

핵이식에 의한 복제동물 생산의 최근 연구 성과

박충생

경상대학교 농과대학 축산학과

Recent Research on Production of Cloned Animals by Nuclear Transplantation

C. S. Park

Department of Animal Science, Gyeongsang National University

SUMMARY

Nuclear transplantation technique has been found to be the most potential and efficient method for producing a large number of genetically identical animals from a single embryo. The technical development of nuclear transplantation in mammals and its application to the production of cloned animals were reviewed. For the efficient and successful production of cloned embryos by nuclear transplantation, selection and micromanipulation of recipient eggs or embryos as capacious recipient cytoplasm, and beneficial preparation of multiple totipotent embryonic cells as donor nuclei, and also fusion technique are very critical. Recent works approaching to these critical points were introduced and discussed.

서론

핵이식은 totipotency한 시기에 있는 수정란의 할구로부터 다수의 핵을 얻어서 이를 탈핵된 oocyte나 early embryo에 이식시키는 것으로서 이 핵이식 기술은 하나의 수정란으로부터 수백개의 동일한 성과 유전형질을 가진 복제 수정란을 작출할 수가 있으며, 이들 복제 수정란을 수란축에 이식하여 복제동물을 생산할 수가 있다(Park, 1990). 이러한 핵이식 기법은 상실배 또는 포배기에 있는 수정란으로부터 채취한 핵을 탈핵된 수정란에 이식하여 발달시키면 하나의 수정란으로부터 다수의 동일한 산자를 생산함으로써 우수한 수정란을 확대 보급할 수 있고, 유전적으로 동일한 동물을 생산함으로써 정교한 동물 실험을 수행할 수 있을 뿐만 아니라 이들 실험에 소요되는 동물의 수도 줄일 수 있음으로 이용율을 크게 높일 수 있을 것이다.

핵이식을 통한 cloning 은 양서류에서 처음 시도되어 Brigs 과 King(1952)이 *Rana pipiens* 계통의 개구리 수정란에 핵을 이식하여 수정란 발생을 유도하는데 성공한 이래 Gurdon(1964)은 개구리의 포배기 및 장배기 수정란의 핵을 채취하여 탈핵된 수정란에 이식을 실시하여 정상적인 개체로 발육하는 것을 확인하였으며, 포유동물에서는 McGrath 와 Solter(1983)가 미세조작기법과 virus융합기법을 이용하여 생쥐 수정란의 핵이식으로 산자를 생산하는데 성공함으로써 핵이식 기술의 응용으로 복제동물의 생산 가능성이 입증되었다. 이러한 미세조작기법으로 가족에 있어서 핵이식에 의한 산자생산은 면양(Willadsen, 1986), 소(Prather 등, 1987), 돼지(Prather 등, 1989) 및 토끼(Collas 와 Robl, 1991)등에서 핵이식에 의한 산자를 생산하는데 성공하였다.

본문에서는 이러한 핵이식 기법의 연구성과, 문제점 및 개선방향을 최근의 국내외 연구자들의 문

현직 고찰을 통하여 앞으로 보다 효율적이고 실용적인 연구방향의 제시에 대하여 고찰해 보고자 한다.

소의 핵이식 연구 성과

초기의 핵이식에 관한 연구는 공핵란이나 수핵란 모두 전핵단계의 접합자 또는 2-세포기의 수정란에서 핵이식을 실시하는 단계여서 핵이식기술에 있어서 가장 중요한 “복제동물생산”이라는 의미와는 다소 거리가 먼 단계에 머물러 오다가 근년에 와서 수정란의 cloning 을 통하여 우량유전자로 조성된 개체의 다량 복제는 Bondioli 등(1990)과 Will-adesn 등(1991)이 16 내지 64-세포기에 있는 牛의 수정란의 핵을 이식하여 92마리의 산자를 생산하여

이중 7마리가 유전적으로 동일한 산자를 얻는데 성공함으로써 핵이식 기술의 응용으로 복제동물의 생산 가능성이 입증되었다.

