

Clone Animal Production

서울대학교 수의과대학

황우석 · 노상호 · 이병천

머 리 말

1997년 2월 24일 전세계 매스컴은 Scotland의 Roslin 연구소에 근무하는 Wilmut박사 그룹의 Dolly라는 羊의 탄생발표에 관하여 일제히 보도하기 시작하였으며 즉각 커다란 충격과 반향을 일으켰다. 그것은 기존 생물학적 개념으로는 불가능한 것으로 인식되어 왔던 포유동물의 성체세포를 이용한 핵이식 과정의 결과로 생명체의 탄생을 이룩했다는 학문적 의의와 이 기술이 진전되면 머지않은 장래에 인간복제도 가능할 것이라는 전망 때문이었다. 즉각 교황청의 견해와 우려가 발표되었으며, 클린턴 대통령이 미국정부에 후속조치 수립을 명하였고 일부 국가에서는 인간복제를 비롯한 생명체의 인위적 조작에 대한 규제와 금지법률을 제정하거나 준비에 착수하기도 하였다.

국내에서도 유사한 논쟁들이 대중매체를 통해 연속되었고, 창조과학회, 녹색환경연합을 비롯한 학술, 환경, 종교 단체들의 인간복제에 대한 우려가 표출되었다. 이어 4월에는 국회가 주관이 되어 각계인사로 구성된 "생명공학 안전윤리 협의회"가 발족되어 관련 기준 및 법제정을 추진중이다. 또한 보건복지부에서는 7월 22일부터 발효될 "유전자 재조합 실험 지침"이 성안되었다고 한다. 그러나 생명체 복제에 관한 정확한 실체를 파악하지 못한 상태에서 이와같은 논쟁이 확대, 진행된다면 자칫 싹트기 시작한 국내 관련 연구분야의 의욕을 저하시키거나 연구지원이 감축되어 선진국과의 격차가 더욱 확대되고 생명공학기술 종속국으로 전락될 수도 있을 것이다. 반면, 이러한 기술이 무제한 상태로 방임되어 다중이 우려하는 바와 같이 인간복제에의 시도 유혹과 생물재해 초래의 위협에 노출된다면 또 다른 문제를 야기할 수도 있을 것이다.

이와 같은 예민한 논제에 대해서는 객관적으로 실체를 이해하고 그에 대한 관점을 정립할 필요가 있을 것으로 생각되어 동물복제에 대한 개괄적 과정을 소개하며 향후 예측되는 효용성과 문제점을 살펴보기로 하겠다.

동물복제술의 정의

동물체의 복제란 인위적 조작과정을 통하여 표현형(외모)과 유전형질이 동일한 복수의 동물을 생산하는 세포 및 발생공학 기술을 총칭한다. 그러므로 자연발생적인 일란성 쌍태아는 이 범주에서 제외되어야 할 것이다.

동물복제술은 학자에 따라 공여핵(Donor nuclei)의 근원에 따라 광의로 수정란 복제(Embryo cloning)를 포함하기도 하며, 협의로는 성체세포 복제로 한정하기도 한다. 만일 동물복제의 정의를 성체세포 복제로 국한하면 금번 발표된 영국 Roslin 연구소 Wilmut그룹

의 복제양 Dolly가 유일한 예가 될 것이다.

그러나 어느 세포를 공여핵으로 이용하던지 그 과정은 거의 동일하며 복제된 수정란 (Cloned embryo)을 대리모에 이식하여 복제동물이 탄생된다는 의미에서 수정란 복제까지 를 포함시켜야 할 것으로 생각된다.

복제기술의 종류

유전적으로 동일한 복제동물을 생산하는 기술은 복제를 원하는 유전정보를 지닌 핵을 다른 난자에 이식하는 과정의 여부 (핵이식)에 따라 비핵이식법과 핵이식법으로 대별할 수 있다.

1. 비핵이식기법 (Non nuclear transfer)

1) 수정란 분할법 (Embryo section)

부화 (Hatching) 이전 단계의 수정란을 예리한 절단기구를 이용하여 양분 또는 사분 (四分) 한후 각각 여분의 투명대에 넣고 배양과정을 거쳐 대리모에 이식하여 monozygotic twin이나 monozygotic quadruplets을 생산할 수 있다. 양이나 소에서 시도하여 산자생산 예 가 있으며 국내에서도 필자의 연구팀과 축산기술연구소 손동수박사팀에서 소의 쌍자를 생산한 바 있으나 성공율은 매우 낮으며 생산개체의 저체중 및 허약 등의 문제점으로 인 해 실용성을 인정받지 못해 용도 폐기된 상태이다.

2) 할구 분리법 (Embryo splitting)

초기 수정란 단계 (2~8세포기)에서 투명대를 절개하거나 용해한 후 할구 (Blastomere)를 각각 분리해내어 일정기간 배양함으로써 후기 수정란으로 발육후 대리모에 이식하여 동 일한 유전형질 보유 동물을 얻게 된다. 이 방법은 마우스나 토끼 등 실험동물에서 수행된 바 있으나 실용적 측면보다는 발생생물학적 의미가 있다고 하겠다.

