

CHO 세포와 형질전환 닭에 있어서 Retrovirus Vector System에 의한 *hFSH* 재조합 유전자의 전이와 발현

권모선 · 구본철 · 심호섭¹ · 박창식^{2,4} · 이성호^{3,4} · 김태완^{4†}
대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실

Transfer and Expression of the Recombinant *hFSH* Gene in CHO Cells and Transgenic Chickens using Retrovirus Vector System

Kwon, M. S., B. C. Koo, H. Shim, C. S. Park^{2,4}, S. H. Lee^{3,4} and T. Kim⁴
Department of Physiology, Catholic University of Daegu School of Medicine

ABSTRACT

hFSH (human follicle stimulating hormone) is heterodimer consisting of α and β subunits. Since assembly of the both subunits in the cell is often the rate-limiting step in production of functional hormone, single-chain hormones have been engineered by genetically linking two different cDNA fragments with a linker sequence. Using retrovirus vector system, the resulting recombinant *hFSH* gene was transferred in CHO cells and chicken embryos, and the expression of the gene was investigated. In CHO cells, protein synthesis from the single-chain *FSH* gene was 17 fold higher than that from the heterodimeric counterpart. In the study of transgenic chickens, ten of the eleven chicks hatched from 62 embryos manipulated with recombinant retrovirus stock was determined to carry transgenic genes. RT-PCR analyses confirmed transcription of the single-chain *FSH* gene, however, no recombinant *FSH* was detected from the blood samples.

(Key words : *hFSH* gene, CTP, CHO cell, Transgenic chicken, RT-PCR)

I. 서 론

*FSH*는 뇌하수체 전엽에서 분비되는 당단백질의 일종으로, 여성에 있어서는 원시난포의 발달을 촉진시켜서 난자의 성숙을 유도하며, 여포에서의

estradiol의 분비를 자극하여 이 estradiol에 의한 여성의 성장과 행동 및 유선관의 발달을 유도한다. 또한 남성에 있어서는 고환의 기저세포를 자극하여 정자 형성에 관여하는 호르몬으로 알려져 있다. 이러한 특성에 기인하여 무배란주기증, 무월경증,

* 본 연구는 "2001년~2004년 농림부 농림기술개발사업"과 "한국과학재단 우수연구센터(R11-2002-100-01000-0)" 지원으로 수행되었음.

† Corresponding author: 대구가톨릭대학교 의과대학, Tel : 053-650-4470, E-mail : takim@cu.ac.kr

¹ 단국대학교 의과대학 생리학교실(Department of Physiology, Dankook University School of Medicine)

² 충남대학교 동물자원학부(Division of Animal Science & Resources, Chungnam National University)

³ 공주대학교 영상보건대학(College of Visual Image & Health, Kongju National University)

⁴ 충남대학교 형질전환 복제돼지 연구센터(Research Center for Transgenic Cloned Pigs, Chungnam National University)

월경이상 등의 만성무배란신드롬을 가진 불임 여성에게 주사제로 투여되며 IVF(체외수정, *In Vitro* Fertilization)와 ICSI(난자세포질내 정자직접주입법, *Intra Cytoplasmic Sperm Injection*)와 같은 생식술에 사용되고 있다. *FSH*를 비롯한 여러 성선자극호르몬과 갑상선자극호르몬은 α 와 β 의 두 개의 subunit가 비공유성 결합으로 결합되어 있으며, 동일 종에서는 각 호르몬의 α subunit는 공통적인 것으로 나타나나, β subunit는 여러 형태를 가지고 있어서 이로 인해 각각의 다른 생물학적인 특징을 나타내게 된다(Pierce와 Parsons, 1981). 이러한 subunit으로 형성된 호르몬은 각 subunit의 조합에 의해 heterodimer의 구조로 이루어질 경우에만 생물학적 활성을 나타내며, 각각의 호르몬에 대한 특이적인 올리고당의 결합도 dimer의 형성에 의존적인 것으로 알려져 있다. 이러한 특성을 지닌 호르몬의 조합단계에 있어서의 비올적인 한계를 극복할 수 있는 수단으로는 두 개의 subunit을 단일 DNA 사슬에 위치시켜서 동일한 DNA 조각으로부터 발현되도록 하는 방법이 있다(Sugahara 등, 1996).

