

Mouse Mammary Epithelial Cell에서 Retrovirus Vector를 이용한 Human Lactadherin 유전자의 유도적 발현*

권모선 · 구본철 · 정병현¹⁾ · 염행철²⁾ · 박창식^{3,4)} · 김태원⁴⁾
대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실

Retrovirus Vector-Mediated Inductional Expression of the Human Lactadherin Gene in Mouse Mammary Epithelial Cells

Kwon, M. S., B. C. Koo, B. H. Chung¹⁾, H. C. Yom²⁾,
C. S. Park^{3,4)} and T. A. Kim⁴⁾

Department of Physiology, Catholic University of Daegu School of Medicine

ABSTRACT

Lactadherin (formerly known as BA46), a major glycoprotein of the human milk fat globule membrane, is abundant in human breast milk and breast carcinomas and may prevent symptomatic rotavirus infections. In this study, under the control of tissue specific and hormonal inducible mouse whey acidic protein (WAP) promoter, the expression pattern of lactadherin (Ltd) in lactogenic hormone - dependent mouse mammary epithelial cell line HC11 were tested. pLNWLtd construct containing 2.4 kilobases of the WAP promoter and 1.5 kilobases of human lactadherin gene was stably transferred into HC11 cells using retroviral vector system. Integration and expression level of the transgene was estimated using PCR and RT-PCR, respectively. Prominent induction of Ltd gene under the WAP promoter was accomplished in the presence of insulin, hydrocortisone and prolactin. Compared to the control (cells cultured with insulin alone), however we observed that the WAP promoter was leaky. These data indicate that further studies are needed in finding an appropriate promoter other than WAP promoter because of its leakiness.

(Key words: Human lactadherin gene, Whey acidic protein promoter, Lactogenic hormones, RT-PCR)

* 본 연구는 “1999년~2002년 농림부 농림기술개발사업”과 “한국과학재단 우수연구센터 (R11-2002-100-01000-0)’의 지원에 의해 이루어진 것임.

† Corresponding Author : Department of Physiology, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu, Korea. E-mail: takim@cataegu.ac.kr

¹⁾ 건국대학교 수의과대학(College of Veterinary Medicine, Konkuk University).

²⁾ 호서대학교 생명과학전공(Dept. of Life Science, Hoseo University).

³⁾ 충남대학교 동물자원과학부(Division of Animal Science and Resources, Chungnam National University).

⁴⁾ 충남대학교 형질전환복제돼지 연구센터(Research Center for Transgenic Cloned Pig, Chungnam National University)

I. 서 론

형질전환 동물의 유선을 통한 외래 재조합 단백질의 생산에 있어서 물질 정제의 경제성과 용이성, 그리고 높은 수확율을 고려할 때, 유선을 bioreactor로 이용하고자 하는 연구는 그 실현 가능성의 측면에서 매우 높은 타당성을 제시하고 있다(Janne 등, 1998). 몇몇 선행된 연구에서 그 예를 살펴보면, 형질전환 쥐의 유선에서 tissue plasminogen activator (tPA)가 생산되었으며(Gordon 등, 1987), human protein C (Subramanian 등, 1996)와 재조합 human fibrinogen (Prunkard 등, 1996)도 생산되었다. 뿐만 아니라 염소에서는 human tissue plasminogen activator (tPA)가 유선을 통해 만들어졌으며(Ebert 등, 1994), 양의 유선에서는 human anti-trypsin이 만들어졌고(Carver 등, 1993), 돼지의 유선으로부터는 human protein C의 분비가 보고되었다(Van Cott 등, 1996). 이러한 유선을 통해 분리되는 단백질들은 정제에 있어서 매우 용이하며 적절한 전사후 변형과정(post-translational modification)이 이루어지므로 생리활성 물질의 생산 수단으로 널리 연구되고 있다(Clark, 1998).

