

제 9 회 세계홀스타인
후리지안 회의 시리즈 VIII

1. 유전자 변환 (Transgenec)젖소의 작출

카제인(casein) 유전자의 기능조
절 영역을 이용한 유용단백질 또는
기능개선 단백질의 생산

Herman de Boer 박사
<네덜란드 라이덴 대학 화학부>

우리들의 연구팀은 세계 최초로 Transgenec(유전자 변환)유우의 작출에 성공하고 이것을 「Herman」이라 이름 붙였다. 이 성과는 라이덴대학과 우리들 저자등에 의해 설립되어진 Bitech회사, Genepharming BV의 많은 전문가들의 노력한 결정체였다. 1989년에 생산된 Transgenec 수소는 사람의 락토페린(Human lactoferrin)의 일종의 변이체(變異體)를 Code(부호)로 한다. cDNA(messenger-RNA를 주형(鑄型)으로 하여 인공적으로 만들어진 DNA)구조를 작고 있고 도입되어진 트랜스진(Transgen)의 일부를 이룬다. 「소 α s1 Casein promoter」의 제어

하(制御下)에 있다. 이 수소를 아비로 하는 자우(子牛)가 몇마리 얻어져 있고, 이들의 낱우의 유즙에는 hLF(human lactoferrin)의 성분이 나타난 것을 확인하였다. 그 후 Janne 교수를 지도자로 하고 필렌드의 연구진이 세계에서 두번째로 Transgenec 자우(子牛)의 작출에 성공하고 이것을 「Hermen」이라 이름 붙였다. 이 Transgenec 자우는 같은 casein 유전자의 제어영역(制御領域)의 하에, 체액성 조혈인자(體液性造血因子) cDNA를 갖고 있다. 1995년에 Genepharming사는 같은 모양의 유전자 제어영역을 가진 Genom구조를 갖춘 수소 2두와 암소 1두의 Transgenec 자

우의 작출에 성공하였다. 생산될 모든 Transgenec소에 예상대로 높은 유전적 발현(發現)을 달성하기 위해서는 Casein유전자좌내(遺傳子佐內)의 유전자를 지배하는, 제어영역에 관한 기본적 식견(知見)이 불가결하다. 이와같은 이치로 Casein 유전자좌의 전체 유전자지도(地圖)가 작성되어 4개의 전유전자 전사(轉寫)방향이 결정되었다. 실험용 쥐(mouse)에 있어서 Transgen으로서의 독특한 casein유전자의 유전적 발현(發現)에 관한 연구도 개시되었다.

Transgenec자우의 작출의 효율에 대하여는 종래 몇개의 보고가 있으나 작출과정의 여러 가지 단계에서 상당의 소모가 있기 때문에 대체로 효율이 낮다. 이때까지의 결과에서 작출의 절차방법에 관해 유의(有意義)한 개선을 보았다는 보고는 없다. 그러나 여하한 기술에 있어서도 더욱 발전을 계속할 것이므로 우리들은 소의 형질전환(形質轉換)에 관한 전반적 효율도 그동안에 개선되어져 갈 것이라고 확신하고 있다. 그 결과로서 낙농, 식량생산, 제약의 각 업계는 그 발전으로 부터 혜택을 받을 것이다. 본고에 있어서는 전술의 각 분야에 있어서 성과의 몇가지에 대하여 간결하게 나열해 보고자 한다.

○ **의학적(醫學的)으로 관련이 있는 단백질의 합성(주어진 단백질의 생합성)에 어떤 system를 사용할 것인가.**

생물학적으로 중요한 몇가지의 단백질이

Transgenec의 DNA의 수법을 사용하여 행해왔다. 이 합성의 목적에 세균, 효모, 균류, 포유류의 세포배양이 사용되어 왔다. 일반적 원칙으로서 특수한 번역후에 수식을 요하는 복잡한 단백질(조직형, 프라스미노겐부활체(購活體), 에리드로 포이에틴, 제Ⅷ인자와 같은)은 포유류의 세포배양의 속에서 만들어 왔으나 비교적 단순한 단백질(insulin, 성장호르몬 사이드카인과 같은)의 합성에는 세균이다. 효모의 발효 system이 사용되어 왔다. 그러나 이들 두가지 방법의 사이에는 단백질 생산의 효율과 생산량이라고 하는 점에서 큰 차이가 있었다. 즉 세균이나 효모를 사용하는 system은 포유류의 세포배양에 의한 방법에 비해 훨씬 우수하다. 더불어 포유류의 세포배양에 의한 생산 system은 높은 비용의 혈청, 설비, 전문적인 노력, 정교하고도 고가의 QA/QC system을 필요로 한다.

