

형질전환동물의 유선조직으로 부터 인간 성장호르몬의 분비

구덕본 · 최강덕 · 정형민 · 이상민 · 이경광* · 이훈택 · 정길생

건국대학교 동물자원연구센터

Secretion of Human Growth Hormone from Mammary Gland of Transgenic Mice

Koo, D. B., K. D. Choi, H. M. Chung, S. M. Lee, K. K. Lee*, H. T. Lee and K. S. Chung

Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University

SUMMARY

The human growth hormone (hGH) gene under the control of the rat β -casein promoter gene was designed to produce transgenic mouse expressed hGH gene in only mammary gland. One hundred seventy two eggs microinjected were transferred to the oviducts of pseudopregnants and 43 offspring were delivered. By Southern blotting hybridization, 3 were transgenic with rat β -casein/hGH gene. The copy numbers of three transgenic founder were 1, 5, and 15, respectively. A radioimmunoassay was developed to quantitate the amount of expression of the hGH gene in mammary gland of transgenic mice. The amount of hGH was 13.3 ng/ml in the lactating milk of one transgenic line, showing predominantly higher than 3.0 ng/ml in milk of control mice. Therefore, our findings suggested that β -casein promoter may induce the tissue specific expression of structural gene.

I. 서 론

외래유전자의 미세주입을 통한 형질전환 동물의 생산기법이 Gordon 등 (1980)에 의해 개발된 이래, 많은 연구자들이 생쥐 수정란의 진행에 유전자를 미세주입함으로써 형질전환 생쥐를 생산하였다 (Palmiter 등, 1982, 1983; Wagner 등, 1983; Brinster 등, 1985; Bartke 등, 1988; First and Haseltine, 1991). 형질전환 동물생산 목적은 여러 분야 즉, 질병에 대한 치료를 목적으로 한 질환모델 동물개발, 질병에 대한 저항성 증진, 유전자의 발현조절 기전, 가축의 생산효율 증진 등에 응용되고 있다 (Jaenisch, 1988;

Watts, 1991; Snouwaert 등, 1992; Yamamura 등, 1993; Iwakura 등, 1993). 가축에 있어서 유즙의 성분을 사람에게 유용한 방향으로 변화시키려는 노력은 오래전에 시작되었으나, 괄목할 만한 성과를 얻지 못하고 있는 실정이다. 그러나 최근 가축의 유즙과 모유의 성분함량이 밝혀지고 우유의 단백질 유전자들의 구조와 염기서열 및 기능들이 규명되어 형질전환 소, 돼지, 양을 생산하여 우유의 품질향상과 유선으로부터 각종 생리활성물질 등을 생산하려는 연구가 집중적으로 진행되고 있다 (Simons 등, 1987; Pursel and Rexroad, 1993). Simons 등 (1987) 과 Viotte 등 (1989) 은 우유의 성분중 β -lactoglobulin 및 α -lac-

*한국과학기술연구원 유전공학연구소 (Genetic Engineering Research Institute, KIST)

albumin 유전자를 cloning하여 이들 유전자가 유선 조직에서 발현하는 형질전환 동물을 생산하였다. 특히 유선조직 등과 같은 특정조직에서만 발현되는 casein이나 WAP (whey acid protein) promoter를 생리활성 물질의 유전자와 연결시켜 유선조직에서만 특이적으로 발현되게 함으로써 유즙에서 특이 단백질을 생산하였다 (Pittius 등, 1988; Wall 등, 1991; Reddy 등, 1991; First and Haseltine, 1991). 이러한 동물의 생산은 우유의 성분을 변화시키고 유가공품의 질적 향상을 가능케 하며, 생물학적으로 활성이 높은 단백질을 유선으로부터 다량 생산할 수 있다는 장점이 있다. 또한, WAP와 casein에 tissue plasminogen activator (tPA) cDNA를 융합시킨 다음 미세주입에 의해 형질전환 생쥐를 생산한 결과 주입된 유전자는 유선조직에서만 특이적으로 발현되어 생쥐 유즙중에 사람의 tPA 단백질이 분비되었다고 보고하였다 (Pittius 등, 1988; First and Haseltine, 1991).