한때 BA46라고 불려진 lactadherin (Lct)은 인간의 유선과 인간의 유방암 세포에서도 발현되며(Taylor 등, 1997) 모유의 유단백질의 하나인 mucin과 결합되어 분리되는 당단백질의 하나로 분자량이 46 kd이고, 378개의 아미노산 배열과 1.2kb의 cDNA sequence가 알려져 있다. 이 물질은 소아들의 급성 설사를 유발시키는 rotavirus의 감염을 억제하는 것으로 알려져 있는데, 최근의 연구결과(Newburg 등, 1998)에 의하면 모유 성분 중에서 lactadherin은 rotavirus가 다른 분자와 결합하는 능력과 감염성을 약화시켜서 그 바이러스의 번식을 억제하는 것으로 밝혀졌다. Lactadherin은 pH 4이하의 위산에서 변성되지 않는 생화학적 특성으로 인해 그 정제가 기술적으로 매우 간편하고 다른 약품들과는 달리 대량 생산 후 이유식이나 분유에 혼합하여 간편하게 복용시킬 수 있다는 장점을 지니고 있다. 이에 본 연구에서는 lactadherin이라는 고부가가치를 가진 단백질을 *in vivo*에서 생산하

기 위한 전 단계로서, retrovirus vector를 이용한 효과적인 gene transfer system을 *in vitro*에서 확립하고자 한다. Retrovirus를 이용하는 방법은 다른 외래유전자 도입방식에 비해 유전적으로 안정성을 나타내며(Temin, 1989), 외래유전자가 genome에 삽입될 때 euchromatin region 내로 선택적으로 도입될 수 있으며, 유전자 삽입시 반복되지 않는 단일 유전자만이 삽입이 되고 다양한 종류의 세포에 다양한 종류의 외래유전자를 높은 효율로 감염시킬 수 있다는 장점을 가지고 있다(Rohdewohld 등, 1986). 반면에 이 방법은 고농도의 virus stock을 수확하는 데 있어서 감염성 저하 등의 현상이 나타나는데, 본 연구에서는 이러한 문제점을 해결하기 위하여 VSV-G glycoprotein을 envelope으로 하는 retrovirus vector system (Kim 등, 2001)을 사용하였다. 이 system에 의해 생산되는 virus는 초원심분리로 농축시켜서 감염도를 1,000 배 이상 증가시킬 수 있으며 또한 pantropic이기 때문에 어류를 포함하여 거의 모든 동물세포를 감염시킬 수 있는 장점을 가지고 있다(Lin 등, 1994).

이 system을 확립하기 위하여 해결해야 할 가장 중요한 문제점 중의 하나는 형질전환 동물에 있어서 외래 단백질의 지속적인 발현으로 인한 생리적인 유해성을 어떻게 극복하느냐에 있다. 이미 잘 알려진 바와 같이, 유선을 통한 재조합 단백질의 지속적인 발현은 유선의 기능에 있어서나 그 동물 자체에 유해한 영향을 초래할 수도 있다(Houdebine 등, 2000). 본 연구에서는 이러한 예기치 못한 부작용을 감소시키기 위하여 일반적으로 많이 사용되는 β -actin promoter와 CMV (cytomegalovirus) promoter 대신에 조직특이적이며, hormone에 의하여 유도적인 활성을 가지는 promoter인 whey acidic protein (WAP) promoter를 이용하였다. 먼저, 이 promoter를 marker gene인 *E. coli* LacZ gene과 재조합하여 retroviral vector system을 이용해서 lactogenic hormone에 반응하는 쥐의 유방상피세포인 HC11 (Kannius-Janson 등, 1998)에 도입한 후, lactogenic hormone을 처리하여 이 hormone의 유도에 의한 LacZ gene의 발현을 검정하였다. 확립된 hormonal inducible system을 이용

하여 본 실험에서 확인하고자 하는 *Ltd* gene의 유도적 발현을 위하여 *E. coli LacZ* gene과 동일한 과정보로 *Ltd* gene을 HC11에 도입하여 발현을 확인하고자 하였다. *E. coli LacZ* gene과 *Ltd* gene의 세포 genome 상으로의 도입은 PCR을 이용하여 확인하였으며, lactogenic hormone인 insulin, hydrocortisone, 그리고 prolactin을 처리하여 유도된 synergistic effect에 의한 발현의 정도는 RT-PCR을 이용하여 측정하였다.

