韓國受精卵移植研究會誌(1992) 第 7 券 第 1 號
Korean J. Emb. Trans. (1992) Vol.7, No.1 pp.49~55

실험동물의 계통 보존과 유전공학에의 응용

오 양 석
한림대학교 의과대학 실험동물부

Colony Management and Its Application to Genetic Engineering

Y. S. Oh
Experimental Animal Center, College of Medicine, Hallym University

SUMMARY

Animal experiments need numerous kinds of animal which are suitable for every research. About 300 mouse strains are developed up to the present, but they do not give satisfaction to every researchers. So we must build up the methods of breading animals which are newly developed and of maintenance of characteristics which were developed before. To maintain experimental animal is not only proceeding the generation but also increasing the animal populations, it needs genetical control.

Genetic factors which influence to reproduction are very important to maintain colony. These factors include lethal gene, chromosomal abberation, sterility gene, etc.. With the recent development of transgenic technology, scientists now can deliberately creat numerous specific animal models. To know how to manage the colony which has genetic defect on reproduction and transgenic mice is one of the key to study *in vitro* fertilization.

서 론

동물실험은 아주 다양하고, 각각의 실험에 대응하는 특성을 가진 실험동물이 필요하다. 하나의 계통이 각각 그 특징을 하나씩 갖고 있다고 생각하면 거의 무한에 가까운 동물의 계통이 필요하다. 예를 들면 현재 약 300 계통정도의 근교계 mouse가 있지만 연구자들에 만족할 만한 것은 아니다. 따라서 새로운 실험동물종의 개발과 더불어 육성되어진 계통의 유지 및 발굴된 형질을 보존하는 방법이 확립되어야 한다. 실험동물을 유지하는 것은 단지 세대를 이어간다거나 개체수를 증가시키는 것만이 아니라, 유전적 균일성과 특성을 갖도록 control 할 필요성이 있는 것이다. 여기서는 번식력에 영향을 주는 유전적 인자 즉, 치사유전자, 불임유전자, 염색체 이상 등을 갖고 있는 mouse의 유지법과, 최근에 들어 많이 연구되고 있는 transgenic mice의 유지법에 관하여 논한다.

1. 치사유전자

Mouse에 있어서 발견된 치사 유전자는 A^{Y}, C^{25++}, Os, Ts, A^{i}, C^{6h}, Ve, BLd, W 등이 있다. 이들 유전자는 전부 다면효과를 나타내고, 모색 또는 골격의 이상 등의 형태적 형질 및 치사성에 관여하고 있다(若杉, 1981). 이들 유전자의 보존은 비교적 용이하고 Fig. 1 (a)에서와 같이 변이형질을 나타내는 개체를 교배하여 계대하면 된다. 방사선 조사에 의하여 일으키는 albino 좌위의 치사유전자(C^{25H}, C^{6H} 등)의 경우에는 야생유전자(C) 에 대하여 열성이지만 C^{ch}/C^{25H}, C^{ch}/C^{6H} 등은 옅은 친칠라 모색을 나타내므로, 친칠라 모색(C^{ch}/C^{ch})과 구별되는 점을 이용하여 유지한다.

또 한가지의 보존방법은 기존 근교계에 돌연변이 유전자를 도입하는 방법으로 특정의 근교계에 돌연변이 개체를 교배하여 얻은 자손 중에서 돌연변이 형질을 나타내는 개체를 선택하여, 다시 근교계에 교배하는 방법으로 매 세대에 반복하여 행한다(Fig 1. (b)). 이