공핵란의 이용효율 개선

Keefe 등(1993)은 inner cell mass(ICM)로 핵을 채취하여 이를 수핵란자에 이식하였을 때 임신이 가능하다고 하였다. 최근에 와서는 공핵란을 핵이식전에 동결시켜 두었다가 핵이식에 사용함으로써 복잡한 핵이식과정의 간편함을 도모할 수 있게 되었다(Table 1). 또한 공핵란을 IVF를 실시하여 얻은 수정란으로 부터 핵이식을 실시함으로써 공핵란의 효율을 높일 수 있는 방향으로 개선되고 있다(Table 2). 또 다른 한가지 방법은 recycling nu-

Table 1. In vitro development of nuclear transfer embryo using *in vitro* matured oocytes

Donor embryos	No. of eggs used	No. of enucleated oocytes fused with a blastomere(%)			No. of reconstituted eggs developed at the stage ²⁾ of				
		Fused	Without Blastomere		2	4	8	M	B
			fused	lysed					
Fresh	208	181(87) ^a	22(11)	5(2) ^a	108	74	38	17	4
Frozen	125	85(68) ^b	12(10)	28(22) ^b	48	31	20	11	4
IVF	84	59(70) ^b	9(11)	16(19) ^b	31	23	12	7	1
Total	417	325(78)	43(10)	49(12)	187	128	70	35	9

1) Cultured in vitro for 3 days after *in vitro* fertilization.

2) M: morula; B: blastocyst

Values with different superscript letters were significantly different $a > b$ ($P < 0.05$) (Ushijima & Eto, 1992).

Table 2. Comparison of 5-day, 6-day, frozen-thawed and nuclear transfer embryos on the efficiency of nuclear transfer

Donor embryo type	No. attempted fusions	No. (%) successful fusions	No. (%) transferred to sheep	No. (%) recovered from sheep	No. (%) recovered viable ^a
5-day	513	294(57.3)	493(96.1)	44(90.1)	92(20.7) ^b
6-day	405	252(62.2)	375(92.5)	357(95.2)	84(23.5) ^b
Frozen-thawed 5-day	144	111(77.1)	144(100)	127(88.2)	32(25.2) ^b
Nuclear transfer	223	142(63.7)	223(100)	199(89.2)	31(15.6) ^b

^aViable=compact morula or blastocyst when collected from sheep.

^bDifferent superscripts within the same column denote a significant difference $P < 0.05$ (ANOVA)(Westhusin *et al.*, 1991).

clear transplantation 에 의한 다세대 핵이식 방법이다(Table 3). 즉 핵이식한 수정란을 다시 반복해서 핵이식을 실시함으로써 복제수정란의 생산효율을 높일 수 있는 방법이다. 다세대 핵이식 수정란의 배반포로의 발달율은 세대가 반복할수록 제 1세대 핵이식 수정란의 발달율보다는 다소 감소한다. 또한 Stice(1992)는 소 수정란의 다세대 핵이식에서 체외발달율(제 1세대, 45% ; 제 2세대, 35% ; 제 3세대, 34% ; 제 4세대, 17% ; 제 5세대, 46%)은 세대가 반복할수록 감소하다가 제 5세대 핵이식 수정란은 오히려 증가하였으나, 제 3세대 핵이식 이상에서는 아직 산자를 얻지 못하였다고 하였다.

수핵란의 선택과 준비

핵을 수여받을 수핵란의 적절한 선택과 준비는 핵이식에 매우 중요한 요건 중의 하나다. 수핵난자로 사용할 수 있는 것은 전핵기에 있는 접합자, 2-세포 수정란, 성숙한 난자 등이었으나, Kono 등(1993)은 도축장에서 도축시의 난소로부터 미성숙 난자를 채취하여 이들 난자를 전기를 이용하여 인공적으로 활성화시킨 다음 이들을 수핵난자로 사용하여 핵이식후 체외배양을 실시하였을 때 처리구별로 5~24%가 배반포로 발달하였으며(Table 4), 이들 배반포기 수정란을 체내 이식을 실시하여

Table 3. Fusion rate and *in vivo* developing rate of multiple generation bovine embryos

Donor embryo	Fusion rate(%)	Morula-blastocyst(%)	Av. cell No. of resulting
Original(G=0)	584 / 887 ^a (66)	84 / 417 ^a (20)	27.5
1st Gen. NT	576 / 961 ^b (60)	63 / 610 ^b (10)	27.5
2nd Gen. NT	230 / 441 ^c (52)	49 / 255 ^a (19)	35.4
3rd Gen. NT	67 / 124 ^{bc} (54)	8 / 68 ^{ab} (12)	not counted

^{a,b,c} Numbers in columns with different letters are significantly different at the 0.01 level for fusion and at 0.001 for development to morula-blastocyst stage(Stice *et al.*, 1991).