Multisubunit의 복합체를 단일사슬로 변형시키는 연구는 단백질의 안정성과 활성을 증가시키기 위해 몇몇의 실험실에서 이미 시도되었다(Arora 등, 1994; Sano 등, 1992). 이러한 연구에서 linker 서열은 각 subunit의 가장 적절한 배열을 위해 사용되었으며, 이 linker의 사용은 호르몬의 유연성, 친수성, 단백질 분해효소에 대한 저항성을 제공하게끔 계획되어 결과적으로 단일 사슬의 생물학적 안정성에 기여하는 것으로 보고되어 있다. 본 실험에서 linker로 사용한 CTP (carboxyl-terminal peptides)는 hCG (human chorionic gonadotropin)의 β subunit의 113에서 145 아미노산 잔기에 해당하는 서열로, *in vitro*와 *in vivo*에서의 hCG의 생물학적 안정성에 기여하고(Sugahara 등, 1995; Matzuk 등, 1990), post-translational processing에 관여하여 효율적인 분비를 촉진하는 것으로 보고되었다(Muyan and Boime, 1998). 이상의 보고에 근거하여 본 연구에서는 CTP에 해당하는 DNA 단편을 *FSH* β 와 α 의 유전자 사이에 linker 서열로 도입함으로써 최종산물에 있어서 *FSH* β 의 카르복시말단과

α 의 아미노말단의 연결 부위에 CTP linker를 삽입하여 *FSH*의 분비와 신호 전달의 조절, 호르몬에 특이적인 post-translational modification의 효율을 증대시키고자 하였다.

이 재조합 *FSH* 유전자의 전이와 발현을 위하여 본 연구에서는 retroviral vector system을 이용하였다. 이 system의 장점은 다른 외래유전자 도입 방식에 비해 유전적으로 안정성을 나타내며(Temin, 1989), 외래유전자가 표적세포의 genome에 삽입될 때 반복되지 않는 단일 유전자만이 진정염색질 부위 내로 선택적으로 도입될 수 있으며, 다양한 종류의 세포에 다양한 종류의 외래유전자를 높은 효율로 감염시킬 수 있다는 점이다(Rohdewohld 등, 1987). 반면에 이 방법은 고농도의 virus stock을 수확하는 데 있어서 감염성 저하 등의 현상이 나타나는데, 본 연구에서는 이러한 문제점을 해결하기 위하여 VSV-G 당단백질을 피막으로 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).

본 연구에서는, 당단백질의 합성시 사람의 뇌하수체에서 분비되는 경우와 유사한 형태로 올리고당의 부가가 이루어지는 것으로 알려진 CHO (chinese hamster ovary) 세포를 표적세포로 하여(Takeuchi 등, 1989), *in vitro*에서 재조합 *FSH*의 발현을 확인하고자 하였다. 또한 생산된 retrovirus vector를 이용하여 재조합 *FSH* 유전자를 닭의 genome 내로 전이시켜서 형질전환 닭을 생산하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 명명

Plasmid DNA를 지칭하는 경우에는 접두어로 "p"를 사용하였으며(예를 들어 pLN β -*FSH*-CTP), virus 생산세포에서 생산된 virus를 명명하는 경우에는 "p"를 사용하지 않았다(예를 들어 LN β Z). 보조세포(helper cell)에 plasmid DNA를 transfection

하거나 virus를 infection하여 구축된 virus 생산세포의 명칭은 전자의 경우에 있어서는 보조세포의 명칭 뒤에 plasmid 명칭을 연결하였고(예를 들면 PT67-pLN β -*FSH*-CTP), 후자의 경우에는 세포의 명칭 뒤에 virus 명칭을 결합시켰다(예를 들면 293mGPHy-LN β -*FSH*-CTP).

2. 세포배양

본 실험에서 사용한 PT67 (Clontech, USA)과 293mGPHy (Kim 등, 2001) 세포는 10%의 FBS (HyClone, USA)와 penicillin (100 U/ml) - streptomycin (100 μ g/ml) (Pen/Strep; GibcoBRL, USA)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 4.5 g/l glucose, GibcoBRL 12800-017, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다. CHO 세포는 10%의 FBS와 penicillin (100 U/ml) - streptomycin (100 μ g/ml)이 첨가된 Ham's F-12 Medium (GibcoBRL 21700-075, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다.

3. Retrovirus vector의 구축

*FSH*의 발현율을 증가시키기 위하여 각 subunit를 CTP linker로 연결하여 한 vector 내에서 *FSH*가 발현되도록 계획하였다.

