

형질전환 동물(Transgenic Animal)

박 재 학

성장호르몬을 과발현시켜 만든 거대한 transgenic mouse의 사진이 1982년 Nature誌의 표지에 실렸는데 이것이 분자생물학에 있어서 하나의 이정표가 되었다. Transgenic animal을 생산하기 위한 기법은 수십년간 쌓은 수많은 원리들에서 근간이 되는 이론을 발견하고 이들을 합하여 가능하게 되었다. 이러한 새로운 발견들은 포유류에서의 번식에 대한 호르몬 조절, 난자와 초기 배자의 채취, 조작, 재이식기법 즉, 오늘날 전세계적으로 시험관내 수정으로 이용되는 그런 기법들의 발달에 중요한 통찰력을 갖게 하였다. 또다른 중요한 발달은 DNA재조합기법의 사용으로써, DNA를 분리하고 특성을 알아내어 그 분절을 실제로 어떠한 모양으로도 자르고 붙일 수 있게 된 것이다.

비록 형질전환기법이 몇몇(면양, 소, 산양, 닭, 물고기)에 적용되고 있지만 마우스가 아직까지 가장 성공적이고 널리 사용되는 종이다. 이러한 형질전환 방법의 변형으로 지금은 내재성 유전자 발현의 파괴 또는 Knock-out을 응용하고 있다. 현재 트랜스제닉 마우스는 방법론이 진보되어, 기본적으로 보통 실험실에서도 가능하게 되었다. 연구방법론은 모두 일상화되었으며 기술론도 technician 수준에서 행하여지고 있다. 여기서는 작제법의 상세한 부분을 설명하는 것은 의미가 없기때문에 어떻게 transgenic animal이 생산되고 생의학적 연구에 사용되는가를 설명한다.

Transgenic animal을 생산함에 있어 첫번째 단계는 전달될 DNA(transgene)를 설계하여 원하는 유전자 산물을 원하는 위치에 발현하게 하는 것이다. 이 단

계에는 일반적인 DNA재조합기법이 이용된다. 전형적인 transgene에는 관심의 대상이 되는 유전자에 상응하는 nucleotide 서열은 물론 그 유전자의 효과적인 발현에 필요한 모든 요소 즉, 전사-시작 부위, 5' 비해독 부위, 해독-시작 codon, coding 부위, stop codon, 3' 비해독 부위, polyadenylation 부위가 포함된다(그림 1).

Transgene의 중요한 요소는 전사를 유도하는 촉진자(promoter) 또는 조절부위이다. Transgene은 β -actin이나 SV40 T antigen같이 전신조직에 발현되는 유전자의 promoter를 이용하여 Transgenic animal의 각종 조직에서 발현될 수 있다. 한편 조직특이 promoter를 이용하여 transgene이 특정위치에서 발현되게 할 수 있다. 지방세포에서의 선택적인 발현은 지방세포 P2 promoter로 가능하고, 근육에서의 발현은 myosin light-chain promoter를 사용함으로써 일으킬 수 있으며, amylase promoter는 선방샘장에 국한되어 발현시키며, insulin promoter는 β -cell에 전달된 유전자를 발현시킨다.

Transgenic을 마우스 유전자(genome)에 도입하려면 수정된 마우스 난자가 필요하다(그림 1). 암컷 마우스에 gonadotropin(일반적으로 PMSG와 HCG)을 주입하면 과배란을 유도하여 수컷과의 교배후 난자를 채취할 수 있다. 이 수정란을 첫 분할전인 다음날 오후에 채취하여 petri dish에 옮긴다. 수정란의 채취를 할 마우스계통은 실험목적에 따라 결정해야 한다. 근교계가 필요하면 C57BL/6 마우스나 C3H 마우스가 좋다. 그렇지 않은 경우는 교잡계인 BDF1이 수정란의 수도 많고 적당하다.

