Transgenic animal을 통한 면역학의 연구

한국과학기술연구원 유전공학연구소 **유대열 · 이경광**

I. Transgenic animal이란?

외래의 유전자를 인위적으로 염색체상에 삽입시킴으로서 그 형질의 일부가 전환된 동물을 transgenic animal(형질전환 동물)이라 한다. 1980년 Gordon 등(2)에 의해 개발된 형질전환동물생산기법이 생물학자들의 주목을 받기 시작한 것은 1982년 Nature 잡지의 표지에 거대 생쥐(super mouse)가 실린 이후이다(3). 당시 거대 생쥐는 Rat의 성장호르몬 유전자를 mouse metallothionein promoter에 연결하여 만든 재조합 DNA를 mouse 수정란의 핵내에 미세주입(microinjection)시켜 Rat의 성장호르몬의 발현을 유도한 것으로, 태어난 산자가 보통 생쥐보다 성장속도가 빠르고 체구 및 체중이 2배나 되는 형질전환된 생쥐이다. 이처럼 형질전환 생쥐가 출현하게된 학문적 배경을 살펴보면, 첫째로 수정란의 회수, 배양 및 난관 또는 자궁에의 이식 등 초기배의 체외취급기술이 완성되어 있었고, 둘째로 미세주입을 하는데 필요한 micromanipulator가 개발되어 있었으며, 셋째로 유전자 클로닝 및 유전자 재조합 기술이 발달되어 목적으로 하는 DNA를 충분히 확보할 수 있었기 때문이다.

거대 생쥐가 출현한 후 지금까지의 연구동향을 살펴보면 대체로 다음과 같이 분류할 수 있다. 첫째로 성장이 빠르고 사료 효율이 높은 고생산성 고품질의 축산물을 생산하는 가축을 개발하여 식량자원을 확보한다는 농축산업적인 응용과, 둘째로 사람에서만 발병하는 각종 난치병에 대한 질환 모델동물을 개발하여 질환의 연구 및 치료제 개발에 이용하는 것으로 HIV, 유전병 및 각종 암질환 모델생쥐가 이에 해당된다. 셋째로 Tissue Plasminogen Activator(TPA), Interferon(IFN), 그리고 각종 Cytokine 등과 같은 인체 생리 활성 물질을 형질전환 동물의 유선(mammary gland)을 통해 대량 생산하려는 연구(animal bioreactor system)가 시도되고 있으며, 넷째로 *in vitro* 실험으로 해석할 수 없는 각종 유전자의 기능을 형질전환 생쥐를 실험동물로 이용하여 활발한 연구가 추진되고 있다.

형질전환 생쥐를 통해 면역현상을 이해하려는 연구는 면역학 다방면에서 시도되어, 지금까지 큰 연구성과를 얻고 있으며, 앞으로도 계속 좋은 결과가 나오리라 기대된다. 면역현상은 말할 것도 없이 본래 한 개체내에서 일어나, 많은 세포가 상호작용함으로서 비로소 가능하게 된다. 형질전환 동물은 개체에 유전자를 도입하는 시스템으로, 이와 같은 면역현상을 해석하는데 매우 적합하다.

형질전환 동물이 면역학에 도입되기 전까지는 congenic mouse 및 recombinant mouse가 면역학의 발전에 많은 공로를 해왔다. 이러한 생쥐를 이용해서로 면역시킴으로써 항혈청을 얻어 면역담당세포의 표면에 표현되어 있는 분자를 동정하여 그 기능을 추정하고 나아가서 유전자 cluster를 결정해나가는 방법을 취해 왔다. 이러한 방법에 의해 새로운 많은 사실이 밝혀졌지만, 크게 2가지의 결점이 존재한다. 첫째로, 면역기능이 있다고 생각되는 단백질 분자의 동정이, 단지 정제라는 수단에 의한 것이 아니라, 그 분자에 대한 항체를 만들어, 그 항체와의 결합반응을 일으키는 존재를 상징하고 있으므로, 처음에 생각하지 아니한 결과가 초래되는 경우이다. 그 좋은 실례로서, I-J 분자가 있다. 종래의 방법으로 그 존재가 예상되고 있던 유전자가 실제로는 그 장소에 존재하지 않음이 유전자 재조합 기술을 이용해 클로닝해본 결과, 밝혀졌다. 아직까지 I-J 분자에 대한 수수께끼는 풀리지 않고 있으나, 최근 I-J 분자의