II. 재료 및 방법

1. 명명

Plasmid DNA를 지정하는 경우에는 접두어로 "p"를 사용하였으며(예를 들어 pLNβZ), virus producing cell에서 생산된 virus를 명명하는 경우에는 "p"를 사용하지 않았다(예를 들어 LNβZ). Helper cell에 plasmid DNA를 transfection하거나 virus를 infection하여 구축된 virus producing cell의 명명은 전자의 경우에 있어서는 helper cell의 명칭 뒤에 plasmid 명칭을 연결하였고(예를 들면 PT67-pLNβZ), 후자의 경우에는 cell의 명칭 뒤에 virus 명칭을 결합시켰다(예를 들면 293mGPHY-LNβZ).

2. 세포배양

본 실험에서 사용한 PT67 (Clontech, USA)과 293mGPHY (Kim 등, 2001) packaging cell line은 10%의 FBS (fetal bovine serum; HyClone)와 penicillin (100 U/ml) - streptomycin (100 µg/ml) (Pen/Strep; GibcoBRL)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 4.5 g/l glucose, GibcoBRL 12800-017)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 배양하였다. Mouse mammary epithelial cell line인 HC11은 10%의 FBS와 penicillin (100 U/ml) - streptomycin (100 µg/ml), insulin (5 µg/ml), 그리고 EGF (10 ng/ml)가 첨가된 RPMI-1640 Medium (GibcoBRL 31800-022)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 배양하였다.

3. Retrovirus Vector의 구축

phEPO-WAP (경상대 김진희 박사가 제공)에서 2.4 Kb의 WAP promoter를 EcoR I 과 HindIII로 절단한 후, pLNCX를 BamH I 과 HindIII로 처리하여 제거된 CMV promoter의 위치에 cloning하여 pLNWX를 구축하였다. *E. coli LacZ* gene을 marker gene으로 사용하기 위하여 pLNβZ의 LacZ fragment를 HindIII와 Sal I으로 절단한 후 이를 pLNWX의 HindIII와 Cla I 위치에 cloning하여 pLNWZ로 재조합하였다. pLNβLtd는 pGEM-Ltd의 1.5 Kb *Ltd* fragment를 HindIII와 Sal I으로 잘라내어 pLNβZ의 *E. coli LacZ* gene 대신에 위치시켰다. 동일한 *Ltd* fragment를 pLNWX의 WAP promoter의 downstream에 존재하는 HindIII와 Cla I 위치에 cloning하여 pLNWLtd를 구축하였다(Fig. 1). 새로 재조합된 recombinant vector들은 Qiagen maxiprep kit을 이용하여 대량 분리한 후 다음 실험에 사용하였다.

4. Retrovirus Vector의 생산

Retrovirus vector인 pLNβZ, pLNWZ, pLNβLtd,

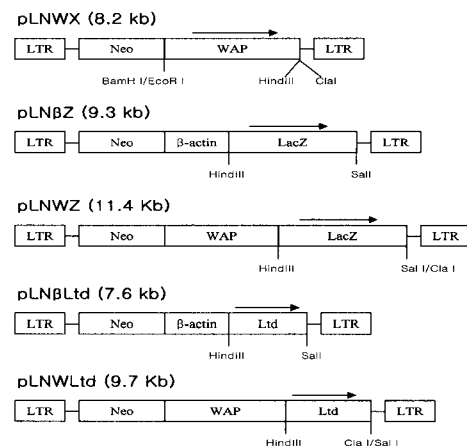


Fig. 1. Structures of retrovirus vectors. LTR, long terminal repeat; Neo, G418 resistant gene; β-actin, rat β-actin promoter; WAP, mouse whey acidic protein promoter; LacZ, *E. coli LacZ* gene; *Ltd*, human *lactadherin* gene. Length of each sequence is not drawn to scale.

그리고 pLNWLtd는 다음과 같은 과정으로 각각의 virus를 생산하였다. 각 retroviral vector는 PT67에 calcium phosphate 방법으로 transfection하여 G418 (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 선별용액으로 2주간 선별하였으며 형성된 Neo^R (G418 resistant) PT67 cell의 pool을 DMEM/FBS (10%)에서 48시간 배양한 후 virus stock을 수확하였다. 이 virus를 본 실험실에서 구축한 packaging cell line인 293 mGPHy (Kim 등, 2001)에 감염시켜 G418 (600 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 선별용액으로 2주간 선별하였다. 선별된 Neo^R (G418 resistant) 293 mGPHy-LN β Z cell에 calcium phosphate 방법으로 20 μg 의 pHCMV-G를 transfection하여 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 조건에서 8시간 배양 후 새 배양액으로 갈아주었다. 48시간이 경과한 후 retrovirus가 포함된 배양액을 수확하였다.

