

일본의 복제수정란이식 연구동향

다쓰유키 스즈키
일본 야마구찌대학 농학부 수의학과

Nuclear transfer of bovine in Japan

Tatsuyuki Suzuki

Department of Veterinary Sciences, Yamaguchi University, Japan

1. 서론

1997년 영국의 Edinburgh Roslin 연구소에서 성체의 유선세포의 핵을 사용하여 최초로 복제양 "Dolly"가 탄생하였고, 의외로 이러한 연구가 각광을 받기 시작하였다. 이후로 복제인간이 탄생하지 않을까 하는 여러 사람들의 기대와 불안이 교차되기 시작하였다.

한편, 우리 축산분야의 전문가들은 체세포에서 복제양을 만든 연구자에 대한 찬사를 아끼지 않았고 그간의 연구경위로 보아 소에서도 당연히 가능하리라 확신하게 되었다. 이러한 기대로 일본에서는 소 수정란의 할구를 핵으로 한 복제소는 이미 400두를 넘을 정도로 생산이 진행되었고, 수정란결절세포(胚結節細胞)의 핵을 사용한 복제소도 탄생되었다. 결국 일본의 도, 현에 있는 축산시험장, 전농사료연구소(全農飼料研究所), 모리나가유업 및크연구소(森氷乳業ミック研究所), 유끼지루시유업(雪印乳業) 수정란이식연구소나 교도사료(協同飼料)연구소 등의 많은 연구실에서는 어디에서든지 수정란의 할구(blastomere)로부터 체세포를 핵이식으로 치환하는 기술력이 가능한 것으로 되어 있다.

영국에서 성공한 복제양의 작출 방법이 일본의 여러 연구소에서 소를 대상으로 시도되었다. 그로부터 1998년 7월부터 계속하여 소의 생체세포를 핵으로 한 복제소가 탄생되었다. 한편 1998년 1월 미국에서는 소태아의 표피로부터 얻은 섬유아세포를 핵으로 한 복제소가 탄생되었지만, 이것은 소로부터 사람에게 유익한 의약품을 만들기 위한 목적이었다. 이와 같이 체세포 복제기술은 상업적인 측면에서 확실한 목적을 가지고 행하여지고 있다. 이러한 상황에서 핵이식에 의한 사람의 복제는 멀지 않은 장래에 반드시 행하여질 것이므로 이

러한 행위는 절대 허용하지 말아야 한다는 의견이 종교단체나 법조계로부터 고조되고 있다. 그러나 사람의 불임치료나 이식장기의 작출이 목적이라면, 복제기술은 아주 다양하게 활용되어질 것이라는 의학자도 다수 있다. 그 후, 한국의 경우에 있어서 실제로 경희대학 의학부 산부인과의 김교수와 이교수는 사람의 세포핵을 제거한 난자에 삽입하여 4세포기까지 분할한 복제수정란을 만들었는데, 이러한 사실은 장래에 사람에게 유익한 이식장기를 만들기 위한 기초연구였다.

따라서 본 연자의 연구실에서는 1995년 복제 chimera를 탄생시키는 등 일찍부터 복제에 관한 연구를 행하여 왔다. 최근에는 멸종되어진 동물을 부활하는 것을 목적으로 한 소, 개 및 고양이의 복제기술의 개발에 노력하고 있으며, 본 원고에서는 이러한 새로운 복제 기술의 현황과 과제에 관하여 언급하고자 한다.

2. 일본에 있어서 복제소의 탄생

Wilmot 박사의 방법으로 복제소의 작출이 일본 국내 다수의 연구소에서 실시되어, 1998년 7월부터 복제소의 탄생이 계속 보고되고 있다. 각 연구실에서는 자궁내막 세포, 난구세포, 귀세포, 근육세포 등의 성체세포를 핵으로 한 복제수정란을 만들어 이식에 의한 방법으로 복제소를 분만시키는데 성공하였는데, 이 사실은 세계 최초의 쾌거이다. 긴끼대학(近畿大學)의 지원으로 이시카와현(石川縣)의 축산시험장에서 탄생한 복제소는 분만에정일로부터 2주간 빨리 분만되었지만 별 탈없이 잘 사육되고 있다. 일본의 축산시험장으로부터 지도를 받아 가고시마현(鹿兒島縣)의 축산시험장에서 소의 귀 유래 세포를 핵으로 한 복제소가 탄생되었다. 일본에 있어서 복제기술은 농림수산성이 중심이 되어 있으며, 이러한 기술의 개발, 보급에 노력을 기울임으로서 각 자치 단체의 축산시험장에서는 보다 더 발달된 전농사료연구소, 모리나가유업 및크연구소, 유끼지루시유업 수정란이식연구소나 교도사료연구소 등의 각 연구시설은 세계적으로도 대단히 높은 기술수준이다. 물론, 이러한 연구소에 소속되어 있는 젊은 연구자들은 매년 개최되어지는 국제학술대회에 적극적으로 참가하고, 자기들의 연구성과를 발표하고 있다. 또한 그들은 새로운 biotechnology에 관련한 정보에도 아주 민감하게 반응하고 그러한 기술의 도입과 적용에도 매우 빠르게 대처하고 있다.