교미한 암컷 마우스의 좌우 난관을 일부의 자궁과 함께 수정란을 적출한다. 그후 27G의 주사침으로 난

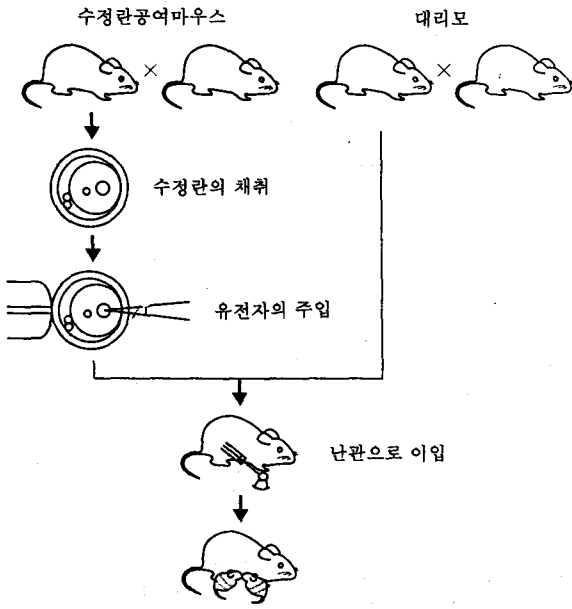


그림 1. 트랜스제닉 마우스트랜스제닉마우스의 작제법.

Promotor	5'UT	Coding region	3'UT	3'Flanking region
----------	------	---------------	------	-------------------

관팽대부를 자궁측으로 부터 잘라들어가서 난관속의 수정란을 덩어리로 방출시킨다. 채취한 수정란을 Hyaluronidase에 넣어 CO₂ 배양기에서 배양한다.

유전자 주입을 위해서는 micromanipulator를 설치한 도립현미경이 필요하다. Micromanipulator에 주입 또는 보정용 피펫을 접속한 홀더를 셋트한다. 현미경에서는 Nomarski 미분간섭 장치나 호프만 분해장치를 붙여 전핵의 위치를 정확히 파악할 수 있도록 한다. 실험자는 200배의 쌍안현미경 하에서 조작을 실시한다. 수정란을 담은 페트리 디쉬를 현미경에 올려놓고 보정용 피펫에 음압을 걸어서 수정란을 고정한다. 설계된 DNA(보통 완충액 2pl당 약 100~200copies)를 미세한 유리바늘을 이용하여 수컷의 前核(pronucleus)에 미세주입한다. 이 전핵은 난자의 핵과 융합전에 정자로 부터 유래한 것이다. 수정란의 직경은 70 μ m이고, 유리바늘은 0.75 μ m이다.

주입하여 살아남은 수정란은 2세포기까지 배양하여 수정란을 채취한 마우스와 같은날 교미한 위임신 마우스의 난관내에 이입한다. 마우스의 경우, 성주기는

4일이며, 교미 signal에 따라 임신상태로 들어간다. 이 상태가 7일 전후로 지속된다. 위임신 마우스를 마취시키고 신장의 뒷쪽 부분의 피부와 근층을 절개하여 난소와 난관을 체외에 노출한다. 난관과 난소를 덮고 있는 난소막을 핀셋으로 찢고 난관구를 찾는다. 한편 수정란을 이입용 피펫에 약 10개 흡입하여 그 피펫의 선단을 난관구에 삽입하여 수정란을 이입한다.

대리모로는 ICR계 마우스와 같이 산자수가 많고 새끼를 잘 기르는 계통으로 10주령 이후의 암컷을 사용한다. 1마리에 보통 약 20개의 DNA 주입난자를 이식하는데 처리하는 난자의 수를 고려하여 동물을 충분히 준비해 둔다. 위임신 마우스는 미리 정관결찰을 해둔 수컷과 교배시켜 질전을 확인한 것을 사용한다. 난관이식 경우에는 주입 직후의 1-cell인, 다음날 2-cell의 경우에서도 질전을 확인한 날에 이식한다. 이 기술도 난관체의 확보나 난자를 주입하는 피펫의 굵기의 조절 등 다소 숙련을 필요로 하는데 다른 마우스로 충분히 연습을 하고 질전에 들어간다.

DNA주입 난자를 이식한 대리모의 출산예정일은 질전을 확인한 날을 1일로 하면 29일째이다. 착상한 태아수가 많으면 문제가 되지 않지만 산자수가 1~3마리 정도의 경우, 어미가 기르지 않고 잡아먹는 수가 있다. 그래서 꼭 출산예정일이 정상임신 암컷을 대리모로 하여 준비해두고 임신에 의한 복부의 팽창이 약한 대리모는 20일에 제왕절개로 출산시켜 새끼를 대리모에 붙여주는 것이 바람직하다.