5. WAP Promoter에 의한 *LacZ* 유전자의 조직 특이적 발현 유도

수확한 LN β Z와 LNWZ virus stock은 각각 0.45 μm pore-size의 cellulose acetate filter를 이용하여 여과한 후, 1 ml을 전날 60 mm dish에 1×10^6 으로 준비된 HC11 세포에 감염시켰다. 24시간 경과 후 세포를 split하여 G418 (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 선별용액으로 2주간 선별하였다. 선별이 끝난 세포 중 HC11-LNWZ는 lactogenic hormone에 의한 *E. coli LacZ* gene의 유도적 발현의 확인을 위하여 10%의 heat-inactivated FBS와 penicillin (100 U/ml) - streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 RPMI-1640 medium에 insulin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 EGF (10 ng/ml)를 첨가하여 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 2일간 배양하였으며, 이 후에는 동일한 medium에 prolactin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 hydrocortisone (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 추가하여 2일에 1번씩 교환하면서 4일동안 배양하였다.

배양한 세포는 1 \times trypsin/EDTA를 처리하여 PBS에 재부유한 후 DNA와 RNA를 각각 QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Germany)와 RNA Mini Kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 분리하였다. 분리한 DNA는 PCR의 template로 사용하였으며 50 pmole의 각 primer, 50 μM dNTP, 1.5 mM MgCl₂,

2.5 U Taq polymerase (Promega), 10 \times Taq polymerase buffer (Promega)와 혼합한 후 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 방치 후, 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초(denaturation), 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초(annealing), 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초간(extension) 반응하는 cycle을 35회 반복 실시하였다. 반응에 사용한 primer의 sequence는 + strand primer sequence로 5'AAATGGCTTTCGCTACCTGGA 3'과 -strand primer sequence로 5'GGTAGTTCAGGCAGTTCAATC 3'을 사용하였다. 반응이 끝난 후 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 방치한 후 2% agarose gel을 이용하여 전기영동을 실시하였다.

분리한 RNA는 50 pmole의 primer, 0.2 mM dNTP, 1 mM MgSO₄, 5 U AMV Reverse Transcriptase (Promega), 5 U *T7*/DNA Polymerase (Promega), AMV/Tfl 5 \times Reaction Buffer (Promega)로 만든 reaction mixture와 혼합하여 RT-PCR을 수행하였다. 일차적 cDNA를 합성하기 위하여 48 $^{\circ}\text{C}$ 에서 45분간 반응한 다음, AMV Reverse Transcriptase의 활성화와 RNA/cDNA/primer의 denaturation을 위해 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2분간 반응시켰다. 2차 cDNA 합성과 PCR 증폭을 위하여 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초, 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초간 반응하는 cycle을 25회 반복 실시한 후, 최종 신장을 위해 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 방치하였다. Primer는 PCR의 경우와 동일한 것을 사용하였으며, 2% agarose gel을 이용하여 전기영동을 실시하였다.

6. WAP Promoter에 의한 *Ltd* 유전자의 조직 특이적 발현 유도와 발현 여부 확인

수확한 LN β Ltd와 LNWLtd virus stock을 이용하여 앞에서 언급한 과정과 동일하게 *Ltd* gene을 target cell의 genome 내로 전이시켰다. *Ltd* gene의 도입 여부는 PCR을 이용하여 확인하였으며, 발현 여부는 RT-PCR 방법을 이용하였다. 각 반응에서 사용한 primer의 sequence는 + strand primer sequence로 5'AGTAAGATCTTC CCTGGCAAC3'과 - strand primer sequence로 5'GAAAACAGGAC AGTGAGGACT3'을 사용하였다. 앞의 *E. coli LacZ* gene을 이용한 실험과 동일한 조성의 반응액을 사용하였으며 PCR은 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초(denaturation),