형질전환 동물의 생산에 있어서 가장 효과적으로 사용된 유전자는 GH라고 할 수 있다. Palmiter와 Brinster는 metallothionein-growth hormone fusion gene을 사용하여 형질전환 생쥐를 생산하였다. 이들 생쥐들은 정상적인 생쥐보다 체중이 2배나 증가하였으며, 성장호르몬의 양도 정상적인 생쥐보다 800 배 이상 높게 나타났으며, 혈청에서도 IGF1의 농도가 증가된다고 보고하였다 (Miller 등, 1988; Mathews 등, 1988; Naar 등, 1991). 성장관련 유전자를 활용하여 형질전환 가축을 생산한 예도 보고되었다 (Hammer 등, 1985; Ebert 등, 1990). Rat β -casein transgene이 도입되어 생산된 생쥐들은 유단백질 유전자의 호르몬적 조절에 대한 연구에 유용한 모델 (Lee 등, 1988)로서 이용 가능하다는 측면과, 형질전환 생쥐의 성장과 번식에 영향을 미치지 않고 우유에서 hGH가 다량 존재한다는 (Reddy 등, 1991) 점은 상업적으로도 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 시사해 준다.

따라서 본 연구에서도 인간의 성장호르몬 유전자에 유선조직에서 특이적으로 발현하는 β -casein promoter를 결합시킨 제조합유전자(pChGH)를 이용하여 생쥐 수정란의 진행에 미세주입후, 가친에 이식하여 산자를 생산하였다. 이들 산자의 꼬리로부터 DNA를 추출하여 Southern blot한 결과 주입 DNA가 염

색체상에 삽입된 형질전환 생쥐를 얻었으며, 생쥐의 유즙에서 성장호르몬이 생산, 분비된다는 것을 확인하였다. 이러한 결과들은 포유동물에서 인체 생리활성물질을 다량 생산하고, 유즙분비 기능의 조작기술을 가축에 응용하려는 집중적인 연구에 대한 가능성을 제시한다는데 그 의미가 있다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물

공시동물은 C57BL/6과 CBA의 교잡종인 hybrid BCF1 계통의 생쥐로써 자성생쥐는 4~6주령의 체중 15~25g, 웅성생쥐는 14주령 이상의 체중 30~35g을 사용하였다. 일조시간은 14시간으로 고정하였으며, 고형사료와 식수는 무제한 급여하고, 가능한 무균상태를 유지하였다.

2. 배양액

수정란의 회수와 외래 유전자의 미세주입시는 M2 (Quin, Barros 와 Whittingham, 1982) 배양액을 사용하였고, 수정란의 체외배양을 위해서는 M16 (Modified Krebs-Ringer Bicarbonate Solution, Whittingham, 1971) 배양액을 사용전에 0.2 μ m의 Milipore filter를 사용하여 여과 제균한 다음, 소량으로 분주하여 사용하였다. 배양조건은 37°C, 5% CO₂ 및 95% 공기조건의 CO₂배양기를 이용하였다.

3. 수정란의 준비 및 미세주입

자성생쥐의 복강내에 5IU의 pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG; Pregnecol, Heriot, Netheland)을 주사한 다음, 48시간째에 동일한 방법으로 5IU의 human chorionic gonadotropin (hCG; pregnyl, N. V. Organon, Netheland)을 주사하여 과배란을 유도하였다. 난자의 회수는 hCG 주사후 18~20시간 째에 생쥐를 도살하여 난관을 적출한 후, 실체현미경 (Kyowa Optical Co., Japan)하에서 28 gage needle을 사용하여 난관 팽대부로부터 난구세포에 둘러싸인 수정란을 회수하였다. 회수된 수정란의 난구세포는 300 unit/ml의 hyaluronidase (Sigma, U. S. A)가 함유된 배양액에 2분간 침지하여 제거하였다. BCF1 hybrid 생쥐의 수정란의 핵판

찰을 위해 12,000rpm에서 3분간 원심분리를 실시했다. 미세주입 DNA은 1991년 Yu등이 제작한 pChGH (Fig. 1)을 사용하였으며, Hogan등 (1986)의 방법에 따라 DNA을 정제한 다음 4~8g/ml 농도로 미세주입하였다.