발견자인 일본의 Tada 팀은 I-J 분자가 클로닝되지 않은 이유를 설명하고 있는데, 즉 I-J 분자는 MHC 유전자의 직접산물이 아니라 T 세포 성숙환경에 의해, 후천적으로 획득되는 T 세포상의 자기인식 수용체라는 것이다(18). 또한가지 결점은 congenic mouse는 하나의 유전자 cluster만이 다르다고 생각되고 있으나, 누구도 그것을 증명할 수 없다는 점이다. 확실히 하나의 세포표면 분자가 하나의 유전자산물에 의해 형성되고 있는 경우에는 적용가능하지만, 면역기능을 지닌 분자의 존재는 항체와 반응하는 분자로써 동정되어 있을 뿐이므로, 그 분자가 하나의 peptide로 구성되어 있는지, 또는 2개 이상으로 구성되어 있는지 불명확한 경우가 있어 congenic mouse로써는 해석할 수 없는 것도 있다. Congenic mouse나 recombinant mouse에서의 이러한 결점을 형질전환동물을 이용하여 보강할 수 있다고 생각되고 있다. 왜냐하면, 형질전환 생쥐에서는, 도입되는 유전자만이 본래 생쥐가 가지고 있는 유전자와 명백하게 구분되기 때문이다. 따라서 단지 하나의 유전자가 어떠한 면역기능을 가지고 있는지를 해석할 수 있으며, 더 나아가서 종래의 방법으로 명확하게 되었던 유전자 cluster 가운데 어떤 유전자에 대응할 수 있는지를 명백히 할 수 있다.

이상으로 형질전환 동물이란 무엇인지에 대해 단편적으로 설명하였다. 좀 더 자세한 것은 총설(4, 5)을 참고할 수 있으므로 본 지상을 통해서는 형질전환 생쥐를 만드는 방법론에 대해 간단히 설명하고, 이들 형질 전환 생쥐가 면역학 분야에서 어떻게 이용되고 있는지 살펴보고자 한다.

II. 유전자 이식(Gene transfer)에는 어떤 방법이 있는가?

형질전환 생쥐의 작제 방법은 다음과 같이 3종류가 있다. 즉, Microinjection법(2), Retroviral infection법(6, 7) 그리고 Embryonal stem cell법(8)이다. 1989년 sperm을 이용한 유전자 이식방법(12)이 발표되었으나, 재현성이 없어 신뢰되지 못하고 있다.

1) Microinjection법

1세포기 수정란의 웅성 전핵에 micropipethe를 사용하여 DNA 용액을 직접 미세주입하는 방법을 말한다. 이 때 micromanipulator를 이용하는 기술이 필요하지만 DNA 삽입이 잘 되며, 후손에의 transmission도 용이하다. 현재 가장 널리 이용되고 있는 방법으로 필자 등도 동일한 방법으로 양호한 결과를 얻고 있다(4).

2) Retroviral infection법

재조합 Retrovirus를 생산하고 있는 세포와 8세포기 배를 함께 배양하여 감염시키는 방법이다. 감염조작 그 자체는 용이하지만 재조합 Retrovirus를 만드는 것이 까다롭다. 이 방법은 Retrovirus의 배에의 감염 및 숙주 DNA에의 삽입이 2세포기 이후가 아니면 성립되지 않으며, 또한 그 빈도가 매우 낮다. 따라서 얻어지는 형질전환 생쥐도 모자이크가 되게 마련이다. 하지만, 숙주 DNA에 삽입되는 외래 유전자가 항상 1 copy라는 점이 큰 이점이다. 오늘날 거의 이용되고 있지 않다.