Table 4. Effect of ooplast activation pri or to receiving a donor nucleus on development *in vitro*

Interval between activation and fusion(h)	No. of egg fused /No. attempted (%)	No. (%) of developed to			
		2-cell	8-cell	Morula	Blastocyst
0	99 / 106(94)	60(60)	22(22)	10(10)	5(5)
3	73 / 74(99)	46(63)	20(27)	11(15)	9(12)
6	87 / 97(90)	69(79)	28(32)	14(16)	14(16)
9	197 / 226(87)	185(87)	130(66)	76(39)	48(24)
12	82 / 93(88)	67(82)	33(40)	14(17)	11(13)

(Kono *et al.*, 1993)

Table 5. Cloning of bovine embryos with *in vitro* and *in vivo* matured oocytes

Oocyte souce	No. of fusion	No. of fusioned(%)	No. of recovered(%)	No. of viable(%)	No. of transferred(%)	No. of pregnant(%)	Calves born
<i>In vitro</i> matured	961	840(87)	906(93)	161(18)	125	33(26)	27
<i>In vivo</i> matured	1,074	884(82)	1,008(88)	161(16)	135	33(24)	24

(Barnes *et al.*, 1991)

29%의 임신율을 얻은 바 있다. 또한 Ushijima와 Eto(1993)는 7% ethanol을 이용하여 activation시켰을때도 배반포로의 발달율이 이와 비슷한 7~21%의 성적을 얻었다고 보고하였다.

전기적 융합기법의 개선

가축에 있어서 핵이식된 수정란의 핵과 세포질의 융합은 일반적으로 전기적 융합 방법(electrofusion methods)으로 실시하고 있으며, 융합율은 전류의 전압, 통전시간, 동물의 종류, 수정란의 발달상태

및 보고자에 따라 다소의 차이는 있다(Table 6). 소에서는 100V, 20 μ sec의 전류로 80% 정도의 핵융합율을 보이고 있으며, 돼지에서는 120V, 30 μ sec로 69%의 융합율을, 그리고 면양에서는 20V, 100 μ sec로 90%의 융합성적을 얻고 있다.

복제 배의 체외배양

핵이식한 수정란의 배반포로의 발달은 생쥐와 같은 실험동물에서는 가축에 비하여 비교적 발달율이 높으나(Park 등, 1990), 소와 같은 대가축에서는

Table 6. Efficiency of electrofusion in various species of animals

Species	DC voltage	Duration of pulse(usec)	Fusion rate(%)	% of blastocyst developed	Reference
Sheep	20	100	90	56	Smith and Wilmut(1989)
	80	100	88	66	Mclaughlin <i>et al.</i> (1991)
Pig	120	30	69	38	Prather <i>et al.</i> (1989)
Cattle	15	50 \times 3 times	77	25	Westhusin <i>et al.</i> (1991)
	100	75 \times 2 times	87	24	Kono <i>et al.</i> (1993)

Table 7. Comparison of embryo size, number of blastomeres and diameter of nuclei in nuclear transplant or intact embryos of blastocyst stage

Stage of nuclear donor	Recipient embryos	Examined blastocysts	Diameter of blastocyst(μ m)	No. of blastomeres	Diameter of nuclei(μ m)
2-cell	Enucleated				
	2-cell	40	100.7 \pm 1.1 ^a	33.1 \pm 1.2 ^b	15.0 \pm 0.4 ^c
4-cell	Enucleated				
	2-cell	40	97.9 \pm 1.9 ^a	27.5 \pm 1.8 ^a	14.3 \pm 0.5 ^{bc}
8-cell	Enucleated				
	2-cell	40	102.5 \pm 2.1 ^{ab}	24.0 \pm 1.3 ^a	13.3 \pm 0.5 ^a
	Fresh blastocysts	40	99.4 \pm 2.7 ^a	49.2 \pm 1.8 ^c	13.8 \pm 0.5 ^{ab}
	<i>In vitro</i> developed blastocysts	40	107.5 \pm 2.2 ^b	51.5 \pm 1.8 ^c	14.9 \pm 0.4 ^{bc}

1) Mean \pm S. E. M.