4. 형질전환 생쥐의 분리 및 동정

고분자 DNA는 생후 4주경 산자의 꼬리를 1~2cm 절단후 Hogan등의 방법에 따라 추출하였으며 분리된 DNA는 EcoRI 제한효소를 이용해 완전히 절단후 Boehringer Mannheim사의 방법에 따라 Southern blot hybridization을 실시하였다. 이때 사용한 probe는 사람 성장호르몬 유전자의 1.2 kb puvII 단편을 glass powder법에 의해 분리정제후, dig-11-dUTP을 사용해 random primer법에 의해 dioxigenin labeling을 했으며, blotting detection은 dioxigenin antibody에 의한 nonradio법을 사용했다.

5. Radioimmunoassay (RIA)

생쥐 체중 10g당 0.5mg Entobar을 정상적인 생쥐와 형질전환 생쥐 (분만후 2일째) 복강내에 각각 주사하여 전신 마취를 유도한 다음, 4IU의 oxytocin(유한양행)을 피하주사한 후 유즙을 채취하였다. 채취한 유즙에서의 사람 성장호르몬의 농도 결정은 Nichols

Institutue사의 HGH 100T kit (Catalog No 40-2155)을 사용해 이원 임상 병리 센터에 의뢰하여 실시하였다. Assay는 2회 반복하여 측정하였으며, intra 및 inter GH 편차는 각각 2.8% 와 4.6%였다.

III. 결과 및 고찰

1. 형질전환 생쥐의 생산

염색체상에 인간 성장호르몬 유전자가 삽입된 생쥐를 생산하기 위하여 197개의 수정란에 미세주입하였다. 이중 172 (87.3%)개의 수정란이 생존하였으며, 이들 생존된 수정란을 가진 난관에 이식한 결과 43 (25%)마리의 산자를 얻었다(Table 1).

유전자의 도입에 의해 태어난 산자는 재료 및 방법에서 기술한 바와 같이 고분자 DNA를 추출하고 제한효소 EcoRI으로 절단한 후 Southern blot hybridization을 실시하였다. Fig. 2는 Southern 분석의 일부의 결과를 나타낸 것으로서 30마리의 산자중 3마리가 형질전환 생쥐로 판명되었다. 이들 결과는 Palmiter등의 mMT-I/hGH 유전자를 이용한 형질전환 생산효율보다는 저조하나 casein/hGH을 이용한 형질전환 생산효율과는 필적할만하다 (Yu 등, 1993). 이같은 형질전환동물의 생산효율의 차이는 사용된 유전자의 차이에 의해 기인한 것으로 사료된다.

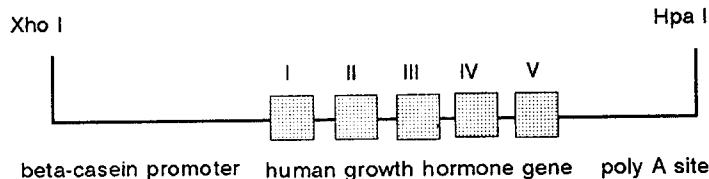


Fig. 1. Construction of the casein/hGH gene for microinjection

The 4.9kb DNA fragment for microinjection contains the 2.8kb rat beta casein promoter and 2.1 kb human growth hormone gene. For detail, see Yu et al.

