

최	종
연구	보고

형질전환토끼의 생산을 위한 효율적인 유전자
이식 방법의 개발

Development of Efficient Gene Transfer
Methods for Transgenic Rabbit Production

토끼 Embryonic Stem Cell System의 개발

(제 1 세부과제)

Development of Rabbit Embryonic Stem Cell System

DNA 미세주입법에 의한 형질전환토끼의 생산

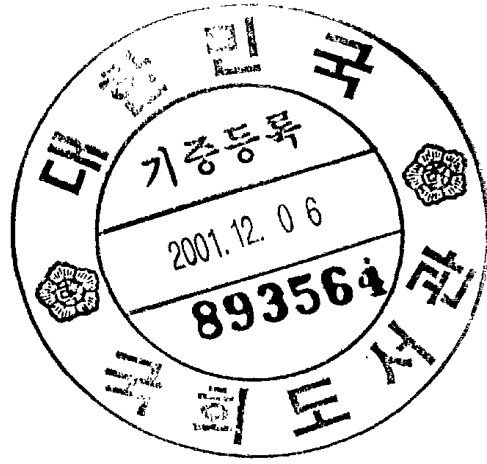
(제 2 세부과제)

Production of Transgenic Rabbit by DNA
Microinjection

연구기관

선문대학교(서울대학교)

농 립 부



최 종 보 고 서

1996년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 형질전환토끼의 생산을 위한 효율적인 유전자이식 방법의 개발에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부

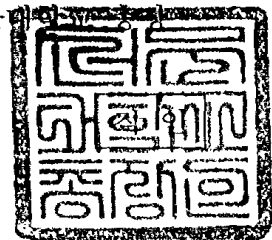
2. 최종보고서 디스켓 1매

2001 년 10 월 30 일

주관연구기관 : 신문대학교

총괄연구책임자 : 진 동 일

주관연구기관장 : 신문대



농 립 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “형질전환토끼의 생산을 위한 효율적인 유전자이식 방법의 개발”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001 년 10 월 30 일

주관연구기관명: 선문대학교

총괄연구책임자 : 진동일

세부연구책임자 : 진동일

연 구 원 : 정구민

최화식

협동연구기관명: 서울대학교

협동연구책임자 : 박영일

협동연구기관명: 서울대학교

협동연구책임자 : 임경순

요 약 문

I. 제 목

형질토끼의 생산을 위한 효율적인 유전자이식 방법의 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

가축에 유용유전자를 직접 이식하여 형질전환가축을 생산함으로써 종래의 선발 육종방법에 의한 형질의 개량보다 훨씬 빠른 유전적 개량을 이룩할 수가 있고 가축집단 내에 새로운 유전 변이를 창출할 수가 있으며 전통적인 교미방법으로는 가능하지 않은 다른 종간의 유전정보의 교환이 가능하다. 또한 각 가축의 Embryonic Stem Cell의 배양이 가능하게 되면 능력이 좋은 가축의 복제가 무한정 가능할 뿐만 아니라 생쥐에서 이용되고 있는 homologous recombination 방법에 의해서 가축에서도 무용유전자를 제거하고 유용유전자를 끼워 넣을 수 있게 된다. 이러한 장점에도 불구하고 아직까지 유전자 이식방법을 이용한 가축개량이 실용화 되지 못하고 있는데 이는 현재의 유전자 이식방법은 효율이 낮아서 형질전환가축을 생산하는데 많은 비용과 노력이 필요하다. 또 실제 이용 가능한 유용유전자가 많이 밝혀져 있지 않았을 뿐더러, 알려진 유전자를 이용하여 형질전환동물을 만들었다하더라도 실제 그 유전자가 발현함으로써 발생하는 체내의 생리적인 효과에 대해서 정확하게 예측할 수가 없다. 그러므로 축산분야에서 유전자이식을 실용화하기 위해서는 형질전환가축을 생산하는 효율을 증가시키는 방법을 개발하고 실지 경제형질의 개량을 위해 경제형질에 관련된 유전자들을 찾아내어 그 유용성을 밝혀야 한다. 동물의 유전자이식 기술은 분자유전학, 발생학, 번식생리학 등의 기초학문에 기반을 두고 발전하고 있다. 이러한 유전자기술을 이용하여 농업의 생산성을 향상시킴으로써 WTO 등에 의해 어려운 상황에 놓여 있는 우리나라 농업의 경쟁력을 강화시키는데 기여할 수 있고 실제 첨단기술을 가축생산에 응

융합으로써 농업의 지위를 향상시키고 아울러 첨단산업으로서 농업의 중요성을 인식 시킴으로써 농업에 지속적인 투자를 유발할 수 있다.

현재 이용되고 있는 생쥐의 형질전환기술과 Embryonic Stem Cell system은 미국과 유럽에서 개발되었는데 생쥐의 실험동물로서의 가치를 대신 할 수 있는 토끼의 형질전환기술의 효율을 높이고 Embryonic Stem Cell system을 개발함으로써 생쥐 위주의 실험이 토끼 위주의 실험으로 대체될 것이며 이러한 기술을 의학분야와 기초분야에 제공될 것이다. 초자원을 이용하는 축산물로서 토끼를 고급모피와 육단백질을 효율적으로 생산하는 가축으로 개량하는데 선구적인 역할을 할 수 있을 것이고 또한 다른 가축에서 형질전환기술을 이용하는데 기초 자료를 제공할 것으로 기대된다.

본 연구에서는 토끼를 이용하여 첫째 아직 정립되어 있지 않은 Embryonic Stem Cell을 확립하고 Chimeric 토끼를 만들어 미분화상태와 Germline Transmission을 확인하고 이를 이용하여 유전자조작이 가능하도록 확립된 토끼의 Embryonic Stem Cell의 Genomic DNA Library를 만들어 토끼의 유전자 조작이 가능하도록 토끼의 완벽한 Embryonic Stem Cell system을 만들고자 한다. 토끼의 Embryonic Stem Cell system의 확립은 토끼 자체의 유전적 개량을 위해서 이용될 수 있을 뿐만 아니라 다른 가축에서 Embryonic Stem Cell을 확립하는데 중요한 Factor들을 제공해 줄 수 있을 것이며, 의학분야와 기초과학분야에서 실험동물로서 토끼의 이용성을 훨씬 더 확대시킬 것으로 사료된다. 둘째 DNA 미세주입법에 의해 Growth Hormone Receptor와 Insulin-like Growth Factor Receptor를 과잉발현하는 형질전환토끼를 생산하고자 한다. 토끼에서 DNA 미세주입법의 적합한 조건등을 확립하여 전반적인 형질전환토끼의 생산효율을 높이고 또한 성장과 관련된 형질전환토끼를 생산하여 실용화를 이룩하고자 한다. 특히 Hormone이나 Growth Factor를 이용한 형질전환동물의 경우 심각한 부작용을 나타내어 실용화 할 수 없는 것으로 보고되고 있으므로 본 연구에서는 실제 체내에서는 Hormone이나 Growth Factor등은 이들의 세포내 Receptor보다 molar ratio면에서 훨씬 많이 분비되고 있는 점을 착안하여 이들의 Receptor를 세포내에 과잉 발현시킴으로써 부작용을 최소로 줄이고 Receptor를 통한 신호전달체계(Signal Transduction)를 증폭시켜 성장의 효과를 얻고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구의 목표는 토끼의 유전자이식 기술을 완벽하게 개발하는데 있다. 각 세부 과제별 연구내용은 제 1 세부과제에서 토끼 Embryonic Stem Cell System의 개발하여 토끼의 Embryonic Stem Cell을 확립하며 Chimera와 Germline Transmission으로 미분화성(Pluripotency)을 분석하고 토끼 Embryonic Stem Cell의 Genomic DNA Library를 만드는 것이다. 제 2 세부과제에서는 DNA 미세주입법에 의해 Growth Hormone Receptor와 Insulin-like growth Factor Receptor를 여분으로 갖는 형질전환토끼를 만들고 그 생산효율을 향상시키는 조건을 확립하며 생산된 형질전환토끼의 형질을 정량적으로 분석하고 두개의 유전자를 함께 가진 double 형질전환토끼를 생산하여 두 유전자의 상호성을 검사하는 것이다. 각 세부과제 별 연구내용 및 범위는 다음과 같다.

제 1 세부과제 : 토끼 Embryonic Stem Cell System의 개발

- feeder cell의 확보

- 기존의 mouse embryonic fibroblast와 STO-LIF cell line 확보
- rabbit embryonic fibroblast cell line을 임신 10, 15, 20일령의 fetus로부터 확립

- 토끼 embryo 채취와 이식 기술 연구

- 과잉배란과 발정동기화를 유발시키기 위한 hormone 처리계획 확립
- 토끼 1-cell 수정란과 blastocyst 수정란의 채취시기 선정
- 수정란 이식을 위한 최적의 시기와 부위 설정

- 토끼 Embryonic Stem Cell 분리

- 각 feeder별로 blastocyst embryo 배양후 Stem Cell 분리
- 분리된 Stem Cell의 조직학적 관찰과 세포분열 상태를 정량적으로 측정
- 분리된 Stem Cell의 Embryoid body 형성과정 추적

- mouse ES cell 분리
 - mouse feeder를 이용하여 C57BL/6 mouse의 blastocyst embryo 배양
 - Mouse Embryonic Stem Cell 분리 및 분석

- 토끼 Embryonic Stem Cell의 확립
 - 분리된 Embryonic Stem Cell의 passage number에 따른 미분화상태 조절에 대한 연구
 - 분리된 Embryonic Stem Cell의 Chromosome Karyotyping과 Sexing
 - 미분화, 분화된 Embryonic Stem Cell의 유전자 발현차이 규명

- Chimera 토끼의 생산
 - 확립된 Embryonic Stem Cell의 blastocyst 수정난의 blastocoel로의 주입
 - Embryonic Stem Cell과 Zona Pellucidea를 제거한 초기 수정난의 aggregation에 의한 Chimera 시도

- Germline Transmission 확인
 - Chimera토끼에서 Embryonic Stem Cell의 생식세포 형성 기여도 측정
 - Back-cross에 의한 Embryonic Stem Cell을 얻은 original 토끼품종 생산

- 토끼 Embryonic Stem Cell의 Genomic DNA Library 구축
 - 토끼 Embryonic Stem Cell DNA의 추출과 Lambda phage vector 구축
 - Ligation과 in vitor packaging
 - 구축된 Genomic Library의 Amplification

제 2 세부과제 : 형질전환토끼의 생산

- Growth Hormone receptor와 Insulin-like Growth Factor Receptor의 이식유전자 구축
 - Metallothionein promoter에 Growth Hormone Receptor와 Insulin-like Growth Factor Receptor sequence를 접합
 - 3' 쪽에 SV40 Intron과 Poly(A) Signal을 접합

- 토끼 수정란 배양액의 선정
 - 토끼의 1-cell의 수정란과 Blastocyst의 수정란을 위한 배양액 선정
 - 각 수정란 배양액에서 토끼 수정란과 생쥐 수정란의 발육을 측정

- DNA 미세주입
 - mouse FVB line의 1cell 수정란에 DNA 주입
 - New Zealand White, Californian, Rex등의 1-cell 수정란의 전핵에 DNA 주입후 생존성 관찰
 - 주입 DNA의 copy number, volum 등의 주입조건에 따른 생존성 관찰

- 형질전환생쥐의 생산과 분석
 - founder 생쥐와 F₁의 생산
 - 형질전환생쥐의 Phenotype 관찰 및 분석

- 형질전환토끼의 생산과 번식
 - DNA 미세주입법에 의해 태어난 새끼들의 DNA 검사 - PCR, Southern Blot
 - Founder토끼의 이식유전자의 copy number 추정
 - Founder토끼의 번식과 이식유전자의 다음 세대로의 전달 관찰

- 형질전환토끼에서 이식유전자의 발현측정
 - 형질전환토끼의 각 장기별로 RNA를 추출하여 Northern Blot 분석

- 각 Receptor의 antibody를 이용하여 이식유전자의 발현상태를 정량적으로 분석
- 형질전환토끼의 표형형 관찰
 - 형질전환동물의 성장율, 일당증체량, 사료효율, 번식율 등을 측정
 - 신체 구성성분의 구성비율 측정
 - 병리학적, 조직학적 상태 관찰
- Growth Hormone Receptor와 Insulin-like Growth Factor Receptor를 함께 가진 double 형질전환토끼의 생산
 - Growth Hormone Receptor를 가진 형질전환토끼와 Insulin-like Growth Factor를 가진 형질전환토끼의 교배에 의한 double 형질전환토끼의 생산
 - double 형질전환토끼의 표현형을 single형질전환토끼와 비교 정량적 분석
 - Growth Hormone과 Insulin-like Growth Factor의 신호전달체계 연구

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

1) Embryonic Stem Cell을 위한 feeder cell line 개발도 토끼의 태아로부터 embryonic fibroblast cell line을 확립시킬 수 있었고 생쥐의 embryonic fibroblast cell line과 STO cell line도 확보된 상태이다. 토끼 수정난의 체란과 배양, 이식 등의 연구는 잘 수행되고 있으며 이미 수정난을 채취하여 recipient 토끼에 이식하여 새끼를 얻어 토끼 수정난 이식기술의 기초를 확립하였는데 토끼 one-cell embryo를 expanded blastocyst까지 배양하는데 기존의 배양액 보다 효율적으로 배양시킬 수 있는 RDH medium을 개발하였다.

2) 토끼 ES cell을 분리하여 놓았고 이 토끼 ES cell의 세포분열상태 및 분화를

분석하여 Embryoid body로의 분화과정을 유도하여 이 토끼 ES cell이 stem cell임을 증명하였다. 아울러 생쥐의 ES cell을 분리하여 ES cell을 확립하는 총체적 기술을 확립하여 놓았다.

3) 분리해 놓은 토끼 ES cell을 이용하여 passage number 및 반복적인 freezing을 하여도 미분화상태가 유지되는 것을 확인하였다. 또한 karyotyping을 실시하여 염색체 분석을 완료하였으며 이를 통해 토끼 ES cell의 sex를 규명하였고 분화된 상태를 유도하여 미분화 상태와의 protein pattern을 분석하였다.

4) New Zealand White종으로부터 분리해 놓은 토끼 ES cell을 이용하여 순종 Dutch Belted종의 수정란에 주입한 후 Recipient에 이식하여 Dutch Belted종 모피의 검은색 띠가 albino로 희석된 모양을 지닌 Chimera토끼를 생산하였다. 또한 Chimera 토끼를 New Zealand White종과 교배시켜 ES cell로부터 New Zealand White새끼가 태어나는 지를 확인하였다. 그러므로 본 연구에서 분리된 ES cell이 미분화상태인 것을 확인하였다.

5) 확립된 토끼 ES cell의 유전자조작을 위한 기반구축으로 토끼 genomic library를 구축하였으며 아울러 유전자적중을 위한 vector를 구축하였다.

6) 형질전환토끼의 생산을 위한 유전자를 모두 확보하여 Green Fluorescent Protein(GFP)유전자를 CMV나 Actin promoter에 재조합시켜 construction은 완성되었고 MT promoter에 GH-R 및 IGF-1R유전자의 재조합을 완성하였다.

7) CMV_{promoter}-GFP DNA를 이용하여 수정란의 전핵에 미세주입후 체외에서의 이식효율과 recipient에 이식하여 태아에서의 형질전환을 등을 분석하였다. 또한 생쥐 수정란의 DNA 미세주입도 함께 실시하여 토끼와 생쥐에서 DNA 미세주입법을 확립하여 놓았다.

8) 이미 구축된 MT-IGF-1R(IGF-1 receptor)와 MT-GHR(Growth hormone receptor) 유전자를 DNA microinjection을 이용하여 DNA를 미세주입 후 recipient에 이식하여 토끼새끼를 얻어 DNA 분석 후 형질전환토끼를 생산을 확인하였다. 형질전환토끼의 확인은 토끼의 귀 조직으로부터 DNA를 추출하여 MT-IGF-1R와 MT-GHR DNA의 specific primer를 이용하여 PCR 반응과 IGF-1R과 GHR specific probe로 Southern blotting에 의해 확인하였다. 또한 같은 DNA를 microinjection 하여 형질전환생쥐를 생산하였으

며 이에 대한 증체효과를 분석하였다.

9) IGF-1R(IGF-1 receptor)와 GHR(Growth hormone receptor) 유전자를 가진 형질 전환 토끼를 이용하여 Northern blotting으로 이식유전자의 발현을 검사하였으며 형질전환토끼의 증체율 및 장기별 무게 등의 표현형을 관찰하였다. 본 연구에서 생산된 형질전환토끼가 대조구에 비해 증체효과를 가진 것으로 분석되었다.

10) Growth Hormone receptor(GHR)를 가진 형질전환토끼와 IGF-1 receptor (IGF-1R)를 가진 형질전환토끼를 교배시켜 새끼를 얻고 두유전자를 함께 지닌 double 형질전환토끼를 생산하였다.

11) double 형질전환토끼의 성장률은 비형질전환토끼보다는 30%정도 빠르고, GHR 이나 IGF-1R 형질전환토끼보다 10-15% 정도 빠른 경향을 나타내고 있다.

2. 활용 방안

1) 토끼 Embryonic Stem Cell system의 선구적 역할: 현재 생쥐의 Embryonic Stem Cell만이 이용 가능한데 토끼의 Embryonic Stem Cell이 개발됨으로써 이 분야에 우위성을 차지할 것으로 기대된다.

2) 유전자 이식기술에 의해 성장과 관련된 형질전환 토끼의 생산: Growth Hormone Receptor와 Insulin-like Growth Factor Receptor를 여분으로 갖는 형질전환토끼를 얻고 성장과 관련된 표현형의 발현시 부작용으로 인한 유해 형질의 발현이 최소화 될 것으로 예상된다.

3) 실험동물로서 토끼의 가치 향상: 현재 기초과학분야와 의학분야에서 분자유전학 또는 유전공학의 실험으로 많이 이용되고 있는 생쥐 대신 토끼에서 본 연구의 결과에 의해 유전자 이식과 조작이 가능해짐에 따라 토끼의 이용성이 증대될 것으로 기대된다.

4) 형질전환토끼를 생산하기 위한 효율성 증진: 현재 형질전환토끼를 생산하는데 효율은 1% 이하로써 본 연구가 진행됨에 따라 그 생산효율이 증대될 것이다.

5) 다른 중소가축 또는 대가축에서 유전자 이식기술 개발을 위한 자료제공: 토끼에서

유전자 이식기술은 다른 가축보다 훨씬 앞서 갈 것이고 이러한 토끼에서의 응용기술은 다른 가축의 유전자 이식기술의 개발에 모델이 될 것이다.

6) 성장과 관련된 유전적, 생리적 기작의 연구: Growth Hormone Receptor와 Insulin-like Growth Factor Receptor를 가진 형질전환토끼는 성장과 관련된 기작의 연구에 이용될 것이며 이와 관련된 과학적인 사실들이 밝히는데 이용될 것이다.

SUMMARY

Rabbit has a value as a important agricultural animal to provide meat, wool and fur and a laboratory animal in the field of medicine and basic sciences. However, the biotechniques such as transgenesis and nuclear transplantation in rabbit is not well established yet for application to improvement of economic trait or experimental purpose. Present obstacle for the utility of transgenic technology in rabbit is the low efficiency of transgenic rabbit production resulted in improper conditions of gene transfer and unsettled procedures for embryo manipulation. The increase in efficiency of transgenic rabbit production would allow to apply transgenic technique to rabbit breeding or laboratory tool.

This project was designed to develop the efficient system of transgenic rabbit production by establishment of rabbit ES cells and DNA microinjection of Growth Hormone Receptor and Insulin-like Growth Factor Receptor genes fused to MT promoter as transgenes for this study.

As this project progresses, techniques for the production of transgenic rabbits will be established and efficiency of transgenic rabbit production will be improved to provide transgenic technology for rabbit breeding and other applied research fields.

1. Establishment of rabbit ES cells

The objective of this study is to isolate and culture rabbit embryonic stem(ES) cells with pluripotency and to characterize them by studying differentiation process. For isolation of rabbit embryonic stem cells, one-cell embryos were flushed and cultured to blastocyst in vitro and stem cells were isolated from inner cell mass (ICM). Feeder cells for co-culture used were

mouse embryonic fibroblasts (MEFs), rabbit embryonic fibroblasts (REFs), and STO cell expressing leukemia inhibitory factor gene (SNL) feeder cells. MEFs were revealed to be most efficient in isolation of rabbit ES cells. Isolated rabbit ES-like cells were grown into colony of round shape and the surrounding of colonies was grown without any differentiated cells. These appearances were continuously maintained in 3-5 times passaging culture after freezing preservation in liquid nitrogen. As a result, isolated rabbit ES-like cells were identified as stem cells.

When isolated rabbit ES cells were cultured on ungelatinized culture dishes, ES cells were proliferated to suspension state forming cavity in the interior and differentiated into a typical embryoid body appearance with ectoderm and endoderm suggesting that isolated ES cells were stem cells with undifferentiated state. Alkaline phosphatase which is presented in undifferentiated cells but rapidly lost upon differentiation was used to isolated rabbit ES cell and its activity was measured. By activity of alkaline phosphatase, substrate was dissolved, stained into violet and ES cells were revealed to express strong alkaline phosphatase activity, so identified as undifferentiated stem cells. Feeder cells used as control were not shown to be stained at all revealing without activity of this enzyme.

To investigate the expression patterns of proteins in differentiated rabbit ES cells, ES cells of confluent state grown on feeder layer and differentiated cells into embryoid bodies without feeder cell were applied to protein gel electrophoresis. The 60 kDa protein was expressed only in differentiated cells.

Rabbit ES cells were tested for pluripotency by making chimera rabbits. ES cells were injected into blastocoel cavity of Dutch belted blastocysts and transferred into uterus of recipients. Eight chimeric rabbit were produced and backcrossed with New Zealand White rabbits. And three albino (New Zealand White) pups were born from backcrossing conforming that isolated rabbit ES

cells were pluripotent.

And rabbit genomic library and efficient targeting vector were constructed to modify rabbit genome using ES cell system./

2. Production of transgenic rabbit by DNA microinjection

To produce transgenic rabbits with GH receptor (GHR) and IGF-I receptor (IGF-1R) genes, DNA was microinjected into rabbit one cell embryos, and embryos were transferred into oviduct of foster mothers. Among founders born from the zygote injected with transgenes, transgenic rabbits were identified Chain Reaction (PCR) and Southern blot hybridization. Among 105 founders, 18 founders (17.1%) were transgenic rabbits with GHR and among 54 founders, 10 founders (18.5%) were transgenic rabbits with IGF-1R.

Transgenic rabbits with GHR (3.2%) showed the same transgenic overall efficiency as with IGF-1R (3.1%). The founder rabbits were mated to normal rabbits to produce transgenic progeny (F₁) and to identify transmission of transgene to progeny. Transgenic rabbit with GHR gene or IGF-1R gene were stably transmitted into germline and double transgenic rabbits can be produced.

Double transgenic rabbits were produced through the mating between IGF-I R and GHR single transgenic rabbits. Transmission pattern of double transgenic mice were almost the same as that of single transgenic rabbits.

The mRNA expression of transgenes using Northern blotting with probes of IGF-1R and GHR genes was checked in liver of transgenic rabbits. Transgenic rabbits with IGF-1R and GHR genes more expressed mRNA than control non-transgenic rabbits.

To identify the effects of transgenes on growth performance, body weight of transgenic rabbits was measured between 30 and 150 days after birth. Both single transgenic rabbits grew faster than non transgenic littermates. GHR

transgenic rabbit grew fast in young age while IGF-1R transgenic rabbit grew fast in purberty. Growth of double transgenic rabbits (IGF-1R/GHR) were fastest compared with transgenic rabbits containing IGF-1R and/or GHR genes.

These experiments showed that foreign gene such as GHR and IGF-1R could be incopotated efficiently into rabbit genome and transmitted successfully to progeny. The experiments demonstrated that these growth-related genes could constitutively promote growth of female and male rabbits and transgenic rabbits with these genes could be used as model animals for growth-related studies of other livestock animals.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction -----	1
1. Objectives of the Project -----	1
1-1. Technical Aspect -----	1
1-2. Economical & Industrial Aspect -----	4
1-3. Social & Cultural Aspect -----	5
2. Contents & Scopes of the Project -----	6
3. Current Status & Problems of the Related Technology -----	9
Chapter 2. Development of Rabbit Embryonic Stem Cell System -----	12
1. Introduction -----	12
2. Materials and Methods -----	15
3. Results and Discussion -----	28
4. Conclusion -----	60
5. References -----	62
Chapter 3. Production of Transgenic Rabbits by DNA Microinjection -----	65
1. Introduction -----	65
2. Materials and Methods -----	69
3. Results and Discussion -----	76
4. Conclusion -----	121
5. References -----	124

목 차

제 1 장 서론 -----	1
제1절 연구개발의 필요성 -----	1
1. 기술적 측면 -----	1
2. 경제·산업적 측면 -----	4
3. 사회·문화적 측면 -----	5
제 2 절 연구개발 내용 및 범위 -----	6
제 3 절 국내외 관련기술의 현황 및 문제점 -----	9
제 2 장 토끼 Embryonic Stem Cell System의 개발 -----	12
제 1 절 서설 -----	12
제 2 절 연구재료 및 방법 -----	15
제 3 절 연구결과 및 고찰 -----	28
제 4 절 결론 -----	60
제 5 절 참고문헌-----	62
제 3 장 DNA 미세주입법에 의한 형질전환토끼의 생산 -----	65
제 1 절 서설 -----	65
제 2 절 연구재료 및 방법 -----	69
제 3 절 연구결과 및 고찰 -----	76
제 4 절 결론 -----	121
제 5 절 참고문헌-----	124

제 1 장 서론

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

가. 유전자 이식기술 확립의 필요성

가축에 유용유전자를 직접 이식하여 형질전환가축을 생산함으로써 다음과 같은 효과를 얻을 수 있다. 첫째, 유용유전자를 직접 가축에 이식함으로써 종래의 선발 육종 방법에 의한 형질의 개량보다 훨씬 빠른 유전적개량을 이룩할 수가 있다. 둘째, 그동안 선발 육종으로 인해 실제 가축내 유전적 변이가 점차 작아져 선발효과도 적어지고 있는데 유전자이식을 이용함으로써 가축집단내에 새로운 유전 변이를 창출할 수가 있다. 셋째, 전통적인 교미방법으로는 가능하지 않은 다른 종간의 유전정보의 교환이 가능하다. 그러므로 어떤 동물의 유용유전자를 다른 가축의 개량에 이용할 수 있다. 넷째, 각 가축의 Embryonic Stem Cell의 배양이 가능하게 되면 능력이 좋은 가축의 복제가 무한정 가능할 뿐만 아니라 생쥐에서 이용되고 있는 homologous recombination 방법에 의해서 가축에서도 무용유전자를 제거하고 유용유전자를 끼워 넣을 수 있게 된다. 이러한 장점에도 불구하고 아직까지 유전자 이식방법을 이용한 가축개량이 실용화되지 못하고 있는데 그 이유는 다음과 같다. 현재의 유전자 이식방법은 효율이 낮아서 형질전환가축을 생산하는데 많은 비용과 노력이 필요하다. 가장 많이 이용되고 있는 DNA 미세주입법을 이용해서 생산된 가축의 전체효율은 1% 이하로 보고되고 있다. 가장 큰 문제점은 생쥐의 미세주입법을 그대로 가축의 미세주입법에 적용하고 있기 때문인 것으로 추정되는데, 그 효율을 최소한 생쥐에서의 효율인 5%

이상까지 높일 수 있을 것으로 사료된다. 최근 핵이식 방법에 의해 체세포를 이용하여 복제면양, 복제소, 복제생쥐의 생산기술이 보고됨에 따라 체세포를 이용한 복제동물의 생산이 가능해졌을 뿐만 아니라 체세포에 DNA를 transfection 시킨 후 핵이식을 통한 방법으로 형질전환동물의 생산이 가능하게 되었다(Campell et al., 1996; Willmut et al., 1997; Schieke et al., 1997; Cibelli et al., 1998; Wakayama, et al., 1998). 유선상피세포(mammary epithelium cell) 뿐만 아니라 섬유아세포(fetal fibroblast cell)의 핵을 공핵(donor nucleus)으로 이용하여 핵을 제거한 미수정란에 융합하여 체외배양시킨 후 발달한 수정란을 recipient에 이식하여 완전한 복제동물을 생산하였다. 이들의 방법은 이미 분화된 세포의 핵을 이용하고 있다는 면에서 기존의 발달초기 수정란의 할구(blastomere)를 공핵으로 이용하는 방법이나 Embryonic Stem cell과는 전혀 다른 방법이다. 특히 섬유아세포는 in vitro에서 배양이 가능하여 ES cell system에서와 같은 유전자의 조작이 가능할 것으로 예상되고 있다. 그러나 이러한 체세포 복제 방법은 가축의 종에 따라 그 효율성이 다른 것으로 보고된 것이 있는데 면양과 소에서는 다른 가축보다 상대적으로 높은 것으로 알려지고 있다.

또한 실제 이용 가능한 유용유전자가 많이 밝혀져 있지 않았을 뿐더러, 알려진 유전자를 이용하여 형질전환동물을 만들었다하더라도 실제 그 유전자가 발현함으로써 발생하는 체내의 생리적인 효과에 대해서 정확하게 예측할 수가 없다. 그러므로 축산 분야에서 유전자이식을 실용화하기 위해서는 형질전환가축을 생산하는 효율을 증가시키는 방법을 개발해야 하고 실지 경제형질의 개량을 위해 경제형질에 관련된 유전자들을 찾아내어 그 유용성을 밝혀야 한다. 토끼에서는 아직 체세포 복제기술이 보고되지 않고 있어 토끼에서는 체세포복제 기술의 확립에 어려움이 있는 것으로 예측되고 있다. 아직까지는 가축에서 계속 ES cell과 DNA microinjection에 의한 유전자조작술이 필요할 것으로 사료되고 또한 ES cell을 이용한 효율적인 핵이식방법 등의 개발 가능성이 있어 본 연구에서는 토끼 New Zealand White종을 이용하여 계속적으로 Embryonic Stem cell system을 확립하고자 한다.

본 연구에서는 토끼를 이용하여 첫째 아직 정립되어 있지 않은 Embryonic Stem Cell을 확립하고 Chimeric 토끼를 만들어 미분화상태와 Germline Transmission을 확인하고 이를 이용하여 유전자조작이 가능하도록 확립된 토끼의 Embryonic Stem Cell의 Genomic DNA Library를 만들어 토끼의 유전자 조작이 가능하도록 토끼의 완벽한 Embryonic Stem Cell system을 만들고자 한다. 토끼의 Embryonic Stem Cell system의 확립은 토끼 자체의 유전적 개량을 위해서 이용될 수 있을 뿐만 아니라 다른 가축에서 Embryonic Stem Cell을 확립하는데 중요한 Factor들을 제공해 줄 수 있을 것이며, 의학분야와 기초과학분야에서 실험동물로서 토끼의 이용성을 훨씬 더 확대시킬 것으로 사료된다. 둘째 DNA 미세주입법에 의해 Growth Hormone Receptor와 Insulin-like Growth Factor Receptor를 과잉발현하는 형질전환토끼를 생산하고자 한다. 토끼에서 DNA미세주입법의 적합한 조건등을 확립하여 전반적인 형질전환토끼의 생산효율을 높이고 또한 성장과 관련된 형질전환토끼를 생산하여 실용화를 이룩하고자 한다. 특히 Hormone이나 Growth Factor를 이용한 형질전환동물의 경우 심각한 부작용을 나타내어 실용화 할 수 없는 것으로 보고되고 있으므로 본 연구에서는 실제 체내에서는 Hormone이나 Growth Factor등은 이들의 세포내 Receptor보다 molar ratio면에서 훨씬 많이 분비되고 있는 점을 착안하여 이들의 Receptor를 세포내에 과잉 발현시킴으로써 부작용을 최소로 줄이고 Receptor를 통한 신호전달체계(Signal Transduction)를 증폭시켜 성장의 효과를 얻고자 한다.

나. 토끼의 유전자이식 기술의 우위성 확립과 그에 따른 효과

현재 이용되고 있는 생쥐의 형질전환기술과 Embryonic Stem Cell system은 미국과 유럽에서 개발되었는데 생쥐의 실험동물로서의 가치를 대신 할 수 있는 토끼의 형질전환기술의 효율을 높이고 Embryonic Stem Cell system을 개발함으로써 생쥐 위주의 실험이 토끼 위주의 실험으로 대체될 것이며 이러한 기술을 의학분야와 기초분야에 제공될 것이다. 초자원을 이용하는 축산물로서 토끼를 고급모피와 육단백질을 효율적

으로 생산하는 가족으로 개량하는데 선구적인 역할을 할 수 있을 것으로 기대된다.

