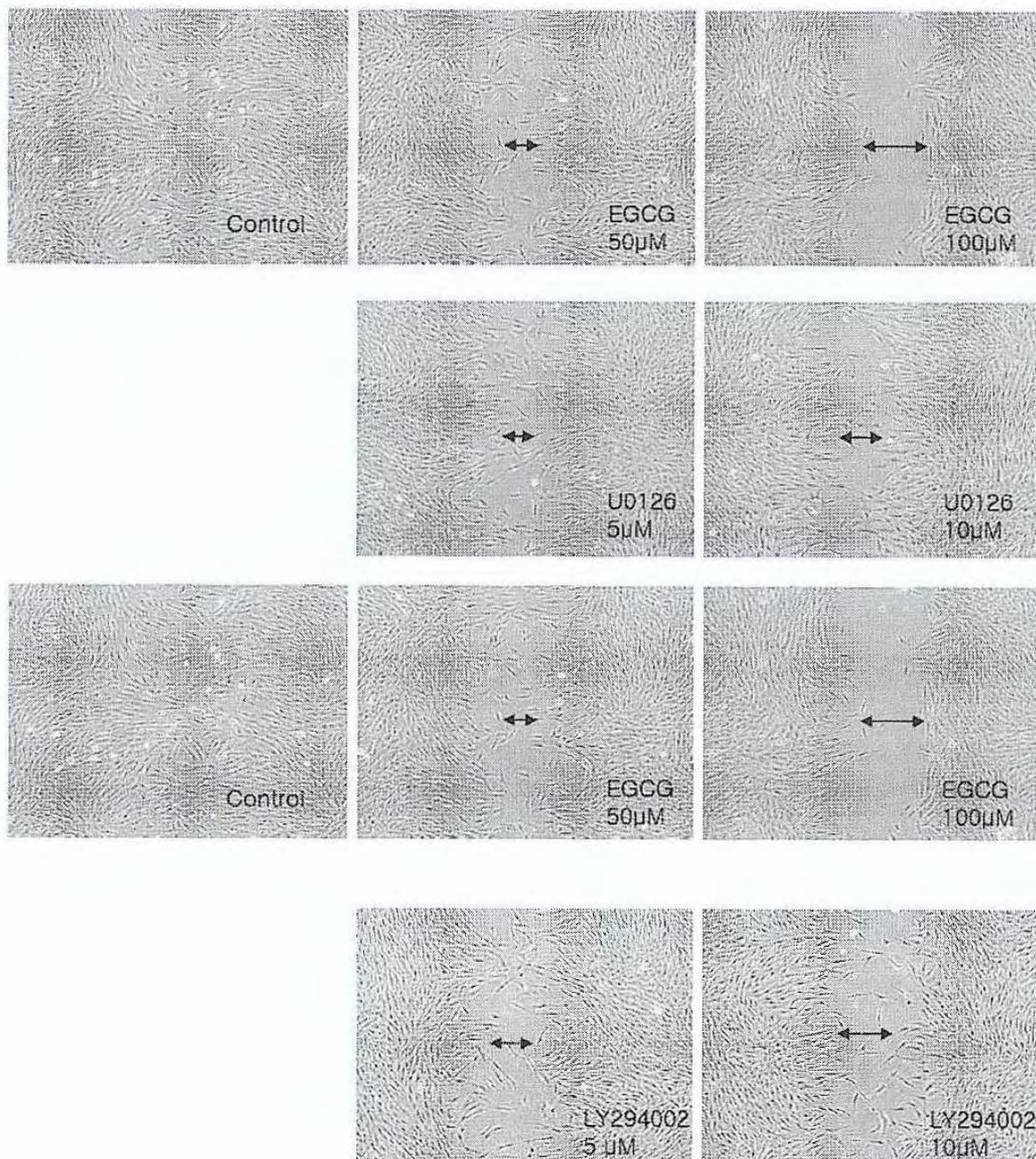


그림 42. EGCG가 세포의 이동에 미치는 효과

제 3 절 3차년도 연구개발수행 내용 및 결과

본 연구과제의 3차년도 연구개발의 목표와 내용은 표 8.과 같다.

표 8. 3차년도 연구개발 목표와 내용

연구개발목표	연구개발 내용
1. 한우 태아 근육유래 체세포주의 유전자 프로그램 및 세포특성 규명	1. 한우 태아 체세포주의 세포특성규명 및 유전자 발현 프로그램 규명 - 세포분열조절인자의 작용양상을 규명 - 세포의 분화양상을 비교
2. 근육성장 및 분화관련유전자의 발현이 한우 태아 체세포주의 성장 및 근육세포 분화에 미치는 효과 규명	- 확립된 체세포주가 단순히 세포수명이 연장된 세포인지 또는 암세포의 특성을 가지는 형질전환 (transformation)된 세포인지를 세포유전학적 방법을 통해 규명 - 근육세포 분화유도 유전자의 과발현에 의해 전변된 근육-특이적 세포주가 근육세포 분화실행 인자들에 의해 완전한 근육세포로 분화되는 것을 규명하고 근육세포로 분화되는 시기에 세포내 근육세포 분화관련 유전자의 발현양상을 규명
3. 근육성장 및 분화관련 유전자의 클로닝	2. 한우 증체 및 육질 관련 경제형질유전자 (MRF4, MYF5 또는 muscle c-protein 등)의 발현조절을 위한 레트로바이러스-유전자전이 벡터 구축
4. 근육성장 및 분화관련유전자의 발현조절벡터의 구축	3. 2차년도까지의 연구결과를 바탕으로 성장조절제들의 복합처리방법을 통해 한우 태아 체세포주의 성장·발달 및 분화에 영향을 미치는 상호작용 효능규명
5. 한우 태아 체세포주의 성장 및 근육세포 분화에 영향을 미치는 다양한 성장조절제들의 상호효능 규명	- 세포증식속도 측정, 세포성장억제 측정, 세포분화율 측정 - 근육 성장·발달 및 분화 marker 유전자 (Actin, myosin, troponin T, actin-binding filament confilin)의 발현 양상을 RT-PCR에 의해 확인
6. 한우 태아 체세포주에서 지방세포로의 전변에 관련된 성장조절제들의 선발	4. 한우 태아 체세포주를 지방세포로 분화 유도 가능한 성장조절제들의 선발 - 형태학적 고찰 및 Oil-red-O 염색으로 확인 - 지방분화 관련 유전자 (aP-2, adipsin, LPL, PPAR-γ)의 발현 양상을 RT-PCR과 같은 분자생물학적 방법에 의해 확인

1. 한우 태아 근육유래 체세포주의 개발 및 특성 규명 (주관연구 및 제 1 세부과제)

가. 실험목적

- 1) 한우 태아 근육유래 체세포주의 유전자 프로그램 및 세포특성 규명
- 2) 근육성장 및 분화관련유전자의 발현이 한우 태아 체세포주의 성장 및 근육세포 분화에 미치는 효과 규명

나. 실험방법

- 1) 세포분열조절인자의 작용양상을 규명
- 2) 세포의 분화양상을 비교
- 3) 확립된 체세포주가 단순히 세포수명이 연장된 세포인지 또는 암세포의 특성을 가지는 형질전환 (transformation)된 세포인지를 세포유전학적 방법을 통해 규명
- 4) 근육세포 분화유도 유전자의 과발현에 의해 전변된 근육-특이적 세포주가 근육세포 분화실행 인자들에 의해 완전한 근육세포로 분화되는 것을 규명하고 근육세포로 분화되는 시기에 세포내 근육세포 분화관련 유전자의 발현양상을 규명

다. 실험결과

- 1) 세포분열조절인자의 작용양상을 규명

불멸화세포주를 확립하는 과정에 세포분열 촉진 및 억제 유전자들의 작용기작 검증하기 위하여 p53과 p16^{INK4a} pathway의 작용양상을 검증했다.

세포의 분열 및 사멸에 관여하는 핵심 유전자인 p53의 발현 양상을 관측하기 위하여 DNA damage agent인 doxorubicin을 처리하고 p53단백질을 western blotting을 통하여 측정했다. 그림 43A.에서 보여주는 바와 같이 BEFE(primary cell), BEFS(spontaneous immortal cell line) 와 BEFT(hTERT mediated immortal cell line)는 모두 doxorubicin의 처리에 따라 p53단백질의 발현이 증가하였다. 그러나 BEFS에서는 다른 세포들에 비하여 p53단백질의 증가비율이 상대적으로 적었다. 구체적으로 자발적 방법으로 유도한 불멸화 체세포주(BEFS)와 hTERT를 도입하여 유도한 불멸화 세포주(BEFT)가 doxorubicin에 의한 사멸이 진행되는 지를 보기 위하여 DNA damage assay를 진행했다. 그림 43B.에서 보여준 바와 같이 doxorubicin을 서로 다른 농도로 처리 했을 때 BEFS의 생존율은 BEFE와 비교하여 조금 높은 경향을 보여주었다. BEFT는 BEFE와 유사한 생존율을 보여주었다. 이러한 결과는 장기간의 계대배양이 한우 태아 체세포에서 p53단백질의 발현과 기능을 억제하고 있음을 시사해주고 있다. p53DD를 과발현시킨 세포는 p53DD자체가 p53 pathway를 억제하므로 본 실험에 사용하지 않았다.

p53발현과 기능자체 뿐만 아니라 p53 down stream pathway에도 문제가 있는 지를 검증하기 위하여 p53 transfection assay를 진행했다. 그림 44A.는 BEFS와 BEFT에서 p53 transfection assay를 통하여 얻은 사진이다. BEFS와 BEFT는 대조구인 BEFE와 유사한 클로니들을 형성했다(그림 44B.). 이러한 결과는 BEFS와 BEFT에서 p53 down stream pathway인 p21과 BAX가 정상적임을 시사해주고 있다. 즉 근육으로 분화를 유도 시 p21유전자에 의한 growth arrest가 가능할 것으로 사료된다.

또 다른 세포분열 촉진 및 억제 유전자의 작용기작인 p16^{INK4a} pathway를 검증하기 위하여 p16^{INK4a} transfection assay를 실시했다. 그림 45A.는 BEFS, BEF-p53DD와 BEFT에서 p16^{INK4a} transfection assay를 통하여 얻은 사진이다. 클로니 형성을 통계해본 결과 그림 45B.와 같이 모든 세포들에서 70%를 넘는 클로니를 형성하면서 모든 세포들이 다소 p16^{INK4a} downstream pathway가 소실되었음을 시사해주고 있다.

2) 세포의 분화양상 비교

확립된 BEFS와 BEFT세포주의 분화양상을 보기 위하여 기존에 발표된 여러

가지 분화조건하에서 분화를 유도했다. 그림 46.는 여러 가지 분화조건에서 분화를 유도한 BEFS, BEF-p53DD, 와 BEFT세포주의 광학 및 현관현미경사진이다. 근육전구세포가 근육세포로 분화되면 한세포내에 여러개의 핵이 들어있는 다핵근섬유(multinuclear myofiber)로 분화된다. 본 실험에서 다핵세포를 관측하기 위하여 핵을 PI(Propidium Iodide)로 염색을 했다. 결과 다핵근섬유가 관측되지 않았다. 즉 우리의 한우 태아 섬유아세포는 근육전구세포가 아님을 시사해주고 있다. 앞으로 근육특성유지와 분화에 관여하는 유전자를 도입하여 근육전구세포로 전변을 유도할 필요성을 요구하고 있다.

3) Soft agar assay

확립된 체세포주가 암세포의 특성을 가지는 형질전환(transformation)된 세포인지를 확인하는 세포유전학적 방법은 soft agar를 이용한 anchorage independent culture 방법을 사용했다. 정상적인 세포는 ECM(extracellular matrix)에 의존하여 자란다. ECM이 없는 환경에서 정상적인 섬유아세포는 성장을 멈추는 반면에 암세포는 계속성장을 할 수 있다. 이러한 원리에 근거하여 ECM이 없는 soft agar에서 3D로 세포를 키우면 암세포인지 정상세포인지를 확인할 수 있다. 그림 47A.에서는 soft agar에서 anchorage independent culture를 실시한 세포들의 사진이다. 암세포인 Hela세포는 아주 큰 foci를 형성하는 반면에 같은 조건에서 한우태아에서 유래한 불멸화세포 중 BEF-p53DD를 제외한 BEFE, BEFS, 와 BEFT는 foci를 형성하지 못하면서 암세포특성을 가지는 형질전환된 세포가 아님을 증명되었다. BEF-p53DD에서 형성된 foci는 크기와 양적인 측면에서 모두 positive control인 Hela보다 작고 적었다(그림 47B.).

4) 불멸화 세포들에서의 근육분화유도 유전자의 과발현 효과검증

가) BEFS 세포주에서 분화유도 유전자의 과발현효과 검증

(1) BEF 세포주에서 MyoD 과발현효과 검증

(가) BEFS에서 MyoD 유전자의 발현 및 성장양상에 미치는 영향

그림 48A.는 MyoD 유전자를 과발현시킨 BEFS 세포주(BEFS-MyoD)의 광학현미경사진과 과발현된 MyoD 단백질 발현양상이다. 그림 48B.는 MyoD 유전자를 과발현시킨 BEFS 세포주의 성장성적이다. 이러한 결과는 MyoD과발현이 세포의 형태와 성장에 영향을 미치지 않음을 시사해준다.

(나) BEFS-MyoD 세포주의 분화조건 확립

BEFS-MyoD 세포주의 분화조건을 확립하기 위하여 여러 가지 분화배지에서 분화를 유도했다. 그림 49A.에서는 여러 가지 분화조건에 분화된 BEFS-MyoD 세포주를 근육분화 표지인자인 Desmin을 현광으로 보여준 사진이다. 그림 49B.는 분화된 근섬유를 관측하여 통계한 그래프이다. 결과적으로 모든 분화배지에서 BEFS-MyoD 세포주는 모두 분화되었지만 0.5%FBS+10ug/ml insulin과 2%HS+10ug/ml insulin조건에서 다른 분화 조건보다 많은 근섬유를 관측할 수 있었다. 2%HS+10ug/ml insulin과 0.5%FBS+10ug/ml insulin에서의 분화양상을 비교했을 때 2%HS+10ug/ml insulin에서 더 굵은 근섬유들이 관측되었으므로 이후 분화조건을 2%HS+10ug/ml insulin으로 확정했다.

(다) BEFS-MyoD의 분화특징 및 분화관련 단백질 발현패턴

MyoD유전자의 과발현에 의해 전변된 근육-특이적 세포주가 근육세포 분화실행 인자들에 의해 완전한 근육세포로 분화되는 것을 규명하고 근육세포로 분화되는 시기에 세포내 근육세포 분화관련 유전자의 발현양상을 규명하기 위하여 다핵근섬유와 근유세포 분화관련 단백질들의 발현패턴을 관측했다. 그림 50A.는 다핵근섬유를 관측한 현미경사진이다. 붉은색은 근섬유표지인자인 desmin이고 푸른색은 핵을 염색한 DAPI다. 결과적으로 전형적인 마우스 근육전구세포인 C2C12와 비슷하게 분화된 다핵근섬유들을 관측할 수 있었다. 그림 50B.는 근육세포 분화관련 단백질들의 발현패턴을 측정된 결과이다. 비록 BEFS 세포주 자체는 C2C12와 유사한 단백질 발현패턴을 보여주지 못했지만 MyoD를 과발현 시킨 BEFS-MyoD 세포주는 C2C12와 유사한 발현패턴을 보여주고 있었다.

(라) BEFV-MyoD의 분화특징 및 분화관련 단백질 발현패턴

BEFS세포주에서 분열조절인자의 작용양상을 관측한 결과로부터 BEFS세포주가 p53단백질의 발현과 기능이 감소하는 추세이며 p16^{INK4a} pathway가 소실된 세포였다. 장기적인 계대배양을 진행시 p53 pathway와 p16^{INK4a} pathway가 완전히

파괴될 수 있다. 이러한 상황에서도 MyoD에 의하여 BEFS가 분화될 수 있는 지를 보기 위하여 암유전자인 SV40LT로 p53 pathway와 p16^{INK4a} pathway를 일정하게 파괴시킨 후 분화를 유도해 보았다. 그림 51A.에서 보다 싶이 BEFS에 SV40LT를 과발현시킨 BEFV세포에서도 MyoD에 의하여 다핵근섬유가 형성되었으며 분화관련 단백질들의 발현패턴(그림 51B.)도 C2C12나 BEFS-MyoD세포주와 유사했다. 즉 우리가 개발한 MyoD유전자를 도입한 한우 태아 체세포는 장기적인 계대배양에서도 근육으로 분화할 수 있는 능력을 갖고 있음을 시사하고 있다. 이 내용에 근거하여 BEFS-MyoD에 관한 논문을 작성하여 투고했다.