2. 핵이식법 (Nuclear transfer)

핵이식기법에 의한 복제동물의 생산은 Willadsen (1986)이 면양에서 8-16세포기수정란의 할구를 공여핵으로 사용하여 첫 산자를 보고한 이후로 최근 면양 배반포 (Blastocyst)의 내 세포괴 (ICM, Campbell et al, 1996) 및 암양의 유선세포 (Wilmot et al, 1997)를 계대배양한 후 상피세포로 분화한 세포를 공여핵으로 이용하여 산자생산에 성공하는 등 획기적인 발 전을 거듭하고 있다. 또한 소에서 oogonia를 탈핵난자와 융합하여 oogonia의 다능성을 검 정하는 등 (Lavoit et al, 1997) embryonic germ cell/primordial germ cell을 이용한 핵이식이 연 구되고 있으며 이는 배아간세포 (embryonic stem cell)와 마찬가지로 다능성 세포를 이용한 형질전환동물생산의 한 방안으로 응용코저하는 시도이다.

핵이식은 주로 산업화를 위한 효율성 향상의 측면에서 연구가 진행되고 있으며, Stice와 First (1993)는 핵이식 과정의 기법 개선과 공여핵 및 수핵난자의 질적 향상과 대량생산 체 계 수립등에 의한 실용화를 주장하였다. 본 종설에서는 소를 중심으로한 핵이식과정 및 현

재 관심을 가지고 연구되고 있는 세부분야들을 간략히 소개하고자 한다.

핵이식 기법에 의한 복제동물 생산은 공여핵 (Donor nuclei)의 근원이 어느 세포냐의 차이가 있을 뿐, 거의 동일한 과정을 거친다.

즉 수핵난자 (Recipient oocytes)의 확보 (체내 또는 체외 유래란) → 세포로부터 공여핵 또는 공여핵을 포함한 조직의 분리 → 탈핵 (Denucleation) → 핵이식 (Nuclear transfer) → 세포융합 (Cell fusion) → 체외배양 (In vitro culture) → 대리모에의 이식 (Embryo transfer) → 복제동물의 탄생 (Clone animal)이라는 과정을 거치게 된다.

1) 수핵난자의 준비

수핵난자의 탈핵은 핵이식과정중 선행단계이며 일반적으로 cytoskeletal inhibitor인 cytochalasin B를 처리하여 세포막의 파괴를 제어한 상태에서 미세조작을 통해 실시한다. 수핵난자로는 MII (metaphase II) 및 1-2세포기의 수정란이 이용되는데 각각의 장단점이 있다. 수정된 난자의 경우 난자의 활성화 (oocyte activation)조치가 필요없으며, 특히 설치류에서는 2세포기에 transcription (embryonic genomic activation)이 시작되어 배반포까지 별 변화가 없어 미수정난자에 비하여 2세포기의 탈핵한 수정란을 수핵란으로 이용하는 것이 핵이식란의 reprogrammimg이 덜 요구되기 때문에 선호되고 있는 반면, 토끼 및 반추류에서는 4-16세포기에 transcription이 이루어져 이를 수핵난자로 이용하기에는 세포질이 너무 적어 곤란하여 (표 1), MII기의 성숙난자를 이용하게 된다. 초기에는 체내에서 성숙이 완료된 난자를 주로 이용하였으나 소의 경우 체외성숙 과정이 이미 보편화되어 있기 때문에 현재에는 체외성숙난자의 이용하는 편이 일반적이다. 토끼나 양의 경우는 현재도 체내성숙난자를 수술적인 방법으로 회수하여 이용한다. MII기의 난자를 수핵란으로 할 경우 탈핵용 피펫으로 흡입시 증기염색체 (metaphase chromosome)가 검경 확인되는 토끼 (Stice & Robl, 1988)에서와는 달리 양이나 소에서는 제 1극체 인접 세포질의 25-50%를 제거하고 Hoechst 33342 형광염색액을 이용 탈핵유무를 판단하게 되며 (blind enucleation) 이로써 세포질 제거의 최소화 및 완전한 탈핵이 보장된다 (Tsunoda et al, 1988). 탈핵여부의 확인으로 인한 단시간의 자외선 노출은 핵이 제거된 난자의 경우 생존성에는 큰 영향이 없는 것으로 알려져 있다 (Westhusin et al, 1990). 미세조작에 의한 물리적인 탈핵은 높은 탈핵율이라는 장점을 지니고 있으나 작업에 많은 시간을 요하며 이로 인해 핵이식 효율을 저하시키는 주요인이 되고 있다. 이의 보완 방안으로 탈핵과정을 간편하고 효율적으로 수행하기 위하여 수정란의 보조부화술 (assisted hatching)에 이용하는 레이저 (Rink et al, 1996)로 염색체를 소

Table 1. A comparison between the stage of development at which transcription from the embryonic genome begins and the most advanced stage of development from which nuclei transferred to enucleated oocytes have been able to support development to adulthood

Species	Mouse	Rabbit	Cow	Sheep	Xenopus
Start of transcription	Two-cell	Four-cell	8-16 cell	8-16 cell	4000
Nuclear totipotency	Two-cell	32-cell	32-cell	64 cell	Tadpole intestinal epithelium

(Wilmut & Campbell, 1992).

락시키거나, 원심분리와 자외선조사를 통한 기능적 핵 제거술이 제시되고 있다 (Wagoner et al, 1996).

