

최 종
연구보고서

Retrovirus Vector System을 이용한
Human Lactadherin Protein을 분비하는
형질전환 쥐와 소의 생산에 관한 연구

Retrovirus Vector System-Mediated Production of
Transgenic Mice and Cattle Secreting Human
Lactadherin in the Milk

건국대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “Retrovirus vector system을 이용한 human lactadherin protein을 분비하는 형질전환 쥐와 소의 생산에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002년 11월 18일

주 관 연 구 기 관 명 : 건 국 대 학 교

총괄연구책임자 : 정병현

세부연구책임자 : 정병현

연 구 원 : 이병한

연 구 원 : 김진영

연 구 원 : 임좌진

협동연구기관명 : 대구카톨릭대학교

협동연구책임자 : 김태완

협동연구기관명 : 호서대학교

협동연구책임자 : 염행철

요 약 문

I. 제 목

Retrovirus vector system을 이용한 human lactadherin protein을 분비하는 형질전환 쥐와 소의 생산

II. 연구개발의 목적 및 필요성

현대의학은 급격히 발달하고 있지만 상당수의 질병은 아직까지 의학기술로서도 방지할 수 없는 것이 현실이다. 그중에서 가장 대표적인 것중의 하나는 유아기의 어린이들의 retrovirus성 급성설사이다. 전세계 5세이하의 어린이중 연간 약 1억3천명이 retrovirus에 감염되고 약 2천만 정도가 설사로 고통을 받고 있으며 그중에서 60만 정도가 사망에 까지 이르고 있다. 일반적으로 rotavirus성 설사는 위생상태와는 상관없이 어느 나라를 막론하고 선진국과 개도국에서 비슷한 빈도로 발생하고 있다. 따라서 대부분의 취학전 유아들은 이 rotavirus에 한번이상 감염된다고 볼수 있다. 한편 모유를 먹고 자란 아이는 설사뿐만 아니라, 호흡기 질환, 중이염 등에 잘 감염되지 않는다고 보고 되어 있는데 이것은 모유 성분 중에서 lactadherin이 rotavirus가 다른분자와 결합하는 능력과 감염성을 약화시켜서 그들의 번식을 억제하기 때문이다. 따라서 유아 설사의 대부분 원인이 rotavirus에 의한 것이므로 lactadherin을 충분히 섭취한다면 rotavirus에 의한 설사를 예방할 수 있을것으로 사료되며 축산농가의 차원에서 도 rotavirus에 의한 설사로 인한 자축의 폐사가 큰 손실이 된다는 점을 감안할 때 lactadherin이라는 고부가 물질을 생명공학 기법을 응용하여 bioreactor system으로 생산해 내는 것은 축산업의 생산성 증대와 나아가 인류의 복지에 있어서 매우 커다란 파급효과를 가져올 것으로 기대된다. 따라서 본 연구의 목적은 retrovirus vector gene transfer system을 이용하여 human lactadherin을 milk를 통해 분비하는 형질전환 쥐의 생산을 통하여 필요한 지식과 기술을 축적한 다음, 최종적으로는 human lactadherin을 대량생산하는 형질전환 소를 생산하여 첨단 생명공학 기술을 산업적으로 응용 가능한 수준까지 개발 발전시키는 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 Retrovirus vector system을 이용한 human lactadherin protein을 분비하는 형질전환 쥐와 소의 생산을 위하여 제1 세부과제인 '농축된 VSV-G based retrovirus 용액을 미수정란의 위란강에 주입하여 형질전환 쥐와 소의 생산'과 제1세부과제의 수행을 위하여 제2 세부과제인 'Human-milk lactadherin 유전자를 전이 및 발현시키는 retrovirus vector system의 개발'과 제3 세부과제인 'Human Lactadherin 유전자의 Cloning'의 과제로 나누어 실시되었고, 각 세부과제별 연구개발 내용 및 범위는 다음과 같다.

제 1 세부과제 : VSV-G based retrovirus 용액을 미수정란의 위란강에 주입하여 형질전환 쥐와 소의 생산

- 미수정란에 retrovirus 감염조건 확립
 - 생쥐의 미수정란에 retrovirus의 감염조건 확립
 - marker gene이 전이된 형질전환 생쥐의 생산
 - 소의 미수정란에 retrovirus의 감염조건 확립
- Human lactadherin 유전자가 전이된 소의 embryo와 형질전환 쥐의 생산
 - lactadherin 유전자가 전이된 소의 미수정란을 체외수정 후 대리모에 이식
 - 유전자의 정상발현 검색을 위한 lactadherin 유전자를 이용한 형질전환 쥐의 생산
 - human lactadherin 유전자가 전이된 형질전환 송아지 생산을 위한 수정란 이식
- Human lactadherin 유전자를 발현하는 형질전환 송아지의 생산

제 2 세부과제 : Human-milk lactadherin 유전자를 전이 및 발현시키는 retrovirus vector system의 개발

- 유선조직 세포에서 발현되게 design된 retrovirus vector의 구축
 - marker gene을 이용하여 유선세포에서 지속적으로 발현하는 promoter의 선택
 - 유선조직세포에 국한하여 발현하는 promoter의 cloning
- VSV-G based retrovirus vector producing cell의 개발
 - Lactadherin 유전자를 전이 및 발현시키는 retrovirus vector의 구축

- Virus-producing cell로부터 virus의 생산
- 외부 유전자의 발현을 통제할 수 있는 또 다른 retrovirus vector system의 구축
 - Tetracycline promoter의 통제하에 marker 유전자를 발현하는 retrovirus vector의 구축
 - Tetracycline promoter의 통제하에 lactadherin 유전자를 발현하는 retrovirus vector의 구축
- Retrovirus vector system의 bio-safety 검사
 - Helper virus의 생산여부를 조사
 - Reverse transcriptase의 activity의 존재 여부를 측정

제 3 세부과제 : Human Lactadherin 유전자의 Cloning

- Human lactadherin 유전자의 cloning
 - promoter 및 probe 제작
 - mRNA 분리
 - RT-PCR 과 사람 유선조직의 cDNA library screening
- Human lactadherin 유전자의 전이 및 발현에 대한 검정 방법의 확립 I
 - Lactadherin을 이용한 항체의 생산
 - Southern blot 방법의 확립
 - Lactadherin의 bioassay 방법 확립
- Human lactadherin 유전자의 전이 및 발현에 대한 검정 방법의 확립 II
 - Lactadherin 유전자의 전이 및 발현 검정
 - 우유중 성분분석
 - Lactadherin 유전자의 SNP 조사

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 제 1 세부과제 : VSV-G based retrovirus 용액을 미수정란의 위란강에 주입하여
형질전환 쥐와 소의 생산

- 미수정란에 retrovirus 감염조건 확립
 - Retrovirus vector를 미수정란의 위란강내에 주입한 후 수정하는 기법에 의해 난자는 배반포로 발달가능 하였으며 이것은 retrovirus vector를 이용한 형질전환 동물의 생산이 가능함을 나타냄
 - 유전자 전이 후 발달율이 주입하지 않은 군과 차이가 없는 것으로 나타남
 - 유전자 전이 후 수정란에서 외래유전자 도입을 조사한 결과 성공적인 외래유전자의 도입과 발현이 확인됨

- Human lactadherin 유전자가 전이된 소의 embryo와 형질전환 쥐의 생산
 - 유전자 도입된 수정란을 대리모에 이식한 뒤 외래유전자가 도입된 산자를 생산하였으며 각 장기에서 유전자 발현을 조사한 결과 유전자의 도입과 발현이 성공적으로 이루어졌음을 확인함
 - 유전자가 도입된 소의 수정란에서도 체외수정란과 비교시 발달율의 차이가 없었으며 외래유전자의 성공적인 도입을 확인하였음
 - 외래유전자가 도입된 배반포를 EM-grid방법으로 동결하였을때 높은 생존율을 나타냄

- Human lactadherin 유전자를 발현하는 형질전환 송아지의 생산
 - 총 18두에 36개의 수정란을 이식 후 50일경에서 임신유무를 직장검사를 통해서 확인한 결과 5두에서 임신이 확인되었으나, 90일경에 직장검사를 통해 임신을 감정한 결과 모두 유산됨

- 나. 제 2 세부과제 : Human-milk lactadherin 유전자를 전이 및 발현시키는 retrovirus vector system의 개발
 - 유선조직 세포에서 발현되게 design된 retrovirus vector의 구축
 - β -actin과 CMV promoter의 3' 위치에LacZ 유전자를 도입하여 pLN β Z와 pLNCZ retroviral vector를 재조합하였음
 - β -actin과 CMV promoter의 3' 위치에GFP 유전자를 도입하여 pLN β eGFP와 pLNCeGFP retroviral vector를 재조합하였음
 - 재조합 retroviral vector를 PA317에 transfection하여 virus만든 후 packing cell line에 감염시켜 virus producing cell line을 구축함
 - 각 promoter를 대상으로 virus에 대하여 titer를 측정한 결과 β -actin promoter가 가장 우수한 것으로 판명됨
 - WAP promoter를 이용하여 plasmid pLNWZ와 pLNWeGFP를 cloning함

- 쥐의 유방세포인 HC11에서 lactogenic hormone에 의한 LacZ 유전자의 조직 특이적 발현을 성공
 - WAP promoter에 의한 발현조절 양상을 확인하기 위하여 RT-PCR 실시한 결과 insulin, prolactin, hydrocortisone을 동시에 처리한 군에서 insulin을 단독으로 처리한 군보다 발현이 강하게 나타남을 확인하였음
- VSV-G based retrovirus vector producing cell의 개발
- Lactadherin 유전자를 전이 및 발현시키는 retrovirus vector의 구축
 - WAP promoter하에 lactadherin 유전자를 도입하여 lactadherin 유전자 발현 vector인 pLNWLtd를 재조합하였음
 - Lactogenic hormone에 의한 WAP promoter와 lactadherin 유전자의 조직 특이적 발현을 유도한 결과 lactogenic hormone의 존재하에서 우월하게 발현함을 확인함
 - Virus-producing cell로부터 virus의 생산
- 외부 유전자의 발현을 통제할 수 있는 또 다른 retrovirus vector system의 구축
- Tetracycline promoter의 통제하에 marker 유전자와 lactadherin 유전자를 발현하는 retrovirus vector를 구축하였음
 - Tetracycline promoter의 통제하에 lactadherin 유전자를 발현하는 retrovirus vector system의 구축 완료
- Retrovirus vector system의 bio-safety 검사
- Retrovirus가 infection된 표적세포와 transgenic mouse의 혈액을 이용하여 2차 감염 test를 수행한 결과 이들 sample에 helper virus가 없음을 확인
 - Retrovirus가 infection된 표적세포에서 reverse transcriptase의 activity가 측정되지 않았음

다. 제 3 세부과제 : Human Lactadherin 유전자의 Cloning

- Human lactadherin 유전자의 cloning
- Human lactadherin 유전자를 cloning하기 위하여 primer 제작함
 - Human lactadherin 유전자를 두부분으로 cloning하기 위하여 RNA 추출후 PCR을 통해 증폭한뒤 재조합시켜 lactadherin cDNA clone을 완성함
 - Clone된 lactadherin 유전자의 염기서열을 분석한 결과 67, 454, 286, 329, 1330 번째 base에서 변이가 발견되었으며 lactadherin 유전자의 SNP를 통하여 유전자

의 다형성 유무를 확인함

- Human lactadherin 유전자의 전이 및 발현에 대한 검정 방법의 확립 I
 - Lactadherin을 정제하는 방법으로는 효율성이 높으면서 간단한 E. coli에서의 발현을 채택하였으며 따라서 E. coli 발현 vector를 만들었고 이를 이용하여 단백질을 분리한 뒤 항체 생산을 위한 항원으로 사용하였음
 - E. coli에서 발현시킨 lactadherin을 토끼에 접종하여 항체를 생산해냄
 - 형질전환 동물을 확인하는데 이용될 Southern blot 방법을 확립함

- Human lactadherin 유전자의 전이 및 발현에 대한 검정 방법의 확립 II
 - Northern blot과 RT-PCR을 이용하여 lactadherin 유전자의 전이 및 발현을 검정함
 - 우유중 성분을 SDS-PAGE와 Western blot으로 분석한결과 lactadherin이 human milk mucin에 결합되어 있는 단백질을 밝혀냄.
 - 2D-gel electrophoresis를 실시한 결과 human lactadherin의 M.W값과 pI값 (6.1) 확인할 수 있었음
 - 한국여성의 lactadherin 유전자의 SNP를 조사한 결과 백인에 비해 Ser이 많이 존재하는 것으로 밝혀냄

2. 연구개발 활용에 대한 건의

본 연구에서 도출된 결과들과 개발된 신기술들을 다음과 같은 분야에서 폭넓게 활용될 것이므로 금후 학회발표를 비롯하여 다방면으로 공개하여 유사연구에서 이용토록 해야한다고 본다.

- 가. 외래유전자를 난자내에 도입하려고 시도하는 모든 연구
- 나. 형질전환동물을 생산하고자 하는 모든 연구와 산업분야
- 다. Animal bioreactor system을 개발하고 biosubstances를 동물체에서 생산하고자 하는 모든 연구와 산업분야
- 라. 유전자 재조합에 관련된 연구 및 산업활동분야
- 마. 동물 수정란의 이용효율을 제고하고자 하는 모든 연구 및 산업분야
- 바. 사람의 유전자치료분야
- 사. 형질전환 가축생산의 기초기술분야

SUMMARY

I. Title

Retrovirus vector system-mediated production of transgenic mice and cattle secreting human lactadherin in the milk

II. Goals and significance of this research project

In spite of rapid progress of medicine, there are still numerous diseases that can not be prevented by modern medical technologies. Among such diseases, rotavirus-mediated diarrhea is one of the most devastating ones that should be overcome in near future. Throughout the world, more than one hundred and thirty million children under five years old are infected annually, twenty million of them are suffering from diarrhea, and six hundred thousand children are died of the disease eventually. There are no significant difference between developed countries and developing countries in terms of incidence of this disease, and generally it has been known that the status hygiene is not an important factor affecting the incidence and that most preschool children are infected at least once with this virus. Remarkably, the children of breast feeding, however, are rarely infected with this virus, resulting in low incidence of diarrhea, respiratory disease and middle ear infection, etc. This is due to lactadherin, a milk component, inhibits reproductive cycle of the rotavirus. Therefore, it is reasonable to believe that enough feeding of the lactadherin can prevent rotavirus-mediated diarrhea. In the aspect of animal husbandry industry, mass production of lactadherin from the bioreactor employing genetic engineering techniques contributes not only tremendous increase in industrial revenue but also human welfare eventually.

The ultimate objective of this research is production of transgenic bovine secreting human lactadherin through the milk. To accomplish this goal, we first build up essential knowledge and techniques from the transgenic mouse production, then the research will be progressed to the level at which the advanced bio-engineering techniques can be directly applied to the industry.

III. Contents and scope of the project

The final goal of this study was production of transgenic mice and cattle secreting human lactadherin through milk. To accomplish the goal, the project was subdivided into three parts. The first, second and third subdivisions were 'Production of transgenic mice and cattle by injecting concentrated VSV-G based retrovirus vector stock into the perivitelline space', 'Development of retrovirus vector system transferring and expressing the human lactadherin gene', and 'Cloning of human lactadherin gene', respectively. The detailed are described as follows.

Part1 : Production of transgenic mice and cattle by injecting concentrated VSV-G based retrovirus vector stock into the perivitelline space

- Establishment of optimum condition for retroviral infection to the oocytes
 - How to infect the mouse oocytes with highest efficiency?
 - Production of transgenic mice carrying the marker genes
 - Application of accumulated knowledge to the infection of bovine oocytes with retroviral vectors

- Production of transgenic mice and bovine embryos with human lactadherin genes
 - In vitro fertilization of bovine oocytes carrying human lactadherin genes
 - Production of transgenic mice with human lactadherin genes:
to accumulate of basic knowledge and techniques for the detection of human lactadherin gene expression
 - Transfer of bovine embryos with human lactadherin genes to the surrogate mothers

- Production of transgenic calves expressing human lactadherin genes

Part2 : Construction of retrovirus vector system for the transfer and the expression of the human-milk lactadherin genes

- Construction of retrovirus vector designed to transfer and to express marker

- gene in the mammary gland-derived cells
- Selection of the best promoter expressing constitutively.
 - Cloning of mammary gland-specific promoter
- Construction of VSV-G-based virus-producing cells whose progeny viruses are designed to transfer and express human lactadherin
 - Construction of retrovirus vector carrying lactadherin gene cloned by the 3rd part of the project
 - Production of virus vector from the virus-producing cells
 - Construction of another retrovirus vector system designed to transfer and to express foreign genes in a controllable manner
 - Construction of retrovirus vector expressing marker gene under the control of tetracyclin promoter
 - Construction of retrovirus vector expressing human lactadherin gene under the control of tetracyclin promoter
 - Evaluation of retrovirus vector system in terms of bio-safety
 - Determination of helper virus production
 - Reverse transcriptase assay

Part3:Cloning of Human Lactadherin Gene

- Cloning of human lactadherin gene
 - Primer and probe construction
 - Extraction of mRNA
 - RT-PCR and cDNA library screening from human mammalian gland
- Establishment of analytical methods for the transfer and the expression of human lactadherin gene (I).
 - Production of antibody using lactadherin
 - Establishment of Southern blot method
 - Establishment of bioassay method for lactadherin
- Establishment of analytical methods for the transfer and the expression of human lactadherin gene (II).

- Analysis for the transfer and the expression of lactadherin gene
- Analysis for components of milk
- SNP analysis for lactadherin gene

IV. Results and Suggestions for Applications

Part 1: Production of transgenic mice and cattle by injecting concentrated VSV-G based retrovirus vector stock into the perivitelline space

- Establishment of optimum condition for retroviral infection to the mouse oocytes
 - Oocytes injected with concentrated retrovirus stock into perivitelline space developed to blastocysts, indicating the optimistic prospect of this system in transgenic animal production
 - In terms of embryo development, there was no significant difference between injected oocytes and un-injected control oocytes
 - Successful transfer and expression of the foreign gene were detected from the embryos

- Production of transgenic mice and bovine embryos with human lactadherin genes
 - Transgenic mice were produced
 - Detections of existence and expression of the foreign genes were confirmed from the various organs of the transgenic mice
 - In terms of bovine embryo development, there was no significant difference between injected oocytes and un-injected control oocytes
 - Successful transfer and expression of the foreign gene were detected from the bovine embryos
 - High viability of the bovine blastocysts carrying foreign genes were observed from EM-grid freezing

- Production of transgenic calves expressing human lactadherin genes
 - Among 18 surrogate cows transferred with 36 bovine transgenic embryos, 5 were determined to be pregnant at 50 days of gestation. At

90th day of pregnancy, however, rectal palpation showed miscarriage of all five pregnant cows

Part2:Construction of retrovirus vector system for the transfer and the expression of the human-milk lactadherin genes

- Construction of retrovirus vector designed to transfer and to express marker gene in the mammary gland-derived cells
 - Construction of pLN β Z and pLNCZ designed to express E.coli LacZ gene constitutively under the control of β -actin promoter and CMV promoter, respectively
 - Construction of pLN β eGFP and pLNCeGFP designed to express GFP gene under the control of β -actin promoter and CMV promoter, respectively
 - Construction of VSV-G based virus-producing cells using PA317 and 293mGPHy packaging cells
 - Between two promoters, β -actin promoter was better in expression
 - Cloning of mammary gland-specific WAP (whey acidic protein) promoter
 - Using WAP promoter, retrovirus vector plasmids, pLNWZ and pLNweGFP was constructed
 - In HC11 mouse mammary gland cells, inducible expression of LacZ gene under the WAP promoter in response to the lactogenic hormone
 - The highest activity of the WAP promoter was observed when the cells were treated with the combination of insulin, prolactin and hydrocortisone

- Construction of VSV-G-based virus-producing cells whose progeny viruses are designed to transfer and express human lactadherin
 - Construction of retrovirus vector carrying lactadherin gene under the control of WAP promoter.
 - From the VSV-G-based retrovirus vector system, successful production of retroviruses transferring human lactadherin gene
 - Using reverse transcriptase assay, lactogenic hormone-inducible expression of the lactadherin gene under the control of the WAP promoter was confirmed

- Construction of another retrovirus vector system designed to transfer and to express foreign genes in a controllable manner
 - Construction of retrovirus vector expressing marker gene or human lactadherin gene under the control of tetracycline promoter
 - Confirmed tetracyclin-controllable expression of both genes
- Evaluation of retrovirus vector system in terms of bio-safety
 - No helper virus was detected from the 2ndly infection test of target cells and blood cells of transgenic mice.
 - No reverse transcriptase activity was detected from the target cells infected with retrovirus vectors

Part3: Cloning of Human Lactadherin Gene

- Cloning of Human Lactadherin Gene
 - Selection of primers for the cloning of human lactadherin gene.
 - Separation of human RNAs, their amplification of two partial fragments by PCR followed by their recombination, and completion of the full-length cloning of human lactadherin cDNA gene.
 - Finding on the mutation of the bases at 67, 454, 286, 329, and 1330 from the DNA sequencing analysis of the cloned lactadherin gene, and confirmation of its polymorphism by the presence of the SNPs.
- Establishment of analytical methods for the transfer and the expression of human lactadherin gene (I).
 - Establishment of an efficient expression system in E. coli for the purification of lactadherin, thus, construction of an E. coli expression system in a vector and purification of the protein, and use of the antigen for the production of the antibody.
 - Production of polyclonal antibodies from the rabbits injected with the proteins expressed in E. coli.
 - Establishment of Southern blot for the identification of transgenic animals.
- Establishment of analytical methods for the transfer and the expression of human lactadherin gene (II).

- Establishment of analytical methods for gene transfer and expression by Northern and RT-PCR.
- Finding by SDS-PAGE and Western that lactadherin is a musin-associated molecule.
- Confirmation of MW and pI of human lactadherin by 2D electrophoresis.
- Presence of additional serines in the lactadherin gene by SNP analysis from Korean women compared with white women.

2.PropositionforResearch,DevelopmentandApplicationoftheResults

The results and the technologies derived from our study might be applied in the various following areas, and can be opened in public including scientific meetings and also should be followed in similar studies in the future.

1. All the studies where the introduction of foreign DNA into eggs are attempted.
2. Researches and industries for the production of transgenic animals.
3. Researches and industries for the development of bioreactor system where the production of biosubstances in animals are expected.
4. All researches and industries for genetic recombinations.
5. Researches and industries where the increases in efficiency of the utilization of animal embryos are necessary.
6. Human gene therapies.
7. Basic science and technology for the production of transgenic livestock.

여 백

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	19
1. Objectives of research	19
2. Necessity of research	19
3. Range of research	24
Chapter 2. Current status of technology development	26
1. International/domestic status and the point at issue	26
2. Future prospect	28
Chapter 3. Research scopes and results	29
1. Research scopes	29
2. Results	37
Chapter 4. Achievement and outward contribution	93
1. Achievement	93
2. Outward contribution	94
Chapter 5. Application plan	95
Chapter 6. References	96

여 백

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	19
제 1 절	연구개발의 목적	19
제 2 절	연구개발의 필요성	19
제 3 절	연구개발의 범위	24
제 2 장	국내외 기술개발 현황	26
제 1 절	국내·외 관련기술의 현황 및 문제점	26
제 2 절	앞으로의 전망	28
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	29
제 1 절	연구개발 수행내용	29
제 2 절	연구결과	37
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	93
제 1 절	연구개발의 목표 달성도	93
제 2 절	대외 기여도	94
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	95
제 6 장	참고문헌	96

여 백

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발의 목적

본 연구의 목적은 retrovirus vector gene transfer system을 이용하여 human lactadherin을 milk를 통해 분비하는 형질전환 쥐의 생산을 통하여 필요한 지식과 기술을 축적한 다음, 최종적으로는 human lactadherin을 대량생산하는 형질전환 소를 생산하여 첨단 생명공학 기술을 산업적으로 응용 가능한 수준까지 개발 발전시키는 것이다.

제 2 절. 연구개발의 필요성

Rotavirus는 유아기의 어린이들에게 주로 감염되어 주로 소장 세포에서 번식하며 급성설사를 일으키는데 이로 인하여 때때로 심한 탈수증과 함께 급속히 성장하는 유아의 균형적인 영양공급을 방해함으로써 많은 영양소를 필요로 하는 유아들의 발육과 성장, 그리고 심하면 생명에 커다란 영향을 미치게 된다. Rotavirus성 설사는 특히 겨울철에 가장 많이 발생하는데 바로 이 시점이 유아의 설사 증세가 절정을 이루는 때이다. 세계적으로는 rotavirus에 의하여 5세 이하의 어린이가 연간 약 1억3천명이 감염되고 약 2천만 정도가 설사로 고통을 받으며 그 중에서 60만 정도의 사망자가 나오고 있다. 일반적으로 rotavirus성 설사는 위생상태와는 상관없이 어느 나라를 막론하고 선진국과 개도국에서 비슷한 정도가 발생하고 있다. 따라서 대부분의 취약한 유아들은 이 rotavirus에 한번이상 감염된다고 볼 수 있는데 일반적인 경구용 탈수방지법으로는 사망률이 줄어들지 않는다. 최근 미국의 한 표본조사에 의하면 어린이들로부터 채집한 변의 23%가 rotavirus에 대하여 양성인 것으로 나타났다. 이 같은 사실은 이 바이러스가 꾸준한 관찰대상이 되어야 함은 물론 세계 어린이들에 대한 rotavirus로부터의 면역이 필요함을 강조하는 것이라고 미국의 질병방어 및 통제센터는 지적하고 있다. 미국의 경우는 연간 5만명 정도의 어린이가 rotavirus와 관련된 질병으로 입원치료를 받는데 이 수치는 5세가 될 때까지 78명의 어린이 중 1명이 입원치료를 받는 셈이 된다. 따라서 FDA는 이 같은 문제의 해결을 위해 98년 Rotashield라는 경구용 백신을 승인하였는데 원숭이를 이용한 백신시험에서 약 50%의 case에서 설사 방지효과가 있었다. 그럼에도 불구하고 rotavirus에 의한

설사는 3-24 개월의 유아에서 집중 발생하여 높은 사망률을 야기하는데 이때는 면역 기능이 활성화되지 않기 때문에 백신의 이용을 어렵게 한다.

한편 모유를 먹고 자란 아이는 설사 뿐만 아니라, 호흡기 질환, 중이염 등에 잘 감염되지 않는다는 사실은 오랫동안 알려져 있었다. 하지만 모유의 어떤 성분들이 이 같은 보호 작용을 하는지는 오랫동안 알려지지 않았고 다만 IgA가 중요한 역할을 할 것으로 추정하였다. 그러나 최근의 연구결과(Newburg et al., 1998)에 의하면 모유 성분 중에서 lactadherin이 rotavirus가 다른 분자와 결합하는 능력과 감염성을 약화시켜서 그들의 번식을 억제한다는 사실을 밝혀냈다. 따라서 유아 설사의 대부분의 원인이 rotavirus에 의한 것이었다는 사실을 상기하면 **lactadherin을 충분히 섭취한다면 rotavirus에 의한 설사를 예방할 수 있다**는 결론에 도달할 수 있다.