(2) BEFS 세포주에서 Myogenin과 Myf5의 과발현효과 검증

그림 52.는 myogenin과 Myf5가 BEFS 세포주의 분화에 미치는 영향을 보여주고 있다. Myogenin과 myf5는 MyoD처럼 BEFS를 분화시키지 못했다. 즉 BEF 세포들에서 myogenic determinant로 작용을 하지 못하는 것으로 사료된다. 그러므로 향후 실험에 사용하지 않기로 결정했다.

(3) BEFS 세포주에서 MRF4의 과발현효과 검증

(가) MRF4가 BEFS세포의 근육분화에 미치는 영향

그림 53.에서 보여주는 바와 같이 MRF4는 myogenin, Myf5와 같이 BEFS 세포주를 다핵근섬유로 분화시키지 못했다. 반면에 MRF4를 과발현한 세포들은 분화조건에서 성장을 멈추지 않고 multilayer로 자라는 현상을 관찰할 수 있었다.

(나) MRF4가 BEFS의 성장에 미치는 영향

성장성적을 측정된 결과 현미경을 통하여 관찰한 것과 같이 MRF4를 과발현시킨 BEFS 세포주는 control에 비하여 현저한 빠른 성장을 보여주었다(그림 54A.). 심지어 분화조건하에서도 성장을 멈추지 않고 계속 성장을 했다. 진일보 MRF4에 의한 성장특성을 조사하기 위하여 분화조건에서 키운 세포들에서 FACS를 사용하여 cell cycle을 측정했다. 결과 MRF4를 과발현시킨 세포들이 S-와 G2/Mphase에서 많이 존재한다는 것을 발견했다 (그림 54B.).

(다) MRF4의 MyoD 발현에 미치는 영향

S phase에 있는 cyclinA-및 E-cdk2 complex가 MyoD 단백질의 분해를 야기시킨다는 발표가 있다. MRF4가 이러한 기작에 관여하는지를 알아보기 위하여 BEF-TetON-MyoD 세포주를 구축했다. BEF-TetON-MyoD 세포주는 doxycyclin이 존재하는 조건에서만 MyoD를 발현시킬 수 있는 세포주이다. BEF-TetON-MyoD 세포주에 MRF4를 과발현 시켰을 때 우리는 exogenous MyoD가 현저하게 감소하는 것을 관측했다 (그림 55.). 이 결과는 MRF4에 의한 근육분화 억제가 간접적으로 MyoD 분해와 관계있을 시사해준다.

(라) MRF4의 p21^{Waf1} 발현에 미치는 영향

또 다른 연구에 의하면 MyoD는 직접적으로 p21^{Waf1} 발현을 조절하여 세포의 growth arrest를 유도하여 최종분화를 유도하는 것으로 알려지고 있다. MRF4와 MyoD가 p21^{Waf1} 발현에 미치는 관계를 규명하기 위하여 BEF-TetON-MyoD 세포주에서 p21^{Waf1} promoter를 함유한 luciferase vector를 사용하여 transient transfection luciferase assay를 시행했다. MRF4 과발현은 MyoD를 induction 시키지 않은 상황에서 p21^{Waf1} luciferase activity를 현저하게 감소시켰다. 또 MyoD발현을 Doxycyclin을 사용하여 점진적으로 증가 시켰을 때 MRF4에 의한 p21^{Waf1} luciferase activity가 점차 회복됨을 관측할 수 있었다 (그림 56.). 이 결과는 MyoD와 MRF4가 p21^{Waf1}의 발현을 경쟁적으로 조절하고 있다는 것을 시사해준다. 또 다른 측면에서, MyoD가 MRF4에 의한 성장축진을 극복하고 BEFS의 근육분화를 다시 유도할수 있음을 시사해주었다.

(마) MyoD에 의한 MRF4과발현 BEFS세포의 성장억제와 근육분화

MyoD가 MRF4의 성장축진효과를 극복하고 근육분화를 회복할 수 있는지를 보기 위하여 MRF4가 과발현된 BEF-TetON-MyoD에서 MyoD 발현을 유도하면서 성장성적과 근육분화를 관측했다. 그림 57A.에서 보여주는 바와 같이 MRF4가 과발현된 세포에서 MyoD발현을 유도 시 성장 혹은 분화 배지에서 세포들이 모두 성장이 억제되는 현상을 관측할 수 있었다. 그림 57B.에서는 MyoD에 의한 MRF4과발현 세포가 근육분화를 회복되는 것을 현광현미경 사진으로 보여주고 있다. 그림 57C.에서는 근육분화가 회복된 세포들의 Fusion index를 보여주고 있다.

나) BEFT와 BEF-p53DD 세포주들에서 MyoD 유전자의 과발현효과 검증

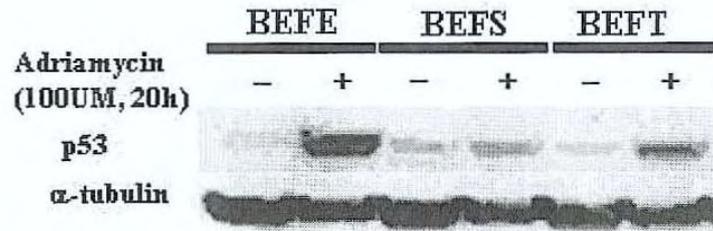
(1) BEFT세포에서 MyoD의 근육분화효과 검증

그림 58.에서 보여주는 바와 같이 hTERT는 MyoD과발현에 의한 근육분화를 억제한다. 그러나 RNAi 기법으로 hTERT의 발현을 감소시켰을 때 MyoD에 의한 근육분화가 다시 회복되고 있음을 관측할 수 있다. 전의 연구에 의하면 hTERT는 telomere의 길이를 연장해주는 외에 여러 유전자들의 발현을 조절한다고 발표되고 있다. hTERT에 의해 조절되는 유전자 중에는 bFGF와 같은 근육분화 억제 유전자도 있다. 그러므로 hTERT에 의해 구축된 근육세포들은 근육분화가 잘 안될 수 있다.

(2) BEF-p53DD세포에서 MyoD의 근육분화효과 검증

p53DD 유전자는 강력한 p53단백질의 억제인자로 알려지고 있다. MyoD가 p53DD에 의한 p53단백질 억제를 극복하고 근육분화를 유도할 수 있는 지를 보기 위하여 근육분화 조건에서 p53DD와 MyoD를 동시에 발현하는 세포를 근육분화로 유도했다. 결과 아주 적은 dosmin-positive cell 들을 관측할 수 있었으나 MyoD는 BEF-p53DD cell을 충분히 분화된 다핵 근섬유로 분화를 유도 할 수 없었다 (그림 59.).

A



B

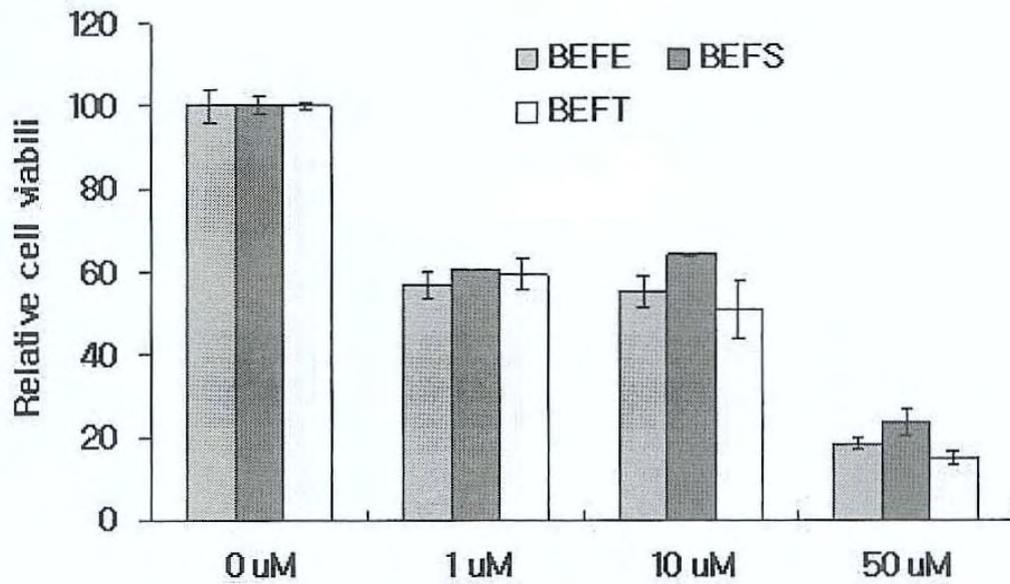
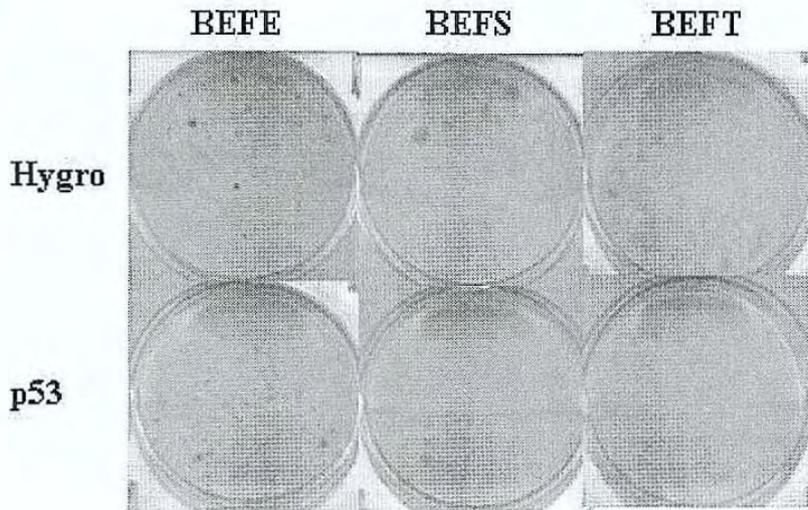


그림 43. BEFS와 BEFT에서 DNA damage에 따른 p53단백질의 발현양상 및 생존율

A



B

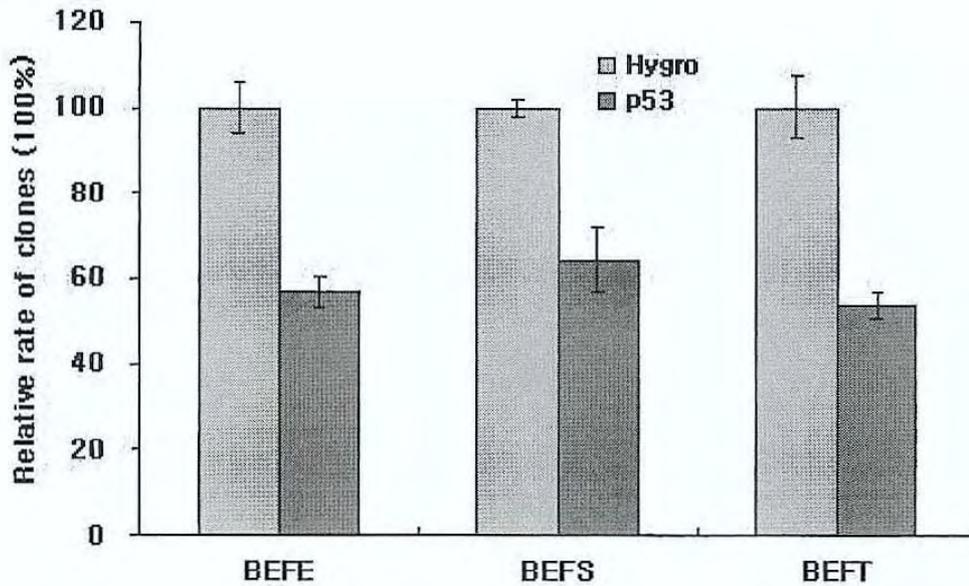
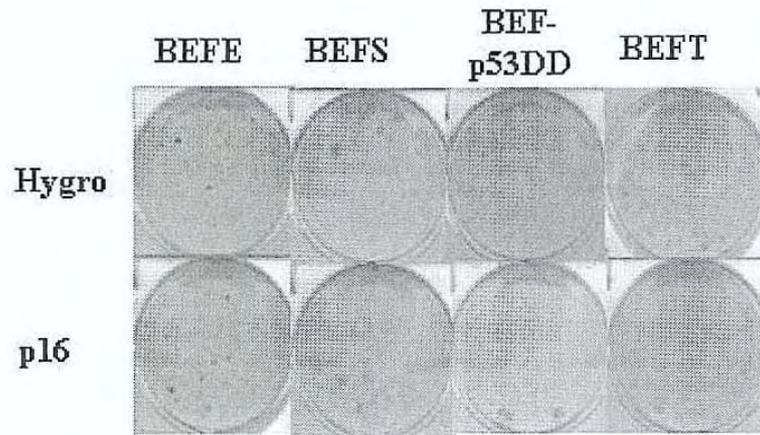


그림 44. BEFS와 BEFT에 대한 p53 transfection assay

A



B

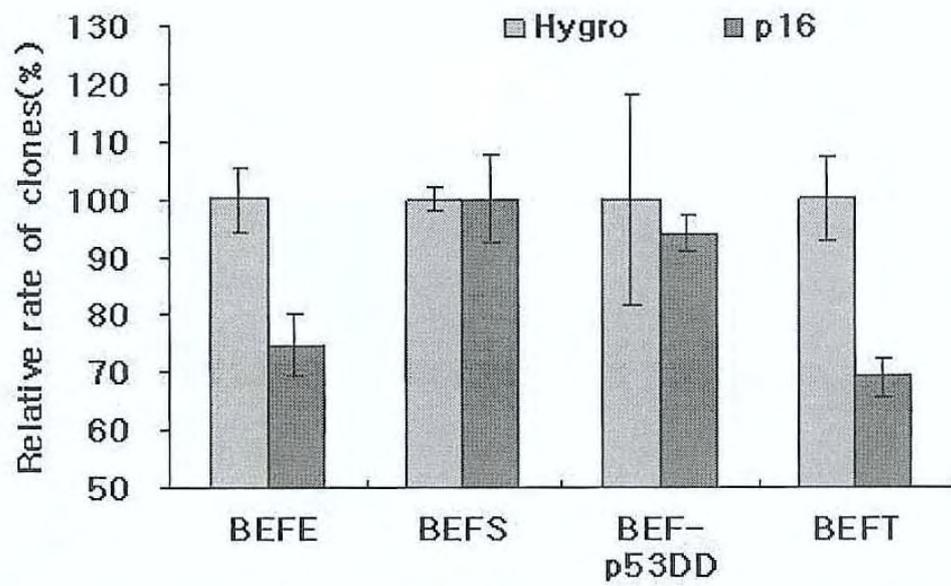


그림 45. BEFS와 BEFT에 대한 p16^{INK4a} transfection assay

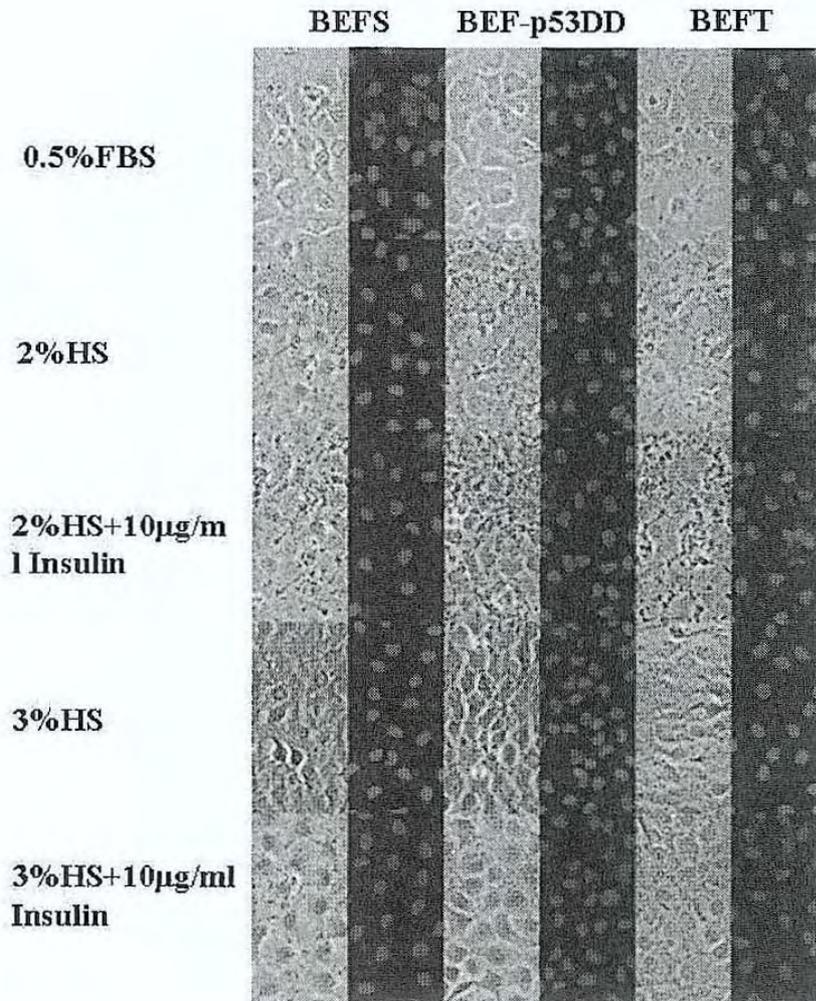
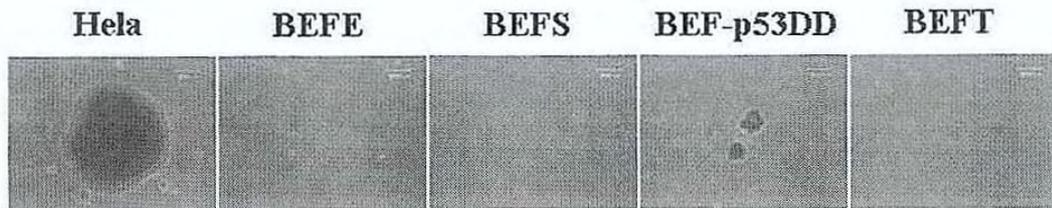