전술한 바와 같이, 일본에서는 수정란을 핵으로 한 복제소는 이미 460두가 넘게 생산되었다. 이와 같이 높은 기술 수준은 수정란의 핵을 체세포의 핵에

표 1. 일본에서 체세포 복제소의 생산 예(1998년 12월)

연구소	체세포의 종류	분만두수		생존/사망두수	
		자연분만	제왕절개	생후사망	생존
간끼대학/ 이시카와현 축시 토치기현 축시	난관세포	2(18.2, 17.3kg)			2
	암컷세포	1(32.0kg)		1	
		2(17.0, 34.		2	
	2(23.0, 27.5kg)				2
	1(30.1kg)		1(33.0kg)	1(사산)	
	1(33.0kg)				2
	1(46.0kg)				1
2(----)				2	
축산시험장/ 가고시마현	수컷태아피층		1(57.2kg)	1	
	수컷귀세포		1(40.0kg)		1
도야마현	암컷태아세포	1(40.5kg)	1(49.4kg)		1
					1
가고시마현 육우개량연	수컷귀세포		1(27.5kg)	1	
오이타현축시	수컷근육세포		1(41.0kg)	1	
			1(43.7kg)	1	
		1(42.5kg)		1	
			1(42.5kg)		1
나라현축시	태아체세포		1(24.0kg)	1	
농림수산성 가축개량 Center	난관세포	1(----)			1
		1(----)			1
계		16	9	10	15

치환하는 것이 용이하게 되었기 때문이다. 실제로 체세포 복제소는 이미 13개도(道)의 현(縣)에서 70두가 넘는 소에서 임신이 확인되었고 지금까지 25두가 분만, 10두가 분만직후 사망하고, 15두가 생존하여(1998년 12월 현재) 있다. 이렇게 많은 연구소에서 일시에 복제소가 탄생한 예는 세계적으로도 매우 희귀한 경우로 생각된다. 매우 흥미로운 일이지만 같은 수컷의 귀세포를 핵으로 하여 이식하여 탄생한 가고시마현의 복제소의 생시체중은 40.0 kg과 40.5

kg, 오이타현(大分縣)의 수컷의 근육세포를 핵으로 하여 만든 복제소의 생시체 중은 41, 43.7, 42.5 및 42.5 kg으로서 거의 유사하게 나타났다. 이렇게 생산되어진 복제송아지의 체중관계는 복제화로 인한 것인지에 대하여 매우 흥미로운 부분이다. 우리들의 실험실에서도 유학생이 소, 개 및 고양이의 체세포 복제 수정란의 작출에 여념이 없다. 한편, 복제수정란의 이식에서 일어나는 유산이나 조산 및 그리고 생후 사망 등 사고율이 높은 이유에 관하여서는 매우 큰 과제로 알려져 남아있다.

3. 핵이식에 이용한 지지세포

요즘 일반적으로 사용되어지고 있는 핵이식의 방법은 1986년 Willadosen 박사에 의하여 확립되었다. 이러한 방법에서는 수정된 초기수정란 16~32세포기의 blastomere를 이식핵으로서 이용하여 왔다. 이러한 핵의 지지세포로서 성숙난자가 이용되고 있다. 따라서 18~24시간 성숙시킨 난자에는 제 1극체가 방출되어 있고 여기에 인접하여 핵이 있다. 2배체의 핵을 이식하기 위하여서는 이러한 핵을 제거하지 않으면 안된다. 이러한 MII기는 난자의 성숙촉진인자(maturation/mitosis/meiosis promoting factor: MPF) 활성이 높기 때문에 S기나 G2기의 핵이 이식되면 염색체의 응집이 일어나며, 이러한 현상에 의하여 유기되어진 세포질내의 세포주기 진행에 따른 핵이식의 DNA 복제가 개시되게 된다. 이러한 예로서는 2배체가 아닌 핵에 있어서 복제가 개시되기 때문에 염색체수에 이상이 일어나 정상 수정란은 구축되지 않는다. 여기에 대하여서는 G1이나 M기의 핵을 이식하면 이상적인 발생은 일어나지 않는다. 여기서, 이식핵과 수용체간에 세포주기를 조절할 필요가 생기게 된다. 예를 들면, 수용체측의 세포질에 자극을 가하여 M기로부터 S기에 진행시켜 놓으면 MPF 활성이 저하하고, 이식핵의 S기나 G2기에서도 수용할수 있도록 되어진다. 이와 같은 수용체 난자를 Universal recipient란이라 부른다. 핵의 제거는 선단을 예리하게 만든 glass제의 pipet을 이용하여 실시한다. 지지세포는 성숙도가 높을수록 이식가능한 수정란을 만들 수 있는 확율이 높아지기 때문에, 이러한 이유로부터 일반적으로 성숙 22~24시간째에 핵을 제거한다. 한편, 이 시기가 되면 핵은 제 1극체로부터 떨어져 나가기 때문에 제거한 핵의 난자 세포질은 약 3분의 1정도가 소실되게 된다. 최근에는 세포질의 손실을 최소한으로 하기 위하여 성숙 18시간째에 핵을 제거하는 방법이 이용되고 있다. 이러한 시기에는 핵이 제 1극체로부터 세포질이 떨어져 나가는

것이 거의 없고, 핵을 제거하기도 용이하다. 또한 그렇기 때문에 세포질의 손실도 적어지게 된다.

일반적으로 난자의 세포질로부터 핵을 제거하기 위하여서는 1 ml중 2 ug을 포함한 Hoechst 33342로 핵을 형광염색하여 현미경하에서 확인하는 방법이 채택되고 있다. 이렇게 핵을 제거한 세포의 투명대 내강에 핵이 삽입되어진다. 이 조작은 5 ug/ml의 cytochalasin B액내에서 행한다. 다음으로 핵을 삽입한 난자를 Zimmerman액내에 옮겨 50 usec/1kv/cm로서 전기적 자극을 가하여 융합한다. 융합한 후 즉시 CR2aa액으로 옮긴다. 20분 경과후에 핵과 세포가 융합되기를 기다린 후 10 ug/ml의 calcium ionophore를 포함한 CR2aa액에서 5분간 활성을 처리한다. 그후, 10 ug/ml의 cycloheximide를 포함한 CR2aa액서 4~6시간 처리하고, 다시 CR2aa액에서 발생배양을 실시한다.