축산업에서 자축에게 큰 피해를 주는 Rotavirus의 감염은 특히 양돈업에서는 자돈의 설사, 소에서는 송아지의 설사로 인한 폐사의 중요한 원인으로 지적되고 있다. 이러한 관점에서 볼 때 현재의 생명공학적인 기술을 이용한 lactadherin의 대량 생산은 국민의 보건뿐만 아니라 가축의 생산성 향상에 기여하여 경제적으로도 크다란 가치를 창출할 수 있다고 볼 수 있다. 이에 본 연구에서는 **lactadherin이라는 고부가가치를 가진 단백질을 젖을 통하여 생산하는 형질전환 쥐를 생산하고 이러한 기술을 바탕으로 대량생산의 최종목적인 형질전환 소를 생산하고자 하였다.** 이를 위한 유전자 전이 방법으로는 본 연구진이 최근에 개발한 새로운 retrovirus vector system을 이용하였다

1. 기술적 측면

Lactadherin은 모유의 乳蛋白質의 하나인 mucin과 결합되어 분비되는 당단백질의 하나로 분자량이 46 Kd이고, 지방구막 속에 연합되어 있다. 인간의 유선과 인간의 유방암 세포에서도 발현되며 한때는 BA46이라고 불려졌다. 이 단백질은 3개의 영역으로 구성되어 있는데 하나는 EGF와 비슷한 영역이고 나머지는 응혈효소 V 및 VIII와 유사한 영역들이다. 인간, 소, 그리고 쥐의 lactadherin의 아미노산 배열들을 비교 분석한 결과는 아미노산 RGD(Arg-Gly-Asp)가 진화과정에서 중간에 잘 보존되어 있음을 보이고 있다. 또한 lactadherin의 378개의 아미노산 배열과 1.2kb의 cDNA sequence가 알려져 있다. Lactadherin과 뮤신은 분만 직후(15일 까지)의 초유에서 그 함량이 그 이후(15-90일)에서 보다 현저히 높다. Lactadherin은 모유에 평균적으로 93 $\mu\text{g/ml}$ 정도가 존재하고 pH 4이하의 위산에서 변성되지 않고 자연상태를 유지한다. 이와 같은 생화학적 특성은 본 연구에서 생산하고자 하는 형질전환 소의 우유에 함유된 human lactadherin을 정제할 때 매우 편리해진다. 즉 우유단백질의 약 85%는 여러 종류의 casein인데 이들은 모두 pH 4.6에서 침전되므로 상층액(supernatant)에서 비교적 간

단하게 정제를 할 수 있게 한다. 또한 lactadherin은 다른 약품들과는 달리 대량 생산 후 이 단백질을 이유식이나 분유에 같이 섞어서 간편하게 복용시킬 수 있다는 장점을 지니고 있다.

형질전환 가축의 생산에 있어서 가장 큰 문제점은 지극히 낮은 성공률인데 이것의 가장 주된 원인은 동물의 胚에 효과적으로 외부 유전자를 전이시키는 방법의 부재에 있다고 말할 수 있다. 본 연구의 사람 lactadherin을 생산하는 형질전환 소를 생산하는데 있어서 낮은 유전자 전이율을 극복하기 위하여 Chan 등(1998)이 발표한 방법을 사용할 예정이다. 이 방법의 특징은 농축된 vector retrovirus를 제 2 감수분열 중기(metaphase II or MII phase) 상태의 미수정란의 위란강(perivitelline space)에 주사하여 유전자를 전이시키는 것이다. Chan 등(1998)은 이 방법을 통하여 100%의 효율성으로 형질전환 소를 생산하는데 성공하였다.

MI phase의 미수정란을 사용하는 이론적 근거는 다음과 같은 retrovirus의 특성과 관계가 있다. 즉, HIV를 제외한 대부분의 retrovirus에 감염된 표적세포는 그 세포가 세포분열을 할 때만 retrovirus의 RNA로부터 역전사된 DNA가 표적세포의 genome에 삽입된다. 이는 세포분열의 중기 때, 즉 핵막이 소실될 때 세포질에서 역전사된 DNA가 표적세포의 genome에 접근할 수 있기 때문으로 추측된다. 보다 구체적으로 말하면 표적세포가 metaphase일 때 virus의 RNA로부터 역전사된 DNA가 표적세포의 genome에 접근할 수 있는 확률이 가장 높다고 할 수 있다. 일반 체세포와 비교하여 미수정란의 MII phase 때가 핵막이 완전히 소실되는 기간이 가장 긴 것으로 알려지고 있다.

위란강에 virus를 주입하는 것은 미수정란이 virus에 감염되는 것을 막는 투명대 문제를 해결하기 위함인데, 소 난자의 위란강의 부피가 280 picoliter ($2.8 \times 10^{-7} \text{ cm}^3$)이고 위란강에 약 10 picoliter의 vector virus 액을 주사한다고 가정하면 적어도 1 ml 당 10^9 colony forming unit 만큼 농축된 virus stock을 사용하여야 확률적으로 난자당 1개의 virus가 주입되는 셈이다. 그러나 현재 사용되고 있는 대부분의 retrovirus vector system에서는 이 만큼의 고농도의 virus stock을 얻을 수 없다. 그 이유는 retrovirus를 포장하는 envelope protein의 instability 때문에 초원심 분리와 같은 물리적인 방법으로 virus의 농도를 높이는 데는 한계가 있기 때문이다(Savatier *et al.*, 1990).

Retrovirus stock의 저농도에 관계된 문제는 수년 전에 보고된 VSV (vesicular stomatitis virus) G glycoprotein을 기존의 쥐의 leukemia virus envelope gene으로 대체한 새로운 retrovirus vector system (Burns *et al.*, 1993)의 등장으로 해결할 수 있다. 이 virus의 특징은 첫째, 이 virus는 pantropic으로써 어류류 (Lin *et al.*, 1994) 포함하여 거의 모든 동물세포를 감염시킬 수 있고 둘째, virus의 감염도 (infectivity)에 영향을 줌이 없이 virus stock을 1,000배 이상까

지 농축시킬 수 있다는데 있다. 따라서 이 virus를 이용할 경우 우리가 실험하고자 하는 거의 모든 종의 세포에 대해 효율적으로 gene transfer가 가능하다고 할 수 있다. 1994년 본 연구자가 미국에서 california 대학의 Burns 박사 group과 공동연구를 추진할 때 VSV pseudotype retrovirus vector system을 사용해 본 결과, 이 system에서 생산된 농축되기 전의 virus는 소의 cell에 대한 감염도가 일반 retrovirus system에서 생산된 virus보다 약 10~350배 이상 높음을 발견하였다. 따라서 VSV G pseudotyped retrovirus system에서 수확한 virus를 약 1,000배 정도 농축하여 소의 胚를 감염시켜 유전자를 전이하고자 할 때, 지금까지의 retrovirus를 이용한 형질 전환 동물의 생산에 있어서 최대의 단점이었던 mosaicism을 최소화할 수 있으리라 생각된다. 또한 이 virus system을 유전자 치료에 응용할 경우, 지금까지의 retrovirus system에서 생산된 virus로는 감염이 저조한 세포들에 대해 보다 효율적으로 유전자를 전이시킬 수 있다고 생각된다. 그러나 이상에서 본 바와 같이 VSV pseudotype retrovirus vector system의 이용성은 다른 어느 virus system보다 우수함이 자명하나 불행히도 이 virus system은 미국 California 주에 위치한 Viagene이라는 회사가 특허권을 갖고 외부로 유출시키지 않고 있다. 이에 본 연구진은 4년 전부터 이 virus vector system의 개발을 시도하여 최근에 독자적인 개발을 완료하였다. 따라서 본 연구진이 개발한 새로운 retrovirus vector system을 이용하는 본 연구과제의 수행으로 축적된 지식과 기술은 장차 형질전환 가축의 생산효율성을 제고하는데 크게 응용되리라 사료된다.

2. 경제·산업적 측면

전 세계적으로 유아들의 rotavirus의 감염으로 인한 직접 간접의 피해는 우리가 생각하는 것보다 훨씬 크며 우리 나라에서도 그 규모가 상당하리라 짐작된다. 전 세계적으로는 약 60만 이상의 유아들이 이 rotavirus로 인하여 죽어가고 있고 감염되는 숫자는 수억에 해당되며 이를 예방하는데 더 많은 수가 노력하는 것을 고려하면 생명공학적으로 lactadherin의 대량 생산은 그 산업적인 효과가 매우 크다고 아니 할 수 없다. 또한 離乳 前段階의 동물에도 비슷한 효과가 기대되기 때문에 lactadherin의 대량 생산과 보급으로 rotavirus로부터 유아뿐만 아니라 동물까지 보호할 수 있는 새로운 지평을 열 수 있다. 또한 국내 생명과학의 발전과 더불어 첨가 약품으로 수출할 경우 많은 외화를 벌어들일 수 있을 것으로 기대된다. 또한 lactadherin은 다른 약품들과는 달리 대량 생산후 이 단백질을 이유식이나 분유에 같이 섞어서 간편하게 복용시킬 수 있다는 장점을 지니고 있다.

현재 우리 나라에서 가축의 경제성을 개선시키고 농가의 소득증대를 위하여 유전 육종분야, 번식 생리분야, 영양 생리분야 등 여러 분야에서 다각적으로 노력하고 있

다. 그러나 축산업이 처한 여러 현안을 고려해 볼 때 새로운 해결책을 모색하여야 할 때가 온 것은 분명하다. 가축의 생산성 향상을 단기간 내에 도모하기 위해서는 앞에서 언급한 분야를 병행하면서 최첨단 생명공학 기법을 도입하는 것이 최선책이라 사료된다. 이미 여러 선진국에서는 자국 축산업의 경제성을 향상시키기 위해 그들만의 생명공학 기법을 개발하고 그 기술 도입에 관한 연구가 활발하게 추진되고 있다. 이와 같은 상황에서 금후 우리 농축산이 살아남는 길은 자국의 농축산물의 생산성을 실질적으로 향상시키면서 부가가치가 높은 산물을 생산하기 위한 첨단 생명공학 기술을 개발하고 그것을 실용화하는 것이 좋은 대안으로 사료된다. 이러한 시대적 요구 등에 부합하기 위하여 본 연구에서는 부가가치와 시장성이 유망한 lactadherin을 가축이 생산하게 하여 농축산업의 경제성을 높여 실용화하는데 그 목적을 두었다.

3. 사회·문화적 측면

여러 가지 의학의 발달과 복제 양인 Dolly의 탄생 등으로 최근 전 세계적으로 생명공학과 그에 따른 여러 유사학문들이 각광을 받고 있다. 그러나, 이러한 세계적인 추세에 호응을 하는 것은 일부 인기 학문들 즉, 유전공학, 의학 등에 한해서 가능한 것으로 인식되어져 왔다. 만약, 이러한 우리의 시도가 성공을 거둔다면 농업 분야에서도 세계첨단을 다투는 성과를 거두었다는 사회적인 쾌거를 이룰 수 있을 뿐만 아니라 우리 나라를 비롯한 농업후진국들에게 커다란 희망을 안겨줄 수 있을 것이라 생각한다. 또한, 농업분야를 식품생산 위주의 산업에서 탈피시켜 고소득을 보장하는 첨단 벤처 산업으로 발전시킬 수 있다는 점은 사회, 문화적으로 매우 바람직한 것으로 사료된다. 본 연구에서 얻어지는 lactadherin의 유전자를 포함한 retrovirus vector system은 체세포 전환 동물을 생산하는 것과 같은 최첨단 유전자 전이 방법에 접목되어 곧바로 단백질의 대량 생산에 응용될 수 있다.

제 3 절. 연구개발의 범위

본 연구는 retrovirus vector gene transfer system을 이용하여 human lactadherin을 milk를 통해 분비하는 형질전환 쥐의 생산을 통하여 필요한 지식과 기술을 축적한 다음, 최종적으로는 human lactadherin을 대량생산하는 형질전환 소를 생산하여 첨단 생명공학 기술을 산업적으로 응용 가능한 수준까지 개발 발전시키고자 실시하였으며, 그 연구개발의 범위는 다음과 같다.

- 가. 농축된 VSV-G based retrovirus 용액을 미수정란의 위란강에 주사하여 형질전환 쥐와 소의 생산
 - 1) 생쥐의 미수정란(MII phase)의 위란강에 농축된 virus 용액을 미세주입 하는 방법의 확립
 - 2) 1)에 의해 축적된 지식 및 기술을 바탕으로 형질전환 쥐의 생산
 - 3) 소의 미수정란(MII phase)의 위란강에 농축된 virus 용액을 미세주입 하는 방법의 확립
 - 4) 1), 2), 3)에 의해 축적된 지식 및 기술을 바탕으로 형질전환 송아지의 생산, 사양 및 번식
- 나. Human milk lactadherin 유전자를 전이 및 발현시키는 retrovirus vector system의 개발
 - 1) Retrovirus vector system의 구축
 - 가) CMV (Cytomegalo Virus) promoter, β -actin promoter, 혹은 WAP (whey acidic protein) promoter 통제하에 *E. coli* LacZ 혹은 GFP (Green Fluorescence Protein) marker gene을 도입한 retrovirus vector의 구축
 - 나) MCF (쥐의 유방세포) cell과 MAC-T (소의 유방세포) cell을 이용하여 연구목적에 가장 적합한 retrovirus vector상의 internal promoter의 선택
 - 다) 나)에서 결정한 retrovirus vector의 internal promoter 하에 human lactadherin gene을 도입한 retrovirus vector의 구축
 - 라) 본 연구진이 이미 개발 완료한 VSV-G based packaging cell과 다)에 개발한 retrovirus vector를 이용한 retrovirus-producing cell의 개발
 - 2) Retrovirus vector system의 생물학적 안전성(bio-safety) 검사
 - 가) Reverse transcriptase assay등을 통하여 vector virus에 의해 외부 유전자가 전이된 세포와 형질전환동물로부터 virus의 생산여부 조사
 - 3) 타 연구자들의 선행된 연구 보고에서 나타난 WAP promoter의

- 발현상의 여러 문제점을 해결하기 위한 새로운 vector system의 개발
 - 가) Inducible promoter인 tetracycline-controllable promoter 통제하
에 human lactadherin gene을 도입한 retrovirus vector의 구축
 - 나) 위 가)의 vector를 생산하는 retrovirus-producing cell의 개발
 - 다) *in vitro* 상에서 tetracycline의 induction 여부에 따른 human
lactadherin gene의 발현 확인

다. Human lactadherin 유전자의 cloning 및 발현분석

- 1) Lactadherin 유전자 cloning
 - 가) Primer(20 base pairs each) 및 probe 제작
 - 나) mRNA 분리
 - 다) RT PCR과 사람의 乳腺組織의 cDNA library screening을 이용
한 cloning
- 2) Lactadherin 정제방법 확립 및 항체 생산
 - 가) 모유의 lactadherin 정제
 - 나) 토끼 항체 생산
- 3) DNA 분석
 - 가) Southern blot
- 4) Lactadherin 발현 분석 (유선 및 우유중)
 - 가) Northern blot
 - 나) Western blot
 - 다) Immunocytochemistry
- 5) Lactadherin의 bioassay

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 국내·외 관련기술의 현황 및 문제점

형질전환가축의 생산에 현재 이용되고 있는 기술은 DNA의 전핵 미세주입, 핵치환을 이용한 cloning, 그리고 retrovirus vector system과 같이 크게 3가지가 있다. 이들 3가지 방법 중에서 핵치환을 이용한 cloning 기술은 가장 최근의 기술로 Wilmut (1997)에 의해 embryonic cell이 아닌 분화가 끝난 유방조직 세포의 핵을 미수정란의 핵과 치환하여 Dolly라는 양을 탄생시킴으로써 세계적인 주목을 끌게 되었고, 그 후 Cibelli 등(1998)은 태아조직세포의 핵을 이식하여 성공적으로 송아지를 생산하는데 성공하였다. 최근에 와서는 국내 서울대학교 team에서도 젓소에 이어 한우의 cloning에 성공하였다. 그러나 이 방법의 단점으로 다음과 같은 점이 지적되어 지고 있다(Solter and Gearhart, 1999).

1. Cloning에 의한 방법으로 가축과 실험동물을 생산하려는 현재의 시도들에서 이 방법의 안전성이 아직까지 입증되지 못하고 있다. 그 이유는 대부분의 clone이 발생단계에서 죽거나 상당수가 출생후 사망하기 때문인데 최근에 일본에서 8 마리의 cloning된 송아지 중에서 4마리가 곧 사망하였다고 보고되었다. (Y. Kato *et al.*, 1998).
2. 핵의 reprogramming이 silent한 유전자의 새로운 발현과 DNA 생산의 개시, 그리고 염색체의 구조에 어떠한 영향을 미치는지에 대하여 알려진 것이 거의 없다.
3. 핵이 제거된 난자에 성숙된 세포의 핵(adult nucleus)이 주입되었을 때 어떠한 분자들이 어떻게 작용하는 지에 관하여는 아직 알려진 것이 없다.

한편, DNA의 전핵 미세주입 방법은 Palmiter 등(1982)이 최초로 성공한 가장 오래된 기술로써 현재까지 생산된 대부분의 형질전환 동물은 이 방법에 의해서이다. 그러나 현재까지 생산된 대부분의 형질전환 포유류 가축 중 경제성이 입증된 경우는 전세계적으로 아직까지 몇몇 경우에 불과한 실정이다 (Ebert *et al.*, 1991; Wright *et al.*, 1991; Carver *et al.*, 1993). 국내의 경우 생명공학 연구소의 이경광 박사 team과 유옥준 박사 team의 성공사례가 언론에는 많이 보도되었으나 수정란에 미세주입한 외부 DNA가 염색체 상에 존재하는 형질전환 가축을 개발했다는 학술지의 보고는 아직까지 미미한 실정이다. 전핵 미세주입에 의한 형질전환 포유류 가축의 생산에 있어서 이와 같은 기대 이하의 진척을 가져온 근본 원인을 요약하면 다음과 같다.

1. 동물 수정란의 효과적인 외부유전자 전이체계 (exogenous gene transfer system)의 부재
2. 대동물의 경우 수정란 구입 비용의 과다, 유전자 전이 후 수정란 이식을 위한 다수의 대리모(代理母) 확보, 대리모 임신기간 중 사양관리비 과다 지출.
3. 형질전환 가축을 생산한 후, 가축의 능력 검정 및 품종 고정에 따른 과다지출과 긴 소요기간
4. 특정 외래 유전자의 지속적인 발현(constitutive expression)으로 인한 형질전환 수정란의 임신중 사망, 또는 동물의 복합적인 생리적 부작용(Vize *et al.*, 1988; Ebert *et al.*, 1988).

Retrovirus의 감염에 의한 최초의 형질전환 동물의 생산은 Jaenisch 등에 의해 이미 1975년에 보고되었지만 아직까지 쥐 이외의 동물에서 retrovirus vector에 의한 성공적인 형질전환은 보고되지 않고 있다. 그 주된 이유는 有蹄類 동물의 embryonic cell에 감염성이 우수한 retrovirus vector system의 부재에 있다. 그러나 본 연구자는 기존의 mouse amphotropic leukemia virus가 아닌 Gibbon ape leukemia virus의 envelope으로 포장된 retrovirus vector를 이용하여 최초로 소의 수정란에 외부 유전자를 전이시키고 발현시켰으며 (Kim *et al.*, 1993), 그 후 이 vector virus를 생산하는 cell을 소 수정란의 위란강에 주입하여 수정란의 생존율 및 외부 유전자의 발현율을 현저히 상승시켰다 (Kim and Park, 1995). 가장 최근에 개발된 retrovirus vector system으로는 VSV (vesicular stomatitis virus) G glycoprotein을 기존의 쥐의 leukemia virus envelope gene으로 대체한 retrovirus vector system이 있다 (Burns *et al.*, 1993). 이 virus의 특징은 다음과 같다. 첫째, 이 virus는 pantropic으로써 어류를 (Lin *et al.*, 1994) 포함하여 거의 모든 동물세포를 감염시킬 수 있고 둘째, virus의 감염도 (infectivity)에 영향을 줌이 없이 virus stock을 1,000배 이상까지 농축시킬 수 있다는데 있다. 따라서 이 virus를 이용할 경우 어류를 포함하여 (Lin *et al.*, 1994) 우리가 실험하고자 하는 거의 모든 종의 동물 세포에 대해 훨씬 효율적으로 gene transfer가 가능할 것이다. 최근의 가장 고무적인 보고로는 Chan 등(1998)이 VSV-G based retrovirus vector system으로부터 생산된 농축된 virus를 metaphase II 상태인 소의 미수정란 위란강에 주사하여 100%의 transgenic 송아지를 생산하였다. 본 연구진은 최근에 이러한 retrovirus vector system을 자체적으로 개발하였고 쥐와 소의 미수정란을 대상으로 연구를 수행하였다.

제 2 절. 앞으로의 전망

형질전환 포유류 가축의 생산에 있어서 해결하여야 할 가장 시급한 문제는 지극히 낮은 생산율이다. 본 연구에서 형질전환 소의 생산에서 시도하고자 하는 새로운 전략, 즉 MII phase의 미수정란을 표적으로 하여 VSV-G based retrovirus vector system을 이용하여 외부유전자를 전이시키는 방법은 앞으로의 형질전환 가축을 생산하는 표준 방법이 될 수 있을 것이다. 특히 고농도의 농축이 가능한 본 연구진의 새로운 VSV-G based retrovirus vector system은 형질전환 포유동물의 생산에 뿐만 아니라 형질전환 조류, 나아가 형질전환 어류의 생산에도 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서 형질전환 소를 이용하여 생산하고자 하는 human milk lactadherin은 부가가치와 시장성이 매우 높을 뿐만 아니라 생화학적 특징상 우유로부터 분리 정제가 비교적 용이하고 또한 구강 투여가 가능하므로 상품화도 용이하다고 할 수 있다. 또한 lactadherin은 포유류 가축의 rotavirus성 설사의 예방에도 이용이 가능하다. 특히 타 가축에서도 본 기술이 활용 가능하므로 종돈산업에서 자돈의 설사를 완벽하게 방지할 수 있어 엄청난 경제적인 효과를 창출할 수 있다. 따라서 형질전환 젖소를 이용한 lactadherin의 대량생산은 국민 건강뿐만 아니라 축산업 농가의 획기적인 소득 증대에도 크게 이바지 할 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 연구개발 수행내용

1. 제 1 세부과제 : 농축된 VSV-G based retrovirus 용액을 미수정란의 위란강에 주입하여 형질전환 쥐와 소의 생산

가. 형질전환 쥐의 생산

1) 공시동물 및 사양조건

본 실험에 사용한 동물은 근교계 생쥐 C57BL/6 암컷과 CBA/N 수컷을 1 : 1로 교배시킨 후 생산, 사육된 4-5주령의 hybrid F1 암컷을 공란생쥐로 이용한다. 실험동물 사육실의 조건은 1일 점등시간 14시간, 온도 25℃, 습도 50%로 조정하고, 공기여과는 강제순환방식을 이용하며, 항생제가 첨가되지 않은 실험동물사료(제일제당, 한국)와 물을 무제한 급여한다. 깔짚은 1주일에 한번씩 교환하며, 사육 cage(대종기기, 한국)는 Germex(한국바이엘, 한국)로 소독한 후 건조시켜 사용하여 실험동물 사육을 위한 최적조건을 유지하였다.

2) 미수정란 위란강에의 virus 주입

6주령의 공시동물에 pm 7:00에 PMSG 5IU 투여후 48시간 뒤인 pm 7:00 에 hCG를 투여 한다. hCG를 투여한후 14-16시간째에 mouse oocytes(MII)를 외과적 방법으로 collection하여 CZB medium상에서 hyaluronidase를 첨가하여 oocyte의 cumulus cell을 denude 시킨 다음 1시간 incubation 시킨다. 이 난자에 RT-virus 9 μ l + dilution medium 1 μ l (1ml PBS + polyblem 10 μ l)를 위란강이 부풀고 세포질이 터지지 않도록 주의 하면서 주입한다. 미세조작은 30분 이내로 끝내고 1시간 가량 oocyte를 incubation 시켰다.

3) 체외수정 및 배 이식 (embryo transfer)

CBA/N male 8-9 주령의 정소상체 미부를 외과적 방법으로 채취하여 sperm을 1시간 30분 가량 incubation 시켜 수정능 획득을 시키고, 공배양하는 sperm의 양은 100만-200만으로 한다. 공배양 후 24시간 뒤 수정여부를 관찰한후 상실배 혹은 배반포기까지 배양한다. 상실배 혹은 배반포기의 난자는 외래 유전자 발현여부를 형광현미경 (GFP gene), X-gal staining (Laz gene) 및 PCR(Neo gene)로 검색하고 일부는 위임

신된 자성생쥐의 자궁각에 각각 5-10개씩 외과적으로 이식하여 임신을 유도하여 산자를 생산 하였다.

4) 외래유전자의 분석

대리모로부터 태어난 산자의 유전자 삽입 및 발현 여부는 생후 6~8주령 쥐의 꼬리 sample을 PCR : Southern, Northern, Western blots : X-gal staining, fluorescent microscopy 등으로 판별하였다.

나. 형질전환 소의 생산

1) 체외성숙

중점적으로 형질전환 소의 생산을 목표로, 소의 미수정란의 준비 및 MII phase 미수정란에의 농축된 virus의 주사 실험에 사용할 MII phase 미수정란은 도살장에서 구입한 난소로부터 채취한 난자를 18 시간 동안 maturation medium에 배양한 후 cumulus cell을 제거한 다음 위란강에 농축된 vector virus를 injection한다. MII phase 미수정란의 위란강에 농축된 virus의 주사는 앞의 쥐의 경우와 같은 방법으로 하였다.

2) 체외수정

위란강에 microinjection이 끝난 난자는 8 시간 후 maturation medium하에서 정액과 함께 24시간 동안 배양한다. 수정이 끝난 zygote는 CR1 + 10% FCS (Rosenkrans et al., 1991, 1993) 배양액 소적내(10 embryos/50 μ l)에서 6-7일 동안 배양한다. 그 중 일부의 수정란은 외부 유전자의 발현유무를 확인하는데 사용하고 일부의 수정란은 대리모에 수정란을 이식하는데 사용하였다.

3) 수정란 이식

Virus-producing cell이 injection된 수정란을 CR1 + 10% FCS drop에서 6-7일간 배양한 후, 8세포기가 된 胚를 synchronization된 대리모의 자궁에 비외과적 방법으로 수정란을 이식하였다.