그림 46. 서로 다른 분화조건에서 분화를 유도한 BEFS와 BEFT세포주의 광학 및 현광현미경사진

A



B

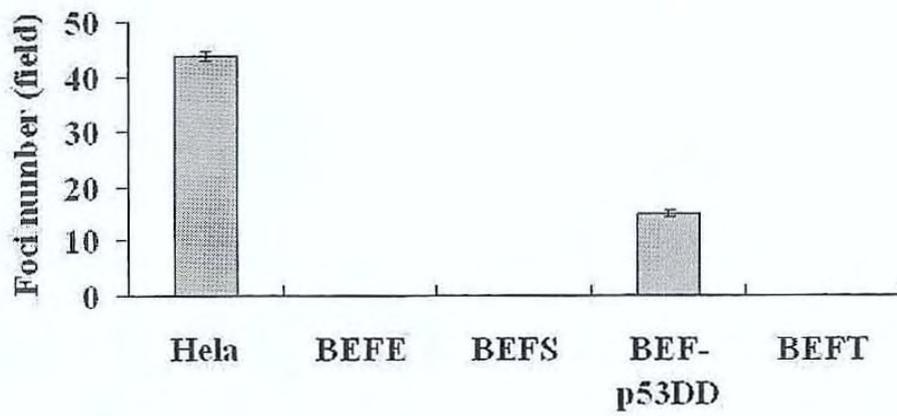


그림 47. soft agar를 이용한 anchorage independent culture

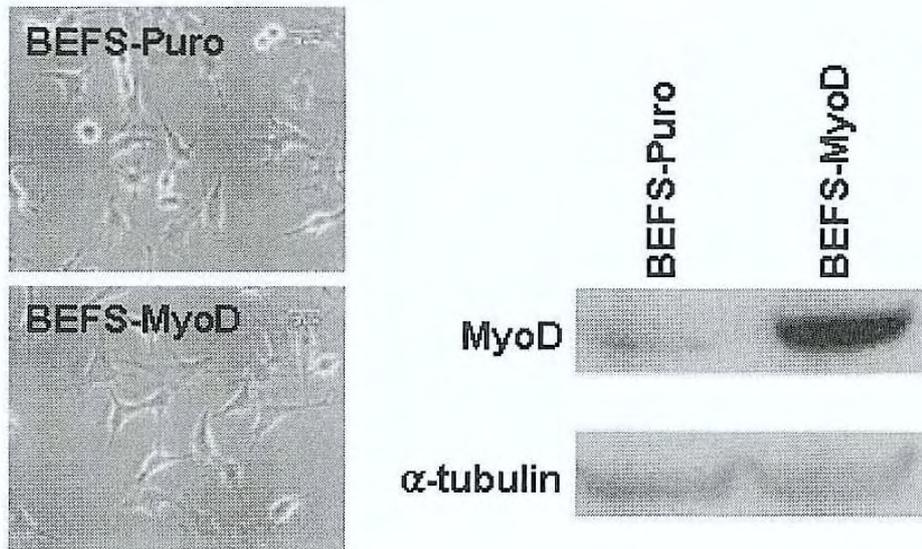
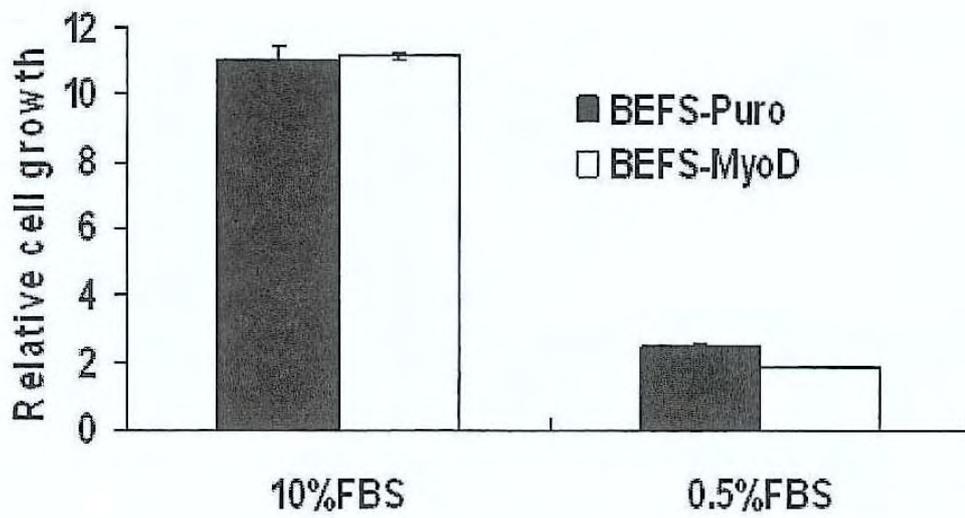
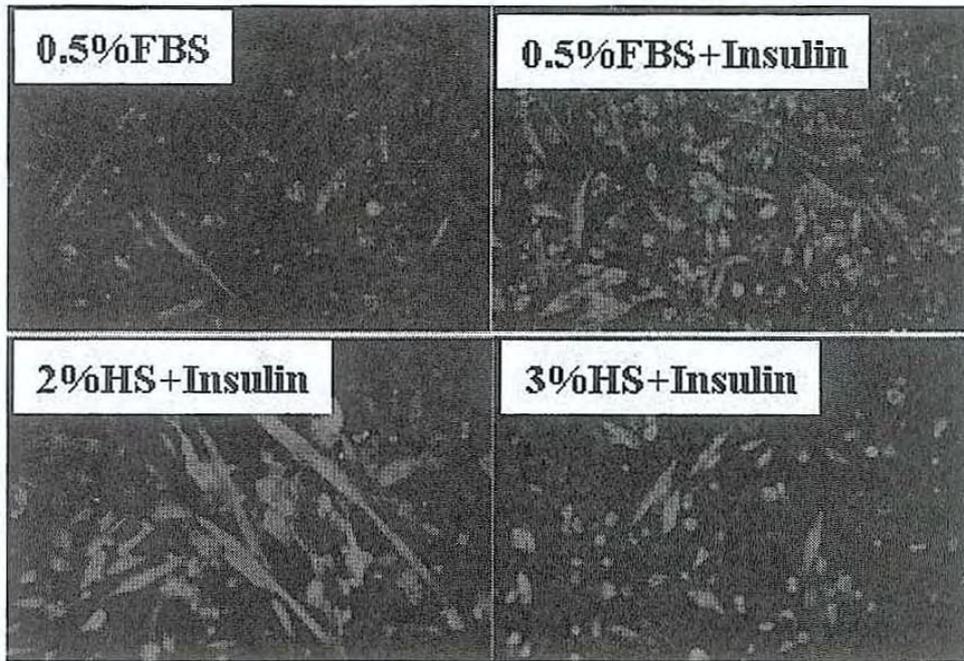
A**B**

그림 48. MyoD유전자를 과발현시킨 BEFS세포주의 사진 및 성장성적



BEFS-MyoD, IF: desmin

B

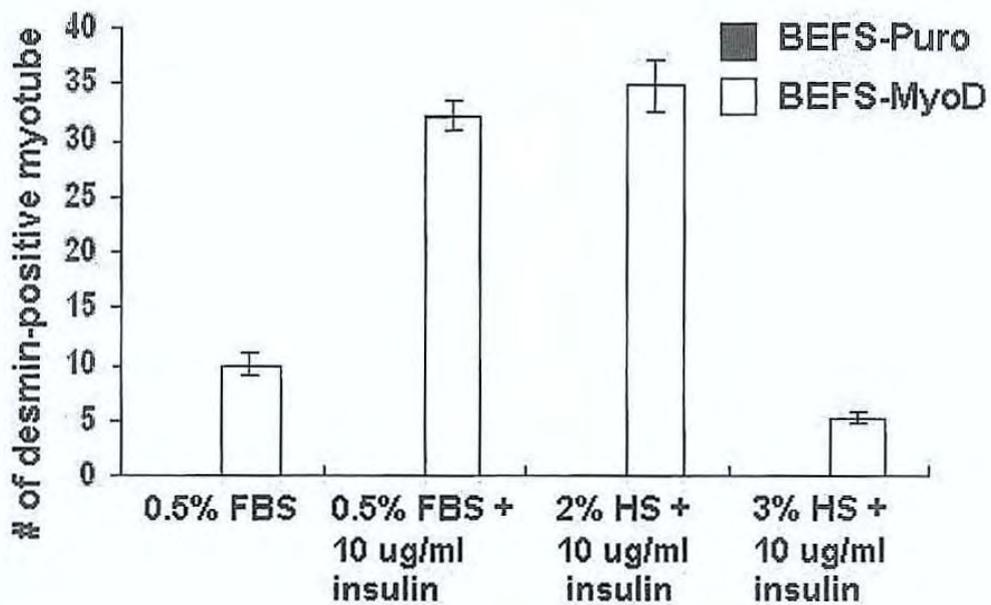


그림 49. BEFS-MyoD세포주의 분화조건 확립

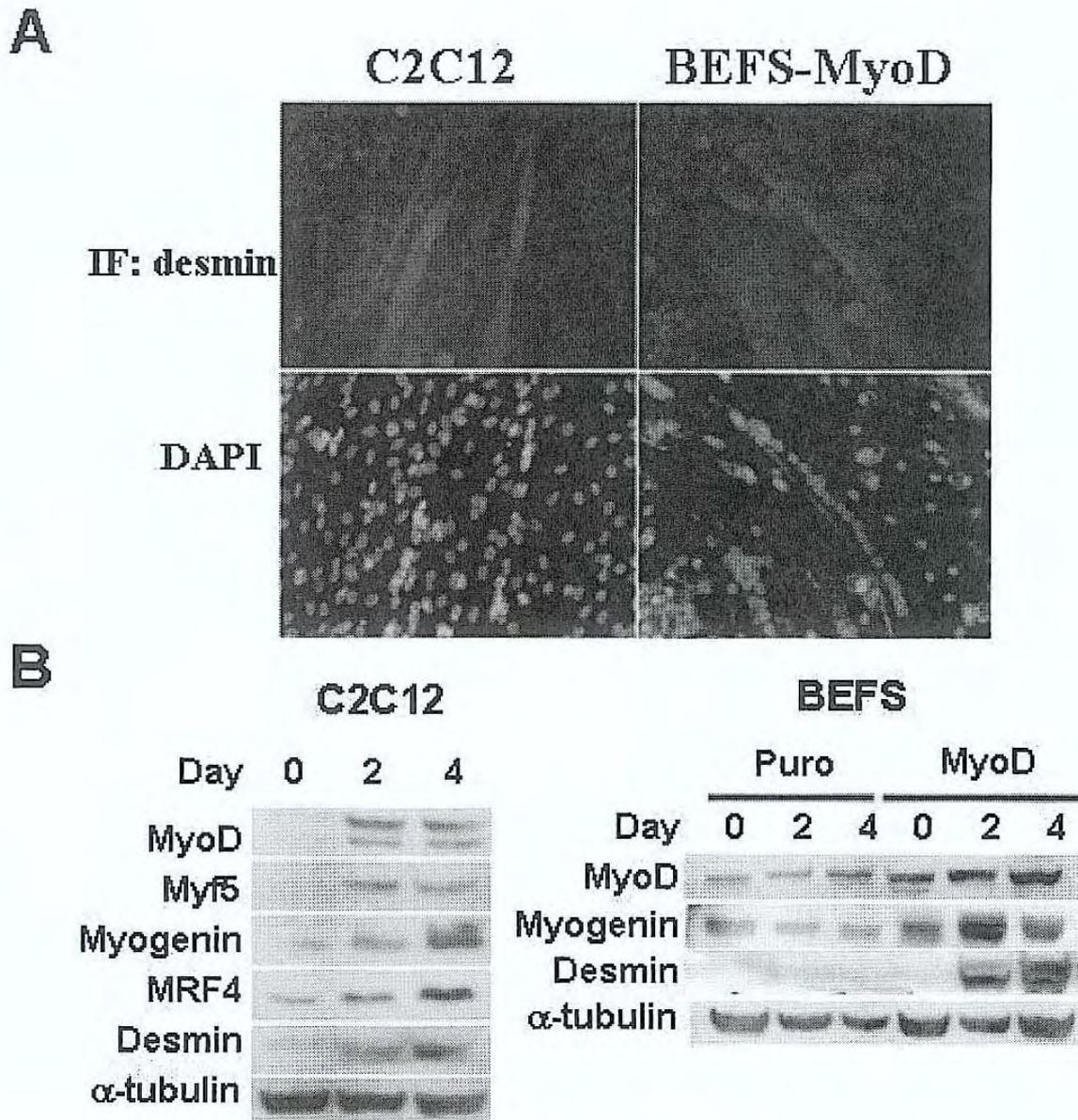
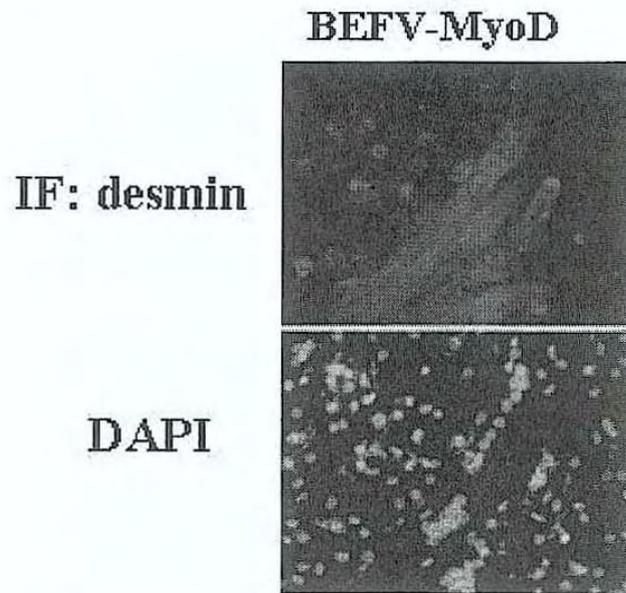