4. 핵의 공급원으로 이용한 수정란의 할구세포 또는 태아의 세포

핵은 세포주기를 수행하고 있기 때문에 계속하여 분열하게 된다. 세포분열을 개시하지 않은 G0기, 다음으로 G1기에서 세포의 발육이 개시하고, S기에서는 DNA의 복제가 시작되게 된다. 따라서 G2기에서는 유사분열이 일어나고 M기로 분열하고 증식한다.

한편, 생체내에서 전체의 세포가 증식하는 것이 아니며, 증식능력을 가지고 가는 도중 증식이 정지하고 있는 세포나 증식능력을 잃은 세포도 존재한다. 결국 세포밀도의 증가, 증식인자의 결핍 등의 환경(배양) 조건에 의하여 세포는 증식을 정지하게 된다. 이와 같은 증식 정지상태를 G0기라 말하며, G1기의 세포에서는 다른 형태로 생각되고 있다. 많은 세포에 있어서 증식의 제어는 G1기로 되어 있다. G1기에는 세포분열 후 S기에 도달할 때까지의 시기로서 DNA의 합성을 개시하기 위한 준비시기이다. G1기의 시간은 언제나 일정하지 않으며, 증식조건이 좋으면 짧아지게 되며, 좋지 않으면 길게 되어진다. 결국 세포주기의 길이는 G1기에서 조절되어지고 있다. 증식인자가 결여되어 있는 G1기에는 G0기에 역으로 휴지상태가 된다. 한편, 결여된 증식인자를 공급하여 주면 G0기 세포는 G1기에 되돌아오게 되고, 다음으로 S기에 들어가 세포주기를 회귀하게 된다. 이러한 세포주기를 조절하기 위하여서는 핵이식과 제거핵 난자를 cycloheximide액 내에서 4~6시간 배양하므로써, 처음부터 M기로 동기화 하는 것이 보통이다.

5. 세포주기의 동기화와 핵이식의 수법

이식되어질 핵과 이식을 받을 세포질간의 세포주기의 동기화는 핵이식에 있어서 매우 중요한 요인이다. Campbell 박사 등은 이식핵을 G0에 동기화하여 이용하였다. G1기의 2배체 핵은 MPF 활성이 높은 세포질에 이식하여도 염색체의 이상복제는 일어나지 않는다. 또한 배양세포를 MII기의 세포질에 이식하고, G0기의 염색체는 이식 세포질 중에서 초기화되기 때문에 수절을 받기 쉬운 것으로 알려져 있다.

한편 이식핵을 세포질 난핵내에 이식하는 경우 3가지의 방법을 소개하면 다음과 같다..

방법 1. Recipient 난자를 활성화한 후 핵을 이식한다.

방법 2. Donor 핵과 recipient 난자를 동시에 활성화(G0/G1 activation transfer; GOAT법) 시킨다.

방법 3. 핵이식을 행한 후에 recipient 난자를 활성화(metaphase arrested G0/G1 accepting cytoplasm; MAGIC법) 시킨다.

방법 1은 donor 핵을 세포주기에 관계없이 받아들이는 Universal recipient란을 이용하는 방법이며, 방법 2 및 3은 MPF 활성이 높은 recipient란을 이용하는 것이다. 특히 3의 방법에서는 이식되어진 핵은 장시간 MPF의 활성이 높은 MII기의 난이 되어지게 된다. Campbell 등은 3의 방법이 분화세포핵의 초기화에 가장 좋은 방법이라고 설명하고 있다.

Wilmot 박사 등은 체세포의 핵이식시 GOAT법을 이용하고 있다. 분화한 체세포의 핵을 초기화는 난세포질 중의 인자는 전사조절인자 또는 염색체 결합단백질과 같은 것이라 생각하고 있다. 이러한 인자는 수정란 genome의 활성화가 일어나 모성 mRNA가 소실하기까지 초기수정란의 세포질에 존재하는 것으로 생각하고 있다. 면양의 수정란 genome의 활성화에는 8~16세포기에 일어나기 때문에 MII기의 난에 이식되어진 핵은 이론상 세포주기가 2~3회 진행되는 동안 초기화 인자의 영향하에 놓여지게 된다. 수정란 genome의 활성화 시기는 소, 면·산양에서는 8~16세포기, 돼지에서는 4세포기, mouse에서는 2세포기로서 동물종에 따라 다르게 나타난다. 분화한 핵의 초기화에는 초기화 인자의 영향을 받는 기회가 많을수록 유리하다. 양이나 소에서는 수정란 유래 배양세포의 초기화가 가능하지만, 돼지나 mouse에서는 어느 정도 발생이 진행된 초기수정란의 핵은 어렵게 된다. 이러한 수정란은 수정란 genome의 활성화 시기의 차이에 기인하는 것으로 생각된다.

6. 체외배양에 있어서 거대한 태아 문제

근년, 체외수정이나 핵이식 기술에 의한 임신례가 증가할수록 이러한 방법에 의하여 작출되어진 수정란의 이식에 의한 분만에서는, 수정란 이식이나 인공수정에 비하여 난산이나 생후즉시 사망하는 사고가 빈발하게 되었고, 이러한 문제는 태아가 거대하기 때문인 것으로 보고되고 있다.