최적의 유전적 발현 system의 선택은 첫째로 어떠한 단백질이 생산되어질 필요가 있는가 하는 점에 달려있다. 가령 특이적(特異的)인 생물학적 및 영양학적 성질에 의한 경구처리(經口處理) (자주 「nutraceutical proteins」로 칭하여 진다)는 그 분자적 복잡성과의 관계 없이 때로는 특수단백질의 대량 처리를 필요로 할 것이다. 이와같은 경우 후술하는바와 같이 Transgenec 유우의 유증에 의한 생산이 특히 적합하여 있다. 원료만에 한정된 생산 cost의 점에서 보면 균적(菌的) 혹은 효모적 system이 선택될 것이다. 그러나 세균적 system은 GRAS(Generally Regarded

As safe : 안전하다고 하는 식품 첨가분의 표시로서 FDA에 의해 사용된다)와 검은 도장 색이 찍힌 미생물은 제외하고 영양적 기능을 갖는 단백질의 생산에는 부적당하다. 이 문제를 해결하기 위해 즉 대량 저 비용 단백질의 생산, 특히 경구적으로 투여할 수 있는 단백질을 생산하기 위해 우리들은 신기(新奇)한 단백질 생산 system, 즉 유우의 유선(乳腺)을 이용한 생산 system을 개발하였다.

○ 발현 System으로서의 유선(乳腺)

여러가지의 포유동물의 유선내에 있어서 이종(異種)의 단백질을 생산하는 일이 될 수 있다고 하는 보고는 현재까지 수 많이 있다. 경구적으로 투여되는 것이 필요한, 혹은 특정의 단백질을 대규모로 생산하기 위해, 유우의 유선을 이용하고자 하는 생각은, 유우의 젖은 경제적으로 아주 값이 싼편이고 또 풍부한 단백질을 조성기관(造成器官)이라는 사실에 연유한다(표1참조)이 유우의 특성은 유우의 유선에는 용적이 큰 단백질 합성조직과 분비조직(分泌組織)이 있고 또 유우는 발효system에 비하여 사료 및 유지비가 싸고, 특히 세포배양system에 비교하였을 때 더없이 현저히 이 특성이 발휘되어지기 때문이다. 또 유전적 발현system으로서의 유선은 본래 경구적으로 투여되며 사람의 위나 장의 관내(管內)에서 기능(機能)하는 단백질의 생산에 아주 적합한 것이라는 것이다.

단백질 처리과정에 관계되어 오나 형질전환

유우의 유량에 새로운 단백질의 생산에는 대개의 다른 종류인(異性的) 단백질은 casein을 간단한 산성 또는 기모신 처리에 의해 응고시킬 때에 분획(分割)중에 남는다고 하는 잇점을 갖고 있다. 이와같은 정제법(精製法)은 발전도상국에 있어서도 또 간단하고도 계량적(計量的)인 수법에 의해 쉽게 규모확대가 된다. 결국에는 방법과 설비는 세계의 낙농계에 공통되는 것이다.

많은 생물학적(Biomedical) 및 또는 영양학적 단백질이 유전자공학적으로 유용가축(乳用家畜)의 유선을 이용하여 생산하는 후보(候補)로서 생각되어진다. 양이 많고 더우기 저비용인 것이 명백하게 그 후보로 된다. 표1에는 그들의 후보단백질을 게시함과 함께 그것을 소비하여 주는 시장의 크기와 동량의 단백질을 얻기 위하여는 필요한 사람의 혈청(血清)의 량을 나타내었다. 그러나 단백질의 생산방법의 선택에 대하여는 이것을 생체의 유선을 활용하여 행할 것인가 아닌가는 여러가지 경제적, 기술적 요인에 의해 결정되어진다. 더욱 그 경제적 조건을 고려할 경우 그 지역에 암컷의 기반적 구조에 힘입는 바가 클 것이다. 이와같은 의미로 세포배양에 근거한 생산방법과 형질전환기술에 의한 생산방법의 어느쪽을 택하는가를 결정함에 있어서 고려하여야할 조건은 발전도상국과 선진국에서는 자연히 달라질 것이다. 이것은 양적으로는 적고 고가인 단백질의 경우에는 특히 현저할 것이다. 앞에서 설명한 바와 같이 단백질은 선진국에 있어서는 일반적으로 세포배양 발효system를 갖춘 공장에서 행

하여진다. 그와같은 생산system은 고도의 기술과 충분히 훈련되어진 전문의 지도자를 필요로 한다. 발전도상국에 그와같은 세포배양 발효system을 설치하는 것은 기술적, 경제적 관점에서 어려울 뿐만 아니라 적당한 기능을 가진 인재를 확보하는 문제등으로 제약을 받으므로 극히 곤란할 것이다. 그러므로 발전도상국에 있어서는 「바이오리악타」로서 형질변환 동물을 사용하는 것을 고려하는 편이 좋을 것이다.

관계되는 「바이오리악타」는 그 자손축을 증식하는 일에 의해 스스로 갱신하고, 증식하여 가기 때문이다. 단지 이 방법은 최초의 시작의 시점으로, 즉 형질전환의 기초축을 만드는 시점에서 고도의 기술이 필요하다. 일단 만들어져 버리면 변환된 유전자는 단순한 mendel식 유전에 의해 자손에 유전되어 간다.