그림 50. 분화된 BEFS-MyoD 세포주 및 분화관련 단백질 발현패턴

A



B

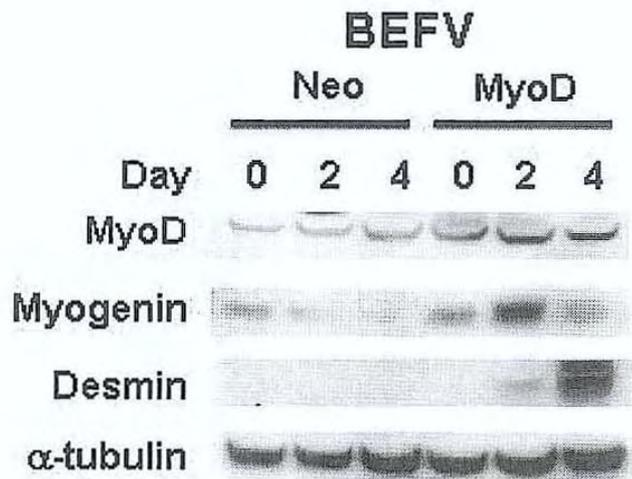


그림 51. 분화된 BEFV-MyoD세포 및 분화관련 단백질 발현패턴

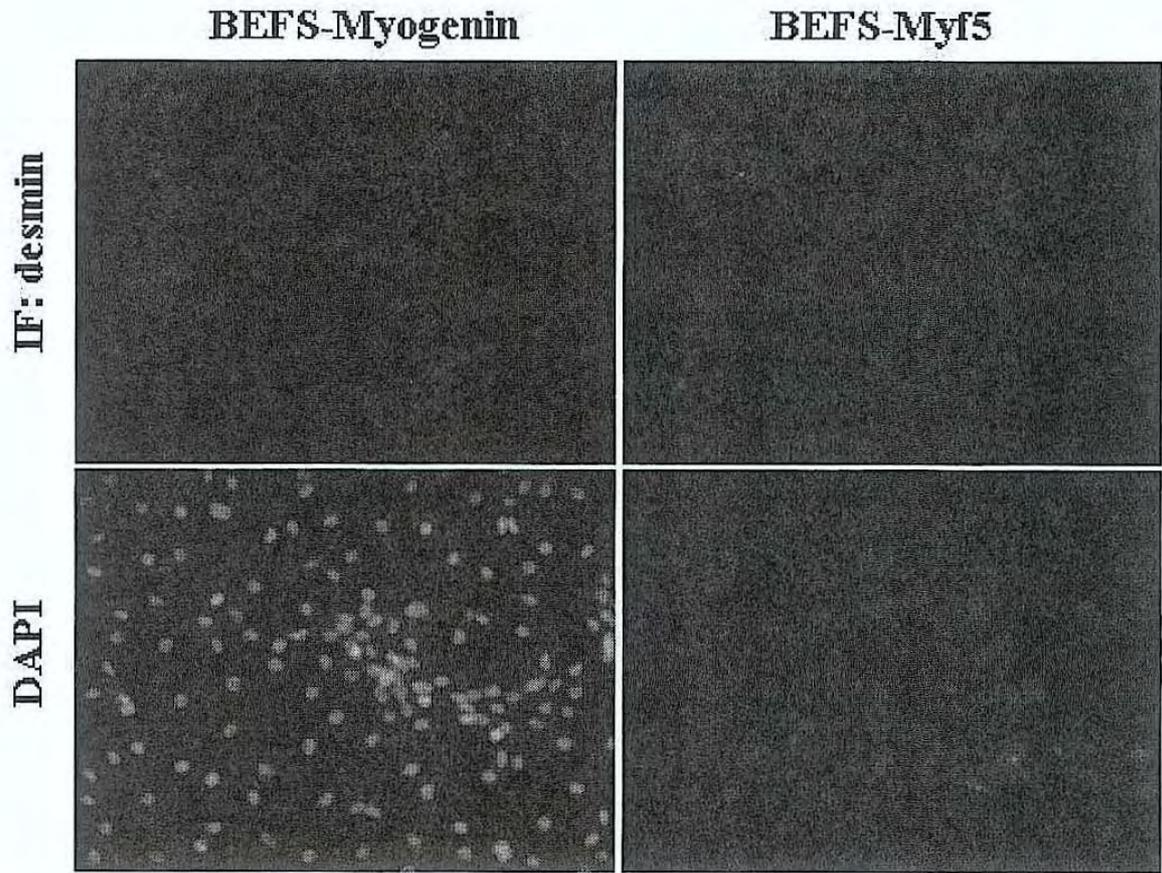


그림 52. Myogenin과 Myf5의 과발현이 BEFS 세포주의 근육분화에 미치는 영향

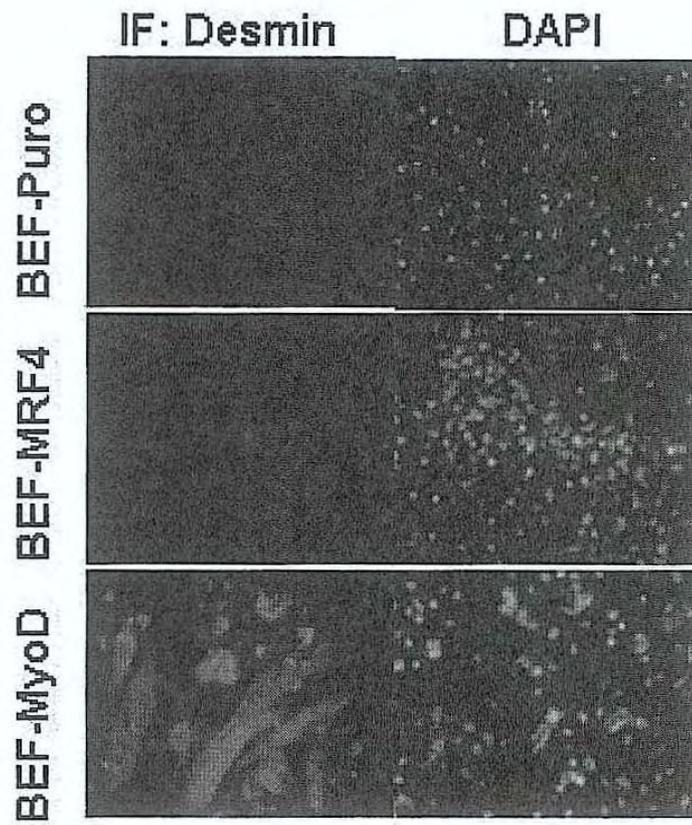


그림 53. MRF4의 과발현이 BEFS세포의 근육분화에 미치는 영향

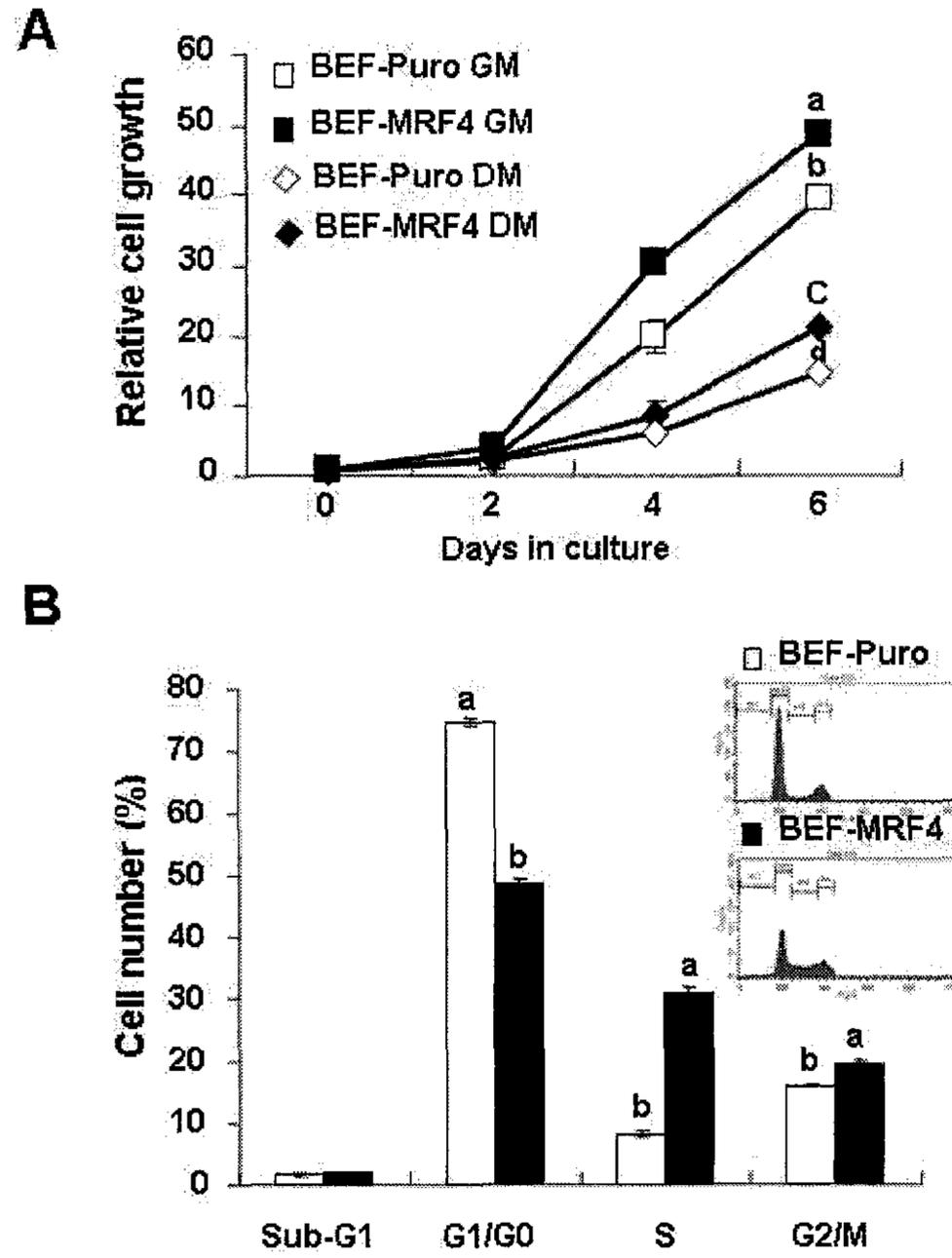


그림 54. MRF4의 과발현이 BEFS세포의 성장 및 cell cycle에 미치는 영향

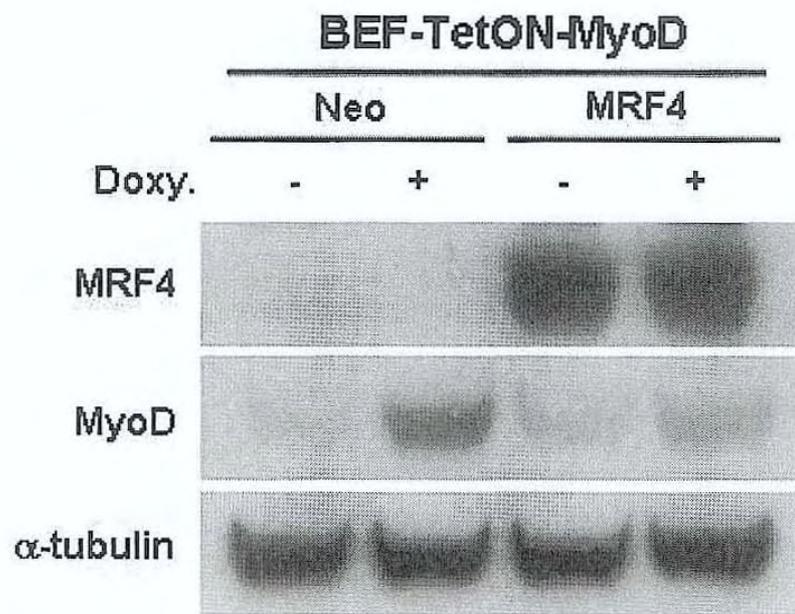


그림 55. MRF4의 MyoD발현에 미치는 영향

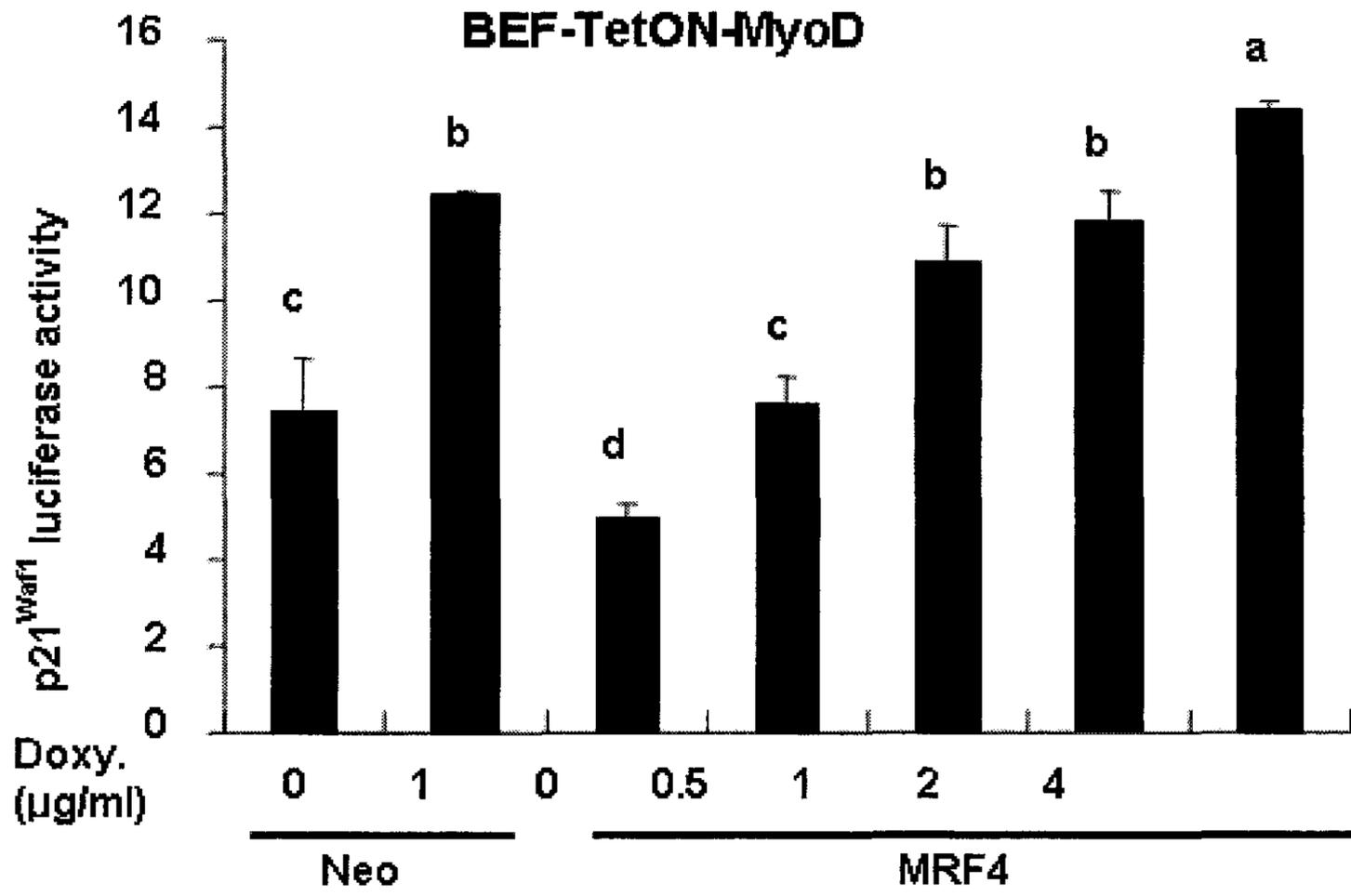


그림 56. MyoD와 MRF4에 의한 p21^{Waf1} promoter 조절효과

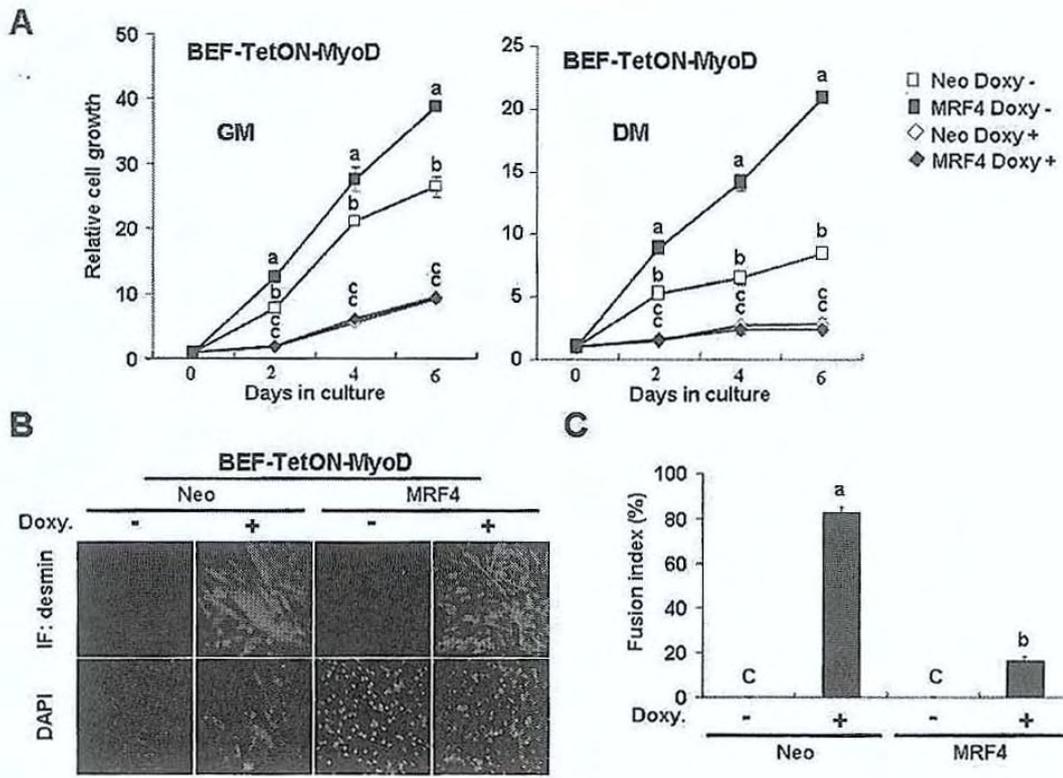
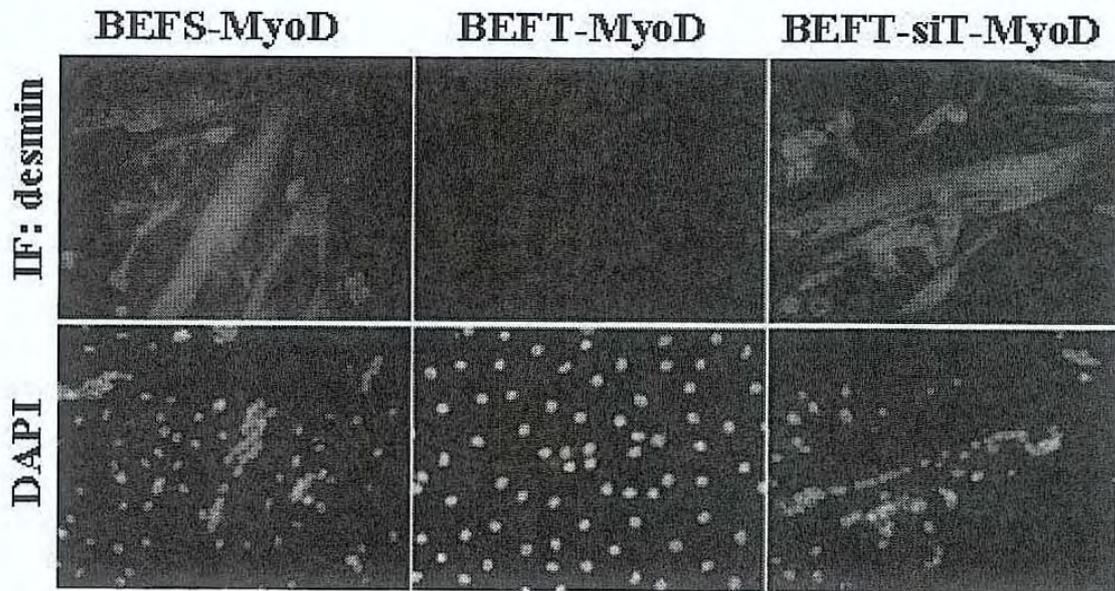