48℃에서 30초(annealing), 72℃에서 30초간(extension) 반응하는 cycle을 35회 반복 실시하였다. RT-PCR은 48℃에서 45분간 반응한 다음 94℃에서 2분간 반응시켰다. 2차적 cDNA의 합성과 PCR 증폭을 위하여 94℃에서 30초, 48℃에서 30초, 72℃에서 30초간 반응하는 cycle을 25회 반복 실시한 후, 72℃에서 5분간 방치하였다. Primer는 PCR의 경우와 동일한 sequence를 사용하였으며, 2% agarose gel을 이용하여 전기영동을 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Lactogenic Hormone에 의한 유도적 발현이 가능한 Gene Transfer System의 확립

Transfection이나 virus를 이용하는 등의 분자생물학적인 방법으로 전이된 외래 유전자의 동물체 내에서의 지속적인 발현은 그 개체의 생리적 균형을 손상시키는 심각한 부작용을 나타내는 것으로 보고되어 있다(Vize 등, 1988). 이러한 문제점을 해결하기 위하여 본 연구실에서는 현재 널리 사용되고 있는 β -actin promoter나 CMV promoter 대신에 tissue specific promoter나 inducible promoter를 사용한 retrovirus vector system을 구축하고자 하였다. 그 일환으로 유선 조직에서 특이적으로 발현되는 WAP 유전자의 promoter를 이용하여 전이된 유전자의 발현을 조절할 수 있는 system을 확립하였다. Cloning한 promoter의 활성 여부를 확인하기 위하여 marker gene으로 *E. coli LacZ* gene을 도입하였으며, WAP promoter의 대조군으로 β -actin promoter를 사용하였다.

Virus producing cell인 PT67-pLN β Z와 PT67-pLNWZ, 그리고 target cell인 HC11-LN β Z와 HC11-LNWZ에서 분리한 DNA를 template로 하여 LacZ primer로 PCR을 수행한 결과 모든 cell line에서 525 bp의 band를 확인할 수 있었으며 이러한 결과로 LacZ gene의 도입이 성공적으로 이루어진 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

LacZ gene의 WAP promoter에 의한 발현 조절 양상을 확인하기 위하여 lactogenic hormone을 처



Fig. 2. PCR analyses of the *E. coli LacZ* gene integration in transformed cells. Each columnal number indicates the source of DNA. M: 100 bp ladder (Promega, USA), 1: no DNA, 2: plasmid pLN β Z, 3: cell line PT67-pLN β Z, 4: cell line HC11-LN β Z, 5: plasmid pLNWZ, 6: cell line PT67-LNWZ, 7: cell line HC11-LNWZ.

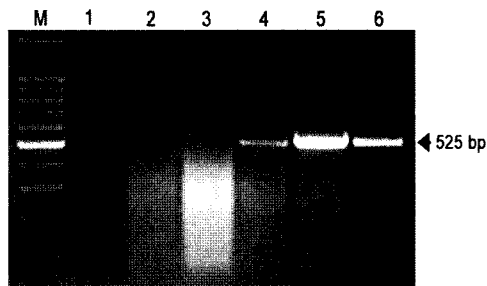


Fig. 3. Determination of hormonal induction of the *E. coli LacZ* gene in lactogenic hormone-dependent mouse mammary epithelial cell line HC11 using RT-PCR. M: 100 bp ladder, 1: no DNA, 2 and 3: cell line HC11, 4 and 5: cell line HC11-LNWZ, 6: cell line HC11-LN β Z. The cells were fed with the media supplemented with either insulin only (for 2, 4 and 6) or insulin, prolactin and hydrocortisone (for 3 and 5).

리한 후 각 실험군에서 RNA를 분리하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 insulin, prolactin, hydrocortisone을 동시에 처리한 실험군이 insulin을 단독으로 처리한 군에 비해 RT-PCR의 band가 densitometer로 측정된 결과, 2.8배 진하게 나타났다(Fig. 3). 이러한 결과는 몇몇의 lactogenic horm-

one의 synergistic effect에 의한 외래유전자의 발현을 나타내는 것이며, 지속적으로 turn on 되어 있는 β -actin promoter와는 달리, WAP promoter는 lactogenic hormone이라는 inducer에 의해 promoter의 turn on/off가 조절됨으로써 외래 유전자의 발현 여부를 유도하는 것이 가능함을 보여주는 것으로서, 이 system은 외래 유전자의 지속적인 발현에 의한 형질전환된 개체의 생리적인 불균형에서 오는 부정적인 문제들을 해결할 수 있는 수단으로서의 가능성을 제시한다.