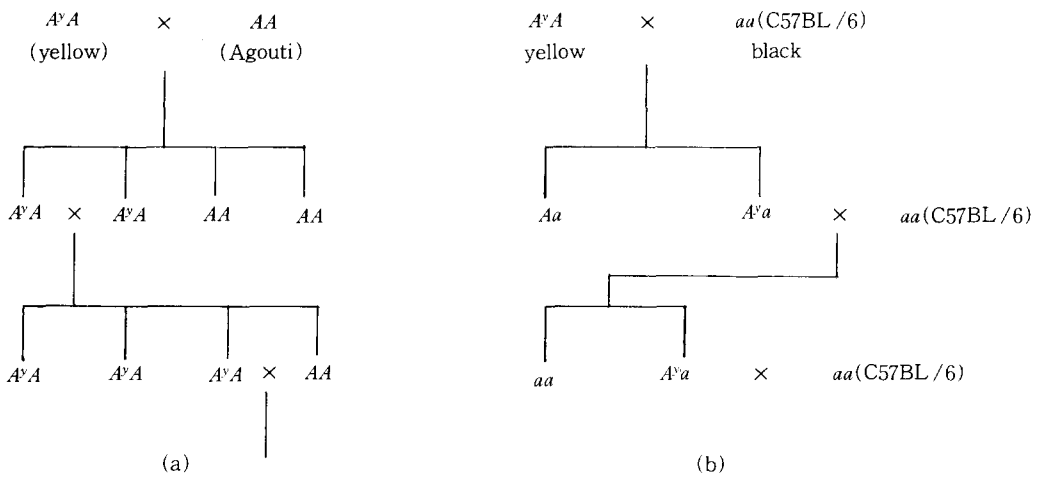

Fig. 1. *Ay* 유전자의 보존
(a) *Ay*유전자를 보유하는 근교계 유지 (b) C57BL/6J 계통에 *Ay* 유전자 도입

렇게 하여 최종적으로 돌연변이 유전자가 위치하는 유전자와 그 주변의 유전자 이외에는 전부 기존 근교계의 유전자를 위치하게끔 한다. 이 경우 도입하고자 하는 돌연변이 유전자는 기존의 근교계와의 적합성이 문제가 되어, 도입조작이 원활히 되지 않는 것도 있다. 이럴 경우에는 다른 근교계에 도입하는 것이 상책이다.

t complex(chromosome 17)의 유지

완전 *t* Haplotype는 꼬리의 길이, 정자의 전달, 수컷불임, 발생치사에 관한 인자를 갖고 있다. 개체의 표현형으로서는 꼬리가 없는 *T/t*가 되어야만 식별할 수 있기 때문에 heterozygote로 유지한다. *T*의 homo는 전부 발생치사되기 때문에 *T/t* 개체 이외에는 태어나지 않는다.

이 교배로 근교계화 되지만 산자수가 적으므로 일반의 근교계에 필요한 수는 적어도 2배 이상을 계대하지 않으면 안된다. 성숙한 pair를 교배하여, 어떤 pair도 2개월 경에 임신하지 않으면 일부 수컷을 *T/t* 암컷에 교배하여 (우쪽이 빨리 성적으로 노화한다) 새로운

Table 1. Mouse의 치사유전자

Name	Symbol	Characteristics of homozygote	Characterics of Heterozygote
Lethal-albino allele	C^{25++}	2~6 cell에서 발생정지	C^{ch}/C^{25H} : 옅은 친칠라 모색
Oligosyndactilism	*Os*	수정후 3~5일에서 다수의 세포 분열정지상을 보인다	손가락의 이상 (2지와 3지의 유합)
Tail short	*Ts*	수정후 3~5일 사망 胚盤胞 형성 부전	꼬리가 짧거나 휘어져 있다.
Yellow	A^y	수정후 3~5일에 사망 桑實期-卵圓筒期에 사망	Yellow skin coat
Lethal-albino allele	C^{6H}	수정후 6.5~8일에 사망 태반 원추체 및 외배엽의 발달이 나쁘다.	C^{CH}/C^{25H} : 옅은 친칠라 모색
Blind	*BLD*	수정후 8일 정도에서 발생이 지연되고 사망	출생시 안검이 열려져 있다.
Velvet coat	*Ve*	수정후 5.5~8일에 외배엽 이상	

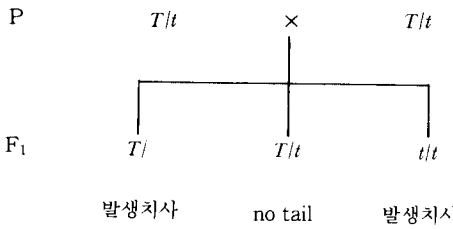

Fig 2. *t* 유전자의 보존

T/t 개체를 얻어야 한다. Congenic 계통은 근교화된 *T/+* 개체에 *T/t* 개체를 역교배하여 얻는다. 완전 *t* Haplotype는 hetero(+/+, *T/t*) ♀으로 정자전달율이 높은 성질을 갖고 있으므로 (예외 t^9, t^{w18}), 이 교배에서는 2개체(*T/t*)를 ♀에 사용하는 것이 효율적이다.