2) 공여핵할구의 준비 및 이식

핵이식란의 작성시 공여핵 효율의 중요성이 간과되는 수가 많으나 동일한 유전형질의 개체생산을 위해서는 하나의 수정란 혹은 공여핵으로 이용할 세포로부터 생존성이 우수한 할구 및 세포를 다량 확보하는 것이 중요하다. 예를 들어 16세포기의 할구의 생존성이 100%이며 32세포기 할구의 생존성이 50%미만이라면 오히려 전자로부터 더욱 우수한 결과를 얻게 된다. 공여핵의 할구 분리법으로 2가지가 통용되고 있는데 첫째, 이식전 모든 할구를 분리하는 것으로 현재 주종을 이루고 있다. 먼저 pH 2.5의 acid Tyrode's solution 혹은 pronase가 첨가된 배양액내에서 투명대를 제거한 후 수정란을 calcium과 magnesium이 포함되지 않은 배양액내에 넣어 할구간의 결합을 이완시켜 분리한다. 토끼의 경우 mucin coat로 인해 피펫작업이 용이하지 않기 때문에 할구의 결합을 이완시키고 나서 투명대를 제거하기도 한다 (Stice & Robl, 1988). 또다른 방법은 예리한 피펫을 수정란에 삽입한 후 이식할 때마다 할구를 하나씩 분리, 흡입하는 방법으로 Prather 등 (1987)은 이 과정을 통하여 소핵이식수정란을 생산하였다. 이 방법은 투명대 용해인자 (acidic medium, pronase 등)를 이용하지 않기 때문에 핵이식란의 작성에 긍정적 영향을 끼칠 것으로 주장되기도 하나 두 방법간 발생율의 현저한 차이는 보고되고 있지 않다.

3) 난자활성화 및 세포융합

핵이식의 미세조작은 수핵난자와 공여핵할구를 융합하는 과정으로 종료된다. MII기의 난자를 수핵란으로 이용했다면 단위발생에서처럼 난자의 활성화과정 (pathenogenetic activation)이 필요하게 된다. 세포융합을 유도하는 수단으로는 화학물질에의 노출, 불활화된 Sendai virus 매개, 전기적 자극 등의 세가지 방법이 이용되어 왔다. 체세포에서는 polyethylene glycol (PEG)에 노출시켜 융합을 유도하는 것이 보편적이나 수정란에서는 PEG의 독성 때문에 잘 이용되지 않는다. 마우스수정란의 경우 분할기 수정란의 융합에 효과적이며 특히 난자의 활성화가 일어나지 않고 세포융합만을 유도하기 때문에 특정실험에 유용하게 쓰일 수 있다. 소나 양과 같은 반추류는 난자의 단위발생활성화와 동일한 조건하에서 세포융합이 가능하며 특히 Sendai virus에 의한 융합이 설치류에서처럼 고율로 나타나지 않기 때문에 전기적 세포융합법이 선호되고 있다 (Willadsen, 1986). 세포융합을 위한 조건은 동물종마다 차이가 있으나 대개 0.75-2kV/cm의 DC로 30-150 μ s 동안 통전시킨다. 통전후 30분정도에 세포융합 여부를 확인하게 되며 융합되지 않은 수정란은 재차 통전을 실시하여 총 3회 반복으로 세포융합을 실시한다. 통전시 공여핵과 수핵난자는 통전방향과 일치시켜야 하는데 이를 위해 인위적으로 핵이식란을 배열하거나 융합전 5-10V의 교류전류를 수초간 통전시키는 방법이 이용된다. 현재 사용하고 있는 세포융합기들은 이러한 조건들을 확립한 후 기억시켜 놓으면 이후 반복작업시 자동 재현 체계가 보편화 되어있다.

일반적으로 정자와 융합된 난자는 정자로부터의 어떤 인자에 의해 세포내 칼슘이온농도가 증가하고 MPF (maturation/mitosis/meiosis/metaphase promoting factor)수준의 감소, cortical granule reaction, 감수분열재개 및 제 2극체의 방출 등의 현상을 보인다. 난자의 인위적인

활성화 또한 세포내 칼슘이온의 유입을 통해 수정시 보이는 난자의 활성을 유도하는 것으로 에탄올 (7%) 단시간 노출법, 통전법 및 Ca-ionophore (A23187)와 단백질합성억제제인 cycloheximide 병행처리법등이 이용되어 왔으며 이와는 별도로 정자로부터 유래한 활성유도인자를 추출하여 난자의 활성화를 유도하는 연구도 수행되고 있다 (Swann, 1990). 만일 정자로부터 좀 더 순수한 인자를 분리해 낼 수 있다면 핵이식수정란의 활성화시 생리학적으로 좀 더 나은 칼슘반응을 유도할 수 있을 것으로 생각된다. 특히 통전에 의한 난자의 활성화는 전기적 세포융합과 유사 혹은 동일한 조건하에서 이뤄질 수 있기 때문에 핵이식과 정중 보편적으로 이용되고 있는데 통전시 난자의 세포막에 순간적인 pore를 형성하여 칼슘이온이 유입되어 활성화를 유도하는 것으로 알려져 있다. 핵이식후 1회 통전으로 전기적 세포융합과 동시에 활성화를 유도하는 방법이 일반적이나 토끼에서는 2회 이상 통전하는 것이 활성화율의 향상과 이후 발육에 유효하다는 보고가 있다 (Collas & Robl, 1990).