일반적으로 주입된 수정란의 15~30%가 유지되고 다시 이 중의 10~20%가 마우스 DNA에 삽입된 transgene을 갖는다. 이런 형질전환 새끼를 탄생한 후 3주령 이상으로 성장하는 것을 기다려 꼬리를 약 3cm 절단 채취하여 게놈 DNA를 추출한다. Southern blot이나 PCR로 그 transgene에 대한 마우스 genomic DNA를 동정한다. 대개 transgene의 1~200copies가 두 미방향(head-to-tail)으로 마우스 genome의 임의의 단일 부위에 삽입된다. 주입과 삽입은 첫번째 세포분열전에 일어나기 때문에 그 새끼들의 모든 세포(배아세포 포함)는 주입된 transgene에 대해 heterozygous하다. 트랜스제닉 마우스인 것이 확인된 마우스는 곧 도입유전자의 영향에 대하여 검토를 해도 좋지만 통상은 동계

통의 정상 마우스와 교배시켜 후대에 도입유전자가 전달된 것을 확인한 후 그 F1(Tg/-)을 사용하거나 또는 F1을 형태교배시켜 얻은 Transgenic mouse의 homozygous (Tg/Tg)를 사용하여 검토한다. F1에서도 도입유전자의 발현은 보이지만 homozygous인 경우가 보다 안정적인 발현이 얻어진다.

Transgene의 발현수준은 동물에 따라 크게 다른데 여러가지 요인 즉, promoter의 내인성 효율, 삽입된 유전자의 copy수, 삽입부위에 의존한다.

일단 transgene의 발현이 확증되면 heterozygous한 새끼는 비형질전환 마우스와 교배되고 그들의 heterozygous한 새끼들을 서로 교배시켜 homozygous한 마우스를 만든다. 이 동물들로서 형질 전환계가 확립된다. 한편 다른 삽입위치에 다른 수의 transgene copy를 갖는 형질전환계를 생산하여, 주어진 표현형이 실제로 transgene의 과발현에 의한 것이며 조직상의 실수에 의한 것이 아니라는 것을 확실히 하기 위해 조사한다.

Transgenic animal은 질환모델 개발과 새로운 치료법의 검증에 이용되고 있다. 예를 들면 β -amyloid 단백질 전구체 유전자 (APP 유전자)의 변이형을 과발현하도록 조작된 형질전환동물은 Alzheimer병 환자의 증상과 유사한 신경병리 변화를 보인다. 이 모델은 지금까지 논란의 대상이었던 Alzheimer병의 발달에 APP 유전자의 일차적 기능을 보여주는 것이다. 또한 Alzheimer병의 예방 또는 지연에 대한 방법을 검사할 기회를 마련하는 것이다.

세포독성분자를 발현하는 transgene(소위 toxigene)은 특정조직을 제거하는데 사용되고 있다. 그런 모델의 하나로 갈색지방조직에서 특이적으로 발현되도록 하는 promoter의 조절하여 diphtheria 독소에 대한 유전자를 갖는 transgene이 생성되었다. Diphtheria 독소의 발현은 그 조직에 제거를 유발한다. 이런 동물은 매우 비만해지고 열발생에 결함을 갖는다. 이 결과는 에너지 균형조절에 있어 갈색지방이 중요한 기능을 함으로 지지해주는 것이다. 또한 인슐린 저항성과 당뇨병이 있어 비만, 인슐린 저항성, glucose tolerance 사이의 관계를 연구하는 좋은 모델동물이 될 수 있다.

화학독소에 의해 유발된 DNA 손상의 정도(변이원

성)을 알 수 있는 확실하고 새로운 동물모델이 개발되고 있다. 이 모델은 LacZ를 발현하도록 되어 있는데 이는 세균효소의 일종으로 그 활성은 간단한 발색검사로 *in vitro* 측정할 수 있다. LacZ 형질전환 마우스는 잠정적 변이원에 노출된 후 조직을 수거하여 조직으로부터 DNA를 분리하고, LacZ transgene을 plasmid vector에 cloning하여 세균에서 발현시킨다. LacZ transgene에서 변이의 빈도는 LacZ 활성이 결여된 세균의 군수에 해당하는데 *in vivo*에서 주어진 화학물질의 변이원성에 관계된다. 이 모델은 독성학, 발암성 연구, 여러 질환에서 DNA 손상과 복구의 기능연구, 정상적인 노화연구에 중요하게 응용될 수 있다.