다. 성장과 관련된 생리와 신호전달체계의 규명

Growth Hormone Receptor와 Insulin-like Growth Factor Receptor를 여분으로 가진 형질전환토끼를 생산할 계획이므로 이러한 Receptor들에 의한 세포내에서의 신호전달체계의 연구와 이러한 자극에 의해서 발현이 자극되는 유전자들의 조사를 통해 성장과 관련된 생체내의 생리를 규명하는데 도움이 될 것이며, 각 인자들의 성장에 대한 효과가 양적인 면으로 측정될 수 있을 것이고, 이 두종류의 형질전환토끼를 교미시킴으로써 두가지의 유전자를 함께 갖는 토끼를 생산하여 additive효과를 추정할 수 있을 것으로 사료된다.

2. 경제·산업적 측면

가. 토끼의 유용성

축산분야의 소동물중에서 경제성이 가장 높은 초식동물로서 육단백질, 털, 가족의 급원으로 이용되고 있다. 토끼는 크기가 작고 번식력이 좋아 토지나 시설의 투자가 적더라도 사육이 가능하다. 이러한 잇점에도 불구하고 토끼의 사육두수가 적은 이유는 고기의 기호도가 다른 동물의 고기보다 떨어지고 털과 가족도 고급제품을 생산해 내지 못했기 때문인 것으로 나타났다. 그러나 토끼고기의 조리법과 가공기술을 개발하고 고급모피를 생산하는 품종의 사양기술을 보급한다면 다른 가족에 비해 경제성이 있는 동물로서 일반농가의 수익에 도움이 될 것이다. 또한 우리나라 자체 내수 공급뿐만 아니라 외국으로도 우수한 토끼제품을 수출할 수 있는 축산물로 키워 갈 수 있을 것이라고 생각된다. 이러한 의미에서 토끼의 빠른 유전적 개량을 이룩할 수 있는 유전자 이식기술을 확립이 필요하다.

현재 의학분야나 기초과학분야에서 유전자이식을 이용한 실험은 거의 생쥐를 이용

하여 이루어지고 있는데 주된 이유로는 형질전환생쥐의 생산이 다른 동물에 비해 효율적으로 생산되고 있기 때문이다. 그러나 생쥐의 경우 몸집이 작아 실제 특정조직을 분석하는데 어려움이 있으며 특히 의학분야에서 인간의 질환모델을 만들어 실험하는데 과연 생쥐가 적합한 동물이나에 대한 의문이 제기되고 있다. 토끼의 유전자이식 방법이 잘 정립된다면 실험동물로서 토끼는 생쥐나 Rat보다 크기 때문에 의학분야나 기초과학분야에서 많이 이용될 것으로 전망된다.

3. 사회·문화적인 측면

가. 첨단산업으로서 농업인식의 필요성

동물의 유전자이식 기술은 분자유전학, 발생학, 번식생리학 등의 기초학문에 기반을 두고 발전하고 있다. 이러한 유전자기술을 이용하여 농업의 생산성을 향상시킴으로써 우루과이라운드 등에 의해 어려운 상황에 놓여 있는 우리 나라 농업의 경쟁력을 강화시키는데 기여할 수 있다. 또한 실제 첨단기술을 가축생산에 응용함으로써 농업의 지위를 향상시키고 아울러 첨단산업으로서 농업의 중요성을 인식시킴으로써 농업에 지속적인 투자를 유발할 수 있다.

나. 농업분야의 고급인력 확보

유전자이식 기술을 이용하여 실질적인 가축의 개량을 이룩함으로써 농업교육의 첨단화와 그에 따른 고급인력의 유치가 필요하다. 특히 기초분야를 공부한 사람들과의 교류를 통해 응용효과가 큰 농업분야에 대해 이바지 할 수 있는 기회를 마련 할 수 있다.

제 2 절 연구개발 내용 및 범위

1. 연구개발의 최종목표

최종목표는 토끼의 유전자이식 기술을 완벽하게 개발 실용화하는 것이고, 각 과제는

1) 제 1 세부과제명 : 토끼 Embryonic Stem Cell System의 개발 : 토끼 Embryonic Stem Cell을 확립하고 Chimera와 Germline Transmission으로 미분화성(Pluripotency)을 확인하고 토끼 Embryonic Stem Cell의 Genomic DNA Library를 만든다.

2) 제 2 세부과제명 : DNA 미세주입법에 의한 형질전환 토끼의 생산 : DNA 미세주입법에 의해 Growth Hormone Receptor와 Insulin-like growth Factor Receptor를 여분으로 갖는 형질전환토끼를 만들고 그 생산효율을 향상시키는 조건을 확립하며 생산된 형질전환토끼의 형질을 정량적으로 분석하고 두개의 유전자를 함께 가진 double 형질전환토끼를 생산하여 두 유전자의 상호성을 검사한다.

2. 연차별 연구개발목표 및 내용

구 분	연 구 개 발 목 표	연 구 개 발 내 용 및 범 위
1차 년도 (1996.11. - 1997.10)	- feeder cell의 확보	1. 기존의 mouse embryonic fibroblast와 STO-LIF cell line 확보 2. rabbit embryonic fibroblast cell line을 임신 10, 15, 20일령의 fetus로부터 확립한다.
	- 토끼 수정란 배양액의 선정	1. 토끼의 1-cell의 수정란과 Blastocyst의 수정란을 위한 배양액 선정 2. 각 수정란 배양액에서 토끼 수정란과 생쥐 수정란의 발육을 측정
	- 토끼 embryo 채취와 이식 기술 연구	1. 과잉배란과 발정동기화를 유발시키기 위한 hormone 처리계획 확립 2. 토끼 1-cell 수정란과 blastocyst 수정란의 채취 시기 선정 3. 수정란 이식을 위한 최적의 시기와 부위 설정
	- Growth Hormone receptor, insulin-like Growth Factor Receptor의 이식 유전자 구축	1. Metallothionein promoter에 Growth Hormone Receptor와 Insulin-like Growth Factor Receptor sequence를 접합 2. 3' 쪽에 SV40 Intron과 Poly(A) Signal을 접합

구 분	연구 개발 목표	연구개발내용 및 범위
<p>2차 년도 (1997.11. - 1998.10.)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Embryonic Stem Cell 분리 - mouse ES cell 분리 (C57BL/6 line) - DNA 미세주입 	<ul style="list-style-type: none"> 1. 각 feeder별로 blastocyst embryo 배양후 Stem Cell 분리 2. 분리된 Stem Cell의 조직학적 관찰과 세포분열 상태를 정량적으로 측정 3. 분리된 Stem Cell의 Embryoid body 형성과정 추적 1. mouse feeder를 이용하여 C57BL/6 mouse의 blastocyst embryo 배양 2. Mouse Embryonic Stem Cell 분리 및 분석 1. mouse FVB line의 1cell 수정란에 DNA 주입 2. New Zealand White, Californian, Rex등의 1-cell 수정란의 전핵에 DNA주입후 생존성 관찰 3. 주입 DNA의 copy number, volum 등의 주입 조건에 따른 생존성 관찰
<p>3차 년도 (1998.11. - 1999.10.)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Embryonic Stem Cell의 확립 - 형질전환생쥐의 생산과 분석 - 형질전환토끼의 생산과 번식 	<ul style="list-style-type: none"> 1. 분리된 Embryonic Stem Cell의 passage number에 따른 미분화상태 조절에 대한 연구 2. 분리된 Embryonic Stem Cell의 Chromosome Karyotyping과 Sexing 3. 미분화, 분화된 Embryonic Stem Cell의 유전자 발현차이를 Acrylamide gel을 이용한 protein의 차이규명 1. founder 생쥐와 F₁의 생산 2. 형질전환생쥐의 Phenotype 관찰 및 분석 1. DNA 미세주입법에 의해 태어난 새끼들의 DNA 검사-PCR, Southern Blot등 2. Founder토끼의 이식유전자의 copy number 추정 3. Founder토끼의 번식과 이식유전자의 다음세대로의 전달 관찰

구 분	연구 개발 목표	연구개발내용 및 범위
<p>4차 년도 (1999. 11. - 2000. 10.)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Chimera 토끼의 생산 - Germline Transmission 확인 - 형질전환토끼에서 이식유전자의 발현측정 - 형질전환토끼의 표형형 관찰 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 확립된 Embryonic Stem Cell의 blastocyst 수정란의 blastocoel로의 주입 (New Zealand White, Rex와 같이 다른 모피색깔의 품종을 이용) 2. Embryonic Stem Cell과 Zona Pellucidea를 제거한 초기 수정란의 aggregation에 의한 Chimera 시도 1. Chimera토끼에서 Embryonic Stem Cell의 생식세포 형성 기여도 측정 2. Back-cross에 의한 Embryonic Stem Cell을 얻은 original 토끼품종 생산 1. 형질전환토끼의 각 장기별로 RNA를 추출하여 Northern Blot 분석 2. 각 Receptor의 antibody를 이용하여 이식유전자의 발현상태를 정량적으로 분석 - Western Blot, Radioimmuno Assay 1. 형질전환동물의 성장을, 일당중체량, 사료효율, 번식을 등을 측정 2. 신체 구성성분의 구성비율 측정 3. 병리학적, 조직학적 상태 관찰
<p>5차 년도 (2000. 11. - 2001. 10.)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 토끼 Embryonic Stem Cell의 Genomic DNA Library 구축 - Growth Hormone Receptor와 Insulin-like Growth Factor Receptor를 함께 가진 double 형질전환 토끼의 생산 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 토끼 Embryonic Stem Cell DNA의 추출과 Lambda phage vector 구축 2. Ligation과 in vitor packaging 3. 구축된 Genomic Library의 Amplification 1. Growth Hormone Receptor를 가진 형질전환 토끼와 Insulin-like Growth Factor를 가진 형질전환토끼의 교배에 의한 double 형질전환 토끼의 생산 2. double 형질전환토끼의 표형형을 single 형질전환토끼와 비교 정량적 분석 3. Growth Hormone과 Insulin-like Growth Factor의 신호전달체계 연구

제 3 절 국내외 관련기술의 현황과 문제점

1. 국외의 경우

토끼를 이용한 유전자 이식방법은 DNA 미세주입법에 의해 생산되었다. 두개의 논문이 발표되었는데 (Hammer 등, 1985; Brem 등, 1985) 이들의 형질전환토끼의 생산효율은 1% 미만으로 나타났다. 그 이후로 토끼의 유전자 이식은 많이 발표되지 않고 있고 대신 형질전환면양, 염소, 돼지 등이 생산되었다 (Simons 등, 1988; Pursel 등, 1989; Rexroad 등, 1991; Evert 등, 1991). 돼지의 경우 Pursel 등(1989)이 Growth Hormone을 과잉 발현시킨 형질전환돼지가 심각한 부작용으로 실용화에 실패한 이후 경제형질개량을 위한 시도가 활발하게 이루어지고 있지 않다. 낮은 형질전환가축의 생산효율 때문에 많은 비용과 노력이 필요하고 또한 생산된 형질전환동물의 이용성에 확신을 가질 수 없기 때문인 것으로 나타났다. 현재 의약분야에서는 가축의 유전자 이식방법을 실용화 방향으로 이용하고 있다. 특히 형질전환 면양과 산양이 이 분야에 이용되고 있는데 이들 가축의 젖으로부터 값비싼 혈액응고 factor등을 생산을 시도하고 있다(Clark 등, 1989 ; Wright 등, 1991). 실제 면양, 산양, 돼지, 소 등의 유전적 개량을 위해 유전자 이식기술을 실용화하는 데는 낮은 생산효율, 밝혀지지 않은 유용유전자, 또한 경제형질에 관여하는 각 유전자의 기능에 대한 제한된 지식 등에 의해 좀 더 시간이 소요될 것으로 사료된다.

토끼의 Embryonic Stem Cell의 경우 아직까지 오직 1개의 논문만이 발표되고 있는데 (Grave와 Mreadith, 1993) 그 토끼의 Embryonic Stem Cell이 Germline Transmission을 하는 Stem Cell인지에 대한 보고는 나오지 않고 있다. 그외 면양, 돼지, 소등에서도 Embryonic Stem Cell에 대한 보고는 있었지만(Evans 등, 1990; Piedrahita 등, 1990, Notarianni 등, 1991; Sims와 First, 1993), 마찬가지로 이들이 만든 것이 분화되지 않은 Stem Cell인지에 대해서는 정확하게 알려져 있지 않다. 또한 이들의 Cell이 오랜동안 in vitro 상태의 배양에서도 분화되지 않고 잘 자라는

지에 대해서도 알려져 있지 않다. 실지 면양, 돼지, 소 등의 가축에서는 Embryonic Stem Cell을 확립하는데 중요한 것으로 여겨지는 feeder의 조건이 잘 정립되어 있지 않은데, 생쥐에서 Embryonic fibroblast가 feeder로서 가장 적합한 것으로 보고되고 있어 이용되는데 가축에서도 fetus의 연령별로 꺼내어 Embryonic fibroblast를 만들어 feeder로서의 조건 등을 조사를 해야하고, 확립된 Embryonic Stem Cell이 미분화 상태인지를, 또 Germline Transmission을 하는지를 검증해야 하는데 이러한 것들이 거의 이루어지고 있지 않다.

2. 국내의 경우

국내에서는 DNA 미세주입법에 의해 축산기술연구소에서 형질전환돼지와 또 한국생명공학연구소에서 형질전환 산양과 소의 생산을 보고한 바 있고 복제 방법과 retrovirus 및 정자주입법을 이용한 형질전환가축을 생산하고자 하는 시도가 진행중이다.

가축의 ES Cell은 아직 전무한 상태이며 생쥐를 이용하여 포항공대(신희섭 박사)와 서울의대(서정선 박사)에서 Knock-out 실험을 수행중이다.

3. 앞으로의 전망

효율적인 DNA 미세주입법이 개발됨에 따라 축산분야에서의 형질전환동물에 대한 연구는 실제 경제형질의 개량이라는 실질적인 목표하에 이루어질 것이며 농업생산성의 향상을 이루어 우리축산물의 국제경쟁력을 강화시키는데 기여할 것이다. 토끼는 초식동물로서 초자원의 이용성이 좋고 고기의 생산뿐만 아니라 고급 모피를 생산하는 가축으로 세대간격이 짧고 산자수가 많아 이러한 유전자 이식기술의 적용이 수월하기 때문에 형질전환기술을 이용한 경제형질의 유전적 개량이 훨씬 빠르게 이루어질 것으로 기대된다. 또한 이식 유전자의 인위적인 발현 조절이 시도될 것이며 Embryonic Stem Cell system을 이용한 특정 유전자의 치환(gene replacement)과 특정 유전자의

복제 (gene duplication) 등이 이루어 질 수 있다. 토끼에서의 이러한 유전자이식 기술의 실용화는 다른 가축의 형질개량에도 응용할 수 있는 기초자료를 제공할 것이며 이 분야의 응용을 조장할 것으로 사료된다.

제 2 장 토끼 Embryonic Stem Cell System의 개발

제 1 절 서설

Embryonic stem(ES) cell은 1981년 처음으로 blastocyst의 inner cell mass로부터 분리되어, 적절한 tissue culture condition에서 무한정 미분화상태를 유지시킬 수 있는 cell line을 의미한다(Evans와 Kaufman, 1981; Martin, 1981). 이 미분화 세포를 초기 donor embryo와 aggregation 시키거나 donor blastocyst의 blastocoel cavity로 주입시킨 후 recipient animal의 자궁으로 이식하면 donor cell과 ES cell로 구성된 chimeric animal을 생산할 수 있다. 이 chimeric animal을 교미시켜 ES cell의 genome을 다음 세대에도 전달할 수 있는 germline transmission을 얻을 수 있고 hetero 상태의 새끼를 교배에 의해 순수하게 ES cell의 genome만을 가진 animal을 생산해 낼 수 있다. 이러한 미분화 상태의 ES cell을 in vitro에서 배양하는 동안 유전자의 조작이 가능한데 정확하게 조작된 ES cell만을 선발하여 chimeric animal을 만들고 그 유전자에 대한 heterozygous와 homozygous animal을 만들 수 있다 (Robertson, 1987). 그러므로 기존의 유전자 이식방법보다 in vitro에서 미리 screening이 가능하여 정교하고 효율적인 animal genome의 조작이 가능하다. 특히 DNA의 homologous recombination현상을 이용한 gene targeting은 특정 gene을 변형시킨 animal을 생산할 수 있으며 ES cell system이 잘 정립되어 있는 생쥐에서는 특정 gene을 파괴시켜(gene disruption) 그 gene의 기능이 없는 생쥐(knock-out mice)를 생산하여 in vivo 상태에서 gene의 기능을 규명하는데 이용되고 있으며 최근에는 gene duplication과 같은 특정 gene을 정확하게 3배체, 4 배체 등의 여분으로 갖는 생쥐를 생산하여 gene product의 증가에 따른 표현형의 변화를 추정하는데 이용되고 있다(Capecchi, 1989; Smithies와 Maeda, 1995).

가축에서의 ES cell system은 ES cell을 분리하고 확인하는 초기 단계이나 앞으로 ES cell이 정립되면 생쥐에서 이용되고 있는 이러한 유전자 조작에 의해가축을 개량할 수 있을 것으로 기대된다. 특히 열성유전자의 치환(gene replacement), 우성유전자의 복제(gene duplication) 등에 의한 방법으로 가축의 genome 조작이 가능하여 복합적인 유전자에 의해 나타나는 경제형질의 개량에 응용할 수 있다.

ES cell은 blastocyst 난자의 inner cell mass로 부터 분리할 수 있는데 미분화상태의 세포들로서 in vitro 상태에서 배양이 가능하며 정상난자와 aggregation을 시키면 chimera를 형성하여 모든 조직으로 분화될 수 있는 pluripotency를 가지고 있다 (Abbondazo 등, 1993; Hogan 등, 1994). 이러한 ES cell은 생쥐와 hamster에서는 잘 정립되어 있지만 그 외 동물에서는 아직 유전자조작에 이용될 수 있을 만큼 정립되어 있지 않은데 그 이유로는 미분화된 상태를 유지시키면서 증식시켜야 하는 배양기술이 개발되지 못하고 있기 때문이다. 각 동물마다 수정란의 배양조건이 다르듯이 ES cell의 배양조건이 다를 것으로 추정되고 있다(Pinkert과 Stice, 1995). 생쥐의 ES cell은 129/Sv stain에서 분리된 것이 가장 많이 이용되고 있는데 실제 생쥐에서 정립된 ES cell의 기술을 다른 동물에 적용하면 분리된 세포의 분열속도가 너무 느리고 fibroblast와 같은 세포로 분화된다. 생쥐에서 ES cell을 배양할 때는 분화를 방지하기 위하여 세포분열을 억제시킨 embryonic fibroblast와 co-culture를 하거나 leukemia inhibitory factors(LIF)나 differentiation inhibition factor(DIF) 또는 ciliary neurotropic factor(CNF)와 같은 growth factor를 사용하여 미분화의 조건을 유지하여 준다. 또한 passage가 진행됨에 따라 chromosome의 2배체 상태도 유지되어야 한다.

ES cell은 미분화 상태이기 때문에 모든 조직으로 분화가 가능하다. morula stage embryo와 aggregation을 시키든지 blastocyst의 inner cell mass 부위로 injection을 하여 대리모의 자궁에 이식하면 chimera를 생산할 수 있다. 이 chimera는 ES cell로부터 유래된 세포들과 donor embryo로 부터 유래된 세포들로 부터 분화되어 모든 조

직을 이루고 있다. germ cell도 ES cell로 부터 유래된 것이 있어 wild-type animal과의 교배에 의해 다음 세대에 heterozygous 상태의 동물을 얻을 수 있고 이 heterozygous끼리의 교배에 의해 그 다음 세대에는 특정 gene loci가 전부 ES cell로 부터 유래된 homozygous animal을 얻을 수 있다. 그러므로 ES cell을 in vitro에서 배양하는 동안 유전자를 조작하여 유전자가 정확하게 조작된 ES cell line만을 selection하여 embryo와 aggregation하여 chimeric 새끼를 얻고 교미에 의해서 유전자가 조작된 형질전환동물을 생산할 수 있다.

hamster(Doetschman 등, 1988), 토끼(Graves와 Moreadith, 1993), 돼지와 양(Notarianni 등, 1991; Piedrahita 등, 1990), 소(Sim과 First, 1993; Stice 등, 1994) 등에서 ES cell 또는 ES-like cell들이 분리되었다는 보고가 있고 최근에 이들 cell line을 이용하여 chimeric animal을 만들었다는 보고가 있으나, 아직 germline transmission에 대한 보고는 없다. 가축에서 ES cell의 정립을 위해서는 pluripotency까지를 증명하는데 많은 비용과 시간이 소모되겠지만 ES cell의 이용성을 고려한다면 개발의 가치가 있다고 사료된다.

그러므로 본 연구에서는 토끼의 배아세포를 추출하여 배양기술을 확립하고 그 특성을 규명하고자 하였다. 이 연구를 통해 다른 동물의 배아세포를 추출하는데 이용할 수 있는 기본적인 자료를 얻을 수 있을 것으로 사료되며, 토끼의 배아세포 system이 잘 정립되면 농학분야와 같은 응용분야에서의 가축개량에서 뿐만 아니라 기초분야에서의 동물유전공학 연구에 기여할 것으로 전망된다.

제 2 절 연구재료 및 방법

1. feeder cell의 개발

임신 중기의 태아를 회수하여 주로 근조직만을 trypsinization시켜 monocell로 분리 배양하여 culture dish에서 monolayer로 분열하여 자라는 cell line을 확립하였다. 특히 본 연구에서는 토끼의 Embryonic Stem Cell 확립을 위하여 feeder cell로서 rabbit embryonic fibroblast cells, mouse embryonic fibroblast cells, STO cells을 비교하고자 이 3가지 cell line을 만들었다. 이 들 cell line을 개발하면서 아울러 Stem Cell culture를 위한 기본적인 culture system을 확립을 하였다.

가. rabbit embryonic fibroblast cell line 확립

성성숙에 도달한 뉴질랜드화이트 암토끼를 수토끼와 교미시킨 후 교미시킨 날을 임신 0 일령으로 하여 임신 15 일령, 17 일령, 19 일령의 태아를 자궁으로부터 적출하였다. 각 임신령 태아를 꺼내 양막과 태막을 제거하고 PBS 용액으로 세척하고 각 태아의 붉은 조직과 뇌조직을 제거하고 잘게 절단한 후 Trypsin 처리하여 DMEM(5% FBS)에서 37°C, 5% CO₂ incubator로 배양하여 tissue culture dish에 붙어 monolayer로 분열하는 세포만을 키워 confluent 상태의 것을 Po로 간주하고 1 : 5로 passing시킨 것은 P1로 명하여 freezing medium(11% DMSO, 50% FBS, 39% DMEM)을 이용하여 액제질소에 보관하였다. 실제 co-culture를 위해서는 1 : 5 나 1 : 10으로 passing하여 P3나 P4의 것을 mitomycin c로 mitogenic inactivation시켜 이용할 것이다.

나. mouse embryonic fibroblast cell line 확보

생쥐를 교미시켜 임신 13-15 일령의 태아를 적출하여 Trypsin 처리하여 mouse 토끼의 경우와 마찬가지로 DMEM(5% FBS)용액으로 생쥐의 embryonic fibroblast cell

line을 확보하였다.

다. SNL cell line 확보

stable cell line인 STO cell line에 embryo의 미분화상태를 유지시켜 주는 factor로 알려져 있는 Leukemia Inhibitory Factor(LIF) gene과 유전자 조작시 ES Cell의 selection 을 위해 neomycin resistant gene을 transfection시킨 후 이 두 유전자가 많이 발현하는 clone을 선발하여 키운 SNL cell line을 서울대학교 의대 암연 구소로부터 확보하였다.

2. 토끼의 수정란 이식 기술

수정란이식 기술에는 과배란 유도, 외과적 방법에 의한 수정란 회수, 수정란의 조작과 배양, 수정란이식을 위한 Recipient 토끼의 발정동기화 유도 및 이식 등이 포함 되어 있다.

가. 과잉배란유도

사용된 토끼는 뉴질랜드화이트 종으로 연암축산대학에서 구입하였다. 사양관리는 14 : 10 시간의 light : dark cycle하에서 관리였고 사료는 Purina의 토끼전용사료가 공급되었다. 성성숙 (5 개월령 이상)에 도달한 암토끼에 약 0.3 mg의 FSH (Sigma)를 12시간 간격으로 6 번 피하주사한 후 75 U의 HCG (Sigma)를 혈관주사한 직후 수토끼 와 두번씩 교미시켜 과배란을 유도하였다.

나. 과잉배란유도 및 수정란 회수

교미후 18시간 후에 Ketamine-Xylazine을 이용하여 마취시켜 배 정중선을 절개하여 자궁과 난관을 드러내고 난관체 부위로 catheter를 삽입시켜 자궁-난관협부로 부

터 20 gauge needle을 사용하여 20%의 fetal calf serum을 함유하는 Dulbecco's phosphate-buffered saline(DPBS)용액으로 난관을 세류하여 1-cell stage의 난자를 회수한다. 회수된 난자는 형태학적인 분류를 시도한다. 배란시기의 균일도를 알 수 있는 cumulus cell의 유무에 따라 나누고 제2극체와 전핵의 유무에 의해 수정란과 무정란을 구분한다. 또한 회수된 난자중 fragmented와 같은 비정상적인 난자의 수를 측정하였다.

3. 토끼 Embryonic Stem cell의 분리

가. 공배양을 위한 feeder cell의 준비

토끼의 ES cell을 확립하기 위해 제 1차년도에서 확보한 rabbit embryonic fibroblast cell(REF), mouse embryonic fibroblast cell(MEF), SNL cell을 100 mm culture dish에 90% confluent한 상태로 37°C, 5% CO₂하에서 배양한 후 세포분열을 불활성화 시키기 위해 mitomycin-C 용액(10ug/ml DMEM)으로 교환하고 약 3 시간동안 배양하여 DMEM(+10% FBS)에 보존하여 공배양을 위해 준비하였다. 특히 REF와 MEF는 계대배양수가 4번을 초과하지 않은 cell line을 사용하였다. 세포분열을 불활성화시킨 feeder cell은 trypsin을 처리하여 96-well 또는 24-well plate에 옮겨 한 개의 토끼 수정란별 공배양을 위해 준비하였다.

나. 공배양을 위한 토끼 수정란의 회수와 처리

토끼의 수정란은 mucin coat로 투명대 밖에 둘러싸여 있어 blastocyst가 hatching 하는데 많은 시간이 소용되므로 New Zealand White종 토끼를 FSH(0.3mg씩 6번 피하주사, 12시간 간격) 와 HCG(75U, 혈관주사)에 의해 과배란 처리하여 교미시켜 1-cell 수정란을 회수하였고 RDH(+taurine+BSA)medium에서 약 96시간 배양하여 hatching되기 시작하는 blastocyst를 세포분열을 불활성화시킨 cell위에 공배양을 시도하였다. 경

우에 따라 토끼 blastocyst의 투명대를 제거하여 공배양을 실시하기도 하였는데 expanded blastocyst를 pronase solution에서 배양하고 현경하에서 투명대가 분해되는 것을 관찰하여 투명대가 제거된 수정란을 배양액에서 3번 washing하여 공배양을 실시하였다.

다. ES cell의 분리

공배양의 medium으로는 high-glucose DMEM(+15%FCS)을 이용하였고 공배양 후 완전 hatching되어 feeder cell에 부착되어 자라면 분화된 모양의 trophoblast cell은 제거하고 inner cell mass 계통의 cell line을 trypsinization한 후 분리하여 계대배양에 의해 stem cell colony의 분리를 시도하였다. 96-well plate에서 24-well plate로 그리고 6 well plate로 확대 배양하여 colony를 확보하고 freezing 하여 cell line을 보관하였다. freezing 방법으로는 trypsinization 한 후 300g로 10분간 centrifuge하고 cell pellet을 freezing medium(50% FBS, 39% DMEM, 11% DMSO)으로 잘 섞어 freezing vial(Nunc)에 분주하고 -70℃에 18시간 보관한 다음 액체질소에 보관하였다. 냉동보관한 것을 다시 녹여 이용하고자 할 경우에는 액체질소통에서 꺼낸 freezing vial을 37℃ water bath에서 녹인 다음 medium이 있는 dish에 잘 섞어 18시간 배양 후 medium을 교환하여 주었다.

라. 분리된 stem cell의 세포분열 상태 분석

blastocyst로 부터 96-well dish에서 35mm dish까지 feeder cell 위에서 confluent하게 자란 것은 모두 stem cell로 간주하였다. 96-well dish에서 35mm dish까지 자라는 데는 적어도 3번의 계대배양을 거치게 되는데 그동안 분화된 세포는 거의 사라지고 feeder cell위에서 colony 모양으로 자라는 것만 남게 된다. 분리된 stem cell의 모양은 mouse ES cell과 같이 둥근 모양의 colony로 자라는 것(colony)과 feeder cell위에서 평평한 모양으로 자라는 것(flat)으로 나눌 수 있었다. 세포분

열속도는 35mm dish에서 거의 confluent하게 자란 것을 1 : 2로 계대배양하였을 때 다시 confluent되는데 소요되는 시간을 측정하여 cell line 별로 기록하였고 mouse ES cell의 것과 비교하였다.

마. embryoid body 형성 관찰

분리된 토끼 stem cell이 분화될 수 있는 cell line인지를 확인하기 위해 embryoid body로의 분화 가능성 여부를 확인하였다. confluent상태로 자란 stem cell을 약하게 trypsinization시켜 colony를 부수지 않은 상태로 gelatin이 되어 있지 않은 dish(bacteria culture dish)로 옮겨 서로 colony가 엉기도록 하고 10% FBS를 함유하고 있는 DMEM medium에서 37°C, 5% CO₂로 5-7일간 배양하였다. plate 바닥에 부착되지 않고 부유상태로 배양후 약 4-5일에 강(腔)이 형성된 전형적인 embryoid body를 관찰할 수 있었고 분화된 내배엽세포와 외배엽세포도 관찰하였다.

4. mouse ES cell의 분리

토끼의 ES cell을 분리하기 위한 control로 mouse ES cell의 분리를 시도하였다. 계획상 mouse의 품종은 C57BL/6였으나 최근 transgenic mouse로 많이 이용되고 있고 과배란 유도 및 체외배양이 용이한 FVB종을 이용하여 실시하였다. mouse ES cell의 분리는 토끼에서와 같은 방법과 용액을 사용하였고 수정란의 채란 및 배양은 mouse system을 이용하였다.

가. mouse 수정란의 채취와 배양 및 feeder cell의 준비

성성숙에 도달한 암컷 FVB mouse를 PMSG(5IU)와 HCG(5IU)로 복강내로 주사하여 과배란시켜 3일경에 자궁에서 blastocyst를 회수하였다. 배양액으로는 CZB medium이 사용되었고 hatching될 때까지 37°C, 5% CO₂하에서 배양하였다. feeder cell은 mouse

embryonic fibroblast cell(MEF)을 이용하였고 mitomycin-C 용액으로 불활성화시켜 토끼에서와 같이 96-well 또는 24-well plate에 분주하여 사용하였다. co-culture를 시켜 hatching이 된 후 ICM으로 부터 자라는 세포를 trypsinization하여 colony를 형성하는 cell line을 증식시켰다.

나. mouse ES cell 분리 및 분석

hatching 되고 있는 mouse blastocyst를 feeder cell위에 공배양시켜 hatching이 된 후 feeder cell위에 붙어 ICM으로 부터 자라는 세포를 trypsinization하여 colony를 형성하는 cell line을 증식시켰다. mouse blastocyst의 ICM으로 부터 자라는 cell line은 2-3번의 계대배양 후 모양이나 자라는 속도가 일정한 cell line만을 분리하였다. 모양은 기존의 mouse ES cell과 비슷한 것만을 선별 유지하였다. 분리된 mouse ES cell은 토끼에서와 같이 embryoid body를 유도시켜 stem cell을 확인하였다.