*FSH*의 α 와 β 유전자를 cloning하기 위하여 genbank에서 이에 해당하는 핵산서열을 확인하였는데, *FSH α* 는 mRNA 서열(genbank accession no. NM_000735)에서 signal peptide 서열을 제외한 부분을 선택하였으며, CTP는 hCG의 β subunit mRNA 서열(genbank accession no. NM_000737) 중에서 발현 후 아미노산 서열 113에서 145 잔기에 해당하는 부분을 택하였고, *FSH β* 는 exon 1과 exon 2 (genbank accession no. M16646 (exon 1), M16647 (exon 2))를 선택하였다. *FSH α* 에 대한 primer로는 Cla I의 제한효소 부위를 첨가한 + strand primer로 5'ATCGATGCTCCTGATGTG CAGGATTGC3'와 BamH I 부위를 첨가한 - strand primer로 5'GGATCCGGATAAGGAGGAA GGCA GTAA3'를 사용하였다. CTP linker에 대한 primer는 Bgl II 부위를 첨가한 + strand primer로 5'AGA

TCTTCCTCCTTCTCCTCAAAGGCC3', Cla I 부위를 첨가한 - strand primer로 5'ATCGATGCTTTGTGGGAGGATCGGGGT3', 그리고 *FSH β* 에 대한 primer로는 Hind III를 첨가한 + strand primer로 5'AGCTTAGGATGAAGACACTCCAGTTTTTCTTC3', 그리고 Bgl II site를 첨가한 - strand primer로 5'AGATCTTCTTTCATTCACCAAAGGAGCAGTA3'를 사용하였다.

PCR의 수행에 있어서 사용한 주형은 human pituitary gland cDNA (Clontech 639324, USA) 0.1 ng을 사용하였으며, 중합효소는 실패율이 현저히 낮은 것으로 알려져 있는 Advantage-HF2 (Clontech, USA) 효소를 선택하였다. PCR은 0.1 ng의 주형 DNA에 100 pmole의 +와 - primer, 5 μ l의 10 \times HF2 dNTP mix, 5 μ l의 10 \times HF2 PCR buffer, 1 μ l의 50 \times Advantage-HF2 중합효소를 혼합하여 94°C에서 1분간 방치해 두었다가 94°C에서 30초(변성), 68°C에서 1분간(primer 부착 및 신장) 반응을 35회 반복 실시하였다. 반응 후 68°C에서 최종 신장을 위하여 68°C에서 3분간 방치하였으며, 반응이 종결된 후 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하였다. 각각의 산물은 추출하여 pGEM-T Easy vector 내로 도입하였으며 각각의 절편을 단일 vector로 통합하여 pGEM-Teasy-*FSH*-CTP를 구축한 다음 (Fig. 1), 각 절편의 DNA 염기서열을 sequencing을 통하여 확인하였다. 최종적인 retrovirus vector plasmid는 pGEM-Teasy-*FSH*-CTP로부터 약 1 Kb의 *FSH*-CTP 절편을 분리하여 retroviral vector인 pLN β Z의 *E. coli LacZ* 유전자의 위치에 cloning함으로써 구축하였다(Fig. 1). 새로 재조합된 pLN β -*FSH*-CTP는 Qiagen maxiprep kit을 이용하여 대량 분리한 후 다음 실험에 사용하였다.

4. Retrovirus vector의 생산

재조합된 retroviral vector는 PT67에 calcium phosphate 방법으로 transfection하여 G418 (500 μ g/ml)이 첨가된 선별용액으로 2주간 선별하였으며 형성된 Neo^R (G418 resistant) PT67 세포군을 DMEM/FBS (10%)에서 48시간 배양한 후 virus stock을 수확하였다. 이 virus를 본 실험실에서 구