(표1) 표에 나타낸 각 생물의학적 단백질의 필요량을 생산하기 위해서 필요한 암소의 두수의 추정과 동량의 단백질을 얻기 위해서 분리 확보할 필요가 있는 사람의 혈청의 양과의 비교

	1년당의 미국시자의 추정치 a	유집중에 발현수준 (g/l)	필요한 암소 발현수준 ① 유량 10000 l/년	사람의 혈청중에 함유량	분리확보 되어질 사람의 혈청 중에 증가량 b
제 VII 인자	—	—	—	0.5mg/ml	—
제 VIII 인자	120 g	0.01	1.2	0.1mg/ml	1.2×10^6
제 IX 인자	—	—	—	5ml/l	—
Protein(단백질) c	100kg	0.1	100	5ml/l	20×10^6
휘브리노겐	200kg	1.0	20	4 g/l	0.5×10^6
ATIII	800kg	1.0	80	0.2 g/l	4×10^6
알부민(albumin)	100,000kg	2.0	5,000	50 g/l	2×10^6

(주) (a) 유럽 및 아세아의 환경에서도 거의 같음 (b) 100% 회수에 근거하여 계산

결론으로서 저비용의 생물의학적 단백질을 대량으로 생산하는 경우에는 유용가축의 유선을 사용하는 생산방법이 발전도상국 및 선진국의 쌍방에 있어 경제적으로 매력적이라고 하겠다. 원재료의 생산현장에서는 고도에 기술을

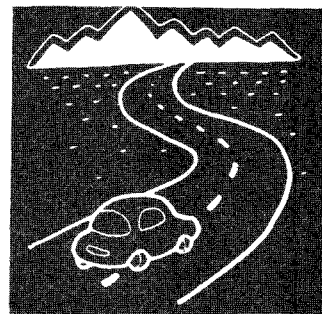
필요로 하지 않는다. 더하여 영양원(營養源)으로되고 경구적(經口的)으로 섭취되어지는 생물의학적 단백질의 경우 많은 우유를 분비시켜서 이를 만들면 거의 또는 전부를 정제할 필요가 없다. 낙농업계에서는 일반적으로 행하여

지고 있는 방법과 서로 엮어서 단지 유장(whey)을 농축하는 것만으로 족할 것이다. 합성단백질의 미소불균일성(微小不均一性)에 의한 오염의 정도도 세포배양system에 의해 제조한 단백질에 비해 현저히 낮다.

○ 암소의 경우

형질전환의 기법(技法)에 의해 유전자 공학적으로 단백질을 만들 경우, 어떤 종류의 가축을 선택할 것인가를 결정할 때에는 임상전(臨床前)시험 및 임상시험에 사용할 단백질을 충분히 확보하는 일이 필요하고 그 때문에 얼마간의 기간이 소요될 것인가를 알아두는 것이 중요하다. 경우에 따라서는 그와같은 시험을 위해 100kg정도의 단백질이 필요하게 된다. 이것을 감안하여 또 단백질에 대한 장래의 수요에 대한 것을 고려에 두는 때에 아주 바람직한 가축은 암소가 될 것이다. 그 이유는 형질전환의 기초 축 즉 F0세대, 그것이 관계되는 물질의 제조기로서 쓸 수 있기 때문이다. 다른 종의 가축의 경우에는 세대간격이 짧기는 하나 비유자축들이 100kg정도에 단백질을 만들 수 있도록 하고자 하면 F1세대 혹은 경우에 따라서는 F2세대 까지도 번식하지 않으면, 이것을 잘 처리할 수가 없기 때문이다(표2참조) 더욱 현대의 낙농장 관리의 높은 효율에 수반하여 암소는 기존에 인공수정이나 수정란이식 기술을 가미한 자연교배 번식법으로 쉽게 증식시킨다. 단백질

의 생산 비용에 관한한 경우 1두의 암소만으로 1g당 0.01불(미화)에 가까운 생산비용로 340kg의 단백질(주로 casein)을 생산할 수가 있다. 대규모적인 단백질 생산을 위해서는 타 가축을 사용할 수가 있으나 어떤 종의 가축을 사용하는 것이 적절한가의 최종 선택을 좌우하는데 다른 요인이 많이 있다. 가령 사용할 단백질의 type이 그것이다. 우유는 유아용 조제유에 있어서 사용되는 단백질의 생산에 제일 적합하다. 이렇다고 하는 것은 암소의 젖은 관계되는 조제유의 제조에 이미 사용되고 있기 때문이다. 그러나 가령 관계되는 단백질의 생산을 위해 암소와는 다른 종에 가축을 쓴다고 하게되면 규제당국의 인가를 필요로 하는 외에 신기(神技)한 단백질 그 자체에 대한 소비자의 수용을 필요할 뿐만 아니라 출발의 재료로서 다른 형의 단백질을 사용하는데 대하여 승인이 필요하게 될 것이다. 유아용 조제유가 소비자로부터 용인된 실적에 입각하면 가령 산양이나 돼지의 젖을 얻어낸다는 것은 아주 힘든 일이 것이다.