5. Embryonic Stem Cell의 karyotype 및 sex 분석

염색체 분석을 위해 토끼 Embryonic Stem Cell을 colcemid 용액에 약 4시간 정도 배양하여 metaphase에 정지시킨 다음 hypotonic 용액에서 약 30분정도 팽창시킨 후 Fixative 용액 (methanol : acetic acid = 3 : 1)을 첨가하여 slide위에 떨어뜨려 cell을 부순 다음 air-dry에 의해 약 2시간정도 건조시킨다. 4% Giemsa 염색액에 slide를 약 6분정도 담가 염색한 다음 H₂O로 씻어낸 후 건조시킨다. Trypsin 처리는 0.05% trypsin 용액(Ca-free D-PBS)을 사용하였다. slide는 light microscope에서 1000X 배율로 검경하였고 사진촬영을 실시하였고 현상한 후 Idiogram을 작성했으며 sex chromosome으로 성별을 확인하였다. 토끼의 sex chromosome의 크기는 X-chromosome이 훨씬 크고 Y-chromosome은 20 또는 21번째의 chromosome과 거의 비슷한 acrocentric형이어서 sex의 구분에 쉽게 이용하였다.

6. 미분화된 ES cell과 분화된 ES cell의 protein pattern 분석

confluent한 상태의 ES cell과 embryoid body로 분화시킨 cell을 RIPA 용액으로 lysis 시킨 후 원심분리하여 protein 추출액을 준비하였다. 전기영동은 Bio-Rad사의 vertical electrophoresis system(Protein II xi)을 사용하였다. gel은 12% resolving gel(52% acrylamide, 1.4% bis-acrylamide, 0.4% SDS, 6M urea, 1.4% ammonium persulfate, 0.1% TEMED in Tris)과 10% stacking gel을 사용했으며 running buffer는 0.2M glycine, 4.3mM SDS, 25mM Tris(pH 8.3)를 이용하였다. sample loading시 sample 10ul 당 tracking dye(50% glycerol, 0.5% bromophenol blue) 2.5ul를 첨가한 후 loading 하였고 전기영동이 끝난 gel은 staining solution(0.5% coomssie blue R-250, 40% methanol, 10% acetic acid)으로 염색한 후 destaining solution(40% methanol, 10% acetic acid)으로 탈색하여 밴드양상을 분석하였다.

silver staining을 위해서는 fixing buffer(50% methanol, 12% acetic acid, 0.5ml/L of 37% formaldehyde)에서 최소 1시간 정도 shaking한 다음 50% ethanol에 20분간 washing하였다. 0.2% sodium thiosulfate에서 1분간 incubation 시킨 다음 증류수로 20분간 washing하고 silver staining buffer(2g/L AgNO₃, 0.75 ml of 37% formaldehyde)에서 20분간 염색하였다. 염색 후 증류수로 20초간 3번 washing한 다음 developing buffer(60g/L Na₂CO₃, 0.5ml of 37% formaldehyde, 4mg/L Na₂S₂O₃)에서 gel을 shaking하여 5% acetic acid로 고정시켰다.

7. Alkaline phosphatase staining

70% 정도 confluent ES cell을 PBS로 2번 washing하고 4% paraformaldehyde(in PBS)로 약 15분간 실온에서 고정시킨다. PBS로 washing한 후 alkaline phosphatase

substrate(NBT/BCIP) 용액을 넣고 약 10-15분 실온에서 배양 후 염색이 되면 PBS로 washing하고 사진 촬영을 실시하였다.

8. 토끼 ES cell injection

가. 토끼 ES cells

토끼의 ES cell은 제 3차년도에 New Zealand White 품종으로부터 확립된 것으로 mitomycin으로 inactivation 시킨 mouse embryonic fibroblasts 위에서 유지하고 있다. passage number는 약 10 이상으로 유지되고 있고 염색체 검사에서 이상이 없는 것을 이용하고 있다. 토끼의 ES cell은 injection 20분 전에 trypsin 처리하여 준비하였다가 수정란이 있는 drop에 약 5-10 ul의 ES cell medium을 주입하는 것으로 ES cell injection을 준비하였다.

나. donor embryos

토끼 ES cell을 주입할 수정란을 위한 donor로는 대부분 농장에서 구입한 순종 Dutch Belted 품종을 이용하였다. FSH와 HCG로 과배란을 유도시킨 후 morula와 blastocyst는 두 방법으로 준비하였는데 난관에 있는 1-cell 수정란을 채란하여 in vitro 배양하여 준비한 것과 난관과 자궁에서 채란된 in vivo 수정란을 준비하였다. in vitro blastocyst는 mucin coat가 없어 ES cell injection 후 recipient의 난관으로 이식을 시도하였고, in vivo blastocyst는 ES cell injection 후 자궁으로 이식하였다.

다. blastocyst injection 및 수정란 이식

expanded blastocyst만을 골라 micromanipulator하에서 holding pipette으로 blastocyst를 고정시킨 다음 injection pipette으로 약 10-15개의 ES cell을 blastocoel로 주입하였다. 특히 inner cell mass쪽으로 ES cell이 aggregation 되도

록 주입하였다 주입 후 약 1-2시간 배양한 후 recipient로 이식하였다. in vitro blastocyst는 발정동기화를 donor보다 하루 지연시킨 recipient의 난관으로 이식하여 mucin coat가 침착되도록 이식하였고, in vivo blastocyst는 donor와 같이 동기화 시킨 recipient의 자궁으로 이식하였다.

라. morula aggregation

토끼에서는 투명대가 임신에 필수적인 것이어서 투명대를 관통하여 주입하는 방법을 실시하였다. in vivo morula 및 in vitro에서 배양된 morula에 micromanipulator 하에서 10개 정도의 토끼 ES cell을 투명대를 관통하여 injection하여 aggregation을 시도하였다. 주입 후 recipient의 난관으로 이식하였다.

9. Chimera 토끼의 생산

Chimera 토끼는 Dutch Belted종의 수정란에 ES cell을 주입하였으므로 Dutch Belted종의 검정색 띠가 흰색으로 희석되는 것에 의해 확인하였다. chimeric율은 원래 Dutch Belted종의 모피 검정색 띠가 흰색(albino)으로 희석되는 분포에 따라 0%(Dutch Belted의 순수한 검정색 띠)에서 100%(Dutch Belted에서 검정색 띠의 albino화)로 추정하였다.

10. germline transmission

태어난 수컷 Chimera 토끼가 성성숙에 도달하면 암컷 New Zealand White 품종과 교미시켜 New Zealand White종의 새끼가 태어나면 ES cell로부터 germline transmission이 되었다고 추정하였다.

11. Genomic DNA library 구축

가. Genomic DNA의 준비

토끼의 혈액 10ml에서 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 먼저 10ml의 혈액에 cell lysis 용액 30ml을 넣고 10분간 상온에서 배양한 후 2,000×g에서 10분간 원심분리하여 백혈구를 회수하였다. 회수된 백혈구에 Nucleic lysis 용액 10ml을 첨가하고 피펫으로 5-6회 혼합한 후 RNase (20mg/ml)를 10 μ l첨가하여 37℃에서 20분간 배양하였다. 배양이 끝난 후 4℃ cold chamber에서 10분정도 냉장시킨 후 protein precipitation 용액 3.5ml을 첨가하고 20초간 vortex mixer로 혼합한 후 2,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 다른 튜브에 옮겨 isopropanol 7ml을 넣어 DNA가 엉킬 때 까지 흔들어주었다. 엉킨 DNA는 피펫으로 다른 튜브에 옮기고 70% 에탄올로 한번 씻어 주었다. 그런 후 건조시키고 멸균 증류수 2ml에 용해시켜 사용하였다.

나. Genomic DNA의 partial digestion을 위한 적정 제한효소 조건 설정

1) Buffer의 준비

Dilution buffer

10×제한효소 Buffer (B, Promega)	150 μ l
Acetylated BSA(1ml/ml)	150 μ l
DW	1,200 μ l

Assay buffer

Genomic DNA	10ug
10X 제한효소 buffer (B)	45 μ l
Acetylated BSA(1ml/ml)	50 μ l
DW로	450 μ l되게 채움

Sau3A I 의 희석

Tube	Preparation	Dilution
1	10 μ l Sau3AI + 140 μ l dilution buffer	1/15
2	10 μ l 1/15 dilution + 90 μ l dilution buffer	1/150
3	10 μ l 1/150 dilution + 10 μ l dilution buffer	1/300
4	10 μ l 1/150 dilution + 30 μ l dilution buffer	1/600
5	10 μ l 1/150 dilution + 50 μ l dilution buffer	1/900
6	10 μ l 1/150 dilution + 70 μ l dilution buffer	1/1200
7	10 μ l 1/150 dilution + 90 μ l dilution buffer	1/1500
8	10 μ l 1/150 dilution + 110 μ l dilution buffer	1/1800
9	10 μ l 1/150 dilution + 190 μ l dilution buffer	1/3000
10	10 μ l 1/150 dilution + 290 μ l dilution buffer	1/4500

Assay buffer를 1번에서 10번까지 표시한 튜브에 45 μ l씩 분주한 후 희석된 Sau3AI을 각각 5 μ l씩 첨가하여 혼합한 후 spin down하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양한 후 1 μ l의 0.5M EDTA를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 10 μ l의 gel loading buffer를 첨가하였다. 0.4%의 agarose gel에서 2volt/cm로 20시간정도 전기영동을 실시 한 후 적정 제한효소 조건을 설정하였다.

다. Genomic DNA의 partial digestion

제한효소의 농도는 DNA 1ug 당 0.05 unit가 가장 적절한 것으로 판단되어 genomic DNA 100ug을 Sau3AI 5unit를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 절단하였다. 반응액은 0.5M EDTA로 정지시킨 후 페놀과 클로로폼으로 추출하고 에탄올로 재 회수한 후 건조시키고 200 μ l의 멸균증류수에 용해 시킨 후 다음과정으로 진행하였다.

라. 원심분리에 의한 적정단편의 회수

sucrose 10%~40%의 gradient를 만든 후 용해된 DNA 용액을 위에 올려두고 Beckman XL-90 초고속 원심분리기의 스윙버킷 (28SW)을 이용하여 25,000rpm에서 24 시간 원심분리를 실시하였다. 원심을 끝난 후 peristatic pump를 이용하여 조심스럽게 1.5ml의 튜브에 약 500 μ l씩의 fraction을 받았다. Fraction은 에탄올을 이용하여 DNA를 회수하여 1% agarose gel에서 적정크기 단편을 알아보았다. Insert DNA의 준비는 완료하였다.

마. Ligation

BamHI 으로 절단 한 Lamda DASHIIvector (Stratagen) 1 μ g에 준비된 insert DNA 400ng을 넣고 T4 DNA ligase (Stratagen) 2 U와 rATP(10mM) 0.5 μ l를 넣고 잘 혼합한 후 4 $^{\circ}$ C에서 over night 배양하였다.

바. Packaging Host cell의 준비

XL1 blue MRA (P2) cell stock을 LB agar에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 O/N 배양한 후 single colony를 LB broth에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 O/N 배양하였다. 배양한 Cell를 500g에서 10분간 원심분리하여 cell을 회수한 후, 10mM의 MgSO₄로 재 현탁시켜 OD가 500 되게 조정하였다. Packaging extract를 -70 $^{\circ}$ C 냉동고에서 꺼내 손가락 사이에 끼워 녹기 시작하면 젓기 얼음위에 올려 놓고 완전히 녹은 후 ligation mixture 2 μ l를 첨가하여 조심스럽게 피펫으로 혼합하고 spin down 하였다. 22 $^{\circ}$ C에서 2시간 배양하고나서 SM buffer 500 μ l를 첨가하고 chloroform 20 μ l를 넣고 손가락으로 tipping하여 잘 섞어준 후 spin down하여 debris를 가라앉혔다.

마. Titering

만든 library의 농도를 알아보기 위하여 1/10, 1/100, 1/1,000, 1/10,000, 1/100,000qofh 희석한 후 1 μ l를 200 μ l의 준비된 host cell에 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 약하

게 흔들어 주면서 배양후, 용해시켜 48℃로 조정하여 든 3ml의 top agar에 혼합하여 LB agar에 도말하여 굳힌 후 37℃에서 10시간 배양하였다.

제 3 절 연구결과 및 고찰

1. feeder cell의 개발에 관한 연구

가. rabbit embryonic fibroblast cell line 확립

임신 15 일령, 17 일령, 19 일령의 태아를 각각 15마리, 14마리, 16마리를 화수하여 각 태아의 붉은 조직과 뇌조직을 제거하고 잘게 절단한 후 Trypsin 처리하여 DMEM(5% FBS)로 배양하였다. 태아 한 마리당 하나의 culture dish(10 cm)로 배양하였을 때 24시간 내 confluent한 상태가 되었다. 계대배양 실험에서는 confluent한 것을 1 : 5 로 희석하여 passing하였을 때 약 48시간내에 confluent한 상태가 되었고 이러한 분열속도는 5번 이상 passing을 하였을 경우에도 변화하지 않았다. passing number 가 10회까지 증가하여도 세포분열상태에는 영향이 없는 것으로 나타나 passing number 4-5회에서 세포분열을 멈추는 mouse fibroblast cell과는 차이가 있는 것으로 나타났다.

나. mouse embryonic fibroblast cell line 개발

임신 13일령과 14일령의 태아를 적출하여 Trypsin 처리하여 토끼의 경우와 마찬가지로 mouse embryonic fibroblast cell line을 확보하였다. 자라는 속도는 rabbit embryonic fibroblast와 거의 비슷하게 confluent한 것을 1 : 5 로 희석하여 passing 하였을 때 약 48 시간 이내에 confluent한 상태로 되었다. 크기와 모양은 실제 현미경하에서 rabbit embryonic fibroblast와 큰 차이가 없었다. mouse embryonic fibroblast cell을 passing number 4 이상에서는 세포분열이 급속히 감소하는 것으로 나타나 ES cell isolation시에는 passing number 4 이하의 것을 사용해야 gkf 것으로 사료된다.

다. SNL cell line 확보

stable cell line인 STO cell line에 embryo의 미분화상태를 유지시켜 주는 factor로 알려져 있는 Leukemia Inhibitory Factor(LIF) gene과 유전자 조작 시 ES Cell의 selection 을 위해 neomycin resistant gene을 transfection시킨 후 이 두 유전자가 많이 발현하는 clone을 선발하여 키운 SNL cell line을 서울대학교 의대 암 연구소로부터 얻어 DMEM(5% FBS) 용액에서 expanded시켜 놓았다. neomycin resistant cell인지를 확인 하기 위해서 G418을 20ug/ml 농도로 DMEM에 첨가하여 배양시켜 보았다. SNL cell은 자라는 속도가 변하지 않았으나 mouse embryonic fibroblast cell은 자라지 않았고 모양도 변하였다. 그러므로 SNL cell은 neomycin-resistant gene을 발현하고 있는 것을 확인 할 수 있었다.

2. 토끼 과배란 유기 및 수정란 채취에 관한 연구

가. 반복적인 과배란 처리에 의한 수정란의 회수율

토끼에서 FSH와 HCG를 이용하여 과배란을 유도한 다음 교미시켜 약 18시간 후에 난관으로 부터 one-cell embryo를 채취하였을 때 평균 32.6개의 embryo를 회수할 수 있었으며 약 7.2%가 cumulus cell을 포함하고 있었고 약 71%의 embryo에서 pronucleus를 관찰할 수 있었다. 반복적인 과배란 처리에 의해서는 회수율이 약간씩 감소하는 경향을 보여 두 번째 과배란 유도에서는 평균 28.7개, 세 번째 과배란 유도에서는 27.9개의 embryo가 회수되었고 그 외 embryo 상태에는 과배란 반복처리에 따른 큰 차이가 없었다. Table 1 에 과배란 유기에 따른 수정란의 회수율과 수정란의 상태를 관찰한 data를 정리하였다.

나. 회수 시기에 의한 수정란의 상태

토끼에서 FSH와 HCG로 과배란을 유도한 다음 교미시킨 후 채란을 14-16시간에 한 것과 18-20시간에 하였을 때의 embryo의 회수율과 상태를 비교하여 보았다. 채란을 에서는 14-16시간에 채란한 것이 평균 29.6개를 얻을 수 있었고, 18-20시간에서는 평균 36.5개의 embryo를 얻을 수 있었다. 14-16시간에 채란한 것이 18-20시간에 채란한 것 보다 cumulus cell을 훨씬 더 많이 함유하고 있었으며 second polar body와 pronucleus의 관찰율이 훨씬 감소하였다. 본 연구결과로 토끼에서 DNA microinjection을 위해서는 과배란 유도하고 교미시킨 다음 적어도 18시간 후에 채란 하는 것이 injection하기 좋은 embryo를 얻기에 적합하다는 결론을 얻었다. Table 2에 채란시기별 회수율과 embryo의 상태의 data를 비교하였다.

3. 토끼 ES cell의 분리

가. 토끼 ES cell 분리 및 분열상태 검사

토끼 ES cell을 확립하기 위해 feeder cell로는 rabbit embryonic fibroblast cell(REF), mouse embryonic fibroblast cell(MEF), SNL cell들을 검사하였다. mitomycin-C 용액(10ug/ml DMEM)에서 약 3 시간동안 배양하여 세포분열을 불활성화시켜 DMEM(+10% FBS)에 보존했고 토끼 수정란은 FSH와 HCG에 의해 과배란 유도하여 1-cell 수정란을 회수하여 RDH(+taurine+BSA) medium에서 96시간 배양하여 hatching 되기 시작하는 blastocyst를 불활성화시킨 cell위에 공배양을 시도하였다. Fig. 1.(a)는 96시간 배양 후 hatching하고 있는 토끼 blastocyst로서 in vitro에서 배양 되었기 때문에 mucin coat가 없는 것을 알 수 있고 Fig. 1.(b)는 hatching하고 있는 토끼 blastocyst를 불활성화시킨 feeder cell에 공배양하고 있는 사진이다. 공배양의 medium으로는 high-glucose DMEM(+15%FCS)을 이용하였고 hatching된 후 분화된 모양의 trophoblast cell은 제거하고 inner cell mass(ICM) 계통의 cell line만을

trypsinization한 후 pasteur pipette를 이용하여 분리하고 배양한 후 계속 잘 자라는 colony를 계대배양에 의해 stem cell colony의 분리를 시도하였다. Fig. 1.(c)는 feeder cell위에서 hatching된 blastocyst로부터 inner cell mass(ICM)만을 분리했을 때 모양이고 Fig. 1.(d)는 분리된 ICM이 feeder cell 위에서 자라는 사진이다.

Table 1. Rabbit superovulation rates

	superovulation		
	first	second ^a	third ^b
Donor number:	24	18	10
Total Embryo no:	782	516	298
average embryo no:	32.6±2.5	28.7±3.7	27.9±4.1
with cummulus:	56(7.2%)	49(9.5%)	36(12.1%)
without cummulus:	726(92.8%)	467(90.5%)	262(88.9%)
2nd polarbody:	695(88.9%)	426(82.6%)	240(80.8%)
pronucleus:	556(71.1%)	389(75.4%)	219(73.5%)

^a The second induction was performed about 1.5 months later following the first induction while the third induction was induced about 2 months later following the second induction.

Table 2. Rabbit one-cell embryo collection

	collection time	
	14-16 hr p.c.	18-20 hr p.c.
Donor number:	8	10
Total Embryo no:	237	365
average embryo no:	29.6	36.5
with cumulus:	128(54.0%)	68(18.6%)
without cumulus:	109(46.0%)	297(81.4%)
2nd polarbody:	169(71.3%)	323(90.7%)
pronucleus:	156(65.8%)	277(75.9%)

분리된 ES cell의 자라는 분열속도나 모양면에서 feeder cell에 따라 큰 차이를 나타냈는데 SNL cell에서 보다는 rabbit embryonic fibroblast(REF)나 mouse embryonic fibroblast(MEF)에서 더 좋은 결과를 얻었다. 계대배양 후 MEF에서 모양과 자라는 속도면에서 가장 좋은 결과를 나타냈다. feeder cell별 효율은 SNL과 REF cell에서 각각 236개와 200개의 토끼 blastocyst를 배양하여 2개와 3개의 cell line을 확보하였고 MEF에서는 150개의 blastocyst로 부터 3개의 cell line을 얻어 토끼 ES cell을 위해서 MEF가 가장 효율적인 것으로 나타났다(Table 3). 전체적인 효율이 낮은 것은 ES cell 분리중 계대배양을 함에 따라 분화되어 버리거나 계대배양 후 colony가 형성되지 않고 자라지 않는 경우가 대부분이었다. 토끼에서 ES cell을 분리하는데 가장 큰 영향을 미치는 것으로는 feeder cell인 것으로 나타났는데 실제 mitomycin-c 처리한 후 feeder cell의 상태에 따라 많은 stem cell들이 분화되어 사라지는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 SNL cell의 경우 LIF(Leukemia Inhibitory Factor)를 생산하는 cell line으로 stem cell 확립에 유리할 것으로 추측되었으나 SNL cell은 토끼 ES cell을 확립하는 데는 REF나 MEF보다 좋은 조건을 제공하지 않는 것으로 나타났다. 그 이유로는 Table 3에서와 같이 효율이 낮을 뿐만아니라 ES cell의 모양을 유지시켜 주지 못하였고 분화가 자주 일어났으며 자라는 속도에 있어서도 다른 두 cell line보다 완만함을 나타내어 분화될 수 있는 시간적 여유를 많이 제공하여 ES cell의 유지에 이롭지 않은 조건을 제공하고 있는 것으로 나타났다. 각 feeder cell에서 ES cell의 자라는 속도도 상당한 차이가 있는 것으로 나타났는데 confluent 상태의 ES cell을 1 : 2로 passing하였을 때 confluent 상태로 될 때까지의 doubling time을 측정하였을 때 SNL cell에서는 평균 120시간이 소요되고 있고 REF와 MEF에서는 각각 평균 96 시간과 84시간이 소요되고 있다(Table 3).

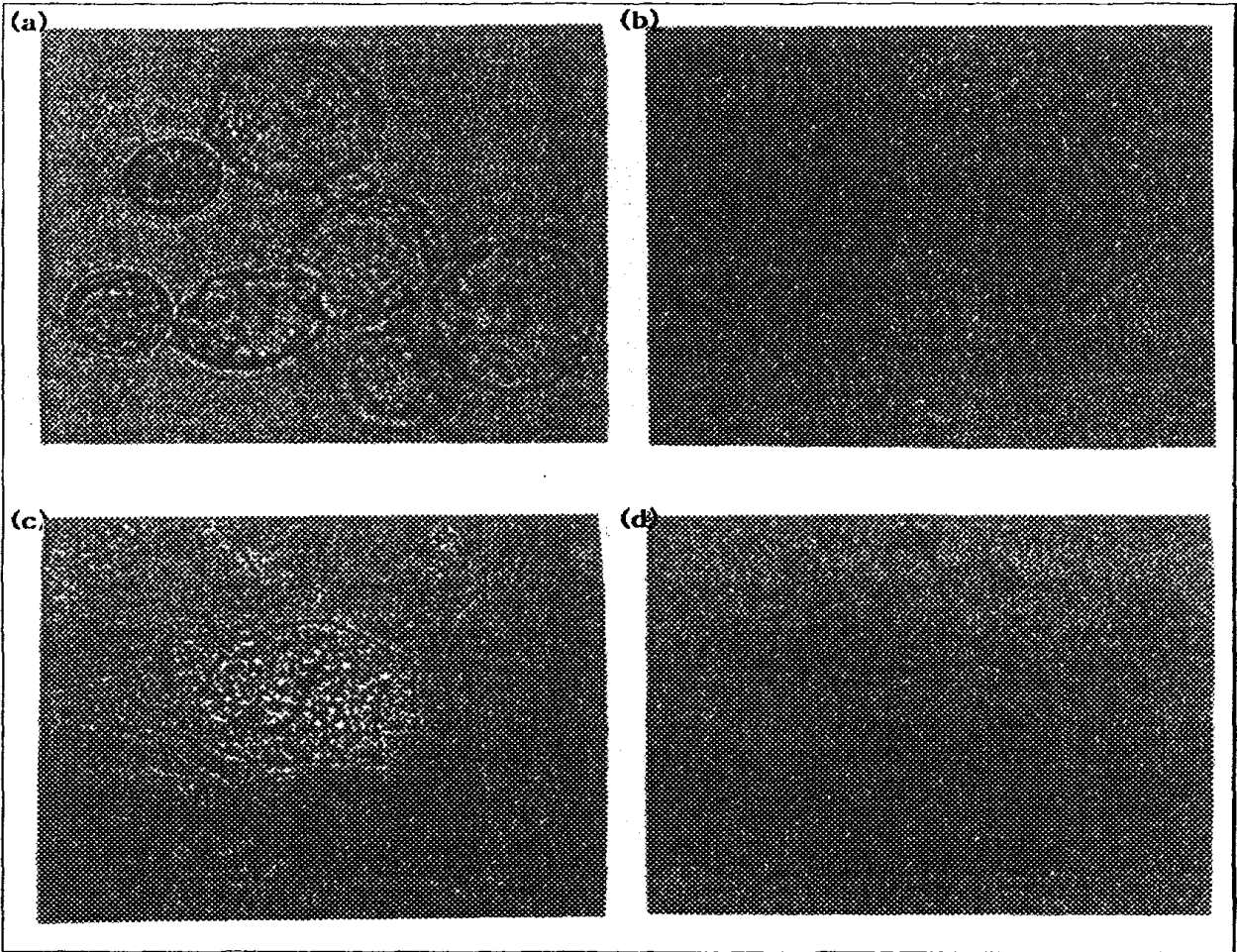


Fig. 1. Isolation of rabbit ES cells by co-culture of hatching blastocysts on mitomycin-c treated mouse embryonic fibroblasts (MEF). (a) hatching rabbit blastocysts (b) culture of hatching rabbit blastocyst on MEF (c) inner cell mass (ICM) isolated from hatched embryos (d) outgrowth of ICM on MEF.

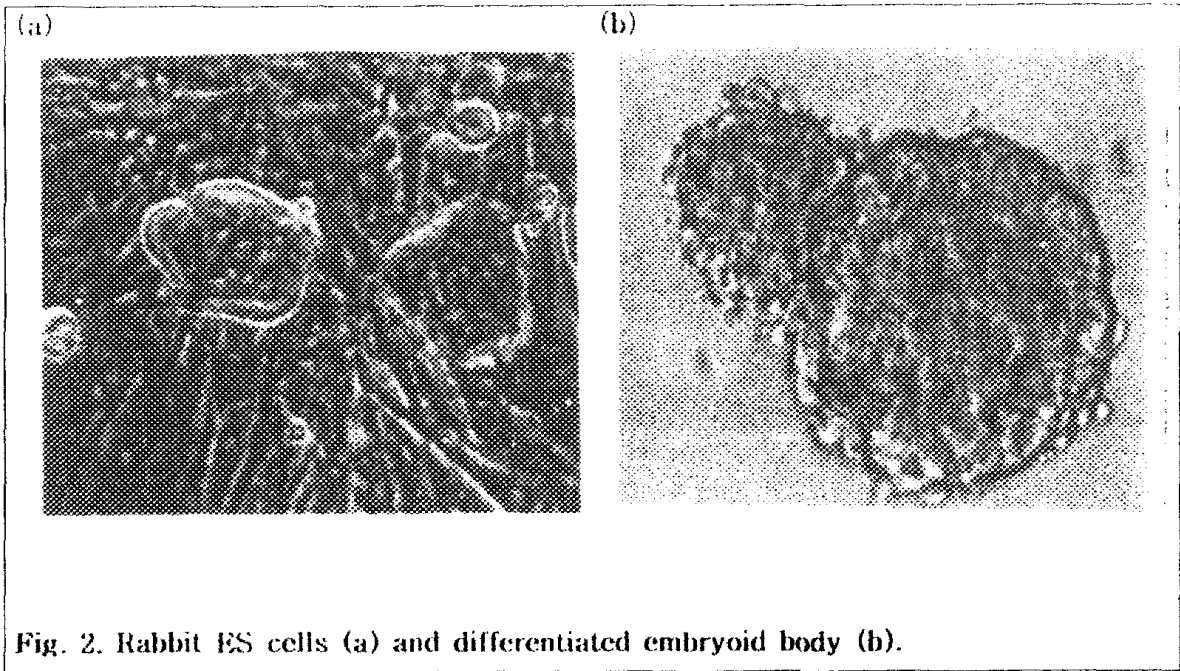


Fig. 2. Rabbit ES cells (a) and differentiated embryoid body (b).

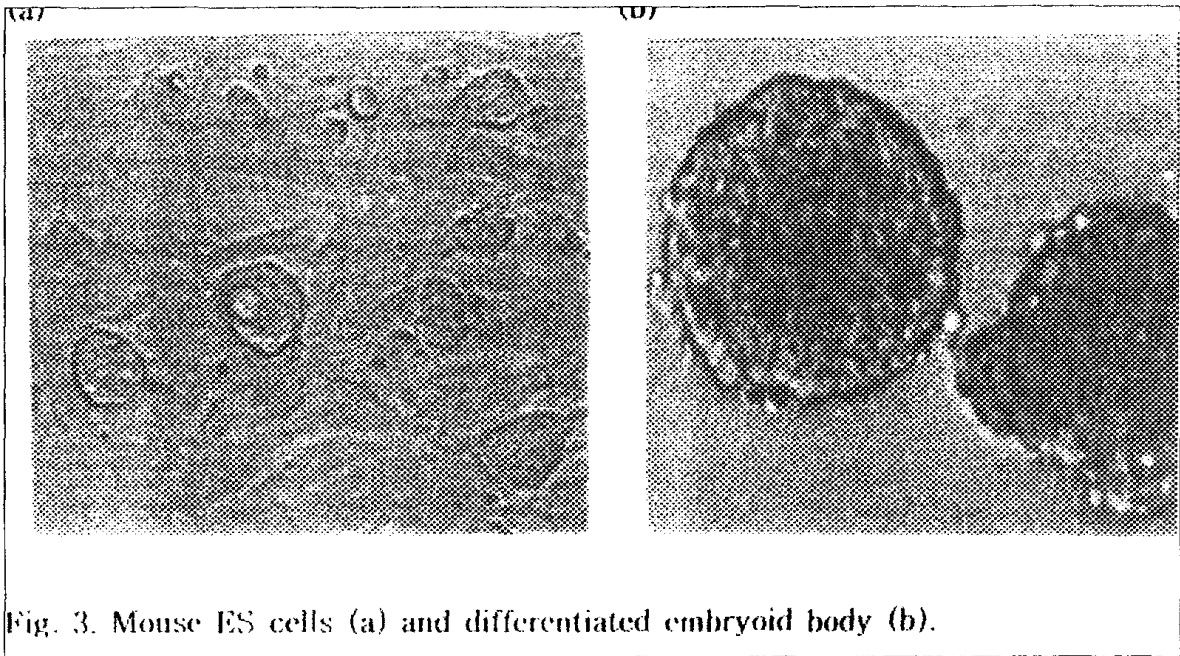


Fig. 3. Mouse ES cells (a) and differentiated embryoid body (b).

Table 3. Efficiency of rabbit ES cell line establishment using different feeder cells and their cell division rates

Feeder cells	Total no. embryos	No. ES cell line	Doubling time(hr) ^a
SNL ^b	236	2	120
REF ^c	200	3	96
MEF ^d	150	3	84

^a average hours for confluent growth following 1 to 2 passing of one confluent dish.

^b STO cells expressing neomycin resistance gene and Leukemia Inhibitory Factor.

^c rabbit embryonic fibroblasts isolated from day 17-fetuses.

^d mouse embryonic fibroblasts isolated from day 13-fetuses.

- A passage number 4 of REF and MEF was used for ES cell establishment.

Table 4. Rabbit ES cell lines isolated on 3 different feeder cells

Rabbit ES cell line	Feeder cell	Passage no. ^a
RESS1	SNL	5
RESS2	SNL	5
RESR1	REF	6
RESR2	REF	6
RESR3	REF	5
RESM1	MEF	10
RESM2	MEF	10
RESM3	MEF	10

^a Passage number above was counted from the first confluent growth in 60 mm dish.