이상의 것들은 생의학 연구에서 형질전환 모델의 응용의 일부에 지나지 않는다. 이들은 여러 질병에서 특정분자에 관한 연구와 새로운 치료법 개발을 가속화할 수 있는 동물모델 생산에 대한 DNA 재조합기법의 생체내로의 확장의 길을 열어 준다. 형질전환기법은 사람의 체세포 유전자 치료에 대한 새로운 길을 열어줄 것이다.

Tg 기술의 문제점

마우스는 Transgenic animal 작출효율은 유전자 도입 난자에 대하여 2~4% 정도인데 돼지나 양 등의 가축에서는 더욱 그의 수분의 1로 떨어진다. 특히 양, 염소, 소 등의 단태동물에 Transgenic animal을 작출하는 경우, 1두의 대리모가 출산하는 산자수는 1~2두에 그치기 때문에 현재의 효율로는 1두의 Transgenic animal을 얻는 것에 매우 많은 수의 동물이 필요하다.

전핵내에 주입된 외래유전자가 어떤 메카니즘으로 염색체에 들어가는 가는 현재 확실하게 알려져 있지 않다. 같은 유전자로 복수의 Transgenic animal을 작출해도 대부분의 경우 각각의 발현의 정도는 틀리다. 그것은 도입된 유전자의 copies 수와는 관계가 없고 도입부위에 의존한다고 추측되고 있다. 이 현상은 position effect로 불리고 있다.

따라서 Transgenic animal 동물을 1두 작출하는 것으로 도입유전자의 효과를 판단하는 것은 위험하며

여러마리를 만들어 발현되기 쉬운 영역에 도입된 개체를 선택하고 필요하면 라인화하여 검토해야 한다.

지금까지의 보고로부터 일반적으로 거론되고 있는 것이지만 구조유전자에 cDNA를 사용하든지, 프로모토에 별종의 생물의 유전자나 동종이라도 비상하게 짧은 영역밖에 사용하지 않았던 경우 등에 position effect나 DNA의 메틸화 등의 염색체내 수식을 받기 쉬운 것으로 나타났다.

안정된 발현을 얻기 위하여는 구조유전자에는 인터론을 포함한 genomic DNA를 또 프로모터에는 동종 또는 근연종의 것에 가능한한 긴 영역을 사용하는

것이 좋은 것으로 보고되고 있다.

최근 YAC(Yeast Artificial Chromosome: 효모 인공 염색체)를 이용하여 크로닝한 수백 kbp에 달하는 크기의 유전자를 그대로 도입하면 position effect가 나타나지 않는다는 실험결과가 보고되어 주목받았다. 이 방법에 의하면 도입유전자가 어디에 들어가도 안정한 발현이 copies 수에 따라 얻어진다고 한다. 이와 같이 전핵에 유전자를 도입하여 형질전환 동물을 작출하는 금후의 문제점은 도입유전자의 발현과 염색체내에의 삽입효율의 개선이다.

대한수의사회지 합본판 배포 안내

본회에서 발간하는 대한수의사회지의 연도별 합본판을 한정판으로 제작하여 회원들에게 실비로 배포하고자하니 관심있는 회원님들의 많은 참여를 기대합니다.

합본판 현황

발간년도	발행부수	잔여부수	발간년도	발행부수	잔여부수	발간년도	발행부수	잔여부수
1977-78	7	3	1986	10	5	1992	29	20
1979-80	9	5	1987	10	5	1993	29	14
1981-82	9	5	1988	14	9	1994	29	14
1983	10	5	1989	11	5	1995	29	13
1984	10	4	1990	19	11			
1985	10	5	1991	19	11			

공급가격 : 15,000원/합본 권당(발송비용 포함)

(송금후 발송처를 통보하여주시기 바랍니다.)

송금구좌 : 은 행 명 : 농협중앙회 신촌지점

구좌번호 : 037-17-001052

예 금 주 : 대한수의사회