2. 불임 유전자

Mouse의 dwarf(*dw*) (Eicher 와 Beamer, 1980), obesity(*ob*)(Ingalls, 등 , 1950), muscular dystrophy(*dy*)(Meier와 Southard, 1970) 등 열성 homo형 개체가 돌연변이 형질을 나타내고 또한 불임의 경우 이 유전자들의 보존은 복잡한 조작이 필요하다.

dw 유전자의 경우 외견상으로 hetero가 구별되지 않기 때문에 정상개체와의 교배에 의하여 다음세대를 얻어야 하지만 교배수를 많이 증가시키면 hetero 형끼리 교배가 일어날 확률이 높아지므로 보존이 가능하다. 친자교배 등으로 이미 hetero형인 것이 판명된 개체에 역교배에 의하여 다음 세대를 얻는 경우 또는 후대검정을 하여 hetero를 찾아내어 그것들과의 교배에 의하여 얻는 방법도 좋다. 돌연변이 형질을 나타내는 homo형 불임 암컷으로부터 정상개체 (조직적합 유전자가 같은 것: 동일계통의 정상 암컷 또는 다른 계통과의 교배에서 얻은 F_1) 난소를 이식하여 그것에 hetero형 수컷을 교배하면 열성 homo형과 hetero형과의 교배에 역교배에 의한 자식을 얻을 수 있어, 능률적인 유전자의 유지 및 homo형 개체의 생산을 얻을 수 있다. 실제로 sphinomyelin증 유전자의 보존을 이러한 방법으로 행하고 있다(Fig. 3) (Miyawaki, 등 1982).

정소여성화증 유전자(*Tfm*)은 X염색체 위에 위치하고 이 유전자를 보유하는 수컷은 정소가 작아 불임이다. 이 돌연변이는 Lyon과 Hawkes(1970)에 의해 X염색체 위의 모색 구조유전자 *Ta*(Tabby)와 모색유전자 Mo^{blo}(Blotch)에 관하여 연구 중 hetero 암컷으로부터 얻은 자손에서 발견되어 다음과 같은 방법으로 보존되고 있다. 이 3 유전자는 *Tfm-Ta-*Mo^{blo} 순으로

Table 2. Complementation groups fo *t* haplotypes

	Hetero (*T/t*)	Homozygote
T	short tail	Day 10, Primitive streak and notochord abnormal
	T/t	
t^{12}, t^{w32}	no tail	Morula. Metabolic and ultrastructural abnormalities
t^{0}, t^{1},	"	Egg cylinder
t^{6}	"	Ectodermal differentiation fails
t^{w73}	"	Blastocyst. Trophectoderm abnormal
t^{w5}	"	Egg cylinder
t^{w18}	"	Day 8~9, Primitive streak stage. Mesoderm formation fails
t^{w1}, t^{w12}	"	Days 9 onwards, Neural tube abnormal
t^{w2}	no tail	Semi lethal 5% alive, ♀sterile
t^{w8}	"	Semi lethal 12% alive, ♀sterile
t^{h2}	no tail	alive
t^{3}	no tail	alive