2) The figures with the different superscripts denote significant(P<0.05) difference between the cell stages of nuclear donor or controls. (Park *et al.*, 1990)

Table 8. Production of nuclear transfer cattle embryos by donor embryos cell number(1st and multiple generation procedures)

Donor embryo cell no.	Viable embryos	No. of transfers	No. of pregnant	Pregnancy rate(%)
1~10	53	38	1	2.0
11~19	143	74	11	14.8
20~29	190	126	23	18.25
30~39	168	105	24	22.8
40~49	71	48	12	25.0
50~59	15	10	0	0.0
> 60	60	50	14	28.0
Total	700	451	85	18.8

(Massey *et al.*, 1990)

아직도 낮은 실정이다. 핵이식한 수정란은 정상적인 수정란에 비하여 할구수가 적음으로써(Table 7) 이들 핵이식 수정란은 체내 이식하면 수태율 및 산자생산율도 낮아진다(Table 8).

복제 배의 이식후 문제점

소에서 핵이식한 수정란의 수태율은 5~30% 정도에 머물고 있는 실정이며, Willadsen 등(1991)은 소에서 핵이식기법으로 101마리의 송아지를 생산하여 이중 4조가 복제된 송아지를 5 case 생산한 바 있다(Table 9). 핵이식 기법으로 생산한 복제 송아지의 약 20~30%는 "Large-calf syndrome" 현상이 일어난다는 보고가 있다(Willadsen, 1991). 즉 핵이식 기법으로 태어난 송아지는 정상적인 송아지에 비하여 배에 가까울 정도로 큰 송아지가 태어나

는 현상으로서 그 원인은 알 수 없으나(Seidel, 1991), 생쥐에서는 이러한 현상이 일어나지 않은 것으로 알려지고 있다(Table 10, 11).

국내의 연구 현황

이철상 등(1989)이 zygote 단계의 전핵을 치환하여 생쥐생산에 성공하였다는 보고가 있었고 인위적으로 모성전핵으로만 이루어진 gynogenetic embryo와 부성전핵만으로 이루어진 androgenetic embryo를 작출하여 모성 genome과 부성 genome의 개체로의 발달능력을 조사하였으며, 아울러 핵이식 기법으로 28마리의 신생자를 생산한 바 있다(Chon 등, 1989). 핵이식에 적합한 donor nucleus와 recipient cytoplasm의 시기를 알아보기 위하여 2, 4 및 8-세포기의 수정란으로 부터 채취된 핵을

Table 9. Information on nuclear transplant calves number of cloned

Clone size	Number of clones								Number of calves*	
	4		3		2		1		F	M
Sex of calves	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
I. Dairy	-	2	3	2	3	6	9	4	24	30
II. Beef	2	1	4	1	1	3	5	7	27	20
Total I + II	2	3	7	3	4	9	14	1	51	50

*Includes the calf born prematurely due to Hydrallantois

(Willadsen *et al.*, 1991)

Table 10. Development and reproductive performance of male mice produced by nuclear transplantation

Group	No. of animals examined	Body weight(g)		No. of female mice mated	No. and (%) of pregnant mice	Litter size
		At weaning	At puberty			
Control mice	10	13.3±0.8	23.6±0.7	10	10(100)	4.0±1.0
Nuclear transplanted mice	10	13.7±0.6	23.8±1.0	10	10(100)	4.1±1.1

*Age at weaning : 4 weeks old

**Age at puberty : 8 weeks old

1) Mean ± S. E. M.