3) Embryonal stem cell법

전분화능력(totipotency)을 갖춘 embryonal stem cell(ES 세포)을 이용하는 방법이다. ES 세포는 *in vitro*에서 유지되므로 미리 돌연변이나 유전자 도입을 해둔다. 이처럼 처리된 ES 세포를 정상적인 배반포기의 배(blastocyst)에 주입시켜, 소위 주입키메라를 만든다. ES 세포가 생식세포에서 분화되면 다음 세대에서 형질전환 생쥐를 얻을 수가 있다. 현시점에서는, 선 분화능력을 지닌 ES 세포의 수립과 그 유지가 쉽지 않고, 키메라를 얻을 수는 있지만 생식 세포로 분화되기 어려워 세계적으로 겨우 몇 group의 연구실에서 성공하고 있을 뿐이다. ES 세포를 이용하면 상동 유전자 재조합(Homologous recombination)을 일으킬 수 있는 가능성이 있으므로, 원하는 곳에 유전자를 도입하는 기술 즉 gene targeting이 가능할 것이다.

III. 형질전환 생쥐는 면역학 연구에 어떻게 이용되고 있는가?

형질전환 생쥐는 면역학 연구에 새로운 강력한 실험시스템으로써 증명되고 있으며, 최근들어 T세포 수용체와 면역글로블린, 림포카인과 그 수용체, 그리고 MHC 항원 등의 기능을 연구하기 위해 수많은 형질전환 생쥐가 개발되었으며, 이를 통해 새로운 사실들이 밝혀지고 있다.

1) 면역글로블린 유전자가 도입된 형질전환 생쥐

배양세포를 이용한 실험에 의하면 항체유전자가 enhancer를 포함하고 있을 경우에는 B림프구에서만 그 항체 유전자가 발현되는 것으로 생각되고 있었다(19, 20). 이러한 *in vitro* 실험결과를 *in vivo*에서 확인되기 위해 항체유전자를 도입한 형질전환 생쥐에 관한 연구를 몇 group에서 시도하였다. 즉, Brinster 등은 생쥐 κ chain 유전자를 도입한 생쥐의 비장(spleen) 세포를 B림프구와 T림프구로 나눠 mRNA를 추출하여 Northern blotting으로 해석한 결과, B림프구에서만 도입된 κ chain 유전자가 발현되고 있음을 보고하였으며(9, 10), 일본의 Yamamura 등도 사람 γ chain 유전자(HIGI)를 도입한 형질전환생쥐를 만들어 해석한 결과, HIGI 유전자는 B림프구에서만 발현되고 있었으며, 또한 enhancer가 결실된 항체유전자를 도입한 생쥐는 도입된 항체유전자가 전혀 발현되지 않았다(21). 한편 Grosschedl 등은 생쥐 μ chain 유전자를 도입하여 형질전환생쥐를 만들었는데 그 생쥐의 비장뿐만 아니라 흉선과 심장에서도 도입된 μ chain mRNA가 생산되고 있었다. 더욱이 심장에서 생산된 μ chain mRNA는 비장과 비교하여 미미하였지만, T세포가 대부분이라고 생각되는 흉선에서 비장의 50%에 해당되는 양의 μ chain mRNA가 생산되고 있었고, 그 mRNA는 정상적인 것으로 S1 mapping 결과 확인되었다(11). 이상의 data를 종합해 보면, enhancer는 항체유전자의 전사활성을 증대시키며, 세포특이적으로 B세포에서만 발현되도록 결정하고 있는 것으로 생각된다. 그러나, T세포에서도 μ chain 유전자의 mRNA가 생산된다는 Grosschedl 등의 보고는 어떻게 해석해야 될지 궁금한데, 그들의 T세포내에도 μ chain 유전자의 enhancer에 결합하는 trans-acting factor가 존재하는 것으로 가정하고, 이 trans-acting factor가 문제 해결의 실마리로 생각하고 있다.