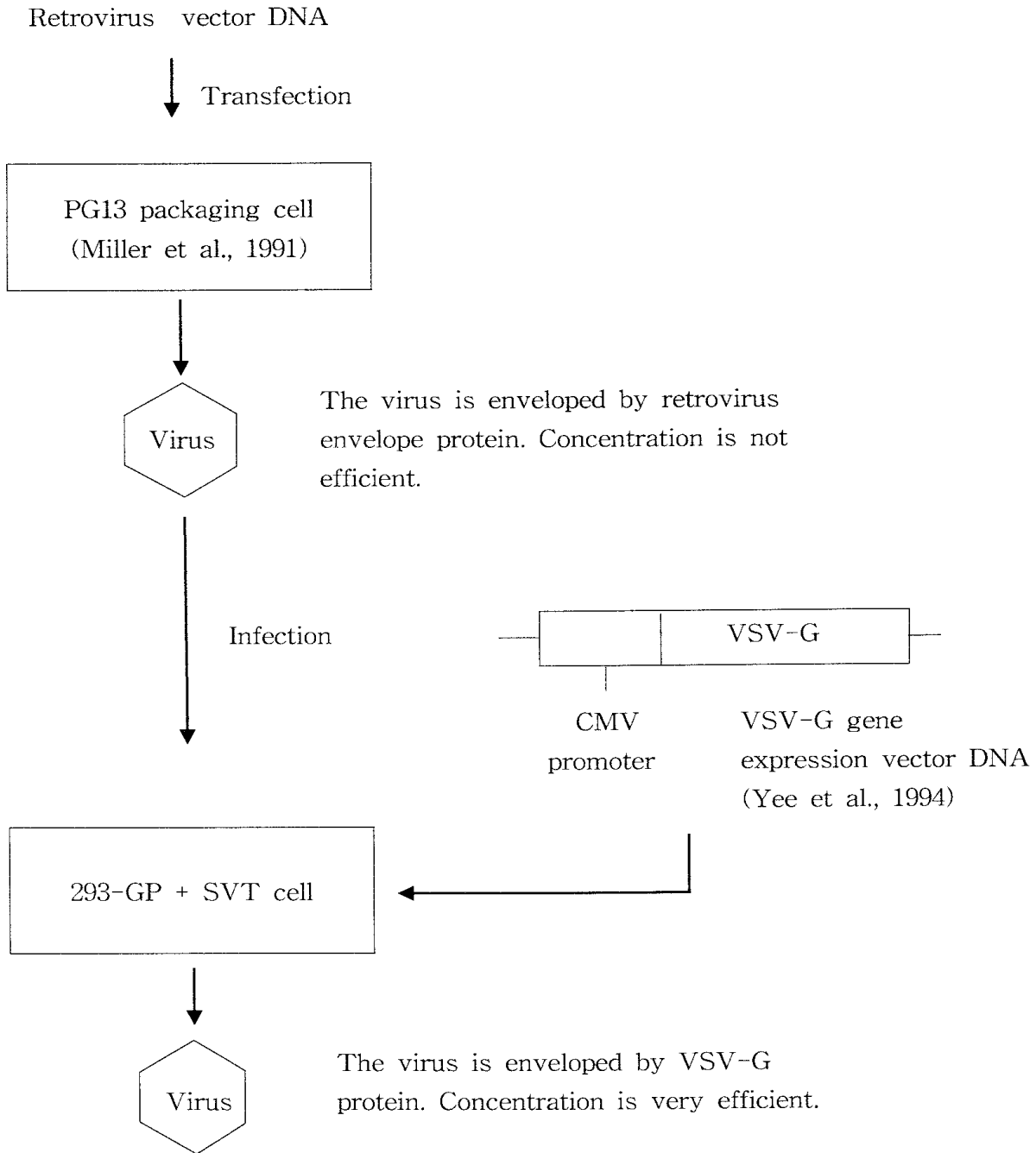
2. 제 1 협동과제 : Human-milk lactadherin 유전자를 전이 및 발현시키는 retrovirus vector system의 개발

가. Packaging cell

본 연구진이 4년에 걸쳐 최근에 개발을 완료한(unpublished) 293-GP+SVT cell을 packaging cell로 사용하였다. 원래 packaging cell은 retrovirus의 *gag-pol* 유전자와 생산되는 virus를 포장하는 envelope protein 유전자를 발현한다. 그러나 293-GP+SVT cell은 retrovirus의 *gag-pol* 그리고 *SV40 T antigen* 유전자를 발현하고 retrovirus의 envelope 역할을 하는 VSV-G protein 유전자는 발현하지 않으므로 엄밀한 의미에서 pre-packaging cell이라고 말할 수 있다. 293-GP+SVT cell에 VSV-G 유전자를 발현시키지 않게끔 한 이유는 VSV-G 유전자의 발현이 cytotoxic 하기 때문이다 (Burns et al., 1993; Yee et al., 1994).

나. Retrovirus-producing cell

Retrovirus를 생산하는 세포(retrovirus-producing cell)는 packaging cell에 retrovirus vector를 도입함으로써 만들었다. Retrovirus vector의 packaging cell에의 도입 방법은 infection을 이용하는 방법과 transfection을 이용하는 방법이 있는데 infection을 이용하는 방법이 훨씬 titer가 높은 것으로 보고되고 있다 (Hwang and Gilboa, 1984). 293-GP+SVT cell로부터 retrovirus-producing cell을 만드는 방법을 정리하면 다음과 같다.



다. Retrovirus vector의 construction

1) 본 연구진이 construction한 다음의 vector들과 VSV-G based packaging cell로부터 만들어진 virus를 이용하여 쥐와 소의 미수정란의 위란강에 virus를 injection하였다 (1차 연도 연구).

2) 우선 pLNCZ vector에서 CMV promoter를 whey acidic protein promoter로 치환한 vector (pLNWZ)를 construction한 다음, pLNCZ와 pLNβZ와 함께 각각 virus를 만들어 MCF (쥐의 유방세포)와 MAC-T (소의 유방세포)를 감염시킨다. 각 vector에 대한 MCF와 MZC-T cell에서의 LacZ marker gene의 발현정도로 어느 promoter가 유방세포에서 발현이 가장 좋은가를 결정하였다.

3) 그 결과를 토대로 pLNCZ, pLNβZ 그리고 pLNWZ 중에서 가장 우수한 vector의 LacZ gene을 human lactadherin gene으로 치환한 vector를 만들어 이 vector를 형질 전환 쥐와 소의 생산에 이용하였다.

라. Retrovirus vector 용액의 농축

Virus를 생산하는 세포로부터 수확한 배양액을 Beckman SW41 rotor를 이용하여 4°C에서 50,000 g (25,000 rpm)로 90분 동안 원심분리한다. 농축된 virus pellet을 처음 volume의 약 1% 정도의 TNE나 0.1X Hank's balanced solution 혹은 수정란 배양액으로 4°C에서 overnight resuspension한다. 농축된 virus 용액은 0.22μm-pore size filter를 이용하여 멸균과 cell debris를 제거한다. 농축이 끝난 vector 용액은 -70°C에 보관하였다.

마. Retrovirus vector system의 생물학적 안정성 (biosafety)의 조사

Retrovirus를 생산하는 세포 속에서 아주 낮은 빈도로 3가지의 retrovirus를 만드는 DNA (gag-pol, retrovirus vector DNA, VSV-G glycoprotein을 coding하는 DNA)가 Homologous recombination하여 replication competent한 retrovirus를 생산할 수도 있다. Replication competent한 retrovirus의 생산 여부를 조사하기 위해서 본 연구자가 이미 확립한 방법(Kim et al., 1993)에 따라 RT assay와 second infection test를 하였다.

3. 제 2 협동과제 : Human lactadherin 유전자의 cloning 및 발현 분석

가. Lactadherin의 정제

모유를 원심분리하여 지방구를 분리하였다. 여기에 지방구 부피의 2배에 해당하는 Tris buffer와 1% Triton-X 100을 첨가하여 적절히 교반하여 주었다. 다시 원심분리를 실시하여 지방을 제거한 후에 Gel filtration을 실시하여 약 50K 정도의 fraction을 분리하였다. 그 다음 ion exchange chromatography를 실시한 다음 적절한 fraction을 선별하여 HPLC를 실시하였다. 해당 fraction에 대하여 다시 ammonium sulphate precipitation, gel filtration, DEAE chromatography 등의 방법으로 정제를 실시하고 각 단계마다 SDS-PAGE로 그 순도를 확인하였다.

나. 항체 생산

정제된 단백질 용액과 Freund's complete adjuvant를 같은 양으로 잘 혼합한 후 5마리의 토끼에 0.2 mg의 단백질이 주입되도록 근육 주사하고, 2주 후에는 같은 방법으로 앞에 주사한 양의 약 20%를 주사한다. 혈액은 주사 전 후로 5일 간격으로 5ml을 귀에서 채취하였다. 여기서 만들어진 항체는 Western blot 등 항체를 이용하는 lactadherin의 각종 발현 분석과 생화학적 분석에 사용하였다.

다. Primer (20 base) 및 Probe 제작

Primer는 lactadherin의 아미노산 sequence중 7개씩 2군데를 선정한 다음 Mixed-oligomer가 되도록 상업적으로 주문하여 제작하였다. 이 primer set와 분리된 RNA를 혼합하여 RT-PCR을 실시하여 DNA를 증폭시키고 이것을 다시 cloning하여 probe를 얻었다. 여기서 얻어지는 probe는 Southern과 Northern blot에 이용하였다.

라. mRNA 분리 및 cDNA cloning

인간의 유선 Cell line으로부터 mRNA 분리 kit을 이용하여 mRNA를 분리하거나 상업적으로 인간 유선 mRNA를 구입한 다음 Mixed primer를 사용한 RT-PCR을 이용하여 cDNA를 증폭한 다음 SDS-PAGE를 실시하고 예상되는 크기의 밴드를 잘라서 pGEM-T (Promega Co.)에 cloning 한 후, E. Coli에 전이 시킨후 배양하고 Plasmid를 분리 정제하여 충분한 양의 Lactadherin 유전자 cDNA Insert를 확보하였다. 이 Insert는 Retroviral vector에 삽입되어 발현 vector로 만들었다.

마. Library Screening

Phage로 만들어진 인간의 유선 cDNA Library를 상업적으로 구입하여 위에서 만들어진 probe을 이용하여 screening을 실시하고 이와 같은 과정을 3-4차례 되풀

이 하여 원하는 몇 개의 clone을 얻었다. 이 방법과 RT-PCR에 의한 cloning은 full size cDNA clone을 얻기 위하여 병행하여 실시하고 상호보완하여 결과를 해석하였다.

바. Northern Blot

유선조직을 쥐로부터 떼어내기 위하여 2mg의 sodium pentobarbital을 intraperitoneal(IP) 주사하고 4번째 유선의 등쪽 끝에서 약 100mg의 유선조직을 분리하였다 (Yom, 1991). 다른 조직은 치사량의 sodium pentobarbital을 주사한후 절개하여 분리하였다. 분리된 조직은 액체질소에 즉시 동결하고 -80℃에 보관하였다가 Teflon 조직분쇄기를 이용하여 분쇄하였다. 다음 total RNA는 Chomczynski 등(1987)의 single step 분리법으로 분리하고, Amersham Co.의 Hybridization 방법에 따라 1%의 Agarose gel을 denature한 조건하에서 실행하고 Hybond-N membrane을 사용하여 transfer한 다음, 42℃에서 Hybridization을 실시하였다. 여기에 사용되는 probe는 nick translation하여 사용하였다 (Yom, 1991).

사. 쥐의 착유

쥐의 착유는 염(Yom, 1991)이 보고한 방법에 의하여 실시하였다. 비유중인 쥐에서 새끼를 4시간 격리시키고 1.5mg의 sodium pentobarbital을 IP 주사하고 10분 후에 0.5 U의 oxytocin을 역시 IP 주사하였다. 그후 진공 펌프에 연결된 쥐의 착유기구로 Eppendorf tube에 4쌍의 유두를 번갈아 가며 모두 착유하였다. 착유량은 개체당 0.5-1.0 ml 가량이었다.

아. Western Blot

우유에서 지방을 일차분리하고 분리된 지방구에서 lactadherin을 포함하는 fraction에 Yom 등(1992)의 방법으로 토끼의 1차 항체와 양의 2차 항체를 이용하여 실시하고, alkaline phosphatase를 이용하는 NBT-BCIP 방법을 사용하였다.

자. Southern Blot

조직으로부터 genomic DNA를 protenase K의 처리로 분리 정제하고, 제한효소로 절단된 다음(EcoR I, Hind III), 1% gel로 분리한 후 Hybond-N (Amersham Co.)을 이용하여 전이시킨 다음 제조회사(Amersham)의 설명에 따라 nick-translate된 DNA probe로 62℃에서 12시간 동안 hybridization을 한 후에 높은 stringency로 wash하고 autoradiography를 실시하였다.

차. Immunocytochemistry

발현된 유선조직은 Acetaldehyde에 의하여 fixation이 되고, epoxy 등의 plastic 안에 고정되고, microtome에 의하여 가는 절편으로 잘려진 후, 유리 슬라이드 위에 놓여져 면역항체법을 이용하여 Polak 등(1983)이 묘사한 방법으로 세포의 구조를 형광현미경으로 분석하였다.

카. Lactadherin의 bioassay

쥐의 milk를 통하여 분비된 사람의 lactadherin이 rotavirus의 증식에 미치는 영향을 다음과 같이 평가하였다. MA104 세포(rotavirus host cell)를 microplate에 부착시킨 후, rotavirus와 recombinant mouse milk를 넣은 다음 세포를 배양하였다. 그 후 세척과 고정 과정을 거친 MA104 세포에 대해 항원항체 반응과 staining을 실시한 다음 현미경하에서 사진을 찍어 그 결과를 판정하였다 (Perez *et al.*, 1999).

제 2 절. 연구결과

본 연구를 위하여 주관연구책임자는 유전자 조작과 retrovirus vector system 개발을 제외한 형질전환수정란 제조와 처리 및 이식 등에 관한 일체 연구의 진행과 관리를 총괄 지휘하였으며, 공동연구자(제1협동)는 유전자 확보와 조작, 프로모터 제작, retrovirus vector system의 개발 및 개발된 system의 생물학적 안정성 검사 등 유전자 조절에 관한 일체의 연구에 관하여 총괄 지휘하였으며 공동연구자(제2협동)는 human lactaherin gene의 cloning과 이 gene의 정제 및 발현의 분석에 관한 일체의 연구를 지휘하였다. 유기적인 연계체제하에 공동연구자는 필요한 유전자를 제작하여 주관연구자에게 제공하였으며, 주관연구자는 제공받은 유전자를 형질전환수정란의 생산을 위하여 사용하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

1. 농축된 VSV-G based retrovirus 용액을 미수정란의 위란강에 주입하여 형질 전환 쥐와 소의 생산 (제1세부과제)

가. Retrovirus 용액을 미수정란의 위란강 주입 기법을 통한 형질전환 쥐의 생산

본 연구는 외래 유전자가 도입된 레트로 바이러스백터를 성숙난자의 위란강내에 주입하는 방법을 통해 최종적으로 human lactaherin을 유즙에서 분비하는 형질전환 소의 생산 기법 확립을 위한 기초 연구로서 쥐 난자의 위란강내에 레트로 바이러스백터를 주입한 후 체외수정을 실시하는 방법으로 수정란내에서의 외래 유전자의 도입과 발현을 각각 조사하였다.

Table 1. Expression of EGFP in blastocysts after microinjection of retroviral vector into perivitelline space of mouse matured oocytes

	No. of oocytes	No. (%) of embryos cleaved	No. (%) of blastocysts	No. (%) of GFP expressed
IVF	295	238 (80.6) ^a	129 (54.2)	0
GFP injection	188	94 (50.0) ^b	47 (50.0)	3 (6.3)

* IVF : *in vitro* fertilization, GFP injection : microinjection of EGFP retroviral vector into perivitelline space of mouse oocytes after removal of cumulus cells.

a vs b = P < 0.05.

EGFP retroviral vector을 과배란이 유도된 난자의 위란강내에 주입 후 체외수정을 유도했을 경우 난할율과 배반포 발달율을 조사한 결과, retroviral vector를 주입하지 않고 체외 수정을 실시한 대조군의 경우 80.6%의 난자가 분할하였으며 이들 난자 중 54.2%가 배반포로 발달한데 반해 유전자를 주입하였을 경우 난할율은 50.0%로 유의적으로 낮게 관찰되었고, 이들 분할란 중 34.5%가 배반포로의 발달율을 보여 대조군에 비해 저조하였으나 유의차는 없었다 (Table 1). 그 이유는 레트로바이러스 벡터를 난자의 위란강내에 주입하는 과정에서 발생한 물리적 손상 내지는 주입 유전자 자체의 특성에 기인한 것으로 사료된다.

그리고 형광현미경 하에서 관찰한 결과 이들 배반포기 배중 6.3%의 수정란에서 EGFP의 발현을 확인하였다. 이들 배반포에서의 EGFP 발현은 Fig. 1에서 보는바와 같이 녹색 형광의 발현으로 확인되었다. 이러한 결과들은 레트로바이러스 벡터를 난자의 위란강내에 주입한 후 수정하는 기법에 의해 난자는 배반포로의 발달이 가능하며 레트로바이러스 벡터를 이용한 형질전환 생쥐 수정란의 생산이 가능함을 나타낸다. 이러한 결과는 레트로 바이러스 벡터를 이용하여 난자의 위란강으로 주입한 후 외래 유전자를 난자의 핵내에 전이시킬 수 있는 Bremel(1998)의 연구와 유사한 결과임을 확인할 수 있었다.

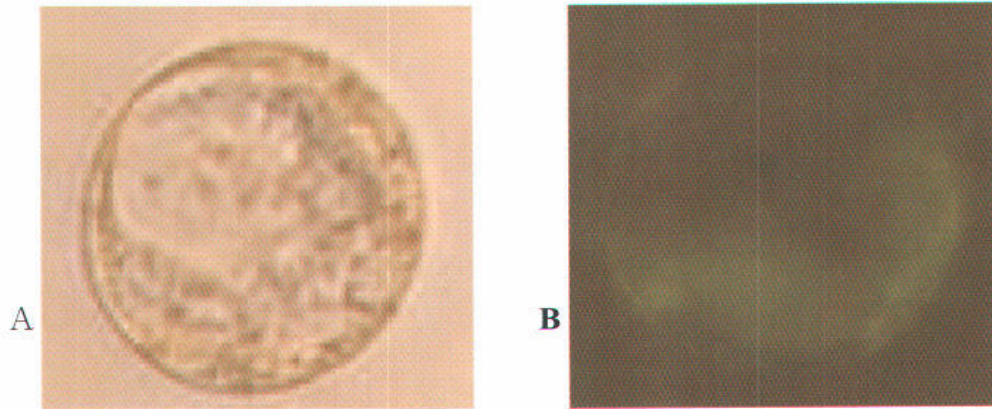


Fig. 1. Representative microscopic image of blastocyst stage embryo that was subjected to the perivitelline space microinjection of EGFP retroviral vector. A: Light stereomicroscopic image. B: Fluorescent image under the EGFP excitation light.

한편 1협동과제에서 구축한 human lactaherin 유전자를 전이시키는 retrovirus를 생쥐 수정란의 위란강내에 주입한 후 난자의 난할율과 이들 분할란에서 배반포로의 발달율은 각각 51.8, 54.1%이었고, retrovirus를 주입하지 않은 군의 경우 난자의 난할율과 이들 분할란에서 배반포로의 발달율은 각각 81.0, 56.3%로 수정률에서는 차이를 보였지만 발달율에 있어서는 차이가 없는 것으로 나타났다 (Table 2).

Table 2. *In vitro* development of embryos after microinjection of retroviral vector into perivitelline space of mouse matured oocytes

Treatment*	No. of oocytes	No. (%) of embryos cleaved	No. (%) of blastocysts
IVF	158	128 (81.0) ^a	72 (56.3)
human lactaherin gene injection	417	216 (51.8) ^b	117 (54.1)

* IVF : *in vitro* fertilization, human lactaherin gene injection : microinjection of human lactaherin retroviral vector into perivitelline space of mouse oocytes after removal of cumulus cells.

a vs b = P < 0.05.

또한 형질전환생쥐를 생산하고자 human lactaherin retroviral vector를 위란강에 주입한 후 체외수정을 실시하여 생산된 수정란을 체외에서 하루동안 배양한 후 분할이 이루어진 난자만을 선별하여 40수의 대리모의 난관에 이식하였으며, 생산된 산자는 PCR을 이용하여 외래유전자의 도입여부를 조사하였다. 모두 49마리의 산자가 태어났으며 (Table 3), 이들 산자 중 한 마리에서 외래 유전자의 도입을 확인할 수 있었다. 이들 human lactaherin 도입은 Fig. 2에서 보는바와 같이 PCR 분석을 통해 한 마리에서 386 bp의 band가 확인되었다. 또한 이 생쥐를 장기별로 분류한 후 RT-PCR을 수행한 결과 난관, 신장, 지라, 꼬리 및 소장에서 유전자의 도입과 발현이 성공적으로 이루어졌음을 확인할 수 있었다. PCR로 분석한 결과 한마리에서 human lactaherin 유전자의 존재가 확인되었다. 이러한 결과는 외래 유전자가 도입된 레트로 바이러스를 난자의 위란강내에 미세주입하는 방법에 의해 형질전환 소의 생산에 성공한 Anthony 등(1998)의 결과에 부합된다.

Table 3. Transfer of mouse embryos injected to transfection of human lactaherin gene

	No. of embryos	No. of recipients	No. of offspring	No.(%) of integration
Control	120	10	32	0(0)
human lactaherin	341	40	49	1(2)

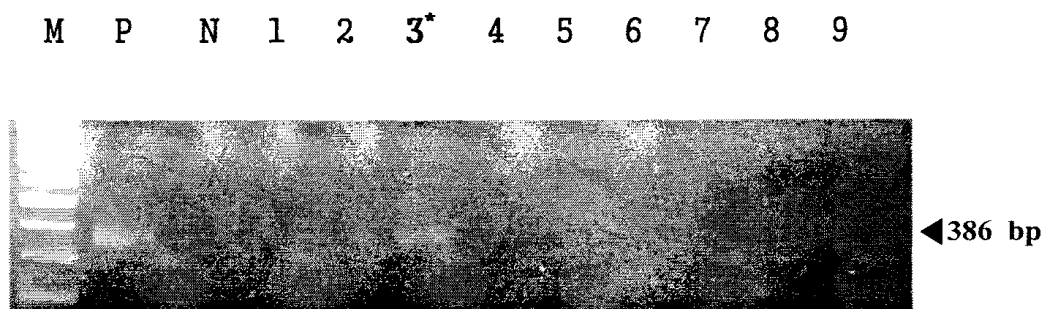


Fig 2. PCR analysis of mouse offspring. P: PA317-LN β EGFP N : negative control. Lanes 1-9 mouse offsprings 9 heads genomic DNA (EGFP 386 bp arrowhead), and M: 100 bp molecular weight marker

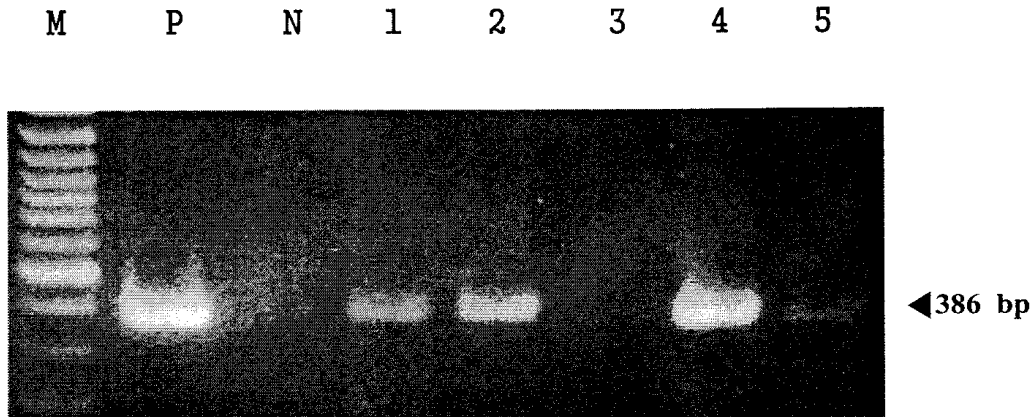


Fig 3. PCR analysis of mouse offspring. P : PA317-LN β EGFP N : negative control. Lanes 1-5 different organs from offspring (EGFP 386 bp arrowhead, 1 : oviduct, 2 : kidney, 3 : spleen, 4 : tail, 5 : small intestine), and M: 100 bp molecular weight marker

나. Retrovirus 용액을 미수정란의 위란강 주입 기법을 통한 형질전환 소의 생산

Retrovirus를 이용한 형질전환 동물을 생산하는데 있어서 최적의 조건을 확립하기 위하여 lactadherin 유전자를 이용한 위란강내 retroviral vector의 주입에 앞서 가장 이상적인 retrovirus의 주입시간과 retrovirus를 이용한 형질전환 동물 생산에 있어서 가장 중요한 요소중의 하나인 충분한 위란강 공간의 확보, retroviral vector의 transduction efficiency를 높이는 방법에 대해 선행 연구를 실시하였다.

우선 소의 미성숙난자를 25 mM NaHCO₃, 10% FBS, 0.2 mM pyruvate, 5 μ g/ml FSH, 1 μ g/ml estradiol-17 β 그리고 25 μ g/ml gentamycine 이 첨가된 TCM-199 (Gibco, Grand Island, NY)에서 16에서 24시간동안 배양한 뒤 각 시간대별로 retrovirus의 microinjection을 실시하였다. 그후 5시간후에 체외수정을 실시하여 그 발달율을 비교하였다. 이것은 위란강내 주입된 retrovirus가 역전사효소에 의해 DNA로 전환된뒤 숙주의 genome에 integration 될 수 있도록 시간적인 여유를 주기 위함이다. 그 결과 각각의 실험군에서 분할율에는 유의차가 없었으나, 배반포로의 발달율은 16, 18, 20시간의 체외성숙 후 retrovirus를 주입한 처리군에서 높은 발달율을 보였다 (Table 4). 이러한 결과로부터 유추하여 본연구에서는 18시간동안 체외성숙을 실시한 뒤 retrovirus를 위란강에 주입하고 5시간의 integration 시간을 주는 것으로 실험조건

을 확립하였다.

Table 4. Effect of maturation time on *in vitro* developmental rate following perivitelline injection using retroviral vector

Maturation time (hr)	No. of MII oocytes injected	No. (%) of cleaved oocytes	No. (%) of blastocysts
16	122	69 (56.5)	15 (21.7) ^a
18	131	80 (61.0)	17 (21.2) ^a
20	218	127 (58.2)	24 (18.8) ^a
22	201	125 (62.1)	14 (11.2) ^b
24	224	128 (57.1)	16 (12.5) ^b

^{a,b} Different superscripts within same column were significantly different ($P < 0.05$).