나. 분리된 Stem cell의 분석

분리된 토끼 ES cell의 모양은 mouse ES cell과 같이 둥근 모양의 colony로 자라고 colony주위에는 거의 분화된 세포는 없었다. 자라는 속도는 mouse ES cell에 비해 느리나 약 5번까지의 계대배양에서도 모양이 유지되었을 뿐만 아니라 동결보존 후 용해 후에도 거의 같은 모양을 유지하였다. Fig. 2(a)에서는 MEF에서 분리된 토끼의 ES cell이 전형적인 둥근 모양에 주위가 밝게 나타나 분화된 세포가 없는 것을 알 수 있다. 이와 같이 분리된 토끼 ES cell은 Table 4에서와 같이 feeder cell에 따라 SNL cell의 것은 RESS 1, 2, 그리고 REF와 MEF의 것은 각각 RESR 1, 2, 3, RESM 1, 2, 3로 명명하였고 지금까지의 passage number는 3-5로 유지하고 있다.

다. embryoid body 형성 관찰

분리된 토끼 ES cell이 분화될 수 있는 stem cell line인지를 확인하기 위해 embryoid body로의 분화 가능성 여부를 확인하였다. confluent하게 자란 ES cell을 trypsinization시켜 coloy를 부수지 않거나 서로 모여있게 뭉쳐놓은 상태로 gelatin이 coating되어있지 않은 culture dish로 옮겨 10% FBS를 함유하고 있는 DMEM medium에서 배양하였다. plate 바닥에 부착되지 않고 부유상태로 약 5-7일간 배양하여 강(腔)이 형성된 전형적인 embryoid body를 관찰할 수 있었다. Fig. 2(b)는 토끼 ES cell의 embryoid body인데 분화되어 강(腔)이 형성되었고 안쪽에 외배엽세포(Ectoderm-like cells)와 안쪽에 내배엽세포(Endoderm-like cells)로 분화되고 있는 것을 관찰할 수 있었다. 이렇게 분화된 embryoid body가 형성되는 것을 확인함으로써 분리된 토끼 ES cell이 미분화상태의 stem cell임을 확인할 수 있었다.

4. mouse ES cell의 분리

가. mouse blastocyst 배양 및 ES cell 분리

FVB mouse를 과배란 유도하기 위해 5 IU의 PMSG를 복강내로 주사한 후 48시간에 5 IU의 HCG를 주사하고 교미시켜 3일 후에 자궁에서 blastocyst를 회수하여 hatching 된 수정란을 mitomycin-C 용액으로 불활성화시킨 mouse embryonic fibroblasts(MEF) 와 SNL에서 토끼에서와 같은 방법으로 co-culture시켜 ICM으로 부터 자라는 세포는 trypsinization하여 주위가 밝고 colony를 형성하는 cell line을 증식시켰다. SNL에서는 1개의 stem cell만을 분리하였는데 효율과 모양면에서 좋지 않았으나 MEF에서는 약 105마리의 hatched blastocyst로 부터 3개의 ES cell line을 확립하여 mouse ES 분리를 위해서는 MEF가 훨씬 나은 것으로 나타났다(Table 5).

Table 5. Efficiency of mouse ES cell line establishment using different feeder cells and their cell division rates

Feeder cells	Total no. embryos	No. ES cell line	Doubling time(hr) ^a
SNL	98	1	36
MEF	105	2	24

나. mouse ES cell 분석 및 embryoid body 형성 관찰

mouse blastocyst의 ICM으로 부터 자라는 cell line은 2-3번의 계대배양 후 자라는 속도가 토끼에 비해 훨씬 좋았으며 Fig.3(a)에서 보여주듯이 전형적인 ES cell 모양을 나타내었다. 계대배양 후에 모양도 잘 유지되었고 doubling time은 약 24시간 정도였으므로 토끼 ES cell에 비해 월등히 빠른 것으로 나타났다(Table 5).

분리된 mouse ES cell의 embryoid body로의 분화를 확인하기 위해 토끼에서와 같이 gelatin이 coating 되어있지 않은 culture dish에 배양하여 약 4-5일 후에 embryoid body의 형성을 관찰하였다. Fig. 3(b)에서 mouse ES cell에서 형성된 embryoid body로 강(腔)이 형성되었고 안쪽에 외배엽세포(Ectoderm-like cells)와 안쪽에 내배엽세포(Endoderm-like cells)도 관찰할 수 있었다.

분리된 토끼 ES cell이 분화될 수 있는 stem cell line인지를 확인하기 위해 embryoid body로의 분화 가능성 여부를 확인하였다. confluent하게 자란 ES cell을 trypsinization시켜 coloy를 부수지 않거나 서로 모여있게 뭉쳐놓은 상태로 gelatin이 coating되어있지 않은 culture dish로 옮겨 10% FBS를 함유하고 있는 DMEM medium에서 배양하였다. plate 바닥에 부착되지 않고 부유상태로 약 5-7일간 배양하여 강(腔)이 형성된 전형적인 embryoid body를 관찰할 수 있었다. Fig. 2(b)는 토끼 ES cell의 embryoid body인데 분화되어 강(腔)이 형성되었고 안쪽에 외배엽세포(Ectoderm-like cells)와 안쪽에 내배엽세포(Endoderm-like cells)로 분화되고 있는 것을 관찰할 수 있었다. 이렇게 분화된 embryoid body가 형성되는 것을 확인함으로써 분리된 토끼 ES cell이 미분화상태의 stem cell임을 확인할 수 있었다.

5. 분리된 토끼 ES cell의 passage number에 따른 미분화상태 연구

세가지 feeder cell (SNL, REF, MEF)에서 분리된 토끼 ES cell line은 trypsinization을 시킨 후 1:3 또는 1:5 비율로 passing 시킨 것을 1 passage number로 하여 passage number를 test하였고 passage number가 증가함에 따라 doubling 되는 시간과 differentiation되는 상태를 조사하였다. 또한 액체질소에 freezing한 것을 passage 1로 하여 freezing 후 ES cell의 상태를 검사했다. feeder로 mouse embryonic fibroblast(MEF)에서 분리된 ES cell(RESM)은 passage number가 약 20까지 증가하여도 cell 모양과 doubling time이 거의 변하지 않아 가장 좋은 ES cell로 나타나고 있고 rabbit embryonic fibroblast(REF)에서 분리된 토끼 ES cell(RESR)은 passage number가 10으로 증가함에 따라 colony 모양은 좋으나 doubling time이 증가하는 경향을 나타냈다 (Table 6, Table 7). 또한 feeder로 SNL cell에서 분리된 토끼 ES cell은 passage number가 증가함에 따라 다른 것에 비해 doubling time이 증가하고 ES cell 모양이 coloy모양 주위가 fibroblast모양으로 differentiation되는 경향을 나타내었다. 그러므로 MEF는 토끼 ES cell이 미분화상태를 유지시켜 주는 물질을 제공한다는 것을 알 수 있다.

6. 토끼 ES cell의 alkaline phosphatase activity

미분화된 cell 특히 germ cell로서의 능력을 가진 cell에서 alkaline phosphatase enzyme이 강하게 발현하여 ES cell 또는 PGC cell에서 대표적인 미분화 marker로 이 enzyme의 활성을 측정하게 되는데 본 연구에서도 분리된 토끼 ES cell과 FVB종에서 분리된 생쥐 ES cell에 대해 alkaline phosphatase activity를 immunochemical staining 방법에 의해 substrate를 넣어 측정하여 보았다. 만약 cell에 이 alkaline

phosphatase의 활성이 있으면 substrate를 분해시켜 보라색으로 염색되게 된다. mouse ES cell 뿐만 아니라 토끼 ES cell에서도 보라색으로 염색되어 강한 alkaline phosphatase를 발현하고 있는 것으로 나타났다(Fig. 4, A: 토끼 ES cells, B: 생쥐 ES cells). control로는 ES cell 밑에 깔려있는 feeder cell로 전혀 염색되지 않은 상태로 alkaline phosphatase activity가 전혀 없는 것으로 나타난 반면 그 위에서 자라고 있는 ES cell은 진하게 염색되어 강한 alkaline phosphatase activity를 나타내어 stem cell인 것을 확인하였다.

Table 6. Rabbit ES cell lines isolated on 3 different feeder cells

Rabbit ES cell line	Feeder cell	Passage no. ^a
RESS1	SNL ^b	10
RESS2	SNL	10
RESR1	REF ^c	12
RESR2	REF	11
RESR3	REF	11
RESM1	MEF ^d	20
RESM2	MEF	20
RESM3	MEF	20

^a Passage number above was counted from the first confluent growth in 60 mm dish.

^b STO cells expressing neomycin resistance gene and Leukemia Inhibitory Factor.

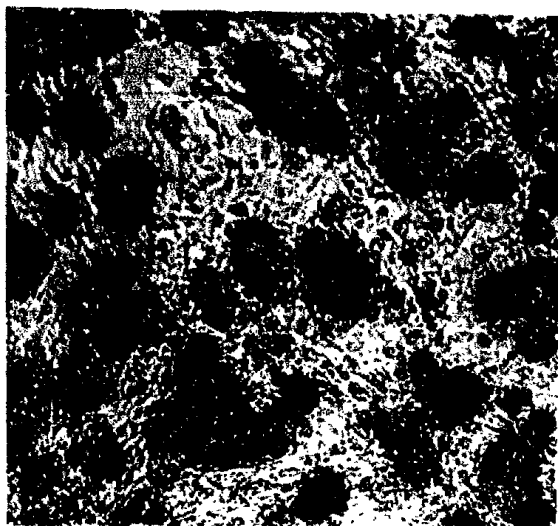
^c rabbit embryonic fibroblasts isolated from day 17-fetuses.

^d mouse embryonic fibroblasts isolated from day 13-fetuses.

Table 7. Cell division rates of rabbit ES cell lines established on different feeder cells by passage number

Feeder cells	doubling time (hours)	
	5 passage no.	10 passage no.
SNL ^a	120	190
REF	96	120
MEF	84	90

(A)



(B)

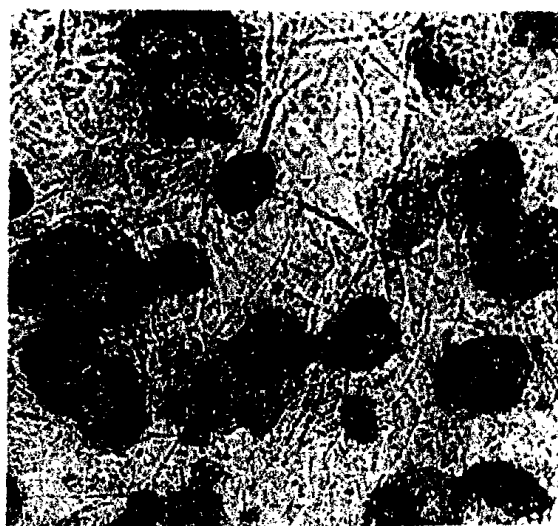


Fig. 4. Alkaline phosphatase activity in rabbit ES cells (A) and mouse ES cells (B)

7. 토끼 ES cell의 chromosome karyotyping과 sexing

분리된 토끼 ES cell을 약 70% confluent한 상태에서 colcemid 용액을 넣어 metaphase II에 정지시키어 chromosome을 준비하였다. 토끼의 chromosome은 총 44개로 이루어져 있고 21개쌍의 상염색체와 2개의 성염색체인 X-chromosome과 Y-chromosome으로 구성되어 있다. ES cell의 염색체 분석에서는 현미경하에서 slide위에서 약 10개의 염색체수를 counting했을 때 44개의 염색체수를 나타내는 비율을 측정하였는데(Fig. 2) 80% 이상이면 정상으로, 약 80% 이상이 44개의 염색체 수를 나타내는 것이 약 5개의 colony를 나타내고 있고 약 70% 이상이 44개의 염색체 수를 나타내는 것이 4개 colony로 나타나고 있고 변이는 44 ± 2 개로 관찰되고 있다(Table 8).

또한 성염색체를 관찰하여 토끼 ES cell의 sex를 규명하였는데 4개의 colony가 암컷(XX) cell로 나타났고 5개가 수컷(XY) cell로 분석되었다. 토끼의 성염색체는 X-chromosome이 거의 metacentric 모양을 이루고 있고 Y-chromosome은 동원체가 거의 말단부위에 동원체가 있어 거의 acrocentric 형에 가까운 모양을 나타내고 있다(Fig. 5와 6). 성염색체의 크기는 X-chromosome이 훨씬 크고 Y-chromosome은 20 또는 21번 째의 chromosome과 거의 비슷하여 sex의 구분에 쉽게 이용될 수 있다.

Table 8. Percentages of normal karyotype in rabbit ES cell lines isolated on 3 different feeder cells

Rabbit ES cell line	Feeder cell	Normal karyotype(%) ^a	Sex
RESS1	SNL ^b	70	male
RESS2	SNL	70	male
RESR1	REF ^c	80	female
RESR2	REF	70	male
RESR3	REF	80	female
RESM1	MEF ^d	80	female
RESM2	MEF	90	female
RESM3	MEF	100	male

^a percentage of normal chromosome numbers out of 10 chromosome samples

^b STO cells expressing neomycin resistance gene and Leukemia Inhibitory Factor.

^c rabbit embryonic fibroblasts isolated from day 17-fetuses.

^d mouse embryonic fibroblasts isolated from day 13-fetuses.

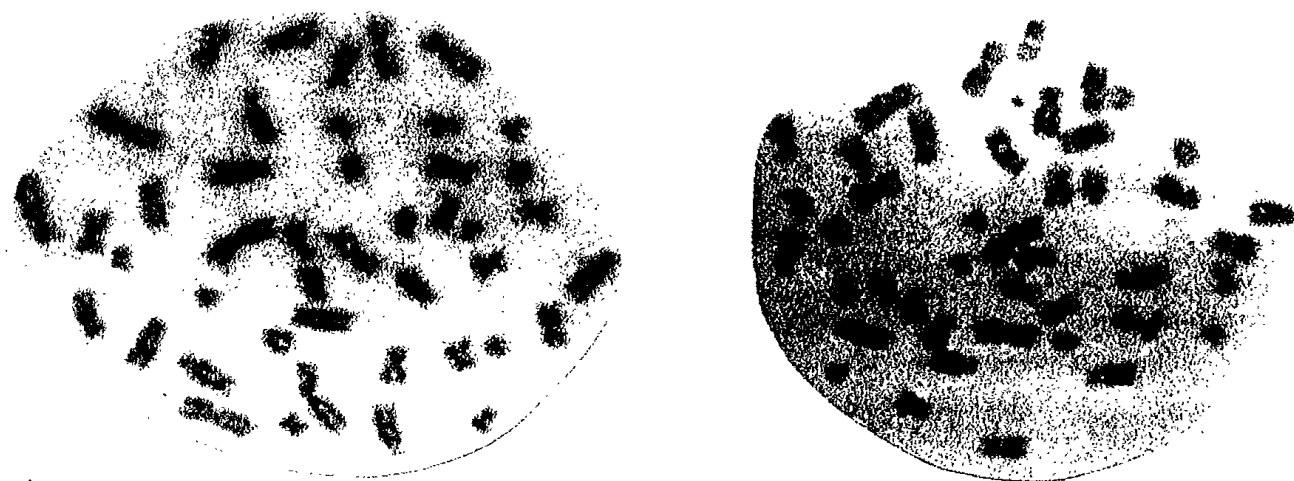


Fig. 5. The chromosomes of rabbit ES cells

IDIODRAM

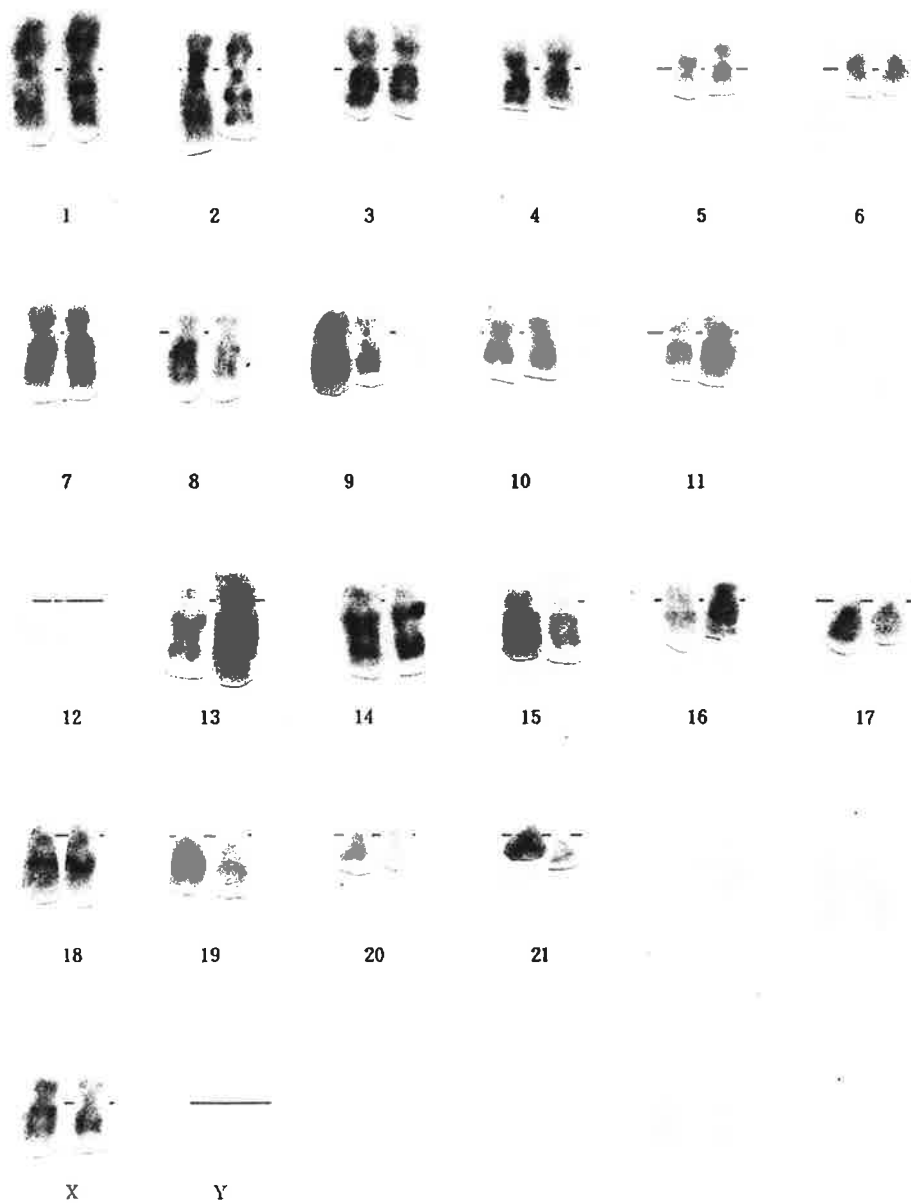


Fig. 6. Idiogram of rabbit ES cell derived from female embryos

IDIODRAM



Fig. 6. Idiogram of rabbit ES cell derived from female embryos

IDIODRAM

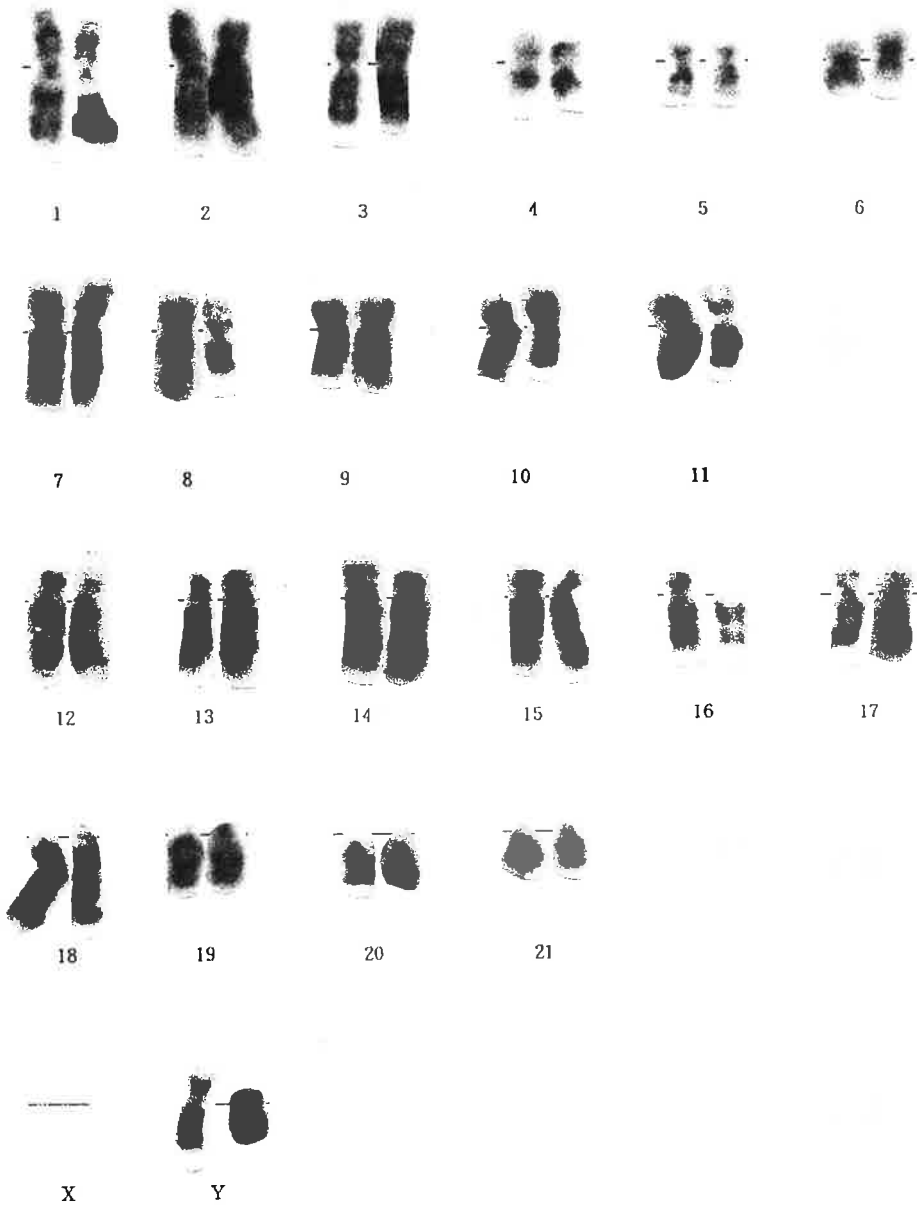


Fig. 7. Idiogram of rabbit ES cells derived from male embryo

IDIODRAM

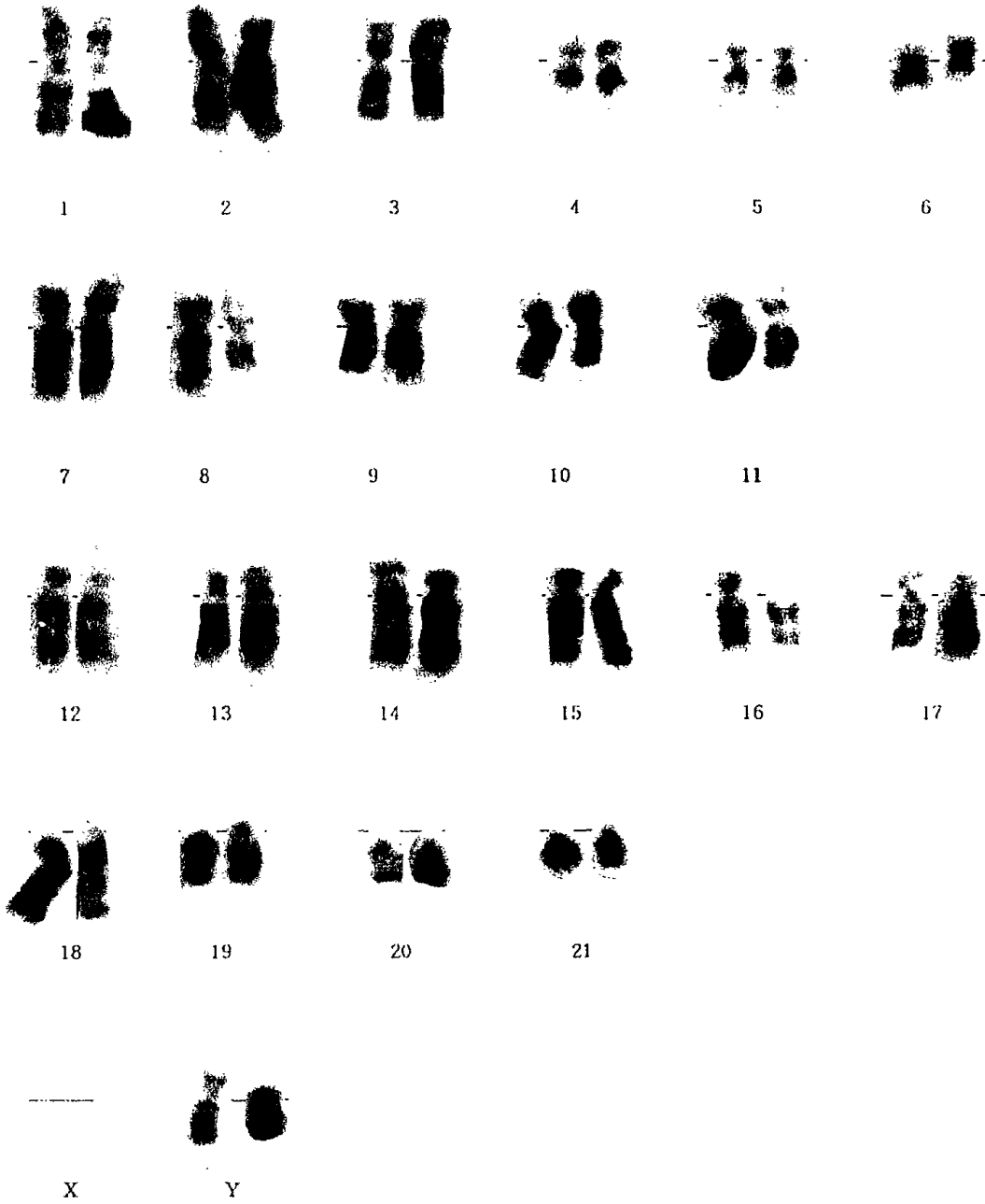


Fig. 7. Idiogram of rabbit ES cells derived from male embryo

8. 분화시킨 토끼 ES cell의 유전자 발현 차이의 protein level 규명

토끼 ES cell을 feeder cell 없이 배양하면 분화되어 embryoid body를 형성하는데 이렇게 분화시 합성 protein의 발현양상을 규명하여 분화된 것과 분화하지 않은 ES cell과의 분리 marker를 개발하기 위해 protein gel을 이용하여 protein band의 차이를 비교하고 있다. cell을 RIPA buffer를 이용하여 lysis시키고 원심분리하여 protein extract를 만들어 12% SDS-PAGE에 약 40 ug의 total protein을 loading하여 전기영동 분리를 시도하고 있다. 전기영동이 끝난 gel의 coomassie blue staining 방법과 silver staining 방법으로 염색 후 탈색시켜 band 양상을 분석하고 있다. 현재 까지 분석된 것으로는 약 60 kd band가 미분화 ES cell에는 분명하게 존재하나 분화된 cell에서는 사라지는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 8). molecular weight가 작은 band(약 30 kd 이하)에서는 큰 차이가 거의 없는 것으로 나타나고 있고 이러한 band pattern은 생쥐의 것과 거의 비슷한 양상으로 나타났다.



Fig. 8. Analysis of protein band patterns in differentiated rabbit ES cells (lane 2, 3, 4) and undifferentiated rabbit ES cells (lane 5, 6, 7). lane 1: low molecular protein marker. lane 2, 5: 30 ug of loading protein. lane 3, 6: 40 ug of loading proteins, lane 4, 7 : 50 ug of loading proteins. arrows: specific band in differentiated ES cells.

9. Chimera 토끼의 생산

본 연구에서 이용되고 있는 토끼 ES cell은 New Zealand White종으로 분리된 것으로 mouse embryonic fibroblast(MEF)하에서 자라는 RESM1, RESM2, RESM3 line을 사용하였다. 이 ES cell은 colony모양이 좋고 자라는 속도가 빠르며 karyotype이 정상적인 것으로 passage number가 20세대 이상까지 잘 자라고 있는 것들을 선발한 것이다. 이를 이용하여 Chimera 토끼를 생산하기 위해 donor 수정란은 유색종인 순종 Dutch Belted종으로부터 과배란 처리하여 회수한 것을 이용하였다. 그러므로 ES cell이 정상적인 태아 발육에 관여하여 Chimera 토끼가 생산되면 Dutch Belted종의 검은색이 흰색으로 희석되는 것으로 Chimera를 확인하였다. ES cell을 주입하는 방법으로는 배반포기와 상실기의 수정란을 사용하였는데 micromanipulator하에서 약 15-20개의 ES cell을 배반포배의 배반포강이나 상실배에 주입한 후 Recipient의 자궁으로 이식하여 새끼를 생산하였다(Fig. 9). 본 연구에서 이용된 토끼 ES cell의 passage number는 10 이하의 것을 사용하여 ES cell의 계대배양에 따른 미분화성의 감소를 최소화시켰다(Table 9, 10).

총 470개의 Dutch Belted종 배반포배(Blastocyst)를 이용하여 39마리의 새끼를 생산하였는데 이중 8마리가 Chimera 토끼인 것으로 나타났다(Table 9). 털색의 chimeric율은 Dutch Belted종의 모피 검정색 띠가 흰색(albino)으로 희석되는 분포에 따라 0%(Dutch Belted의 순수한 검정색 띠)에서 100%(Dutch Belted에서 검정색 띠의 albino화)로 추정하였는데 Chimera 토끼 털색의 chimeric율은 약 10-50%인 것으로 다양하게 나타났다(Fig. 2). 3개의 ES cell line 중에 RESM3로부터 5마리가 태어나 가장 좋은 것으로 나타나 ES cell line별로 Chimera 생산율에 차이가 있는 것으로 드러났다. 원래 ES cell은 수컷 cell로 태어난 Chimera 토끼에서 6마리는 수컷이었고 2마리가 암컷으로 태어났다. 수컷 Chimera 토끼가 chimera율이 높은 것으로 나타나 수컷 Chimera 토끼가 germline transmission율이 높을 것으로 추정되었다.

상실배(Morula)를 이용한 실험에서는 총 320개의 상실배에 ES cell을 주입하여 Recipient에 이식하였는데 총 33 마리의 새끼가 태어나 이중 2마리가 Chimera 토끼로 나타났다(Table 10). RESM2와 RESM3의 ES cell line에서 각각 1마리씩 Chimera 토끼가 생산되었다. 2마리 모두 수컷이었고 털색의 chimeric율은 10-30%인 것으로 나타났다.

본 연구에서 생산된 Chimera 토끼는 전형적인 털색의 혼합 표현형을 나타내고 있다 (Fig. 10). Dutch Belted종의 수정란을 이용하였기 때문에 Dutch Belted의 검은색에 모피에 흰색 띠가 섞여 나타나고 있다. 털색 chimeric율이 최대 50%를 나타내고 있는 2마리의 경우 생식세포에도 ES cell로부터 유래된 세포가 있을 것으로 추정되었다.

본 결과로 ES cell을 이용하여 Chimera 토끼를 생산하였을 때 배반포배의 효율이 상실배보다 높은 것으로 나타났다. 털색 chimeric율도 배반포를 이용하였을 때 높게 나타났는데 이는 배반포배의 Inner Cell Mass와 ES cell의 결합으로 태아의 발달에 직접적으로 관여하는 확율이 상실배보다는 높아 나타나는 현상으로 추정된다. 전체적인 수정란이식율은 배반포배나 상실배에서 큰 차이는 없는 것으로 나타났다.

Table 9. Production of chimera rabbits after injection of ES cells into the blastocoel cavity

ES cell lines	Passage no.	No. Blastocysts	No. Born	No. Chimera
RESM1	9	120	11	2
RESM2	8	150	10	1
RESM3	9	200	18	5
Total		470	39	8

Table 10. Production of chimera rabbits after injection of ES cells into the morula

ES cell lines	Passage no.	No. Blastocysts	No. Born	No. Chimera
RESM1	9	100	7	0
RESM2	8	100	11	1
RESM3	9	120	15	1
Total		320	33	2

10. Germline Transmission 확인

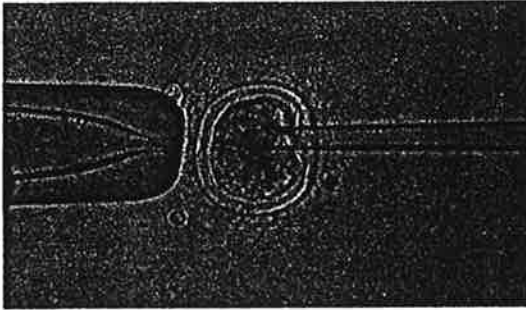
태어난 Chimera 토끼 중에서 수컷이고 털색 chimeric율이 높은 3마리를 New Zealand White종 암컷과 교배시켜 germline으로 전달되는지를 확인하였다. 만약 Chimera 토끼에서 ES cell로부터 유래된 생식세포가 있다면 흰색(albino) New Zealand White종의 새끼가 태어나는 것으로 germline transmission을 확인할 수 있다.