Campbell 등 (1993)은 MPF수준이 높은 MII기의 난자와 공여핵할구의 융합시 nuclear envelope breakdown (NEBD), premature chromosome condensation (PCC), nuclear envelope reformation (NER) 및 nuclear swelling (NS)등을 거치게 되어 S, G2기의 경우에는 DNA의 재복제에 의한 핵형이상 (aneuploidy)이 나타날 수 있기 때문에 공여핵의 세포주기를 G1기에 일치시키거나, 세포융합전 수핵난자의 활성화를 통하여 MPF 수준을 저하시켜 NEBD, PCC 및 NER의 과정을 거치지 않고 이후 핵형의 변화없이 정상적인 발생을 거치게 유도해야만 정상적인 핵이식수정란의 생산이 가능하다고 하였다. 특히 착상전 수정란에서는 확인할 수 있는 핵이 S기에 머물러 있는 경우가 대부분이기 때문에 (Campbell et al, 1993; Barnes et al, 1993) 후자의 방법이 더 효율적인 것으로 여겨지고 있으며 모든 시기의 공여핵을 받아들일 수 있는 이러한 상태의 활성화된 수핵난자를 'universal recipient'라고 부른다. 토끼는 NEBD와 PCC의 유도가 reprogramming에 필수적인 것으로 알려져 왔으나 (Collas et al, 1992), 최근 수핵난자의 'in vivo aging'을 통해 NEBD없이 핵이식란의 발생이 가능함을 확인하였다 (Heyman & Renard, 1996). 소핵이식에 있어서 활성화된 수핵난자의 핵이식란 작성 효율을 향상시키기 위해 in vitro aging 및 융합전 저온에의 노출법 (10°C)도 소개되었다 (Heyman & Renard, 1996).

단위발생시에는 제 2극체의 방출을 막아 diploid상태를 유지하기 위해 cytochalasin B에 노출시키기도 하는데 핵이식과정에서도 융합후 1시간정도 cytochalasin B를 처리하는 방법이 이용되기도 한다 (양, Smith & Wilmut, 1989; 토끼, Collas & Robl, 1990). 그 기전은 아직 완전히 밝혀지지 않았으나 단위발생에서와 마찬가지로 haploidization 및 aneuploidy를 방지하는 역할을 하는 것으로 생각되고 있다. 그러나 소에서는 이방법이 유효하지 못하다는 주장도 있어 (Levenduski & Westhusin, 1990), 모든 동물종에서 통용될 수는 없거나 노출시간 및 적정농도 조건이 종간에 상이할 가능성도 추정할 수 있다.

4) 핵이식란의 체외배양 및 대리모에의 이식

핵이식란의 배양 및 수정란이식은 일반 수정란의 경우에서와 동일하게 적용되며 융합후 정상적으로 분할한 핵이식란의 경우 배반포로의 발생율은 일반적인 체외수정란과 큰 차이를 보이지 않는다. 그러나 핵이식 배반포를 이식한 후의 산자생산율은 20%정도로 체외

수정란에 비해 절반이하인 것으로 나타나고 있으며 (Westhusin et al, 1991) 이는 착상의 실패 등 조기태아사가 주요인인 것으로 생각되고 있다. 각 단계를 경과하면서 효율이 계속 저하되어 소의 수핵난자로 이용되는 MII기의 체외성숙란을 기준으로한 산자생산 비율은 계산상 1-6% 수준이다 (Yang, 1991). 또한 착상후 거대태아의 발육이 지적되는데 (Behboodi et al, 1995) 이는 핵이식란에서만만의 문제가 아닌 수정란의 체외조작시 대부분 나타나는 현상으로 배반포의 elongation 과정시 내부세포괴에 비해서 영양막세포가 우선 증식하여 태반이 정상보다 확대되고 이후 태아의 성장에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 한편 착상전 수정란의 체외조작 혹은 체외배양시 성장에 관여하는 하나 또는 그 이상 유전자의 이상발현, 탈핵시 세포질의 제거, 체외배양시 세포질의 fragmentation, 세포질내 mitochondria의 손상, 외래 progesterone의 투여 및 asynchronous embryo transfer 등도 요인으로 제기되고 있다. 세포질의 부분적 제거 및 fragmentation은 핵과 세포질내 소기관의 정상 반응에 장애를 가져오고 착상전 후 외래 progesterone투여는 영양막세포의 조기 elongation을 유발하는 것으로 알려져 있다 (Walker et al, 1996). 배양시 첨가하는 혈청 또한 직간접적으로 genome 혹은 mitochondria와 같은 세포질내 소기관에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 혈청대신 BSA 및 아미노산의 경우 mitochondria의 변성현상을 유발시키지 않는 것으로 보고되고 있다 (Dorland et al, 1994).

핵이식을 통한 동물의 생산이 완전한 복제를 의미하는 것은 아닐 수가 있다. 왜냐하면 동일한 공여핵을 이용한 산자는 핵은 공유하고 있으나 수핵난자가 다를 경우 mitochondria에 의한 영향을 받아 일정수준의 유전적 특성을 달리할 수 있기 때문이다. 특히 유생산이나 번식성등은 세포질내 mitochondria DNA와의 유관성이 제기되어 (Freeman & Beitz, 1994), 향후 실용화 추구하고 동시에 이 측면에서의 검토도 병행되어야 할 것이다.

5) 복제효율향상을 위한 다양한 공여핵원의 적용

핵이식 기법의 효율향상을 위한 방안으로 recloning, cultured ICM cells, embryonic stem cells, primordial germ cells 및 differentiated somatic cells등을 공여핵원으로 이용 방안이 제시되고 있으며 부분적으로 성과를 거두고 있다.

(1) 재순환복제 (recloning): 핵이식 수정란을 공여핵으로 이용될 수 있는 16-64세포기까지 배양한 후 재차 공여핵으로 이용하는 기법으로 현재 소에서 6세대수정란 (Willadsen, 1989) 및 3세대 산자 (Stice & Keefer, 1993)의 생산이 보고되어 있다. 이론상 단회 복제에 비해 높은 효율을 지니고 있다.