2. Lactadherin Gene의 Lactogenic Hormone에 의한 유도적 발현

Lactadherin은 가축이나 사람의 rotavirus 감염을 방지하는 물질로 알려져 있으며 또한 유방암 진단이나 방사성면역치료에도 이용될 수 있다(Peterson 등, 1995; Couto 등, 1996). 앞의 결과를 토대로 하여, 본 연구에서는 *Ltd* gene을 쥐의 유선에서 유래된 세포인 HC11에서 발현시키기 위하여 조직특이적이고 hormone에 의한 유도적인 발현이 가능한 system을 구축하고자 WAP promoter를 도입하였다.

pLN β Ltd의 *Ltd* gene은 β -actin promoter의 지속적인 활성으로 인하여 단백질의 발현이 연속적으로 이루어지는 구조이고, 이에 비해 pLNWLtd는 WAP promoter의 조직 특이적이며 hormone에 의한 turn on/off의 조절이 가능한 system으로 각 단백질의 발현이 유도적으로 이루어진다. 재조합한 pLN β Ltd와 pLNWLtd를 pLN β Z와 pLNWZ의 경우와 동일한 방법으로 PT67에 도입하였으며, 이후의 실험 과정도 동일한 순서로 진행하였다. PT67과 HC11에서의 *Ltd* gene의 도입은 PCR을 통해서 확인한 결과 *Ltd* gene에 해당하는 377 bp band가 각 cell line에서 나타났다(Fig. 4).

한편, RT-PCR의 결과는 예상한 바와 같이, WAP/Ltd gene이 유전자가 전이된 HC11에서 insulin, prolactin 그리고 hydrocortisone이 존재하는 조건에서 *Ltd* gene의 우월한 발현이 densitometer로 측정된 결과, 1.4배로 나타났다(Fig. 5). 그러나 대조구로 사용한 insulin 단독 처리군과 비교하였



Fig. 4. PCR analyses of the *Ltd* gene integration in transformed cells. Each columnal number indicates the source of DNA. M: 100 bp ladder (Promega, USA), 1: no DNA, 2: plasmid pLN β Ltd, 3: cell line PT67-pLN β Ltd, 4: cell line HC11-LN β Ltd, 5: plasmid pLNWLtd, 6: cell line PT67-LNWLtd, 7: cell line HC11-LNWLtd.

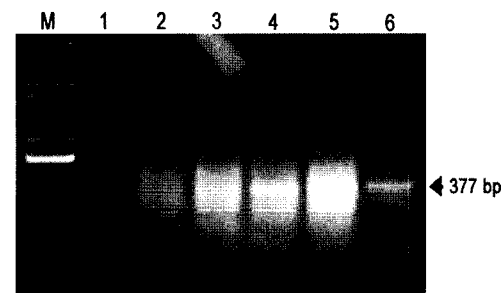


Fig. 5. Determination of hormonal induction of the *Ltd* gene in lactogenic hormone-dependent mouse mammary epithelial cell line HC11 using RT-PCR. M: 100 bp ladder, 1: no DNA, 2 and 3: cell line HC11, 4 and 5: cell line HC11-LNWLtd, 6: cell line HC11-LN β Ltd. The cells were fed with the media supplemented with either insulin only (for 2, 4 and 6) or insulin, prolactin and hydrocortisone (for 3 and 5).

을 때 WAP promoter가 "leaky"하다는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 WAP promoter의 leakiness는 다른 보고서에서도 찾을 수 있으며(Pittius 등, 1988), 그 원인으로는 inducer로 작용하는 hormone을 인식하는 데 관여하는 조절 요소가 실험에 사

용한 WAP promoter 상에 존재하지 않거나(Hennighausen 등, 1991), position effect 때문이라고 간주하는 견해도 있다(Burdon 등, 1991; Paleyanda 등, 1994). 따라서, *in vivo*의 적용에 선행하여 외래 단백질의 완벽한 발현 제어에 대한 조절이 이루어지기 위해서는 WAP promoter의 leakiness를 제거할 수 있는 적절한 조절요소의 첨가와 특정 inducer에 대한 제한적 유도가 가능한 보완적인 factor들에 대한 연구가 선행되어야 할 것이다.