동종항원 특이성을 갖춘 수많은 B세포를 포함하고 있으며 기능적으로 재구성된(rearranged) 면역글로블린이 도입된 형질전환 생쥐는 *in vivo*에서 B세포 레퍼터리를 구성하는 selective force를 연구하는데 유일한 기회를 제공하고 있다. George Köhler는 Ig 형질전환 생쥐를 통해, B세포에 있어서 Ig loci의 대립 유전자 배제(allelic exclusion)는 어떤 형태인가의 negative feed back에 의하여 이루어져, 일단 기능적인 유전자가 재구성되면, 더 이상의 재구성을 방해하고 있음을 밝혔다. 그러나 Köhler는 관찰된 모든 현상이 명확하지 않음을 강조하였는데, 즉 어떤 line의 면역글로블린 heavy chain을 도입한 형질전환 생쥐는 B 및 T세포 lymphopoiesis가 심각하게 손상된다고 하였다(13). 이러한 영향이 도입된 특이한 면역글로블린 V region 때문인지, 또는 어떠한 보다 일반적 형태의 heavy chain 독성이 남아서 그런지는 앞으로 해결해야 될 문제이다.

Christopher Goodnow(Sydney)와 David Nemazee(Denvor)도 자기자신과 반응하는(self-reactive) B세포의 자기관용(self tolerance) 및 negative slection을 연구하기 위해 Ig 형질전환 생쥐를 만들어 해석하였다. Goodnow 등은 double-transgenic progeny를 생산하기 위해, anti-lysozyme 면역글로블린 유전자를 갖고 있는 형질전환 생쥐와 hen egg lysozyme coding 유전자를 발현하고 있는 형질전환 생쥐를 교배시켰다. 이 double transgenic mice에 있어서, anti-lysozyme B세포는 무감작(anergic)인 것으로 나타났으나, 말초 lymphoid 조직으로부터 제거되지는 않았다(14). 반면, Nemazee 등은 k 또는 b haplotype인 H-2K 및 D 분자에 특이적인 항체를 발현하는 Ig 형질전환 생쥐를 만들었는데, 이러한 haplotype의 H-2 분자를 발현하는 Ig 형질전환 생쥐에서, 자기자신과 반응하는 B세포는 말초 림프조직으로부터 분명하게 제거되었다(15). Nemazee와 Goodnow는 두가지 형태의 negative selection에 관련된 중요한 parameter를 밝히는 중인데 각 형질전환 생쥐에 있어서 미성숙 단계의 B세포가 lysozyme 및 H-2 분자를 만나게 되므로, 항원 그 자체가 미성숙단계의 B세포를 만나는 시기(timing)가 무감작(anergy)에 대한 제거(deletion)에 관여하고 있는 것 같지 않는데도 불구하고, Goodnow 등은 명백하게 동일한 형태의 B세포 anergy가, 성숙된 생쥐에 있어서 lysozyme의 유도를 통하든지, 또는 cell transfer에 의해 성숙된 말초 B세포로 유도될 수 있음을 밝히고 있다. 한편, Nemazee와 Bürki는 Ig 형질전환 생쥐와 H-2 haplotype 생쥐사이에서 생산된 소수의 tetraparental 생쥐에 있어서, anti-MHC B세포가 silence되거나, 말초림프 조직으로부터 제거되지 않았다고 하였다. B세포 수용체 뿐만아니라, 이 두가지

model에 있어서 각각의 자기 항원을 유전적으로 변경시키는 것은, B세포가 활성화되어, 무감작되는지 또는 항원과 만남으로써 제거되는지를 결정하는 factor를 밝히는데 도움이 됨에 틀림없다(1).

2) T세포 수용체의 유전자가 도입된 형질전환 생쥐

T세포의 레퍼터리를 구성하는 과정이 최근까지도 잘 이해되지 못하였다. 특성이 완벽하게 부여된 T 세포 클론으로부터 기능적으로 재구성된 α와 β TCR 유전자 또는 γ와 δ TCR를 발현하는 형질전환 생쥐가 개발되었는데, 이들은 transgenic TCR에 의해 인지되는 항원을 발현하거나, 동종 MHC haplotype을 지닌 동물의 흉선에서 selection 기작을 연구하는데 좋은 기회를 제공해 주고 있다.