(2) 배아간세포 (embryonic stem cells; ES cells)의 이용: 다능성/전능성을 지니고 있는 미분화세포인 배아간세포 (ES cell)는 핵이식을 통한 복제동물의 대량생산을 가능하게 하는 방법으로 관심이 집중되고 있는 분야이다. ES cell을 이용한 핵이식 동물 혹은 키메라의 생산은 transfection, infection 혹은 유전자주입을 통한 형질전환동물생산에 이용될 수 있다. 그러나 아직 마우스를 제외한 양이나 소등의 산업동물에서는 완전히 ES cell로 검정된 세포로의 산자성공 예는 없으며 각자 자신이 이용한 ES-like cell에 대하여 embryonic cell line (Stice et al, 1996) 혹은 cultured ICM (Sims & First, 1993)등으로 명명하고 있을 뿐이다. 마우스에서도 2세포기 수정란을 수핵란으로, ES cell을 공여핵으로 산자생산에 성공한 예가 있

으나 신생축의 폐사가 초래되었고 MII난자를 수핵란으로 이용, 착상은 확인되었으나 산자 생산에는 이르지 못했다 (Modli ski et al, 1996). 이와같이 ES cell을 이용한 연구는 마우스에서 보편적으로 행해지고 있으며 다능성세포의 대량공급이라는 매력에도 불구하고 아직까지 산업동물에서의 성공례는 없다. 이외에도 다능성을 지니고 있는 것으로 알려진 primordial germ cell 이 공여핵의 근원으로 마우스, 토끼 및 소에서 연구되고 있다 (Heyman & Renard, 1996).

(3) 분화세포 (differentiated cells)의 이용: ES cell은 embryoid body 혹은 epitheloid cell로 분화되기 쉽기 때문에 배양에 어려움이 있다. 마우스와 달리 양의 경우 2-3대 계대배양시 상피세포로의 분화가 시작되며 6대 정도에서는 상피세포로의 분화 일반적으로 세포의 분열단계는 G1, S, G2, M기로 나눌 수 있으며 세포가 분화할 경우 발육이 정지된 채 일시적 휴면상태에 들어가는데 세포분열기를 벗어나 분화를 준비하는 정지상태를 G1기와 구분하여 G0라 한다. Campbell 등 (1996)은 serum starvation을 통해 상피세포로 분화 후 증식하고 있는 내세포피유래 계대세포를 G0기에 정지시킨 후 핵이식을 통하여 산자생산에 성공하였다. 동일한 방법을 통하여 Wilmut 등 (1997)은 태아섬유아세포 및 임신한 양의 유선세포를 계대배양한 후 산자생산에 성공하여 성체 세포로부터의 핵이식이 가능함을 증명하였다. 이러한 성공들이 주로 양 및 소에서 보고되고 있는 이유는 마우스의 경우 serum starvation에 의한 G0기로의 발달정지가 용이치 않으며 embryonic genome transcription이 8-16세포기 이후에 나타나는 소나 양과는 달리 2세포기 후반에 나타나기 때문에 reprogramming에 필요한 시간을 확보하지 못하기 때문인 것으로 생각되고 있다 (Stewart, 1997).

6) Reprogramming

이식된 공여핵은 수핵난자의 낮은 환경에 놓여지며 개체발생을 위한 정상적 발육은 유전자발현을 변형시킬 수 있는 세포질의 능력에 좌우된다. Reprogramming은 핵이식 후 수정란이 정상적인 수정란처럼 분할 및 발육에 적응하는 과정을 뜻하며 다음의 몇가지 사실이 이의 증거가 된다 (Wilmut & Campbell, 1992). 첫째, 핵이식란이 배반포와 같은 특정단계까지의 소요기간이 일반적인 체외수정란의 배양시간과 큰 차이가 없다 (약간 증가할 수 있다). 둘째, 공여핵의 핵막이 마치 전핵에서처럼 심하게 종대되는 현상 (nuclear swelling)을 보인다. 융합 후 2시간 이내에 핵막의 종대가 나타나지 않으면 배반포로 발육되지 않는 것으로 알려져 있다. 셋째, transcription이 신속하게 억제된다는 사실이 핵소체와 RNA, peptide의 관찰에 의해 확인되었다. 넷째, nuclear lamins 및 ribosomal protein을 포함한 특정분자의 변화상을 들 수 있다. 수정시 정자는 protamine과 같은 독특한 형태의 핵단백질을 지니고 난자에 들어오게 되는데 핵이식시의 공여핵은 protamine이 존재하지 않는다. 그러나 핵이식란은 융합후 이런 특정 핵단백질이 나타나며 이와같은 현상은 세포질내의 특정단백질이 DNA와 결합, 즉각적인 유전자발현을 통해 나타나게 된다. 어떤 경우에는 methylation이 이러한 변화를 더욱 촉진시키는 것으로 알려져 있다.

7) 각종 동물에서의 핵이식 현황

(1) 소 : 최근 핵이식 기술의 향상으로 체외수정란과 동일한 정도의 배반포발육률을 보이나 산자생산율은 체외수정에 비해 절반이하 수준에 머물고 있다.

(2) 양 : 양의 핵이식은 대개 체내성숙난자를 이용하기 때문에 효율이 낮고 실용적 측면보다는 소에서의 실험을 위한 연구용으로 이용되고 있다. 영국의 Roslin 연구소에서는 양을 이용, 분화한 계대세포를 공여핵으로 핵이식에 성공하는 등 (Wilmut et al, 1997) 큰 성과를 보이고 있다.