IV. 요약

본 연구는 VSV-G glycoprotein을 envelope으로 하는 pseudotyped retrovirus vector system을 이용하여 쥐의 유방상피세포인 HC11에서 human Lactadherin 유전자의 발현을 확인하고자 하였다. 실험에 사용한 vector는 개체내에서의 외래 유전자의 지속적인 발현에 의한 생리적인 부작용을 최소화하기 위한 구조로, 조직특이적이며 lactogenic hormone에 의해 유도적인 활성을 가지는 것으로 알려진 WAP promoter의 통제하에 도입하고자 하는 외래 유전자를 위치하도록 하였다. WAP promoter의 대조군으로 지속적인 활성을 나타내는 β -actin promoter를 사용하였으며, 이 각각의 promoter와 marker gene으로 *E. coli LacZ* gene을 재조합한 후 retrovirus vector system을 이용하여 HC11에 도입하였다. 세포의 genome 내로의 유전자의 전이는 PCR을 통해 확인하였고, RT-PCR의 수행으로 유전자의 발현을 확인하였다. Lactadherin 유전자를 이용한 실험도 동일한 과정으로 수행하였으며, RT-PCR의 결과에서 HC11 세포에서 Lactadherin 유전자의 발현이 insulin을 단독으로 처리한 군에 비해 insulin, hydrocortisone, prolactin을 동시에 처리한 군에서 우월하게 나타나는 것으로 확인되었다. 그러나 insulin 단독 처리군에서 유전자의 발현이 약하게 나타나는 것으로 관찰되어 WAP promoter의 leakiness에 대한 재고의 필요성이 요구되었다.

V. 인용문헌

1. Burdon, T. G., Sankaran, L., Wall, R. J., Spencer, M. and Hennighausen, L. 1991. Expression of a whey acidic protein transgene during mammary development. *J. Biol. Chem.* 266: 6909-6914.
2. Carver, A. S., Dalrymple, M. A., Wright, C., Cotton, D. S., Reeves, D. B., Gibson, Y. H., Keenan, J. L., Barrass, J. D., Scott, A. R., Colman, A. and Garner, I. 1993. Transgenic livestock as bioreactor: Stable expression of human alpha-1-antitrypsin by a flock of sheep. *Biotechnol.* 11: 1263-1270.
3. Clark, A. J. 1998. The mammary gland as a bioreactor: expression, processing, and production of recombinant proteins. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 3(3): 337-350.
4. Couto, J. R., Taylor, M. R., Godwin, S. G., Ceriani, R. L. and Peterson, J. A. 1996. Cloning and sequence analysis of human breast epithelial antigen BA46 reveals an RGD cell adhesion sequence presented on an epidermal growth factor-like Domain. *DNA Cell Biol.* 15 (4): 281-286.
5. Ebert, K. M., DiTullio, P., Barry, C. A., Schinder, J. E., Ayres, S. L., Smith, T. E., Pellerin, L. J., Meade, H. M., Denman, J. and Roberts, B. 1994. Induction of human tissue plasminogen activator in the mammary gland of transgenic goats. *Biotechnol.* 12(7): 699-702.
6. Gordon, K., Lee, E., Vitale, J. A., Smith, A. E., Westphal, H. and Hennighausen, L. 1987. Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. *Biotechnol.* 5: 1183-1187.
7. Hennighausen, L., Westphal, C., Sankaran, L. and Pittius, C. W. 1991. Regulation of expression of genes for milk proteins. *Biotechnol.*