Table 1. Production efficiency of transgenic mice with human growth hormone gene

DNA	No. of eggs	No. of offspring	No. of transgenic mice / No. of mice analyzed
Injected ChGH	172 (100%)	43 (25%)	3 / 30 (10%)

Fig. 2에서 나타난 바와 같이 형질전환 생쥐는 lane 2, 4, 5에서 약 2.2 kb의 예측된 위치에 사람 성장호르몬 유전자와 hybridization하는 밴드를 생성했다. 이들 형질 전환 생쥐 2 마리는 male이었으며, 한마리는 female이었다. 이들 형질전환 생쥐는 현재 2마리는 번식능력이 입증되었으나 한마리의 male은 교비능력(질전의 확인)에도 불구하고 sterile인 것으로 확인되었다. 이와 같은 결과는 형질전환 동물에 있어서의 불임은 혈중 GH 농도와 관련이 있다는 Reddy등(1991)과 Yu등(1993)의 보고와 일치한다. Founder 형질전환 생쥐에 있어서 인간 성장호르몬 유전자는 각각 1, 5, 15 copies가 염색체 상에 삽입되었음을 확인했다(Fig. 2).

2. 형질전환 생쥐에서 인간 성장호르몬 유전자의 유선조직 특이발현

형질전환 생쥐에서 도입된 인간 성장호르몬 유전자가 유선조직에서 특이적 발현을 지시하는지를 확인하기 위해 형질전환 생쥐의 유즙을 채취하여 hGH

radioimmunoassay를 이용했다. Table 2에 제시된 바와 같이 유즙에서의 사람 성장호르몬의 발현이 대조구에 비해 높은 비율로서 발현되었다. 이상의 결과는 rat WAP의 promoter을 이용하여 사람 성장호르몬을 유즙에서 410 ug/ml를 발현시킨 Reddy 등(1991)에 비해 매우 저조했지만, 동 그룹 및 Pittius

Table 2. Concentration of hGH in transgenic mouse milk

Transgenic line(sex)	concent.of hGH(ng/ml)
CG-2(F)	13.3
CG-4(M)	ND
CG-5(M)	ND
Control	3.0

ND: not determined. Milks were collected from lactating transgenic and control mice on day 1.5 after parturition. Milk samples from transgenic and control mice were diluted 5 times and 10 times in distilled water, respectively.

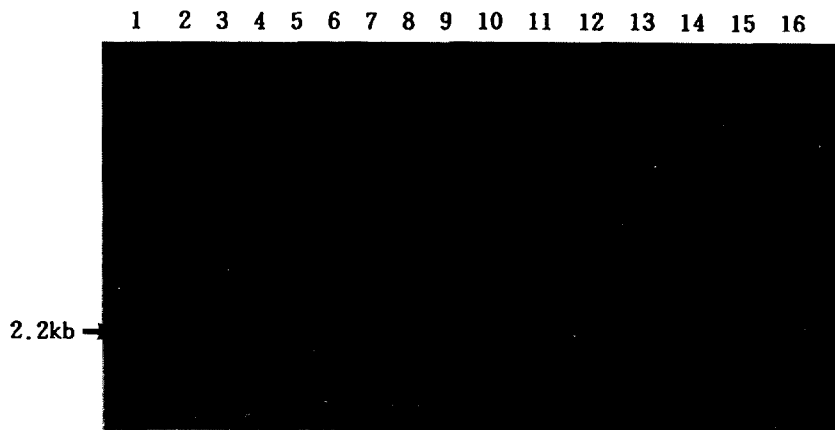


Fig. 2. Southern blot analysis to identify transgenic mice.

Genomic DNA was extracted from tails as described in Materials and Methods. Eight micrograms of genomic DNA was digested with EcoRI. A 1.2kb fragment unique of hGH gene for probe was digested with puvII. After electrophoresis on 0.8% agarose gel and blotting, the DNA was probed with 1.2kb dig labeled puvII fragment of hGH gene. Human GH transgenic mice displayed the specific band of 2.2kb fragment(lane 2, 4, and 5), while nontransgenic mice (lane 1, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) did not showed any other signals. Lane 13 was standard marker (λ /HindIII). Lane 14 and 15 were microinjected DNA(casein/growth hormone gene, 2ng) and pChGH plasmid DNA, respectively.