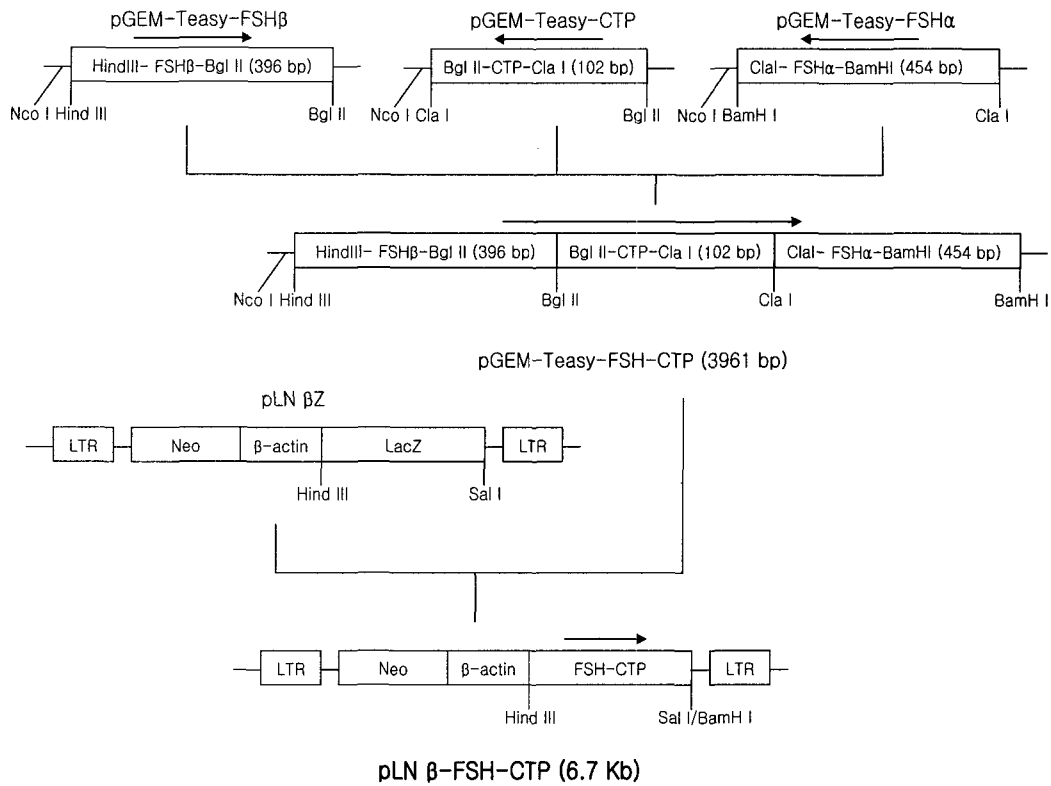


Fig. 1. Strategy of retrovirus vector construction. LTR, long terminal repeat; Neo, *G418* resistant gene; β -actin, rat β -actin promoter; CTP, *carboxyl-terminal peptides* gene; FSH α , *follicle stimulating hormone-alpha* gene; FSH β , *follicle stimulating hormone-beta* gene. Length of each sequence is not drawn to scale.

축한 pseudotype의 retrovirus 생산세포인 293mG PHy (Kim 등, 2001)에 감염시켜 G418 (600 μ g/ml) 이 첨가된 선별용액으로 2주간 선별하였다. 선별된 Neo^R (G418 resistant) 293mGPHy-LN β Z 세포에 calcium phosphate 방법으로 20 μ g의 pHCMV-G를 일시적으로 transfection하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 8시간 배양 후 새 배양액으로 교환하였다. 48시간이 경과한 후 retrovirus가 포함된 배양액을 수확하였다.

5. Virus의 농축과 titer의 측정

수확한 virus stock은 4°C에서 16,700 rpm으로 90분간 vertical rotor (Beckman 70Ti)를 이용하여

원심분리를 하였다. 상등액을 완전히 제거한 후 침전물에 DMEM/FBS를 첨가하여 4°C에서 16시간 방치한 후 재부유하였다. 농축된 virus stock은 0.45 μ m pore-size의 cellulose acetate filter를 이용하여 여과한 후 -70°C에 보관하였다. Virus의 titer를 측정하기 위하여 농축 전과 후의 virus stock을 NIH3T3 세포에 감염시켰다. 24시간 경과 후 세포를 3일 간격으로 G418이 첨가된 선별배양액으로 갈아주어 Neo^R colony forming unit per milliliter (CFU/ml)를 측정하였다.

6. In vitro에서의 FSH 정량을 위한 immuno-assay

본 실험에서 구축한 retrovirus vector system을 이용한 *FSH*-CTP의 *in vitro*에서의 발현 여부를 확인하기 위하여 CHO 세포에 virus를 감염시켰다. NIH3T3와 마찬가지로 G418 (800 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 첨가한 선별배양액으로 2주간 배양하였다. 감염과 선별과정이 끝난 CHO-LN β -*FSH*-CTP 세포를 24시간 배양한 후 배양액을 수확하여 *FSH*를 정량하였다. *FSH*의 정량은 Elecsys *FSH* reagent kit로 electrochem-luminescence immunoassay (ECLIA) 분석기 (Elecsys 2010, Roche)를 사용하여 수행하였다. 대조구로는 virus에 infection되지 않은 CHO 세포의 배양액을 사용하였으며 도출된 결과를 이용하여 *FSH*-CTP 유전자의 발현 정도를 비교하였다.