〈표 2〉 여러가지의 포유동물에 있어서 생의학단백질 100kg을 생산하기 위해서 필요한 비유개체의 필요두수의 추정 : 1g/ℓ의 발현수준을 상정

	시험용 쥐	토끼	돼지	산양	양	소
1년/두당 생산유량(단위 : ℓ)	0.02	50	250	400	500	10,000
100kg의 단백질의(1g/ℓ) 생산에 요하는 두수	5.8×10^6	2000	400	250	200	10
란모세포에의 유전자주입부 터 최초의 비유까지의 기간	14주	17주	12월	12~18월	12~18월	19~29월

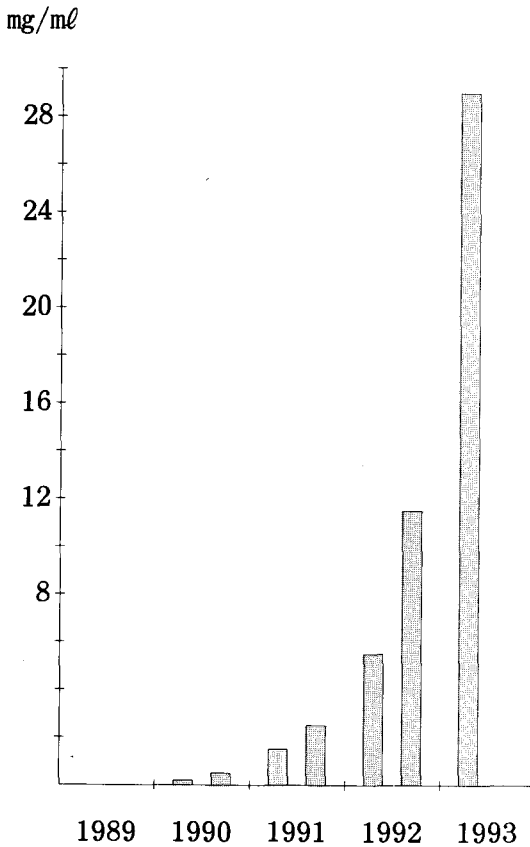
○ 생유중의 casein함량을 높이고 혹은 casein의 1차구조를 변경하는 수단으로서의 유우의 유전적 개조

사람의 genom 유래의 락토펜 유전자는 형질전환 쥐의 젖 생산량을 더없이 고농도로 발현시킬 수가 있다 : 30mg/ml를 넘을 수 있는 정도에 농도가 얻어졌다.(그림1참조) 그러나 기초 쥐들간의 발현수준은 크게 달라지고 일부 mouse(시험용 쥐)은 전혀 발현(發現)하지 않는다. 전환유전자 유용자우(子牛)의 작성에 막대한 비용과 많은 노력이 경주되어진 일에서 보아서도 그것이 쥐이든지, 소이건 모든 기초축은 문체의 외래 유전자가 고수준으로 발현되어야 한다는 것이 대단히 중요하다. 빼놓을 수 없는 것은 먼저 첫째로 genom유래의 유전자구조체의 사용이라는 것과 즉 인토론의 일부 혹은 전부를 가진 유전자의 사용, 둘째로는 형질전환 유전자에 대해 유전자의 삽입위치와 독립의 복사(copy)수 의존성의 발현수준을 수여

(授與)할 수 있는 제어요소(制御要素)를 사용하는 일이다. 이것은 현재는 casein의 제어요소의 경우에는 불가능하다. 이것은 단순하게 casein의 유전자좌에 관한 식견이, 가령 사람의 globin유전자의 유전자좌(遺傳子佐)에 비하여서도 너무나도 적다고 하는 현상이기 때문이다. 이것을 성취하기 위해서는 casein의 유전자좌의 전체를 지배하는 소위 우세한 제어영역의 장소와 특성을 확인할 필요가 있다. 그러므로 소의 casein유전자좌의 모든 유전자 및 유전자내 영역이 분리되어 전유전자좌의 지도(前遺傳子佐地圖)가 결정되었다. 중요한 제어요소의 탐색을 개시하고 그들의 생체내 작용을 이해하고자 하는 일을 시작하기 위해서는 개개소 casein유전자가 쥐에서 전환 유전자로 발현되었다. 이 일이 완료하고 각 유전자에 직접 작용하고 전유전자좌를 통솔제어(制御)하는 제어인자가 확인되어진 후에 「Herman」이나 「Huomen」을 만들 때에 사용한 수법과 같은 수법을 사용하여(일부수정었다) Casein

유전자를 소의 genom의 속에 돌려 넣을 수가 있을 것이다.

〈그림1〉 Transgenic mouse의 유집중에 포함되는 사람의 락토페린의 함유량



(유전자 Cloning 구조체의 구성)

(최초의 변환 쥐 제1세대의 변환 쥐)

(다음세대의 cDNA 구조체 genom 구조체)

○ 소의 casein 유전자좌 전체의 지도 (地圖)

우유중에는 네종의 casein(α s1-, α s2-, β

및 K-casein)이 있고 그들은 각각 1개의 유전자에 의해 code 되어 있다고 하는 것이 확인되었다. 또 이들의 각각에 몇개의 변이체(變異體)가 있다고 보고되어 있다. casein 유전자는 6번염색체의 하나의 부위에 존재하고 있고 그들의 전반적인 구성은 생물종간(生物種間)에 보존되어 있다.