체외수정이나 핵이식수정란의 수태에서는 태아태반의 활성이 높고, 이에 수반하여 임신유지 특수 단백 수준 향상으로 생시체중이 증가할 가능성이 높다. 실제로 mouse를 이용한 체외수정에서는 insulin growth factor 2-receptor의 결핍으로 인하여 거대한 태아가 태어난다고 말하고 있다. 체외에 있어서 성숙, 수정으로 체외수정시킨 수정란은 수정후 5일째부터 6일째에 나타나는 상실배의 소형화가 일어나지 않는다. 그리고 7일째부터 8일째 나타나는 배반포의 크기는 체내 수정란의 것과 비교하여 아주 크고, 따라서 이러한 크기가 문제시되기 때문에 현행의 체외 배양법에서는 많은 문제점이 제기되고 있다. 이렇기 때문에 체내수정란이 난관에 이식하여 발생하는 것과 같은 발육환경을 만들어 줄 필요가 있다. 핵 이식에 의한 초기배 사망이 많은 이유는, 이러한 수정란을 구성하고 있는 세포의 유전자(DNA)가 정상적으로 기능하고 있지 않기 때문에 apoptosis(세포의 자살)가 일어나는 것으로 알려져 있다. 그리고 유산이나 조산 및 생후 사망사고가 많은 이유는 구축한 핵이식수정란의 초기 발생을 이용한 시판되고 있는 CO₂ gas 배양기에 문제가 있을 것으로 생각되어진다. 그러한 배양 환경이 생체의 것에 비하여 아직 불충분한 것인지는 아닌지? 또는 이와 같이 핵이식수정란의 치환은 배양환경조건의 불완전한 원인 중의 하나로 생각되어진다.

실제로 체외수정란의 이식에 의한 거대한 태아의 사고 방지의 목적으로 체외수정시킨 직후의 초기수정란을 면양의 난관에 일시 이식하고, 다시 그것을 꺼집어 내어 recipient의 소 자궁에 이식하면 거대한 태아사고를 나타내지 않았다고 Busuke는(1998) 보고하고 있다. 필자 등은 휴대용의 CO₂ gas 배양기구의 개발에 있어서 이것을 본 연구실에 이용하고 있다. 이것은 도시락 크기의 용기내에 CO₂ gas powder를 넣고 2~5% CO₂를 발생시키는 간이 용기이다. 난자는 수정직후를 통하여 생체의 아주 좁은 난관내에 머물면서 발생하기 때문에 어느 정도의 음압과 저산소의 기상조건하에 놓여지게 되지 않을까 하는 가설을 세웠다. 그리하여 용기내부를 음압(~300 mmHg)과 저산소(14%) 조건하에서 소 난자를 이용하여 체외 수정을 행하였다. 그러한 결과 이러한 간이 배양기를 이용한 체외수정에서의 분할율이나 배반포율은 시판되고 있는

고가의 CO₂ gas 배양기 유래의 것에 비하여 유의적으로 높은 성적을 얻을 수 있었다. 그리고 핵이식수정란의 구축율, 배반포율도 시판되고 있는 gas 배양기보다 유의적으로 높은 성적을 얻을 수 있었다. 이러한 용기의 유용성은 Egypt 국립연구소 번식 및 인공 수정부와 공동연구로 행하여 물소(Buffalo)의 체외수정에서도 확인되었다.

현재 필자의 실험실에서는 이러한 간이 CO₂ gas 배양기를 이용하여 생체 내 난관의 기상조건에 가깝게 할 수 있도록 노력하고 있다. 체외수정란이나 복제수정란의 초기 발생이 생체의 난관 내에서 발생시키는 것과 같은 조건을 얻을 수 있다면 거대한 태아로 인한 분만사고를 줄일 수 있는 것이 가능함에 틀림이 없다. 한편, 생체세포를 이용한 핵이식에서는 이식핵과 핵을 제거한 난자와의 세포주기가 완전히 일치시키는 것이 가장 바람직하고, 핵과 지지세포와의 초기화에 의한 발생 combination이 정확히 기능 하였는지 아닌지의 여부가 앞으로의 정상발생을 위한 큰 factor로 작용할 것이다. 체세포에 전능성을 다시 되돌려 주기 위하여서는 이식핵에 초기화의 조작을 행하여도 활성화되지 않는 유전자가 있다면, 발생의 초기, 이식후의 임신 기간, 분만시 및 분만후의 각 기간중에 수정란의 사망, 유산, 사산 또는 분만직후 사망 등의 발생 확율이 높아지게 된다. 실제로 핵이식에서는 이식후의 수태율의 저하나 유산, 조산, 사산, 분만 직후 사망 등의 현상이 나타나고 있다. 그리고, 다수의 핵이식 태아의 태반형성에 보여지는 이상현상에 대하여도 충분히 고려하여야 한다. 핵이식시 핵의 연령을 생각하지 않을 수 없는데, 가능한한 젊은 동물 유래의 핵을 이용하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

이와 같이 핵이식은 아직 초보단계의 기술로서 많은 문제점을 극복하지 않으면 안될 현실에 놓여 있다.

7. clone기술로 똑같은 것이 복제될 수 있을까?

핵은 우량한 가축이 보유한 유전자를 가지고 있기 때문에 핵을 이용하면 똑같은 유전자를 지닌 가축의 복제가 가능하게 된다. 그러나, 실제로는 동물 표현형중 유전자가 관여하는 것은 30%정도이며 대부분은 사육환경에 지배된다. 동물이 처해진 환경, 사료의 종류 및 영양, 질병에 대한 면역 등의 차이로 인하여 복제하여도 상이한 개체가 태어나게 된다.

예를 들면, 유용우의 개량에서 유량, 유지량, 무지 고형분량 등으로 평가되는 factor의 유전율은 유량에서 0.2~0.4, 유지량 0.5~0.6, 무지고형분량 0.4~0.5 착유 속도가 0.5~0.6으로 유량의 변동은 비교적 유전에 지배되는 부분은

적이고, 약 70%전후가 사육관리나 기상 조건 등의 환경요인에 지배된다.

한편, 핵의 발생을 지지하는 탈핵난자는 mitochondria DNA을 가지고 있다. mitochondria는 발전소적 역할을 하고 있어서, 세포 에너지의 90%이상 mitochondria에 의존하고 있다. 어미의 mitochondria는 자손에 전해진다. 어미로부터 전달된 mitochondria는 암컷 자손의 경우에는 다음 세대의 자손에 다시 전달하지만, 수컷 자손의 경우에는 다음 세대에 전달할 수 없다. 이와 같이 mitochondria는 모체의존성이 있다.