Hanspeter Pircher는 T세포 관용을 연구하기 위해, mixed-lymphocyte stimulatory(Mls^a) 항원과 H-2D에 구속된 lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)를 인식할 수 있는 T세포 수용체를 발현시키는 형질전환 생쥐를 개발하였다. LCMV에 관용인 α β T세포 수용체 형질전환 생쥐는 CD4+ CD8+ 흉선세포와 CD8 항원을 지닌 말초 T세포를 급격히 감소시켰으나, 동일한 α β T세포 수용체 형질 전환 Mls^a 생쥐에 있어서 Mls^a 항원에 대한 관용은 단지 성숙된 흉선세포와 말초 T세포를 결락시켰고, CD4+ CD8+ 흉선세포에는 영향을 미치지 않았다. 따라서 동일한 형질전환 생쥐에서 T 세포 수용체를 발현하는 T 세포는, T세포 성장단계에 따라, 그리고 관여되는 항원에 따라 흉선의 다른 위치에서 관용이 유도되는 것으로 보고 있다 (22).

γ δ T세포의 생리적 역할에 대해 아직 알려진 바가 없다. Stanford의 Yueh Hsiu Chien과 Stephen Hedrick은 γ δ TCR 유전자 형질전환 생쥐를 이용하여 γ δ T세포가 negative thymic selection 기작에도 드러남을 보여주었다(1).

형질전환 생쥐는 T 및 B림프세포의 생성과 TCR의 대립 유전자 배제(allelic exclusion), 그리고 γ δ 또는 α β T세포 형성과정에 TCR가 어떻게 관여하고 있는지를 밝히는데 좋은 실험동물이다.

Michael Stenmetz는 hybrid TCR 분자로써, 사람 β chain과 α chain 및 endogenous murine CD3를 이용하여, human β chain TCR 형질전환 생쥐의 기능 발현에 대해 보고하였다. Steinmetz는 또한 TCR 유전자의 selected 영역을 포함하고 있는 TCR minigenes을 이용하여 형질전환 생쥐를 만들었는데, 이것은 결국 이 영역중 어느 부분이 대립 유전자 배제(allelic exclusion)에 필요한지에 대해 응답할 수 있을 것이다. T 및 B세포의 발달과 T세포의 변현형에 TCR chain 단백질이 관여하고 있음이 Anton Bern에 의해 제시되었다. 기능을 갖춘 β chain TCR transgene이 endogenous β chain locus의 재구성을 방해한다는 것이 이미 보고되었는데, 놀라웁게도 Bern은 T cell genomic TCR 유전자의 VJ의 주요부분이 in-frame 결실된 상태로 만들어진 형질전환 생쥐가 endogenous β chain 유전자의 재구성을 방해함을 발견하였다. Joining 영역에서 frame shift mutation을 갖고 있는 동일한 TCR β chain 유전자로 만들어진 형질전환 생쥐에서는 이 조절작용이 소실되었다. 이는 endogenous β chain 유전자의 대립 유전자 배제가 한 단백질에 의해 이루어지고 있음을 암시해준다. 이들 transgene은 또한 T 및 B세포 발달에 심각한 손상을 초래하기도 한다 (1).

Marc Bonville는 γ chain 유전자의 flanking 영역이 결실된 TCR γ δ chain 유전자에 대한 형질전환 생쥐를 해석하였다. 재구성된 γ 및 δ chain 유전자가 생쥐의 germline에 도입되었을 때 α 및 β chain 유전자의 재구성 및 세포표면 발현에 부정적으로 영향을 미치지 않았다. 그러나, 유전자의 flanking 영역이 결실된 경우, α β T cell에 있어서 γ chain transgene이 억제되었다(1).

