

인체 유용물질 생산을 위한 형질전환 닭 생산 연구

전익수¹, 변승준¹, 최철환¹, 김학규¹, 김상훈², 서준교³, 정일정¹, 장원정¹, 김태운⁴
¹농촌진흥청 축산기술연구소, ²경희대학교, ³한림대학교, ⁴가톨릭대학교

서 론

닭은 번식 생리적으로 포유류 가축에 비해 산자수가 많고 소나 돼지에 비해 세대간격이 짧기 때문에 두 세 마리를 이용하여 짧은 시간 내에 많은 수의 자손을 손쉽게 생산할 수 있다. 그러므로 형질전환 기술을 닭에 적용하면 인간에 유용한 형질을 도입한 형질전환 닭의 계통조성이 소나 돼지보다 용이할 것이다. 사람은 산소호흡의 결과 체내에 유해산소가 생산되며, 생산된 유해산소는 각종 질병과 노화의 원인중의 하나로 알려져 있다. 인체는 유해산소와 싸우는 자체 방어기구를 갖추고 있는데 이중 가장 중요한 역할을 하는 것이 SOD(super oxide dismutase)이다. Lactoferrin은 포유동물의 유즙에 존재하는 철 결합성 생리활성 물질로서 체내 면역체계의 조절 및 염증반응의 제어, 임파구의 증식인자, 장내 철분 흡수 촉진, 항산화제로서의 역할과 점막의 외부항원에 대한 방어시스템의 중요한 구성성분으로서 어린이 용 분유에서 반드시 보강해야 하는 필수성분이다. 따라서 본 연구에서는 형질전환 닭의 계란에서 인체 유용물질의 생산을 목적으로 닭 수정란의 완전 인공 발생기술을 이용한 형질전환 닭 생산기술의 확립과 계란 특이적 promoter의 구축 및 닭의 계란에서 사람의 lactoferrin과 s-SOD 등의 생리활성물질 생산 시스템을 확립하고자 실시하였다.

재료 및 방법

본 실험에 공시한 실험동물은 30~45주령의 산란 실용계(commercial layer)를 사용하였으며, 25±1 °C가 유지되는 무창 케이지 산란계사에서 16시간 점등하면서 사육하였다. 수정란 채란은 공여계(donor hen)가 산란을 하고 난 뒤 2시간 15분 경과 후 공여계를 도살하여 복부로부터 1세포기 수정란이 들어 있는 팽대부에서 험부까지의 난관을 들어낸 다음 1세포기 수정란을 채란하였다. 채란된 1세포기 수정란의 체외배양과 대리난각배양 및 유전자 미세주입은 Perry(1988), Love 등(1994), 전 등(2001)이 제시한 방법을 이용하였다. 실험구에서 부화된 모든 개체는 융모성 뇨막(chorioallantoic membrane : CAM), 혈액 그리고 생식세포에서 주입한 외래 유전자의 삽입 및 통합여부를 검정하기 위하여 PCR 분석을 실시하였다.

생식세포의 분석은 부화된 병아리가 성성숙에 도달하면 수컷일 경우는 정액을 이용하여 분석하였고, 암컷일 경우는 수정란을 생산하여 3일간 발생시킨 다음 그 배자를 이용하여 분석하였다. 생식세포에서 양성으로 판정된 원종계는 인공수정하여 후대를 생산하였으며, 생산된 후대는 융모성 뇨막(CAM)에서 주입한 외래 유전자의 삽입 및 통합여부를 PCR 분석으로 검정하였다. 유용한 유전자의 구축을 위해서 사람의 dermal fibroblast와 bone marrow 세포에서 사람의 s-SOD(723 bp)와 lactoferrin(2136 bp) 유전자를 각각 클로닝하고 염기서열 분석을 완료하였다. 클로닝된 human s-SOD와 lactoferrin 유전자들이 대장균에서 각각 35 kDa(human s-SOD)와 78 kDa(lactoferrin) 크기의 단백질 과발현을 검증하였다.

계란 특이적 발현을 목적으로 계란의 난백에서 대량으로 발현되는 닭 ovalbumin 유전자의 7.4 kb

promoter를 클로닝하고 염기서열 분석을 완료하였다. 최적의 chicken ovalbumin promoter 부위를 탐색하고자 1.2, 2.8, 그리고 7.4 kb 크기의 promoter를 가지는 luciferase reporter vector를 제조하였다.