이식된 핵은 messenger RNA를 통하여 liposome에 단백질을 만들도록 명령을 한다. 단백질이 생산되면 golgi장치가 작동하여 만들어진 단백질에 당이 붙는다. 그리고 이 단백질은 세포에 공급하는 mitochondria에 전해진다. 즉 탈핵난자에 이식된 핵은 모체 유래의 세포질을 구성하는 미소기관에 의하여 키워지게 된다.

mitochondria가 매우 활성적이면, 이식된 핵도 충분한 능력을 발휘하게 된다. 그러나 mitochondria가 빈약하면 아무리 양질의 핵으로 clone동물을 만들어도 기대에 못 미치게 된다.

사람에서는 40세를 넘기면 난자의 질이 저하된다. 또한 난자에 이상이 있는 경우에는 타인의 난자로 체외수정을 하게 된다.

최근 미국 뉴욕대학의 연구팀은 난자의 세포질이 불량한 불임 여성의 난자에서 핵을 제거하여, 이것을 정상적인 다른 여성 난자 핵과 치환하여 체외수정하여 발생한 수정란을 불임의 여성의 자궁에 이식하여 임신에 성공하였다. 이와 같이 난자의 질은 연령에 따라서 차이가 있다. 즉 난자는 개성적이며 젊을수록 energy가 높은 것을 알 수 있다.

8. 상업적 응용

핵이식이 상업적으로 성립하기 위한 조건은 우량우의 생산효율의 적정성, 경제적인 유효성, 적용 대상에 대한 생산의 효율성 등을 고려하여야 한다.

지금까지 가축을 이용한 핵이식에서 문제가 되는 것은 임신시의 태아 태반의 이상이다. 태반 및 태아의 수, 크기와 양은 임신기간에 큰 영향을 준다. 태아의 태반결절수가 적거나, 크기가 작으면 모체와 혈류가 정상적으로 기능하지 못하여 유산 및 조산을 유발시키거나 임신기간이 짧아진다.

Advanced Cell Technology, Inc.의 Stice박사 등은 체세포에 의한 핵이식으로 분만후 사망한 1두와 유산된 2두의 송아지에서 폐압의 이상항진을 발견하였다. 또한 2두의 송아지는 팽창된 심근증으로 폐사하였다고 보고하였다. 이들

송아지의 생시체중은 44에서 58 kg이었다. 이 연구에서 핵으로 이용한 소태아의 섬유아세포와 분만된 송아지의 생시체중과의 관련성 여부는 금후의 연구 결과로 밝혀질 것이다.

핵이식에서 문제가 되는 태아태반의 이상을 감소시키기 위하여 지금부터 세계의 많은 연구자에 의해서 복제수정란의 작출에 개선이 되어질 것으로 생각되어진다.

Stice박사 등이 시도한 유전자도입에 관한 연구에서는 성체의 세포를 이용하는 것보다 태아세포를 핵으로 이용하는 것이 유효하였다. 그 이유는 태아세포는 성체세포보다 발생력이 높기 때문에 유전자도입을 쉽게 받아들이는 이점이 있기 때문이다.

한편 유전적으로 우수한 암컷이나 수컷의 세포핵을 이용하여 핵이식을 하는 것은 현존하는 우량가축의 복제를 만든 것으로 개량과는 무관하다. 성체세포를 핵으로 하여 복제수정란을 만들고 이것을 이식하여 생산된 송아지가 우량하여 시장에서 높이 평가된다면 경제적으로도 성립되지만, 생산효율이 나쁘면 상업베이스로 발전하기는 어렵다. 현재의 기술로는 어렵게 만든 복제수정란을 이식하여도 정상적인 분만까지 하는 것은 매우 어려운 일이다.

핵이식이 안정적으로 축산현장에서 활용되게 되면, 흑모화우의 개량을 시도하는 각 자치체의 연구소에는 시장에서 높게 평가되고 있는 상강육을 복제기술로 생산할 수 있게 될 것이다. 시장에서 높게 평가된 A-5의 고기를 핵으로 하여 다수의 핵이식란을 만들어서 대리모에 이식하여 다수의 우량한 copy우를 만드는 것도 가능하다.

실제로 오이타현 축산시험장의 시가(1998) 등은 암소의 근육세포를 핵으로 하여 clone우를 생산하였다. 이 방법이 퀘도에 오르면 생산자는 시장에서 고가로 팔리는 소의 체세포를 핵으로 하여 clone우를 만드는 것을 원할 것이다. 그리고 이런 것을 판매하는 venture business가 등장할지도 모른다. 문제는 이런 것에 필요로 하는 cost이지만 성공률이 높아지면 기업화가 가능하다고 생각되어진다.

우량우를 복제화하는 또 하나의 merit는 종축을 선택하기 위한 검정효율이 높아지는 것이다. 복수의 clone우 중 1두만을 남기고 다른 것을 비육 하여 그 육질을 판단하여 육질이 최상급이라면 남은 1두는 전부 동일한 유전자를 가지고 있기 때문에 우량한 종축이 될 수 있다. 이 방법이라면 종축 선발이 정확하고 검정기간이 매우 짧아지게 된다. 가고시마현의 육용우 개량연구소에서는 이미 clone기술을 이용한 육용우 검정이 행하여지고 있다.

Holstein종에서 고유량, 고 품질의 유즙을 생산하는 copy우를 다두 생산할 수 가있다. 이것이 잘 이용된다면 holstein사육두수를 줄일 수 있고, 부수적으로 사료비나 인건비를 절약할 수 있기 때문에 낙농가에게는 낭보이다. 또한 소의 체형이 비슷하게되어 착유의 자동화가 용이하게 된다. 특히 로봇착유의 보급화를 촉진시키는 것에도 merit가 높다.