칼슘에 감수성이 높은 casein(α s1-, α s2-, β)을 분류하는 3개의 유전자는 1개의 공통의 조상유전자로 부터 내부중복(內部重複)과 유전자변환(變換)에 의해 생긴 것이며 또한 5'측의 비번역영역(非翻譯領域)의 근위단(近位斷)에 공통의 제어특색(motif)이 존재하고 있다. 그러나 K-casein 유전자는 타 casein 과의 다른 구조를 갖고 있다. casein의 4개의 모든 유전자는 조직이나 비유기에 특이적으로 암소에 높은 수준으로 발현(發現)한다. 근년에 많은 연구가 개개의 casein 유전자의 촉진물(promoter)영역에 위치하고 있는 제어인자의 확인과 특성 파악에 초점을 맞추어 행하여져 왔다. casein 유전자의 5'비번역영역은 유전에 대하여 casein 유전자의 발현을, 어떤 경우에는 이종(異種) 유전자의 발현을 명령할 수 있는 일을 할 수 있다. 그러나 고수준에 삽입위치와 독립의 유전적 발현을 주어줄 수 있는 일을 할 수 있는 우세제어영역(優勢制御領域)은 이때까지 조사되어진 casein 유전자의 근방(近傍)에 비번역영역에는 위치하고 있는 것 같이 않다. β -globin 유전자좌에 유의하여 그와같은 우세제어 요소는 당해 유전자좌의 어딘가의 다른 장소에 개개의 casein 유전자와 비

교적 먼 거리를 두고 위치하고 있는지 알 수 있다.

당초 유전자좌의 발현과 제어의 구조를 잘 이해하기 위해서는 그들의 자매작용 조절성분(element)의 성격과 위치에 대하여 또 그들의 유전자좌의 염색질(chromatin)의 고차구조(高次構造)에 대하여서의 동찰이 불가결하다. 이와같은 이치로 casein의 4개의 전유전자의 협조적 발현의 바탕에 있는 조직(mechanism)을 해명하기 위해서는 casein유전자좌의 구성에 관한 상세한 지식이 필요하다.

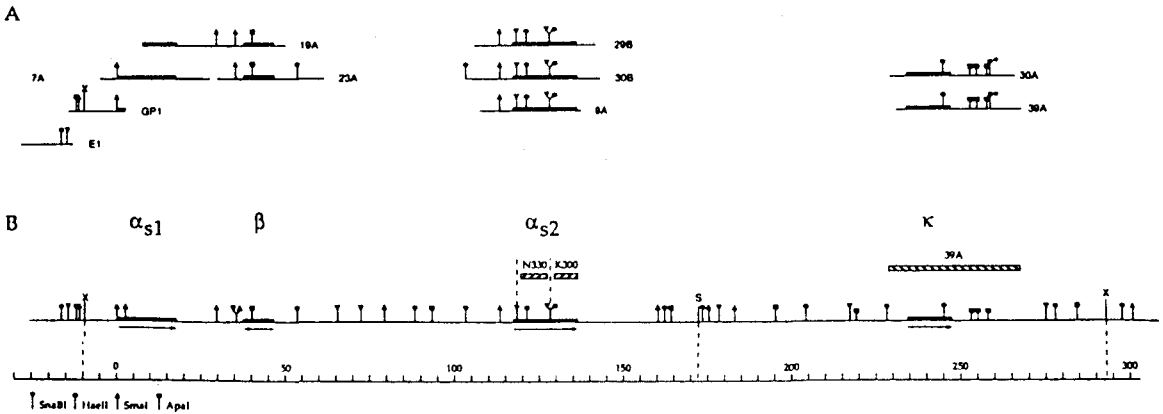
casein의 4개의 전유전자의 염기배열(鹽基配列)에 대하여서는 이때까지 $\alpha s1$ casein에 대하여는, β casein에 대하여는, $\alpha s2$ casein에 대하여는, Kcasein에 대하여는, 또 소의 casein유전자좌 배열순서($\alpha s1-\beta-\alpha s2-K$)에 대하여 등 여러보고가 있다. 그러나 그들의 유전자 상호간의 거리 및 유전자좌 그것 자체의 크기에 관한 자료는 모두 같지 않아 혼란되어 있다. 더욱 그들의 상대적인 전사(轉寫)의 방향에 대하여는 지금껏 파악되어지지 않고 있다. 그래서 소의 casein유전자좌의 전체의 조잡한 지도를 작성하여 보았다. 이 지도는 유전자좌의 크기, 유전자 상호간의 거리, 이들 유전자의 전사(轉寫)의 방향 및 casein유전자의 제한효소지도(制限酵素指圖) 그들의 비번역영역의 일부를 나타낸 것으로 <그림2>에 나타낸 바와 같다. 이 광범위하게 걸친 지도는 분자량의 큰 소의 genomDNA의 위에 파르스필드겔 전기영동법(泳動法-PFGE)에 의해 소의 코스미스드라이프라이-로 부터 분리한 개개의

casein 유전자 clone의 분석결과를 결부시켜 작성하였다. 이 연구 속에서 분리되어진 casein유전자 clone은 자매작용 조절 요소비 확인을 목적으로 하였다. 전환 쥐에 있어서 유전자 발현(發現)에 관한 연구의 출발의 재료로서도 이용되었다.