2) There are no significant ($P < 0.05$) differences in the weights of mice between the control and nuclear transplanted mice. (Park *et al.*, 1992)

Table 11. Development and reproductive performance of female mice produced by nuclear transplantation

Group	No. of animals examined	Body weight(g)		No. of female mice mated	No. and (%) of pregnant mice	Litter size
		At weaning	At puberty			
Control mice	15	12.7±0.9	23.2±0.9	15	15(100)	4.3±1.7
Nuclear transplanted mice	12	12.8±0.9	23.4±0.9	12	12(100)	4.5±1.5

*Age at weaning : 4 weeks old

**Age at puberty : 8 weeks old

1) Mean ± S. E. M.

2) There are no significant ($P < 0.05$) differences in the body weights of mice between the control and nuclear transplanted mice. (Park *et al.*, 1992)

Table 12. Development in vitro to blastocysts of the reconstituted mouse embryos by cell stage of donor embryos

Stage of nuclear donor	No. of donor embryos by nuclear of cloned blastocysts								No. of embryos developed / No. of reconstituted embryos(%)
	No. of cloned blastocysts per donor embryos								
	8	7	6	5	4	3	2	1	
8-cell	0	0	0	1	2	6	6	3	46 / 144(39.1) ^a
4-cell					0	6	10	3	41 / 76(53.9) ^b
2-cell							5	6	16 / 18(88.8) ^c

The numbers with different superscript denote significant ($P < 0.05$) difference between the cell stages of nuclear donor. (Choe, 1992)

Table 13. Production of cloned live youngs following transfer of reconstituted mouse embryos by cell stage of donor embryos

Stage of nuclear donor	No. of donor embryos by number of cloned offsprings								No. of live youngs / No. of reconstituted embryos(%)	No. of live youngs per donor embryos
	No. of cloned offsprings per donor embryos									
	8	7	6	5	4	3	2	1		
8-cell	0	0	0	0	0	2	3	1	13 / 48(27.1) ^a	0.81 ^a
4-cell					0	0	4	4	12 / 36(33.3) ^a	0.63 ^b
2-cell							3	5	11 / 14(78.5) ^b	0.91 ^a

The numbers with different superscript denote significant ($P < 0.05$) difference between the cell stages of nuclear donor. (Choe, 1992)

탈핵된 2-세포기의 수정란에 이식하여 핵융합효과, 체외발달능력 (Table 12) 및 수란생취내에 이식하여 체내에서의 개체발생능력 등을 조사하였으며, 이들 핵이식된 수정란으로부터 113마리의 산자를 생산하였으며, 이중 3마리가 유전적으로 동일한 산자를 2조 생산한 바 있다 (Table 13).

그리고 2-세포기 수정란으로 부터 채취한 핵을 탈핵한 2-세포기 수정란에 이식하여 2- 내지 8-세포기 단계까지 체외발달을 시킨 다음 이것의 핵을 채취하여 탈핵된 2-세포기 수정란에 이식하는 제 2세대 핵이식을 실시 중에 있으며, 또한 mouse에서의 핵이식 기법을 응용하여 토끼에서 8- 내지 32-세포기에 있는 수정란의 할구를 분리하여 탈핵된 oocyte에 이식하여 electrofusion 을 시킨 다음 이를 체외배양시킨 후 수란 토끼에 체내 이식시키는 일련의 실험들을 수행 중에 있다.

결 론

오늘날 가축에서 핵이식 기법의 응용에 의한 복제산자의 생산효율은 소에서 5~30%, 돼지에서는 4%, 면양에서는 14%에 이르는 수준이다. 비록 생산효율이 낮지만 recycling method에 의한 다세대 핵이식기법의 응용 및 복제수정란을 동결보존함으로써 생산효율을 더욱 증대시킬 수 있는 한 방법이 될 수 있을 것이다. 복제 수정란의 작출효율을 개선하고 대량생산 체제로 들어가기 위해서는 공핵란

및 수핵란의 다량 확보가 이루어져야 한다. 또한 핵과 세포질의 융합 효율개선, 핵이식한 수정란의 체외배양기법의 확립 및 핵이식한 수정란을 수란축에 이식하여 산자의 생산효율 향상 등이 이루어지면 가축에서의 복제동물 생산이 실용화 될 것이다.