먼저 말한 것과 같이, 핵이식기술에서는 유전자도입가축을 유효하게 생산할 수 있는 가능성이 있다.

Stice박사 등(1998)은 136개의 핵이식란을 53두의 대리모에 이식하여 7두의 유전자 도입우를 얻었다. 이를 위해서 1,000개이상의 제핵란과 100두를 넘는 대리모가 이용되었다.

도입유전자는 당뇨병환자에게 필수인 insulin, 사람혈청 albumin, 혈우병환자에게 유효한 혈액응고인자, 삼장발작 후 혈전을 용해시키는 tsp나 각종 질병을 예방하는 유전자, 고기나 유량을 증산하는 유전자 등을 생각할 수 있다. 이런 유전자가 도입된 가축의 유즙 중에서는 사람에게 유익한 의약품이 효율적으로 생산 될 것이다.

9. 의약품생산

Berge박사 등(1972)에 의하여 개발된 DNA치환기술은 그 후 급속하게 진보되어 염색체상의 유전자를 단리하여 대량으로 수집할 수 있게 되었다. 현재 사람에서는 수만 개의 유전자지도가 해석되어 단리되었다.

가축의 유전자해석은 사람에 비하여 매우 늦게 시작되었지만, 단리된 유전자 DNA가 배양세포나 동물의 개체에 도입하는 연구가 발전하게 되어서 유전자의 형질 및 조절기능의 해석이 가능하게 되었다. 또한 유전자 공학적 연구는 분자생물학적인 영역 뿐만이 아니고 의학 및 농학영역에서 적극적으로 시도되고 있다. 실제로 이 분야의 연구에서는 지금까지는 추출하는 방법 뿐이었던 insulin, growth hormone, interferon등의 유용한 peptide를 대장균, 효모, 곤충이나 동물세포를 숙주로 하여 대량으로 생산하게 되었다.

의료 목적의 의약품생산, transgenic동물의 작출 및 품종개량을 목적으로 한 유전자도입가축의 생산 등의 연구가 눈부시게 발전하고 있다.

영국에서는 체세포를 핵으로 한 clone sheep이 탄생한 직후 "molly"와 "polly"라고 명명된 체세포유전자도입 clone sheep이 Schnieke박사 등(1997)에 의하여 만들어지었다. 또한 1998년 2월에 Cibelli박사 등이 "Charlie"와 "Albert"라 명명된 체세포 유전자 도입 clone우를 만들었다.

이와 같이 핵이식을 이용하여 유전자를 도입한 가축을 생산하여 이런 가축으로부터 의약품을 만드는 방법은 매우 매력적이며 경제적 가치가 있는 business이다. 그러나 유전자를 도입한 가축으로부터 의약품을 만든다는 biooreactor라는 생각은 결코 새로운 것은 아니다. 실제로 유전자도입으로 유즙에서 단백질을 만든 연구성과는 소, 산양, 면양 및 돼지에서 보고되었다. 이러한 연구에서 활용되는 단백질은 항균제, 항암제, 혈액용해, 혈액응고제 및 hormone 등이다.

최근에는 유즙조성을 수정함으로써 태아의 발육증진, 유량의 증가, 유즙중의 중용 단백, 지방 및 유당의 양을 조절하는 등의 연구도 발전되었다. 이런 연구 중에는 돼지의 유즙 중에서 사람의 유즙과 같은 조성을 가진 것을 만드는 연구도 행하여지고 있다. 더욱, 최근에는 산양과 양의 유즙에서 유전자 도입에 의한 약품단백질이 생산되게 되었다. 이러한 단백질은 언젠가는 사람의 임상 현장에서 이용될 것이다.

유전자도입법으로는 초기 수정란의 웅성전핵에 현미 주입하는 방법, retro virus를 이용하여 유전자를 도입하는 방법, 전기적으로 세포에 순간적으로 천공하여 도입하는 방법, liposome을 이용한 transfection법, 그리고 수정란세포의 배결절이나 체세포를 이용하여 chimera형으로 도입하는 방법 등이 시도되고 있다. 지금까지 주로 이용된 유전자 도입 법은 DNA를 code한 단백을 초기 수정란의 전핵에 주입하는 방법이다. 목적인 유전자도입이 성공한 가축은 유즙에서 의약품이 생산된다. 그러나, 현행의 초기 수정란 전핵에 유전자 주입법은 1두의 유전자 도입가축을 생산하려면 적어도 100~1,000개의 난자 전핵에 DNA를 주입하여야한다. 이와 같은 방법에서의 성공률은 1~2% 정도로 매우 낮기 때문에 상업적으로는 이용되지 못하고 있다.

반면 liposome에 의한 transfection법이나 전기적 자극에 의한 세포의 천공하여 유전자를 도입하는 방법은 간단하며 그 도입율도 높다. 그리고 일단 유전자가 도입된 송아지의 섬유아세포는 미분화 상태로 암수도 사전에 구별 할 수 없기 때문에 이것을 핵이식 할 수 있다. 이 방법은 초기 수정란의 전핵에 유전자도입효율보다 5~10배의 높은 효율을 볼 수 있다.

Wilmot박사 등은 PPL셀라피팅크사와 공동으로 사람의 혈우병 환자를 위한 혈액응고인자를 면양의 유즙에서 만드는 연구를 하고 있다. 이 실험이 완결되면, 혈우병환자는 면양의 유즙으로 혈액응고인자를 얻을 수 있다. 이 기술의 확립은 수혈에 의한 혈우병환자의 ADV감염 등의 인위적 사고를 방지할 수 있어서 안전면에서 높게 평가되고 있다.