7. 닭의 배에 대한 감염

본 실험에 사용된 유정란은 이사브라운 산란계의 종란 중에서 60 \pm 3 g 무게의 것으로서, 배자가 계란의 적도 상단부에 위치하도록 하기 위해서 stage X의 종란을 측상향 위치 상태로 10시간 정지한 후 window를 제작하였다. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 polybrene을 첨가한 virus stock의 주입은 특수가공한 microinjection pipette (SIGMA, pipette, microcapillary, 50 μl , 100 mm length)을 이용하여 배의 하층에 주입하였으며, virus의 주입이 끝난 계란은 window를 parafilm으로 3회 감아서 밀봉한 후 측상향 위치 상태로 26 $^{\circ}\text{C}$ 의 부화기에서 1시간 가량 정지함으로써 온도 충격과 물리적 충격을 안정화시켰다. 37.7 $^{\circ}\text{C}$ 의 온도와 상대습도 55% 조건의 부화기에 입란하여 2시간 주기로 전란시키면서 18일간 발생시킨 후, 19일째 부터는 계란을 37 $^{\circ}\text{C}$ 의 온도와 상대습도 75% 조건의 발생기로 옮긴 후 전란하지 않는 상태에서 부화할 때까지 배양시켰다. 배양하는 동안 10일, 18일, 21일째에 계란의 발생 진행 여부를 검란기를 통하여 관찰하였으며 부화한 병아리는 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 사육하였다.

8. *In vivo*에서의 *FSH*의 발현 확인을 위한 RNA 분리와 RT-PCR

부화 후 2주가량 경과한 병아리의 조직에서 *FSH*-CTP 유전자의 발현을 확인하고자 하였다. 절

취한 날개 말단 조직은 액체질소에 넣어서 동결시킨 후 미세하게 파쇄하여 Trizol (Gibco BRL, USA)을 사용하여 RNA를 분리하였다. RT-PCR은 분리한 RNA 1 μg 을 50 pmole의 primer, 0.2 mM dNTP, 1 mM MgSO $_4$, 5 U AMV 역전사 효소(Promega), 5 U *T7*/DNA 중합효소(Promega), AMV/Tfl 5 \times 반응 완충액(Promega)으로 만든 반응액과 혼합한 후, 일차적 cDNA를 합성하기 위하여 48 $^{\circ}\text{C}$ 에서 45분간 반응한 다음 AMV 역전사효소의 활성화와 RNA/cDNA/primer의 변성을 위해 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2분간 반응시켰다. 2차 cDNA 합성과 PCR 증폭을 위하여 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초, 60 $^{\circ}\text{C}$ (*FSH β* 의 경우), 52 $^{\circ}\text{C}$ (Neo의 경우)에서 30초, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초간 반응하는 횟수를 35회 반복 실시한 후, 최종 신장을 위해 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 방치하였다. 반응에 사용한 primer의 서열은 *FSH β* 유전자에 대해서는 + strand primer로 5'AAGCTTAGGATGAAGACACTCCAGTTTTTC TTC3', - strand primer로 5'AGATCTTCTTTCAT TTCACCAAAGGAGCAGTA3'를 사용하였으며, Neo 유전자에 대한 primer 서열로는 + strand primer 서열로 5'ATTCCGATCTGATCAAGAGAC3'과 - strand primer 서열로는 5'TTTCACCATGATATTCGGC A3'을 사용하였다. 반응이 끝난 후 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 방치한 후 1% agarose gel을 이용하여 전기영동을 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 재조합 *hFSH* 유전자의 cloning

성선자극호르몬이나 감상선자극호르몬과 같이 2개의 subunit로 구성되는 호르몬에 있어서 각 subunit을 단일 사슬 유도체로 생산하는 것은 호르몬 단백질의 생물학적 활성과 안정성을 증가시키기 위한 시도이다. 이에 본 연구에서는 두 subunit의 보다 효율적인 연결을 위하여 CTP를 linker로 도입하였는데, 이 CTP의 요소는 몇몇의 proline과 serine 잔기를 포함하고 있어서 두드러진 이차구조가 나타나지 않는다. 또한 두 subunit 사이의 유연성을 제공함으로써 linker로서의 적절한 후보로 생각된다. *FSH*를 단일 사슬로 구축하기 위해서 lin-

ker를 사용할지의 여부에 대한 결정은 이 linker가 호르몬의 분비와 생물학적 활성에 필수적인가 하는 것이다. CTP를 두 subunit에 위치시킨 경우는 그렇지 않은 경우에 비해서 분비가 4배 정도 높게 나타났다(Klein 등, 2002). hCG의 경우에 있어서도 CTP 서열을 제거했을 경우에는 분비율이 감소하는 현상이 나타났다(Sugahara 등, 1996). 그러나 CTP의 존재 여부가 수용체에 대한 결합 친화력이나 단일 사슬의 신호 전달에는 큰 영향을 미치지 않는다. 따라서 loop에 의해서 생기는 3차원적 구조는 *in vitro*에서의 생물학적 활성보다는 세포 내의 작용에 더욱 중요함을 보여준다(Sugahara 등, 1996). 이러한 재조합 FSH는 wild type의 FSH와 *in vivo*와 *in vitro*에 있어서 구조적, 기능적인 유사성을 나타내는 것으로 보고되었다(Mannaerts 등, 1991).