Lyon MF(1981)에서 개편

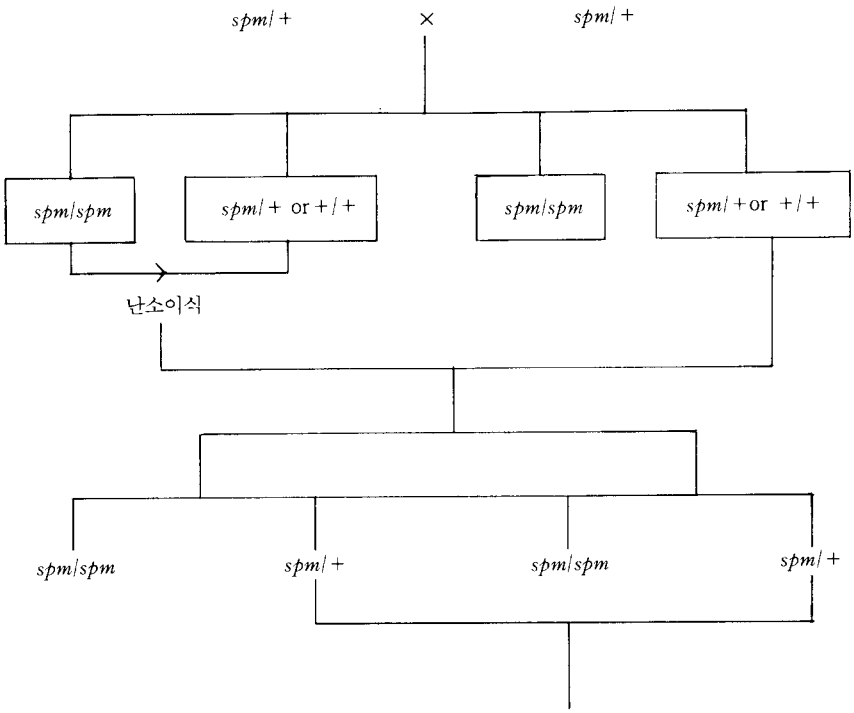

Fig. 3. 난소 이식에 관한 C57BL/ KsJ-*spm*계의 유지

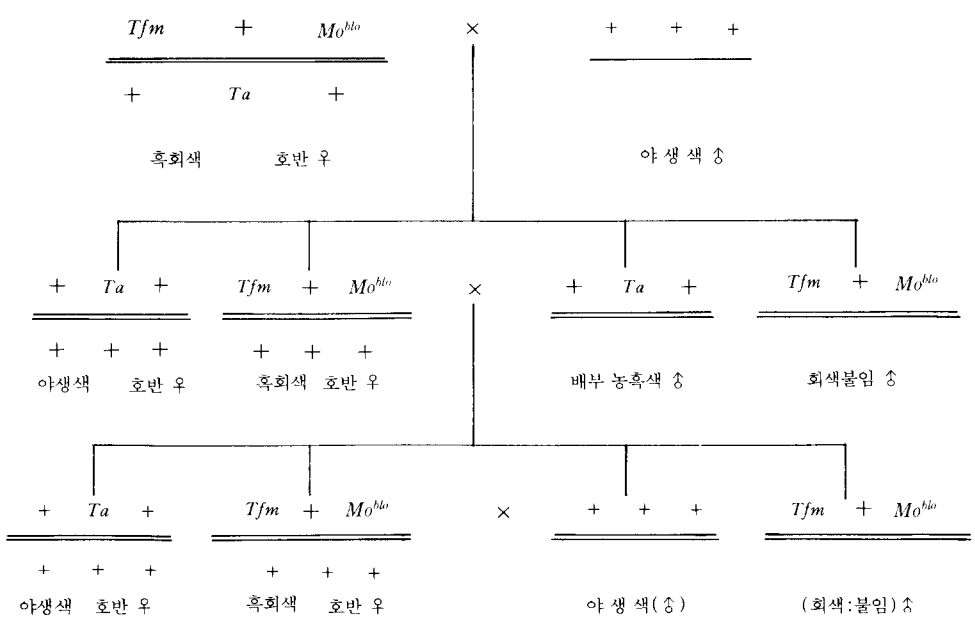

Fig. 4. *Tfm* 유지 방법

배열되어 있고 *Tfm*과 *Ta*좌위의 교차가(crosssing over value)는 1.3%, *Tfm*과 Mo^{blo}는 6.4% 정도이다. *Tfm*과 *Ta* 두 좌위간에 교차가 일어날 확률은 거의 없기 때문에 Fig. 4와 같이 2 세대를 1조로 하는 교배방식에 의하여 유전자를 보존한다.

3. 염색체 이상

염색체 이상은 사람의 유산이나 선천이상에 직접적인 원인으로 중시되고 있다. XO염색체형은 사람의 Turner syndrome에 상당한다. 그러나 mouse에서는 발육은 정상이고, 태생기에 사망도 없고, 생식력은 없다. 단지 생식 가능한 기간의 단축이 보고되어 있다(Lyon 과 Hawkes, 1973). 이 염색체 이상 mouse의 유지는 Fig. 5와 같이 반성 유전자 *Ta*를 이용하여 2세대를 1조로 하는 교배방식에 의하여 행한다. 그 외에 각종의 염색체 이상도 발견되어 있지만 이것들도 아래의 방법으로 유지 보존되고 있다.

① 염색체 이상과 형태적 특징이 있는 경우는, 전술한 치사유전자의 보존과 동일하게 형태적 특징을 이용하여 유지한다.

② 이상 염색체가 homo 형이더라도 정상적인 번식력을 가질 경우는 염색체 이상 계통을 확립하여 보존한다.

③ 염색체 이상이 있고, hetero가 번식력이 있는 경우는 전술한 *Tfm* 유전자 및 XO mouse의 예와 같이 상동염색체의 유전자를 지표로 하여 보존을 행한다.