한편, Stice박사 등은 Genzaim transgenic사와 우유에서 사람 혈청 albumin을 만드는 공동연구를 하고 있다. 매년 440톤의 혈청 albumin이 혈청을 잃은 수많은 환자를 위하여 필요로 하고 있다. 실제로 일본에서는 매년 약 만명의 사람이 교통사고로 귀중한 생명을 잃고 있다. 현재 시판되고 있는 1 g당의 사람혈청 albumin은 매우 고가이다. 이 시장은 현재 연간 10억5천불 이상이다. 이것이 우유에서 생산되면 1두당 연간 80 kg정도이므로 매우 효과적이며 경제 적이라고 말할 수 있다.

10 의료용으로 활용가치가 높은 돼지와 소의 세포, 조직 그리고 기관

ES세포는 배양액 중에서 분화를 유발시키면 심장, 뼈, 근육, 신경 등으로 분화된다. ES세포에 레틴놀산을 첨가하면 신경세포나 glia세포 등의 뇌 세포가 되는 것이 밝혀졌다. 한편 특수한 유전자를 도입한 돼지의 세포를 핵이식 하여 clone돼지를 만들면 그 기관이나 조직을 사람에게 이식하여도 거부반응이 유발되지 않을 것이다. 거부반응을 유발하는 유전자를nock-out하면 된다. 즉nock-out시킬 거부반응유전자와 역 방향의 DNA를 삽입하는 방법으로 유전자를nock-out시키는 방법이다.

사람 단백질을 세포의 표면항원으로 code한 돼지의 clone을 만들면 인간의 면역계를 인식하는 장기를 가지게된다. 이와 같이 특수한 도입유전자는 동일 유전자의 조환으로 구축된다.

많은 연구자는 사람의 조직이나 기관을 얻기 위하여 거부반응을 제거하기 위한 유전자도입을 돼지를 대상으로 시도하였다. 이 연구의 목적을 달성하려면 돼지 생체세포유래의 섬유아세포에 유전자를 주입하여야한다.

그러나 현재까지는 분화된 세포로 clone돼지를 생산하지는 못하였다. 지금까지 돼지의 수정란유래 활구를 이용한 핵이식으로 복제돼지를 생산한 것은 Prather박사 등(1989)에 보고한 것이 전부이다. 이와 같이 동물 종의 차이에 의하여 핵이식의 난이도가 존재하는 이유에 대하여는 아직까지 해결되지 않고 있다. 그러나 돼지의 생체세포를 핵으로 한 clone기술은 급속하게 향상되고 있어 돼지의 장기표면에 존재하는 거부반응의 원인이 되는 특수한 단백질로부터 당 분자를 제거하면 돼지 장기를 사람에게 이식하는 것도 가능할 것이다. 또한 clone돼지는 장기의 크기가 사람에게 적합하기 때문에 장기이식의 좋은 목표가 된다.

11. 세포와 조직의 치료

현재 의료계에서는 쇠약하거나, 손상을 받았거나, 어떤 질병상태에 있는 환

자에 대하여 세포치료를 하고 있다.

무릎 관절연골의 마모로 고통을 호소하는 환자는 연골염을 유발시키는 전조 세포를 수술적으로 제거하여 준다. 환자는 장애를 받은 연골 대신 정상적인 연골세포가 이식된다. 이런 조직이나 장기를 사람에서 사람으로 이식하면 이것이 면역원이 되어 세포를 파괴한다.

Perkinson병도 신경성 장애이다. 50세를 넘으면 위험성이 1%증가한다. Perkinson병은 dopamine을 분비하는 특수한 신경세포의 결손이 그 원인이다. 그러나 이런 환자의 신경세포는 체외배양하여도 성장하지 않는다. 유산된 태아(사람)에서 얻어진 신경세포를 돼지에 이식하여 이것에서 얻어진 돼지유래 신경세포를 Perkinson병 환자에 이식하면 효과를 발휘할 것이다.

Perkinson병 환자의 신경변성을 치료하기 위한 소의 유전자도입 태아의 신경세포의 유효성에 관한 연구도 수행중이다. 이 연구에서는 핵을 이식한 소유전자도입 태아의 조직을 임신 50일째 분리하여 뇌내의 신경전달물질인 dopamine이 체외배양에서 출현여부를 관찰하여 Perkinson병의 모델로 하고 있다.

또한 돼지의 수정란유래 세포조직을 사람의 임상치료를 목적으로 실험에 이용되고 있다. 이 연구에서 유전자도입 clone돼지는 핵이식에서 이용한 생체세포가 도입한 사람의 유전자로 수식되었는지를 확인할 필요가 있다. 유전자 도입이 확인되면 핵을 제거한 난자와 융합하여 clone수정란을 다수 만들어 이것을 대리모의 돼지에 이식하여 새끼돼지가 태어나면 사람유전자 도입 clone돼지가 된다. 이와 같이 돼지의 세포핵에 사람의 유전자 도입으로 만들어진 clone돼지 유래의 피부 이식은 거부반응을 저지 할 수 있게 된다. 또한 사람 성장 유전자가 첨가되면 perkinson병과 같은 신경변성병의 환자 자신의 세포 퇴행을 저지하게 된다.

12. 핵을 이식한 개체의 연령은?

매우 흥미로운 것은 “clone가축은 어떻게 노화되어 갈까?” 이다. Dolly탄생 일은 유선세포를 제공한 어미의 연령을 가산하여야 하는가? 즉, 80세의 사람 세포핵은 앞으로 10년 이내의 수명이므로 핵이식으로 태어난 개체도 앞으로 10년 이내에 수명을 다하지 않을 것인가 하는 의문이다.

실제로 세포는 연령과 함께 노화한다. 노화된 사람유래의 세포도 연령에 대응하여 노화되어간다. 또한 가축 난자의 정상성은 가령과 함께 저하된다. 사람에서는 40세를 넘으면 난자의 변성율이 젊은 사람보다 높다고 보고되었다.