3) Interleukin 유전자가 도입된 형질전환 생쥐

유전공학적 방법에 의해 다양한 기능을 갖추고 있는 림포카인의 대량생산이 가능하게 되어, 현재 생체내 투여가 시도되고 있으나, 대부분의 경우 투여된 림포카인의 대사(clearance)가 신속하기 때문에 생체내에서의 기능을 정확히 평가하는데 큰 어려움을 겪고 있다. 이는 아마도 생리적 조건하에서는, 생산된 림포카인이 근처의 세포에만 영향을 끼치는 local hormone적인 기능을 가지고 있기 때문일지도 모른다. 일본의 Katsuki 등은 IL-2의 생체내에서의 기능을 알고자, 사람 IL-2 유전자를 도입한 형질전환 생쥐를 개발하였다. IL-2는 lectin이나 항원 등의 다양한 mitogen에 의해 활성화된 T세포 sub-

set로부터 생산된다. 동시에 T세포는 IL-2에 특이적인 IL-2 수용체를 발현하고, 이 수용체와 IL-2의 결합에 의해 활성화된 T세포가 증식하게 된다. 따라서 IL-2는 항원 인식에 의해 유도되는 일련의 면역반응에 중요한 역할을 하고 있다. 이러한 기능을 갖춘 사람 IL-2 유전자를 도입한 형질전환 생쥐는 생후 2주경부터 소뇌 실조와 유사한 증상을 띠었다. 즉, 한쪽 방향으로 자빠지는 경향을 띠기도 하고, 균형이 잡히지 않은 보행을 하는 등의 행동이상을 보였다. 이들 형질전환생쥐의 소뇌를 조사해본 결과, 소뇌가 현저하게 축소되었거나 때로는 소뇌가 결손되어 있는 것처럼 매우 작았다. 이는 IL-2에 반응한 림프구가 미량이나마 소뇌에 집적되어 소뇌파괴가 이루어진 것으로 추정하였다(16).

일본의 Kishimoto 등은 사람 myelomas에 있어서 중요한 autocrine 역할을 하고 있는 interleukin 6 유전자를 immunoglobulin heavy chain enhancer에 연결한 재조합 DNA를 제작하여, 형질전환 생쥐를 개발하여 그 기능을 조사해보았다. 이들 형질전환 생쥐는 4주경에 fatal plasmacytosis가 발달되었고, IgG1 isotype에만 국한된 hypergammaglobulinemia가 관련되고 있으며 plasma 세포의 증식은 분명히 암이 발생되기 전의 증상이었다. 한편, Werner Müller는 embryonal stem cell의 transfection에 의해 IL-4 형질전환 생쥐를 생산하였는데, 이 형질전환 생쥐는 B세포의 MHC Class II 항원을 발현시키고 있었으나, B세포 hyperplasia를 초래하지는 않았다(1).

4) MHC 항원 유전자가 도입된 형질전환 생쥐

거의 대부분의 HLA class I 및 class II 형질전환 생쥐에 있어서, HLA 분자는 피부 거부반응(skin graft reaction)에 이식항원으로써 작용하고, 또한 항바이러스 또는 항균 T세포 반응에 구속인자로서 작용한다. 따라서 HLA 형질전환 생쥐는 HLA 연계된 질환모델 생쥐를 개발하는데 적합하다고 생각된다. 가장 두드러진 예증의 하나로써, HLA-B27과 강직성 척수염(ankylosing spondylitis) 사이의 관계를 Chela David가 연구한 것이다. 10^4의 살아 있는 *Yersina enterocolitica*로 HLA-B27 형질전환 생쥐를 감염시켰더니 30-40%의 생쥐가 뒷다리에 마비를 일으켰다. 그러나, 이 마비는 lower spinal cord를 따라 형성된 농양(abcesse)에 의해 생긴 것 같았다. 이 연구를 통해 척추 형태에 명백한 pathological 변화는 보이지 않았으나, B27 생쥐는 정상보다 Yersinaia에 의한 감염 감수성이 강한 것을 알 수 있었다(1).