본 실험에서는 FSH α 와 β subunit를 human pituitary gland cDNA library에서 직접 cloning하였으며, 그 결과 102 bp의 CTP, 454 bp의 FSH α , 그리고 402 bp의 FSH β 의 단편을 얻을 수 있었다. 또한 FSH α 와 FSH β subunit를 CTP linker로 연결하여 한 vector 내에서 FSH가 단일사슬로 발현이 되도록 계획하였다. Sequence가 확인된 FSH-CTP는 retrovirus vector인 pLN β Z의 β -actin promoter의 downstream의 위치에 cloning하였다(Fig. 1).

2. 다양한 표적세포에 대한 감염성 조사

재조합한 pLN β FSH-CTP는 pseudotyped retrovirus producing cell인 293mGPHy에 도입하여 293 mGPHy-LN β -FSH-CTP를 구축하고 VSV-G 피막 유전자를 가진 pHCMV-G plasmid를 일시적으로 transfection하여 LN β -FSH-CTP retrovirus stock을 수확하였다. 수확한 virus stock을 초원심분리로 고농축하여 NIH3T3에 감염시켜서 LacZ⁺ TU/ml와 Neo^R CFU/ml titer를 측정하였다. 농축하기 전의 retrovirus의 titer는 1×10^5 정도로 나타났으며, 1,000 배로 농축한 후의 titer는 1×10^8 으로 나타났다. Gibbon ape leukemia virus의 피막 단백질로 피막이 형성된 전통적인 retrovirus를 농축한 경우 virus의 titer가 농축 배수의 약 1/20로 나타난 보고와 비교해 볼 때(Kim 등, 2001), VSV-G로 피막이 형성된

virus는 고농축 후에도 감염성 저하 등의 현상이 거의 나타나지 않는 것으로 보인다.

3. *In vitro*에서의 FSH 정량

CHO 세포는 치료의 목적으로 재조합된 단백질의 생산에 널리 사용되고, 사람의 CG, FSH, LH와 같은 gonadotropic hormone의 다당류의 구조의 기능을 비롯한 생리학적인 연구에 주로 사용된다(Keene 등, 1989; Hard 등, 1990). 본 연구에서도 CHO 세포에 LN β FSH-CTP를 도입하여 CHO-LN β -FSH-CTP 세포를 구축한 후 배양액을 수확하여 FSH를 정량하였다. 그 결과, FSH-CTP가 전이되지 않은 CHO 세포와 FSH α 와 β 가 co-infection된 세포에서는 각각 0.18 mIU/ml, 0.19 mIU/ml로 나타났는데 비하여 CHO-LN β -FSH-CTP의 배양액에서는 3.16 mIU/ml로 나타났다(Fig. 2). 즉, 단일사슬로 재조합된 FSH의 발현이 대조군에 비하여 약 17배의 발현율을 보였으며 이는 두개의 subunit를 linker를 이용하여 연결한 형태의 호르몬 단백질의 분비가 증가함을 나타내는 것이다.

다른 연구에서도 hCG의 β subunit의 CTP를

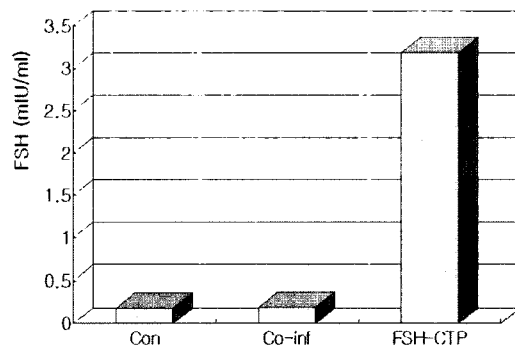


Fig. 2. Measurement of human FSH in culture media of non-transgenic and transgenic CHO cells using ECLIA. Con: non-transgenic CHO cells. Co-inf: CHO cell was co-infected with FSH α and FSH β viruses. FSH-CTP: CHO cell was infected with FSH-CTP virus. All cell culture media harvested after incubate during 48 hours.