결 과

1세포기 닭 수정란의 체외배양 및 대리난각배양에 의한 병아리 생산결과는 159개의 1세포기 수정란을 공시하여 체외배양 및 대리난각배양한 결과 배양 4일차에 86.2 %, 배양 11일차에 52.2 %, 배양 19일차에 43.4 %의 생존율과 24.5 %의 부화율을 획득하였으며, 유전자 미세주입에 의한 형질전환 닭 생산기술 확립을 위하여 표지유전자(Lac-Z)가 미세주입된 1세포기 닭 수정란을 체외배양 및 대리난각배양한 결과 15.7 %의 부화율을 획득하였고, 부화된 21수 중에서 10수가 성체까지 성장하였으며, 그 중 1마리의 성세포에서 미세주입한 표지유전자의 삽입 통합을 PCR 검정을 통하여 확인하였다. 인체 유용물질 생산을 위한 형질전환 닭 생산을 목적으로 다음의 기초연구들을 수행하였다. 인체유용 유전자들의 클로닝과 염기서열 분석, 대장균에서 획득한 유전자의 단백질 과발현 등의 기초적인 연구들을 성공적으로 완료하였다(Fig. 1). 계란 특이적인 promoter인 ovalbumin promoter 부위를 클로닝하고, 최적의 promoter 부분을 확립하고자 3종의 promoter deletion mutant들을 제조하였다(Fig. 2).

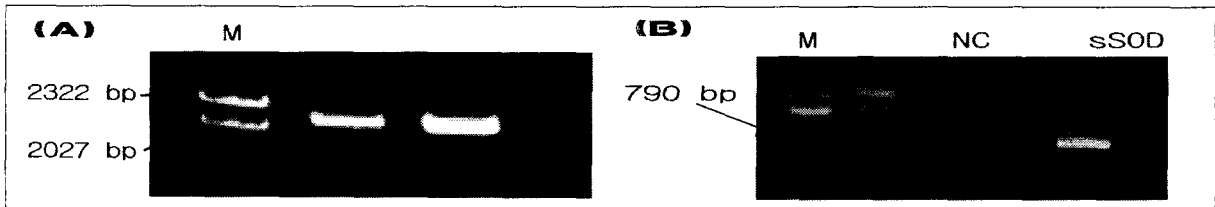


Fig. 1. The RT- PCR successfully amplifies human s-SOD(A) and lactoferrin(B).

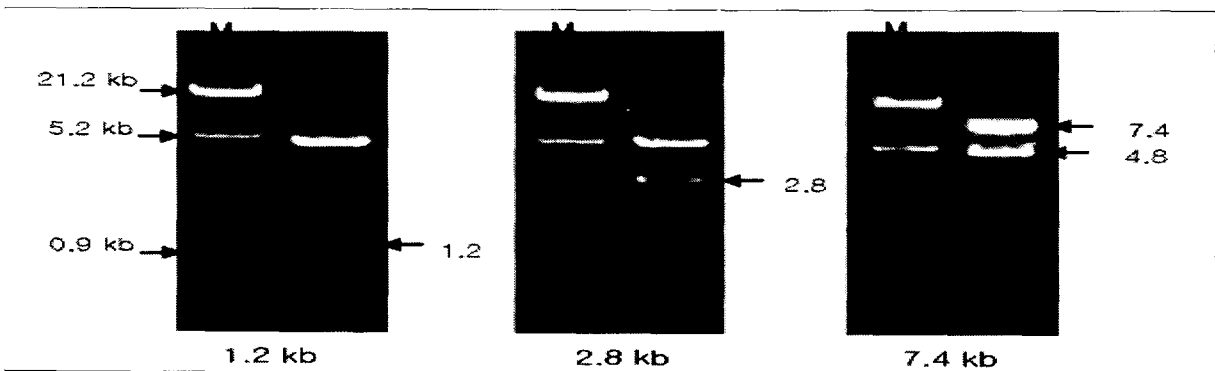


Fig. 2. Deletion reporter vector constructs of the chicken ovalbumin promoter region.
M : DNA marker ; 4.8 kb : pGL3-basic reporter vector.

참고문헌

- Jeon IS et al, 2001. Kor. J. Poul. Sci., 28:125-133.
- Love J, et al. 1994. Bio/Technology. 12:60.
- Perry MM. 1988. Nature, 331:70-72.