(3) 돼지 : 돼지에서는 1989년 zygote간의 전핵 교환에 의해 최초로 산자생산에 성공하였으며 (Prather et al, 1989), 2-16세포기의 수정란을 공여핵으로 핵이식수정란을 생산한 보고들이 있으나 상실배까지의 발생율이 7-11%로 매우 낮아 산자생산은 저조한 실정이다 (Nagashima et al, 1992; Terlouw et al, 1992).

(4) 토끼 : 토끼는 복제동물의 생산자체보다는 동물복제의 모델로 널리 적용되는 종이다. 핵이식란의 2-3회 분할 후 우수한 reprogramming효율을 나타내는 등 정상적인 발생율을 보이나 착상 후 조기태아사율이 높아 산자생산효율은 4%정도인 것으로 보고되고 있다 (Heyman & Renard, 1996).

(5) 기타 : 염소에서의 핵이식성공 보고 (Yong et al, 1991)가 있으며 소의 핵과 염소 혹은 햄스터난자간의 융합, 염소의 핵과 양 또는 소난자의 융합등 중간 핵이식이 시도되고 있으나 산자생산에는 이르지 못한 상태이다.

핵이식기법의 비교

표 1. 공여핵별 핵이식법의 비교

특징	생식세포복제	체세포복제
공핵 (Donor nuclei)	수정란의 할구(Blastomere) 또는 배간세포(Embryonic stem cell)	모든 체세포(?)
Phenotype, 유전적 특징	태어나는 동물간의 동일성 검증 (복제동물) $\text{우}(A) \times \text{수}(B) = \text{Embryo}(AB)$ $= AB, AB, AB \dots$	세포제공 모체와 동일성 발현 복제동물(?) $\text{우}(A) = A \text{ 또는 } A', A', A' \dots(?)$ $\text{수}(B) = B \text{ 또는 } B', B', B' \dots(?)$
공핵세포수	제한적 또는 다수	무제한(?)
유전자 도입 및 선발	제한적	비교적 용이(?)
염색체 이상 (Chromosome anomalies)	일부발생	극히 높은 발생율
개체발생능력	2%선 수준	0.1 ~ 0.2% 수준
실용성	실용화가능 확인 (마우스, 양, 돼지, 토끼, 소, 원숭이)	실용화여부 불투명 (복제양 Dolly)

복제기술의 효용성 및 문제점

모든 과학분야가 양면성을 지니고 있는 바와 같이 동물복제기술도 인류에게 유용하게

기여할 수도, 재앙을 초래할 수도 있을 것이다.

1. 복제기술의 효용성

1) 가축의 유전능력 개량

동물복제기술은 유용가축의 유전능력을 개량하여 축산농민의 소득을 향상시키고 인류의 식량문제를 해결하는데 현존하는 어느 방안보다도 효과적이다. 특히 우리나라와 같은 고능력 유전자원도 부족하며 척박한 토양과 협소한 국토를 지닌 국가에서는 검증된 고능력 유전형질을 지닌 가축으로부터 공여핵을 채취하여 이를 대량복제하고 농가에 보급함으로써 생산성을 현저히 향상시킬 수 있게 된다. 필자의 연구팀에서 수행중인 소의 핵이식 기법을 이용한 능력개량의 한 예를 살펴보기로 하자.

현재 국내 젖소의 두당 연간 우유생산량은 5000kg 남짓한 수준이다. 그러나 유전형질에 따라 연간 15000kg ~ 20000kg을 상회하는 산유능력을 발휘하는 고능력우가 존재하기도 한다. 물론 이들중에서 乳質도 매우 우수하며 병에도 잘 견디는 능력을 지닌 공란우를 선발하여 이들의 수정란에서 공여핵을 채취한다. 그후 핵이식 과정을 거쳐 다수의 수정란으로 복제하여 이를 대리모에 이식함으로써 우수한 송아지를 생산하는 것이다.

이와같은 의도가 산업화 수준에 달성된다면 낙농생산성은 현재보다 수배 향상될 것이며, 확보할 수 있게 될 것이다. 또한 우리국민의 식선호도에 부합되는 고급육질을 지니며 내병성 및 성장율이 탁월한 한우 수정란을 복제하여 이를 대리모에 2~3개씩 이식함으로써 고품질 한우 송아지를 쌍태로 생산할 수 있게 된다. 그외에도 기타 산업동물에 복제기술을 적용시켜 소에서와 같이 유전능력을 향상시킬수 있는 수단으로 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

2) 특수동물 및 희귀동물의 증산

특수한 형질을 지닌 실험동물이나 질환모델동물 또는 멸종위기에 놓인 희귀동물에 복제술을 적용하면 증식이 가능케 될 것이다. 그 결과 기초의학 및 생물학 등의 광범위한 학문적 기여와 자연생태계 유지에도 일익을 담당할 수 있을 것이다.

3) 형질전환동물 생산효율의 향상

형질전환동물의 생산과 같은 생명공학은 21세기를 주도할 산업부문으로 예측되고 있다. 그러나 형질전환동물은 원하는 유전형질의 발현율이 낮고 외부환경에 대한 저항성, 번식성 등이 취약한 문제점으로 지적되고 있다.

이러한 단점은 복제기술에 의해 대부분 극복될 수 있을 것이다. 즉 수정란의 간세포 또는 체세포복제과정에서 배양중 조직세포에 유전자를 도입시키고 그 형질이 발현된 세포만 선별적으로 계대시켜 다수의 공여핵을 확보할 수 있게 된다. 이와같은 복제술의 실현은 현재 막대한 비용과 장기간이 소요되는 형질전환동물의 생산을 실용화시킬 수 있는 핵심기술이 될 것이다.