상실배에서 생산된 Chimera 토끼(M1)는 털색 chimera율이 약 35% 정도로 현재까지 6마리의 새끼가 태어났으나 germline transmission된 albino 토끼는 생산하지 않고 있고, 배반포에서 생산된 두 마리의 Chimera 토끼(B1, B2)에서 3마리의 albino 토끼가 생산되었다(Table 3). 그러므로 본 연구에서 확립한 토끼 ES cell은 생식세포로 분화될 수 있는 전능성을 가진 것으로 확인되었다.

Table 11. Germline transmission of chimeric rabbits

Chimera No.	No. Born	No. Albino
M1	6	0
B1	14	1
B2	12	2
Total	32	3

(A)



(B)

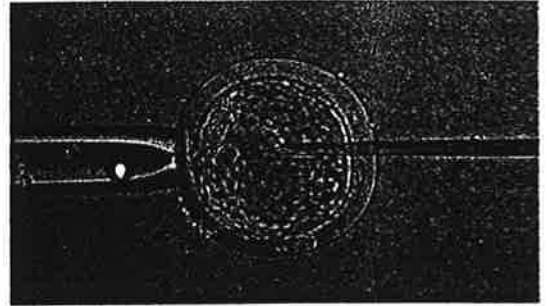


Fig. 9. Injection of rabbit ES cells into rabbit morula (A) and blastocyst (B)

(A)



(B)



Fig. 10. Chimera rabbit (A) produced by injection of ES cells into blastocysts of Dutch Belted strain (B)

11. 토끼 genomic DNA의 추출과 Lambda phage vector 구축

본 과제에서 확립된 토끼 ES cell은 New Zealand White종의 수정란으로부터 유래된 line으로 genomic DNA library를 위해 New Zealand White종 수컷의 혈액으로부터 200kb이상의 genomic DNA를 추출하였다(Stratagene DNA prep kit). Sau3AI enzyme을 이용하여 partial digestion의 조건을 규명하여 large-scale partial digestion을 실시하여 15-25kb DNA fragment가 생성되도록 준비하였다(Fig. 11). phage vector DNA(lambda dash II, Stratagene)는 Bam HI으로 digestion을 한 후 alkaline phosphatase를 처리하여 vector에 dephosphorylation을 시켜 self ligation이 방지되도록 준비하여 사용하였다. partial digested genomic DNA와 phage arm DNA의 ligation을 T4 DNA ligase를 이용하여 실시하였고 0.5-1ug ligated DNA를 이용하여 packaging extract와 혼합한 후 실온에서 3시간 incubation하여 packaging을 실시하였다. titering을 위해 dilution하여 bacteria cell에 infectin 시킨 후 plaque 수를 세어 pfu/ml을 계산하였다. high titer library를 bacteria cell에 넣어 first round amplification만을 대량 실시하여 DMSS용액에 저장 보관하였다.

본 토끼 genomic library는 1.7×10^9 pfu/ml의 높은 titer를 나타내었고, 평균 insert DNA의 크기는 약 17kb로 우수한 genomic library로 판명되었다.

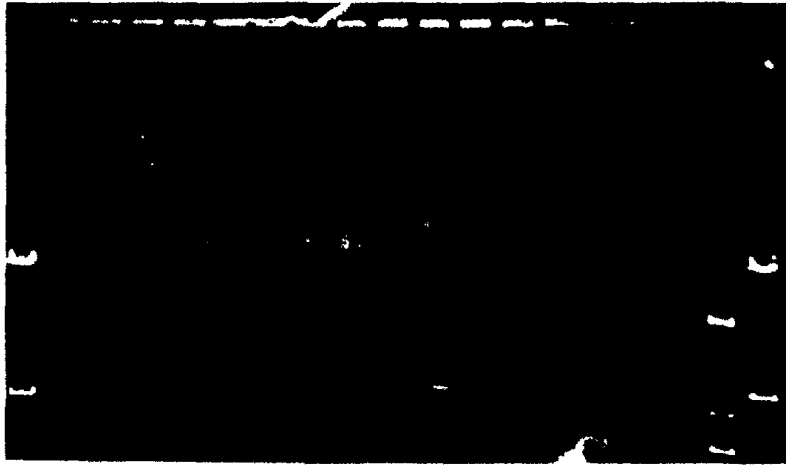


Fig. 11. partial restriction enzyme digestion with sau3A1 for production of larger genomic DNA fragments.

12. 유전자적중용 vector

positive 및 negative selection marker를 가지면서 genomic homologous DNA의 삽입이 용이하도록 cloning site가 다양한 genomic 유전자적중용 vector를 구축하였다. basic vectro로는 pK0scrambler(Lexicon)에 pK0selectNoe를 Asc I으로 자른 후 PGK promoter와 연결된 neomycin-resistant(neo) gene을 삽입하였고 pK0selectDT에서 RNA polymerase II promoter와 연결된 diphtheria toxin A chain(DT) gene을 Rsr II로 자른 후 삽입하여 pK0neoDT vector를 구축하였다. 총 4.6 kb로 basic plasmid 2.0 kb, n대 gene 1.6 kb 및 1.0 kb DT gene으로 이루어져 있다 (Fig. 12)본 vector는 neo gene과 DT gene사이에 Hpa I, Bgl II, Hind III, Kpn I 및 Xho I 제한효소자리가 갖고 있고 neo gene 앞에는 Bam HI, Cla I, EcoR I, Sac II, Sma I, Sal I 및 Not I을 가지고 있고 유전자적중 vector를 구축한 후 Sal I이나 Not I으로 linaerization을 시킬 수 있도록 구축하였다(Fig.13).

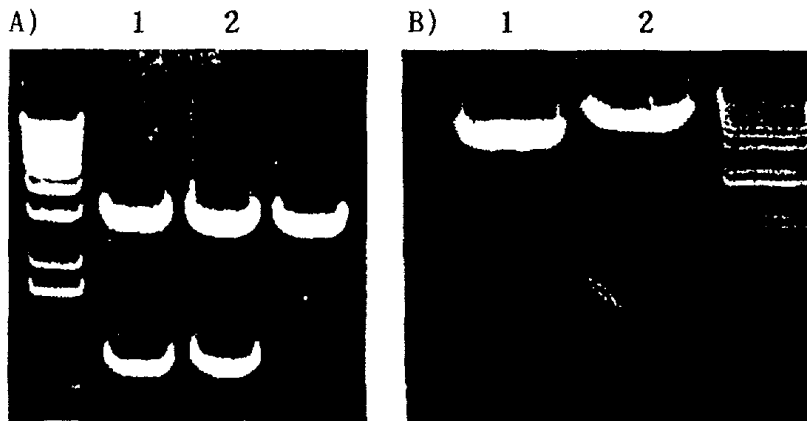


Fig. 12 pK0neoDT vector construction. A) Rsr II digestion. About 0.9kb of DT gene was released (lane 1 and 2). B) About 4.6 kb of linearized vector with Not I (lane 2), Intact (lane 1)

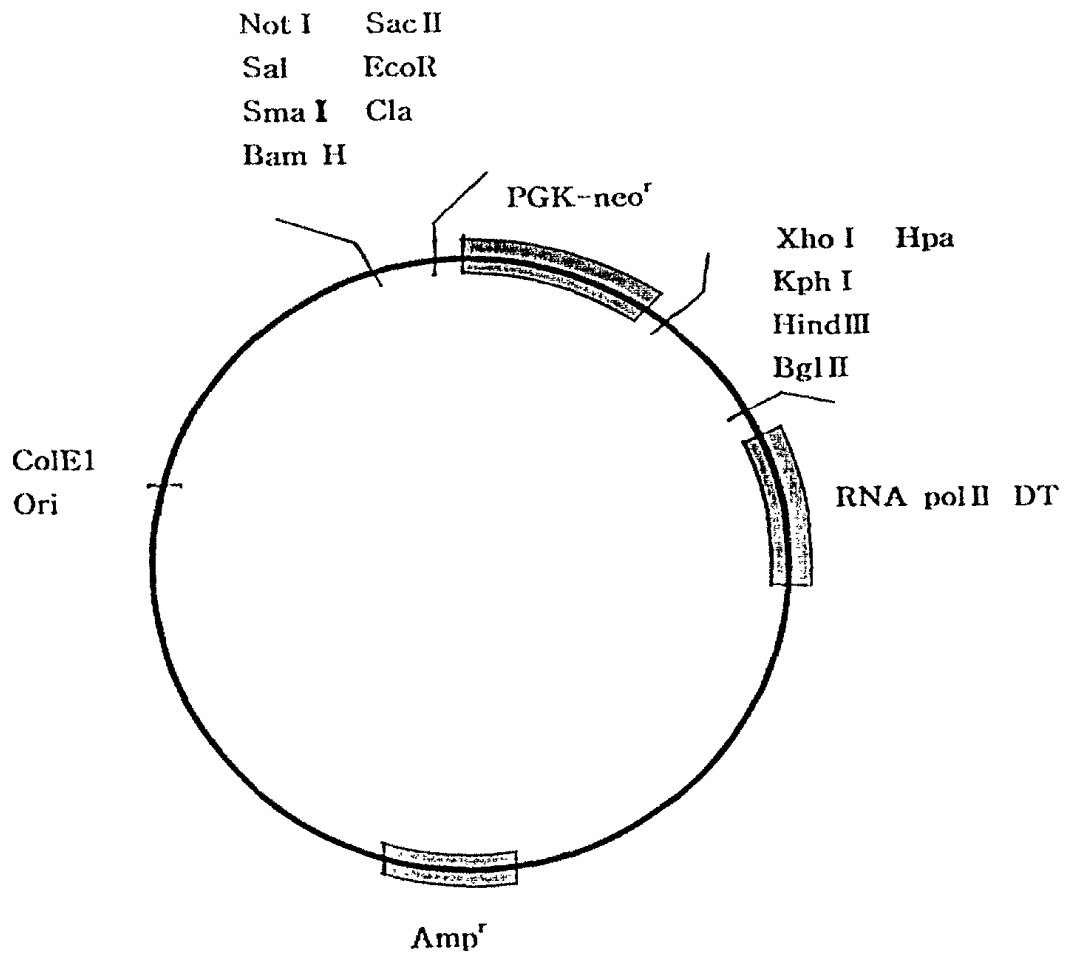


Fig. 13. Restriction map of targeting vector constructed with neomycin resistant gene (neo^r) and diphtheria toxin gene (DT)

제 4 절 결론

본 연구의 목적은 분화전능성을 지닌 토끼의 배아세포를 분리하고 배양하여 분화 과정을 연구하고 토끼 배아세포의 특성을 규명하고 유전자조작에 이용될 library 및 벡터를 구축하는데 있다.

토끼 배아세포를 분리하기 위해 과배란시킨 공란토로부터 토끼 수정란을 채란한 후 체외에서 배반포까지 배양한 후 feeder cell과 공배양하여 ICM으로부터 배아세포를 분리하였다. 이 과정에서 feeder cell로는 rabbit embryonic fibroblast cell(REF), mouse embryonic fibroblast cell(MEF), SNL cell을 이용하였는데 MEF가 가장 높은 분리효율을 나타냈고 세포분열속도 및 모양에서 가장 적절한 feeder cell임이 증명되었다. 분리된 토끼 배아세포는 전형적인 미분화 배아세포의 모양을 나타냈고 계대배양 후에도 모양이나 자라는 속도가 변하지 않았고 동결보존에서 분화하지 않는 것으로 나타났다. 또한 karyotyping 검사에서도 정상적인 염색체 수와 모양을 가지고 있는 것으로 나타났다.

토끼 배아세포를 gelatin으로 coating 안된 배양접시에서 배양하였을 때 부유상태로 증식하면서 내부강이 생기고 내배엽과 dh1qoduq이 형성되는 전형적인 embryoid body로 분화되어 미분화상태의 배아세포임을 확인하였다. 또한 미분화상태의 세포에서 발현되는 alkaline phosphatase의 활성화도 토끼 배아세포에서 강하게 나타내었다. 또한 분화를 유도한 후 protein level에서의 차이를 SDS-PAGE gel에서 관찰한 결과 약 60 kd에서 명확한 band를 관찰할 수 있어 세포 분화에 관여하는 마커를 규명하였다.

정상 수정란과 aggregation 시켜 chimea를 유도하였을 때 높은 chimeric율을 나타내었고 backcrossing에 의해 germline transmission을 확인하였을 때 토끼배아세포에서 유도된 새끼가 태어나 토끼 배아세포가 생식세포로 분화되었음을 확인할 수 있었다.

토끼 배아세포를 이용하여 dbn전자조작을 하기 위해서는 DNA library가 필요한데 본 연구에서는 titer가 높고 insert DNA의 크기가 큰 토끼배아세포와 같은 line의 genomic DNA library를 구축하였으며, 효율적인 유전자적증을 위해 벡터를 개발하였다.

이상에서와 같이 본 연구는 원래 계획한 대로 모든 연구가 이루어져 이 분야에 독보적인 기술 축적과 아울러 미분화상태의 토끼 배아세포를 확보하여 효율적인 유전자 조작기술의 발전에 기여했다고 사료된다.

제 5 절 참고문헌

1. Abbondazo, S. J., I. Gadi and S. L. Stewart. 1993. Derivation of embryonic stem cell line. In Guide to techniques in mouse development, Wassarman P. and M. L. DePamphilis (Ed.), Academic Press, San Diego U.S.A., p. 803-823.
2. Bronson, S. K. and O. Smithies. 1994. Altering mice by homologous recombination using embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 269:27155-27158.
3. Brugarolas, J. C., Chandrasekaran, J. I. Gordon, D. Beach, T. Jacks and G. J. Hannon. 1995. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 377:552-557.
4. Capecchi, R. M. 1989. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244:1288-1292.
5. Doetschman, T. P., Williams and N. Maeda. 1988. Establishment of hamster blastocyst derived embryonic stem (ES) cells. *Dev. Biol.* 127:224-227.
6. Evans, M. J. and M. H. Kaufman. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156.
7. Graves, K. H. and R. W. Moreadith. 1993. Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from preimplantation rabbit embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 36:424-433.
8. Hastly, P., R. Ramiro-Solis, R. Krumlauf and A. Bradley. 1991. Introduction of a subtle mutation into the *Hox-2.6* locus in embryonic stem cell. *Nature* 350:243-246.
9. Hogan B., R. Beddington, F. Constantini and E. Lacy. 1994. Manipulating the mouse embryo. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, U.S.A.

10. Kim, H. S. and O. Smithies. 1988. Recombinant fragment assay for gene targeting based on the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 18:8887-8903.
11. Mansour, S. L., K. R. Thomas, C. Deng and M. R. Capecchi. 1990. Introduction of a *lacZ* reporter gene into the mouse *int-2* locus by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:7688-7692.
12. Mansour, S. L., K. R. Thomas, C. Deng and M. R. Capecchi. 1988. Disruption of the proto-oncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336:348-352.
13. Martin, G. R. 1981. Establishment of pluripotential cell lines from embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:7634-7634.
14. Notarianni, E., C. Galli, S. Laurie, R. M. Moor and M. J. Evans. 1991. Derivation of pluripotent embryonic cell lines from the pig and sheep. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 43:225-260.
15. Piedrahita, J. A., G. B. Anderson and R. H. Bondurant. 1990. On the isolation of embryonic stem cells: comparative behavior of murine, porcine and ovine embryos. *Theriogenology* 34:879-901.
16. Pinkert, C. A. and S. L. Stice. 1995. Embryonic stem cell strategies: beyond the mouse model. In *Strategies in transgenic animal science* Monastersky G. M. and J.M. Robl (Ed.), ASM Press, p. 73-85.
17. Riele, H., E. R. Maandag and A. Berns. 1992. Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:5128-5132.

18. Robertson, E. J. 1987. Embryo-derived stem cell line. In teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach, E. J. Robertson(Ed.), IRL, Oxford, pp. 71-112.
19. Sedivy, J. M. and A. L. Joyner. 1992. Gene targeting. W. H. Freeman and Company, New York, U.S.A.
20. Sim, M. M. and N. L. First. 1993. Production of fetuses from totipotent cultured bovine inner cell mass cells. *Theriogenology* 39:313(Abstr).
21. Smithies, O and H. S. Kim. 1994. Targeted gene duplication and disruption for analyzing quantitative genetic traits in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3612-3615.
22. Smithies, O. and N. Maeda. 1995. Gene targeting approaches to complex genetic diseases: Atherosclerosis and essential hypertension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:5266-5272.
23. Stice, S. L., N. Strelchenko, J. Betthauser, B. Scott, G. Jugella, J. Jackson, V. David, C. Keefer and L. Matthews. 1994. Bovine pluripotent embryonic cells contribute to nuclear transfer and chimeric fetuses. *Theriogenology* 41:301 (Abstr).
24. Wurst, W. and A. L. Joyner. 1993. Production of targeted embryonic stem cells clones. In *Gene targeting: a practical approach* A. L. Joyner (Ed.), Oxford University Press, Oxford, U.S.A., p. 33-66.

제 3 장 DNA 미세주입법에 의한 형질전환토끼의 생산

제 1 절 서설

뇌하수체에서 분비되는 growth hormone(GH)은 체성장과 대사활동을 조절하는 역할을 하는 것으로 보고되고 있고, 최근에는 번식생리나 면역생리에도 관여하고 있다고 알려지고 있다. 그러나 growth hormone의 작용에 대한 세포 내에서의 기작과 그와 관련된 세포와 세포사이의 반응에 대한 기작은 거의 알려져 있지 않다. 1980년대 GH를 overexpression 시킨 transgenic mouse를 이용한 연구에서는 외래 GH의 과량분비로 control mouse보다 2배 가량 큰 증체효과를 나타냈었지만 feedback system의 파괴로 인한 병리증상 즉 과성장호르몬증, female에서의 infertility, premature aging, Libido의 결핍 등과 같은 비정상적인 표현형을 나타내어 GH에 의한 성장조절은 매우 복잡한 기작임을 실감케 하였다. 그러므로 동물에서의 정상적인 성장과 그에 따른 생리활동을 이해하기 위해서는 growth hormone의 정교한 분자생물학적인 연구가 필수적인 것으로 나타났다. 특히 최근에 밝혀지기 시작한 세포내에서의 신호전달체계와 GH의 다양한 생리작용과의 관계가 규명되어야 한다. 이와 관련하여 기존에 수행되고 있는 형질전환동물을 이용한 연구에서는 hormone이나 growth factor를 과잉발현시켜 심각한 부작용이 동반되어 정확한 표현형의 분석이 불가능하거나 이러한 방법으로는 가축에의 응용을 통한 실용화를 이룰 수 없는 것으로 나타나고 있다. 그러므로 본 연구에서는 실제 동물의 체내에서는 hormone이나 growth factor 등이 이들의 표적세포 내 receptor들보다 molar ratio면에서 훨씬 많이 분비되고 있는 점을 착안하여 receptor를 세포내에 과잉 발현시킴으로써 부작용을 최소로 줄이고 receptor를 통한 신호전달체계(signal transduction)를 증폭시켜 성장의 효과를 분석하고 그 기작을 연구하고자 한다.

GH의 binding sites가 간(liver)에 국한되었다고 처음에는 생각되었으나, 분석방법의 개발에 의해 여러조직에서 GH와 binding을 하는 growth hormone(GH) receptor가 발현한다는 것이 밝혀졌다. 1987년에 growth hormone(GH) receptor가 cloning된 후 GH의 기작에 대한 연구가 진행되고 있으나 아직 정확한 신호전달체계 및 GH의 생물학적인 신호를 전달하고 유지하는 GH와 GH receptor의 세포 내에서의 기작에 대해서는 거의 알려져 있지 않고 있다. GH receptor는 약 620개의 아미노산으로 있는데 glycosylation이 된 246개의 아미노산은 extracellular domain을 이루고 있고 24개 아미노산의 transmembrane domain과 약 350개 아미노산의 cytoplasmic domain으로 구성되어 있다. 이 GHR은 cytokine receptor superfamily 중의 하나로 prolactin receptor와 interleukins의 receptor들과 같은 부류에 속하고 있다. 전체적인 아미노산 배열 수준에는 큰 homology는 없으나 이들 receptor는 extramembrane domain에 4개의 cysteine이 2개의 disulfide bond를 이루고 cytoplasmic membrane domain에는 proline-rich sequence를 가지고 있다. rat와 생쥐 조직을 이용한 Northern analysis에서 약 4.0 kb와 1.5 kb의 두 개의 GHR mRNA 감지되는데 큰 transcript가 GH receptor이고 작은 것은 extracellular domain만을 갖고 있는 GH-binding protein(GHBP)으로 serum에 soluble한 형태로 존재하면서 GH와 binding한다고 알려지고 있으나 그 기능이나 특이성에 대해서는 알려져 있지 않다. 이들 receptor들은 한 GH 분자에 대해 두 개의 분자로 binding하여 dimerization을 이루는 것으로 보고되고 있다. 이 dimerization이 GH receptor를 activation시켜 세포내 신호전달체계를 자극하는 초기의 단계로 사료되고 있다. 최근의 data에 의하면 다양한 기작들이 세포내에서 GH 신호전달체계에 관여하는 것으로 나타나고 있다. cell culture system과 mutation experiment에 의하면 GH receptor의 dimerization은 non-receptor tyrosine kinase인 JAK2를 activation시킬 뿐만아니라 PI 3 kinase, PKC, MAP kinase 및 Stats 등의 물질을 activation시키는 것으로 알려져 다양한 신호전달 pathway로 이루어져 있음이 밝혀졌다. 그러나 GH receptor를 통한 이러한 신호전달 pathway의

다양한 효과들이 어떻게 체성장이나 대사활동에 관련되어 있는지에 대해서는 거의 알려진 바 없어 앞으로 풀어야할 과제들이다.

binding assay에 의한 결과에서는 GH receptor는 간(liver), 지방조직(adipose tissue), 소장(intestine), 심장(heart), 근육조직(skeletal muscle), 뇌(braine), 정소(testis) 등의 조직에서 발견되고 있고, 출생전 태아의 체성장은 GH와 거의 무관한 것으로 보이는데 이 시기의 간조직에 GH의 binding능력이 거의 없는 것으로 나타났기 때문이다. 출생후 GH binding 수준은 점차 증가하여 4-5 주령에 가장 높다고 보고되고 있다. hepatoma cell line을 이용한 실험에서는 GH를 첨가하면 처음에는 down-regulation에 의해서 GH receptor mRNA 수준이 감소하다가 곧 증가하여 GH에 의한 조절은 transcription rate에 의한 것임을 나타내었다. 간에서 GH receptor는 세포막 뿐만 아니라 세포질 구조물들의 막에도 높은 양으로 존재하여 receptor의 합성과 분해가 빠르게 진행되고 있음을 알 수 있다. 동물의 성장과 GH receptor와의 관계는 receptor의 수와 관련이 있는 것으로 드러나고 있다. 쥐에서 절식을 시키거나 당뇨병을 유발시켰을 경우 간에서의 GH receptor의 수가 급격히 감소하였으며 재급식에 의해 정상수준의 receptor 수준을 유지하였다는 보고가 있다. streptozotocin으로 유도한 당뇨병 rat에서 GH receptor의 수는 감소하였고 insuline의 투여로 간에서의 receptor 수준을 증가시켰다는 보고도 있다. 또한 Estrogen도 GH receptor의 조절에 관여하는 것으로 나타났는데 쥐에서 사춘기 후와 임신중에 receptor의 수가 증가하였다. fasting/refeeding 실험에서도 간에서의 receptor 농도는 혈장의 insulin농도와 비례하는 것으로 나타났다. 골격의 성장(skeletal growth), 증체(body weight gain), 질소 축적(nitrogen retention)과 같은 GH의 action은 대부분 insulin-like growth factor-1(IGF-1)에 의해서 매개되는 것으로 잘 알려져 있으나, IGF-1과는 상관이 없는 GH 단독의 작용도 상당히 보고되고 있다. 동물에 GH를 투여하면 혈액내 IGF-1의 농도가 증가하고, GH antibody를 투여하면 IGF-1의 농도가 급격히 감소한다. 또한 GH는 간세포에서 cytochrome P-450의 조절 뿐만 아니라 지방세포에서 glucose의 이동

과 대사에도 직접적으로 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. GH는 지방조직에서 지질의 이동을 증진시켜 지방축적을 감소시키고 근육조직의 질소 축적을 도와 신체의 근육/지방의 비율을 증진시키는 것으로 알려져 있다. 이러한 지방조직으로부터 지질 성분의 이동을 증진시키는 GH의 작용은 IGF-1과는 무관한 것처럼 보이는데 이는 지방세포에는 GH receptor를 많이 함유하고 있으나 IGF-1 receptor는 거의 존재하지 않기 때문이다. 또한 GH는 지방세포의 분화(differentiation)를 촉진하는데 이러한 효과는 근육세포와 연골세포에도 존재한다. IGF-1을 통한 GH의 간접효과 중의 대표적인 case가 유생산(milk production)인데 유선상피세포에는 GH receptor가 없는데도 GH에 의해 유량이 증가되기 때문이다. 반면 유상피세포에는 다량의 IGF-1 receptor가 존재하는데 IGF-1에 의해 유생산이 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 다양한 생리작용에 관여하는 GH의 역할에 대한 IGF-1, 기타 다른 매개체들과의 관계 등에 대한 정확한 정보는 보고되지 않고 있다.

이상에서와 같이 뇌하수체에서 분비되는 GH의 효능에 대해서는 단편적으로나마 잘 알려져 있으나 GH의 생리작용과 관련된 세포 내에서와 세포와 세포사이에서의 기작에 대해서는 거의 알려져 있지 않고 있어 형질전환동물을 이용한 분자수준에서의 연구가 필요하다고 사료된다. 그러므로 본 연구에서는 GH에 의한 성장의 기작을 체계적으로 연구하기 위하여 GH receptor와 IGF-1 receptor를 이용하여 형질전환토끼를 생산하고, 교잡에 의해 GH receptor와 IGF-1 receptor 유전자를 둘 다 갖고 있는 double transgenic mice를 생산하여 각각의 표현형분석에 의한 임상연구, 신호전달체계에 대한 기초연구 및 영양학 측면에서의 응용연구를 수행하고자 한다.

제 2 절 연구재료 및 방법

1. 수정란 배양 및 이식

가. 회수 수정란의 체외배양

회수된 수정란을 체외에서 배양하는데 본 실험실에서 개발된 RDH (RPMI, DMEM, Ham's-F10 mixture) medium을 이용하여 50 ul drop으로 mineral oil하에 39°C, 5% CO₂ 상태에서 72시간 배양한 후 Blastocyst까지의 발생율을 측정하였고 Bis-benzamide solution으로 염색하여 현광 현미경하에서 세포수를 관측하였다..

나. Recipient의 발정동기화 및 수정란 이식

Recipient 토끼는 제중이 3.5kg 이상인 것만을 골라 Donor 토끼와 발정주기를 맞추어 주는데 75 U 의 HCG를 주사하고 유리봉으로 질 자극을 하여 동기화를 유도하였다. 수정란이식을 위해서 마취시킨 후 배 정중선을 절개하여 난관만을 드러내어 난관 채 부위로 micropipette을 이용하여 소량의 medium과 함께 수정란을 주입 이식하였다. 본 연구에서는 이식시 각 난관으로 10개의 수정란을 이식하였다. 이식 후 정중선을 잘 봉합하고 회복실로 옮겨 회복시킨 다음 분만시로 옮겨 관리하였다.

2. 이식 유전자의 조립

MT promoter plasmid를 vector로 이용하였고 growth hormone receptor(GHR)와 IGF-1 receptor(IGF-1R) 유전자를 inserts로 이용하였다. GFP 유전자 조립에는 GFP plasmid를 vector로 이용하였고 CMV promoter와 β -actin promoter sequences를 inserts로 이용하여 구축하였다. vector gene과 insert gene을 적당한 restriction

enzyme으로 자른 다음 vector sequences는 alkaline phosphatase로 처리고 insert sequences는 vector의 ligation sites와 맞게 변형시킨 후 gel purify하여 ligation 반응을 시켜 competent DH₅ α cell에 transformation 하였다. antibiotics가 첨가된 배지에서 자란 colony들로부터 DNA를 추출하여 restriction enzyme digestion으로 screening을 하여 바르게 유전자가 조립된 것을 선발하여 완성시켰다.

가. MTpromoter-GHR, MTpromoter-IGF-1R 조립

MT promoter-GHR gene construction: MT vector를 Nru I으로 digestion시켜 blunt end를 만들고 GH-R은 E Co RI으로 digestion 시켜 DNA polymerase로 filling-in reaction을 한 다음 blunt ligation을 시도하여 완성하였다.

MT promoter-IGF-1R gene construction: MT vector를 Nru I으로 digestion시켜 blunt end를 만들고 IGF-1R을 Sal I과 BamHI으로 digestion시킨 후 DNA polymerase로 filling-in reaction을 한 다음 blunt ligation을 시도하여 완성하였다.

나. CMVpromoter-GFP, Actin promoter-GFP

CMV promoter-GFP gene construction: GFP vector의 Xho I과 E Co RI사이에 CMV promoter sequence를 ligation시켜 완성하였다. Actin promoter-GFP gene construction: GFP vector의 E Co RI과 Bam HI 사이에 β -Actin promoter sequence를 ligation시켜 완성하였다.

3. DNA의 미세주입

본 연구의 2차년도에서는 CMVpromoter-GFP vector를 이용하여 토끼에서의 DNA microinjection에 의한 형질전환 생산효율을 검사하고 주입 DNA 농도에 따른 차이를 조사하여 적정 농도를 규명하고 본 연구의 이식 유전자를 그 적정 농도로

microinjection 하는 것을 목표로하였다. 또한 생쥐에서 DNA microinjection을 하고 그 생존성 여부를 검사하여 토끼의 것과 비교하기로 되어 있다. CMV_{promoter}-GFP를 이용해서 microinjection을 하는 중이고 이미 토끼에서의 시간을 단축시켜 형질전환율을 검사하기 위하여 CMV-GFP DNA를 이용하여 microinjection을 한 후 그 효율을 임신 20 일령의 태아를 꺼내어 GFP specific primer를 합성하여 PCR에 의해 이식유전자의 확인과 형광현미경하에서 green fluorescence의 발현에 관찰하여 효율을 확인하였다. 또한 제 1차년도에 구축한 MT_{promoter}-Growth Hormone(GH) Receptor cDNA와 MT-Insulin like Growth Factor-1 Receptor(IGF-1R) 유전자도 microinjection을 실시하고 있다.

가. 수정란의 채취

토끼는 성숙한 New Zealand White와 Californian종과 생쥐는 FVB종 암컷에 FSH와 HCG를 주사하여 과잉배란을 유도하고 교미시켜 다음날 난관으로부터 1-cell의 수정란을 채취하였다. 채란을 위한 용액으로는 20%의 fetal calf serum을 함유하는 Dulbecco's phosphate-buffered saline(DPBS)을 이용하였다. 회수된 토끼 1-cell 수정란은 RDH+BSA+taurine medium에서 DNA 미세주입시까지 배양하고 DNA 미세주입시에는 RDH medium에 Herpes medium을 첨가한 것을 이용하였다.

생쥐의 수정란은 5 IU의 PMSG와 5IU의 HCG로 과배란을 유도하였으며 HCG 주사후 교미시켜 다음날 vaginal plug를 확인하였다. 교미한 암컷의 난관 팽대부에서 cummulus cell로 둘러싸인 수정란을 회수하고 hyaluronidase를 처리하여 cummulus cell을 제거하고DNA 미세주입시까지 CZB meium에 배양하였다. 생쥐 수정란의 DNA 미세주입시에는 CZB+Herpes medium을 사용하였다.