파르스필드겔 전기영동(電氣泳動) 분석의 결과는 4개의 casein유전자는 Xho. DNA 단편상(斷片上)에 300kb의 길이로, 물리적으로 결부되어 있는 것을 나타내고 있다. $\alpha s1$ casein유전자가 당해 유전자좌의 한편의 끝에 위치하고 Kcasein유전자가 다른 편의 끝에 위치하고 있다. 칼슘에 감수성의 3개의 casein 유전자($\alpha s1, \beta, \alpha s2$)는 140Kb의 영역의 속에서 연결되어 있다. $\alpha s1$ casein유전자와 β casein유전자는 겨우 20Kb의 거리를 가지고 위치하고 있는 것 같으며 수감적으로 전사(轉寫)되어진다. $\alpha s2$ casein 유전자는 β casein 유전자의 약 70Kb 상류(上流)에 위치하고 β casein 유전자에 대해 분기적(分岐的) 전사방향을 갖는다. Kcasein유전자의 정확한 위치와 전사방향을 명확하게는 파악되지 않으나 우리들의 연구결과의 자료로서의 $\alpha s2$ casein유전자의 95~120Kb 하류(下流)의 영역에, 또 $\alpha s1$ casein유전자와 β casein유전자로 부터 약 200Kb의 영역에 위치하고 있음을 나타내고 있다. Kcasein유전자의 전사방향은 $\alpha s2$ casein유전자의 그것과 거이 같다. 유전자좌의 전체의 크기는 $\alpha s1$ casein유전자의 전사개시 위치로 부터 Kcasein유전자의 전사종결 위치 까지의 거리는 250Kb로 추정되어진다.

또 이 지도 작성에 상세한 해설은 별도로 주어 지라고 본다.

〈그림 2〉 소의 casein 유전자의 전체의 조잡한 지도



○ Transgeneac mouse의 유선에 있어서 개개의 소 casein 유전자의 유전적 발현

4종의 casein은 우유의 주요한 유단백질이 다. 4종의 casein은 유단백질의 전체의 80%를 점하고 그중 αs1 casein과 βcasein이 제일 많고 각기 10~12mg/ml, 10mg/ml 포함되어 있다. αs2casein과 Kcasein은 이들에 비해 적고 각기 3.7mg/ml, 3.4mg/ml 포함되어 있다. 4개의 전casein 유전자는 상호에 강조하면서 조직이나 비유기에 특이적으로 발현함과 함께 칼슘의 감수성의 casein을 분류하는 유전자의 비번역영역에는 공통의 제어영역이 존재하고 있다. 그러나 K casein 유전자의 5'영역은 다른 3개의 casein 유전자의 그것과는 다른 구조로 편성되어 있다. casein 유전자의 촉진물(promoter)에 대하여서는 조직배양에 의해 연구되어 왔다. 또 어느정도는 형질전환

동물에 있어서 연구되어 왔다. 몇개인가의 제어 motif(Hormone 반응부위를 포함한 전사 인자(轉寫因子) 결합부위)과 그들에 결합하는 변환작용인자가 βcasein 유전자의 촉진물(promoter) 영역에 있어서 확인되었다. 쥐의 키메라와 와일드(wild)형의 βcasein 유전자의 유전적 발현에 대하여, 동일하게 mouse의 유전적 발현에 대하여 동일하게 소의 유전적 발현에 대하여서의 연구가 변환 되어진 유선의 상피세포(上皮細胞)를 사용하여 행하여져 왔다. casein 유전자의 유전적 발현기능에 대하여 호르몬적, 세포외 마도릭스적 영향의 매개에 관여하고 있는 개체의 자매제어 요소는 전사개시 위치의 1.7Kb 상류(上流)로부터 에기손 I까지의 영역내에서 확인 되었다. 변환 쥐 및 Transgenic rat를 사용하여 βcasein 유전자의 와일드(wild)형 및 키메라 유전자의 발현 외에 비교 연구가 수 많이 행하여져 왔다. 그것에는 Rat의 βcasein 유전자를 자료로 한 것,

산양을 자료로 한것, 소를 자료로 한 것등이 있다. 그것에 의하면 발현 수준에 있어서는 큰 편차가 있으나 조직·비유기 특이성은 보존하여 잘지니고 있었다. 이들의 연구에 사용된 형질 전환 유전자는 5'측의 비번역영역에 적어도 1.7Kb를 포함하고 있었으며 또 유전적 발현의 제어에 관여하고 있다고 생각되었다. 최초에 에기손의 DNA 배열을 포함하고 있었다.

이때까지 보고되어진 유일한 Kcasein의 유전자 배열에 근거한 형질전환 유전자는 형질전환 유전자 쥐에 있어서 가능하지 않은 것 같다. 본래에 α s2casein 유전자, 혹은 키메라의 α s2casein 유전자를 사용하여서의 유전적 발현의 연구에 대하여는 이때까지 보고의 예가 없다.