Retroviral vector를 주입할 때 높은 titer의 vector stock은 필수적인 사항이다. 이것은 미수정란의 위란강이 매우 협소하기 때문이며 실제 자연배란된 난자와 체외성숙시킨 난자를 비교해볼때 난자의 크기, 투명대의 두께와 경도, 세포질의 밀도 그리고 위란강의 크기에서 상당한 차이를 보인다. 따라서 위란강의 공간적 제약 때문에 retrovirus stock을 충분히 주입하기가 어려운 상황이며 이에 본 연구에서는 sucrose를 처리함으로써 위란강내에 충분한 공간을 확보하기 위해 최적인 sucrose 처리 농도를 구하기 위한 연구를 진행하였다. 그결과 배발달율은 처리하지 않은 대조군과 비교시 유의차를 보이지 않았으며 유전자의 integration 율은 sucrose를 처리한 군에서 매우 높게 나타나는 것을 확인하였다 (Table 5).

Table 5. Effect of sucrose treatment on *in vitro* development of bovine oocytes and integration rate of GFP gene in blastocysts

Treatment	No. of oocytes	No. of embryos developed to		No. of blastocysts gene-integrated (%)
		2-cell (%)	Blastocyst (%)	
Control	240	139 (57.9)	25 (17.9)	1 (4) ^a
0.5% Sucrose	200	122 (61)	23 (18.8)	6 (26) ^b
1% Sucrose	200	119 (59.5)	24 (20.1)	7 (29.1) ^b
2% Sucrose	190	108 (56.8)	21 (19.4)	5 (23.8) ^b
3% Sucrose	220	128 (58.1)	22 (17.1)	7 (31.8) ^b

^{a,b} Different superscripts within same column were significantly different (P<0.05).

VSV-G 의 감염은 viral envelope의 glycoprotein과 세포막의 phospholipid성분의 결합에 의해 이루어진다. 지금까지의 보고에 따르면 polybrene은 retrovirus와 숙주 세포 막성분의 음전하를 중화시킴으로써 transduction을 유도하는 것으로 알려져있다. 따라서 본연구에서는 polybrene과 retrovirus를 동시에 위란강내로 주입함으로써 가장 효율적인 주입방법을 확립하고자 하였다. 그 결과 0.5, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 polybrene을 첨가한 처리군에서는 대조군인 polybrene을 첨가하지 않은군과 별다른 차이를 보이지 않았지만 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 polybrene을 처리한 군은 대조군과 비교시 유의적으로 낮은 배발달율을 보였다. 그러나 유전자의 integration율은 polybrene을 처리한 군에서 보다 높은 효율로 전이되는 양상을 나타냈다 (Table 6).

Table 6. Effect of polybrene treatment on *in vitro* development of bovine oocytes and integration rate of GFP gene in blastocysts

Polybrene ($\mu\text{l}/\text{ml}$)	No. of oocytes examined	No. of embryos developed to		No. (%) of integration in blastocysts
		2-cell (%)	Blastocyst (%)	
0	180	110 (61.1) ^a	25 (22.7) ^a	3 (12) ^a
0.5	180	107 (59.4) ^a	21 (19.6) ^a	7 (33) ^b
5	180	112 (62.2) ^a	21 (18.7) ^a	8 (38) ^b
50	180	67 (37.2) ^b	5 (7.4) ^b	2 (40) ^b

^{a,b} Different superscripts within same column were significantly different ($P < 0.05$).

소의 경우 체외에서 성숙된 난자를 체외수정한 결과 72.5%의 분할율을 보였으며, 이들 분할란 중 22.9%가 배반포로 발달하였다. 한편 EGFP retroviral vector를 위란강에 주입한 후 체외수정을 실시한 군에 있어서의 분할율은 59.2%였고, 이들 분할란 중 배반포로의 발달율은 18.4%였다. 분할율에 있어서는 위란강내 주입군이 다소 낮았지만, 배반포로의 발달율에는 유의차가 없었다 (Table 4). 또한 이들 배반포를 대상으로 PCR분석법을 통해 EGFP 유전자의 난자내 도입여부를 조사한 결과, EGFP retroviral vector를 위란강에 주입 후 체외수정을 실시한 난자의 30.4%에서 EGFP 유전자의 도입이 확인되었다. 이들 배반포에 있어서의 EGFP는 Fig. 4에서 보는바와 같이 PCR 분석을 통해 386 bp에서 그 존재가 확인되었다.

Table 7. Integration of EGFP into blastocysts developed from embryos after microinjection of retroviral vector into perivitelline space of bovine matured oocytes

Treatment	No. of oocytes	No. (%) of embryos cleaved	No. (%) of blastocysts	No. (%) of EGFP integrated
Control	612	444 (72.5) ^a	99 (22.2)	0 (0)
EGFP injection	633	375 (59.2) ^b	69 (18.4)	21 (30.4)

* Control : in vitro fertilization, EGFP injection : microinjection of EGFP retroviral vector into perivitelline space of mouse oocytes after removal of cumulus cells.

a vs b = P < 0.05.

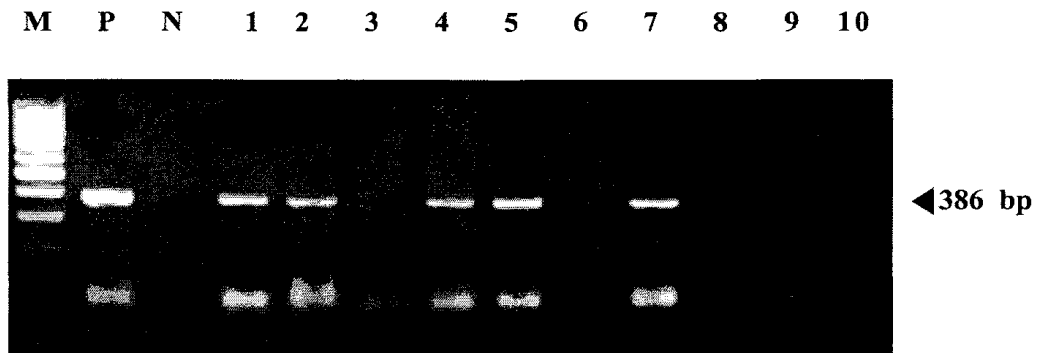


Fig. 4. PCR analysis of *in vitro* produced bovine embryos after microinjection of retroviral vector into perivitelline space. Lanes 1-10 perivitelline space injected single blastocyst (EGFP 386 bp arrowhead). M: 100 bp molecular size marker. P : positive control. N : negative control.

미성숙 난포란을 체외에서 18시간 동안 성숙시킨 후, 제 1협동과제에서 구축한 human lactahedrin 유전자가 장착된 retroviral vector를 위란강 내에 주입한 후 체외 수정한 결과 73.3%의 분할율을 보였으며, 이들 분할란 중 22.4%가 배반포로 발달하였다. 한편 retroviral vector를 위란강에 주입하지 않고 체외수정을 실시한 군에 있어서의 분할율은 57.8%였고, 이들 분할란 중 배반포로의 발달율은 18.3%였다. 분할율에 있어서는 위란강내 주입군이 다소 낮았지만, 배반포로의 발달율에는 유의차가 없었다 (Table 5). 또한 이들 배반포를 대상으로 PCR분석법을 통해 lactahedrin 유전자의 난자내 도입여부를 조사한 결과, human lactahedrin retroviral vector을 위란강에 주입 후 체외수정을 실시한 난자의 28.5%에서 human lactahedrin 유전자의 도입이 확인되었다. 이들 배반포에 있어서의 human lactahedrin 유전자는 Fig. 5에서 보는바와 같이 PCR 분석을 통해 386 bp에서 그 존재가 확인되었다.

Table 8. Integration of human lactahedrin into blastocysts developed from embryos after microinjection of retroviral vector into perivitelline space of bovine matured oocytes

Treatment	No. of oocytes	No. (%) of embryos cleaved	No. (%) of blastocysts	No. (%) of human lactahedrin gene integrated
Control	765	561 (73.3)	126 (22.4)	0 (0)
human lactahedrin injection	990	573 (57.8)	105 (18.3)	30 (28.5)

* Control : in vitro fertilization, human lactaherin gene injection : microinjection of human lactaherin retroviral vector into privitelline space of mouse oocytes after removal of cumulus cells.

a vs b = P < 0.05.

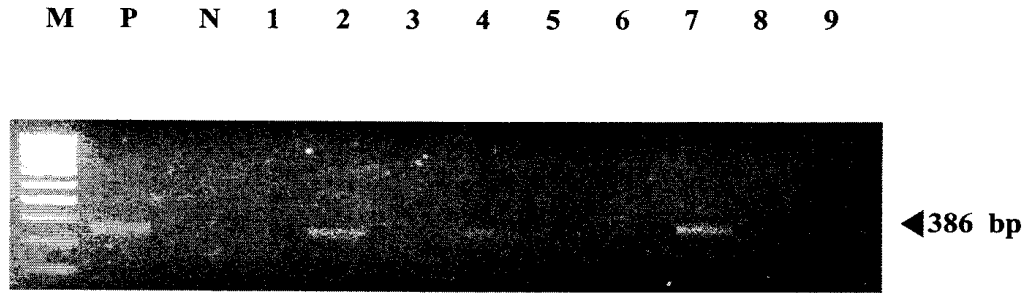


Fig. 5. PCR analysis of in vitro produced bovine embryos after microinjection of retroviral vector into perivitelline space. Lanes 1-9 perivitelline space injected single blastocyst (lactaherin 386 bp arrowhead). M : 100 bp molecular size marker. P : positive control. N : negative control.

본 연구는 제조된 복제수정란을 체외에서 장기간 보존함으로써 복제수정란의 산업적 이용에 관한 시간적 공간적 제약을 극복함과 동시에 복제수정란에 대한 현장의 수요에 시의 적절하게 대응할 수 있는 복제수정란 동결 기술의 기초를 확립하여 보다 효율적인 방법으로 형질전환 젖소의 생산에 이용하고자 실시하였다.

미성숙 난포란을 체외에서 성숙시킨 후 Human lactaherin 유전자가 장착된 retroviral vector를 위란강에 주입한 후 체외수정을 실시하고 배발달을 유도한 결과 체외 수정율은 59.6%이었으며 배반포까지의 발달율은 19.3%였다. 이렇게 생산된 수정란은 대리모에 이식하기전 EM-grid방법으로 동결하였으며 이식전 24시간 전에 해동시켜 재배양을 실시한 후 팽창여부로 생존율을 파악한 결과 75.0%의 생존율을 나타내었다 (Table 5). 이 결과는 소 배반포를 초자화 동결 후 융해하였을 때 79%가 생존하였고, 59%가 부화 배반포 까지 발달하였다고 보고한 Vajta 등(1996)의 연구 결과와 유사하며, 이러한 결과는 형질전환 젖소를 생산하는데 있어 보다 효율적으로 이용될 수 있으리라 사료된다.

Table 9. Survival rates of bovine blastocysts after freezing/thawing.

No. of oocytes	No. (%)		No. (%) of blastocysts	Freezing	Thawing	Freezing/Thawing (%)
	of embryos cleaved	No. (%) of 8-cell				
551	305 (59.6)	108 (35.4)	59 (19.3)	28	21	75

대리모를 선발하기 위하여 직장검사에서 정상적인 황체가 존재하며 생식기의 이상이 없는 비임신 경산우 15두와 미경산우 13두로 총 28두를 1차 선발하여 발정주기를 동기화시켜 발정유기 후 정상발전 여부 및 자궁의 상태 등을 확인하여 최종적으로 수정란 이식에 적합한 대리모 18두를 최종 선발하여 다시 성주기의 10-13일에 다시 발정주기의 동기화를 유기하여서 선발 수정란을 이식하였다. Human lactadherin 유전자가 전이된 수정란을 CRF+10% FCS drop에서 6-7일간 배양한 후 팽창 배반포기배 단계의 수정란을 동결하였다가 수정란 이식 24시간 전 융해하여 재팽창된 배반포를 취하여 30°C의 보온병으로 수송하여 비외과적인 방법으로 이식하였다. 수정란을 이식한 시기는 발정 후 8일째의 대리모의 양 자궁각에 수정란 1개씩 이식하였다. 총 18두에 36개의 수정란을 이식한 결과 50일경에 5두에서 임신이 확인되었고 13두에서 재발정이 일어났으며 90일경에 직장검사를 통해 임신을 감정한 결과 모두 유산된 것을 확인하였다 (Table 6).

Table 10. Embryo transfer of bovine embryo produced by microinjection of retroviral vector into perivitelline space

No. of embryos transferred	No. of recipients	No. (%) of pregnancy	No. of offspring	No. of transgenic offspring
36	18	5 (27.7)	0	0

2. Human-milk lactadherin 유전자를 전이 및 발현시키는 retrovirus vector system의 개발 (제1협동과제)

본 연구는 형질전환 동물의 유선조직 세포에서 외래 유전자가 보다 효과적으로 발현되도록 design된 retrovirus vector를 구축하고자 지속적으로 발현되는 여러 가지 promoter 중 발현이 가장 우수한 promoter를 선택하고 VSV-G based retrovirus vector producing cell line의 구축과 이 retrovirus system을 이용한 Ltd 유전자의 전이의 연구를 수행하였으며, 이러한 결과를 바탕으로 retrovirus vector를 생산하는 producing cell을 구축함과 동시에 이러한 system의 bio-safety 검사를 실시하였고, 나아가 타 연구자들의 선행된 연구보고에서 나타난 WAP promoter의 발현상의 여러 문제점을 해결하기 위한 새로운 vector system의 개발하기 위해 수행되었다.

가. Retrovirus vector의 구축

1) Marker gene 발현 vector의 구축

LacZ 유전자 발현 vector는 현재 가장 널리 사용되고 있는 promoter인 β -actin promoter와 CMV (cytomegalovirus) promoter의 3' 위치에 *E. coli LacZ* gene을 marker gene으로 도입하여서 pLN β Z와 pLNCZ retroviral vector를 재조합하였으며 (Fig. 1) EGFP 유전자 발현 vector는 pEGFP-N I (Clontech, USA)의 eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) fragment를 HindIII와 Not I 으로 절단한 후, 이 fragment를 pLN β Z의 *E. coli LacZ* gene을 제거한 위치에 cloning하였다 (Fig. 1). 재조합된 pLN β eGFP는 β -actin promoter의 조절 하에 eGFP gene의 발현이 이루어진다. CMV promoter의 3' 위치에 eGFP fragment를 재조합하는 과정도 전자의 pLN β Z 대신에 pLNCZ를 이용하여 동일한 순서로 이루어졌다. 이 vector는 CMV promoter에 의하여 eGFP gene의 발현이 조절되는 구조이다 (Fig. 1).

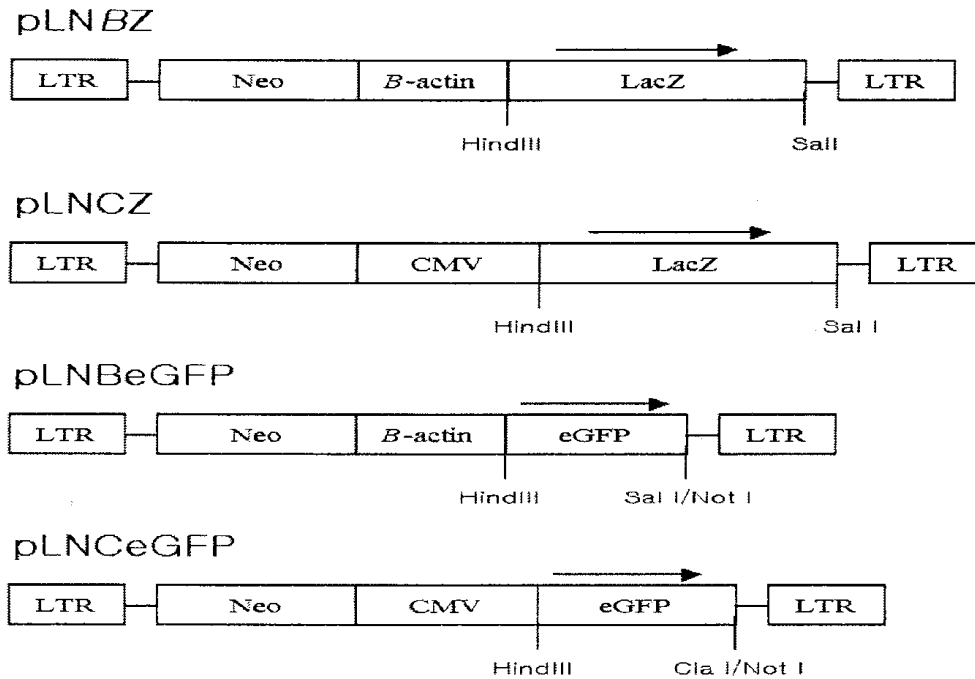


Fig. 1 Structures of retrovirus vectors. LTR, long terminal repeat ; Neo, G418 resistant gene ; β -actin, rat β -actin promoter ; CMV, cytomegalovirus promoter ; LacZ, *E. coli* LacZ gene ; eGFP, enhanced Green Fluorescent Protein gene. Length of each sequence is not drawn to scale.

2) Virus producing cell line의 구축과 retrovirus의 생산

전 단계에서 재조합한 각각의 retroviral vector를 PA317에 transient transfection 하여 virus를 만든 후 이 virus가 포함된 배양액을 PG13에 감염시켰으며 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 polybrene을 첨가하였다. G418 (800 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 선별용액으로 2주간 선별하여 살아남은 PG13 colony의 pool을 배양한 후, 이들 세포로부터 수확한 virus stock을 본 실험실에서 구축한 packaging cell line인 293mGPHy (Kim *et al.*, 2001)에 감염시켜 G418 (600 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 선별용액으로 2주간 선별하였다. 각각의 선별된 Neo^R (G418 resistant) 293mGPHy-LN β Z, 293mGPHy-LNCZ, 293mGPHy-LN β eGFP, 293mGPHy-LNCeGFP에 calcium phosphate 방법으로 20 μg 의 pHCMV-G를 transfection하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 8시간 배양 후 새 배양액으로 갈아주었다. 48시간이 경과한 후 retrovirus를 포함한 배양액을 수확하였다.

3) Virus의 농축과 표적세포의 감염

수확한 virus stock은 4°C에서 16,700 rpm으로 90분간 vertical rotor (Beckman 70Ti)를 이용하여 원심분리를 하였다. 상등액을 완전히 제거한 후 침전물에 DMEM/FBS를 첨가하여 4°C에서 16시간 방치한 후 재부유하였다. 농축된 virus stock은 0.45 μ m pore-size의 cellulose acetate filter를 이용하여 여과한 후 -70°C에 보관하였다. Virus의 titer를 측정하기 위하여 농축 전과 후의 virus stock을 EBTr (embryonic bovine trachea)에 감염시켰다. LN β Z와 LNCZ virus를 감염시킨 EBTr 세포는 24시간 경과 후 세포를 split하여 X-gal staining을 실시하거나 3일 간격으로 G418이 첨가된 선별배양액으로 갈아주어 Neo^R colony forming unit per milliliter (CFU/ml)를 측정하였다. LN β eGFP와 LNCeGFP는 slide glass 상에서 24시간 배양 후 형광현미경으로 GFP의 발현을 관찰하거나 또는 Neo^R colony forming unit per milliliter (CFU/ml)를 측정하였다.

4) 발현이 가장 우수한 promoter의 선택

전 단계에서 생산된 6종의 virus vector를 target cell에 감염시켜서 발현이 가장 우수한 promoter를 선택하고자 하였다. 각각의 virus에 대하여 titer를 측정한 결과, *E.coli LacZ* gene과 *eGFP* gene 모두 CMV promoter의 조절 하에 위치한 경우에 비해 β -actin promoter에서 그 발현의 정도가 양호한 것으로 나타났으므로 β -actin promoter를 선택하여 다음 실험에 이용하기로 하였다 (Table 1).

Table 1. Titer comparisons of the retroviruses produced from 293mGPHy/VSV-G packaging cell lines

Virus vector	Neo ^R CFU/ml ^a		LacZ ⁺ TU/ml ^b		GFP ⁺ TU/ml ^c	
	1 ×	1000 ×	1 ×	1000 ×	1 ×	1000 ×
LNβZ	6.1 × 10 ⁵	8.7 × 10 ⁷	2.3 × 10 ⁵	3.1 × 10 ⁷		
LNCZ	6.4 × 10 ⁴	1.5 × 10 ⁷	2.5 × 10 ⁴	8.5 × 10 ⁶		
LNβeGFP	2.9 × 10 ⁵	3.0 × 10 ⁸			N/A ^d	N/A
LNCeGFP	1.0 × 10 ⁵	1.0 × 10 ⁸			N/A	N/A

Titer of the viruses produced from 293mGPHy/VSV-G packaging cell lines

^aNeo^R CFU/ml refers to G418 resistant colony forming unit per ml. ^bLacZ⁺ TU/ml refers to LacZ transforming unit per ml. ^cGFP⁺ TU/ml refers to GFP transforming unit per ml. ^dN/A ; not applicable, because GFP⁺ TU/ml was not numerically measured due to technical difficulties using by epifluorescence microscopy.

나. 조직 특이적으로 발현되는 WAP (whey acidic protein) promoter를 이용한 Ltd 유전자 발현 vector의 개발

1) WAP promoter 유전자의 cloning

phEPO-WAP (경상대 김진희 박사가 제공)에서 2.4 Kb의 WAP promoter를 EcoR I 과 HindIII로 절단한 후, pLNCX를 BamH I 과 HindIII로 처리하여 제거된 CMV promoter의 위치에 cloning하여 pLNWX를 구축하였다. WAP promoter의 통제 하에 *E. coli LacZ* gene을 marker gene으로 사용하기 위하여, pLNβZ의 LacZ fragment는 HindIII와 Sal I 으로 분리한 후, 이를 pLNWX의 HindIII와 Cla I 위치에 cloning하여 pLNWZ로 재조합하였다 (Fig. 2). 또 다른 marker gene인 *eGFP* gene은 pEGFP-N I 의 eGFP를 HindIII와 Not I 으로 절단하여 pLNWX의 HindIII와 Cla I 위치에 cloning하였다 (Fig. 3).

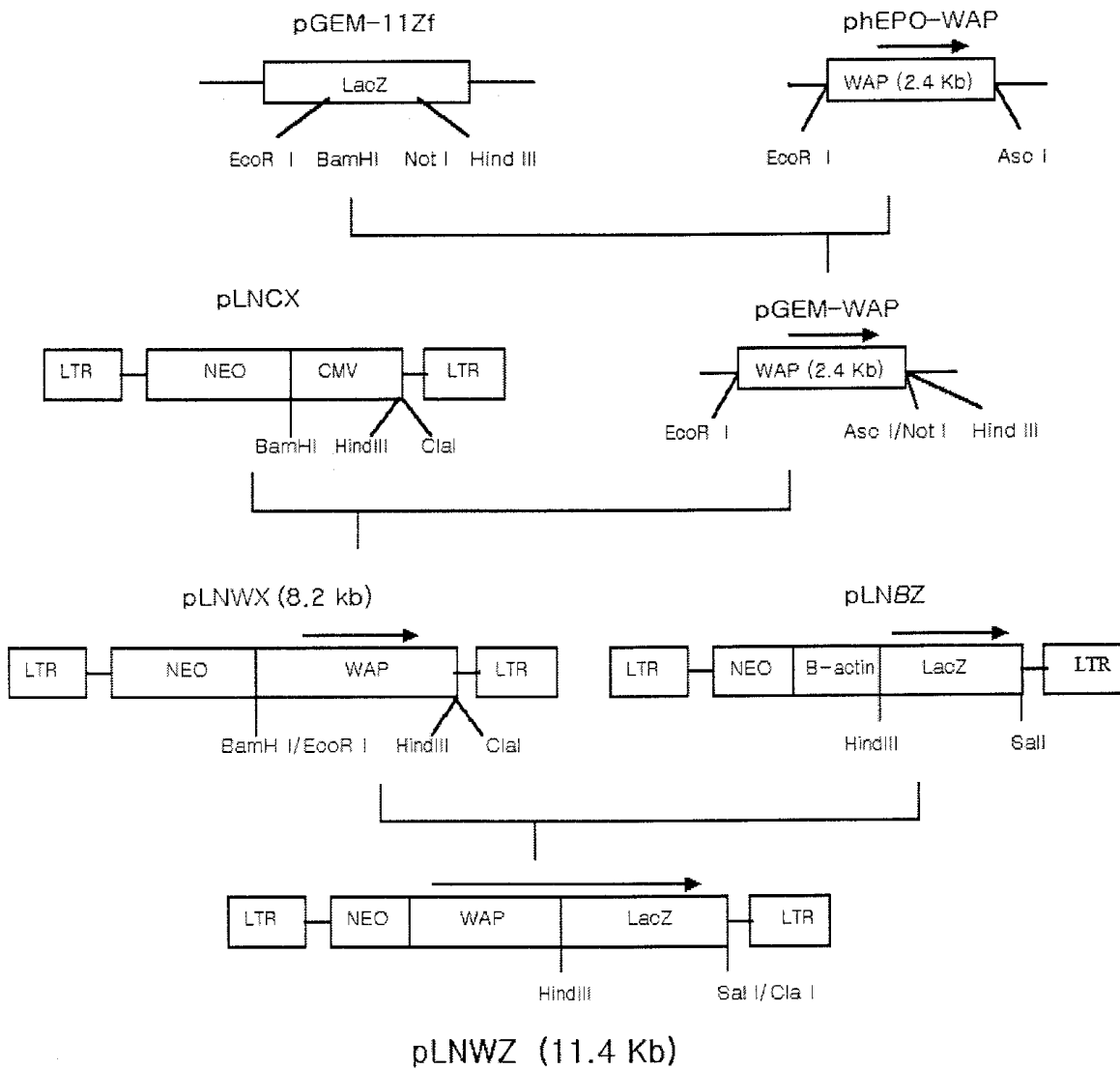


Fig. 2. Structures of retrovirus vectors. LTR, long terminal repeat ; Neo, G418 resistant gene; WAP, mouse whey acidic protein promoter ; LacZ, *E. coli* *LacZ* gene. The pLNWZ was constructed by inserting the multi cloning sites of the pLWX with LacZ fragment derived from pLNβZ.