또한가지 질환모델이 Mathis에 의해 보고되었다. Insulin-dependent diabetes mellitus(IDDM)는 pancreatic Langerhans islets에서 인슐린을 생산하는 β세포가 특이적으로 결실되어 발병되는 것이다. 이 β 세포에 MHC class II 분자가 이상 발현되는 것이 그들의 자기면역 파괴에 결정적 인자인 것으로 제안되어 왔다. 이 제안을 확인하기 위해 islet cell 표면에 resting B lymphocyte에서 정상적으로 발견되는 것과 비슷한 수준으로 allogeneic 또는 syngeneic class II 분자가 발현되는 형질전환 생쥐를 만들었다. 이 동물들은 당뇨병을 발현하지 않았고 islet를 관찰해 보았으나, 림프세포의 유입은 보이지 않았다. 면역학적인 불활성이 외래 class II 분자에 관용을 초래하지도 않았다(1).

다음엔 TL 유전자 도입 생쥐에 대해 보고된 바를 소개한다. 생쥐 TL 항원은 T세포형 백혈병의 종양 특이항원 및 정상흉상 T세포의 분화 항원으로써 세포표면에 발현되고 있다. 면역학적 및 생화학적 해석을 통해 이 지배 유전자는 생쥐 MHC class I 항원 H-2와 함께 제 17 염색체상에 H-2D로부터 오른쪽으로 약 1.5 cM 떨어져 TLa cluster에 존재한다. 일본의 Takahashi 등은 TL 유전자가 도입된 형질전환 생쥐를 만들어 해석하였다. 정상 흉선에서 특이적 발현에 필요한 염기 배열을 포함하고 있는 TLa-3를 도입한 형질전환 생쥐의 흉선 T세포에 분화 이상이 생겨, 피질에 존재하는 소형의 림프구가 극히 적어졌고, 분열형태가 다양한 세포로 치환되어 있었다. 생후 8개월령 이상의 생쥐중 50% 이상에서 T세포 백혈병의 증상이 관찰되었으며, 이 백혈병 세포는 이식가능 하였다. 백혈병은 주로 말초림프절과 비장의 비대를 동반하였고, 세포표면은 TL+/L3T4−/Lyt2−/Thy1+/H-2+의 표현형을 갖고 있었으며, 이 생쥐의 흉선 세포와 동일하였다. 이는 어떤 알 수 없는 면역 이상이 생겨 백혈병이 발병되었다고 생각되나, 흉선 세포와 백혈병세포가 같은 표현형을 가지고 있으므로, maturation arrest를 일으킨 T세포가 2차 또는 3차 event에 의해 암화 증식된 것으로 생각된다고 하였다(17).

필자는 MHC class III에 위치하고, testosterone에 의해 발현이 유도되는 것으로 알려진 생쥐 Slp(Sex limited protein) 유전자의 발현을 실현시키기 위해 Slp 유전자 5'flanking 영역 2.7 kb에 CAT(Chloramphnicol Acetyltransferase) 유전자를 융합시킨 재조합 DNA를 도입한 형질전환 생쥐 4마리를 만들어, Northern blotting 및 Cat assay 등으로 해석해 보았으나, 전혀 발현되지 않았다. 이는 Slp 유전자가 발현되기 위해서는 현재 생각되고 있는 기작보다 더 복잡한 system이 필요함을 암시하는 것으로 간주된다. 미국의 Washington university 및 Columbia 대학 등 경쟁 groupd에서도 Slp 유전자가 도입된 형질전환 생쥐를 만들었으나 어느 팀도 발현에 성공치 못하고 있다. 앞으로 생쥐의 계통을 바꾸는 등의 궁리를 하여 다시 시도해 볼 작정이다.

IV. 앞으로 해결되어야 할 문제점

이상으로 면역학 분야에서 형질전환 동물이 어떻게 이용되고 있는지에 대해 단편적으로 살펴보았다.

면역현상이란 수많은 면역물질이 서로 연계되어 자기를 방어하고 때로는 자기 자신을 공격하는 등의 복잡한 생리현상으로 최근에는 신경계와 내분비계와도 서로 관련 있는 것으로 보고되고 있어, 어떤 한 면역물질을 단지 *in vitro* 실험만을 통해 그 생리적인 기능을 충분히 해석하는 것이 불가능한 실정이다.