그림 57. MyoD에 의한 MRF4과발현 세포의 성장억제와 근육분화

A



B

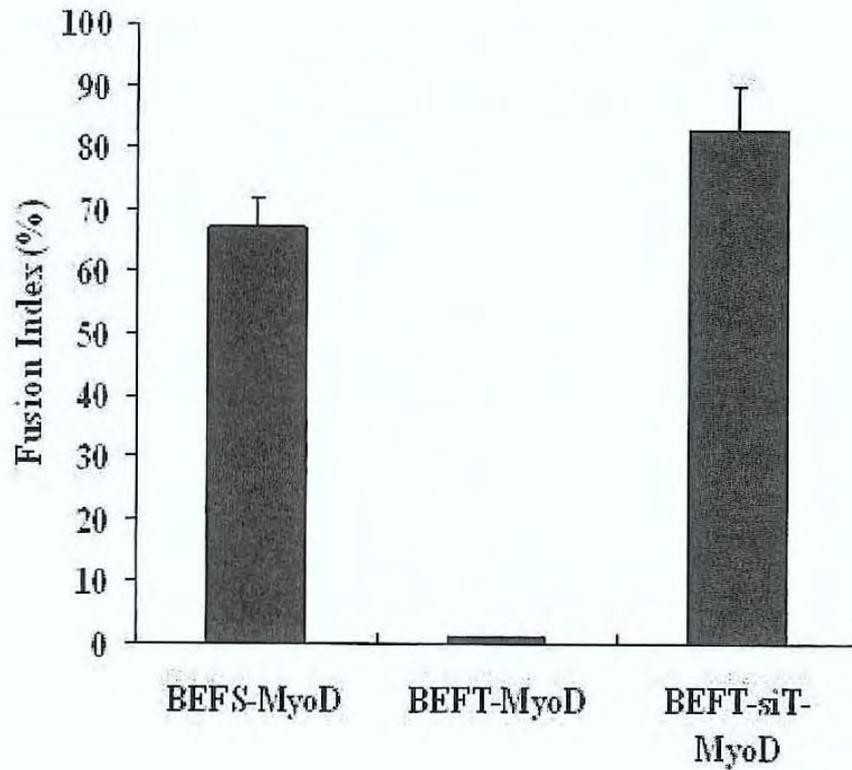


그림 58. hTERT에 의한 MyoD 과발현 세포에서의 근육분화억제

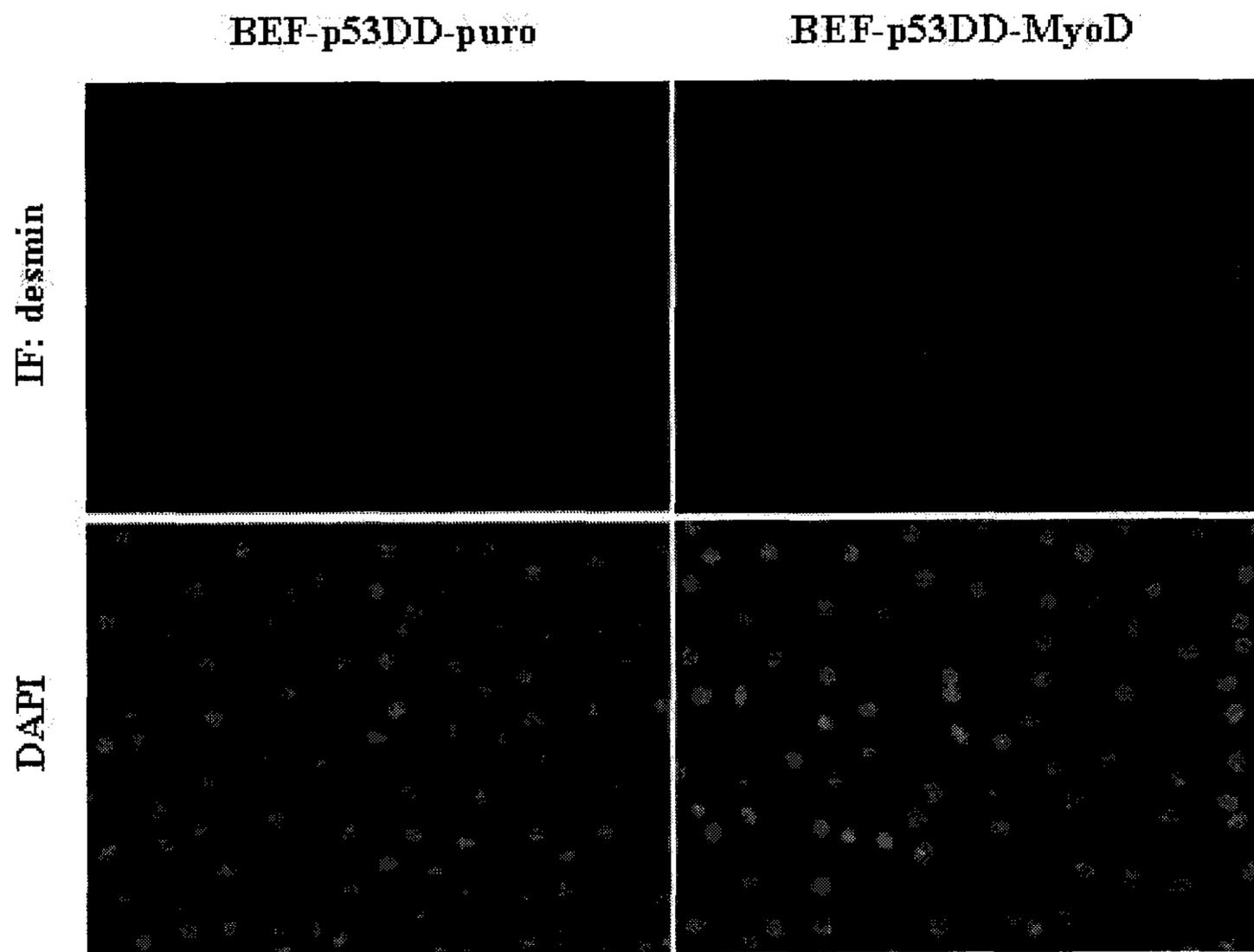


그림 59. MyoD의 과발현이 BEF-p53DD세포의 근육분화에 미치는 영향

2. 한우 태아 체세포주 확립에 관련된 유전인자의 클로닝 및 발현조절 벡터의 구축 (제 1 협동과제)

가. 실험목적

- 1) 근육성장 및 분화관련 유전자의 클로닝
- 2) 근육성장 및 분화관련 유전자의 발현조절벡터의 구축

나. 실험방법

- 1) 한우 태아 근육성장 및 분화에 관련된 유전자의 클로닝

근육성장 및 분화에 관련된 MRF4와 Myf5 유전자들을 GenBank에 보고된 sequence를 바탕으로 하여 RT-PCR을 통하여 클로닝한다.

- 2) 한우 태아 체세포주 확립에 관련된 유전자 발현조절벡터의 구축

클로닝 된 유전자들은 TA cloning 과 제한효소 cutting을 통하여 레트로바이러스-유전자 전이 발현벡터에 삽입한다.

- 3) 한우 태아 체세포주 확립에 관련된 유전자의 과발현 확인

MRF4와 Myf5의 과발현은 Western blotting을 통하여 확인한다.

다. 실험결과

- 1) MRF4 유전자의 클로닝

가) 유전자 클로닝

그림 60은 근육성장 및 분화에 관련된 유전자 MRF4를 RT-PCR을 통하여 클로닝한 결과이다. 유전자에 해당하는 NCBI GenBank ID와 본 실험에서 클로닝한 유전자의 크기를 표 9.에 요약하였다.

나) 레트로바이러스-유전자 전이 발현벡터구축

RT-PCR을 통하여 얻은 PCR product들은 TA-cloning을 거쳐 sequencing했다. sequencing 결과를 Blast search를 통해 각각의 sequence를 확인했다. 그림 61은 Cloning한 각각의 불멸화유도 유전자를 레트로바이러스 벡터시스템인 pBabe vector에 sub-cloning하고 구축된 vector를 제한효소 절단 후 전기영동을 통해 최종 확인한 결과이다.

다) 유전자 과발현 확인

위에서 구축한 레트로바이러스 발현벡터를 한우 태아 체세포에 retroviral system을 이용한 transduction을 실시하고 그 발현을 RT-PCR을 통하여 확인했다. 클로닝한 Telomerase의 발현을 확인한 결과는 그림 62에서 보여주는 바와 같다. 그림에서 Puro는 vector control이다. Western blotting을 통하여 transduction을 통해 한우 태아체세포에 도입한 MRF4가 안정적으로 발현이 유지됨을 확인하였다.

2) Myf5유전자의 클로닝

가) 유전자 클로닝

그림 63은 근육성장 및 분화에 관련된 유전자 Myf5의 발현조절인자인 c-myc유전자를 RT-PCR을 통하여 클로닝한 결과이다. 유전자에 해당하는 NCBI GenBank ID와 본 실험에서 클로닝한 유전자의 크기를 표 9.에 요약하였다.

나) 레트로바이러스-유전자 전이 발현벡터구축

RT-PCR을 통하여 얻은 PCR product들은 TA-cloning을 거쳐 sequencing했다. sequencing 결과를 Blast search를 통해 각각의 sequence를 확인했다. 그림 64.는 Cloning한 각각의 불멸화유도 유전자를 레트로바이러스 벡터시스템인 pBabe vector에 sub-cloning하고 구축된 vector를 제한효소 절단 후 전기영동을

통해 최종 확인한 결과이다.

다) 유전자 과발현확인

위에서 구축한 레트로바이러스 발현벡터를 한우 태아 체세포에 retroviral system을 이용한 transduction을 실시하고 그 발현을 RT-PCR을 통하여 확인했다. 클로닝한 c-myc의 발현을 확인한 결과는 그림 65.에서 보여주는 바와 같다. 그림에서 Puro는 vector control이다. Western blotting을 통하여 transduction을 통해 한우 태아체세포에 도입한 Myf5가 안정적으로 발현이 유지됨을 확인하였다.

표 9. 클로닝한 유전자의 sequencing결과와 일치한 GenBank ID와 크기

Gene name	GenBank ID	Size (bp)
MRF4	NM-008657	1143
Myf5	NM-008656	1550

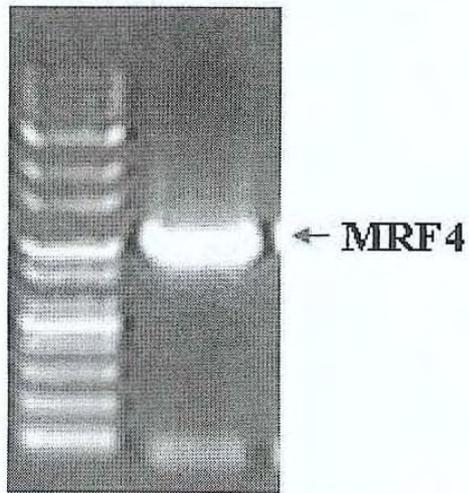


그림 60. MRF4 유전자 클로닝을 위한 RT-PCR 결과

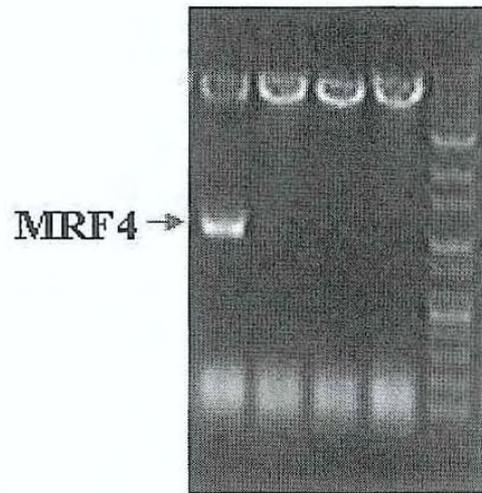


그림 61. 구축된 레트로바이러스-유전자 전이 발현벡터의 제한효소를 이용한 확인

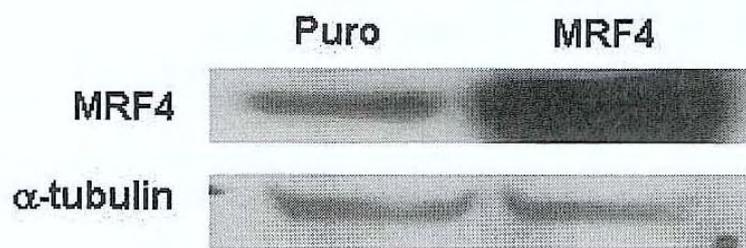


그림 62. 한우 태아 체세포에서 클로닝한 유전자의 과발현 확인

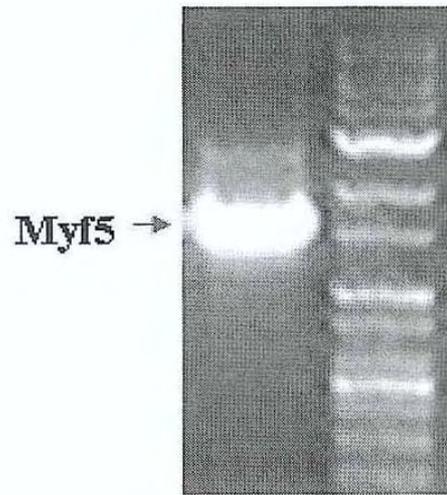


그림 63. Myf5 유전자 클로닝을 위한 RT-PCR 결과

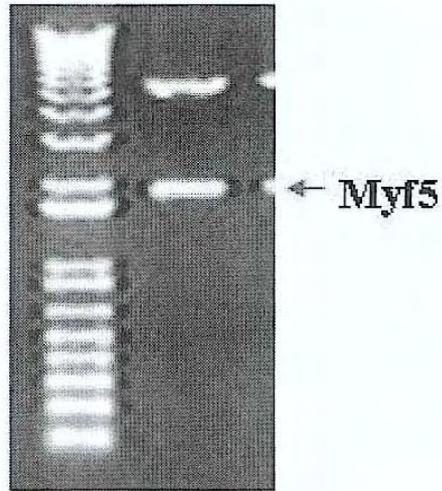


그림 64. 구축된 레트로바이러스-유전자 전이 발현벡터의 제한효소를 이용한 확인

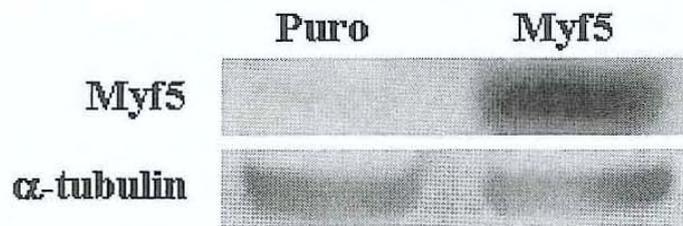


그림 65. 한우 태아 체세포에서 클로닝한 유전자의 과발현 확인

3. 한우 근육성장 및 분화관련 호르몬 및 성장조절제의 효능 규명 (제 2 세부과제)

가. 실험목적

- 1) 한우 태아 체세포주의 성장 및 근육세포 분화에 영향을 미치는 다양한 성장조절제들의 상호효능 규명
- 2). 한우 태아 체세포주에서 지방세포로의 전변에 관련된 성장조절제들의 선발

나. 실험방법

- 1) 형태학적 고찰 및 Oil-red-O 염색으로 확인
- 2) 지방분화 관련 유전자 ($\alpha P-2$, adipsin, LPL, PPAR- γ)의 발현 양상을 RT-PCR과 같은 분자생물학적 방법에 의해 확인

다. 실험결과

- 1) Insulin 이 근육분화에 미치는 영향

그림 66A.는 BEF-MyoD 세포에서 insulin을 분화를 유도하는 조건에서 농도별 처리한 후 다핵근섬유를 관측한 현광현미경사진이다. 붉은색은 근섬유표지인 desmin이고 푸른색은 핵을 염색한 DAPI다. 결과적으로 insulin의 처리농도에 따라 desmin에 positive 한 다핵근섬유들이 증가했다. 그림 66B.는 분화된 다핵근섬유의 fusion index를 통계적으로 보고 있다. 현광현미경사진과 같이 insulin처리에 따라 fusion index도 증가했다. 반면에 20ug/ml의 insulin 처리에서 다핵근섬유가 다소 감소했다. 이 결과는 아마 insulin의 과다처리에 의한 것으로 사료된다.