나. DNA 준비

본 연구를 위해 제 1차년도에 구축한 CMV_{promoter}-GFP와 MT_{promoter}-GHR, MT_{promoter}-IGF-1R vector를 linearization시키고 purification을 하여 DNA

microinjection을 준비하였다. CMV_{promoter}-GFP vector는 ApaI과 MluI으로 digestion시켜 linearization을 하였다. MT_{promoter}-GHR과 MT_{promoter}-IGF-1R vector는 Sall digestion에 의해 linearization을 하였다. digestion시킨 DNA는 agarose gel에 전기영동을 하여 DNA band를 자른 다음 Gene Clean Kit(Bio 101)으로 purification하고 T₁₀E_{0.1}(10mM Tris, 0.1mM EDTA)용액으로 12시간마다 용액을 바꾸면서 48시간 동안 4°C에서 dialysis를 하였다. dialysis 후 다시 agarose gel에 전기영동을 하여 DNA band와 농도를 추정하였으며 마지막 DNA농도를 2500 copy/pl(CMV-GFP 경우 10 ng/ul)와 5000copy/pl (CMV-GFP 경우 20 ng/ul)로 하여 주입되는 DNA copy를 조절하였다.

다. DNA 미세주입

micromanipulator와 differential interference contrast(DIC) microscope(Nikon)을 이용하여 DNA를 토끼 1-cell 수정란의 전핵으로 주입하였다. 준비된 DNA는 모세관 현상을 이용하여 injection pipette에 loading하였다. 전핵이 약간 부푸는 것에 의해 injection을 완료하였다.

라. DNA미세 주입 후 체외배양

토끼 1-cell 수정란에 DNA 미세주입 후 체외 배양하여 DNA 미세주입하지 않은 수정란과의 blastocyst까지의 배발달율을 비교 조사하였고 green fluorescence protein의 발현에 의한 형광발현을 조사하였다.

마. 수정란 이식

DNA가 주입된 수정란은 HCG와 질자극에 의해 발정주기를 동기화 시킨 recipient 토끼의 난관 팽대부위로 평균 20개의 수정란을 외과적인 방법으로 이식하고 있다.

4. 형질전환토끼의 식별

CMV-GFP vector를 microinjection한 다음 recipient에 이식한 후 임신이 된 것은 임신 중기(약 15-20일)에 태아를 회수하여 GFP에 의한 형광발현을 형광현미경하에서 emission 540nm, excitation 488nm로 발현을 관찰하였고 일부 조직으로부터 genomic DNA를 추출하여 GFP-specific primer를 이용하여 Polymerase Chain Reaction(PCR)방법으로 이식 유전자의 sequence를 가지고 있는가를 검사하였다. GFP primer sequence는 다음과 같다.

GFP5 : 5'-CAA GGA CGA CGG CAA CTA CAA GAC-3'

GFP3 : 5'-GTC GAT TAT GAT CAG TTA TCT AGA TCC-3'

PCR cycle의 조건은 denaturation: 94°C, 1분 30초, annealing: 55°C, 2분, extension: 72°C, 2분으로 총 35 cycle을 실시하였다. PCR 후 band size는 약 490 bp가 증폭된다.

Southern blotting을 위해서는 약 10ug의 genomic DNA를 EcoRI으로 digestion시킨 다음 0.9% agarose gel에서 전기영동 시켰다. 전기영동 후 denaturation buffer(1.5M NaCl, 0.5M NaOH)에서 30분간 denature를 시키고 neutralization buffer(0.5M Tris, pH7.4, 1.5M NaCl)에서 30분간 중화시킨 다음 nylon membrane으로 gel stacking에 의해 overnight transfer하였다. hybridization은 DIG Hybridization kit를 이용하여 DIG로 labeling된 probe을 만들고 hybridization을 시킨 후 extensive하게 washing한 다음 AP-conjugated secondary DIG antibody를 이용하여 signal을 detection하였다.

5. 형질전환토끼의 번식

수정난 이식에 의해 첫번째의 형질전환동물을 founder라고 하는데 founder 토끼를 교미시켜 새끼를 todtksgks 다음 PCR과 Southern Blot 방법으로 이식유전자를 가진 형질전환토끼를 식별하였다. 이렇게 계속 번식시켜 각 founder 토끼의 혈통표

(Pedigree)를 구축하였다.

6. 형질전환토끼의 표현형

가. 형질전환토끼의 번식

GHR 및 IGF-1R founder 형질전환토끼를 교배를 시켜 F₁ 및 F₂ 새끼를 생산하여 germline transmission rate를 측정하였다. GHR 및 IGF-1R 유전자를 동시에 갖는 double transgenic rabbit의 생산을 위해서는 GHR 및 IGF-1 F₁ transgenic rabbit을 교미시켜 DNA 검사에 의해 생산하였다.

나. 성장률 및 구성비율

GHR 및 IGF-1R F₁ 형질전환토끼의 체중을 생후 1주일부터 측정하여 성장률은 약 150일령까지 non-transgenic litter mate와 비교하여 분석하였다. 신체 구성율은 형질전환토끼의 내부장기(허파, 심장, 간, 콩팥 등)의 무게를 분석하였다.

7. Western blotting

가. Protein extract

형질전환토끼의 간조직을 분리하여 lysis buffer(0.3% SDS, 1% β -mercaptoethanol, 50mM Tris-HCl, pH8.0)으로 처리한 후 homogenize시킨 다음 2 분정도 끓인 다음 centrifuge하여 lysate를 회수한다.

나. Blotting

간세포 cell lysate를 SDS-PAGE gel에 전기영동시킨 후 1시간 동안 electrotransfer 방법으로 nitrocellulose paper에 옮기고 곧바로 blocking

buffer(5% non-fat dry milk)로 처리한 후 1: 1000으로 희석한 primary antibody(MAP kinase antibody)로 약 1 시간정도 배양하였다. 잘 washing한 후 1:1500으로 희석한 horseradish-conjugated secondary anti body로 약 1 시간 처리하고 washing한 후 ECL detection kit를 이용하여 diagnostin film(Kodak)으로 발현을 분석하였다.

제 3 절 연구결과 및 고찰

1. 토끼 수정란의 배양 및 이식에 관한 연구

가. rabbit one-cell embryo의 배양액과 배양성분에 관한 연구

본 연구는 토끼 one-cell embryo의 in vitro culture에서 최대 발육율을 얻기 위한 배양조건을 구명하기 위해 실시되었다. 우선 기존의 Ham's-F10, RD medium(a 1:1 mixture of RPMI 1640 and DMEM)과 새로 개발한 RDH medium(a 1:1:1 mixture of RPMI 1640, DMEM and Ham's-F10)을 비교하였다. 토끼 one-cell stage embryo를 채란하여 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 약 72 시간동안 배양한후 blastocyst까지 도달한 비율은 Ham's-F10:43%, RD:45%, RDH:80%로 관찰되었고, 배양후 blastocyst의 cell number는 Ham's F-10:105, RD:107, RDH:125를 나타내어 RDH medium이 토끼수정란의 생존성과 분화율에 있어서 두 medium보다 유의성 있게 높았다(Table 1). 또한 토끼 수정란의 in vitro에서 glucose와 BSA의 효과를 보았는데 glucose는 blastocyst까지의 생존율에 영향을 미치지 않았으나(Table 3) BSA와 Taurine은 morula에서 blastocyst로의 전이에 영향을 미치는 것으로 나타났다(Table 2, Table4). Figure 2 는 배양 후 embryo의 cell number를 counting하기 위해 hoechst staining을 한 다음 형광현미경으로 관찰된 blastocyst embryo이다. Figure 1 는 채란된 토끼 one-cell embryo를 RDH medium에서 배양한 것으로 약 12 시간 후 4-cell, 48 시간 후 morula, 72 시간 후 blastocyst stage의 embryo를 사진 찍은 것이다.

Table 1. Rabbit one-cell embryo development in vitro in different media

medium	embryo no.	no. (%)			cell no.
		morula	blast	expanded	
RD	64	35(54.7)	23(35.9)	6(9.3)	107
Ham's-F10	64	37(56.3)	23(35.9)	5(7.8)	105
RDH(1:1:2)*	64	14(21.9)	40(62.5)	10(12.6)	125
RDH(1:1:1)**	64	10(12.6)	42(65.6)	12(18.8)	130

* A 1 to 1 mixture of RD and Ham's-F10 media

** A 2 to 1 mixture of RD and Ham's-F10 media

Table 2. Rabbit embryo development in vitro with BSA

medium	embryo no.	no. (%)			cell no.
		morula	blast	expanded	
RD	42	22(52.4)	16(38.1)	4(9.5) ^a	109 ^a
RD+BSA	42	18(42.9)	19(45.2)	5(11.9) ^a	131 ^{ab}
RDH	50	23(40.4)	18(36.0)	9(18.0) ^a	121 ^{ab}
RDH+BSA	50	9(18.0)	22(44.0)	19(38.0) ^b	142 ^b

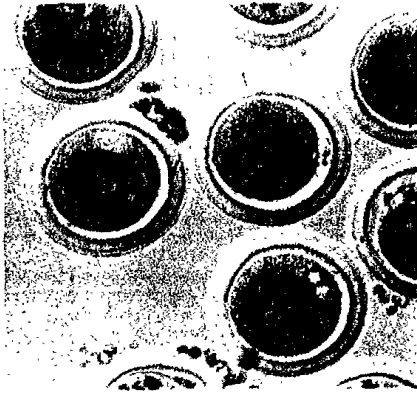
Table 3. Rabbit embryo development in vitro with high glucose

medium	embryo no.	no. (%)			cell no.
		morula	blast	expanded	
RD (low gluc)	56	30(53.6)	22(39.3)	4(7.1)	117
RD (high gluc)	56	35(62.5)	19(33.9)	2(3.6)	111
RDH (1:1:1)	56	13(23.2)	36(64.3)	7(12.5)	129
RDH (1:1:2)	56	20(35.7)	30(53.6)	6(10.7)	121

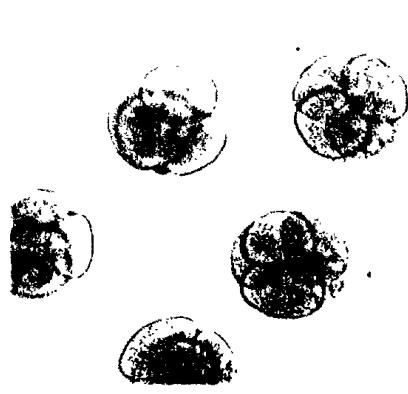
Table 4. Rabbit embryo development in vitro with BSA and Taurine

medium	embryo no.	no. (%)			cell no.
		morula	blast	expanded	
RDH	55	22(40.0)	22(40.0)	11(20.0)	125
RDH+B	55	13(25.5)	22(40.3)	20(36.4)	141
RDH+T	55	15(27.3)	24(43.6)	16(29.1)	139
RDH+B+T	60	9(15.0)	22(36.7)	29(48.3)	154

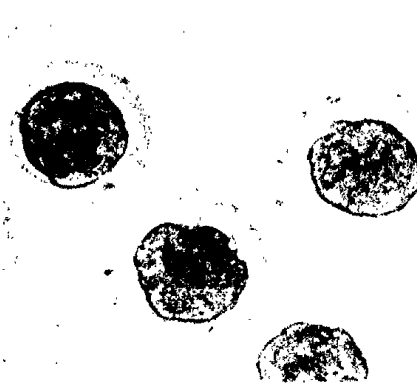
a. one-cell embryos



b. 4-cell embryos



c. morular embryos



d. blastocyst embryos

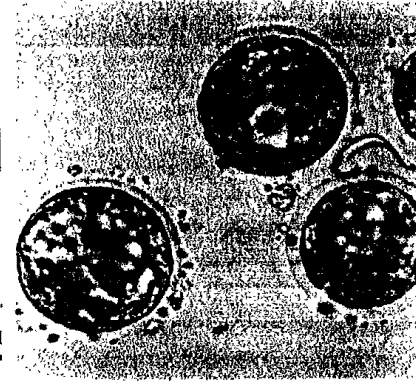


Fig. 1. Rabbit embryos following in vitro culture in RDH medium.



Fig. 2. Rabbit blastocyst stained with hoechst.

나. rabbit blastocyst embryo의 채취와 배양

Embryonic Stem Cell을 만들기 위해서는 blastocyst stage embryo가 필요하여 본 연구에서는 in vivo embryo와 in vitro embryo를 이용하였다. in vivo blastocyst embryo는 성성숙에 도달한 New Zealand White종에 FSH와 HCG 주사하고 수컷과 교미시킨 다음 약 72 시간이 지난 후 자궁을 PBS 용액으로 세척하여 난자를 회수하였다. 회수된 blastocyst stage embryo를 본 연구에서 개발한 RDH medium에서 39°C, 5% 배양기에서 배양하여 약 70%의 embryo가 hatching되는율을 얻었다. in vivo blastocyst embryo는 zona 바깥쪽을 mucin coat가 둘러싸고 있어 hatching하는데 in vitro embryo보다 시간이 더 소요된다. in vitro embryo는 호르몬 처리한 토끼를 교미시킨 후 약 18 시간에 난관을 세척하여 토끼 one-cell embryo를 회수하였다. 회수된 난자를 RDH medium에서 체외에서 배양시키면 약 96 시간후에 약 70%의 hatching하고 있는 blastocyst embryo를 얻을 수 있었다.

다. rabbit one-cell embryo의 이식

DNA microinjection의 기초 실험으로 토끼 one-cell embryo를 회수하여 체외에서 약 3 시간을 배양한 후 위에서 기술한 발정동기화 방법으로 처리된 recipient 토끼의 난관으로 이식하여 임신율과 수태율을 검사하였다. 10 마리의 recipient에 200개의 난자를 이식하였는데 그 중 6 마리가 임신하여 33 마리의 새끼를 분만하였다(Table 5). 그러나 donor 토끼에서 embryo를 채란한 후 같은 donor 토끼의 난관으로의 이식 방법에서는 임신율을 얻지 못했다(0/5). 그러므로 DNA microinjection한 다음 recipient 토끼의 난관으로 이식하는 방법으로 형질전환토끼를 생산할 수 있는 체계를 이루었다.

라. 체외배양 embryo의 이식

토끼 one-cell embryo를 RDH medium에서 48 시간 배양하여 morula 또는 early blastocyst까지 자란 embryo를 발정동기화 시킨 recipient 토끼의 난관으로 이식하는 실험을 하였다. 9 마리의 recipient에 180개의 embryo를 이식하였는데 그 중 5 마리가 임신 심신하여 25 마리의 새끼를 분만 하였다(Table 5). 본 실험으로 RDH medium으로 배양한 후에도 임신이 가능하며 DNA microinjection한 embryo를 어느정도 in vitro에서 배양한 다음 selection하는 것이 가능해졌다.

Table 5. Rabbit embryo transfer experiments

stage at transfer	in vitro culture period	No. embryos transferred	No. Recipients	No. pregnant	No. offspring
1-cell	3 hr	200	10	6	33
Morula	48 hr	180	9	5	25

2. 이식유전자의 구축에 관한 연구

가. MTpromoter-GH receptor과 MTpromoter-IGF-1 receptor gene의 구축

MT promoter sequence는 Dr. Palmiter가 최근에 개발한 것으로 높은 발현율을 얻기 위해 MT locus control region(LCR)을 함유하고 있다. 총 길이는 20 kb 이고 이식유전자를 cloning하도록 Nru I site(blunt end)를 만들어 놓고 있다. 그리고 이식유전자가 바르게 삽입되었는지 확인하기 위해서 E Co RI sites(1.4 kb release)가 있어 insert된 유전자가 release되게 하였다. GH receptor sequence는 2.1 kb로 Klenow reaction에 의해 blunt ends로 만든 후 MT vector의 Nru I site로 ligation하였다. Figure 3에서 lane 4가 바르게 ligation된 clone으로 E Co RI digestion 후 약 20 kb의 MT vector fragment와 3.5 kb(2.1 kb + 1.4 kb) fragment가 release된 것으로 확인할 수 있었다.

IGF-1 receptor sequence는 약 4.1 kb로 GH receptor와 마찬가지로 Klenow reaction에 의해 blunt ends로 만든 다음 MT vector의 Nru I site로 ligation을 시도하였다. Figure 4에서 lane 4가 IGF-1 receptor sequence를 가진 clone으로 E Co RI digestion으로 약 5.5 kb(4.1 kb + 1.4 kb) fragment가 release 되었다.

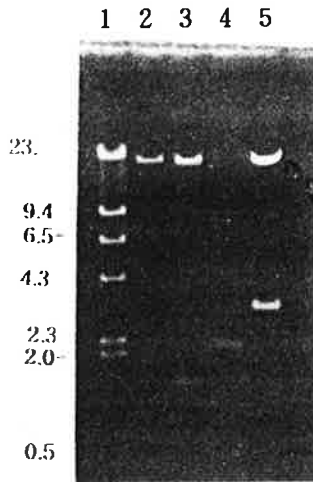


Fig. 3. MT promoter와 GH receptor의 cloning. Lane 1: λ DNA maker(Hind III), Lane 2: MT vector(Nru I), Lane 3: MT vector(E Co RI), Lane 4: GH receptor fragment, Lane 5: MTpromoter-GHR clone(E Co RI).

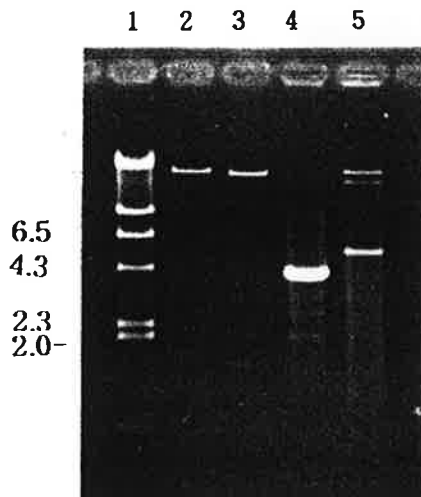


Fig. 4. MT promoter와 IGF-1 receptor의 cloning. Lane 1: λ DNA maker(Hind III), Lane 2: MT vector(Nru I), Lane 3: MT vector(E Co RI), Lane 4: IGF-1 receptor fragment, Lane 5: MTpromoter-IGF-1R clone(E Co RI).

나. CMVpromoter-GFP와 Actin promoter-GFP gene의 구축

GFP vector는 약 4.1 kb 인데 0.8 kb의 GFP sequence를 포함하고 있다. 이 vector의 GFP gene 5' 쪽에는 multi-cloning site가 있다. CMV promoter sequence는 0.8 kb로 Xho I과 E Co RI으로 digestion한 후 GFP vector multi-cloning site의 Xho I과 E Co RI site로 ligation을 시도 하였다. Figure 5에서 lane 2는 ligation한 clone을 Xho I과 E Co RI으로 double digestion한 것으로 4.1 kb의 GFP vector sequence와 0.8 kb의 CMV promoter sequence가 release되는 것을 알 수 있다.

Actin promoter sequence는 약 4.2 kb로 E Co RI과 Bam HI으로 digestion한 다음 GFP vector multi-cloning site의 E Co RI과 Bam HI site로 ligation을 시도하였다. Figure 9\5에서 lane 4의 clone은 E Co RI과 Bam HI으로 double digestion한 것으로 4.1 kb의 GFP vector와 4.2 kb의 Actin promoter sequence가 overlap되어 release되고 있는 것을 확인할 수 있었다.



Fig. 5. CMV promoter와 GFP gene, Actin promoter와 GFP gene의 cloning. Lane 1: λ DNA maker(Hind III), Lane 2: GFP vector(Xho I-E Co RI), Lane 3: CMVpromoter-GFP clone(Xho I-E Co RI), Lane 4: Actin promoter-GFP clone(E Co RI-Bam HI, overlapped fragments of 4.1kb and 4.2 kb DNA).

다. NIH3T3에서 CMV-GFP gene의 발현에 관한 연구

본 연구는 CMV promoter와 Actin promoter로부터 Green Fluorescent Protein(GFP) gene이 발현되도록 구축한 유전자가 NIH 3T3 cell에서 GFP가 발현되는지를 확인하였다. CMV promoter-GFP gene을 NIH 3T3에 transfection시킨 후 G418으로 selection한 다음 selection된 clone을 expansion시켜 fluorescence microscope(Ex:488nm, Em:515)하에서 관찰하였다. Figure 6에서와 같이 transfection하지 않은 control군과 비교하여 GFP 유전자가 발현되는 세포의 세포질에서는 푸른색의 현광을 식별할 수 있었다. 그러므로 이 유전자들을 실제 이식 유전자들과 함께 co-injection이나 co-transfection을 함으로써 이식유전자들의 상태를 확인하고 selection하는데 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

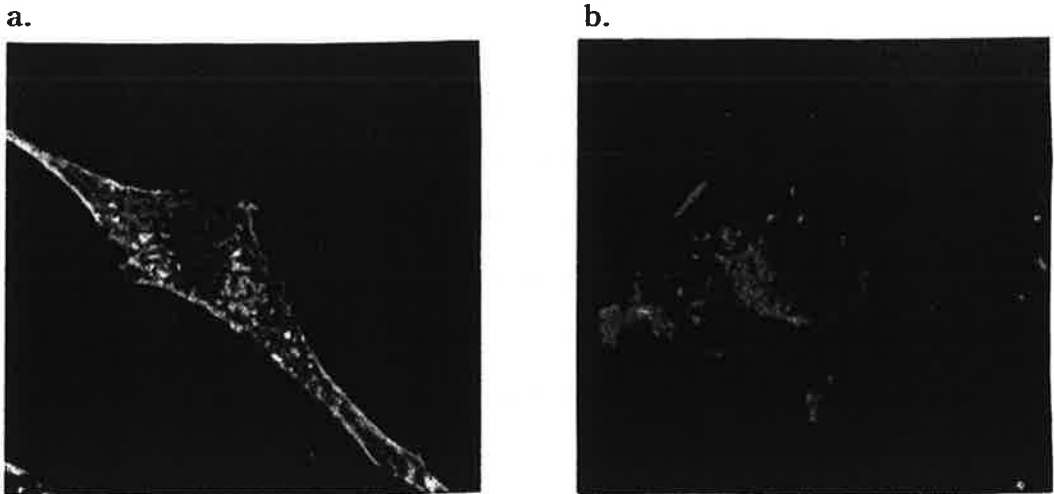


Fig 6. GFP vector를 transfection시킨 NIH 3T3 cells(a)과 transfection시키지 않은 cells(b). 붉은색 부위는 actin이고 푸른색 부위는 GFP가 발현된 부위이다.

3. 토끼 수정란의 DNA 미세주입

본 연구의 2차년도에서는 CMV-GFP vector를 이용하여 토끼에서의 DNA microinjection에 의한 형질전환 생산효율을 검사하고 주입 DNA 농도에 따른 차이를 조사하여 적정 농도를 규명하는 것으로 되어있다. 또한 생쥐에서 DNA microinjection을 하고 그 생존성 여부를 검사하여 토끼와 비교하였다. CMV-GFP를 이용해서 microinjection을 하였고 토끼에서의 시간을 단축시켜 형질전환율을 검사하기 위하여 CMV-GFP DNA를 microinjection한 후 그 효율을 임신 20일령의 태아를 꺼내어 PCR에 의해 형질전환효율을 확인하였다.

가. DNA의 미세주입(DNA microinjection)

micromanipulator를 이용하여 1-cell stage 수정란의 전핵(pronucleus)으로 준비된 DNA를 주입하기 위하여 성숙한 New Zealand White와 Californian종 암컷에 FSH와 HCG를 주사하여 과잉배란을 유도하고 교미시켜 다음날 난관으로부터 1-cell의 수정란을 채취하였다. 회수된 토끼 1-cell 수정란은 RDH+BSA+taurine medium에 DNA 미세주입 시까지 배양하고 DNA 미세주입시에는 RDH medium에 Herpes medium을 첨가한 것을 이용하였다. 생쥐의 DNA 미세주입을 위해서는 PMSG와 HCG를 이용하여 과배란을 유도하였고 생쥐 수정란을 위해서는 CZB medium과 Herpes medium을 사용하였다. 토끼 DNA 미세주입을 위해서는 differential interference contrast(DIC) microscope을 이용하여 DNA를 수정란의 전핵으로 주입하게 되는데 Fig. 7에서 보듯이 수정란의 가운데에 형성되어 있는 전핵(a)에 injection pipette를 삽입시켜 DNA용액을 주입시켜 전핵이 약간 부풀도록하여 injection을 완료하였다(b).

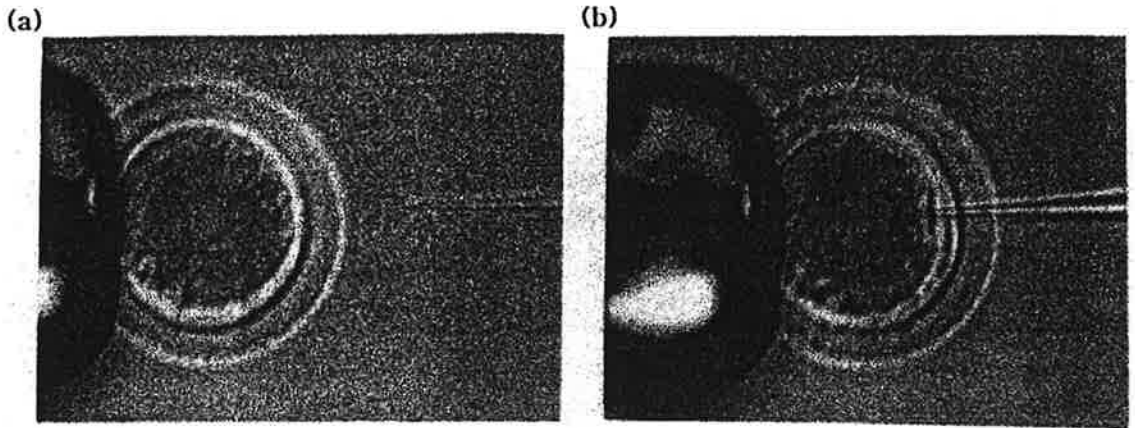


Fig. 7. Microinjection of DNA into a rabbit embryo. (a) Before microinjection, pronucleus can be seen in the middle of cytoplasm of zygote (b) During microinjection DNA is injected into the pronucleus of rabbit zygote.

나. DNA 미세주입이 수정란의 체외 배발달율에 미치는 영향

토끼 1-cell 수정란에 DNA 미세주입후 blastocyst까지 체외에서의 배발달율은 73.2%(101/138)로 나타냈고 이는 DNA 미세주입하지 않은 수정란의 배발달율 87.5%(84/96)와 유의적인 차이를 나타냈다(Table 6). 그러나 생쥐에서는 DNA 미세주입 후 70.8%(85/120)의 발달율을 보이고 있어 토끼에서 DNA 미세주입이 생쥐와 비슷한 발달율을 나타내는 것으로 보인다(Table 6). 그러므로 토끼에서 DNA 미세주입은 배발달율에 영향을 미치지만은 그 수준은 생쥐의 배발달율과 차이가 없었다.

Table 6. The development of rabbit and mouse embryos following GFP gene microinjection

	No. Zygotes	No. Blastocysts (%)	Cell no.
No injection(Rabbit)	96	84 (87.5)	154
Rabbit	138	101 (73.2)	145
Mouse	120		85 (70.8)

다. DNA 미세주입이 recipient에 이식 한 후 태아 생존율에 미치는 영향

본 연구에서 주입되는 DNA 용액의 volume은 생쥐에서와 비슷한 약 1 picoliter로 추정되어 GFP vector DNA의 농도를 2500 copy/pl(10 ng/ul)와 5000copy/pl(20 ng/ul)로 하여 주입되는 DNA copy를 조절하였다. DNA를 주입한 후 체외 배발달율은 두 처리가 동일하게 약 70%로 거의 비슷하게 나타났다. 토끼 수정란에 GFP DNA를 미세주입한 후 recipient의 난관에 이식하여 임신 20일령에 회수된 태아의 생존율은 DNA를 주입하지 않은 수정란의 생존율(23.0%)과 DNA를 미세주입한 수정란의 생존율(22.3%, 21.6%)에는 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Table 7). 또한 DNA 농도를 10 ng/ul(2500 copies/pl)와 20 ng/ul(5000 copies/ul)로 다르게 미세주입하였을 때 생존율에는 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

Table 7. The viability of GFP gene-microinjected rabbit embryos after transfer into recipients

DNA conc.	No. embryos	No. recipients	No. pregnancies	No. fetuses ^a (%)
Control	200	10	6	47 (23.0)
10 ng/ul	239	10	6	53 (22.3)
20 ng/ul	250	9	6	54 (21.6)

^a Number of fetuses recovered at day 20 of pregnancy

라. DNA 미세주입후 체외배양시 GFP 발현 변화 분석

토끼 1-cell 수정란의 전핵에 CMV_{promoter}-GFP DNA 미세주입후 체외배양하여 배발육 단계별 green fluorescence protein(GFP)의 발현율을 조사하였다. GFP에 의한 형광발현은 형광현미경하에서 emission 540nm, excitation 488nm로 발현율을 관찰하였다. Fig. 8에는 CMV_{promoter}-GFP DNA 미세주입된 morular stage(a)와 blastocyst embryo(b)의 GFP 발현사진이다. 1-cell stage에 DNA를 미세주입하였지만 배발달이 진행됨에 따라 GFP의 발현은 mosaicism 현상으로 나타난다. 즉 Fig. 8(a)의 morular embryo에서와 같이 하나의 embryo안에 GFP를 강하게 발현을 하고 있는 blastomere가 있고 전혀 GFP를 발현하지 않는 blastomere가 공존하고 있다.

또한 DNA를 미세주입한 embryo를 체외배양하여 배발달이 진행됨에 따라 GFP 발현율이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다(Table 8). 총 80 마리의 토끼 1-cell embryo에 DNA를 미세주입하여 24 시간 후에 4- 또는 8-cell stage에 도달하게 되는데 이때 GFP 발현율은 80%(48/60)를 나타내다가 48 시간 후의 morular stage에서는 61.7%(37/60), 72 시간 후의 blastocyst에서는 36.7%(22/60)로 감소하였다. 이러한 경향은 DNA 미세주입후 초기에는 embryo의 chromosome에 integration되지 않은 DNA가 발현해 높은 발현율을 나타내다가 세포분열이 진행됨에 따라 integration이 이루어지지 않은 DNA가 점차 제거되기 때문인 것으로 추정된다. 그러므로 형질전환동물의 생산효율을 높이기 위해 fusion DNA로 GFP 유전자를 이용함으로써 초기에 integration되지 않은 embryo를 선별할 수 있어 형질전환율을 높이는데 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 8. GFP expression rates in rabbit embryos microinjected with CMV_{promoter}-GFP DNA.

DNA	No. embryos microinjected	No. embryos expressing green fluorescence (%)		
		4- or 8-cell	Morula	Blastocyst
CMV _{pro} -GFP	60	48 (80.0)	37 (61.7)	22 (36.7)

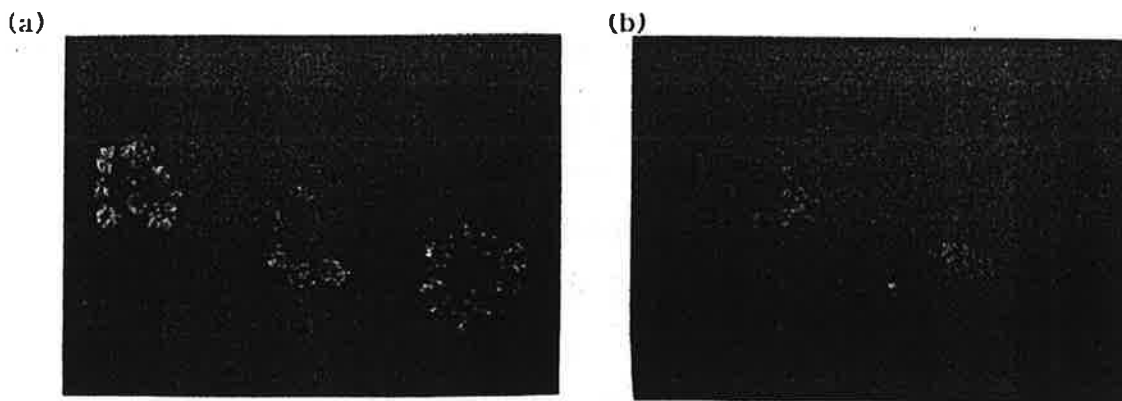


Fig. 8. GFP expression in rabbit embryos microinjected with CMV_{promoter}-GFP DNA.
(a) Morular embryos (b) Blastocyst.