세포배양system에 있어서 유단백질에 관계하는 유전자의 발현 기구를 invitro로 분석하고자 하는 시도는 그들의 세포모델이 유선에 있어서 유전자 발현에 불가결의 발생신호의 모든 줄거리를 완전하게 의태(擬態)할 수 없기 때문에 우리들은 유선 특이적인 고도에 유전적 발현이 훌륭하게 조화되어진 상태로 제어되어 있는 일에 관계되어 있는 본체를 조사하여 확실하고자 하는 특별한 목적으로 쥐의 생식 세포계중에 소의 α s2, K, β casein 유전자를 각기 도입하여 보았다. 몇개의 유단백질 유전자의 제어배열은 α s1casein 유전자 및 β casein 유전자를 포함시켜 유선 특이적인 형질전환 유전자 발현을 지령(指令)할 수 있다는 사실이 보고되었다. 일반적으로 형질변화 유전자 쥐에 있어서 외래(外來)의 유단백질 유전자의 발현 수준은 삽입위치에 따라 영향되며 큰 편차를 나타내고 복사수는 무관계의 발현수준을 가져오

게 하고 있다. casein유전자의 발현의 제어에 관계되고 있는 조절요소는 casein유전자좌 속의 어디에 위치하고 있는지를 알수 없다. 또한 그들의 조절요소간에 상호작용, 혹은 그에 결합한 단백질의 상호작용이 casein의 유전적 발현에 적절한 제어 때문에 필요한 것인지도 모른다. 하나에 casein유전자의 부분만을 포함하여 키메라적 구조체를 사용하기 보다도 비교적 큰 인접영역을 포함한, 자연의 소에 casein 유전자의 유전적 발현을 분석하는 것으로 의해 관계되는 조절요소의 실체를 조사하여 확실히 알아낼수 있는 가능성이 증대하고 있다. casein유전자좌로부터 얻어지고, 근접의 유전자 배열로부터의 영향을 받지 않는 조절요소를 파악 분리하는 일이 되어질 수 있었으면 산유량이 이종구조(異種構造)의 단백질을 발현시킬 수 있는 일을 노렸다. 유선 특이적인 발현system의 개선에 기여할 것이다. 이와같은 이유로 형질전환 쥐를 사용하여 소의 α s1, β , α s2, Kcasein 유전자의 발현 특성이 대하여서의 연구가 행하여졌다. 전환 쥐의 작출 때문에 다음의 세가지 코스내도 clone이 사용되었다. (그림2참조)

- 1) 고스미도 23A, 이 벡타에 16Kb의 5'측의 비번역영역과 8Kb 3'측의 비번역영역을 붙인 9Kb의 β casein 유전자를 운반시켰다.
- 2) 고스미도 9A이 벡타에 8Kb의 5'측의 비번역 영역과 1.5Kb의 3'측의 비번역영역을 붙인 19Kb의 α s2casein 유전자를 운반시켰다.
- 3) 고스미도 30A, 이 벡타에는 13Kb의

Kcasein유전자와 5Kb의 5'측의 비번역영역과 19Kb의 3'측의 비번역영역을 붙였다.

개개의 casein유전자에 있어서의 형질전환 유전자 쥐는 β casein유전자 고스미도 23A (33Kb), α s2 casein유전자 고스미도 9A (28.5Kb), Kcasein유전자 고스미도30A (37Kb) (그림2참조)의 Not I 단편의 미량 주입법에 의해 작출 되었다. 형질전환유전자의 발현 상태는 단백질의 수준으로 측정되었다. 전환 쥐의 산유량을 소에 β casein함유량을 웨스턴 보롯딩법(이모노 브로딩)에 의해 측정되었다. 유량 sample은 비유기의 몇개의 단계에서 채취되어짐과 동시에 다른 비유기에 있어서도 채취되었다. 상당량에 소의 β casein이 모든 전환 쥐의 line에 산유량에서 검출 할 수 있다. 최고 함유수준은 쥐의 line간에서 넓은 편차를 나타내고 0.05mg/ml 미만부터 20mg/ml까지의 차이가 있었다. 12line의 중에 6line은 소의 β casein을, 1~20mg/ml의 범위내를 갖고 있었다. 그들의 line중에 3line은 우유중에 보이는 함유량과 같거나 또는 그것을 능가하고(2배) 있었다. 발현의 수준은 도입된 변환 유전자의 복사수와는 관계가 없었다.

소의 α s2 casein 및 Kcasein은 유선에서는 검출 가능수준에서 발현되지 않았다. 명백하게 유선이 빠르게 제어되어진 발현을 억제할 수 있는 일을 할 수 있는 조절요소는 이 연구에서 사용되었다. α s2casein유전자 및 Kcasein유전자로 부터는 포착할 수가 없었다. 이들의 실험의 모든 해설은 별도로 발표되어 있다.

이들의 관찰결과는 Kcasein유전자는 타 casein 유전자와 진행적으로 붙어 있지 않고 있다는 사실과 서로 잘 어울려, 4종의 전casein 유전자는 암소에 있어서 협조적으로 발현하나 그것에는 4종의 전casein유전자의 발현에 필요한 것에 관계되어 있는 우세자매작용 성분이 존재하고 있음이 틀림 없음을 시사하고 있다. casein유전자좌에 있어서 유전자좌 제어영역(LCR) 양조절요소(樣調節要素)를 포착하고자 하는 실험이 현재 진행되고 있다.