*FSH*에 응용한 경우, *FSH*의 반감기를 연장시키는 것으로 알려져 있고(Arora 등, 1994), 또한 체내에 잔존하는 시간이 증가한 것으로 나타났는데 실제, 1992년 Fares 등이 쥐를 대상으로 *FSH*에 CTP를 부가한 형태와 wild type의 *FSH*를 투여하여 비교해 보았을 때 전자가 *in vivo*에서 오랫동안 생물학적 활성을 나타내며 일정시간 경과 후 혈청에 잔존한 수위가 높게 측정된 것으로 보아서 임상적 치료에 있어서도 그 효과가 클 것으로 보인다.

4. Retrovirus stock을 이용한 *FSH* 유전자의 전이에 의한 형질전환 닭의 생산

*In vitro*에서 발현이 확인된 재조합 *FSH*를 *in vivo*인 닭의 genome 내로 전이시키기 위하여 고농축된 retrovirus stock을 닭의 배반엽층에 주입하였다. 조작한 유정란의 부화율을 증가시키기 위하여 window 제작시 발생하는 물리적인 손상을 최소화하고자 하였다. 그의 일환으로 window의 크기를 최소화하고 window의 제작시 발생하는 난각 파편이 안으로 들어가지 않도록 하였으며 배자를 상단부에 위치하도록 하여 조작 거리를 짧게 확보함으로써 기질의 손상에 의한 부화율의 저하를 방지하고 micropipette의 말단을 경사진 형태로 제작하여 배반엽 층의 구멍이 최소화되도록 하였다.

조작전의 유정란의 부화율은 거의 100%를 나타냈으며 DMEM/FBS를 주입한 경우에는 부화율이 45%로 감소하였다(Table 1). 이러한 현상은 window 제작시 발생하는 물리적인 손상과 주입시 나타나는 배반엽층의 구멍에 의한 것으로 추정된다. Virus를 주입한 군은 18%의 부화율을 나타내었는

데 이는 retrovirus의 주입이 배발생이나 부화에 부정적인 영향을 나타내는 것을 의미한다(Table 1).

Retrovirus vector에 의한 성공적인 유전자 발현에 대한 확인은 virus를 주입한 군 중 부화한 병아리의 날개 말단 조직에서 분리한 RNA를 이용한 RT-PCR에 의해서 수행되었다. 사용한 primer는 성선자극호르몬의 종류에 따라서 특이적 subunit인 β subunit에 해당하는 primer와 Neo 유전자에 대한 primer를 사용하였으며, 그 결과 11마리 중 10마리에서 396 bp의 *FSH β* 와 600 bp의 *Neo* 유전자에 대한 산물을 전기영동 상에서 확인하였으며 형질전환율은 약 91%로 나타났다(Fig. 3, Table 2). 이에 비해 형질전환 닭의 혈액 표본에서는 재조합 *hFSH*의 존재를 확인할 수 없었다. 그 원인으로는 체세포에서 발현되어 혈액내로 분비된 *FSH*의 양이 너무 미미하여 본 실험에서 사용한 immunoassay 방법으로는 감지할 수 없는 것으로 추측된다.

부화한 병아리의 91%가 형질전환 개체로 판명된 결과는 적어도 형질전환 닭의 생산에 있어서 본 연구진의 retrovirus vector system이 타 방법에 비해 우월함을 증명하고 있다. 그러나 60,000 여개의 모든 배세포에 완전한 외래 유전자의 전이가 성공적으로 이루어지기는 매우 어려운 실정이다. 이에 따라 나타날 수 있는 chimerasm에 대한 해결과, 전이된 외래 유전자의 지속적인 발현으로 인한 생리적인 불균형은 앞으로 해결하여야 할 문제점으로 지적되고 있다. Chimerasm은 수 대에 걸쳐 germ line에 유전자가 전이된 개체들 간의 교잡과 선발을 통하여 해결할 수 있을 것으로 생각된다. 생리적인 불균형에 의한 문제점을 해결하기 위하

Table 1. Hatching rates of manipulated chicken embryos

Treatment	No. of embryos	No. (%) of embryos hatching
Control (no injection)	10	10 (100)
DMEM/FBS	20	9 (45)
FSH-CTP	62	11 (18)

To each freshly laid egg, 10 μ l of DMEM/FBS or concentrated virus stock (*FSH-CTP*) was injected into the subgerminal cavity of stage X chicken embryos, then incubated for 21 days.

Table 2. Efficiency of gene transfer to chicken embryos

Medium	No. of eggs injected	No. (%) of eggs hatching	No. of LN β FSH-CTP + embryos	
			FSH-CTP	Neo
DMEM/FBS	20	9 (45)	0	0
FSH-CTP	62	11 (18)	10	10

To each freshly laid egg, 10 μ l of DMEM/FBS, 100X post-concentrated virus stock was injected into the subgerminal cavity of stage X chicken embryos, then incubated for 21 days before RT-PCR assay.