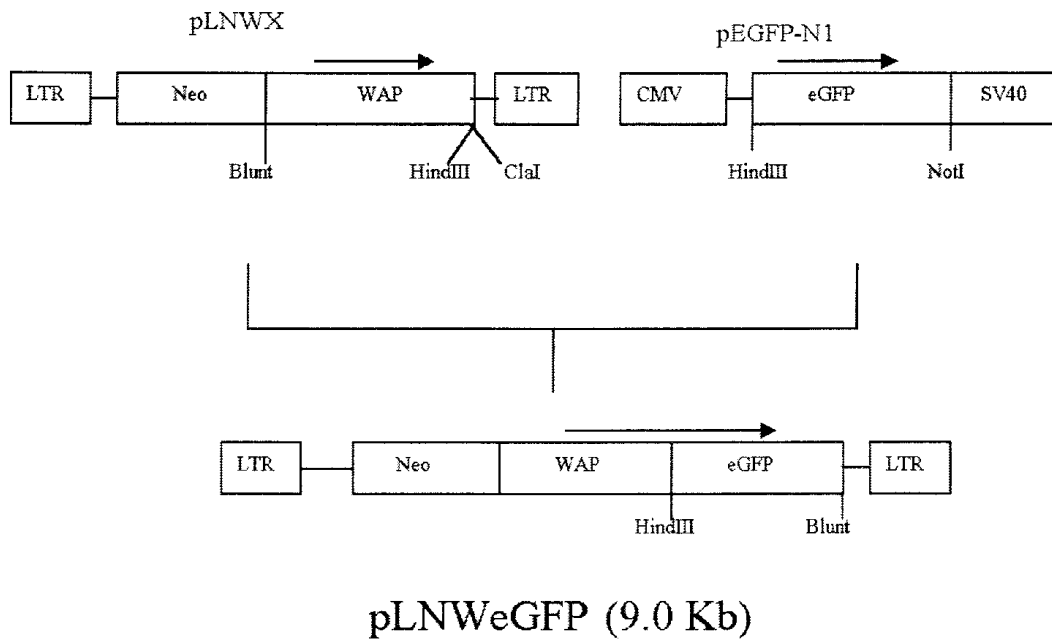


Fig. 3. Structures of retrovirus vectors. LTR, long terminal repeat ; Neo, G418 resistant gene ; WAP, mouse whey acidic protein promoter ; GFP, enhanced Green Fluorescent Protein gene. The pLNWeGFP was constructed by inserting the multi cloning sites of the pLWX with eGFP fragment derived from 780 bp Hind III- Not I fragment of pEGFP-N1 purchased from Clontech.

2) Lactadherin 유전자 발현 vector의 개발

β -actin promoter 통제 하에 lactadherin 유전자를 발현하도록 하는 pLN β Ltd는 pGEM-Ltd의 1.5 Kb Ltd fragment를 HindIII와 Sal I 으로 잘라내어 pLN β Z의 *E. coli LacZ* gene 위치에 삽입하여 cloning하였다 (Fig. 4). 동일한 Ltd fragment를 pLNWX의 WAP promoter의 downstream에 존재하는 HindIII와 Cla I 위치에 cloning 하여 pLNWLtd를 구축하였다 (Fig. 5). 새로 재조합된 recombinant vector들은 Qiagen maxiprep kit을 이용하여 대량 분리한 후 다음 실험에 사용하였다.

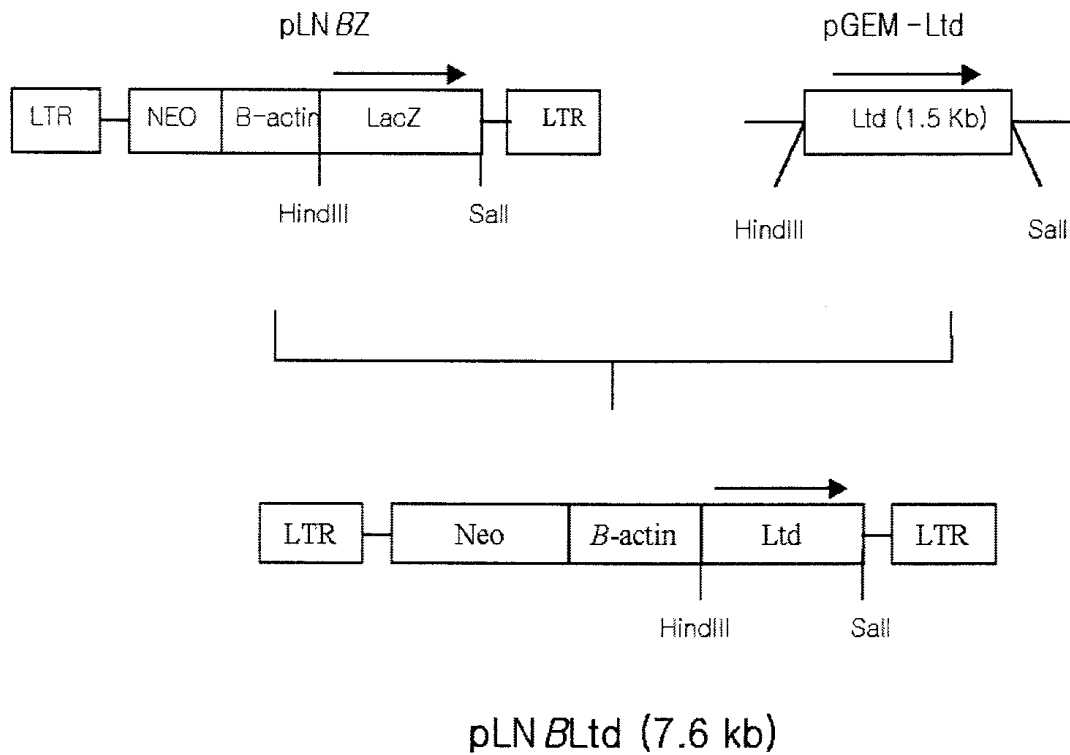


Fig. 4. Structures of retrovirus vectors. LTR, long terminal repeat; Neo, G418 resistant gene; β -actin, rat β -actin promoter; Ltd, human *Lactadherin* gene. The pLN β Ltd was constructed by replacing the LacZ gene fragment of the pLN β Z with Ltd fragment derived from pGEM-Ltd

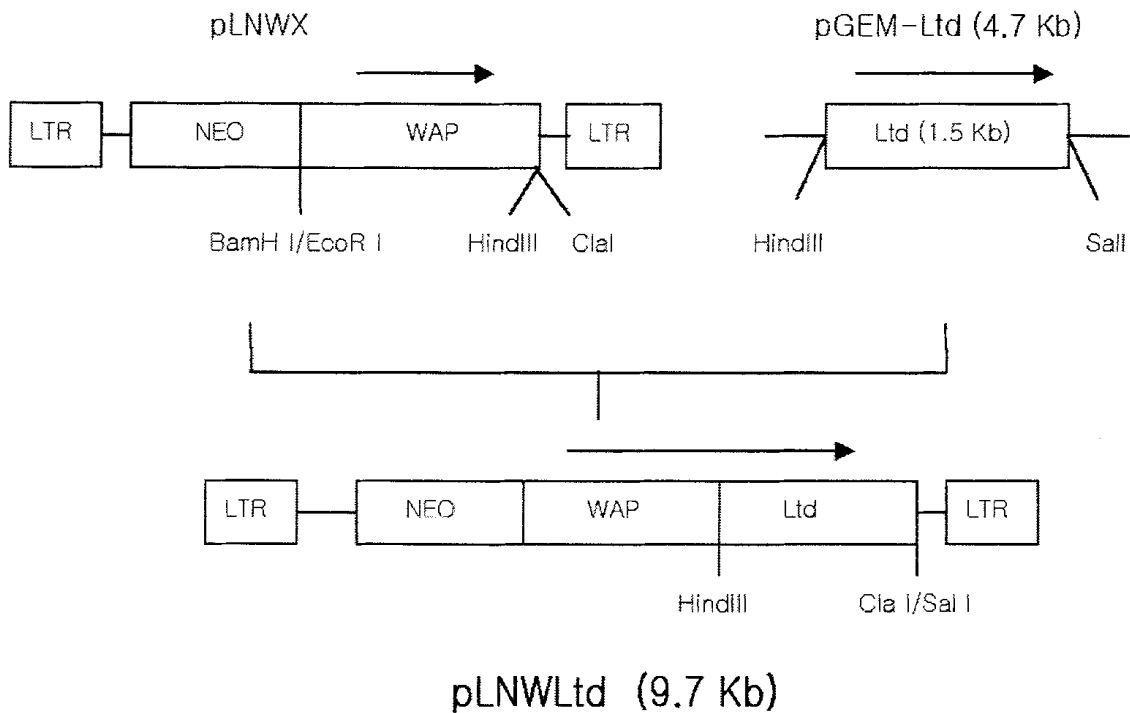


Fig. 5. Structures of retrovirus vectors. LTR, long terminal repeat ; Neo, G418 resistant gene ; WAP, mouse whey acidic protein promoter ; Ltd, human *Lactadherin* gene. The pLNWLtd was constructed by inserting the multi cloning sites of the pLWX with Ltd fragment derived from pGEM-Ltd.

다. Human Lactadherin을 생산하는 VSV-G based Retrovirus Vector Producing Cell의 개발

1) Retrovirus vector를 생산하는 producing cell의 구축

Transfection이나 virus를 이용하는 등의 분자생물학적인 방법으로 전이된 외래 유전자의 동물체내에서의 지속적인 발현은 그 개체의 생리적 균형을 손상시키는 부작용을 보일 뿐만 아니라(Vize 등, 1988; Ebert 등, 1988), 배 발달에도 심각한 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 본 연구실에서는 현재 널리 사용되고 있는 β -actin promoter나 CMV promoter 대신에 tissue specific promoter나 inducible promoter를 사용한 retrovirus vector system을 구축하고자 하였다. 그 일환으로 유선 조직에서 특이적으로 발현되는 WAP의 5'에 위치한

promoter를 cloning하였으며, 그 결과 lactogenic hormone을 inducer로 이용하여 발현의 조절이 가능한 gene transfer system을 확립하였다. Cloning한 promoter의 활성 여부를 확인하기 위하여 marker gene으로 *E. coli LacZ* gene을 WAP promoter의 3' 위치에 삽입하여 pLNWZ를 재조합하였다. 또한 WAP promoter의 대조구로 WAP promoter 대신에 β -actin promoter를 포함하는 pLN β Z를 사용하였다. 이 vector들을 이용하여 inducible gene transfer system의 활성을 확인하였다. 확인된 결과를 바탕으로 하여, 본 실험의 target gene인 human lactadherin의 유도적 활성을 관찰하기 위한 vector로 pLNWLtd를 구축하였으며, 대조구로 pLN β Ltd를 사용하였다. pLN β Z와 pLN β Ltd의 각각 *E. coli LacZ* gene과 *Ltd* gene은 β -actin promoter의 지속적인 활성으로 인하여 단백질의 발현이 연속적으로 이루어지는 구조이고, 이에 비해 pLNWZ와 pLNWLtd는 WAP promoter의 조직 특이적이며 hormone에 의한 turn on/off의 조절이 가능한 system으로 각 단백질의 발현이 유도적으로 이루어진다.

재조합된 retrovirus vector인 pLN β Z, pLNWZ, pLN β Ltd, 그리고 pLNWLtd는 다음과 같은 과정으로 각각의 virus를 생산하였다. 각 retroviral vector는 PT67에 calcium phosphate 방법으로 transfection하여 G418 (500 μ g/ml)이 첨가된 선별용액으로 2주간 선별하였으며, 각각의 vector에 대해서 형성된 Neo^R (G418 resistant) PT67 세포의 pool을 DMEM/FBS (10%)에서 48시간 배양한 후 virus stock을 수확하였으며, QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. 수확한 virus를 본 실험실에서 구축한 VSV-G based packaging cell line인 293mGPHy (Kim et al., 2001)에 감염시켜 G418 (600 μ g/ml)이 첨가된 선별용액으로 2주간 선별하였다. 선별된 Neo^R (G418 resistant) 293mGPHy-LN β Z, 293mGPHy-LNWZ, 293mGPHy-LN β Ltd, 그리고 293mGPHy-LNWLtd cell에 각각 calcium phosphate 방법으로 20 μ g의 pHCMV-G를 transfection하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 8시간 배양 후 새 배양액으로 갈아주었다. 48시간이 경과한 후 retrovirus를 포함한 배양액을 수확하였다.

2) mouse mammary gland cell line인 HC11에서 lactogenic hormone에 의한 *LacZ* 유전자의 조직 특이적 발현 유도

수확한 virus 중 LN β Z와 LNWZ virus stock은 각각 0.45 μ m pore-size의 cellulose acetate filter를 이용하여 여과한 후, 1 ml을 전날 60 mm dish에 1 \times 10⁶으로 준비된 mouse mammary epithelial cell line인 HC11에 감염시켰다. 24시간 경과 후 세포를 split하여 G418 (500 μ g/ml)이 첨가된 선별용액으로 2주간 선별하였다. 선별이 끝난 세포 중 HC11-LNWZ는 lactogenic hormone에 의한 *E. coli LacZ* gene의 유도적 발현을 확인하고자 하였다. 먼저 이 세포를 10%의 heat-inactivated FBS와 penicillin

(100 U/ml) - streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$)이 첨가된 RPMI-1640 배양액에 insulin (5 $\mu\text{g/ml}$)과 EGF (10 ng/ml)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 2일간 배양하였으며, 이 후에는 동일한 배양액에 prolactin (5 $\mu\text{g/ml}$)과 hydrocortisone (5 $\mu\text{g/ml}$)을 추가로 첨가하여 2일에 1번씩 교환하면서 4일간 배양하였다.

배양한 세포는 1×trypsin/EDTA를 처리하여 PBS에 재부유한 후 DNA와 RNA를 각각 QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Germany)와 RNA Mini Kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 분리하였다. 분리한 DNA는 PCR의 template로 사용하였으며 50 pmole의 각 primer, 50 μM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 U Taq polymerase (Promega), 10× Taq polymerase buffer (Promega)와 혼합한 후 94°C에서 5분간 방치 후, 94°C에서 30초(denaturation), 50°C에서 30초(annealing), 72°C에서 30초간(extension) 반응하는 cycle을 35회 반복 실시하였다. 반응에 사용한 primer의 sequence는 + strand primer sequence로 5'AAATGGCTTTCGCT ACCTGGA3'과 - strand primer sequence로 5'GGTAGTTCAGGCAGTTCAATC3'을 사용하였다. 반응이 끝난 후 72°C에서 5분간 방치한 후 2% agarose gel을 이용하여 전기영동을 실시하였다.

Virus producing cell인 PT67-pLN β Z와 PT67-pLNWZ, 그리고 target cell인 HC11-LN β Z와 HC11-LNWZ에서 분리한 DNA를 template로 하여 LacZ primer로 PCR을 수행한 결과 모든 cell line에서 525 bp의 band를 확인할 수 있었으며 이러한 결과로 *E. coli* LacZ gene의 도입이 성공적으로 이루어진 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 6).

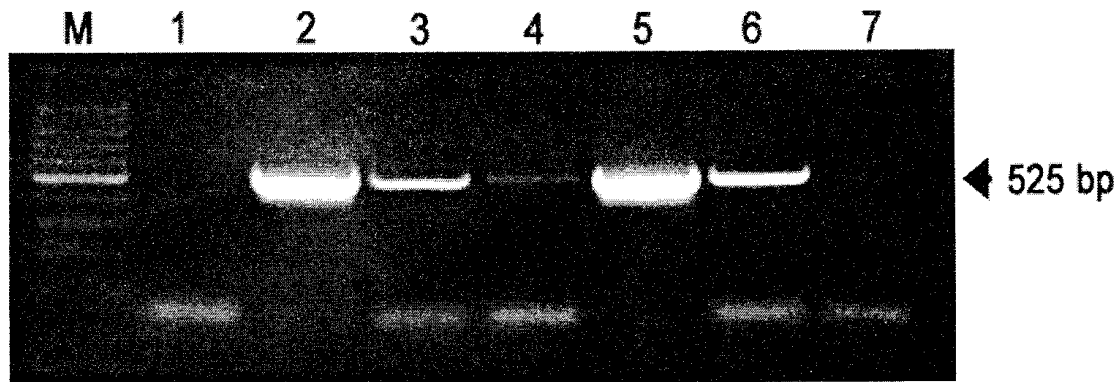


Fig. 6. PCR analyses of the *E. coli* LacZ gene integration in transformed cells
M: 100 bp ladder (Promega, USA), 1 : H₂O, 2 : pLN β Z, 3 : PT67-pLN β Z, 4 : HC11-LN β Z, 5 : pLNWZ, 6 : PT67-LNWZ, 7 : HC11-LNWZ.

분리한 RNA는 50 pmole의 primer, 0.2 mM dNTP, 1 mM MgSO₄, 5 U AMV Reverse Transcriptase (Promega), 5 U *T7*DNA Polymerase (Promega), AMV/Tfl 5×Reaction Buffer (Promega)로 만든 reaction mixture와 혼합하여 RT-PCR을 수행하였다. 일차적 cDNA를 합성하기 위하여 48°C에서 45분간 반응한 다음, AMV Reverse Transcriptase의 활성화와 RNA/cDNA/primer의 denaturation을 위해 94°C에서 2분간 반응시켰다. 2차 cDNA 합성과 PCR 증폭을 위하여 94°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 30초간 반응하는 cycle을 25회 반복 실시한 후, 최종 신장을 위해 72°C에서 5분간 방치하였다. Primer는 PCR의 경우와 동일한 것을 사용하였으며, 2% agarose gel을 이용하여 전기영동을 실시하였다.

LacZ gene의 WAP promoter에 의한 발현 조절 양상을 확인하기 위하여 lactogenic hormone을 처리한 후 각 실험군에서 RNA를 분리하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 insulin, prolactin, hydrocortisone을 동시에 처리한 실험군이 insulin을 단독으로 처리한 군에 비해 RT-PCR의 band가 진하게 나타났다 (Fig. 7). 이러한 결과는 몇몇의 lactogenic hormone의 synergistic effect에 의한 외래유전자의 발현을 나타내는 것이며, 지속적으로 turn on 되어있는 β -actin promoter와는 달리, WAP promoter는 lactogenic hormone이라는 inducer에 의해 promoter의 turn on/off가 조절됨으로써 외래 유전자의 발현 여부를 유도하는 것이 가능함을 보여주는 것으로서, 이 system이 외래 유전자의 지속적인 발현에 의한 형질전환된 개체의 생리적인 불균형에서 오는 부정적인 문제들을 해결할 수 있는 수단으로서의 가능성을 제시한다. Negative control을 위해서 infection하지 않은 cell에서 RNA를 분리하여 동일한 primer로 RT-PCR을 수행하였으며 전기영동 상에서 band가 나타나지 않은 것으로 보아서 infection에 의한 gene transfer가 성공적으로 이루어졌으며, 외부 유전자에 대한 세포 자체의 homologous gene sequence에 의한 background가 나타나지 않는 것을 확인하였다.

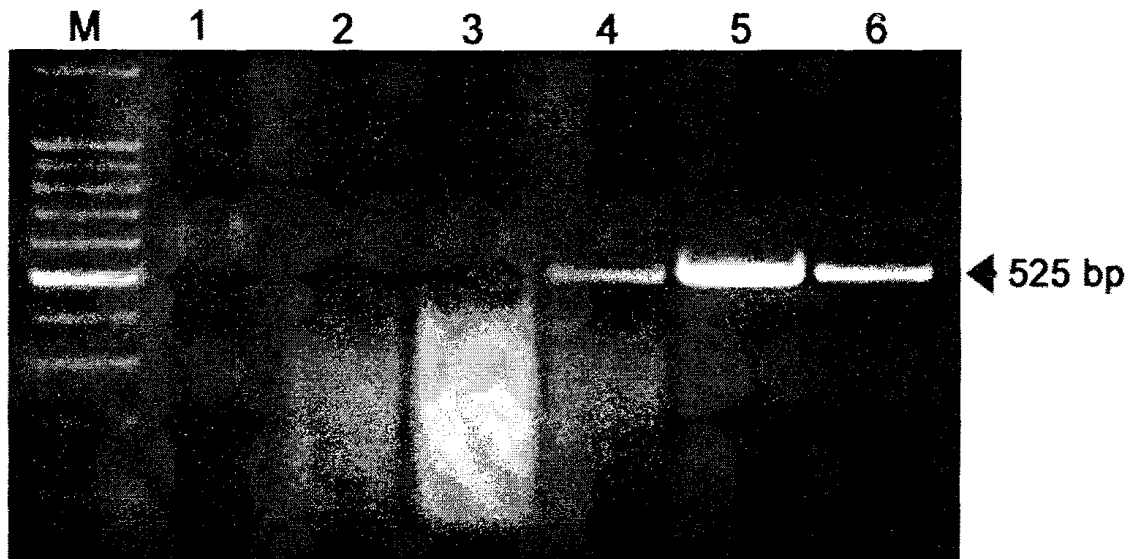


Fig. 7. Determination of hormonal induction of the *E. coli LacZ* gene in lactogenic hormone-dependent mouse mammary epithelial cell line HC11 using RT-PCR. M : 100 bp ladder, 1 : H₂O, 2, 3 : HC11, 4, 5 : HC11-LNWZ, 6: HC11-LNβZ. 2, 4 media supplemented with insulin and 3, 5 with insulin, prolactin and hydrocortisone.

3) Lactogenic hormone에 의한 WAP promoter/*Ltd* gene의 조직 특이적 발현 유도과 발현 여부 확인

전 단계의 결과를 토대로 하여, 본 연구에서는 *Ltd* gene을 쥐의 유선에서 유래된 세포인 HC11에서 발현시키기 위하여 조직 특이적이고 hormone에 의한 유도적인 발현이 가능한 system을 구축하고자 WAP promoter를 도입하였다. 이 promoter는 선행된 여러 연구에서 형질전환 동물의 유선에서 외래 유전자의 조직 특이적 발현을 목적으로 많이 사용되었다. WAP promoter의 3' 위치에 *Ltd* gene이 위치한 pLNWLtd도 전 단계의 pLNWZ의 경우와 동일한 과정으로 실험을 수행하였으며 대조구로 pLNβLtd를 사용하였다. Virus producing cell인 PT67-pLNβLtd와 PT67-pLNβLtd, target cell인 HC11-LNβLtd와 HC11-LNWLtd에서의 *Ltd* gene의 도입 여부는 PCR을 이용하여 확인하였으며, target cell에서의 발현 여부는 RT-PCR 방법을 이용하였다. 각

반응에서 사용한 primer의 sequence는 + strand primer sequence로 5'AGTAAGATCTTC CCTGGCAAC3'과 - strand primer sequence로 5'GAAAACAGGACAGTGAGGACT3'을 사용하였다. 앞의 *E. coli LacZ* gene을 이용한 실험과 동일한 조성의 반응액을 사용하였으며 PCR은 94°C에서 30초 (denaturation), 48°C에서 30초 (annealing), 72°C에서 30초간 (extension) 반응하는 cycle을 35회 반복 실시하였다. RT-PCR은 48°C에서 45분간 반응한 다음 94°C에서 2분간 반응시켰다. 2차적인 증폭을 위하여 94°C에서 30초, 48°C에서 30초, 72°C에서 30초간 반응하는 cycle을 25회 반복 실시한 후, 72°C에서 5분간 방치하였다. Primer는 PCR의 경우와 동일한 sequence를 사용하였으며, 2% agarose gel을 이용하여 전기영동을 실시하였다.

PT67과 HC11에서의 *Ltd* gene의 도입은 PCR을 통해서 확인한 결과 *Ltd* gene에 해당하는 377 bp band가 각 cell line에서 나타났다(Fig. 8).

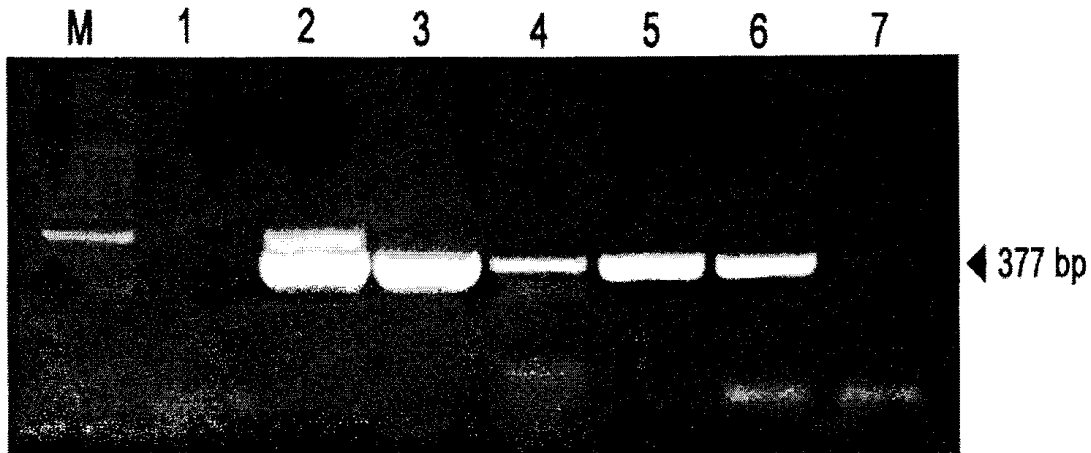


Fig. 8. PCR analyses of the *Ltd* gene integration in transformed cells.

M : 100 bp ladder (Promega, USA), 1 : H₂O, 2 : pLNβLtd, 3 : PT67-pLNβLtd, 4 : HC11-LNβLtd, 5 : pLNWLtd, 6 : PT67-LNWLtd, 7 : HC11-LNWLtd.

RT-PCR의 결과는 예상한 바와 같이, WAP/*Ltd* gene이 유전자가 전이된 HC11에서 insulin, prolactin 그리고 hydrocortisone이 존재하는 조건에서 *Ltd* gene의 우월한 발현을 나타내었다(Fig. 9). 그러나 대조구로 사용한 insulin 단독 처리군과 비교하였을 때 WAP promoter가 “leaky”하다는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 WAP promoter의 leakiness는 다른 보고서에서도 찾을 수 있으며(Pittius *et al.*, 1988), 그 원인으로서는 inducer로 작용하는 hormone을 인식하는 데 관여하는 조절 요소가 실험

에 사용한 WAP promoter 상에 존재하지 않거나(Hennighausen *et al.*, 1991), position effect때문이라고 간주하는 견해도 있다(Burdon *et al.*, 1991; Paleyanda *et al.*, 1994). 따라서, *in vivo*의 적용에 선행하여 외래 단백질의 완벽한 발현 제어에 대한 조절이 이루어지기 위해서는 WAP promoter의 leakiness를 제거할 수 있는 적절한 조절요소의 첨가와 특정 inducer에 대한 제한적 유도가 가능한 보완적인 factor들에 대한 연구가 선행되어야 할 것이다.

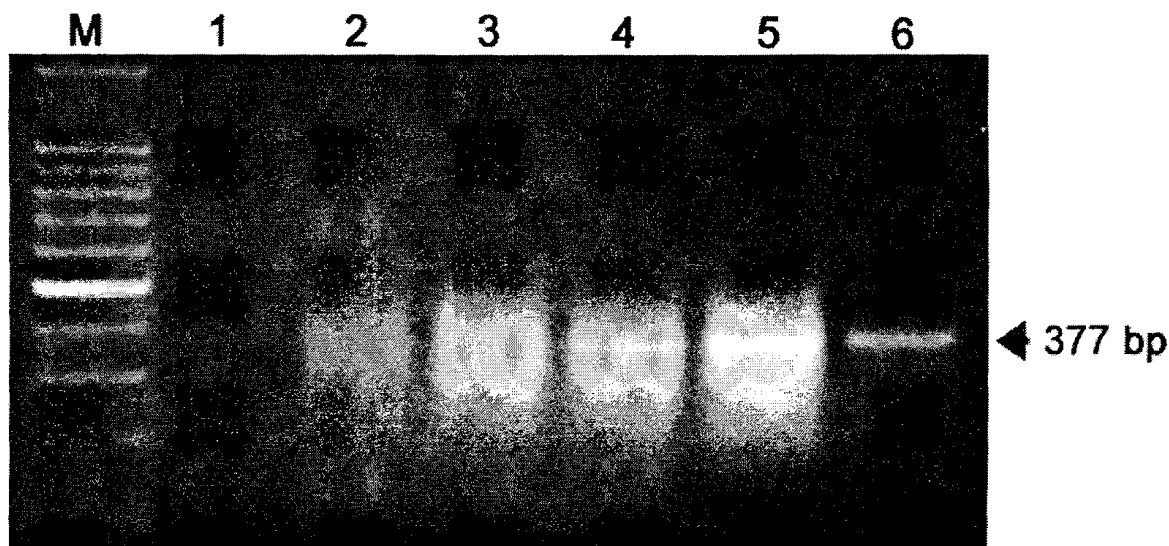


Fig. 9. Determination of hormonal induction of the *Ltd* gene in lactogenic hormone-dependent mouse mammary epithelial cell line HC11 using RT-PCR. M : 100 bp ladder, 1 : H₂O, 2, 3 : HC11, 4, 5 : HC11-LNWLtd, 6 : HC11-LNβLtd. 2, 4 media supplemented with insulin and 3, 5 with insulin, prolactin and hydrocortisone.