- 2) Cr이 근육분화에 미치는 영향

전의 발표에 의하면 Cr은 insulin의 sensitivity를 증가시킨다고 한다. 위에서 보여준 바와 같이 insulin은 근육분화를 촉진한다. Cr이 insulin sensitivity를 증가시켜 근육분화를 촉진하는지를 확인하기 위하여 서로다른 농도의 Cr을 insulin이 없는 분화배지에 첨하여 BEF-MyoD 세포의 분화를 유도했다. 그림 67A.에서 보여주는 바와 같이 Cr첨가농도의 증가에 따라 desmin에 positive 다핵근섬유들이 많이 증가하고 있었다. 현광현미경에서 관찰한 결과와 같이 insulin을 분화를 유도하는 조건에서 농도별 처리에 따른 fusion index가 유출되었다(그림 67B.).

3) PPAR ligand들이 근육분화에 미치는 영향

전의 발표에 의하면 근육전구세포들이 PPAR ligand들에 의하여 지방세포로 전변될 수 있다. 그러나 이러한 연구는 지방세포로의 분화조건하에서 진행되었으며 근육분화조건에서 이러한 물질들이 근육분화에 미치는 영향은 진행된바가 없다. 그러므로 PPARs의 ligand인 GW0742과 troglitazone을 처리하여 근육분화에 미치는 영향을 보았다. 그림 68A.에서 보면 GW0742과 troglitazone를 처리에 의하여 desmin positive 다핵근섬유들이 적어 졌다. Fusion index도 현미경사진 결과와 같이 줄어들었다 (그림 68B.).

4) 성장조절제 및 호르몬들이 근육분화에 미치는 영향

GH, IGF-1, IGFBP-3, thyroid hormone, steroid hormone, transferrin, vitamin A, vitamin C, IL-3, TNF를 처리한 결과 IGF-1과 transferrin이 근육분화를 촉진하는 결과를 보았다 (그림 69.). 호르몬과 transferrin의 복합처리 효과를 보기 위하여 IGF-1과 transferrin을 함께 처리하여 분화를 유도해 보았다. 결과 근육분화를 더 촉진하는 결과를 얻지 못했다 (그림 70.). 또 IGF-1 및 transferrin을 처리한 세포들에서 RNA를 추출하여 marker 유전자들인 actin, myosin, troponin T, conifilin을 측정했다. IGF-1처리에 의하여 myosin이, transferrin의 처리에 의하여 troponin T이 증가하는 현상을 보았다 (그림 71.).

5) 성장조절제 및 호르몬들이 지방분화에 미치는 영향

GH, thyroid hormone, 및 steroid hormone이 한우 태아 체세포주에서 지방세포 분화에 미치는 영향을 보기위하여 다음과 같은 실험들을 했다. 우선 지방으로의 분화를 유도하기 위하여 3T3L1을 분화시킬 수 있는 지방분화조건: 1ug/ml

insulin, 1 μ M dexamethason, 과 0.45mM IBMX를 DMEM에 첨가하여 분화배지를 만들고 이 배지로 48시간 배양한 후 1 μ g/ml insulin과 10%FBS를 함유한 분화유지 배지로 교체하여 14일간 배양했다. 그림 72A.는 분화를 유도한 후 Oil-red-O로 세포를 염색한 사진이고 그림 72B는 염색된 세포들을 확대해 보여준 사진이다. 그림 72C.는 분화된 세포에서 RNA를 추출하여 지방분화 관련 유전자 (aP-2, LPL, PPAR- γ)의 발현 양상을 RT-PCR로 분석한 결과이다. RT-PCR결과를 보면 지방분화 관련 유전자인 aP-2, LPL, 및 PPAR- γ 가 모두 분화조건에서 증가함을 확인할 수 있다. 그림 73.은 GH, thyroid hormone, 및 steroid hormone을 분화유지 배지 중 insulin을 대체하여 처리 시 지방분화 관련 유전자 (aP-2, LPL, PPAR- γ)의 발현 양상을 RT-PCR로 분석한 결과이다. 결과를 보면 GH, thyroid hormone, 및 steroid hormone 모두 aP-2, LPL, 및 PPAR- γ 의 발현을 증가시킴을 관측할 수 있었고 특히 steroid hormone 경우에는 농도별 처리에 따라 지방분화관련 유전자들의 발현이 증가함을 관측할 수 있었다(그림 73C).

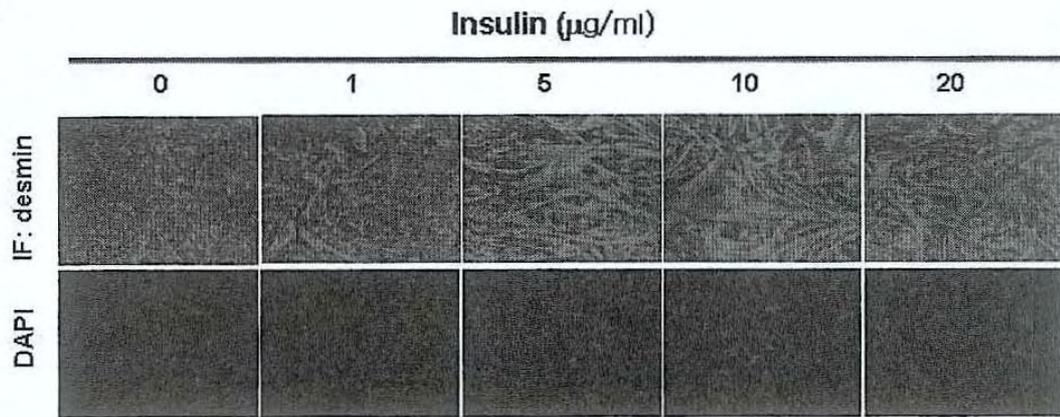
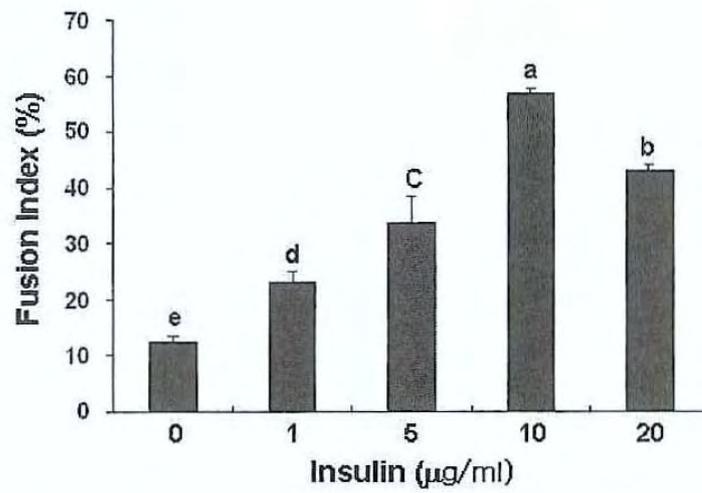
A**B**

그림 66. Insulin이 근육분화에 미치는 영향

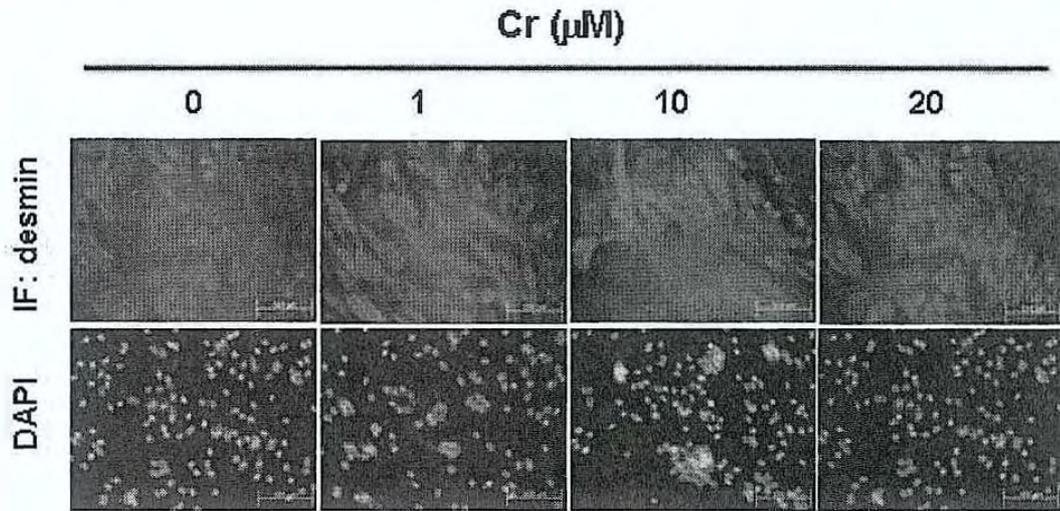
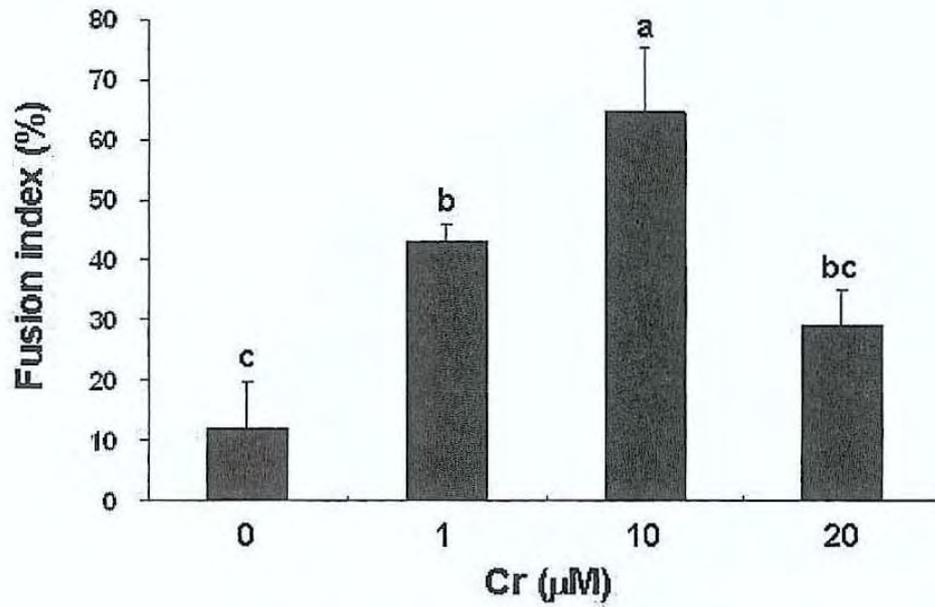
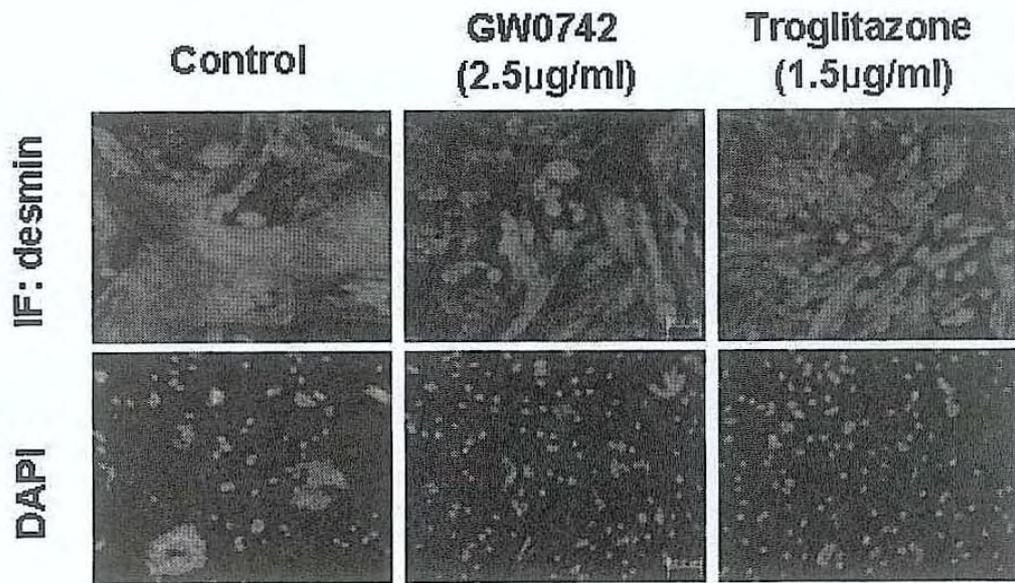
A**B**