등 (1988)의 결과와는 필적할만하다. Reddy등의 결과에 비해 낮은 발현율은 plasminogen activity가 비유를 통해 유즙에서 크게 향상되었다고 보고한 결과를 고려하면, 분만후 2일째 회수한 유즙에서의 hGH농도는 비유기를 통해 크게 내인성 호르몬의 유도에 의해 향상되리라 본다.

IV. 적 요

본 연구의 목적은 형질전환동물 생산 기법을 이용하여, 유선조직에서 고품질의 인간 성장호르몬을 다량으로 생산하는 것이다. 유즙은 생리활성 물질의 정제가 간단할 뿐만 아니라 Biomedical material 생산을 위한 고 순도의 생리활성 물질 생산을 위한 기회를 제공한다.

성장관련 호르몬은 대장균이나 효모 등의 숙주를 이용하여 대량생산에 이용하고 있으나, 대장균에서 생산된 GH는 glycosylation이 일어나지 않아 생체내에서의 안정성이 결여될 뿐만 아니라 정제시 고도의 순도(99%)를 요구한다. 이와 같은 결점을 극복하기 위해 동물 세포를 숙주로 사용하여 품질좋은 순도의 제품을 생산할 수 있으나, 세포 배양은 단가가 높으며, 세포의 증식이 표면적에 의존하여 막대한 공간이 요구되며, 또한 serum의 사용에 의한 정제의 어려움이 있다.

따라서 본 연구에서는 랫트 β -casein promoter 유전자 (2.8kb)의 제어하에 인간 성장호르몬 유전자를 C57BL/6 \times CBA F1 hybrid의 수정란 전핵에 도입하여 3 line의 bioreactor 모델동물을 개발했다. 이 형질전환동물은 유선조직에서 분만후 1.5일경에 대조군에 비해 높은 인간성장 호르몬을 분비해 animal bioreactor 개발의 가능성을 강력하게 시사했다.

V. 인용문헌

1. Bartke, A., E. M. Naar, L. Johnson, M. R. May, M. Cecim, J. S. Yun and T. E. Wagner. 1992. Effects of expression of human or bovine growth hormone genes on sperm production and male reproductive performance in four lines of transgenic mice. J. Reprod. Fert. 95:109-118.

2. Brinster, R. L., H. Y. Chen, M. E. Trumbauer, M. K. Yagle and R. D. Palmiter. 1985. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:4438-4442.
3. Ebert, K. M., T. E. Smith, F. C. Buonomo, E. W. Overstrom and M. J. Low. 1990. Porcine growth hormone gene expression from viral promoters in transgenic swine. Animal Biotech, 1:145-159.
4. First, N. L. and F. P. Haseltine. 1991. Transgenic animals. Butter-Worth-Haimann Press. Stoneham, MA.
5. Gordon, J. W., G. A. Scangos, D. J. Plotkin, J. A. Barbosa and F. H. Ruddle. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77:7380-7384.
6. Gordon, J. W., P. J. Chesa, H. Nishimura, W. J. Rettig, J. E. Maccari, T. Endo, E. Seravalli, T. Seki and J. Silver. 1987. Regulation of Thy-1 gene expression in transgenic mice. Cell. 50:445-452.
7. Hammer, R. E., V. G. Pursel, C. E. Rexroad, R. J. Wall, D. J. Bolt, K. M. Ebert, R. D. Palmiter and R. L. Brinster. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. Nature. 315:680-683.
8. Hogan, B., F. Costantini and E. Lacy. 1986. Manipulating the Mouse Embryo. Cold Spring Harbor Lab. New York.
9. Iwakura, Y., M. Hayashi and M. Asano. 1993. Transgenic mice carrying interferon genes. Mol. Reprod. Dev. 36:245-247.
10. Jaenisch, R. 1988. Transgenic Animals. Science. 240:1468-1473.
11. Lee, K. F., F. J. DeMayo, S. H. Atiee and J. M. Rosen. 1988. Tissue-specific expression of the rat β -casein gene in transgenic