마. 태아에서의 형질전환을 분석

GFP vector를 이용한 생산효율을 위한 실험에서는 임신 중기에 태아를 회수하여 일부 조직으로부터 genomic DNA를 추출한 후 GFP-specific primer를 이용하여 Polymerase Chain Reaction(PCR)방법으로 이식 유전자의 sequence를 가지고 있는가를 검사하여 빠르고 효율적인 방법으로 형질전환율을 확인하였다. PCR 증폭에 의해서는 약 490 bp의 DNA band가 증폭되는데 Fig. 6에서와 같이 토끼 태아의 DNA를 PCR로 분석하였을 때 vector DNA(+ control)에서와 같은 size의 PCR band가 sample # 2와 #5에서 증폭되어 vector DNA를 가진 형질전환태아로 분석되었다(Fig.9). 또한 이들 태아에서 형광현미경을 이용하여 GFP 발현을 조사하였을 때 모두 강한 green fluorescence를 발현하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 10). 특히 뇌와 척수, 근육에 강한 발현을 나타내었는데 이는 CMV promoter의 발현조절 특이성에 기인한 것으로 사료된다.

DNA 미세주입한 토끼 수정란을 평균 20개씩 recipient의 난관에 이식하여 임신 20일령에 태아를 회수하였는데 총 107 마리의 태아를 PCR로 분석한 결과 6 마리가 형질전환태아인 것으로 확인되어 평균 5.6%의 형질전환율을 나타내었다(Table 9). 총 embryo에 대한 형질전환효율(형질전환태아수/총 microinjected embryo수)은 1.2%로 나타났다. 주입 DNA 농도에 따른 형질전환율은 20 ng/ul 조건하에서 7.4%(4/250)을 나타내어 3.8%(2/239)로 나타난 10ng/ul 조건보다 높은 것으로 드러나 DNA 농도를 높여주므로써 형질전환율이 높아지는 경향을 나타내었다. 20 ng/ul 조건하에서 7.4%의 형질전환효율은 그동안 보고된 토끼나 가축에서의 형질전환율보다는 높은 것으로 생쥐의 형질전환율과 거의 비슷한 것으로 드러났고 20ng/ul의 CMV_{promotr}-GFP DNA 농도는 약 5000 copies/pl로 본 연구에서는 토끼의 embryo와 태아의 생존율에 영향을 미치지 않으면서(Table 9) 형질전환율을 높여주는 조건인 것으로 나타났다. 6000 copies/pl 이상의 조건에서는 토끼의 embryo와 태아의 생존성이 급격히 저하되는 경향이 있어 전체적인 형질전환율(형질전환태아수/총 microinjected embryo수)이 급격히 감소되었

다.

그러므로 토끼에서 DNA 미세주입에 의한 형질전환방법의 조건은 DNA copy수는 4000-5000 copies/pl 이하와 농도로는 20ng/ul이하의 조건이 적합한 것으로 나타났다. 이러한 조건은 주입 DNA의 size와 관련이 있는데 큰 size인 경우 DNA 농도를 최대한으로 하여 copy수를 늘려주고 작은 size인 경우 copy수를 최대한으로 하여 미세주입하는 것이 형질전환효율을 높일 것으로 사료된다.

Table 9. Transgenic efficiency of rabbit fetuses detected by PCR analysis and GFP expression.

DNA conc.	No. embryos	No. fetuses	No. transgenics (%)	No. GFP
10 ng/ul	239	53	2 (3.8)	2
20 ng/ul	250	54	4 (7.4)	4
total	489	107	6 (5.6)	6

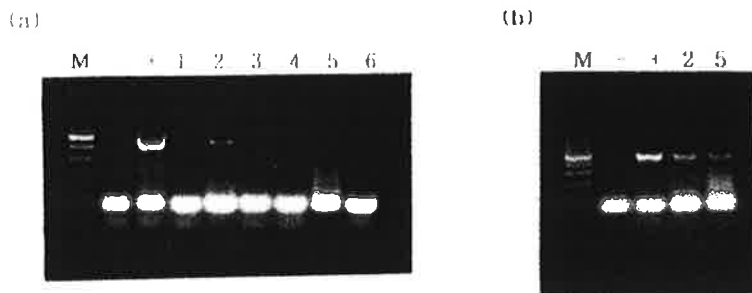


Fig. 9. PCR analysis of rabbit fetuses derived from embryos microinjected with CMV-GFP DNA. (a) Two positive fetuses with GFP amplification (b) Reamplification of #2 and #5 fetuses. M: 100 bp DNA marker, -: negative control +: positive control lane 1-6: rabbit fetuses

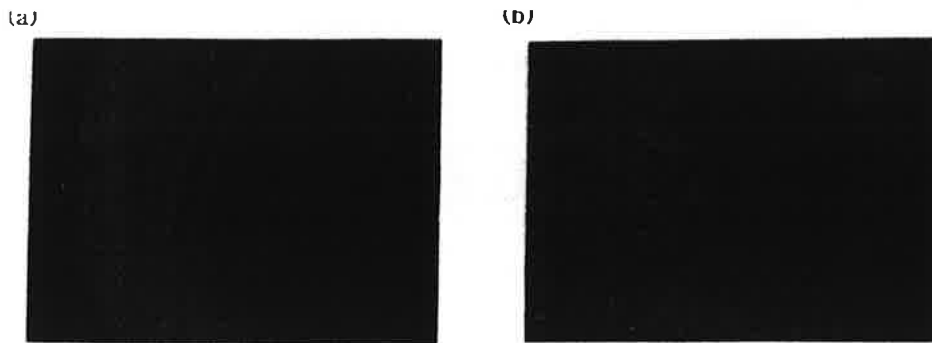


Fig. 10. GFP expression in PCR-positive fetus. (a) Dorsal area of fetus (b) Abdominal area of fetues

4. founder 생쥐의 생산

생쥐의 zygote에 DNA microinjection에 의해 MT-GHR과 MT-IGF-1R 두 개의 유전자를 주입하여 각각의 DNA construct에 대해 total 25마리와 18마리의 새끼중 각각 3마리의 founder 생쥐를 생산하였다. specific primer를 이용한 PCR과 Southern blotting에 의해 주입 유전자가 정착된 것을 확인하였다(PCR results, Fig. 11과 12). IGF-1R의 경우 3마리 모두 암컷이었고 GHR의 경우 2마리는 수컷이고 1마리는 암컷이었다(Table 10과 11). 이중 3마리의 GHR founder 생쥐는 outbreeding 시켜 F₁의 생산을 시도한 결과 수컷 1마리는 불임으로 새끼를 생산하지 못했고 다른 수컷에서는 태어난 새끼의 약 50%, 한 마리의 암컷은 약 15%의 이식유전자를 후대에 전달하는 것으로 나타냈다(Table 10). 또한 IGF-1R 형질전환 founder 생쥐 2마리를 교미시켜 F₁을 생산하여 DNA 검사를 실시한 결과 약 50%가 주입한 IGF-1R 유전자를 가진 것으로 분석되어 Mendel의 법칙에 따라 후대에 전달되는 것으로 나타났고 한 마리는 아직 새끼를 얻지 못하고 있다(Table 11). 그리고 한 line의 F₂에서도 50%의 전달율을 나타내어 이식 유전자가 chromosome에 정착되어 전달되는 것을 확인하였다.

Table 10. Summary of transgenic mouse lines containing GHR

F ₀	Sex	Transmission F ₁ (%)
GHR-1	M	infertility
GHR-2	M	6/12 (50%)
GHR-3	F	3/20 (15%)

Table 11. Summary of transgenic mouse lines containing IGF-1R

F ₀	Sex	Transmission	
		F ₁ (%)	F ₂ (%)
IGR-1	F	6/10 (60%)	no pups
IGR-2	F	2/6 (33%)	11/22 (50%)
IGF-3	F	no pups	-

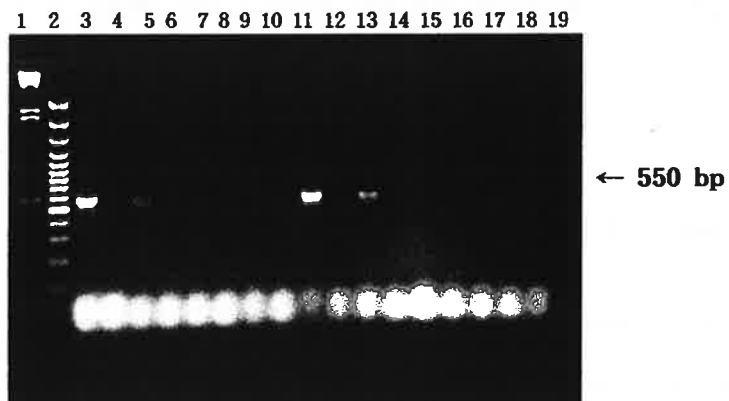


Fig. 11. PCR of GHR mouse line. lane1: HindIII-digested lambda DNA, lane2: 100bp ladder marker, lane3: (+) control, lane4: (-) control, lane5-19: genomic DNA of GHR mouse

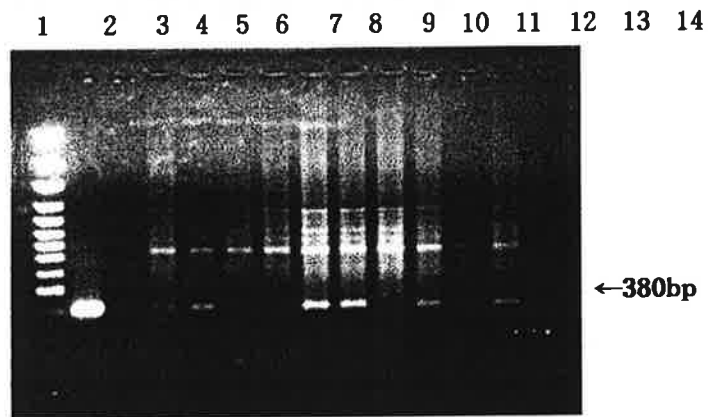


Fig. 12. PCR of IGF-1R mouse line. lane1: 100bp ladder marker, lane2: (+) control, lane3: (-) control, lane4-14: genomic DNA of IGF-1R mouse

5. 형질전환생쥐의 생산과 Phenotype 분석

본 연구에 이용되고 있는 이식 유전자는 성장(growth)과 관련이 있는 유전자로 체중이나 증체율에 효과를 나타낼 것으로 추정되어 먼저 연령에 따른 체중증가 효과를 측정하였다. GHR 또는 IGF-1R 형질전환생쥐의 F₁(TG)을 이용하여 2-3주령부터 non-transgenic littermate(NTG)와 함께 몸무게를 측정하고 있는데 약 20-30%정도 체중이 증가된 상태에서 일령과 함께 증가하는 경향을 나타내고 있다(Fig. 13과 14). GHR과 IGF-1R의 증체 경향에는 약간의 차이가 나타나고 있는데 GHR 형질전환생쥐에서는 약 12주령(80일령) 이후부터 증체에 차이가 나타나기 시작한 반면 IGF-1R 형질전환생쥐에서는 약 7주령(50일령)부터 증체에 차이를 나타내고 있다(Fig. 13과 14). 이는 growth hormone receptor의 경우 growth hormone와 함께 성성숙이 시작되는 사춘기 이후부터 증체 효과에 관여하기 때문인 것으로 추정되고 IGF-1 receptor의 경우 IGF-1과 함께 발육 초기부터 증체에 관여하기 때문인 것으로 추정되고 있다.

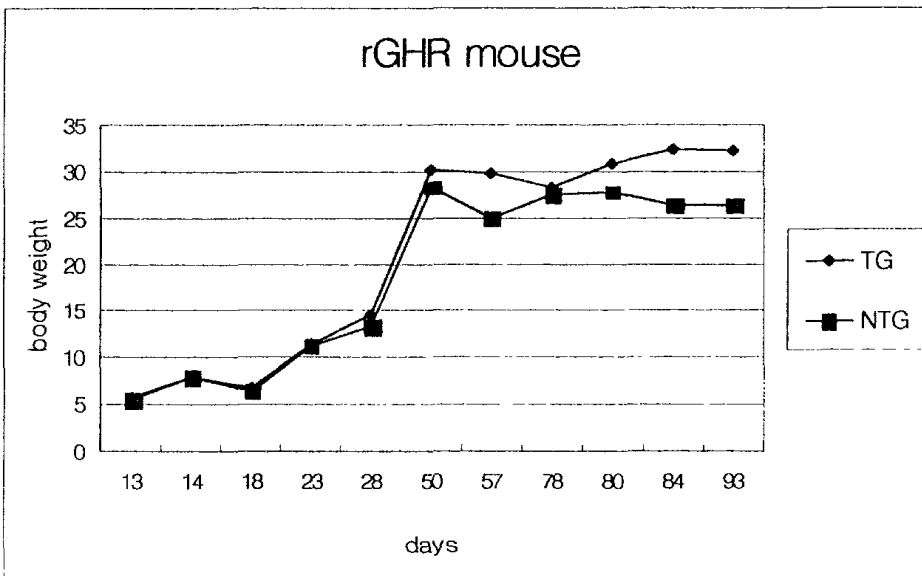


Fig. 13. Transmission rate of GHR mouse. TG: Transgenics, NTG: non-transgenics

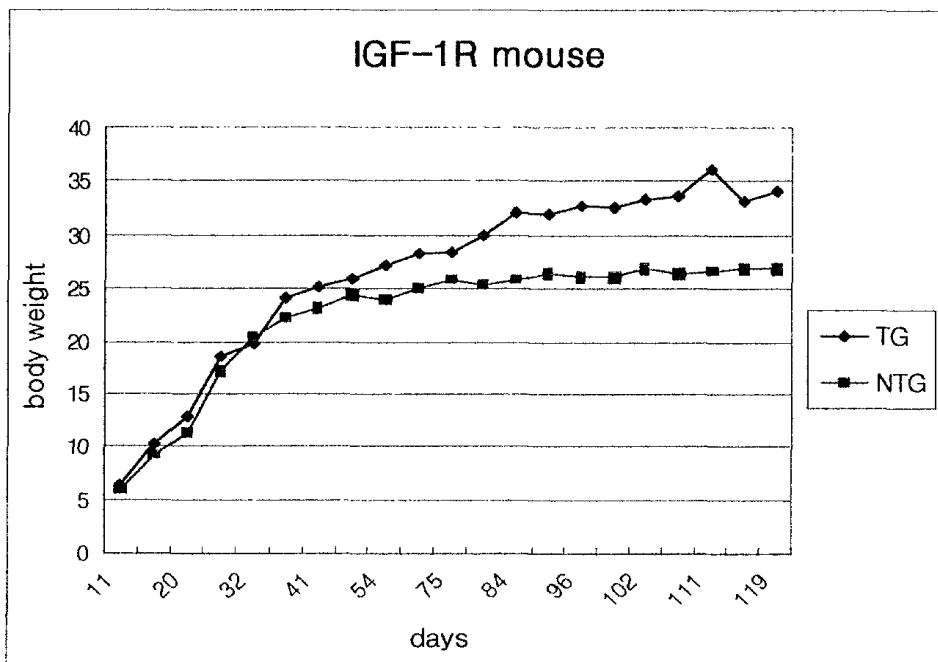


Fig. 14. Transmission rate of IGF-1R mouse. TG: Transgenics, NTG: non-transgenics.

6. 형질전환토끼의 DNA 분석

제 2 세부과제에서 DNA microinjection을 하여 생산한 토끼들 중 형질전환동물을 확인하는 작업을 수행하였다. 생산된 동물의 귀 조직으로부터 genomic DNA를 추출하여 growth hormone receptor(GHR)와 IGF-1 receptor(IGF-1R) DNA의 specific primer를 제작하여 PCR과 EcoRI restriction enzyme digestion을 시킨 후 Southern blotting을 수행하여 DNA를 분석하였다. GHR 및 IGF-1R을 가진 형질전환토끼는 PCR과 Southern blotting에 의해 확인하였다 (Fig. 6, 7, 8, 9, 10, 11). MT-GHR의 PCR screening을 위해서는 5' primer로 3' GHR부위와 3' primer로는 human poly(A)를 이용하여 550 bp를 증폭되게 하였다(Fig. 15). MT-GHR의 Southern blotting을 위해서는 GHR을 probe으로 이용하였고 이 경우 MT promoter와 GHR부위를 함유한 약 3.0 kb가 hybridization게 된다(Fig. 17). MT-IGF-1R인 경우도 PCR을 위해 3' IGF-1R primer와 human poly(A)를 이용하여 380 bp를 증폭되게 하였다(Fig. 16). Southern blotting을 위해서는 IGF-1R을 probe으로 이용하여 promoter와 IGF-1R부위를 함유한 약 5.0 kb가 hybridization게 된다(Fig. 18).

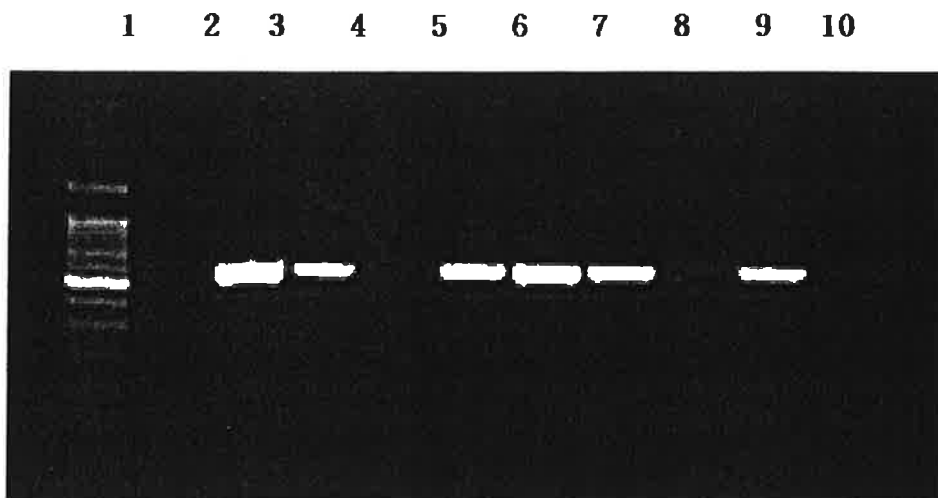


Fig. 15. Screening of MT-rabbit GHR transgenic F0 rabbits by PCR. lane 1, 100bp marker ; lane 2, negative control ; lane 3, positive control

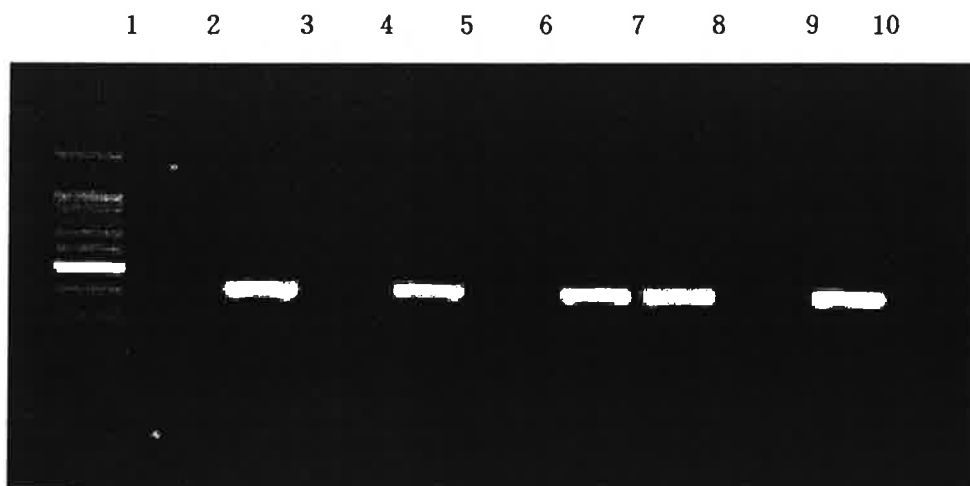


Fig. 16. Screening of MT-rabbit IGF1R transgenic F0 rabbits by PCR. lane 1, 100bp marker ; lane 2, negative control ; lane 3, positive control

1 2 3 4 5 6 N P



Fig 17. Identification of GHR transgenic rabbit by Southern blot analysis. Lanes 1, 4 and 5 : transgenic founder rabbits, Lanes 2, 3 and 6 : non-transgenic rabbits, Lane N : negative control, Lane P, pMTGHR vector positive control.

P N 1 2 3 4 5

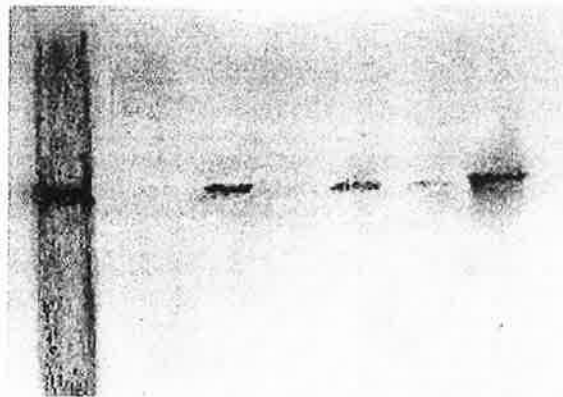


Fig. 18. Identification of IGF-1R transgenic rabbit by Southern blot analysis. Lanes 1, 3, 4 and 5 : transgenic founder rabbits, Lanes 2 : non-transgenic rabbit, Lane N : negative control, Lane P, pMTIGF-1R vector positive control.

7. 형질전환토끼의 생산과 번식

MT-GHR 유전자를 총 567개의 수정란에 미세주입하여 105 마리의 토끼새끼를 얻었으며 DNA 분석한 결과 18 마리(25.6%)가 MT-GHR 유전자를 가진 형질전환토끼인 것으로 확인되었고 이중 12 마리가 생존하였다(Table 12). MT-IGF-1R은 총 327개의 수정란에 미세주입하여 15 마리의 recipient에 이식한 후 총 54마리의 새끼를 얻었는데 이중 10 마리(18.5%)가 MT-IGF-1R 형질전환토끼인 것으로 DNA 분석 결과 확인되었다(Table 13).

이들 MT-GHR, MT-IGF-1R 세 형질전환토끼들 중 성성숙에 도달한 토끼를 outbreeding시켜 F₁으로의 전달율을 확인하였는데(Table 14) MT-GHR founder 형질토끼에서는 6마리 새끼 중 3마리의 이 형질전환토끼인 것으로 확인되어 50%의 전달율을 나타내고 있다. MT-IGF-1R founder 형질전환토끼에서도 5마리 새끼 중 2마리가 형질전환 F₁인 것으로 분석되어 MT-GHR과 MT-IGF-1R 형질전환토끼는 Mendelian 법칙에 의해 후대에 이식유전자를 전달하는 것으로 확인되어 이식유전자가 chromosome상에 정착되어 chromosome과 함께 후대에 전달되는 것을 확인하였다(Table 14).

Table 12. The efficiency of transgenic rabbit production by microinjection of MT-GHR gene into rabbit embryos

No. of injected	No. of transferred	No. of recipients	New born		
			No.	No. of transgenics (%)	% TG of transferred embryos
578	567	22	105	18 (17.1)	3.2

Table 13. The efficiency of transgenic rabbit production by microinjection of MT-IGF-IR gene into rabbit embryos

No. of injected	No. of transferred	No. of recipients	No.	New born	
				No. of transgenics (%)	% TG of transferred embryos
382	327	15	54	10 (18.5)	3.1

Table 14. Transmission of transgenes into progeny in founder rabbits

Transgenic line	Sex	No. of progeny	No. of transgenics	Transmission rate(%)
MTGH ^a -1	F	7	2	28.6
MTGHR ^b -2	M	6	3	50.0
MTIGF-1R ^c -1	F	5	2	40.0

^a : MT-rat Growth Hormone

^b : MT-rabbit Growth Hormone Receptor

^c : MT-rabbit Insulin Growth Hormone - I Receptor

8. 형질전환토끼에서 이식유전자의 발현측정

본 연구에서 생산된 Growth Hormone Receptor(GHR) 및 IGF-1 Receptor(IGF-1R)형질전환토끼에서 이식 유전자들의 발현 양상을 Northern blotting을 이용하여 검사해보았다. Metallothionein(MT) promoter에 의해서 발현이 조절되기 때문에 광범위하게 발현되는 양상을 관찰할 수 있었고 특히 간이나 신장 등에서 강하게 발현되는 것을 알 수 있었다. 비형질전환토끼에서의 endogenous GHR 및 IGF-1R 유전자의 transcripts는 Northern blotting에 의해 감지되지 않는데 비해 형질전환토끼에서 뚜렷한 transcript band가 detection되어 이식유전자들이 형질전환토끼에서 overexpression되고 있는 것을 확인할 수 있었다.

가. Growth Hormone Receptor 형질전환토끼

MT-GHR 형질전환토끼의 각 line 별 F₁ 새끼의 장기에서 RNA를 추출하여 Northern blotting을 시도하였다. probe으로는 GHR sequence를 random priming방법으로 labeling한 것을 사용하였다. 이 probe을 이용하여 hybridization을 실시하였을 경우 비형질전환토끼의 장기에서 endogenous GHR은 거의 detection되지 않아 endogenous GHR을 Northern blot으로 detection하기에는 sensitivity가 떨어지는 것으로 추정되었다. 그러나 형질전환토끼에서 MT promoter에 의한 GHR 유전자 발현은 간, 신장, 근육, 내장, 등에서 transcription이 일어나고 있으며, 현재까지 형질전환토끼에서 간과 신장에서 가장 강하게 발현되는 것으로 나타났고 line 별 발현정도의 차이가 있는 것으로 나타나고 있다(Fig. 19). 약 3.0 kb의 band에서 강하게 GHR probe과 hybridization되는 것을 관찰할 수 있었다. 형질전환토끼의 line별로 #3 line의 경우는 간에서 #8 line의 경우는 신장에서 강하게 발현되어 장기별에 따라 발현정도의 차이가 관찰되었으나 MT promoter의 발현조절 양상에 따른 것으로 추정되고 있다. 현재까지 성장 표현형이 잘 나타난 것일수록 발현정도가 큰 것으로 추정되고 있다.

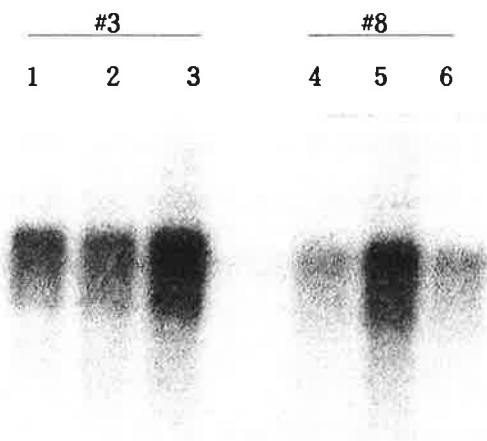


Fig. 19. Northern blot analysis of GHR expression in different tissues of GHR transgenic rabbits. Lane 1,2,3,: no.3 transgenic rabbit F₁, Lane 4,5,6: no.8 transgenic rabbit F₁, Lane 1,4 : Muscle, Lane 2, 5: Kidney, Lane 3, 6: Liver.

나. IGF-1 Receptor 형질전환토끼

MT-IGF-1R 형질전환토끼의 장기별 RNA를 추출하여 IGF-1R DNA를 probe로 hybridization을 실시한 Northern blot에서는 약 5.0 kb의 transcript에서 강한 band를 나타냈다(Fig. 20). 비형질전환토끼의 장기 RNA를 이용한 Northern blot에서 endogenous IGF-1R signal은 detection되지 않아 endogenous level의 극히 소량인 것으로 추정되었다. 그러므로 형질전환토끼에서는 IGF-1R 유전자가 overexpression되고 있는 것을 확인할 수 있었다. 형질전환토끼에서는 IGF-1R 유전자는 간에서 가장 강하게 발현되었고 그 외 장기에서도 고루 발현되고 있다. 또한 각 형질전환토끼의 line마다 발현양상은 거의 같은 pattern인 것으로 확인되었다.

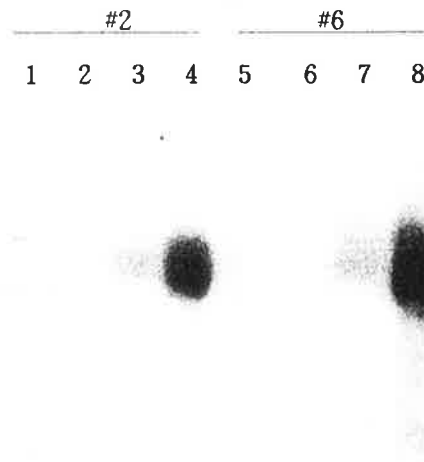


Fig. 20. Northern blot analysis of IGF-1R expression in different tissues of IGF-1R transgenic rabbits. Lane 1,2,3,4: no.2 transgenic rabbit F₁, Lane 5,6,7,8: no.8 transgenic rabbit F₁, Lane 1,5: Lung, Lane 2,6: Muscle, Lane 3,7: Kidney, Lane 4,8: Liver.

9. 형질전환토끼의 표현형 관찰

가. 형질전환토끼의 번식

GHR 형질전환토끼를 non-transgenic 토끼와 교배를 시켜 F₁ 새끼를 생산하여 germline transmission을 측정한 결과 founder 토끼 수컷 및 암컷에서 각각 12마리와 11마리의 새끼를 생산하여 50%(6마리) 및 36.4%(4마리)의 새끼가 이식유전자를 지닌 것으로 확인되었다(Table 15). 암컷에서 36.4%의 전달율을 기록하고 있으나 litter size가 증가하면 50%에 도달할 것으로 사료된다. 그러므로 Mendel의 법칙에 의해 이식유전자가 다음세대에 전달되는 것으로 추정되었다.

IGH-1R의 경우 founder 수컷과 암컷을 non-transgenic 토끼와 교배를 시켜 각각 13 마리와 6마리의 3마리를 교배시킨 결과 38.5%(5마리) 및 33.3%(2마리)의 전달율을 기록하고 있다(Table 16).

GHR 및 IGF-1R 형질전환토끼의 이식유전자가 다음세대에 전달되어 이식유전자가 chromomosome 상에 정착되었음을 확인할 수 있다.

Table 15. Transmission of GHR transgenes into progeny in founder rabbits

Transgenic line	Sex	No. of progeny	No. of transgenic	Transmission rate(%)
MTGHR ^a -3	M	12	6	50.0
MTGHR-8	F	11	4	36.4

^a : MT-rabbit Growth Hormone Receptor

Table 16. Transmission of IGF-1R transgenes into progeny in founder rabbits

Transgenic line	Sex	No. of progeny	No. of transgenic	Transmission rate(%)
MTIGF-1R ^a -3	M	13	5	38.5
MTIGF-1R-8	F	6	2	33.3

^a : MT-rabbit Growth Hormone Receptor

나. 성장률 및 구성비율

본 연구에 이용되고 있는 이식 유전자는 성장(growth)과 관련이 있는 유전자로 체중이나 증체율에 효과를 나타낼 것으로 추정되어 먼저 연령에 따른 체중증가 효과를 측정하였다. GHR 또는 IGF-1R 형질전환토끼의 F₁을 이용하여 non-transgenic littermate와 함께 5일령부터 30일령까지의 초기 몸무게를 측정하였다(Fig. 21). 초기성장율에 있어서는 GHR 형질전환토끼의 증체율이 급격히 증가하고 IGF-1R 형질전환토끼의 증체율은 완만히 진행되었다.

그 이후 150일령까지의 증체율을 조사하였는데 GHR 형질전환토끼의 성장률은 non-transgenic litter mate에 비해 약 25% 정도 증가하는 경향을 나타내고 있고, IGF-1R 형질전환토끼는 약 15%정도 증체효과가 있는 것으로 나타나고 있다(Fig. 22, 23). 형질전환토끼 암컷과 수컷의 증체율에서는 차이가 거의 없었고 증체 pattern도 같은 경향을 나타냈다. GHR과 IGF-1R의 증체 경향에는 약간의 차이가 나타나고 있는데 GHR 형질전환토끼에서는 초기부터 증체에 차이가 나타나기 시작한 반면 IGF-1R 형질전환토끼에서는 약 90일령부터 증체에 차이를 나타내고 있다(Fig. 22, 23). 이는 growth hormone receptor의 경우 growth hormone과 함께 발육 초기부터 증체에 관여하기 때문인 것으로 추정되고 IGF-1 receptor의 경우 IGF-1과 함께 성성숙이 시작되는 사춘기 이후부터 증체 효과에 관여하기 때문인 것으로인 것으로 추정되고 있다.