그림 67. Cr이 근육분화에 미치는 영향

A



B

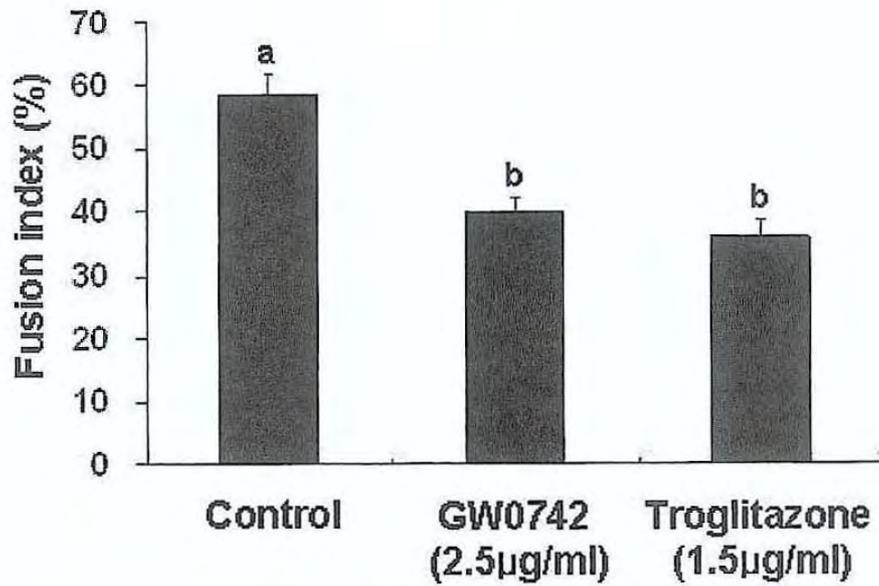


그림 68. PPAR ligand들이 근육분화에 미치는 영향

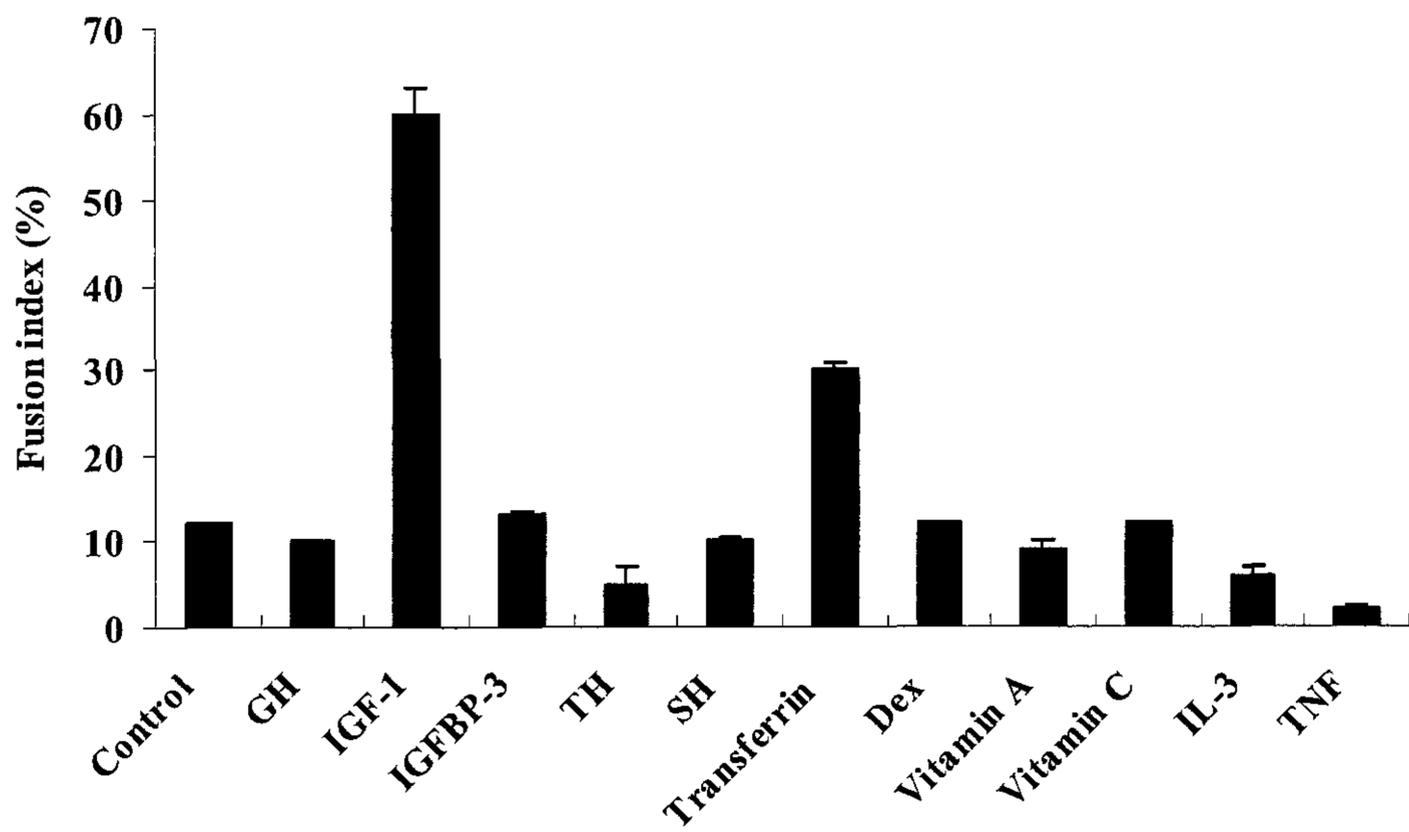


그림 69. 성장조절제들과 호르몬들이 근육분화에 미치는 영향

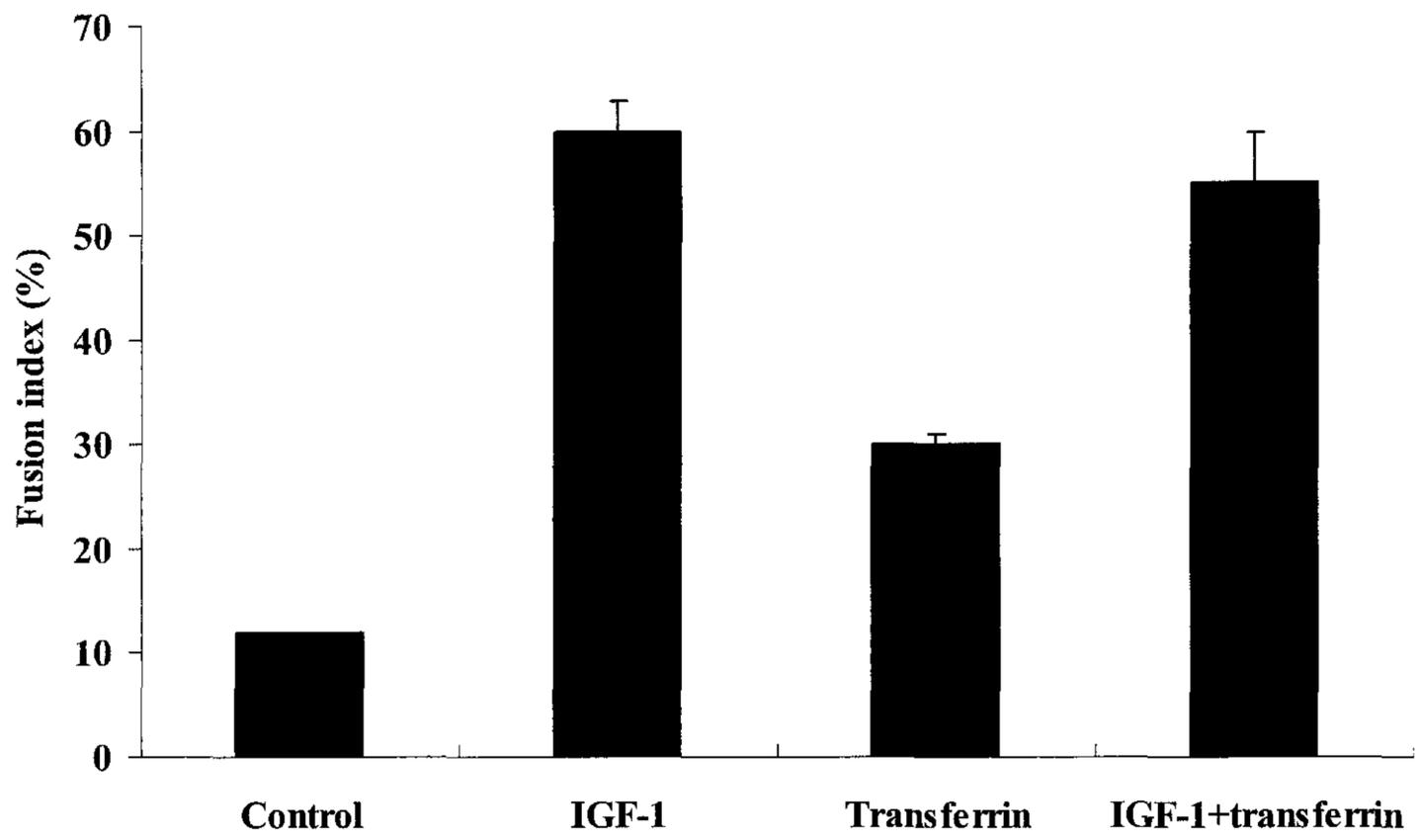


그림 70. 성장조절제와 호르몬을 복합처리시 근육분화에 미치는 영향

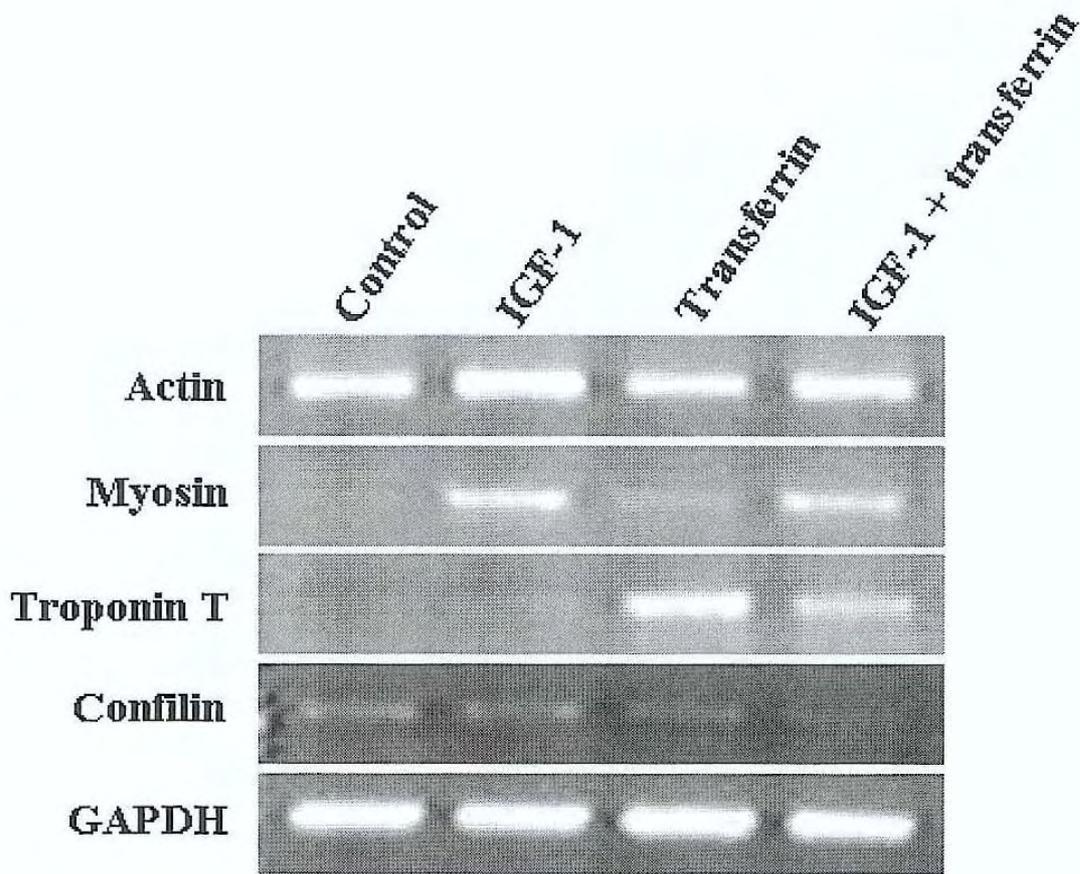


그림 71. 성장조절제와 호르몬처리에 의한 marker 유전자들의 변화

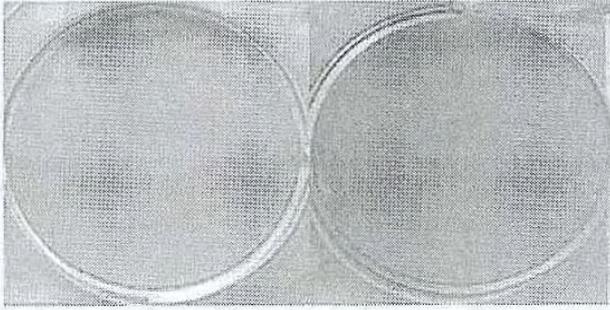
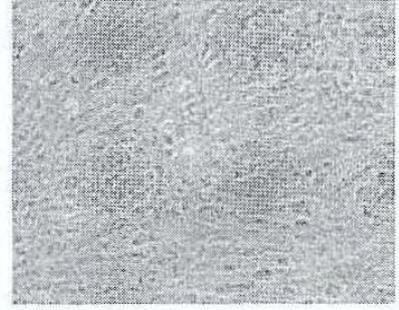
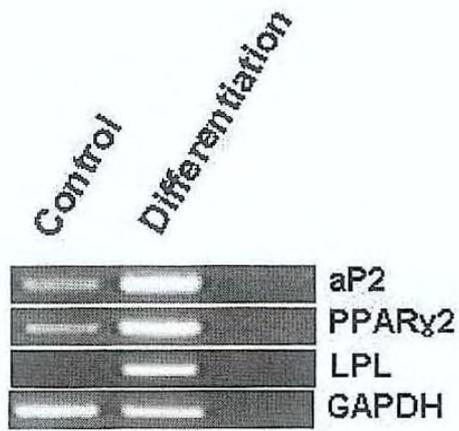
A**B****C**

그림 72. 한우 태아 체세포에서 지방분화조건 확립

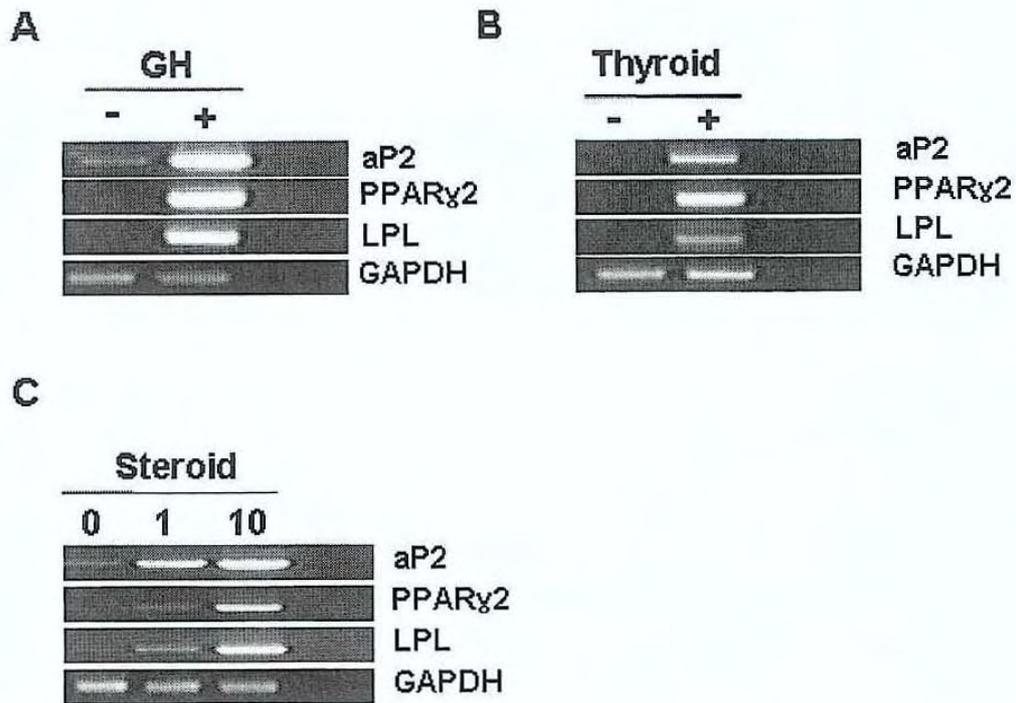


그림 73. 성장조절제와 호르몬들이 한우 태아 체세포주의 지방분화관련 유전자 발현에 미치는 영향

제 4 장 연구개발목표의 달성도 및 기술발전 기여도

제 1 절 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

본 연구의 최종목표는 한우 태아 체세포주를 확립하고 이의 특성을 규명하며, 한우 태아시기 근육성장 및 분화에 영향을 미치는 다양한 성장조절제의 검증을 위한 세포주로 활용하여 사용여부를 가늠할 수 있는 *in vitro* model system을 확립하고 이들 성장조절제들의 상호 효능규명 및 지방세포로의 전변에 관여하는 성장조절제를 선별하는 것으로 논리적인 가설설정과 체계적인 실험설계에 입각한 연구수행을 통해 본 연구가 추구하는 목표를 성공적으로 완료하였다고 판단된다.

최종목표를 달성하기 위한 연도별 연구목표는 다음과 같다.

1차년도 연구목표는 한우 태아의 근육조직으로부터 체세포의 분리 및 초대배양기술 확립하고 근육세포 특성유지에 관련된 유전자의 클로닝 및 발현벡터구축 하며 한우 근육발달 및 분화관련 성장조절제의 선별 및 효능검정이다.

2차년도 연구목표는 한우 태아 체세포의 불멸화 유도 및 체세포주의 *in vitro* 수명 측정하고 한우 태아 체세포주 확립에 관련된 유전자의 클로닝 및 발현조절벡터의 구축하며 한우 태아 체세포주의 성장 및 근육세포로의 분화에 미치는 성장조절제의 효능규명이다.

3차년도 연구목표는 한우 태아 근육유래 체세포주의 유전자 프로그램 및 세포특성 규명하고 근육성장 및 분화관련유전자의 발현이 한우 태아 체세포주의 성장 및 근육세포 분화에 미치는 효과 규명하며 근육성장 및 분화관련 유전자의 클로닝 및 발현조절벡터의 구축하고 한우 태아 체세포주의 성장 및 근육세포 분화에 영향을 미치는 다양한 성장조절제들의 상호효능 규명하고 한우 태아 체세포주에서 지방세포로의 전변에 관련된 성장조절제들의 선별한다.

1. 1차년도 연구과제의 연구개발목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

1차년도 연구과제의 연구개발목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도는 표 10.과 같다.