- 16: 65-74.
8. Houdebine, L. M. 2000. Transgenic animal bioreactors. *Transgenic Res.* 9 (4-5): 305-320.
 9. Janne, J., Alhonen, L., Hyttinen, J. M., Peura, T., Tolvanen, M. and Korhonen, V. P. 1998. Transgenic bioreactors. *Biotechnol. Annu. Rev.* 4: 55-74.
 10. Kannius-Janson, M., Lidberg, U., Hulten, K., Gritli-Linde, A., Bjursell, G. and Nilsson, J. 1998. Studies of the regulation of the mouse carboxyl ester lipase gene in mammary gland. *J. Biochem.* 336: 577-585.
 11. Kim, T., Lee, Y. M., Lee, H. T., Heo, Y. T., Yom, H. C., Kwon, M. S., Koo, B. C., Whang, K. and Roh, K. S. 2001. Expression of the *E. coli LacZ* gene in chicken embryos using replication defective retroviral vectors packaged with vesicular stomatitis virus G glycoprotein envelopes. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 14(2): 163-169.
 12. Lin, S., Galiano, Culp, N., Burns, J. C., Friedmann, T., Yee, J. K. and Hopkins, N. 1994. Integration and germ-line transmission of a pseudotyped retroviral vector in zebrafish. *Science* 265: 666-668.
 13. Newburg, D. S., Peterson, J. A., Ruiz-Palacios, G. M., Matson, D. O., Morrow, A. L., Shults, J., Guerrero, M. L., Chaturvedi, P., Newburg, S. O., Scallan, C. D., Taylor, M. R., Ceriani, R. L. and Pickering, L. K. 1998. Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. *Lancet* 351 (9110): 1160-1164.
 14. Paleyanda, R. K., Zhang, D. W., Hennighausen, L., McKnight, R. A. and Lubon, H. 1994. Regulation of human protein C gene expression by the mouse WAP promoter. *Transgenic Res.* 3(6): 335-343.
 15. Peterson, J. A., Couto, J. R., Taylor, M. R. and Ceriani, R. L. 1995. Selection of tumor specific epitopes on target antigens for radioimmunotherapy of breast cancer. *Cancer Res.* 55: 5847-5851.
 16. Pittius, C. W., Sankaran, L., Topper, Y. J. and Hennighausen, L. 1988. Comparison of the regulation of the whey acidic protein gene with that of a hybrid gene containing the whey acidic protein gene promoter in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.* 2(11): 1027-1032.
 17. Prunkard, D., Cottingham, I., Garner, I., Bruce, S., Dalrymple, M., Lasser, G., Bishop, P. and Foster, D. 1996. High-level expression of recombinant human fibrinogen in the milk of transgenic mice. *Nat. Biotechnol.* 14(7): 867-871.
 18. Rohdewohld, H., Weiher, H., Reik, W., Jaenisch, R. and Breindl, M., 1987. Retrovirus integration and chromatin structure: Moloney murine leukemia proviral integration sites map near DNase I-hypersensitive sites. *J. Virol.* 61: 336-343.
 19. Subramanian, A., Paleyanda, R. K., Luban, H., William, B. L., Gwazdauskas, F. C., Knight, J. W., Drohan, W. N. and Valander, W. H. 1996. Rate limitations in posttranslational processing by the mammary gland of transgenic animals. *Annual N. Y. Acad. Sci.* 782: 87-96.
 20. Taylor, M. R., Couto, J. R., Scallan, C. D., Ceriani, R. L. and Peterson, J. A. 1997. Lactadherin (formerly BA46), a membrane-associated glycoprotein expressed in human milk and breast carcinomas, promotes Arg-Gly-Asp (RGD)-dependent cell adhesion. *DNA Cell Biol.* 16 (7): 861-869.
 21. Temin, H. M. 1989. Retrovirus variation and evolution. *Genome* 31: 17-22.
 22. Van Cott, K. E., Williams, B., Velander, W. H., Gwazdauskas, F., Lee, T., Lubon, H. and Drohan, W. N. 1996. Affinity purification of biologically active and inactive forms of recombinant human protein C produced in

- porcine mammary gland. *J. Mol. Recognit.* 9 (5-6): 407-414.
23. Vize, P. D., Michalska, A. E., Ashman, R., Lloyd, B., Stone, B. A., Quinn, P., Wells, J. R. E., and Seamark, R. F. 1988. Introduction of a porcine growth hormone fusion gene into transgenic pigs promotes growth. *J. Cell Science* 90: 295-300.
- (접수일자: 2003. 1. 12. / 채택일자: 2003. 2. 7.)