4. 계통간 교배에 있어서 발견된 특수한 불임현상

근교계 mouse 계통간의 교배에 있어서는 보통 잡종강세에 의하여 수태율, 산자수, 육성율, 체중 등이 증가하는 것이 일반적이지만, DDK × KK 간의 교배에 있어서는 산자수가 격감하는 사실을 발견하였다(若杉, 1981).

① 이 번식력의 저하는 DDK 우 자궁내에 F_1배의 대부분이 상실기에서 배반포기에 걸쳐 배반포 형성부전을 나타내어 사망하는 것 때문이다.

② DDK 우 의 난소를 이식한 F_1 우 (C57BL 우 × DDK ♂ 의 교배에서 태어난 것)에 C57BL ♂ 를 교배하면 아주 낮은 번식력을 보인다. 즉 DDK난자와 C57BL 정자의 수정에 의해 생긴 배는 F_1 의 자궁내(DDK 의 자궁내와 다른 환경)에 있어서도 사망하는 것이 확인되었다. 따라서 F_1 배는 DDK 의 자궁내 환경과 부적합성에 의해 배사망이 일어나는 것이 아니라 F_1 배 자신 즉 DDK 난자와 타계통 정자와의 부적합성에 의한 것이 확실하다.

③ 난자요인 및 정자요인의 유전양식을 교배실험에 의하여 검토하여 보면 양쪽 요인을 지배하는 유전자는 상염색체 동일 좌위에 위치하거나 또는 아주 가까이 연관되어 있는 것이 확실하다. DDK가 갖고 있는 유전자를 난자돌연변이 유전자(*Om* : ovum mutant gene)라고 명명하였다(Katoh, 1980). 이 현상은 정자 유래의 유전자와 난자의 세포질과 상호작용, 즉 초기발생과정(배반포 현상)에 대한 정자 유래의 유전자가 관여하는 흥미 있는 문제를 제기하였다. 또 NZB와 NZW 계통의 F_1 잡종에 있어서 자기면역증+의 발현이 조기에 일어난다는 것도 발견하였다. 따라서 계통

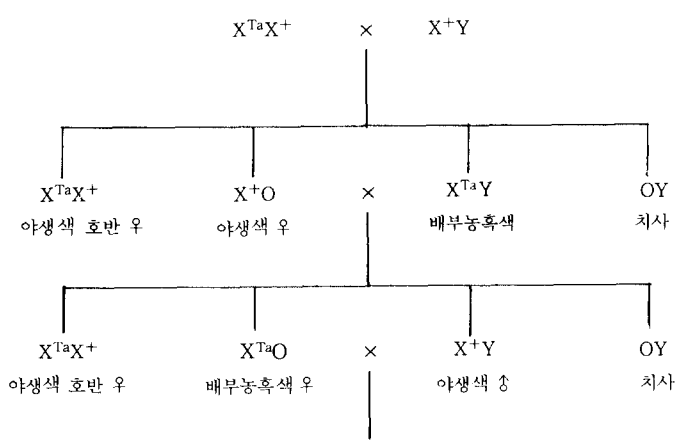

Fig. 5. XO(염색체이상) mouse의 유지

간 교배 및 그 교배에서 태어난 F_1 잡종에 있어서 특수한 현상이 발견될 가능성이 많기 때문에 교배실험의 경우 주의깊게 관찰하지 않으면 안된다.

5. Transgenic breeding colony(Ret)

Transgenic mice가 만들어지면 첫째로 생각하여야 할 4가지가 있다.

① Transgenic mice의 back ground strain이 무엇인가?

② 만들어지는 동물이 homozygote인가 heterozygote인가?

③ Transgenic 계가 번식에 영향을 미치는 특별한 유전형질을 가지고 있는가?

④ 그 계통의 health profile은 만들어져 있는가?

이상의 점들을 고려하여야 한다(Allen, 등, 1987).

Background strain

원래 transgenic mice는 microinjection에 쓰여진 embryo를 가진 계통에서 유래된 것이다. 즉 원래의 계통에서 3~4개의 유전자만 달라진 것이고 다른 모든 유전적 배경은 원래 계통과 같은 것이다. 따라서 transgenic 동물은 공여 암컷과 같은 특징을 보인다. Transgenic 동물이 번식적령기(6~8주)에 도달하면 우선 어느 계통과 교배할 것인가를 정하여야 한다. 같은 공여 mice와 같은 근교계로 유지하고 싶으면 같은 근교계와 교배를 하면 된다. 만약에 공여계통이 잡종(hybrid)이면 반드시 잡종의 양친의 어느 한쪽 계통과 교배하여야 한다.