- mice. *Nucleic Acids Research*, 16:1027-1041.
12. Mathews, L. S., R. E. Hammer, R. L. Brinster and R. D. Palmiter. 1988. Expression of insulin-like growth factor I in transgenic mice with elevated levels of growth hormone is correlated with growth. *Endocrinology*, 123:433-437.
 13. Miller, K. F., D. J. Bolt, V. J. Pursel, R. E. Hammer, C. A. Pinkert, R. D. Palmiter and R. L. Brinster. 1989. Expression of human or bovine growth hormone gene with a mouse metallothionein-1 promoter in transgenic swine alters the secretion of porcine growth hormone and insulin-like growth factor-I. *J. Endocrinol.* 120:481-488.
 14. Naar, E. M., A. Bartke, S. S. Majumdar, F. C. Buonomo, J. S. Yun and T. E. Wagner. 1991. Fertility of transgenic female mice expressing bovine growth hormone or human growth hormone variant genes. *Biol. Reprod.* 45:178-187.
 15. Palmiter, R. D., R. L. Brinster, R. E. Hammer, M. E. Trumbauer, M. G. Rosenfeld, N. C. Birnberg and R. M. Evans. 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, 300:611-615.
 16. Palmiter, R. D., G. Norstedt, R. E. Gelinis, R. E. Hammer and R. L. Brinster. 1983. Metallothionein-Human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science*, 222:809-814.
 17. Pittius, C. W., L. Hennighausen, E. Lee, H. Westphal, E. Nicols, J. Vitale and K. Gordon. 1988. A milk protein gene promoter directs the expression of human tissue plasminogen activator cDNA to the mammary gland in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5874-5878.
 18. Pursel, V. G. and C. E. Rexroad. 1993. Recent progress in the transgenic modification of swine and sheep. *Mol. Reprod. Dev.* 36:251-254.
 19. Reddy, V. B., J. A. Vitale, C. Wei, M. Montoya-Zavala, S. L. Stice, J. Balise and J. M. Robl. 1991. Expression of human growth hormone in the milk of transgenic mice. *Animal Biotech.* 2:15-29.
 20. Snouwaert, J. M., K. K. Brigman, A. M. Latour, N. N. Malouf, R. C. Boucher, O. Smithies, and B. H. Koller. 1992. An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. *Science* 257:1083-1088.
 21. Simons, J. P., M. McClenaghan and A. J. Clark. 1987. Alteration of the quality of milk by expression of sheep β -lactoglobulin in transgenic mice. *Nature*. 328:530-532.
 22. Viotte, J. L., S. Soulier, M. G. Stinnakre, M. Massoud and J. L. Mercier. 1989. Efficient tissue-specific expression of α -lactalbumin in transgenic mice. *Eur. J. Biochem.* 186:43-48.
 23. Wagner, E. F., L. Covarrubias, T. A. Stewart and B. Mintz. 1983. Prenatal lethality in mice homozygous for human growth hormone gene sequences integrated in the germ line. *Cell*, 35:647-655.
 24. Wall, R. J., V. G. Pursel, A. Shamay, R. A. McKnight, C. W. Pittius and L. Hennighausen. 1991. High-level synthesis of a heterologous milk protein in the mammary glands of transgenic swine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:1696-1700.
 25. Watts, S. 1991. A matter of life and patents. *New Scientist* 12:56-61.
 26. Yamamura, K. I., F. Tashiro, S. Yi, S. Wakasugi, S. Araki, S. Maeda and K. Shimada. 1993. Transgenic mouse model for human genetic diseases. *Mol. Reprod. Dev.* 36:248-250.
 27. Yu, D. Y., C. S. Lee, J. Y. Kim and K. K.

- Lee. 1991. Synergistic action of glucocorticoid and insulin in expression of transfected rat β -casein promoter /human growth hormone fusion gene in mammary epithelial cell line. Mol. Cells. 1:459-464.
28. 유대열, 이철상, 강만중, 한용만, 이경광. 1993. 사람 성장호르몬이 유선조직에서 특이적으로 발현되는 형질전환 생쥐의 개발. 한축지. 35(1):32-38.