따라서 *in vitro* 실험 시스템이 필요한데, 형질전환 동물이야 말로 오늘날까지 이용된 실험 시스템중 가장 좋은 *in vivo* 실험 시스템으로, 앞으로도 이를 이용해 새로운 사실들이 밝혀지리라 의심치 않는다. 현재 Microinjection에 의한 유전자 이식 방법이 가장 널리 이용되고 있으며, 이를 이용하여 수많은 결과들이 나왔지만 앞으로 개량되야 될 많은 문제점이 남아있다. 즉, 도입되는 외래 유전자의 발현율이 매우 저조하고 삽입되는 유전자의 copy 수가 조절되지 않고 있으며, 항상 random하게 염색체에 삽입되고 있다. 따라서 이 문제를 극복하기 위해 여러 가지 연구가 진행되고 있는데, 이중 embryonal stem cell을 이용한 homologous recombination을 통한 유전자 이식 방법이 각광을 받고 있으며, 도입되는 유전자의 발현 조절 등을 통해 재조합 유전자를 개량하면, 앞으로 이러한 문제점들이 해결되는 날도 멀지 않을 것으로 확신한다.

REFERENCE

1. Anold, B., Goodnow, C., Hengartner, H. & Hammerling, G.; Immunology Today, **11**, 69 (1990).
2. Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A. & Ruddle, F.H.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 7380 (1980).
3 Palmiter, R.D., Brinster, R.L., Hammer, R.E., Trumbauer, M.E., Rosenfeld, M.G., Birnberg, N.C. & Evans, R.L.; Nature, **300**, 611 (1982).
4. 이경광 등.; "유전공학적 기법에 의한 거대 동물의 복제 생산 기술개발에 관한 연구" 보고서 과학기술처 (1986-1990).
5. Hogan, B., Constantini, F. and Lacy, E.; Manipulating the Mouse Embryo; A Laboratory Manual, Cold Spring harbor Laboratory (1986).
6. Janisch, R.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 1260 (1976).
7. Rubenstein, J.R. et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 366 (1986).
8. Thomas, K.R., and Capecchi, M.R.; Cell, **51**, 503 (1987).
9. Brinster, R.L., Ritchie, K.A., Hammer, R.E., O' Brien, R.L., Arp, B. & Storb, U.; Nature, **306**, 332 (1983).
10. Storb, U.. O'brien, R.L., McMullen, M.D., Gollahon, K.A. & Brinster, R.L.; Nature, **310**, 238 (1984).
11. Grosschedl, R., Weaver, D., Baltimore, D. & Constantini, F.; Cell, **38**, 647 (1984).
12. Lavitrano, M., Camaioni, A., Fazio, V.M., Dolci, S., Farace, M.G., and Spadafora, C.; Cell, **57**, 712 (1989).
13. Rusconi, S. & Köhler, G.; Nature, **314**, 330 (1985).
14. Goodnow, C.C., et al.; Nature **334**, 676 (1988).
15. Nemazee, D.A. & Büki, K.; Nature, **337**, 562 (1989).
16. Habu, S., Otani, H., Kimura, M. and Katsuki, M.; Cell technology **8**, 323 (1989).
17. Obata Y., Hamasima, N., Matsudaira, Y., Hasegama, H. and Takahashi T.; Cell technology

8, 313 (1989).
18. 多田富雄;ヒユーマンサイエンス基礎研究事業 官民共同プロジエクト研究報告 第3分野コード番號 3-1-2-C (1988).
19. Gillies, S.D., Morrison, S.L., Oi, V.T. & Tonegawa, S.; Cell, **33**, 717 (1983).
20. Banerji, J., Olson, L. & Schaffner, W.; Cell, **33**, 729 (1983).
21. Yamamura, K. & Ebihara, T.; 代謝 Vol. 22 臨時增刊號 免疫 '85 (1985).
22. Pircher, H., Burki, K., Lang, R., Hengartner, H. & Zinkernagel, R.M.,; Nature, **342**, 559 (1989).