표 10. 1차년도 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

목표	평가착안점	달성도
한우 태아의 근육조직으로부터 체세포의 분리 및 초대배양기술 확립	한우 태아의 근육조직으로부터 체세포의 분리	100%
	분리된 초대배양세포의 배양상 세포수명 측정	100%
근육세포 특성유지에 관련된 유전자의 클로닝 및 발현벡터구축	한우 태아 근육유래 체세포의 분화유도에 관련된 유전인자의 클로닝 및 발현조절벡터의 구축	100%
	한우 태아 근육유래 체세포의 증식에 관련된 유전인자의 선발 및 발현조절벡터의 구축	100%
한우 근육발달 및 분화 관련 성장조절제의 선발 및 효능검정	한우 근육발달 및 분화관련 호르몬 확보 및 효과연구	100%
	한우 근육발달 및 분화관련 성장조절제 확보 및 효과연구	100%
	한우 근육발달 및 분화관련 성장조절제 및 호르몬이 한우 초대배양 태아 체세포의 성장·발달 및 분화에 미치는 영향을 세포생물학적방법을 이용하여 조사	100%

2. 2차년도 연구과제의 연구개발목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

2차년도 연구과제의 연구개발목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도는 표 11.과 같다.

표 11. 2차년도 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

목표	평가착안점	달성도
한우 태아 체세포의 불멸화 유도 및 체세포주의 <i>in vitro</i> 수명측정	세포생리적조절을 통한 자발적 불멸화 유도	100%
	세포분열촉진유전자의 과발현을 통한 불멸화 유도	100%
	세포무한분열유도유전자의 과발현을 통한 불멸화 유도	100%
	세포분열억제유전자의 발현억제에 의한 불멸화 유도	100%
한우 태아 체세포주 확립에 관련된 유전자의 클로닝 및 발현조절벡터의 구축	한우 체세포주 확립에 관련된 유전인자의 클로닝	100%
	한우 체세포주 확립에 관련된 유전인자의 발현조절벡터의 구축	100%
한우 태아 체세포주의 성장 및 근육세포로의 분화에 미치는 성장조절제의 효능규명	한우 근육발달 및 분화관련 성장조절제 및 호르몬이 한우 태아 체세포주의 성장·발달에 미치는 영향을 세포생물학적방법을 이용하여 조사	100%
	한우 근육발달 및 분화관련 성장조절제 및 호르몬이 한우 태아 체세포주의 분화에 미치는 영향을 세포생물학적방법을 이용하여 조사	100%
	근육성장·발달 및 분화 marker 유전자의 발현 양상확인	100%

3. 3차년도 연구과제의 연구개발목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

3차년도 연구과제의 연구개발목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도는 표 12.과 같다.

표 12. 3차년도 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

목표	평가착안점	달성도
한우 태아 근육유래 체세포주의 유전자 프로그램 및 세포특성 규명하고 근육성장 및 분화관련유전자의 발현이 한우 태아 체세포주의 성장 및 근육세포 분화에 미치는 효과 규명	세포분열조절인자의 작용양상을 규명	100%
	세포의 성장 및 분화양상을 비교	100%
	확립된 체세포주가 단순히 세포수명이 연장된 세포인지 또는 암세포의 특성을 가지는 형질전환 (transformation)된 세포인지를 세포유전학적 방법을 통해 규명	100%
	근육세포 분화유도 유전자의 과발현에 의해 전변된 근육-특이적 세포주가 근육세포 분화실행 인자들에 의해 완전한 근육세포로 분화되는 것을 규명하고 근육세포로 분화되는 시기에 세포내 근육세포 분화관련 유전자의 발현양상을 규명	100%
근육성장 및 분화관련 유전자의 클로닝 및 발현조절백터의 구축	한우 증체 및 육질 관련 경제형질유전자 클로닝	100%
	한우 증체 및 육질 관련 경제형질유전자의 발현조절백터의 구축	100%
한우 태아 체세포주의 성장 및 근육세포 분화에 영향을 미치는 다양한 성장조절제들의 상호효능 규명하고 한우 태아 체세포주에서 지방세포로의 전변에 관련된 성장조절제들의 선발	성장조절제들의 복합처리방법을 통해 한우 태아 체세포주의 성장·발달 및 분화에 영향을 미치는 상호작용 효능규명	100%
	한우 태아 체세포주를 지방세포로 분화유도 가능한 성장조절제들의 선발	100%

제 2 절 기술발전 기여도

본 연구에서는 한우의 태아 근육조직에서 유래한 체세포를 분리, 초대배양하여 연속적인 계대배양을 통해 자연적으로 세포의 불멸화 특성을 획득한 세포주의 개발과 함께, 염색체말단(telomere)의 길이를 유지할 수 있는 유전자인 telomerase가 지속적으로 발현할 수 있도록 하거나 세포분열을 지속적으로 촉진할 수 있는 p53DD와 같은 단백질들의 발현유도를 통해 인위적인 불멸화를 유도함으로써 세포수준에서 영구적으로 고유한 동물소재자원인 한우를 유지할 수 있었다. 또한 다양한 근육성장 및 분화 관련 유전자들을 클로닝하고 발현 벡터 시스템을 구축하여 확립된 불멸화세포주에 형질전환을 통해 근육세포로 전변될 수 있는 세포주를 구축함으로써 한우 태아 근육발달을 연구할 수 있는 in vitro model system을 구축했으며 구축된 세포 model에서 여러 가지 성장조절제의 효능 검증을 통하여 최적 생리활성물질을 선별할 수 있었다. 또 본 연구를 통하여 MyoD유전자가 불멸화 과정에서 자연적으로 야기되는 p53과 Rb pathway 소실을 극복하고 한우 태아 체세포를 근육전구세포로 전변시킬 수 있음을 새로 밝혔고, MRF4가 한우 태아의 myotome 형성과정에 세포증식을 촉진하는 새로운 기작을 밝혔다.

본 연구를 통해 축적된 동물세포주의 불멸화와 관련한 제반 기술과 자원은 앞으로 이러한 기법을 이용한 보다 다양한 생물종에서의 산업적으로 유용한 불멸화세포주의 개발의 초석이 될 것으로 확신하며, 본 연구의 성공적 결과는 향후 세포배양기법을 통해 한우의 근육성장발달을 연구하는 새로운 in vitro model system이 될 수 있고 한우의 근육발달을 촉진하는 유용한 사료 첨가제들을 선별할 수 있는 도구로 한우산업의 활성화를 위한 기반기술 확충에 기여하였다고 판단된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구를 통해 개발된 한우 태아 유래의 불멸화세포주인 1) BEFS, 2) BEF-p53DD, 3) BEFT와 근육성장 및 발달관련 유전자들을 도입한 세포주들은 향후 근육발달을 연구하는 *in vitro model system*으로 사용할 수 있으며 또한 이를 이용하여 다양한 근육생리 조절제들을 선별하여 한우사육에 응용함으로써 한우산업의 활성화에 크게 기여할 수 있을 것이다. 이들 산물의 활용분야를 보면 아래와 같다.

1. 불멸화된 한우 태아 체세포주의 활용

본 연구를 통해 구축된 불멸화 한우 태아 체세포주 (한우 태아 유래)는 정상세포주에 가까운 특성을 나타내면서 무한증식 할 수 있는 장점을 보유하고 있으므로, 현재까지 자연적인 세포의 경우 그 수명의 유한성에 의해 연구에 많은 제약이 있었던 근육의 성장 및 발달을 연구에서의 *in vitro model*로 활용할 수 있다.

2. 불멸화유도기술 및 불멸화유도 관련 유전자의 활용

본 연구를 통해 축적된 동물세포의 불멸화에 관련된 기술 및 본 연구를 통해 구축한 불멸화유도 관련 유전자 생산 벡터 시스템은 향후 다른 생물종 또는 다른 기관 유래의 *primary cell*을 이용하여 불멸화세포주를 개발하려는 연구에 있어서 중요한 기초자료로써 활용할 수 있다.

3. 근육분화 기술 및 근육발달 관련 유전자들의 활용

본 연구를 통해 클로닝된 근육성장 및 분화 관련 유전자들은 불멸화한우 태아 체세포에 도입하여 근육분화 및 발달을 연구하는 *in vitro model* 사용할 수 있을 뿐만 아니라 유전자 자체의 새로운 기작연구에 광범위하게 활용될 수 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

세포 불멸화기전에 대한 연구는 다양한 세포생물학 및 생리학 분야에서 활발하게 진행되고 있으나 본 연구의 최종목표인 다양한 성장조절제의 효능을 검증할 수 있는 한우 근육 불멸화 세포주는 아직 국내외적으로 개발된 바가 없다.

Yaffe에 의하여 초대배양세포에서 처음으로 근육분화가 관측된 지 40년이나 지났지만 현재까지 근육관련 체세포주는 설치류에서 확립된 2 종류의 세포주와 메추리에서 확립된 1종류의 세포주만 보고되고 있다. 그 원인은 근육세포와 같은 기능성 세포는 세포 자체의 기본 생리적 특성 (근육세포의 특성 보유)과 세포분열특성 (일정 회수의 세포분열 후 세포성장이 억제되고 분열이 억제된 세포들의 융합에 의해 근육세포가 형성이 됨)을 가지고 있는 독특한 세포생리·생화학적 성격을 가지고 있기 때문이다. 따라서 이러한 특성이 세포배양기법 측면에서 연구의 발전을 저해하고 있었다.

또한 세포배양학적 측면에서 정상적인 체세포는 일정 수의 세포분열 후 세포의 성장이 멈추는 세포 노화 단계에 도달하기 때문에 무한하게 증식할 수 없다. 반면에 정상체세포는 일연의 유전적 변이에 의해 세포 노화 단계를 벗어나 궁극적으로 지속적으로 분열 증식할 수 있는 불멸화세포로 전변이 될 수 있다. 이러한 유전적 변이에는 보편적인 p53과 p16^{INK4a} pathway 소실이 포함되고 있다(Sherr와 DePinoh, 2000). 최근 연구에서 p53과 p16^{INK4a}은 근육세포의 분화에 밀접한 관계가 있다고 발표되었다(Puri 등, 2002; Falco 등, 2006).

보편적으로 근육의 발달은 muscle regulator factor(MRF)들에 의하여 조절된다고 알려지고 있다. MRF들에는 MyoD, myogenin, Myf5, 와 MRF4가 잘 알려지고 있다. 이런 MRF들을 여러 종류의 세포들에 과발현시키면 근육으로 분화된다. 최근 연구에 의하면 MyoD가 직접 p53의 하부유전자인 p21^{Waf1}의 promoter에 작용하여 p21^{Waf1}의 발현을 조절한다고 발표되었다 (Gao 등, 2006). 이러한 최근 연구 결과에 근거하여 MyoD를 p53과 p16^{INK4a} pathway 소실된 한우 태아 체세포에 과발현시킴으로써 근육으로 분화되는 한우 태아 체세포를 확보할 수 있었다.

또한, 최근 MRF4가 mouse에서 태아의 myotome에서 일시적으로 발현한다고 발표된 적이 있다(Kassar-Duchossoy, 2004). 그러나 그 기능이 잘 밝혀지지 않고 있었다. 본 연구에서 MRF4를 불멸화된 한우 태아 체세포주에 도입함으로써 MRF4가 세포분열을 촉진하는 기능을 한다는 새로운 사실을 밝혔다.

제 7 장 참고문헌

Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., Wright, W.E. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. 1998, *Science*, 279:349-352.

Campisi, J. From cells to organisms: Can we learn about aging from cells in culture? *Experimental Gerontology*, 2001, 36:607-618.

Cao, Y., Kumar, R.M., Penn, B.H., Berkes, C.A., Kooperberg, C., Boyer, L.A., Young, R.A., and Tapscott, S.J. Global and gene-specific analyses show distinct roles for Myod and Myog at a common set of promoters. *EMBO*, 2006, 25: 502-511.

Dickson, M.A., Hahn, W.C., Ino, Y., Ronfard, V., Wu, J.Y., Weinberg, R.A., Louis, D.N., Li, F.P., Rheinwald, J.G. Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. 2000, *Molecular and Cellular Biology*, 20:1436-1447.

Falco, G.D., Comes, F., Simone, C. pRb: master of differentiation. Coupling irreversible cell cycle withdrawal with induction of muscle-specific transcription. 2006, *Oncogen*, 25, 5244 - 5249.

Greider, C.W., Blackburn, E.H. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. 1989, *Nature*, 337:331-337.

Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M.W., Weinberg, R.A. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. 1999, *Nature*, 400:464-468.

Hahn, W.C., Dessain, S.K., Brooks, M.W., King, J.E., Elenbaas, B., Sabatini, D.M., DeCaprio, J.A., Weinberg, R.A. Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation. 2002, *Molecular and Cellular Biology*, 22:2111-2123.

Hayflick, L., Moorhead, P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 1961, 25:585-621.

Itahana, K., Dimri, G., Campisi, J. Regulation of cellular senescence by p53. 2001, *European Journal of Biochemistry*, 268:2784-2791.

Jeon, S.Y., Kong, B.W., Foster, D.N., You, S., Kim, H., The role of MnSOD and catalase in response to antimycin A induced oxidative stress in immortal DF-1 cells. Manuscript submitted, 2004.

Kassar-Duchossoy, L., Gayraud-Morel, B., Gomes, D., Rocancourt, D., Buckingham, M., Shinin, V., Tajbakhsh, S. Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. *Nature*, 2004, 431:466-471.

Kim, H., Farris, J., Christman, S.A., Kong, B.W., Foster, L.K., O'Grady, S.M., Foster, D.N. Events in the immortalizing process of primary human mammary epithelial cells by the catalytic subunit of human telomerase. *Biochemical Journal*, 2002b, 365:765-772.

*Kim, H., *You, S., Farris, J., Foster, L.K., Choi, Y.J., Foster, D.N. Gonad-specific expression of two novel chicken complementary deoxyribonucleic acid isoforms. *Biology of Reproduction*, 2001h, 64:1473-1480.
*These authors contributed equally in this study.

*Kim, H., *You, S., Farris, J., Foster, L.K., Choi, Y.J., Foster, D.N. Gonad-specific expression of two novel chicken complementary deoxyribonucleic acid isoforms. *Biology of Reproduction*, 2001h, 64:1473-1480.
*These authors contributed equally in this study.

Kim, H., You, S., Farris, J., Kong, B.W., Christman, S.A., Foster, L.K., Foster, D.N. Expression profiles of p53, p16^{INK4a} and telomere regulating genes in the replicative senescent human, mouse and chicken fibroblast cells. *Experimental Cell Research*, 2001a, 272:199-208.

Kim, H., You, S., Foster, L.K., Farris, J., Choi, Y.J., Foster, D.N. Differential expression of chicken dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor-1 (DcoH) and its novel counterpart, DcoH. *Biochemical Journal*, 2001g, 354:645-653.

Kim, H., You, S., Kong, B.W., Foster, L.K., Farris, J., Foster, D.N. Necrotic cell death by hydrogen peroxide in immortal DF-1 CEF cells expressing deregulated MnSOD and catalase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001f, 1540:137-146.

Kim, H., You, S., Kim, I.J., Farris, J., Foster, L.K., Foster, D.N. Increased mitochondrial-encoded gene transcription in immortal DF-1 cells. *Experimental Cell Research*, 2001e, 265:339-347.

Kim, H., You, S., Kim, I.J., Foster, L.K., Farris, J., Ambady, S., Ponce de Len, F.A., Foster, D.N. Alterations in p53 and E2F-1 function common to immortalized chicken embryo fibroblasts. *Oncogene*, 2001b, 20:2671-2682.

Kim, H., You, S., Farris, J., Foster, L.K., Foster, D.N. The rapid destabilization of p53 mRNA in immortal chicken embryo fibroblasts. *Oncogene*, 2001c, 20:5118-5123.

Kim, H., You, S., Kim, I.J., Farris, J., Foster, L.K., Foster, D.N. Post-transcriptional inactivation of p53 in immortalized murine embryo fibroblast cells. *Oncogene*, 2001d, 20:3306-3310.

Kong, B.W., Kim, H., Foster, D.N. Expression analysis and mitochondrial targeting properties of the chicken manganese-containing superoxide dismutase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1625:98-108.

Kong, B.W., Kim, H., Foster, D.N. Cloning and expression analysis of chicken phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. *Animal Biotechnology*, 2003, 14:19-29.

Mauro, L.J., Foster, D.N. Regulators of telomerase activity. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2002, 26:521-524.

Puri, P.L., Bhakta, K., Wood, L.D., Costanzo, A., Zhu, J. and Wang, J.Y. A myogenic differentiation checkpoint activated by genotoxic stress. *Nat. Genet.* 2002, 32:585-593.

Sherr, C.J., DePinho, R.A. Cellular senescence: Mitotic clock or culture shock? *Cell*, 2000, 102:407-410.

Yaffe, D. (Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1968, 61: 477-483.