라. Retrovirus vector system의 bio-safety 검사 및 새로운 vector system의 개발

1) 1차년도 제 1 세부과제에서 생산된 형질전환 생쥐의 생물학적 안전성 검정

형질전환 생쥐에서 wild type retrovirus의 감염 여부를 확인하기 위하여 혈액을 채취하여 혈청 부분을 분리한 후, RT (reverse transcriptase) assay와 secondary infection을 실시하였다. RT assay는 Boehringer Mannheim의 Reverse

Transcriptase assay, non-radioactive kit를 사용하여 실시하였으며, 분리한 혈청은 NIH3T3와 HeLa cell에 재감염하여 G418으로 선별하였으며 일정 기간 선별 후 생존한 세포가 없는 것으로 보아서 wild type의 retrovirus에 의한 감염이 없는 것으로 관찰되었다. 또한 RT assay에 의한 ELISA 결과에서도 동일한 결과가 나타났다.

2) Retrovirus에 의해 유전자가 전이된 mammary gland cell의 생물학적 안전성 검정

자가증식을 하는 virus의 생산 여부 확인하기 위하여 감염과 선별과정이 끝난 Neo^R 표적세포의 배양액을 0.45 μm pore-size filter를 이용하여 여과한 후 PG13 packaging cell에 재감염시켰다. 48시간 배양한 후 배양액을 수확하여 HeLa 세포에 감염시켜서 G418 (800 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 첨가한 선별배양액으로 2주간 배양하였다. 선별 후 생존한 세포가 관찰되지 않았으며 이러한 결과로 미루어 보아서 wild type retrovirus의 생산이 없는 것으로 나타났다. 또한 I감염된 세포를 대상으로 replication competent한 virus의 존재여부를 검정하기 위하여 RT assay를 수행하였으며 ELISA를 이용하여 측정된 결과 virus가 존재하지 않음을 확인하였다.

3) Tetracycline inducible retroviral vector system의 구축

WAP promoter의 leakiness에 의한 발현상의 문제점을 해결하기 위한 방안의 하나로 Inducible promoter인 tetracycline-controllable promoter를 이용한 gene transfer system을 확립하고자 하였다. 본 실험에 선행하여 *E. coli LacZ* gene을 marker gene으로 사용하여 tetracycline inducible expression system을 구축하였다(Fig. 10). 재조합 plasmid를 만들기 위하여 사용한 pRevTRE vector는 minimal CMV promoter의 upstream 부위에 42 bp의 tetO operator sequence를 포함한 TRE (Tet-response element)를 가지고 있으며 삽입된 외래 유전자의 발현에 관여한다. 외래 유전자의 발현이 이루어질려면 이 TRE 부위에 결합하여 전사를 활성화시킬 수 있는 또다른 system인 pRev-Tet On 또는 Off system이 요구되며, 본 실험에서는 Tet On system을 사용하였다. pRev-Tet On의 reverse Tet repressor는 tetracycline 계열의 물질이 존재할 경우 reverse tetracycline-controlled transactivator (rtTA)로 발현되어 pRevTRE의 TRE 부분에 결합하여 전사를 활성화시킨다. 즉 이 system은 tetracycline 계열의 물질로 외래 유전자의 발현을 유도적으로 조절할 수 있는 system으로서 선행된 연구에서 나타난 retrovirus vector system이 지속적으로 turn on되어 형질전환 개체의 부정적인 생리적 변화를 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 추정된다. 또한 기존에 사용한 중금속이나 steroid hormone, heat shock에 의한 inducible gene expression system은 비특이적이거나 발현의 조절이 leaky한 경우가 많았으며

유도체 자체의 세포 독성과 부정적인 영향이 많은 것으로 보고되었다. 이에 비해 본

system은 매우 특이적이며 유도물질로 더해지는 doxycycline의 농도가 매우 낮아서 세포 자체의 독성을 유발할 가능성이 매우 적다(Bohl *et al.*, 1997; Mayford *et al.*, 1996).

Virus producing cell은 재조합한 pRevTRE-LacZ와 pRev-Tet On을 PT67 packaging cell에 transfection한 후, 각각 hygromycin (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 G418 (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 배양액으로 2주간 선별하여 PT67-pRevTRE-LacZ와 PT67-pRev-Tet On virus producing cell line을 확립하였다. Target cell로는 NIH3T3를 사용하였으며 PT67-pRevTRE-LacZ와 PT67-pRev-Tet On에서 생산한 virus를 순서대로 감염시켜서 각각 hygromycin (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 G418 (800 $\mu\text{g}/\text{ml}$)으로 선별하여 NIH3T3-RevTRE-LacZ-Rev-Tet On을 확립하였다. 이 세포들을 $5 \times 10^5/60$ mm dish로 준비하여 16시간 배양한 다음, tetracycline 유도체인 doxycycline을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 배양액에 첨가하여 발현을 유도하였다. 배양액 제조에 사용한 FBS는 serum 자체에 함유되어 있는 미량의 tetracycline으로 인한 실험 결과의 background를 배제하기 위하여 tetracycline free FBS를 사용하였다. 48시간 배양 후 RNA를 분리하여 WAP promoter induction 실험에 사용한 것과 동일한 sequence의 primer를 사용하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과 *LacZ* gene의 발현이 유도적으로 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

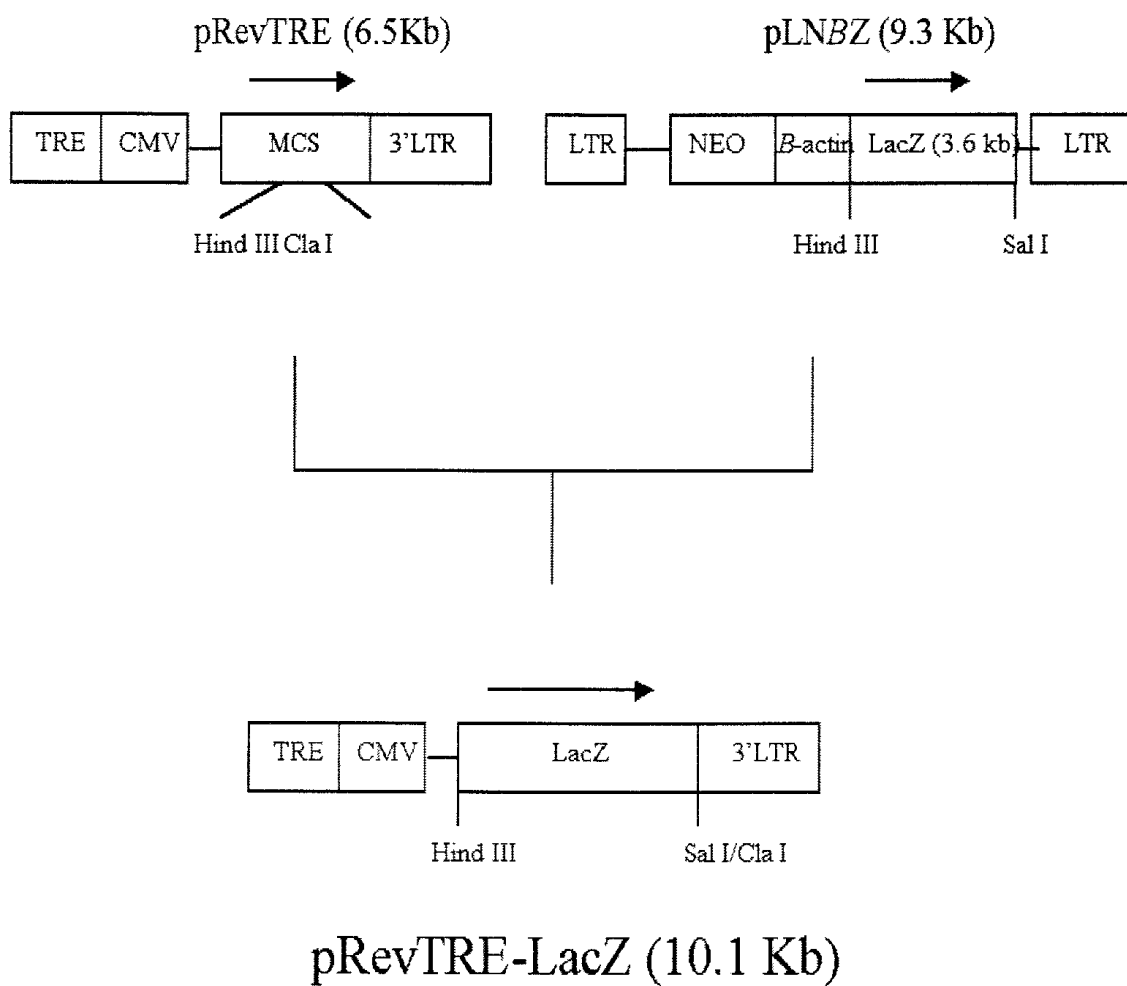


Fig. 10. Structures of retrovirus vectors. TRE, Tet-response element ; LTR, long terminal repeat ; LacZ, *E.coli* LacZ gene ; CMV, cytomegalovirus promoter ; MCS, multi cloning sites. The pRevTRE-LacZ was constructed by inserting the multi cloning sites of the pRevTRE with LacZ fragment derived from pLNβZ.

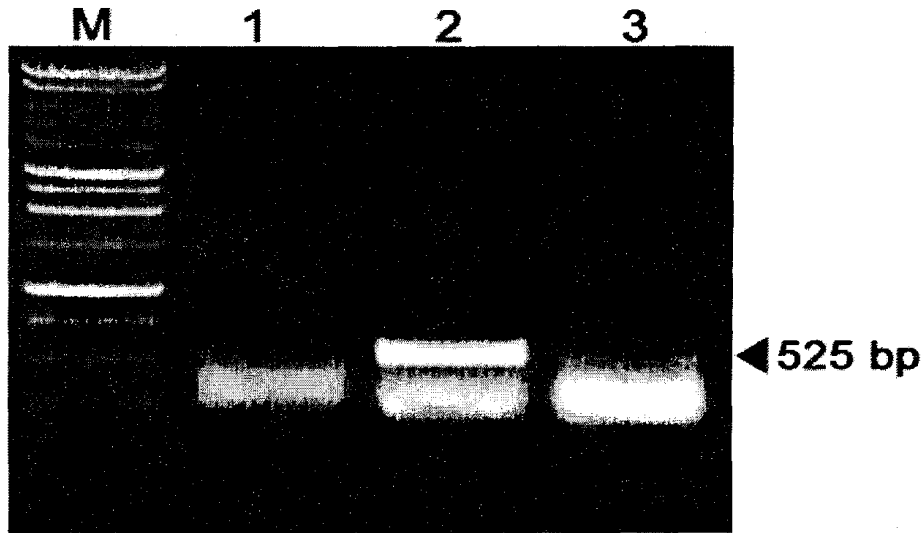


Fig. 11. Determination of doxycycline induction of the *E. coli LacZ* gene in CHO cell using RT-PCR.

M : 100 bp ladder, 1 : H₂O, 2 ; CHO-RevTRE-LacZ-Rec-Tet On was grown in media prepared with tetracycline free FBS supplemented with doxycycline (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 3 : CHO-RevTRE-LacZ-Rev-Tet On was grown in media prepared with tetracycline free FBS.

4) Tetracycline inducible retroviral vector system을 이용한 human Lactadherin gene의 발현

전 단계에서 구축한 tetracycline inducible expression system을 이용한 human lactadherin 유전자 발현의 확인은 앞선 *E. coli LacZ* gene의 실험 결과를 기초로 하여 이루어졌다. pRevTRE-Ltd는 *Ltd* gene을 pRevTRE vector의 multi cloning site에 도입하여 재조합하였다 (Fig. 12). (1)의 실험과 마찬가지로 pRevTRE-Ltd와 pRev-Tet On를 PT67에 transfection하여 packaging cell을 구축하였고, 이 세포에서 생산된 virus를 CHO (chinese hamster ovary) 세포에 감염시킨 후 hygromycin (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 G418 (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)으로 선별하여 CHO-RevTRE-Ltd-Rev-Tet On을 확립하였다. *Ltd* gene의 유도적 발현의 확인은 확립한 CHO-RevTRE-Ltd-Rev-Tet On을 doxycycline (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 세포에서 RNA를 분리하여 RT-PCR을 실시하였다. 사용한 primer는 WAP promoter induction 실험에 사용한 것과 동일한 것으로 실험 결과 377 bp의 *Ltd* gene에 해당하는 band를 확인할 수 있었다 (Fig. 13). 또한 발현의 정도는 doxycycline이 첨가되지 않은 경우에 비해

첨가한 조건에서 우월하게 나타났다. 이러한 결과를 바탕으로 하여, 본 실험에서 구축한 tetracycline inducible expression system은 외래 유전자의 지속적인 발현에 의해 나타나는 부정적인 영향을 최소화할 수 있는 새로운 vector system으로서의 가능성을 나타내는 것으로 확인되었다.

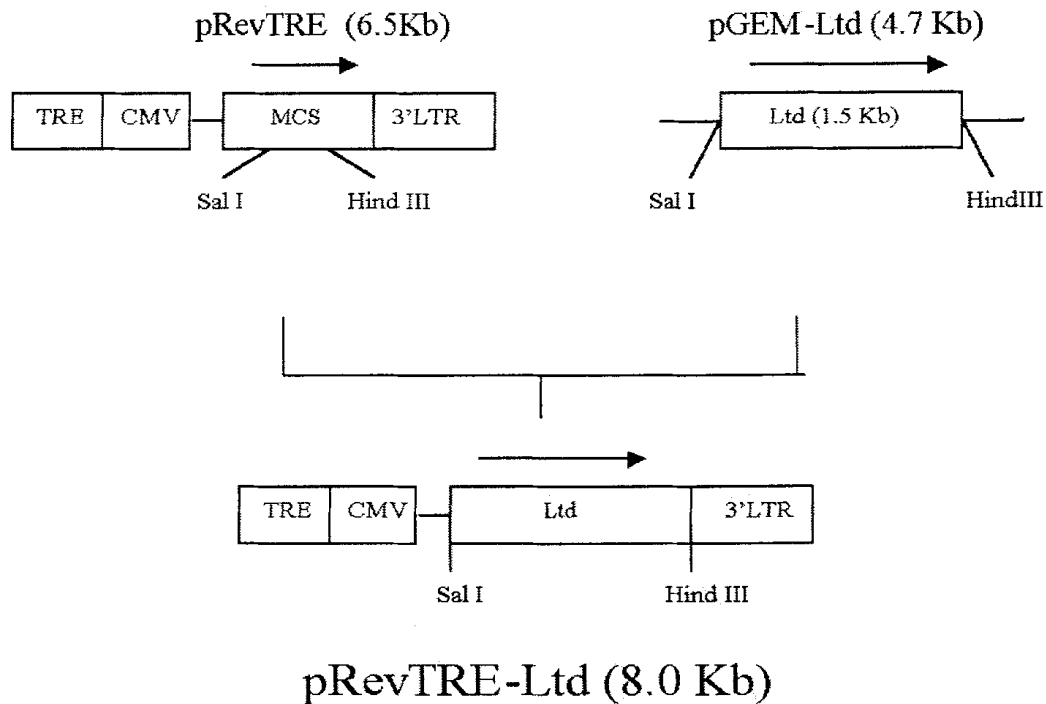


Fig. 12. Structures of retrovirus vectors. TRE, Tet-response element; LTR, long terminal repeat ; Ltd, human *Lactadherin* gene ; CMV, cytomegalovirus promotor ; MCS, multi cloning sites. The pRevTRE-Ltd was constructed by inserting the multi cloning sites of the pRevTRE with Ltd fragment derived from pGEM-Ltd.

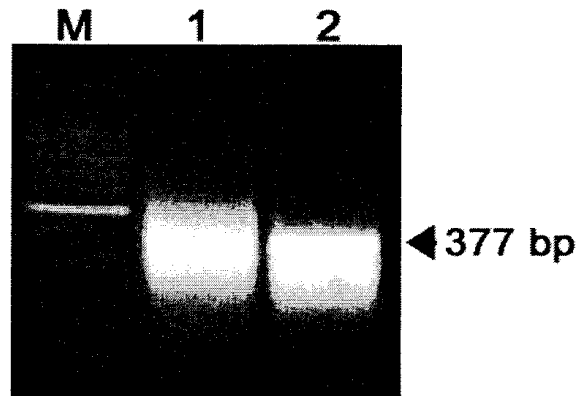


Fig. 13. Determination of doxycycline induction of the human *Lactadherin* gene in CHO cell using RT-PCR.

M : 100 bp ladder, 1 : CHO-RevTRE-Ltd-Rec-Tet On was grown in mEDIA prepared with tetracycline free FBS. 2 :

CHO-RevTRE-Ltd-Rec-Tet On was grown in media prepared with tetracycline free FBS supplemented with doxycycline (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

나. RNA의 분리 및 cDNA 합성

인체의 유선조직 0.5g을 조직분쇄기로 잘게 분쇄한 후에 Trizol 방법을 이용하여 총 70 µg의 total RNA를 분리하였다. 이 RNA에서 Life Science사의 1st strand 합성 kit를 이용하여 RT-PCR을 시작하여 cDNA를 합성을 시도하였다. 그러나 약 1.5 K로 추정되는 band는 나타나지 않았다. 그래서 반으로 나누어 clone하기 위하여 그 사이에 새로운 primer set를 추가하였다.

다. 중앙 Primer Design

Human lactadherin 유전자를 둘로 나누어 cloning하기 위하여 BA46 mRNA 의 염기서열에 근거하여 추가로 sense 및 anti-sense primer를 만들었다. Primer Designer를 사용하여 Tm이 비슷하고 GC 함량이 되도록 높지 않는 primer 조합을 선택하였다. 그 후 상동성 여부를 NCBI의 BLAST를 이용하여 검색하였으며 최종선택된 새 Primer는 Fig. 2와 같다.

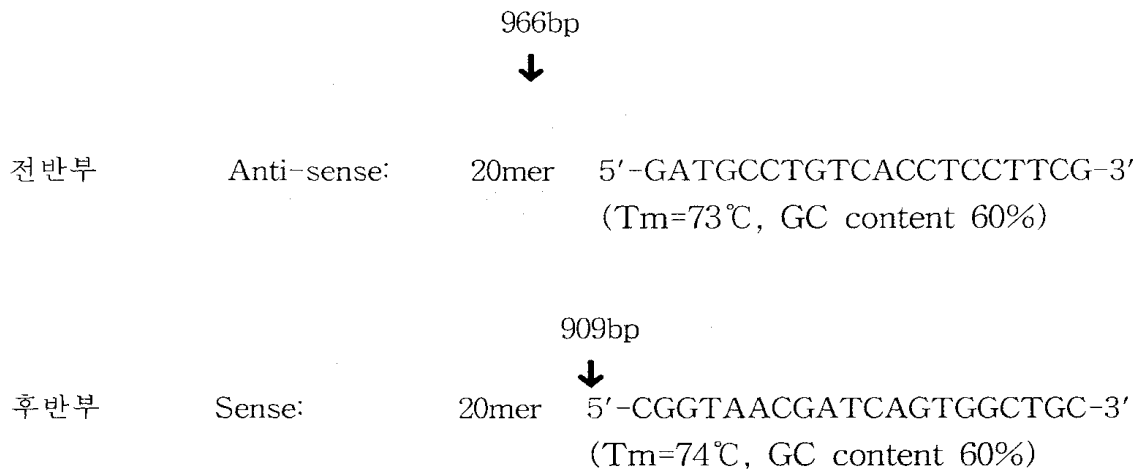


Fig. 2. Primer construction

라. RT-PCR에 의한 cDNA 합성

Life Science사의 1st strand 합성 kit를 이용하여 Total RNA를 template로 하고 합성된 primer대신 oligo-dT를 primer로 사용하여 1st strand를 합성하였다. 그리고 PCR을 통하여 전반부와 후반부의 cDNA를 따로 따로 합성하였다. 즉 Sense primer와 전반부 Anti-sense primer를 통하여 935 bp (Fig 3)의 band가 합성되었으며, 후반부 Sense primer와 Anti-sense primer를 통하여 609 bp (Fig 4)의 band가 합성되었다. 여기서 얻어지는 band들은 다시 제한효소 EcoR I으로 분석하여 확인한 결과 전반부는 531bp와 404 bp 그리고 후반부는 349 bp와 260 bp의 조각으로 분리되어 이곳에 유일한 EcoR I이 각각 하나씩 있는 lactadherin 유전자인 것으로 추측되었다.

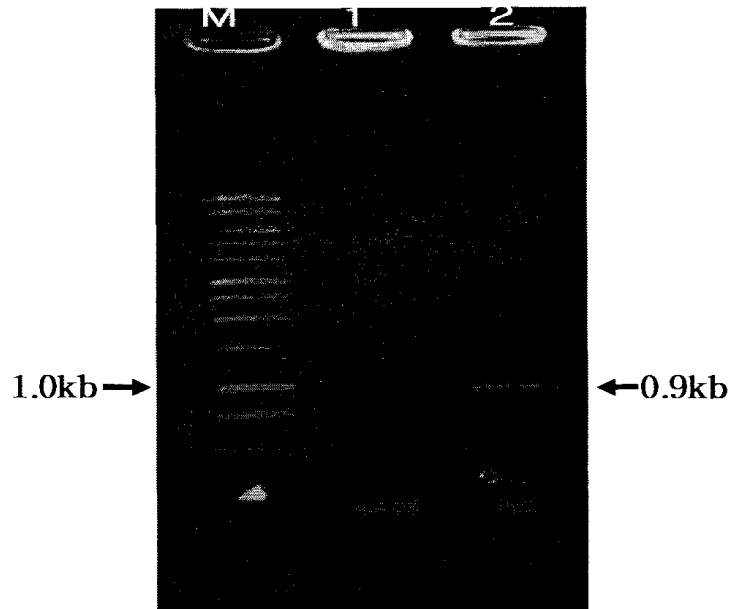


Fig. 3. Amplification of lactadherin A fragment by PCR product on 1% agarose gel electrophoresis(30 cycles, 94°Cdenaturation, 58°C annealing, 72°C extension).

M : 1kb Size marker DNA

Lane 1 : No template

Lane 2 : Lactadherin A fragment

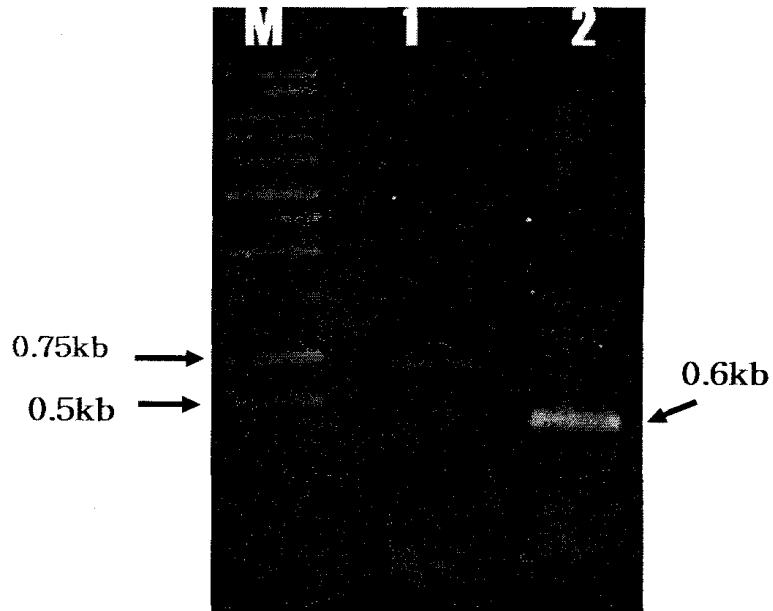


Fig. 4. Amplification of lactadherin B fragment by PCR product on 1% agarose gel electrophoresis(30 cycles, 94°C denaturation, 58°C annealing, 72°C extension).

M : 1 kb Size marker DNA

Lane 1 : No template

Lane 2 : Lactadherin B fragment

마. 조각 DNA 연결에 의한 cDNA clone 완성

후반부 Sense primer(20mer)와 전반부 Anti-sense primer (20mer) 사이는 Pst I site를 포함한 57bp가 중복되게 design되어 있어 이 제한효소로 각각 자르고 연결하면 sticky end ligation이 된다. 따라서 PCR products인 935 bp와 609 bp가 pGEM-T vector에 각각 따로 삽입되었다. 그후 *E.coli* cracking에 의한 방법으로 insert를 포함한 vector가 선택되었다. 이 두 vector는 각각 Pst I (Fig 5,6)으로 잘린후 다시 연결되었으며 역시 *E.coli* cracking (Fig 7) 방법으로 insert를 포함한 vector가 선택되었으며 이 vector는 1487bp의 인간 lactadherin cDNA clone을 완성하였고 제한효소 *EcoRI*으로 잘라 인간 lactadherin cDNA임을 확인하였다 (Fig 8).

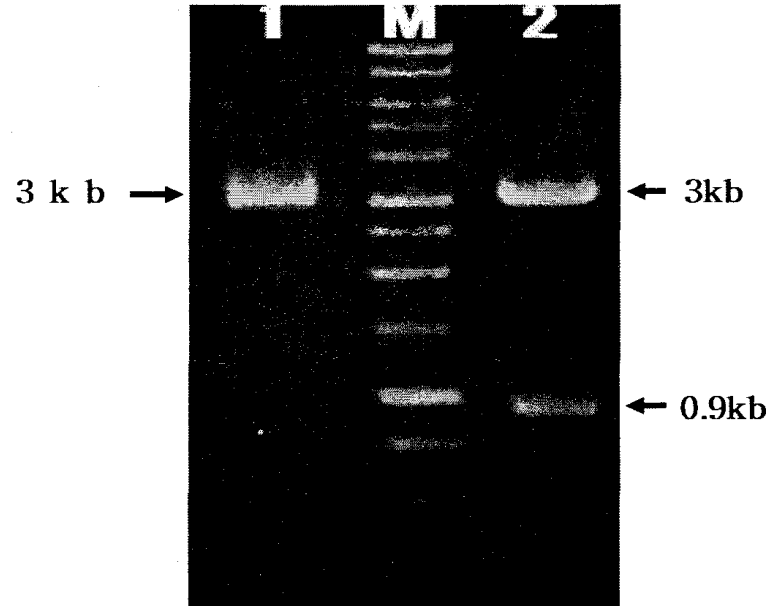


Fig. 5. Restriction enzyme analysis of the vector with lactadherin A fragment by *Pst I* on 1% agarose gel electrophoresis.