Homozygotes vs Hemizygotes

Transgenic 계통은 만들어지기 전에 유전자가 도입된 개체가 homozygote인가 hemizygotes(각각의 transgene에 대해서 heterozygote)인가에 따라, 또는 원하는 유전적 상태를 갖고 있는지를 확인하여야 한다. Hemizygote 숫놈이면 많은 암컷에 원하는 만큼 교배시킬 수 있기 때문에 가장 좋다. 일반적으로 열성 homozygotes에서 발현되는 것이면 breeding colony를 만드는데 어려움이 생긴다. 그러나 일반적으로 오직 몇마리 정도면 번식을 시키는 것이 가능하다. 또 이러한 방법들은 그 각각의 자식들의 DNA를 test하여야만 homozygote의 자식들을 만들어낼 수 있다.

Special traits

Transgenic을 만들었을 때 도입된 유전자가 언제 어떻게 발현되는지를 알아내어야 한다. 표현되는 유전자가 조직 손상이나 번식력에 영향을 끼칠 수 있기 때문이다. 도입된 유전자는 항상 한 부분에 모이지 않는다. DNA가 한 곳 혹은 독립적으로 분리하거나 germ line에서 mosaic로 되는 곳에 모여지는 것도 60% 밖에 되지 않는다. 그래서 보다 많은 도입된 유전자를 갖기 위해서는 번식계획을 세워야 한다. 만들어진 line에서 특징에 관한 지식도 중요하다. 어떤 line에서는 tumor가 조기에 발현하고, 어떤 것은 번식기를 짧게 하고 nursing을 방해하는 것도 있다. 또한 특징을 잘 파악하면 DNA의 검사 없이도 계통을 유지할 수 있기 때문이다. 예를 들면 ras line은 Haderian gland hyperplasia가 잘 일어나기 때문에 육종하는 사람들이 금방 알아볼 수 있다.

맺음말

번식력에 영향을 주는 이상의 인자 이외에도, 생식기관이 이상적으로 비대하고, 기형 발생율이 높고 이유율이 낮은 RFM 계통, 또 체중이 작은 SIII 계통에서는 이유율이 46.5% 정도 밖에 되지 않는 특질들이 연구되고 있다. 이렇게 개발,연구, 유지되고 있는 동물들을 이용하여 치사유전자, 불임유전자, 염색체 이상 등의 분자생물학적 접근과 더불어 생명체 분화에 관한 연구도 가능하리라 생각된다.

참고문헌

Allen ND, Barton SC, Surani MAH and Reik W. 1987. Production of transgenic mice. In "Mammalian development A practical approach" Ed by Monk M, IRL Press., pp. 217.

Eicher EM and Beamer GM. 1980. New mouse *dw* allele: genetic location and effects on life span and growth hormon levels J Hered., 71: 187.

Ingalls AM, Dickie MM and Snell GD. 1950. Obese, a new mutation in the house mouse.

J. Hered., 41:317.

Katoh H. 1980. Studies on fertilization of the incompatible mouse eggs due to the ovum mutant gene. MS. thesis, Graduate School of Agriculture, Nagoya University.

Lyon MF. 1981. The *t* complex and genetical control of development. Symp. zool. Soc. Lond. No., 47:455.

Lyon MF and Hawkes SG. 1970. An X-linked gene for testicular feminization of the mouse. Nature 227: 1217.

Lyon MF and Hawkes SG. 1973. Reproductive life span in irradiated and unirradiated chromosomally XO mice. Genet. Res., (Camb.) 21: 185.

McLaren A. 1976. Genetics of the early mouse embryo. Ann. Rev. Genet., 10: 361.

Meier H and Southard JL. 1970. Muscular dystrophy in the mouse caused by an allele at the dylocus. Life sci., 9: 137.

Miyawaki S, Mitsuoka S, Sakiyama T and Kitakawa T. 1982. Sphingomyelinosis, a New mutation in the mouse: a model of Niemann-Pick disease in humans. J. Hered., 73: 257.

若杉 昇. 1981. 遺傳的 研究法 "哺乳動物の初期發生" 妹尾左知丸 등 編 pp.377.