그 결과 인간에 유익한 생리활성물질을 대량생산할 수 있으며 난치성 질환을 해결하는 하나의 방법으로도 적용할 수 있게 된다. 또한 인간장기 제공용 형질전환동물의 대량생산에도 이용될 수 있다고 본다.

2. 복제기술의 문제점

1) 낮은 효율

복제기술은 현단계로서는 향상시켜야할 단계별 난제들을 안고 있다. 즉 수핵난자의 탈핵, 세포주기 동기화, 세포융합, 체외배양 등 효율을 향상시켜야할 기술적 사항들을 검토, 극복해야 한다. 특히 현재까지는 단 한마리의 결과밖에 없는 체세포 복제의 경우는 더욱 심각한 문제이다.

2) 고율의 염색체 이상

복제기술은 공여핵과 수핵난자의 세포질간 세포주기의 불일치, 핵이식 과정의 각 단계에서 초래될 수 있는 장벽 등에 의한 염색체 이상과 유산, 조산, 사산 등 異常産의 발생율이 높은 측면도 문제점으로 대두된다. 이는 향후 기술의 개발과 함께 해결될 수도 있겠으나 장기간의 연구와 시행착오를 경험해야 할 것이다.

3) 생물재해 (Biohazard)의 초래

복제술과 같은 생물공학 기술은 그 과정에서 항상 돌연변이적 생물체의 탄생을 염두에 두지 않으면 안된다. 즉 인간의 자의적 또는 수행과정중 불가피한 결과에 의해 인류에 해악을 초래할 수 있는 생명체의 생성과 이의 파급은 언제나 경계해야 할 문제이다.

4) 인간복제에의 시도 유혹

현기술 수준으로도 수정란 복제에 의한 동일한 외모와 유전형질을 지닌 인간의 탄생은 가능하다. 그러나 Wilmut박사의 Dolly 탄생과 같은 체세포 복제를 인간에 적용시킬 수 있을 것인가의 기술적 문제는 현재로서는 불투명한 것으로 생각된다. 그러나 어느 동물에서 이루어진 세포생물학적 기술은 시간과 의지의 문제일 뿐 인간에의 적용자체가 불가능할 것으로 여겨지지는 않는다. 동물에서 본 기술이 실용화되었을 때 인간복제의 적용 유혹이 초래될 수도 있을 것으로 예견된다.

복제기술을 인간에 적용시킬 것인가?

복제기술을 인간까지 적용시킬 필요성이 있다고 주장하는 의견이 사회일각에 엄존하고 있다. 그 배경으로는 인류의 유전병 및 난치질환의 해결방안과 특별한 상황적 요건등이라 한다. 그러나 이에 비해 복제된 인간이 태어났을 경우 초래될 존엄성의 상실, 사회윤리의 붕괴 등 사회학적 문제점과 신의 창조질서와 가족 및 가정의 기본구성을 부정하는 등 결코 용인할 수 없는 사안으로 여기는 종교적 측면도 대두된다.

필자 등은 종교, 사회학적 측면보다는 과학적 측면에서 과연 인간복제가 허용될 수 있을 것인가를 조망해 보고자 한다.

앞에서 동물복제기술의 문제점 중 고율의 기형발생을 언급한 바 있다. 이와같은 기형 또는 異常産은 공여핵과 수핵난자세포질과의 세포주기 불일치에서도 기인하지만 복제과정 중 필수적 단계인 공여핵의 추출 (화학적 조작), 세포융합 (전기적 충격), 체외배양 (각종 호르몬제 및 배양인자에의 노출) 등의 과정에서 세포가 겪게 되는 불가피한 자극으로 기

형체가 발생하는 것으로 추정하고 있다. 동물의 경우는 비정상 개체 발생시 이를 폐기처리할 수 있으나 인간복제 결과물은 기형체라 할지라도 인간이기 때문에 이를 폐기할 수 없게 된다.

한편 인간의 체세포를 복제할 경우, 특히 도시생활을 하는 성인의 경우에 각종 공해 및 오염원으로의 노출로 말미암아 세포내 기형유전자의 발생이 동물에 비하여 수백배 수준으로 높게 나타날 것으로 추정된다. 그러므로 인간복제의 필요성에 대한 사회적 동의가 성립되는 시점에서 과학적으로는 용인될 수 없는 문제가 남아있는 것이다. 단지 발생생물학적 기술이 완료되어 기형과 기타문제가 모두 해결되는 시점에 가서나 재검토해 볼 수 있을지 모르겠다.

향후 대책

전항에서 살펴본 바와같이 복제기술은 지나친 규제도 자유방임도 나름대로 문제점을 지니게 된다. 그러므로 향후 과학, 종교, 사회학계 등 광범위한 분야의 인사들로 기구를 구성하고 대책을 협의하여 적절한 방안을 강구해야 할 것이다. 관련 학계에서는 생명공학윤리 지침 등 자율적 준수규범을 설정할 필요가 있을 것이며, 국가적으로는 관련기술의 지원방안과 아울러 적절한 규제규정을 마련하여 생명공학기술이 인류의 복지증진에 국한될 수 있도록 조정할 필요가 있을 것이다.