이와 같이 난자의 변성이 연령과 함께 증가하는 것을 생각한다면 당연하게

핵이식의 연령도 고려할 필요가 있다. 예를 들면, 자신의 복제를 만든다면 최상의 방법으로 자신을 낳아준 모친의 난자를 얻을 필요가 있다. 이런 난자를 성숙시켜서 핵을 제거하고 자기의 세포핵을 삽입하여 융합한다면 가장 자신과 비슷한 복제를 만들 수 있다. 그러나 연로한 모친의 난자는 활성이 젊은 시기의 그 것과는 큰 차이가 있다. 또한 자신의 세포에 연령을 가산하게 된다면 자신을 만드는 것과는 크게 달라지게 된다.

염색체의 말단에는 DNA염기배열이 반복되어 있는 부분이 있다. 이 Telomere라 하는 DNA는 종이 tape와 같이 세포 분열 시마다 단축된다. Telomere는 젊은 세포일수록 길고, 나이를 들면 짧아진다. 만일 이것이 사실이라면 노화되어서 처음으로 능력이 확인된 우량우를 핵이식으로 만든다는 것은 의미가 없게 된다. 이와 같이 노화된 세포에서는 분열 횟수를 측정하는 「counter」적 역할을 하는 염색체의 말단에 있는 Telomere는 짧다. 나이를 들면 암이 될 위험이 높아지는 것은 이 Telomere가 telomerase라는 효소에 의해서 길이가 유지되지 때문이다. 이 Telomerase효소에 의한 암세포의 폭주를 저지하기 위하여 노화세포 Telomere를 짧게 하기 위한 유전자 P16의 스위치가 있다.

그러나 통상적으로 노화세포도 이식 핵내에 있는 생물시계가 재program되어 reset되었기 때문에 당연하게 도입된 동물의 세포핵은 초기화된 것으로 보아야한다. 또한, 난자에는 telomere를 늘려주는 효소가 존재하여 세포의 활성화와 핵의 전기융합조작으로 염색체의 telomere가 늘어나게 되는 것이 틀림없다. 그러나, 이것은 명확한 것은 아니고, 앞으로 남아진 중요한 연구과제라고 생각된다.

12. 끝으로

우리 연구실에는 복제 소와 복제 고양이 만들기를 하고 있다. 앞서 말했듯이 사망 후 동결 보존된 소나 고양이 조직에서 이식 가능한 수정란을 만드는 데 성공하였다. 그러나, 대리모가 될 소가 없기 때문에 이식까지는 하지 못하였다. 복제 소가 정상적으로 분만될 수 있도록 체외배양기구(인공자궁)의 개발을 포함한 연구도 하고 있다. 동결 보존된 조직이나 기관유래의 체세포를 이용하여 핵이식하고, 이것에서 복제 소가 얻어진다면 이 기술은 멸종위기의 희소동물보호에 도움이 될 것이다. 한편 EGFP유전자를 도입한 복제가축 생산에 관한 연구도 적극적으로 하고 있다.

복제가축으로부터 의약품생산에 관한 연구가 진전되면 의약품회사와 공동 연구도 발전할 것이다.

그러나 이 연구는 초기단계이다. 조급하게 유효성만을 추구함과 동시에 손해가 되는 부분도 고려하여야 한다. 일본에서의 축산물 자급율은 50%에도 미치지 못한다. 이와 같은 현상에서 첨단기술이 도움이 될 것인가? 대부분의 주요독립국가는 농업 자급율이 70%가 넘는 농업기반을 자랑하고 있다. 독립국으로 인지되려면 식량의 자급율이 적어도 70%이상 되어야 한다고 생각된다. 한편 소비자는 우유의 대상이 되는 가축이 인위적 조작을 받지 않고, 안전한 사료로 자연적인 환경 하에서 사육되기를 원하고 있다. 이와 같이 시장에서의 축산물의 평가는 사람의 건강을 해치지 않고 안전하고 양질의 것이어야 한다. 연구자는 축산물의 시장평가도 고려하여 선구적 연구를 수행하여야 한다.

참고문헌

1. Development in vitro and in vivo of aggregated parthenogenetic bovine embryos. Boediono and others, *Reprod. Fertil. Dev.*7:1073-1079, 1995
2. Aggregation of parthenogenetic and fertilized embryos for producing chimera calves. Boediono and others, *Theriogenology* 454:220,1996
3. 野生動物の家畜化と改良 鈴木達行著 養賢堂, 1996
4. 單爲生殖卵と受精卵 鈴木達行 畜産の研究 49:3-4, 1995
5. クロ-ン羊ドリ-ジ-ナ コ-ナ著 中俣眞知子驛 アスキ-出版, 1998
6. 世界における動物バイオテクノロジーの研究動向(1) 鈴木達行 畜産の研究 50:437-442, 1996
7. 世界における動物バイオテクノロジーの研究動向(2) 鈴木達行 畜産の研究 50:547-551, 1996
8. 第3回 國際受精卵移植學會に出席して 鈴木達行 畜産の研究 51:471-477, 1997
9. クロ-ン家畜の生産 鈴木達行 *デ-リ-マン* 2:76-77, 1998
10. 遺傳子導入家畜の生産 鈴木達行 *デ-リ-マン* 3:108-109, 1998
11. 處女發生 鈴木達行 *デ-リ-マン* 4:56-57, 1998
12. 性判別 鈴木達行 *デ-リ-マン* 5:52-53, 1998
13. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. Cibelli JB and others. *Science*, 280:1256-1258, 1998
14. Lambing by nuclear transfer. Solter D, *Nature* 380:24-25, 1996
15. An udder way of making lambs. Stewart C, *Nature* 385:769-780, 1997
16. 平成10年度核移植技術全國檢討資料, 農林水産省畜産試験場 & 農林水産省家畜改良センター
17. 細胞週期 山本正幸, 長濱嘉孝, 岡山博人 *實驗醫學* 羊上社 18:51-58, 1990