○ 낙농업계의 응용

4종에 전casein유전자에 각각의 유전적 발현이 고수준에 달성되어 모든 변환 유전자 기초축에 있어 예언된바와 같이 실현되면 이 기술은 그 자연적 형태로 혹은 각각의 변이체라고 하는 형태로, 유우의 생식세포계 속에 추가 casein 유전자를 도입할 수 있는 일을 가능하게 할 수 있을 것이다. 이렇게하여 암소의 산유량에 단백질율을 유전자 복사수의 증가에 의해 높일수가 있던가 혹은 우유중의 총단백질량이 타 제약인자, 즉 생리적 제약에 의해 제한되어지는가 아닌가의 문제에 회답을 줄 수가 있을 것이다. 이 정보를 손에 넣기만 하면 현재의 casein유전자좌의 외측에 심어서 casein유전자의 추가 복사를 줄 수 있는 일이 될 수 있을 것이다. 단 각각 독립으로 작출되어진 기초축에 있어서는 이 노선선정(路線選定)은 달라질 것이다. 또 양축가에 대하여서는 단순한 교배번식을 통하여 casein유전자의 copy수를 늘린다고 하는 이때까지 없었던 기회를 제공할 수가 있을 것이

다. 변이체(變異體)가 재도입되며는 그 치즈 제조 과정에 대한 영향도 검토할 수가 있을 것이다.

이들의 기술은 의문도 없이 가까운 장래에 이용할 수가 가능하게 될 것이다. 따라서 일반사회, 교배번식의 업계, 낙농업계는 이들의 혁신적 수단을 일반사회의 이익을 위해 흔쾌히 적용하게 될 것인가 아닌가 결단을 내리지 않으면 안될 것이다. 이 결단은 단지 경제적 기준에 따라서 결정되어지는 않을 것이다. 가령 유전적변환에 의한 단백질을 가진 식품의 소비자 수용의 문제는 대개의 국가에 있어서 큰 관심사의 하나로 되어 있고 또 이 기술에 대한 윤리적 배려의 문제도 같은 맥락으로 논의의 대상으로 되어 있다.

○ 변환 동물의 업계에 있어서 가족의 복지 와 윤리문제

의론(議論)을 일으킨 성장호르몬 유전자를 품고 있는 Transgenec 돼지, 혹은 가축의 건강, 복지, 번식성능에 나쁜 영향을 미치는 형태로 성장을 촉진시킬 수 있는 것 같은 다른 유전자가 도입된 변환가축의 문제는 가축의 형질전환 기술에 약간의 그림자를 던졌다. 그래서 우리들은 처음부터 이 신기술에 관하여 2, 3의 단순한 내부적지침(guide line)을 만들었다. 가령 우리들은 이제부터 만들고자 하는 새로운 물질은 전적으로 유선으로 생산할 수 있는 가축을 작출하는 일에 한정을 하였다. 또 예컨대 유선내에서 생산되어지는 것이라 할지라도 당해 가축의 건강이나 복지에 나쁜 영향을 끼치지 않

으리라는 생각을 취하고 있다. 또 여하한 유전적 수정의 형태를 취하더라도 당해 가족의 표현형에 까지 영향을 주어서는 안된다고 하는 생각에서 이 규칙은 옛부터 내려온 번식수법에도 적용할 수 있는 것이다. 이들의 기준적 생각은 일반 대중에 용이하게 설명할 수 있는 것이고 또 이 기술이나 이 기술에 의한 상품을 일반 대중에게 받아들여지게 하던가 혹은 또 그와같은 상품을 필요로 하고 있는 환자의 복지를 위해서 이것을 용인하여 주는데 큰 도움으로 될 것이다. 이 문제에 관하여 이 이외의 접근에 의한 대중교육을 행한 결과 네덜란드 전국민 대다수(70이상)의 사람이 생물의학적 단백질의 생산을 둘러싸고 이 기술에 많은 호감을 갖고 있고 1993년의 여론조사에 의하면 극소수 사람이 반대하고 있는데 지나지 않았다.

이상 기술한바로부터 어떤 다른 국가에 있어서 유용가축의 유전적 수식(修飾)을 행하고 있는 기관이 있으면, 이와 유사한 행동규범을 채용하도록 권할 수 있을 것이다. 이것은 가축의 복지를 옹호할 뿐만 아니라 기술의 발전을 지키고 나아가 형질전환 기술의 평판을 손상하는 일이 없이 인류의 복지에 이소용될 수 있는 길을 열수 있게 될 것이다. 추가하여 네덜란드의 사례와 같은 많은 대중속에서 널리 논의할 기회를 갖음으로서 일반 대중에 널리 주시키는 일이 정부의 강력한 지지와 맞물려 있으며, 이 기술이 큰 의미가 있는 산업의 역군으로서 비약하기 위해서는 필수적의 조건이다. ■