M : 1 kb Size marker DNA

Lane 1 : Vector DNA digested by *Pst I*

Lane 2 : Lactadherin A set digested by *Pst I*

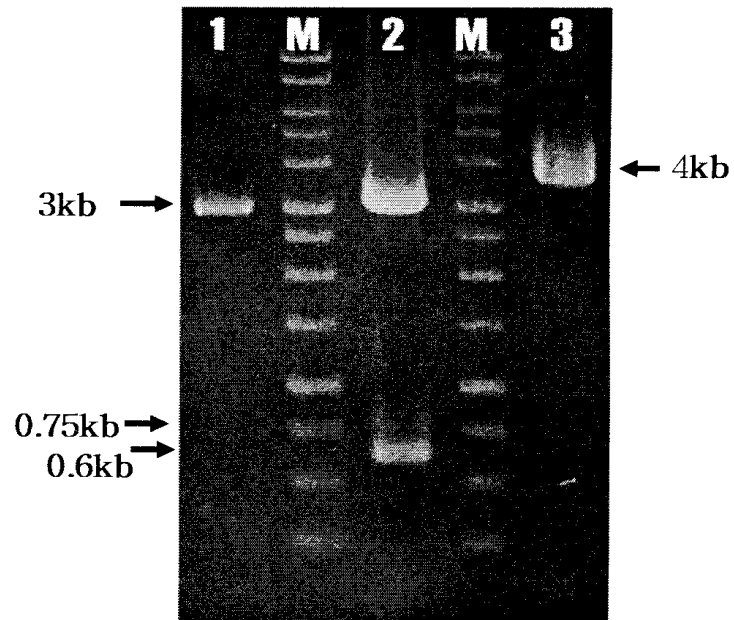


Fig. 6. Confirmation of orientation of lactadherin B fragment by *Pst I* on 1% agarose gel electrophoresis.

Lane 1 : Vector DNA digested by *Pst I*

M : 1 kb Size marker DNA

Lane 2 : Vector DNA with reversed insert by *Pst I*

M : 1 kb Size marker DNA

Lane 3 : Vector DNA with forwarded insert by *Pst I*

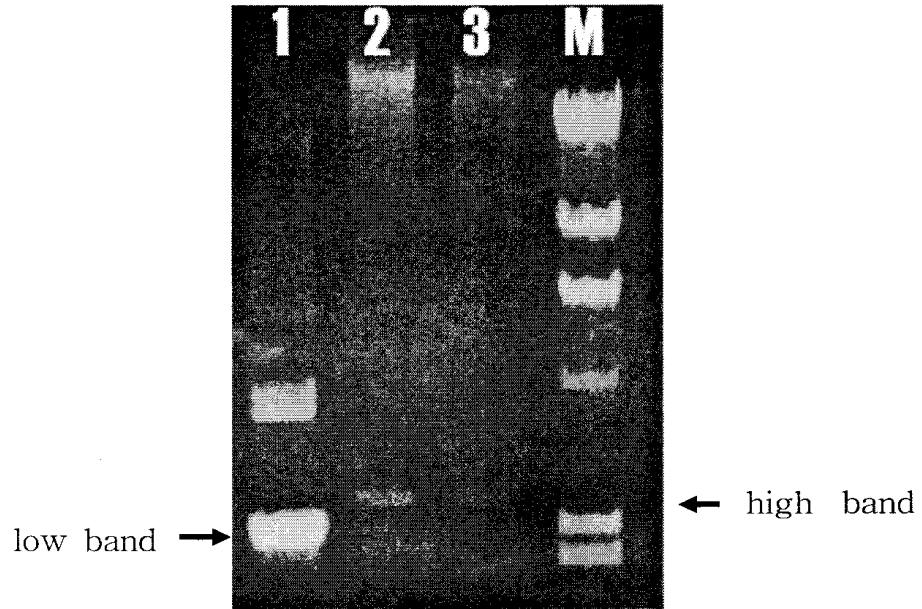


Fig. 7. Rapid screening of plasmid DNA with lactadherin inserts on 1% agarose gel electrophoresis.

Lane 1 : Vector DNA

Lane 2,3 : Vector DNA with the insert

M : 1 kb Size marker DNA

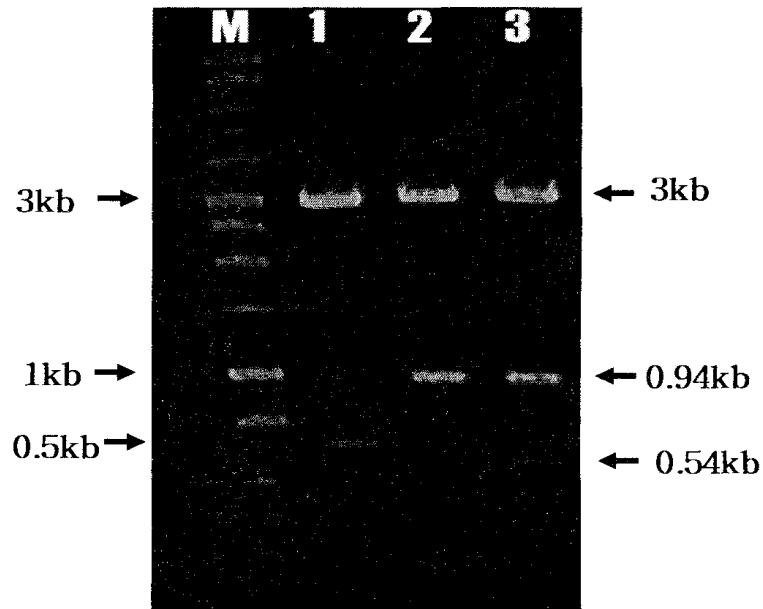


Fig. 8. Restriction enzyme analysis of lactadherin full fragment by *EcoR I* on 1% agarose gel electrophoresis.

M : Size marker DNA

Lane 1 : Vector DNA digested by *EcoR I*

Lane 2,3 : Vector DNA with lactadherin full set digested by *EcoR I*

바. Lactadherin 유전자의 염기 서열 비교 분석 및 SNP발견

본 연구에서 밝힌 한국 여성의 유방 조직으로부터 얻은 lactadherin 유전자의 (Fig 9, 10) 염기서열과 종래에 발표된 백인 여성의 lactadherin 유전자의 염기서열 (C)과 비교 분석하여 Fig. 11 과 같은 결과를 얻을 수 있었다. 백인여성의 lactadherin 유전자의 염기 서열과 비교하여 K1 여성에서는 67 번째 base에서 C가 A로 바뀌면서 그 amino acid가 Arg에서 Ser로 변화되었고, 454 번째 base에서 C가 T로 바뀌었지만 silent mutation으로 그 amino acid에는 아무런 변이가 없었으며, 1419 번째 base에서 G가 C로 변이되면서 Ser이 Thr로 바뀌었다. K2 여성에서는 다른 형태의 변이가 관찰되었다. 286 번째 base에서 A가 C로 바뀌면서 그 amino acid가 Met에서 Leu로 변화되었고, 329 번째 base에서 A가 G로 바뀌었지만 silent mutation이 되고, 1330 번째 base에서 G가 A로 변이되면서 Gly가 Ser로 바뀌었다. 이와같은 amino acid 수준의 변이 중 Ser으로의 변이는 Ser이 가지는 특성으로 인해 큰 의미를 갖게된다. Ser

은 다른 amino acid와는 달리 phosphorylation이 일어나는 amino acid로 이러한 Ser 이 백인 여성의 lactadherin 단백질보다 한국 여성의 그것에서 더 많이 존재한다는 것은 인산화와 관련된 단백질 수준에서의 변이가 있을 것이라는 것을 암시한다. 이렇게 관찰되어진 각각 3 곳의 염기 서열의 변이는 한국 사람이 가지는 lactadherin 유전자의 SNP(single nucleotide polymorphism)의 일부라고 생각되어지며 이것으로 백인 여성과 한국 여성의 lactadherin 유전자의 다형성의 유무를 확인 할 수 있었다.

```

TGCCCATTCAGCGCCCGCGTCCCCGCAGCATGCCGAGCCCCCGCCTGCTGGCCGCGC 58
TGTGCGGCGCGCTGCTCTGCGCCCCAGCCTCCTCGTCGCCCTGGATATCTGTTCCA 115
AAAACCCCTGCCACAACGGTGGTTTATGCGAGGAGATTTCCCAAGAAGTGCAGAGGA 171
GATGTCTTCCCCTCGTACACCTGCACGTGCCTTAAGGGCTACGCGGGCAACCACTGT 228
GAGACGAAATGTGTCGAGCCACTGGGCATGGAGAA'TGGGAACATTGCCAACTCACA 284
GATCGCCGCTCATCTGTGCGTGTGACCTTCTTGGGT'TTGCAGCATTGGGTCCCCGA 341
GCTGGCCCCGCTGAACCGCGCAGGCATGGTCAATGCC'TGGACACCCAGCAGCAATGA 398
CGATAACCCCTGGATCCAGGTGAAC'TTGTGCGGAGGATGTGGGTAACAGGTGTGG 454
TGACGAGGGTGCCAGCCGCTTGGCCAGTCA'TGAGTACCTGAAGGCCTTCAAGGTGGC 511
CTACAGCCTTAATGGACACGAA'TCGATTTTCATCCATGATGTTAATAAAAAACACA 567
AGGAGTTTGTGGGTAACTGGAACAAAACGCGGTGCATGTCAACCTGT'TTGAGACC 623
CCTGTGGAGGCTCAGTACGTGAGATTGTACCCACGAGCTGCCACACGGCCTGCACT 680
CTGCGCTTTGAGCTACTGGGCTGTGAGCTGAACGGATGCGCCAATCCCCTGGGCCTG 737
AAGAA'TAACAGCATCCCTGACAAGCAGATCACGGCTCCAGCAGCTACAAGACCTGG 794
GGCTTGATCTCTTCAGCTGGAACCCCTCCTATGCACGGCTGGACAAGCAGGGCAAC 851
TTCAACGCCTGGGTTGCGGGGAGCTACGGTAACGATCAGTGGCTGCAGGTGGACCTG 908
GGCTCCTCGAAGGAGGTGACAGGCATCATCACCCAGGGGGCCCGTAACTTTGGCTCT 965
GTCCAGTTTGTGGCATCCTACAAGGTTGCCTACAGTAATGACAGTGCGAACCTGGAC 1021
TGAGTACCAGGACCCAGGACTGGCAGCAGTAAGATCT'TCCCTGGCAACTGGGACAA1078
CCACTCCCACAAGAAGAACTTGT'TTGAGACGCCATCCTGGCTCGCTATGTGCGCAT 1135
CCTGCCTGTAGCCTGGCACAACCGCATCGCCCTGCGCCTGGAGCTGCTGGGCTGT'TAG1193
TGGCCACCTGCCACCCCCAGGTCTTCCCTGCTTTCCATGGGCCCCGCTGCCTCTTGGCTT 1251
CTCAGCCCCTTTAAATCACCATAGGGCTGGGGACTGGGGAAGGGGAGGGTGTTCAGA1308
GGCAGCACCCACACAGTCACCCCTCCCTCCCTCTT'TCCCACCCTCCACCTCTCACG 1366
GGCCCTGCCCCAGCCCCAACCCCGTCCCCTAACCCCAAGTCC'TCACTGTCC'TGTTT 1429
TCTTAGGCACTGAGGGATCTGAGTAGGTCTGGGATGGACAGGAAAGGGCAAAGTAG 1486
GGCGTGT 1493

```

Fig. 9. Confirmation of nucleotide sequence of Korean woman 1 lactadherin gene

TGCCCATTCAGCGCCCCGCGTCCCCGCAGCATGCCGCGCCCCCGCCTGCTGGCCGCGC 58
 TGTGCGGCGCGCTGCTCTGCGCCCCCAGCCTCCTCGTCGCCCTGGATATCTGTTCCA 115
 AAAACCCCTGCCACAACGGTGGT'TTATGCGAGGAGATTTCCCAAGAAGTGCGAGGA 171
 GATGTCTTCCCCTCGTACACCTGCACGTGCCTTAAGGGCTACGCGGGCAACCACTGT 228
 GAGACGAAATGTGTGCGAGCCACTGGGCCTGGAGAATGGGAACATTGCCAACTCACA 284
 GATCGCCGCTCGTCTGTGCGTGTGACCTTCTTGGGT'TTGCAGCATTGGGTCCCGGA 341
 GCTGGCCCCGCTGAACCGCGCAGGCAATGGTCAATGCCTGGACACCCAGCAGCAATGA 398
 CGATAACCCCTGGATCCAGGTGAACCTGCTGCGGAGGATGTGGGTAACAGGTGTGG 454
 TGACGCAGGGTGCCAGCCGCTTGGCCAGTCATGAGTACCTGAAGGCC'TCAAGGTG 510
 GCCTACAGCCTTAATGGACACGAATTCGATTTTCATCCATGATGTTAATAAAAAAC 565
 ACAAGGAGTTTG'TGGGTAAC'TGGAACAAAAACGCGGTGCATGTCAACCTGTTTGAG 621
 ACCCCTGTGGAGGCTCAGTACGTGAGAT'TGTACCCACAGAGCTGCCACACGGCCTGC 678
 ACTCTGCGCTTTGAGCTACTGGGCTGTGAGCTGAACGGATGCGCCAATCCCCTGGGC 735
 CTGAAGAATAACAGCATCCCTGACAAGCAGATCACGGCCTCCAGCAGCTACAAGACC 792
 TGGGGCT'TGCATCTCTTCAGCTGGAACCCCTCCTATGCACGGCTGGACAAGCAGGGC 849
 AACTTCAACGCCTGGGT'TGCGGGGAGCTACGGTAACGATCAGTGGCTGCAGGTGGAC 906
 CTGGGCT'CCTCGAAGGAGGTGACAGGCATCATCACCCAGGGGGCCCGTAACTTTGGC 968
 TCTGTCCAGTTTGTGGCATCCTACAAGGT'IGCCTACAGTAATGACAGTGCGAAGT 1024
 GACTGAGTACCAGGACCCCAAGGACTGGCAGCAGTAAGATCTTCCCCTGGCAACTGGGA1081
 CAACCACTCCCACAAGAAGAACTTGT'TTGAGACGCCCATCCTGGCTCGCTATGTGCG1138
 CATCCTGCCTGTAGCCTGGCACAACCGCATCGCCCTGCGCCTGGAGCTGCTGGGCTGT1196
 TAGTGGCCACCTGCCACCCCAAGGTCTTCCCTGCTTTCCATGGGCCCCGCTGCCTCTTGG1254
 CTCTCAGCCCC'TTAAATCACCATAGGGCTGGGGACTGGGGAAGGGGAGAGTGTTC1311
 AGAGGCAGCACCACCACACAGTCACCCCTCCCTCCCTCTTTCCCACCTCCACCTCTC 1369
 ACGGGCCCTGCCCCAGCCCCTAAGCCCCGTCCCCTAACCCCAAGTCC'TCACTGTCCCTG 1427
 TTTTCTTAGGCACTGAGGGATCTGAGTAGGTCTGGGATGGACAGGAAAGGGCAAAG1483
 TAGGGCGTGT 1493

Fig. 10. Confirmation of nucleotide sequence of Korean woman 2 lactadherin gene

	61	67	280	286	327
CATG	CCG CGC.....	CTG GGC	ATG.....	GCC TCA TCT
		Arg		Met	Ser
K1		AGC			
		Ser			
K2			CTG		TCG
			Leu		Ser

	454	1327	1330	1418
C CTG	CTG.....	GAG GGT	GTT.....CTA AGC
	Leu		Gly	Ser
K1	TTG			ACC
	Leu			Thr
K2		AGT		
		Ser		

Fig. 11. Sequence comparison of lactadherin among Caucasian and Korean
C : Caucasian, K1 : Korean 1, K2 : Korean 2
Bold letter : mutation

사. Probe 제작

앞에서 선택된 4개의 primer들은 probe로 직접 사용하였고 특히 가운데 위치한 두개의 primer 즉 전반부 Anti-sense(20 mer)와 후반부 Sense (20 mer) primer가 후에 있을 실험에서 probe로 쓰였고 또한 클론된 cDNA를 이용하여 Pst I 과 EcoR I 절단의 조합에서 얻어진 fragment를 biotin이 함유된 dTTP를 사용하여 nick translation을 하여 제작하였다.

아. Lactadherin 정제방법 확립 및 항체 생산

1) lactadherin 정제방법 확립

Lactadherin을 HPLC 등에 의한 전통적인 생화학적 정제방법으로 얻는 것은 시간적인 한계와 시료의 제한(충분한 모유 초유의 확보)때문에 어려움이 많았다. 그래서 이러한 방법에 의한 시도는 몇 차례에 그치고 실험전략을 수정하였다. 따라서 시간을 절약하면서 일의 효율을 높이고 일의 연속성이 높은 *E. Coli*에서 발현을 채택하였다. 즉 이미 클로닝된 lactadherin cDNA 유전자를 *E. Coli*에서 발현시키고 여기서 얻은 단백질을 이용하여 항체를 생산하는 방향으로 전략을 수정하였다. 우선 pGEMT vector에 클론된 lactadherin cDNA를 Not I (Fig 12)으로 절단 1.5 kb의 Not I 유전자 절편을 얻어 insert를 만들었다.

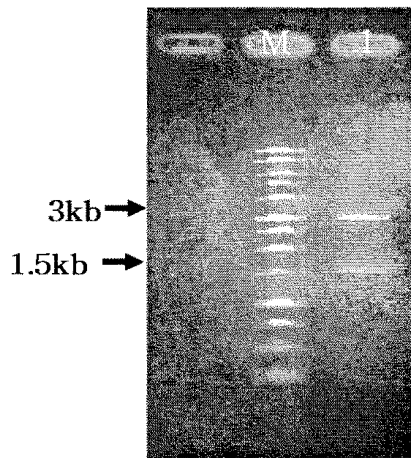


Fig. 12. Restriction enzyme analysis of lactadherin full length cDNA by *Not I* on 1% agarose gel electrophoresis.
M : 1 kb Size marker DNA
Lane 1 : Vector DNA with lactadherin full cDNA digested by *Not I*

발현벡터는 pET-32 (b)를 선택하여 유전자의 reading frame을 맞추었고 이를 Not 1으로 자른 다음 5.9 kb의 절편을 얻었고 CIAP를 처리하여 self ligation을 방지시킨 후 insert와 ligation을 실시하였다. *E. coli*의 transformation을 위하여 electroporator를 사용하여 10,000V/cm DC로 electroporation을 실시하였다. 여기서 얻은 vector를 cell cracking 방법(Fig 13)으로 insert의 유무를 확인한 다음 다시 insert의 방향을 제한효소로 확인하였다 (Fig 14).

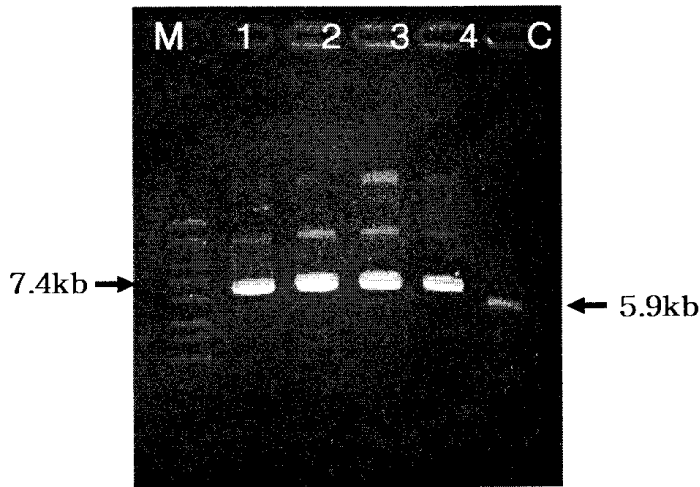


Fig. 13. Screening of plasmid DNA with lactadherin inserts on 1% agarose gel electrophoresis.

M : 1 kb Size marker DNA

Lane 1,2,3,4 : Vector DNA with the insert

Lane C : Vector DNA

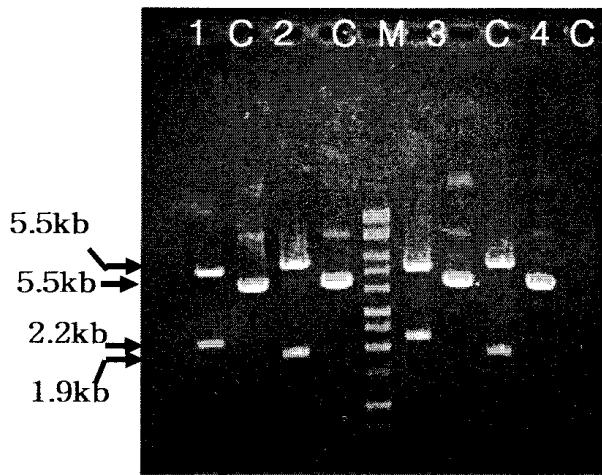


Fig. 14. Restriction enzyme analysis of lactadherin full length cDNA by *PstI* on 1% agarose gel electrophoresis.

M : 1 kb Size marker DNA

Lane 1,2,3,4 : Vector DNA with the insert

Lane C : Vector DNA

여기서 얻은 벡터는 *E. coli*의 발현 벡터이다. 그 후 이 vector의 reading frame을 DNA sequencing에 의하여 재차 확인하였다. 여기서 얻은 발현벡터는 BL21 cell line에 치환하기 위하여 다시 electroporation을 실시하여 host cell에 전이 시켰다. 여기서 얻은 cell을 OD 0.6 까지 키운후 냉장 보관후 그 1/10을 다음날 아침 다시 large culture에서 OD 0.6까지 배양하고 0.1mM IPTG로 6시간 유도하였다. 그 후 약 30분간 원심분리를 실시하고 수확한 cell을 PBS buffer에 부유시킨 후 1분간 10회 sonication을 실시 하고 다시 원심분리를 실시한후 10%의 SDS-PAGE로 (Fig 15) 분리하여 약 46k의 fusion단백질의 발현을 확인하였고 10%의 SDS-PAGE로 전기영동하여 분리된 gel을 nitrocellulose에 transfer시킨 다음 1/5000으로 dilute한 S-protein conjugate을넣고 s-tag에 결합시켜 NBT/BCIP를 기질로 사용하여 (Fig 16) 발현유무를 확인하는 방법으로 western blot을 실시하였고 발현된 부분의 band를 잘라 gel을 으갠 후 2 vol의 Tris-Cl (ph6.8) buffer를넣고 4°C에서 o/n shaking한 후 10000g로 원심 분리하여 상층 액만을 얻었다. 상층 액은 4 vol의 acetone를 첨가하여 - 20°C o/n으로 침전 시킨 후 다시 10000g에서 원심 분리하여 침전된 단백질을 PBS로 녹여 항체 생산을 위한 항원으로 사용하였다.

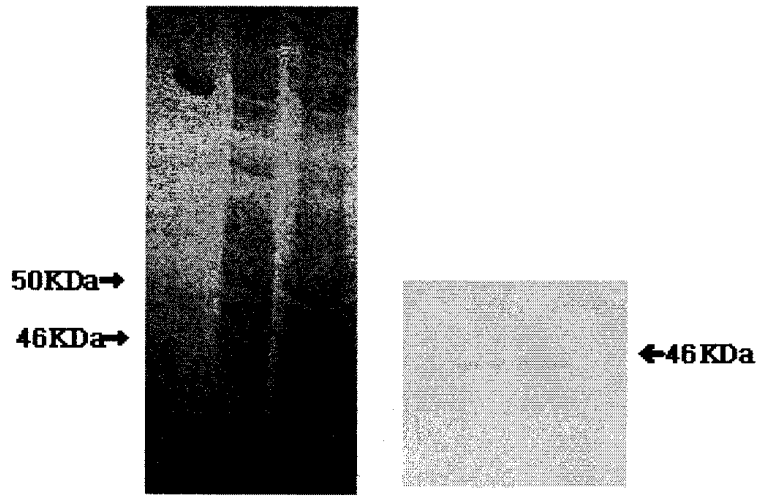


Fig. 15. SDS-PAGE Fig. 16. Lactadherin Western blot (20 ng)

2) 토끼에서 human lactadherin에 대한 항체 생산

*E. Coli*에서 발현시킨 Lactadherin을 2마리의 토끼에 일차 접종시켰다. 2주 간격으로 3차례 약 0.2 mg의 항원으로 추가 접종을 실시하였다. 혈액은 일주일에 2번씩 두 귀에서 번갈아 약 5 ml씩 채취하였다. 항체의 titer는 dot blot(Fig 17)의 방법으로 확인하였는데 1/1000, 1/3000, 1/5000, 1/10000 으로 항체를 dilute하여 dot blot을 실시하여 single이 가장 강하고 background가 가장 약한 1/10000 dilute을 선택하여 확인하였고 titer의 밝기 정도를 1-5까지 score를 매겨 평균값을 그래프로 나타내어 분석하였다 (Fig 18).

1/10000 dilution by sample A Ag



1/10000 dilution by sample B Ag



Fig. 17. Dot blot

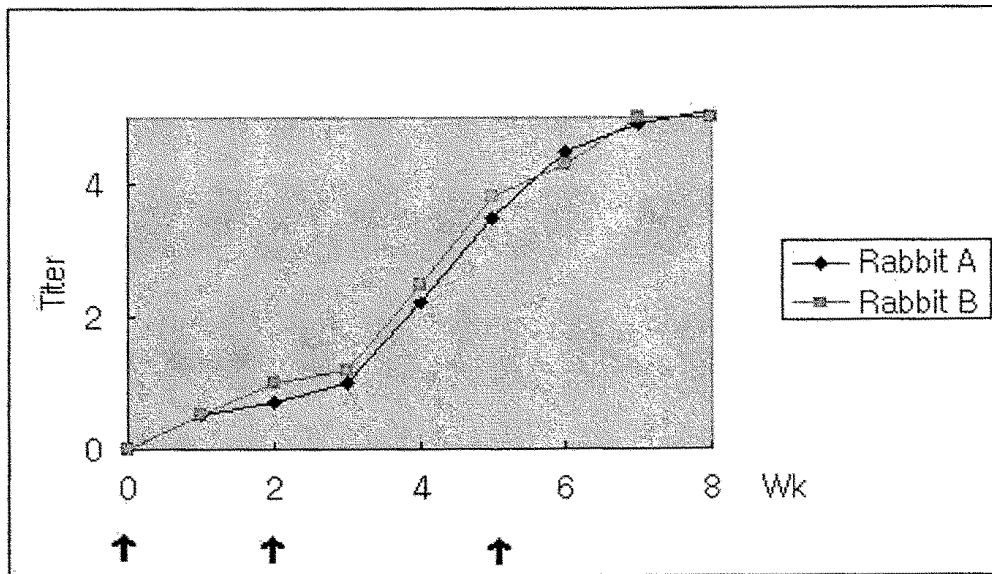


Fig. 18. Titer of rabbit anti-lactadherin
(The arrows indicate the injection of antigens)

자. Southern blot

비방사선 동위 물질인 biotin과 효소를 이용한 방법이 확립되었고 300bp의 plasmid fragment를 biotin이 결합된 dTTP를 이용하여 Nick translation한 후 가열하여 사용하였다. 최종 wash는 0,01 X SSC를 이용하였으며 발색은 Western blot에

서 사용하는 NBT와 BCIP를 기질로 이용하였다. 그 후 1-3시간 동안 developing시키는 이 방법은 10-20 pg의 target DNA를 측정하였고 (Fig 19), 이 방법은 PCR에 의한 선별 방법과 함께 형질전환 동물을 정확히 확인하는데 이용되었다.