분만 후 약 75일령의 형질전환토끼를 대조구로 littermate 비형질전환토끼와 함께 신체 장기의 무게를 분석하였는데 형질전환토끼에서 간 및 신장 등의 무게가 증가한 것으로 분석되었다(Table 17). 특히 GHR 형질전환토끼에서는 체중과 함께 모든 장기에서 대조구 토끼에 비해 25%- 30% 증가되었다. IGF-1R 형질전환토끼는 장기의 비율이 10-15% 증가한 것으로 나타나고 있다. 특히 형질전환토끼에서 간과 신장의 무게가 뚜렷하게 증가된 것을 확인할 수 있었다.

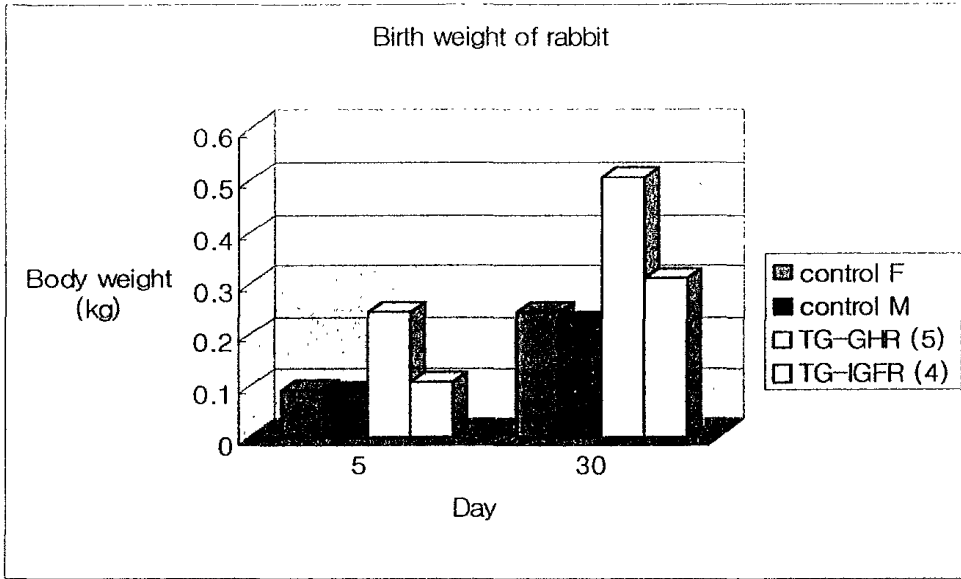


Fig. 21. Body weight of transgenic rabbits in early growth phase.

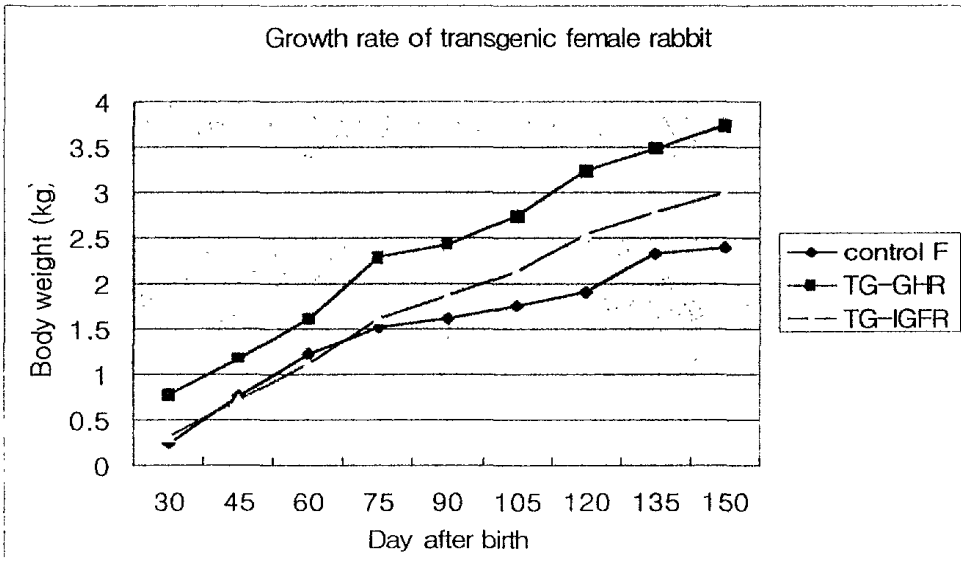


Fig. 22. Growth of female transgenic rabbits.

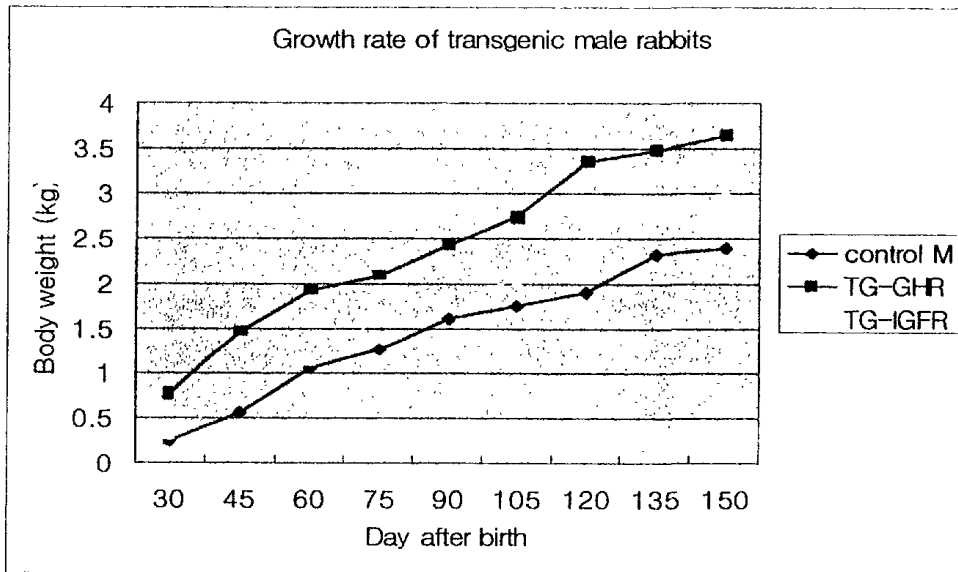


Fig. 23. Growth of male transgenic rabbits.

Table 17. Body and organ weight in transgenic rabbit

Transgenic rabbits ^a	Sex	Tissue wt (g)					
		BT(kg)	Liver	Kidney	Spleen	Lung	Heart
Control	F	1.61	30.3	10.8	0.69	7.5	3.7
	M	1.65	32.2	10.3	0.65	8.1	3.5
MT-GHR	F	1.93	40.5	17.6	0.87	9.1	4.3
	M	2.04	39.6	18.8	0.93	9.7	4.8
MT-IGF-1R	F	1.76	33.4	12.5	0.73	7.8	3.9
	M	1.86	35.2	13.2	0.82	7.9	4.2

^a Animals were killed at 75 days of age.

10. Double 형질전환토끼의 생산

GHR 유전자와 IGF-1R 유전자를 함께 지닌 double 형질전환토끼를 생산하기 위해 GHR 형질전환토끼와 IGF-1R 형질전환토끼를 교배시켜 GHR 유전자와 IGF-1R 유전자를 함께 갖고 있는 형질전환토끼를 생산하였다.

Growth Hormone receptor(GHR)를 가진 형질전환토끼와 IGF-1 receptor (IGF-1R)를 가진 형질전환토끼를 교배시켜 새끼의 DNA를 분석을 통해 두 유전자를 함께 지닌 double 형질전환토끼를 생산하였다. 각 line의 5마리 암컷 과 5 마리 수컷을 상호 교배시켜 새끼를 생산하여 PCR을 이용하여 DNA를 분석하였다(Fig, 24). GHR 유전자와 IGF-1R 유전자의 PCR product의 크기에 차이가 있게 하여 single 및 double 형질전환토끼를 명확히 구분할 수 있었다. Fig. 24에서 GHR 및 IGF-1R의 PCR product는 각각 550 bp와 380 bp로 위에 나타난 밴드는 GHR 유전자를 나타내고 아래 밴드는 IGF-1R 유전자를 나타내어 두 밴드를 함께 나타내는 것은 GHR 유전자와 IGF-1R 유전자를 함께 지니고 있는 double 형질전환토끼이고 한 밴드만을 나타내는 것은 single 형질전환토끼(GHR 또는 IGF-1R transgenic rabbit)이며 아무 밴드도 나타내지 않는 것은 non transgenic으로 명확히 형질전환상태를 분석할 수 있었다.

총 5쌍의 mating에서 41 마리의 새끼토끼를 분석한 결과 DNA 분석 결과 non-transgenic , GHR, I GF-1R 및 double transgenic rabbit의 비율이 19.5%, 31.7%, 26.8% 및 17.1%fh 나타났다(Table 18). 이론적으로 Mendal의 법칙에 따라 유전자가 분리되어야 하지만(non-transgenic : GHR : I GF-1R : double = 1 : 1 : 1 : 1) 충분한 수가 확보된다면 이 비율에 맞을 것으로 예측된다. 현재 태어난 새끼들의 분포를 보면 double 형질전환율이 약간 낮게 나오고 있는데 비형질전환토끼의 생산율이 낮은 것을 감안한다면 태어나는 새끼의 수가 증가하면 정확한 transmission rate를 추정할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 GHR 및 IGF-1R 형질전

환토기 생산율이 약간 높은 것으로 나오고 있는데 단순히 아직 sample수가 충분하지 않기 때문인 것으로 사료된다.

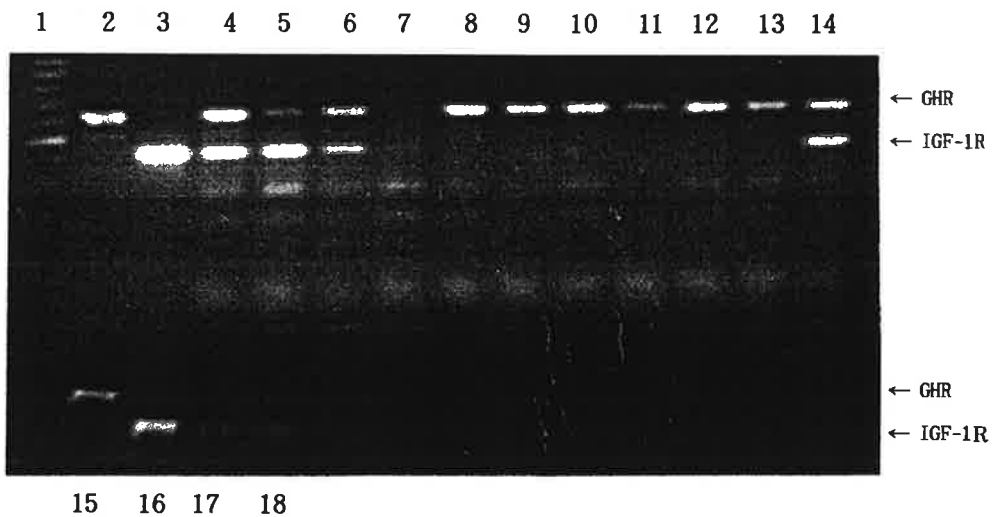


Fig. 24. PCR analysis for double transgenic rabbits. Lane 1: 100 bp DNA marker, Lane 2 & 15: GHR positive, Lane 3 & 16: IGF-1R positive, Lane 4,5,6,14: double transgenics, Lane 8,9,10,11,14,13: GHR transgenics, Lane 17,18: IGF-1R transgenics, Lane 7: non transgenic.

Table 18. Transmission of double transgenes (GHR/IGF-1R) into progeny by crossbreeding of GHR and IGF-1 transgenic rabbits

No. Mating set	No. Progeny	No. of (%)			
		Transgenic with GHR	Transgenic with IGF-1R	Double transgenic	Non transgenic
1	8	3	2	1	1
2	18	6	5	3	4
2	15	4	4	3	4
total	41	13 (31.7)	11 (26.8)	7 (17.1)	9 (19.5)

11. double 형질전환토끼의 표현형

가. 성장률

GHR 유전자와 IGF-1 유전자를 함께 갖고 있는 double 형질전환토끼들에 대한 체중을 연령에 따라 같은 littermate의 비형질전환토끼(non-transgenic rabbit) 및 single 형질전환토끼들과 성별로 구분하여 비교하는 실험을 하였다(Fig. 25, 26). 생후 30 일령까지의 체중은 비형질전환토끼보다는 훨씬 큰 것으로 나타났고 GHR 형질전환토끼와 비슷한 것으로 드러났다. 이는 double 형질전환토끼에서 초기 성장에는 GH의 작용에 의해 성장이 주도되고 있는 것으로 사료된다. double 형질전환토끼의 성장률은 75일령 이후부터 single 형질전환토끼와 차이를 나타내고 있는데 비형질전환토끼보다는 약 30% 정도 빠르고, GHR 이나 IGF-1R 형질전환토끼보다 10-15% 정도 빠른 경향을 나타내고 있다. 이러한 성장은 약 75 일령에 IGF-1R 형질전환토끼가 증체하는 것과 함께 증가하는 것으로 나타나 이전까지는 GHR의 작용에 의해 증체를 유지하다가 75 일령 이후에는 GHR 및 IGF-1R의 상호작용에 의해 증체되고 있는 것으로 사료된다. 150 일령까지 계속되는데 암컷과 수컷간에 차이가 없는 것으로 나타나고 있다. 이는 growth hormone receptor의 경우 growth hormone과 함께 발육 초기부터 증체에 관여하고 IGF-1 receptor의 경우 IGF-1과 함께 성성숙이 시작되는 사춘기 이후부터 증체 효과에 관여하기 때문인 것으로 추정되어 GHR과 IGF-1R을 여분으로 함께 갖고 있는 double 형질전환토끼의 경우 GHR 형질전환토끼보다 75일령이 후에 증체율이 증가하는 경향을 나타내는 것으로 사료된다. 생체내 성장과 관련하여 GH-IGF-1 기본 내분비 개념에서 GH의 총체적이고 일차적인 기능을 수행하고 IGF-1은 조직에서 국소적으로 GH의 이차적인 기능을 수행하는 것으로 알려져 있는데 본 연구에서의 형질전환토끼의 표현형은 이러한 개념과 일치하는 것을 알 수 있다.

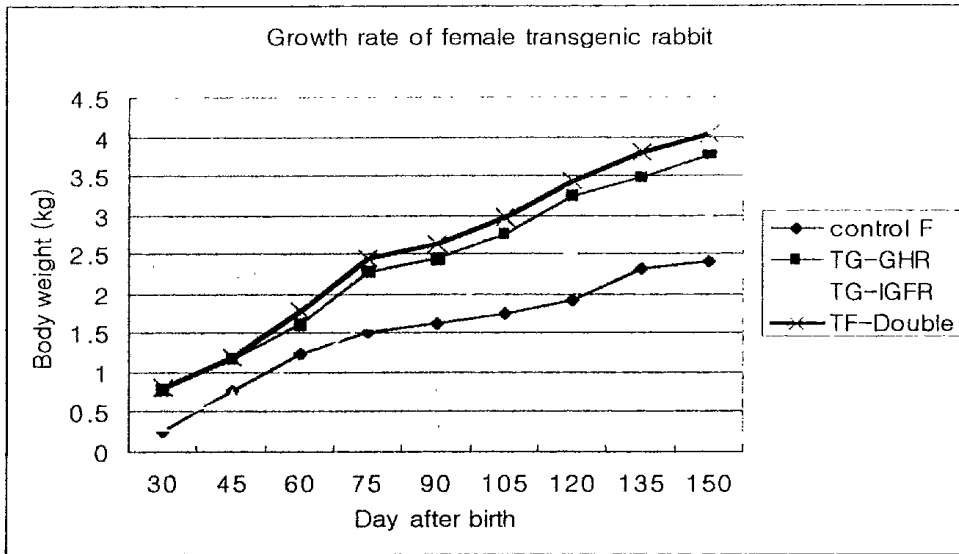


Fig. 25. Growth rate of female double transgenic rabbits

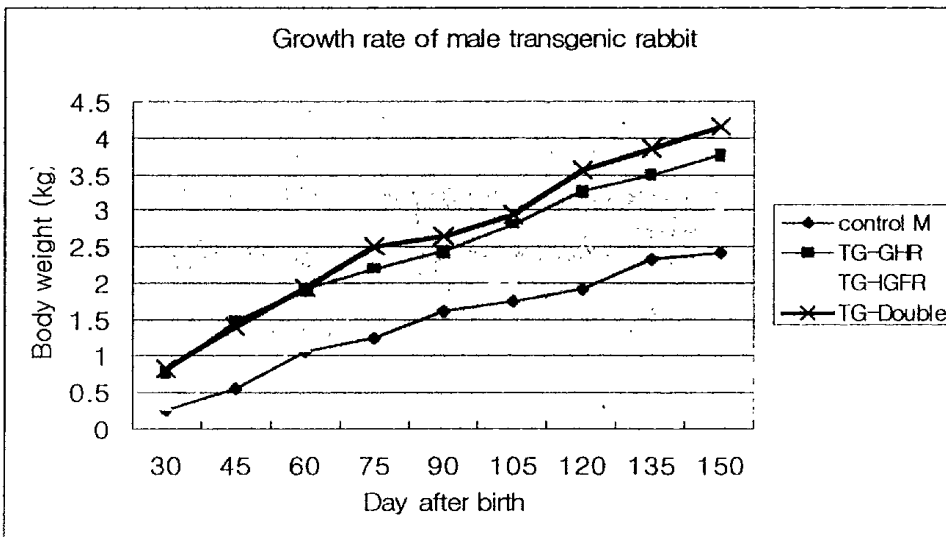


Fig. 26. Growth rate of female double transgenic rabbits

나. Growth Hormone과 Insulin-like Growth Factor의 신호전달체계 연구

GHR 및 IGF-1receptor는 다양한 신호전달체계를 활성화시키는 것으로 알려져 있는데 대표적인 신호전달체계인 RAS signaling을 살펴보기 위해 GHR 및 IGF-1R 형질 전환토끼의 간과 섬유아세포를 이용하여 MAP kinase의 수준 및 활성을 antibody를 이용하여 western blotting으로 분석하였다(Fig. 27). MAP kinase는 growth factor 나 hormone 등에 의해 세포내에서 활성화되는데 MEK kinase에 의해 Tyrosine과 Threonine residue에 phosphorylation을 일으켜 active한 형태가 된다. MAP kinase(intact form)는 보통 42 kd으로 세포내에 존재하는데 활성화되면 phosphorylation에 의해 약 44 kd으로 분자량이 증가한다. 본 연구에서는 GHR 및 IGF-1R 형질전환토끼의 간세포에서 protein을 추출하여 전기영동으로 분리한 후 MAP kinase antibody를 이용하여 MAP kinase를 분석하였다. Fig. 27에서와 같이 GHR 및 IGF-1R 형질전환토끼의 간세포에서는 phosphorylation에 의해 활성화된 44 kDa의 MAP kinase가 강하게 발현되었는데 비해 바형질전환토끼의 간에서는 42 kDa의 intact form의 MAP kinase가 더 발현되는 것으로 드러나 형질전환토끼의 세포에서 신호전달체계가 활성화되어 있는 것으로 나타났다. 특히 IGF-1R 형질전환토끼의 세포에서는 강하게 44 kDa의 활성화된 MAP kinase가 발현하였는데 이는 IGF-1 receptor의 증가에 의해 IGF-1의 signal이 증가한 것으로 사료된다. 기타 40 kDa 아래 부위의 밴드는 토끼에 존재하는 작은 MAP kinase subunit들로 예측되는데 이들에서도 같은 경향으로 phosphorylation의 pattern을 나타내고 있다. 이상에서와 같이 GHR 및 IGF-1R 형질전환토끼에서 GH receptor와 IGF-1 receptor를 통한 세포내에서의 신호전달체계가 활성화되어 증체와 관련된 유전자들이 발현되어 형질전환토끼의 표현형을 나타내는 것으로 유추할 수 있다.

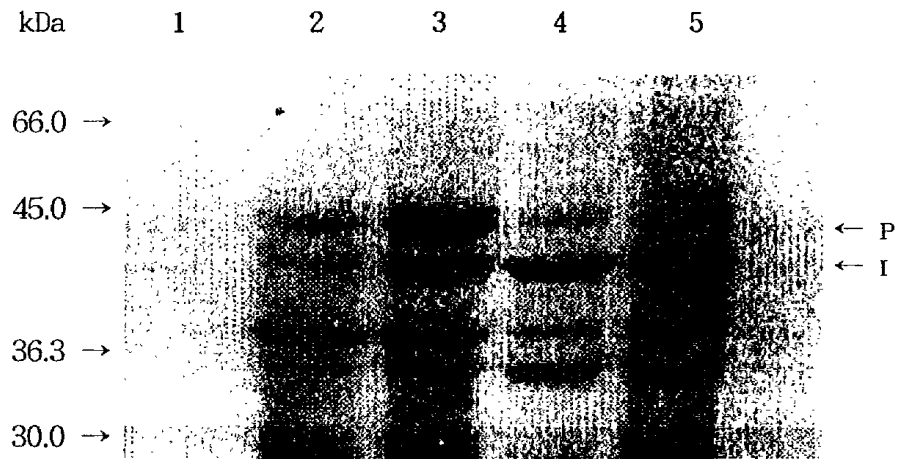


Fig. 27. Western blot analysis with MAP kinaes antibody in transgenic rabbit liver. Lane 1: Protein Marker, Lane 2: GHR transgenic rabbit, Lane3: IGF-1 transgneic rabbit, Lane 4 & 5: non transgenic rabbits.

제 4 절 결론

본 연구의 목적은 토끼에서 DNA 미세주입법에 의해 형질전환토끼를 생산하는 system을 구축하고 그 생산효율을 향상시키는 조건을 확립하며 Growth Hormone receptor와 IGF-1 receptor 유전자를 이용하여 형질전환토끼를 생산하여 증체 효과에 대한 형질을 정량적으로 분석하고 두개의 유전자를 함께 가진 double 형질전환토끼를 생산하여 두 유전자의 상호성을 분석하는데 있다

토끼 수정란의 채란과 배양, 이식 등의 연구는 수정란을 채취하여 recipient 토끼에 이식하여 새끼를 얻어 토끼 수정란 이식기술의 기초를 확립하였으며 토끼 one-cell embryo를 expanded blastocyst까지 배양하는데 기존의 배양액 보다 효율적으로 배양시킬 수 있는 RDH medium을 개발하였다.

형질전환토끼의 생산효율을 높이기 위한 방법으로 Green Fluorescent Protein(GFP)유전자를 CMV나 Actin promoter에 재조합시키는 construction은 완성되었고 이식유전자로서 MT promoter에 GH-R유전자와 IGF-1R 유전자를 재조합시켜 완성하였다. CMV-GFP gene을 NIH3T3에 transfection 시켜 gene expression을 관찰하였다

토끼 1-cell 수정란을 채란하여 micromanipulator하에서 CMV_{promoter}-GFP DNA를 전핵에 주입하여 in vitro에서 배양하여 배발달율을 측정하였으며 recipient의 난관에 이시하여 임신 20일령까지의 태아 생존성을 control과 비교 분석하였고 DNA 미세주입 후 GFP 유전자의 발현에 의한 green fluorescent 형광을 관찰하여 배발달과 태아에서의 발현율을 검사 분석하였다. 주입 DNA의 농도를 10 ng/ul(2500 copies/pl)와 20 ng/ul(5000 copies/pl)로 하여 미세주입하였을 때 임신 20일령 태아에서의 형질전환율을 검사하여 PCR과 GFP 발현에 의한 형광발현을 검사한 결과 20 ng/ul에서 7.4%의 형질전환율을 나타냈고 10 ng/ul에서는 3.8 %의 형질전환율을 나타내어 토끼의 경우 미세주입 DNA의 copy수는 5000 copy가 적합한 것으로 나타났다.

DNA microinjection방법에 의해 생쥐의 zygote에 MT-GHR과 MT-IGF-1R 두 개의 유전자를 미세주입하여 각각의 DNA construct 당 3마리의 founder 형질전환생쥐를 생

산하였다. GHR 형질전환생쥐와 IGF-1R 형질전환생쥐의 F₁을 생산한 후 DNA 분석이 끝난 2-3 주령부터 non-transgenic littermate와 함께 몸무게를 측정하고 있는데 초기부터 약 20-30%정도 체중이 증가되었으며 일령이 증가함에 따라 체중도 증가하는 경향을 나타냈다. graph로 분석해 보면 거의 평행적으로 증가된 상태를 약 15 주령까지 지속되는 것을 관찰할 수 있었다.

형질전환토끼의 생산을 위해 MT-GH, MT-GHR 및 MT-IGF-1R DNA를 micromanipulator를 이용하여 토끼의 1-cell embryo의 pronucleus로 미세주입을 실시하였다. DNA 미세 주입 후 recipient 토끼의 난관에 이식하여 태어난 새끼의 생존율에 있어서는 DNA 미세주입 여부에 관계없이 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 이식 후 recipient 토끼들의 임신율은 약 65%정도를 나타내고 있고 평균 수태율은 약 6 마리였다. MT-GHR과 IGF-1R의 DNA를 미세주입하여 MT-GHR은 약 16마리, IGF-1R은 약 13마리의 토끼새끼를 생산하였으며 PCR과 Southern blotting에 의해 형질전환토끼 여부를 확인하였다. 또한 이들 중 성성숙에 도달한 형질전환토끼를 교미시켜 F₁으로의 전달율을 측정하였는데 약 50% 전달율을 보였으며 이식유전자가 chromosome에 정착되었음을 확인하였다.

MT-GHR 및 MT-IGF-1R 형질전환토끼의 장기에서 RNA를 추출하여 Northern blotting을 실시한 결과 MT promoter에 의한 GHR 및 IGF-1R의유전자 발현은 형질전환토끼의 간, 근육, 신장 등에서 transcription이 일어나고 있으며, 성장 표현형이 잘 나타난 것일수록 발현정도가 큰 것으로 측정되고 있다. GHR 형질전환토끼의 성장률은 초기부터 성장률이 증가하였고 약 150령까지 non-transgenic litter mate에 비해 25% 정도 증가하는 경향을 나타내고 있고, IGF-1R 형질전환토끼는 초기에는 증체효과가 거의 없으나 중기부터 약 15% 정도 증체효과가 있는 것으로 나타나고 있다. 신체 구성율을 분석한 결과 GHR 형질전환토끼는 신장 및 간 등의 무게가 유의적으로 증가한 것으로 분석되었고, IGF-1R 형질전환토끼에서도 non-transgenic 대조군에 비해 장기의 비율이 증가한 것으로 분석되었다.

Growth Hormone receptor(GHR)를 가진 형질전환토끼와 IGF-1 receptor (IGF-1R)를 가진 형질전환토끼를 교배시켜 두유전자를 함께 지닌 double 형질전환 토끼를 생산하였다. non-transgenic , GHR, I GF-1R 및 double transgenic rabbit 의 비율이 19.5%, 31.7%, 26.8% 및 17.1%h 나타났다. 태어난 double 형질전환토끼들에 대한 체중을 연령에 따라 같은 littermate의 non-transgenic 및 single 형질전환토끼들과 비교하는 실험에서 double 형질전환토끼의 성장률은 비형질전환토끼보다는 30%정도 빠르고, GHR 이나 IGF-1R 형질전환토끼보다 10-15% 정도 빠른 경향을 나타내고 있다. 신호전달체계인 RAS signaling을 살펴보기 위해 GHR 및 IGF-1R 형질전환토끼의 간세포를 이용하여 MAP kinase의 수준 및 활성을 MAP kinase antibody로 western blotting으로 분석한 결과 phosphorylation으로 활성화된 MAP kianse가 gudwlfwjsghksxhR의 세포에서 많이 발현되어 GH receptor와 IGF-1 receptor를 통한 세포내에서의 신호전달체계가 활성화된 것으로 나타났다.

제 5 절 참고문헌

1. Palmiter, R. D., R. L. Brinster, R. E. Hammer, M. E. Trumbauer, G. M. Rosenfeld, N. C. Birnberg and R. M. Evans. 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300: 611.
2. Palmiter, R. D., G. Norstedt, R. E. Galinas, R. E. Hammer and R. L. Brinster. 1983. Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science* 222:809.
3. Pursel, V. G., C. A. Pinkert, K. F. Miller, D. J. Bolt, R. G. Campbell, R. D. Palmiter, R. L. Brinster and R. E. Hammer. 1989. Genetic engineering of livestock. *Science* 244:1281.
4. Leung, D. W., S. A. Spencer, G. Cachinanes, R. G. Hammond, C. Collins, W. J. Henzel, R. Barnard, M. J. Waters and W. I. Wood. 1987. Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature* 330:537-543.
5. Colosi, P., K. Wong, S. R. Leong, W. I. Wood. Mutational analysis of the intracellular domain of the human growth hormone receptor. *J. Biol. Chem.* 12617.
6. Fuh, G., B. C. Cunningham, R. Fukunaga, S. Nagata, D. V. Goeddel and J. A. Wells. 1992. Rational design of potent antagonists to the human growth hormone receptor. *Science*. 256:1677.
7. Argestinger, L. S., G. S. Campbell, X. Yang, B. A. Witthuhn, O. Silvanoinen 1993. Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell* 74:237.

8. Ridderstrale M. and H. Tornqvist. 1995. PI-3 kinase inhibitor wortmannin blocks the insulin-like effects of growth hormone in isolated rat adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203:306.
9. Doglio, A., C. Dani, P. Grimaldi and G. Ailhaud. 1989. Growth hormone stimulates c-fos gene expression by means of protein kinase C without increasing inositol lipid turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1148.
10. Winston, L. A. and P. J. Bertics. 1992. Growth hormone stimulates the tyrosyl phosphorylation of 42- and 45-kDa ERK-related proteins. *J. Biol. Chem.* 267:4747.
11. Gronowski A. M., Z. Zhong, Z. Wen, M. J. Thomas, J. E. Darnell Jr. 1995. Nuclear actions of growth hormone: rapid tyrosine phosphorylation of Stat1 and Stat3 after in vivo growth hormone treatment. *Mol. Endocrinol.* 9:171.
12. Mathews, L. S., B. Enberg and G. Norstedt. 1989. Regulation of rat growth hormone receptor gene expression. *J. Biol. Chem.* 264:9905.
13. Frick, G. P., J. L. Leoard and H. M. Goodman. 1990. Effect of hypophysectomy on growth hormone receptor gene expression in rat tissues. *Endocrinology* 126:3076.
14. Mullis, P. E., T. Lund, M. S. Patel, C. G. D. Brook and P. M. Brickell. 1991. Regulation of human growth hormone receptor gene expression by human growth hormone in a human hepatoma cell line. *Mol. Cell. Endocrinol.* 76:125.
15. Postel-Vinay, M. C., E. Cohen-Tanugi and J. Charrier. 1982. Growth hormone receptors in rat liver membranes: effects of fasting and refeeding and correlation with plasma somatomedin activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 28:667.

16. Baxter, R. C., J. M. Bryson and J. R. Turtle. 1980. Somatogenic receptors of rat liver: regulation by insulin. *Endocrinology* 107:1176.
17. Hughes, J. P., H. P. Elsholtz and H. G. Friesen. 1985. Growth hormone and prolactin receptors. In *Polypeptide Hormone receptors*(Posner B. I., ed.) Marcel Dekker, New York, p 157.
18. Daughaday, W. H., K. Hall, M. S. Raben, W. D. Salmon, J. L. van den Brender and J. J. VanWyk. 1972. Somatidin: proposed designation for sulfation Factor. *Nature* 107.
19. Tollet, P., B. Enberg and A. Mode. 1990. Growth hormone (GH) regulation of cytochrome P-450IIC12, insulin-like growth factor-1 (IGF-1), and GH receptor messenger RNA expression in primary rat hepatocytes: a hormonal interplay with insulin, IGF-1, and thyroid hormone. *Mol. Endocrinol.* 4:1934.
20. Flinton, D. J. 1994. Immunomodulatory approaches for regulation of growth and body composition. *Anim. Product.* 58:301.
21. Bauman, D. E. and R. G. Vernon. 1993. Effects of exogenous bovine somatotrophin on lactation. *Ann. Rev. Nutri.* 13:437.
22. Palmiter, R. D., E. P. Sandgren, D. M. Koeller and R. L. Brinster. 1993. Distal Regulatory elements from the mouse metallothionein locus stimulate gene expression in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* 13:5266-5275.
23. Smith, W. C., J. Kuniyoshi and F. Talamantes. 1989. Mouse serum growth hormone (GH) binding protein has GH receptor extracellular and substituted transmembrane domains. *Mol. Endocrinol.* 3:984.