참고문헌

- Barnes FL, Westhusin EW and Looney CR, Powell R, Westhusin M and Bondioli K. 1991. Embryo cloning in cattle: The use of IVM oocyte. *J. Reprod. Fertil.* (submitted).
- Bondioli KR, Westhusin ME and Looney CR. 1990. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenol.* 33:165.
- Brigs R and King TJ. 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog eggs. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 38:455.
- Choe SY, Park CS, Lee HJ and Park HS. 1990. Studies on nuclear transplantation in mouse embryos. I. Functional differences between maternal and paternal genomes. *Korean J. Vet. Res.* 30:123.
- Collas P and Robl JM. 1991. Development of rabbit nuclear transplant transplant em-

- bryos from morula and blastocyst stage donor nuclei. *Theriogenology*. 35:190.
- Gurdon JB. 1964. The transplantation of living cell nuclei. *Adv. Morphogen*. 4:1
- Kono T, Sotomoru Y, Aono F, Takahshi T, Ogihara K, Sekizawa F, Arai T and Nakamura T. 1993. Effect of ooplast activation on the development of nuclear transferred bovine embryos. *Theriogenol*. 39:248.
- Keefer CL, R Koppang, AM Paprocki, P Golueke, S Stice, M Maki-laurila and L Matthews. 1993. Bovine inner cell mass (ICM) cells as donor nuclei in the production of nuclear transfer embryos. *Theriogenol*. 39:242.
- Lee CS, Park HD, KS Chung and KK Lee. 1989. Production of nuclear transplanted mice. *Korean J. Anim. Sci*. 31:69-74.
- Massey JM. 1990. Animal production industry in the year 2000 A. D. *J. Reprod. Fert., Suppl*. 41:199-208.
- McGrath J and Solter D. 1983a. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science*. 220:1300.
- McLaughlin KJ, Pugh AP, Logan K and Tervit HR. 1991. Assessment of oocyte source for ovine nuclear transfer. *Theriogenology*. 35:240.
- Park CS, Choe SY, Lee HJ and Park HS. 1990. Studies on nuclear transplantation in mouse embryos. II. Developmental potential of nuclei from embryos of different developmental stages *Korean J. Vet. Sci*. 30:355.
- Prather RS, Barnes FL, Sims MM, Robl JM, Eyestone WH and First NL. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo: Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod*. 37:859.
- Prather RS, Sims MM and First NL. 1989. Nuclear transplantation in early pig embryos. *J. Biol. Reprod*. 41:414.
- Seidel GE, Jr. 1992. Overview of cloning mammals by nuclear transplantation: proseedings "Symposium on cloning mammals by nuclear transplantation" Fort Collins Colorado pp. 1-4.
- Smith LC and Wilmut I. 1989a. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vitro of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol. Reprod*. 40:1027-1035.
- Stice SL, Keefer CL, Maki-Laurila M and Phillips PE. 1991. Producing multiple generation of bovine nuclear transplant embryos. *Theriogenol*. 35:273.
- Stice SL. 1992. Multiple generation bovine embryo cloning: proceedings "Symposium on cloning mammals by nuclear transplantation" Fort Collins Colorado pp. 28-31.
- Ushijima H and Eto. T. 1993. Bovine nuclear transfer using parthenogenetically activated oocyte as recipient cytoplasm. *Theriogenol*. 39:333.
- Westhusin ME, Pryor JH and Bondioli KR. 1991. Nuclear transfer in the bovine embryo : A comparison of 5-day, 6-day, frozen-thawed, and nuclear transfer donor embryos. *Mol. Reprod. Dev*. 28:119-123.
- Willadsen SM. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos *Nature*. 320:63.
- Willadsen SM, Janzen RE, McAlister RJ, Shea BF, Hamilton G and McDermand D. 1991. The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. *Theriogenol*. 35:161-170.
- 박희성, 정장용, 박충생. 1992. 핵이식기법으로 생산된 생쥐의 육성을 및 번식능력. *한국축산학회지*. 34:31-35.
- 최상용, 박희성, 이효종, 박충생. 1992. 생쥐 8-세포 수정란의 핵이식에 의한 복제산자의 생산. *한국축산학회지*. 34:89-96.