참 고 문 헌

- Barnes FL, Collas P, Powell R, King WA, Westhusin M, Shepherd D: Influence of recipient oocyte cell cycle stage on DNA synthesis, nuclear envelope breakdown, chromosome constitution, and development in nuclear transplant bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 1993, 36, 33-41.
- Behboodi E, Anderson GB, BonDurant RH, Cargill SL, Dreuscher BR, Medrano JF, Murray JD: Birth of large calves that developed from in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* 1995, 44, 227-232.
- Campbell KHS, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I: Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996, 380, 64-66.
- Campbell KHS, Ritchie WA, Wilmut I: Nuclear-Cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: Implications for deoxyribonucleic acid replication and development. *Biol Reprod* 1993, 49, 933-942.
- Collas P, Pinto-Correia C, Ponce de Leon FA, Robl JM: Effect of donor cell cycle stage on chromatin and spindle morphology in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod* 1992, 46, 501-511.
- Collas P, Robl JM: Ractors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. *Biol Reprod* 1990, 42, 877-884.

- Dorland M, Gardner DK, Trounson AO: Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. *J Reprod Fert* 1994, 13, 25.
- Freeman AE, Beitz DC: Cytoplasmic inheritance-molecular differences and phenotypic expression. In: Seidel GE, ed. *Symposium on Cloning Mammals by Nuclear Transplantation*. Colorado: Colorado State University, 1992, 17-20.
- Heyman Y, Renard JP: Cloning of domestic species. *Anim Reprod Sci* 1996, 42, 427-436.
- Levenduski MJ, Westhusin ME: Effect of cytoskeletal inhibitor on fusion and development. *Theriogenology* 1990, 33, 273.
- Lavoie MC, Rumph N, Moens A, King WA, Plante Y, Johnson WH, Ding J, Betteridge KJ: Development of bovine nuclear transfer embryos made with oogonia. *Biol Reprod* 1997, 56, 194-199.
- Modliński JA, Reed MA, Wagner TE, Karasiewicz J: Embryonic stem cells: developmental capabilities and their possible use in mammalian embryo cloning. *Anim Reprod Sci* 1996, 42, 437-446.
- Nagashima H, Saito S, Yamakawa H: Development of porcine nuclear transplant embryos from 8-16 cell stage donor nuclei. *Theriogenology* 1992, 37, 263.
- Prather RS, Barnes FL, Sims MM, Robl JM, Eyestone WH, First NL: Nuclear transfer in the bovine embryo assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol Reprod* 1987, 37, 859-866.
- Prather RS, Sims M, First NL: Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol Reprod* 1989, 41, 414-418.
- Rink K, Descloux L, Delacretaz G: Zona pellucida drilling by a 1.48 μm laser: influence on the biomechanics of the hatching process. *Proc SPIE* 1996, 2624, 27-32.
- Sims M, First NL: Production of calves by transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90, 6143-6147.
- Smith LC, Wilmut T: Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol Reprod* 1989, 40, 1027-1035.
- Stewart C: An udder way of making lambs. *Nature* 1997, 385, 768-771.
- Stice SL, First NL: Progress towards efficient commercial embryo cloning. *Anim Reprod Sci* 1993, 33, 83-98.
- Stice SL, Keefer CL: Multiple generational bovine embryo cloning. *Biol Reprod* 1993, 48, 715-719.
- Stice SL, Robl JM: Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod* 1988, 39, 657-664.
- Stice SL, Strelchenko NS, Keefer CL, Matthews L: Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. *Biol Reprod* 1996, 54, 100-110.
- Swann K: A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development* 1990, 110, 1295-1302.

- Terlouw SL, Prather RS, Day BN: In vitro development of nuclear transplant pig embryos. *Theriogenology* 1992, 37, 309.
- Tsunoda Y, Shioda Y, Onodera M, Nakamura M, Ochida T: Differential sensitivity of mouse pronuclei and zygote cytoplasm to Hoechst staining and ultraviolet irradiation. *J Reprod Fert* 1988, 82, 173-178.
- Wagoner EJ, Rosenkrans CF, Gliedt Jr DW, Pierson JN, Munyon AL: Functional enucleation of bovine oocytes: effects of centrifugation and ultraviolet light. *Theriogenology* 1996, 46, 279-284.
- Walker SK, Hartwich KM, Seamark RF: The production of unusually large offspring following embryo manipulation concepts and challenges. *Theriogenology* 1996, 45, 111-120.
- Westhusin ME, Levanduski MV, Scarborough R, Looney CR, Bondioli KR: Utilization of fluorescent staining to identify enucleated demi-oocytes for utilization in bovine nuclear transfer. *Biol reprod* 1990, 42 Suppl. 1, 407.
- Westhusin ME, Pryor JH, Bondioli K: Nuclear transfer in bovine embryo: a comparison of 5-day, 6-day, frozen-thawed , and nuclear transfer donor embryos. *Mol Reprod Dev* 1991, 28, 119-123.
- Willadsen SM: Cloning sheep and cow embryos. *Genome* 1989, 31, 956-962.
- Willadsen SM: Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 1986, 320, 63-65.
- Wilmot I, Campbell K: Embryo multiplication in livestock: present procedures and the potential for improvement. In: Lauria A, Gandolfi F, eds. *Embryonic Development and Manipulation in Animal Production-Trends in Research and Applications*. London: Portland Press, 1992, 135-145.
- Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS: Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997, 385, 810-813.
- Yang X: Embryo cloning by nuclear transfer in cattle and rabbits. *Embryo Transfer Newsletter* 1991, 9, 10-22.
- Yong Z, Jianchen W, Jufen Q, Zhiming H: Nuclear transplantation in goats. *Theriogenology* 1991, 35, 299.