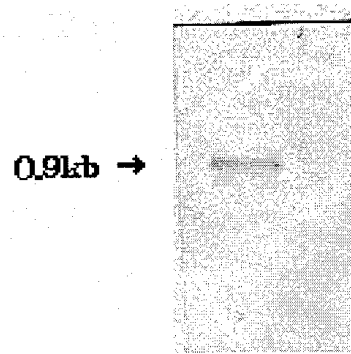


Fig. 19. Southern blot

차. Northern blotting/ RT-PCR

Total RNA는 Chomczynski 등(1987)의 single step 분리방법에 따라 분리되었고, 여기에 사용되는 probe는 biotin이 label된 nucleotide를 nick translation하여 사용하였다. 그후 Amersham Co.의 Hybridization 방법에 따라 1%의 Agarose gel을 denature한 조건하에서 실행하고 Hybond-N membrane을 사용하여 transfer한 다음, 42°C에서 Hybridization을 실시하였다. 그러나 이 방법에서는 signal이 약하여 이를 강화하는 필요성이 제기되었다. 방사선 동위원소를 이용하는 방법이 또 하나의 대안이기는 하지만 현실적인 면을 고려하여 또다른 RNA 측정법인 RT-PCR을 이용하였다. 우선 lactadherin을 발현하는 tissue를 수집해서 RNA를 분리후 reverse transcription하여 first strand를 만들고 PCR을 (Fig 20) 통하여 증폭정도를 보고 RNA측정량을 결정하였다. 이 방법에서는 소량의 mRNA (1pg)의 측정이 가능하고 이에 필요한 조건도 확립되었다.

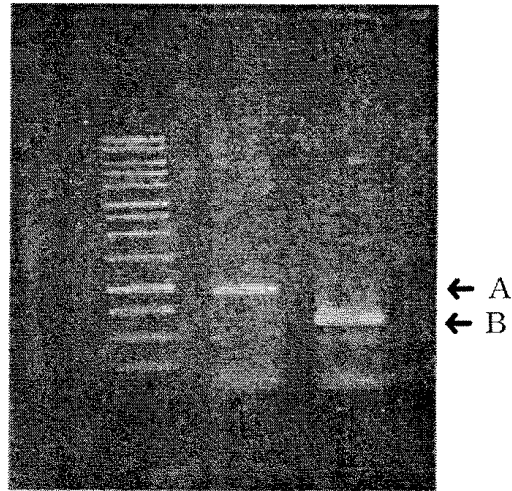


Fig. 20. Identification of lactadherin A, B fragment RT-PCR product by 1% agarose gel electrophoresis.
M : 1 kb Size marker DNA
Lane 1, 2 : Lactadherin A, B set fragment

카. Western blot

우유에서 지방을 일차분리하고 분리된 지방구에서 lactadherin을 포함하는 fraction에 Yom 등(1992)의 방법으로 토끼의 1차 항체와 양의 2차 항체를 이용하여 실시하였고, alkaline phosphatase를 이용하는 NBT-BCIP 방법을 사용하였다. 우선 lactadherin을 포함하는 단백질을 10% SDS-PAGE(Fig 21)로 전기영동하여 분리된 gel을 nitrocellulose에 transfer시킨 다음 토끼의 1차 항체와 양의 2차항체-효소 conjugate를 차례로 결합시키고 NBT-BCIP를 기질로 하여 발색을 확인하였다 (Fig 22). 이 방법은 10-20ng의 sensitivity를 가지고 있음이 확인되었다. 특히 부분 정제를 실시한 sample의 경우 극소량의 발현 단백질을 측정할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 약 70kDa의 밴드도 발색되는 것을 확인하였으며 이는 milk mucin으로 확인되었는데 몇몇 작은 분자들과 70KDa의 glycoprotein, butyrophilin 그리고 46KDa의 glycosylated component, lactadherin을 포함하고 있는 milk mucin은 associated molecular임이 밝혀졌다.

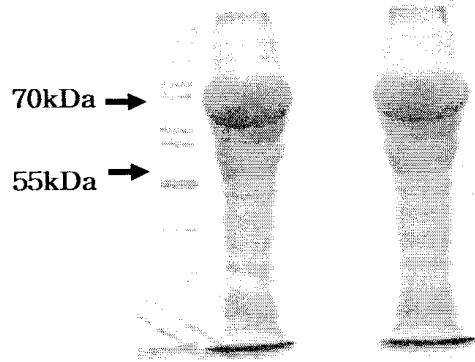


Fig. 19. Human milk SDS-PAGE

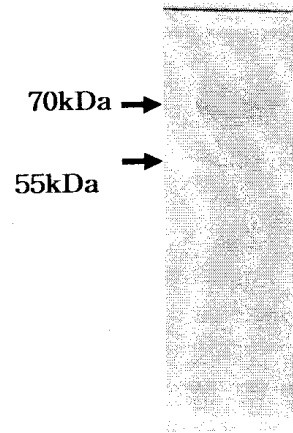


Fig. 20. Western blot

타. 2D-gel electrophoresis using immobilized pH gradients

우유에서 지방을 일차 분리하고 분리된 지방구를 rehydration solution과 섞어 total volume 250 μ 를 strip holder에 loading한 후 dry strip gel을 strip holder에 올려 놓아 샘플이 골고루 퍼지도록한 후 dry strip cover fluid solution을 가득채우고 IPG strip cover를 덮고 Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System을 이용하여 first-dimension step과 Isoelectric Focusing을 동시에 실시하였다 (Fig 23).

Program steps

Protocol # 1

HUMAN_MILK

Rehydration

10 : 00 Hrs at 20 °C

IEF

20 °C 50 μ A max

S1 step - n - hold or Gradient

500 V 01 : 00 Hrs

S2 step - n - hold or Gradient

2000V 01 : 00 Hrs

S3 step - n - hold or Gradient

8000V 02 : 00 Hrs

Fig. 23. First dimension protocol worksheet

IEF가 끝난후 strip gel을 equilibration sol에 넣어 30min간 shaking하여 rehydration solution을 제거한후 10% SDS-PAGE로 second dimension step (Fig. 24)을 실시하여 human lactadherin의 M.W값과 pI값을 확인할수 있었다.

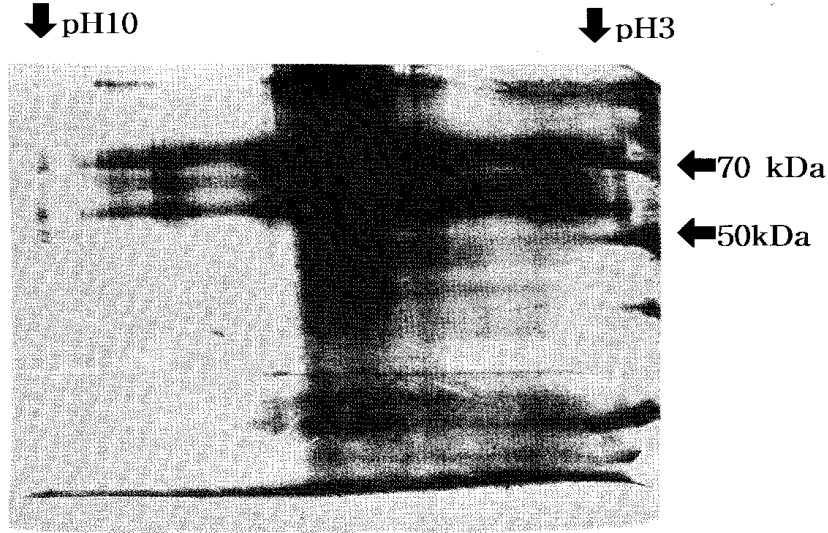


Fig. 24. 2-D image of human milk

파. 한국여성의 lactadherin SNP

추가로 4명의 한국여성의 유선조직을 얻어 종래 Couto (1996)등에 의해 밝혀진 백인여성의 lactadherin 유전자의 염기서열과 비교하여 그 차이점을 분석하였다. (Fig. 25, 26) 조직은 normal breast tissue (1, 3), cancer breast tissue (1), cancer breast tissue의 normal tissue (2, 2')부분을 각각 클론하여 그 염기서열을 비교하고 mutant 정도를 분석하였다. cancer tissue의 경우 coding region (stop codon 전)에서도 mutant발생 빈도가 normal tissue보다 많았으며 특히 stop codon후에는 거의 대부분의 염기서열이 mutant된 것으로 확인되었으며 normal tissue의 경우 stop codon전에는 mutant정도가 극히 적거나 silent mutant였지만 stop codon후에 mutant 발생빈도가 stop codon전 보다는 많은 것으로 밝혀 졌는데 이는 post-translational modification을 거치면서 coding region후의 염기서열은 외부환경에 잘 보호받지 못하는 것으로 생각되어진다. 또한amino acid 수준의 변이 중 Ser으로의 변이는 Ser이 가지는 특성으로 인해 큰 의미를 갖게된다. Ser은 다른 amino acid와는 달리 phosphorylation이 일어나는 amino acid로 이러한 Ser이 백인 여성의 lactadherin 단백질보다 한국 여성의 그것에서 더 많이 존재한다는 것은 인산화와 관련된 단백질 수준에서의 변이가 있을 것이라는 것을 암시한다.

	BASE	BASE변화	A.A변화	비고
Cancer1	535	AAG->CAA	Lys->Gln	M
	664	GCT->CTT	Ala->Leu	M
	697	GTC->GCC	Val->Ala	M
	1126	AAC->GAC	Asn->Asp	M
	1222	TAG->TAA	STOP	S.M
NORMAL 1	422	ATC->ATT	Ile->Ile	S.M
	541	GCC->GCT	Ala->Ala	S.M
NORMAL 2	286	ATG->CTG	Met->Leu	M
	324	TCA->TCG	Ser->Ser	S.M
	1330	GGT->AGT	Gly->Ser	M
NORMAL 2'	286	ATG->CTG	Met->Leu	M
	324	TCA->TCG	Ser->Ser	S.M
	415	CCC->CGC	Pro->Arg	M
	433	AAC->AAA	Asn->Lys	M
	442	ATC->ATT	Ile->Ile	S.M
	445	CAG->CAA	Gln->Gln	S.M
NORMAL 3	67	CGC->AGC	Arg->Ser	M
	454	CTC->TTG	Leu->Leu	S.M
	1418	AGC->ACC	Ser->Thr	M

Fig. 25. Stop전의 염기서열 분석결과

	BASE	BASE변화	A.A변화	비고
CANCER 1	1243	AGG->AAG	Arg->Lys	M
	1252	TGC->TGG	Cys->Try	M
	1258	CCA->TCA	Pro->Ser	M
	1264	GCC->GGC	Ala->Gly	M
	1270	TGC->TGT	Cys->Cys	S.M
	1273	CTC->GTC	Leu->Val	M
	1279	GTC->GGG	Ala->Gly	M
	1285	CAG->CAT	Gln->His	M
	1291	CTT->CTC	Leu->Leu	S.M
	1294	TAA->TAT	STOP->Tyr	M
NORMA L 1	1297	ATC->ATA	Ile->Ile	S.M
	1300	ACC->ATC	Thr->Ile	M
NORMA L 2'	1306	GGG->AGG	Gly->Arg	M
	1309	CTG->ATG	Leu->Met	M
NORMA L 2'	1294	TAA->TAT	STOP->Tyr	M
	1297	ATC->ATA	Ile->Ile	S.M

Fig. 26. Stop후의 염기서열 분석결과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절. 연구개발의 목표 달성도

본 연구는 3년간의 연구를 수행함에 있어서 1차년도는 형질전환동물 생산을 위한 최적 생산체계를 적립하기 위하여 GFP marker gene을 expression 하는 vectovirus를 이용하여 생쥐의 미수정란과 소의 미수정란에 retrovirus의 감염조건을 확립하였고 형질전환 동물의 생산을 위하여 marker gene이 전이된 형질전환 동물을 생산하기 위하여 수정란 이식을 실시하는등 미수정란에 retrovirus vector system을 이용한 효율적인 유전자 전이 방법을 확립하였다. 또한 LacZ, GFP marker gene을 이용하여 여러 가지 promoter중 쥐와 소의 유방세포에서 발현이 가장 우수한 promoter를 선택하고 이를 통해 lactadherin을 발현하는 retrovirus vector를 구축하는등 유선조직 세포에서 발현되게 design된 retrovirus vector를 구축하였으며 human lactadherin 유전자를 cloning하였다. 2차년도는 lactadherin 유전자가 전이된 소의 미수정란을 체외수정 시킨 후 대리모에 이식하고 유전자의 정상발현 검색을 위한 제1협동과제에서 구축한 lactadherin 유전자를 전이시키는 retrovirus vector system을 이용한 형질전환 쥐를 생산하였으며 Human lactadherin 유전자가 전이된 형질전환 송아지 생산을 위한 수정란 이식을 통하여 Human lactadherin 유전자가 전이된 소의 embryo와 형질전환 쥐의 생산을 시도하였다. 또한 human lactadherin을 생산하는 VSV-G based retrovirus vector producing cell의 개발과 retrovirus vector를 개발하였고 retrovirus로 쥐와 소의 유방세포에 lactadherin 유전자를 전이시켰다. 그리고 retrovirus에 의해 유전자가 전이된 유방세포의 생물학적 안정성 검사를 실시하였으며, *E.coli*에서 발현시킨 lactadherin을 이용하여 항체생산을 시도하였으며, 형질전환동물을 선별하기 위한 Southern blot과 lactadherin의 효능을 평가하기 위한 lactadherin의 bioassay 방법을 확립하였다. 3차년도는 두 협동기관과 협조하에 형질전환 수정란을 계속 생산하였고 공란우에 이식을 실시하였다. 또한 WAP promoter의 발현상 여러문제점을 해결하기 위한 새로운 vector system을 개발하기 위하여 inducible promoter인 tetracycline-controllable promoter 통제하에 human lactadherin 유전자를 도입한 retrovirus vector를 구축하였고 *in vitro* 상에서 tetracycline의 induction 여부에 따른 human lactadherin 유전자의 발현을 확인하였으며 lactadherin 유전자의 전이 및 발현을 검정하기 위하여 Northern blotting과 Western blotting을 실시하였고 우유중의 성분분석을 위하여 first-dimension과 second-dimension step을 실시하였다. 또한 여성의 유선조직에서 lactadherin 유전자의 SNP에 대한 연구를 진행하였다.

따라서 이들 3년간에 걸친 연구의 결과는 보다 효율적으로 형질전환동물 생산을

위한 연구에 귀중한 자료로 활용되리라 본다.

제 2 절. 대외 기여도

본 연구의 최종 목표인 형질 전환 젓소의 생산에는 실패하였으나 연구 수행 과정에서 얻은 각종 결과들의 활용을 통해 다음과 같은 관련 분야의 기술 발전에 기여할 수 있는 학문적 기초를 갖추게 되었다.

- 효율적인 형질전환동물의 새로운 생산 방법이 개발되었으며, 이 결과는 또한 형질전환 가금 및 형질전환 어류의 생산에도 적용이 가능하다.
- 본 연구에서 생산된 고농도의 retrovirus stock은 사람의 유전자 치료법에도 직접적인 응용이 가능하다.
- 기존 기술의 10% 정도 비용으로 형질전환 동물을 생산할 수 있어서 보다 많은 국내의 연구기관이 다양한 형질전환 가축을 생산할 수 있다.
- 첨단 기술의 국내개발 가능성을 제시하여 농업 분야에서의 첨단기술 개발의 기폭제로 작용할 것이다.
- 우유의 성분을 인위적으로 바꾸어서 유제품의 경제적 가치를 현저히 향상시킬 수 있다는 가능성을 제시한다.
- 가축의 생체를 통해 고부가가치 물질을 생산하는 신기능 동물의 창출에 필요한 기술의 기반 확립
- 농업 첨단 기술을 응용한 새로운 산업군의 형성과 Gene bank system들의 정립 및 활성화
- 본 연구에서 cloning 한 유전자는 국제간 우수 유전자의 상호교류를 통해 협력의 증대를 가능케 한다.
- 고부가 가치성 희귀물질을 대량 생산하는 연구에 기반을 제공함으로써 세계시장 내에서의 국내 축산업의 경쟁력을 강화할 수 있다.
- Human lactadherin은 사람뿐만 아니라 동물에도 rotavirus성 설사 방지제로 사용될 수 있기 때문에 전망이 매우 밝다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구는 세계적으로 유전자 재조합 형질전환동물을 생산하며 인류에 획기적으로 공헌할 수 있는 방안으로 연구가 추진되고 있는 생명공학의 축산적 응용을 위한 형질전환동물의 생산기법의 연구가 추진되고 있는 실정인바 본 기술개발을 모델로 하여 다음과 같은 목적의 연구와 연계시켜 사회·경제적으로 삶의 질을 향상시킬 수 있는 기술을 국내관련기관에 이전하고자 한다.

가. 활용분야

- 유전자 재조합에 관련된 연구 및 산업활동분야
- 외래유전자를 난자내에 도입하려고 시도하는 모든 연구 분야
- 동물 수정란의 이용효율을 제고하고자 하는 모든 연구 및 산업분야
- 동물의 특이부위를 형질전환시켜 유용 단백질을 생산하고자 하는 모든 연구와 산업분야
- 형질전환동물을 생산하고자 하는 모든 연구와 산업분야
- Animal bioreactor system을 개발하고 bioactive substances를 동물체에서 생산하고자 하는 모든 연구와 산업분야
- 사람의 유전자치료분야
- 형질전환 가축생산의 기초기술분야

나. 활용방안

- 개발된 기초기술은 학술지에 발표하고 특허권을 획득한 다음 관련 연구진과 산업계에 보급 활용
- 연구중에 얻어진 retrovirus vector gene transfer system을 국내관련 연구기관에 보급
- 수정란의 동결융해 기술 개발에 의한 우수 유전자의 시간적, 공간적 제약 극복
- 임신우의 사양관리 기술개발에 기여
- 본 기술을 국내 여타기관 또는 산업체에 이전하여 관련 기술인력 양성
- 금후 형질전환 가축생산 등 기술적 기반 확보
- 포유동물의 수정, 발생, 분화 및 생리기전에 관한 기초 연구 자료를 제공하여 줌으로써 전반적인 동물 생명공학의 발전에 기여

또한 본 연구의 계속적인 추가연구를 통해서 기술체계학립에 의한 연구결과를 국내 유관기관에 이전하여 공동으로 활용시 국제경쟁력이 있는 축산업의 산업화가 실현될 수 있을 것이다.

제 6 장 참고문헌

Bohl D, Naffakh N, Heard JM. (1997). Long-term control of erythropoietin secretion by doxycycline in mice transplanted with engineered primary myoblasts. *Nat Med.* Mar;3(3):299-305.

Bremel, R. D., Yom, H. C., and Bleck, G. T. (1989). Alteration of milk composition using molecular genetics. *Journal of Dairy Science.* 72: 2826-2833.

Burdon T, Sankaran L, Wall RJ, Spencer M, Hennighausen L. (1991). Expression of a whey acidic protein transgene during mammary development. Evidence for different mechanisms of regulation during pregnancy and lactation. *J Biol Chem.* Apr 15;266(11):6909-14.

Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., and Yee, J-K. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 8033-8037.

Carver, A. S., Dalrymple, M. A., Wright, G., Cottom, D. S., Reeves, D. B., Gibson, Y. H., Keenan, J. L., Barrass, J. D., Scott, A. R., Colman, A., etc. (1993). Transgenic livestock as bioreactors: Stable expression of human alpha1-1-antitrypsin by a flock of sheep. *BIO/TECHNOLOGY.* 11: 1263-1270.

Chan, A. W. Homan, E. J., Ballou, L. U., Burns, J. C., and Bremel, R. D. (1998). Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 14028-14033.

Chomczynski, P. (1991). The RNAzol B method. *Tel-net Inc. Bulletin No1.*

Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke P. J., Kane, J. J. Jerry, J., Blackwell, C., de Leon F. A. P., Robl, J. M. (1998). Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280: 1256-1258.

Couto JR, Taylor MR, Godwin SG, Ceriani RL, Peterson JA. (1996). Cloning and

sequence analysis of human breast epithelial antigen BA46 reveals an RGD cell adhesion sequence presented on an epidermal growth factor-like domain. *DNA Cell Biol.* Apr;15(4):281-6.

Ebert, K. M., Low, M. J., Overstrom, E. W., Buonomo, F. C., Baile, C. A., Roberts, T. M., Lee, A., Mandel, G., and Goodman, R. H. (1988). A moloney MLV-rat somatotropin fusion gene produces biologically active somatotropin in a transgenic pig. *Molecular Endocrinology.* 2: 277-283.

Ebert, K. M., Selgrath, J. P., DiTullio, P., Denman, J., Smith, T. E., Memon, M. A., Schindler, J. E., Monastersky, G. M., Vitale, J. A., and Gordon, K. (1991). Transgenic production of viriant of human tissue-type plasminogen actvator in Goat Milk: Generation of transgenic goats and analysis of expression. *BIO/TECHNOLOGY.* 9: 835-838.

Couto JR et al. (1996) Cloning and sequence analysis of human breast epithelial antigen BA46 reveals an RGD cell adhesion sequence presented on an epidermal growth factor-like domain. *DNA Cell Biol* 15, 281-6.

Hennighausen, L., C. Westphal, L. Sankaran and C. W. Pittius. 1991. Regulation of expression of genes for milk proteins. *Biotechnol.* 16: 65-74.

Hwang, L. S., and Gilboa, E. (1984). Expression of genes introduced into cells by retroviral infection is more efficient than that of genes introduced into cells by DNA transfection. *Journal of Virology.* 50: 417-424.

Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H., Tsunoda, Y. (1999). Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282: 2095-2098.

Kim, T., Leibfried-Rutledge, M. L., First, N. L. (1993). Gene transfer in bovine blastocysts using replication-defective retroviral vectors packaged with Gibbon Ape Leukemia virus envelopes. *Molecular Reproduction and Development* 35: 105-113.

Kim, T., Park, S. P. (1995a). Expression of E. coli LacZ gene in bovine morulae or blastocysts after microinjection of retrovirus vector-producing cells into the perivitelline space of one- to four-cell embryos. *Kor. J. Animal Reprod.* 19: 35-41.

Kim, T., Park, S. P. (1995b). Transfer and expression of E. coli LacZ gene in bovine embryos by co-culturing with retrovirus vector-producing cells. *Kor. J. Animal Reprod.* 19: 89-93.

Lin, S., Galiano, N., Culp., Burns, J. C., Friedmann, T., Yee, J.-K., and Hopkins, N. (1994). Integration and germ-line transmission of a pseudotyped retroviral vector in zebrafish. *Science* 265: 666-668.

Mayford, M., M. E. Bach, Y. -Y. Huang, L. Wang, R. D. Hawkins and E. R. Kandel. 1996. Control of memory formation through regulated expression of a CaMK II transgene. *Science* 274: 1678-1683.

Newburg DS et al. (1998) Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. *Lancet*, 351, 1160-4.

Paleyanda, R. K., D. W. Zhang, L. Hennighausen, R. A. McKnight and H. Lubon. 1994. Regulation of human protein C gene expression by the mouse WAP promoter. *Transgenic Res.* 3 (6): 335-343.

Palmiter, R. D., Brinster, R. L., Hammer, R. E., Trumbauer, M. E., Rosenfeld, M. G., et al. (1982) Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature.* 300: 611-615.

Perez, J. F., Ruiz, M. C., Chemellome, M. F. (1999). Characterization of a membrane calcium pathway induced by rotavirus infection in cultured cells. *J. Virology* 73: 2481-2490.

Pittius, C. W., L. Sankaran, Y. J. Topper and L. Hennighausen. 1988. Comparison of the regulation of the whey acidic protein gene with that of a hybrid gene containing the whey acidic protein gene promoter in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.* 2 (11): 1027-1032.

Polak, J. M. and S. Van Noorden. (1983) Immunocytochemistry: Practical applications in pathology and biology. John Wright & Sons, Bristol, England

Rosenkrans, C. F., and First, N. L. (1991). Culture of bovine zygote to the blastocyst stage effect on amino acids and vitamins. Theriogenology. 35: 266 (Abstract).

Rosenkrans, C. F., Zeng, G. Q., McNamara, G. T., Schoff, P. K., and First, N. L. (1993). Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. Biol. Repro. 49: 459-462.

Salter, D., Gearhart, J. (1999). Putting stem cells to work. Science 282: 1468-1470.

Savatier, P., Morgenstern, J., and Beddington, R. S. P. (1990). Permissiveness to murine leukemia virus expression during preimplantation and early postimplantation mouse development. Development. 109: 655-665.

Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. (1996): Factors affecting survival rates of *in vitro* produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. Anim Reprod Sci. 16;45(3):191-200.

Vize, P. D., Michalska, A. E., Ashman, R., Lloyd, B., Stone, B. A., Quinn, P., Wells, J. R. E., and Seamark, R. F. (1988). Introduction of a porcine growth hormone fusion gene into transgenic pigs promotes growth. J. of Cell Science. 90: 295-300.

Wilmot, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., and Campbell, K. H. S. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature 385: 810-813.

Wright, G., Carver, A., Cottom, D., Reeves, D., Scott, A., Simons, P., Wilmot, I., Garner, I., and Colman, A. (1991). High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. BIO/TECHNOLOGY. 9: 830-834.

Yang, Y., Vanin, E. F., Whitt, M. A., Fornerod, M., Zwart, R., Schneiderman, R. D., Grosveld, G., and Nienhuis, A. W. (1995). Inducible, high-level production of infectious murine leukemia retroviral vector particles pseudotyped with vesicular stomatitis virus G envelope protein. *Human Gene Therapy*. 6: 1203-1213.

Yee, J-K., Friedmann, T., Burns, J. C. (1994). Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods in Cell Biology*. 43: 99-1207.

Yom, H. C. and R. D. Bremel. (1992). Xerographic paper as a transfer medium for Western blot. *Anal. Biochem*. 200: 249-253.

Yom, H.C. (1991) Genetic engineering of milk proteins in transgenic animals. Ph. D. Thesis. University of Wisconsin-Madison, WI, USA