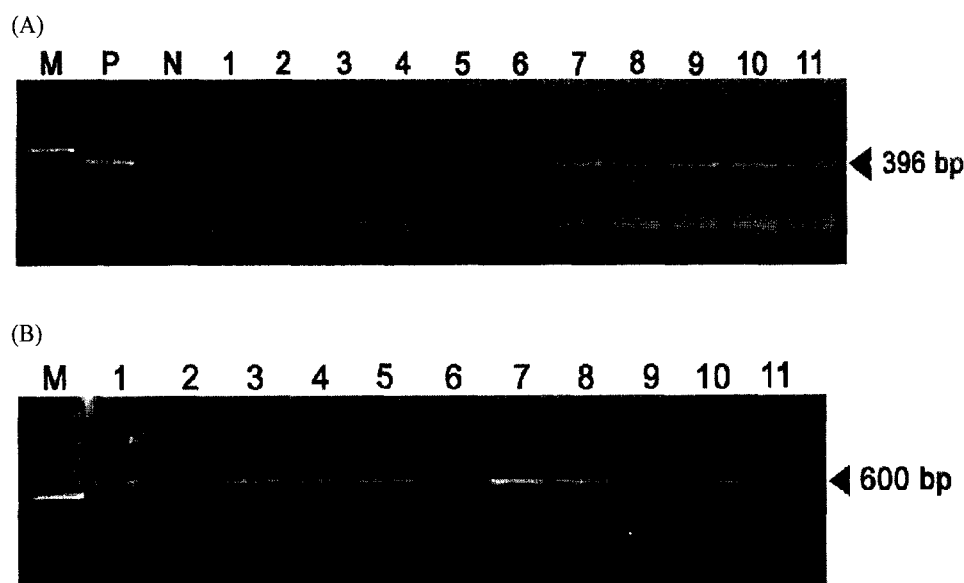


Fig. 3. RT-PCR analyses of the FSH β (A) and Neo (B) genes in the manipulated chickens. M: 100 bp ladder, P: Positive control, N: Negative control, 1~11: Samples from 11 different chickens.

여 본 연구실에서는 현재 널리 사용되고 있는 β -actin promoter나 CMV (cytomegalovirus) promoter 대신에 조직특이적 promoter나 유도적 promoter를 사용한 retrovirus vector system을 구축 중이다. 이 system이 구축되면 보다 효율적이고 성공적으로 외래 유전자가 전이된 형질전환 가금을 생산할 수 있을 것이다.

IV. 요약

*hFSH*는 α 와 β subunit으로 구성된 heterodimer

로서 두 subunit의 조합은 활성을 지닌 호르몬의 생산에 있어서 매우 중요한 단계이다. 이 조합과정의 효율을 증대하기 위하여 본 연구에서는 *hFSH*를 단일사슬의 단백질로 구축하고자 하였으며, 이의 일환으로 각 subunit에 대한 cDNA 단편을 연결하는 서열로 CTP linker를 도입하였다. 재조합한 *hFSH*-CTP 유전자는 pseudotype의 retrovirus vector system을 이용하여 CHO 세포와 닭의 배로 각각 전이되었다. CHO 세포에서의 *FSH*의 생산은 α 와 β 를 각각 전이한 경우에 비해 *hFSH*-CTP를 전이한 경우에서 17배 이상 높은 것으로 나타났다.

닭에서는 유전자 전이를 시도한 62개체 중에서 11마리가 부화하였으며 그 중 10마리가 형질전환된 닭인 것으로 RT-PCR을 통하여 확인되었다. 그러나 개체의 혈중 FSH의 생산은 확인하지 못하였다. 이상의 실험 결과를 바탕으로 하여 재조합된 hFSH-CTP는 FSH의 발현에 매우 효율적인 구조로 생각되며, 또한 retrovirus를 이용한 유전자 전이 방법은 형질전환 가금의 생산에 있어서 매우 적절한 방법으로 사료된다.

V. 인용문헌

1. Arora, N., Williamson, L. C., Leppla, S. H. and Halpern, J. L. 1994. Cytotoxic effects of a chimeric protein consisting of tetanus toxin light chain and anthrax toxin lethal factor in non-neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 269: 26165-26171.
2. Hard, K., Mekking, A., Damm, J. B. L., Kammerling, J. P., De Boer, W., Wijnands, R. A., and Vliegthart, J. F. G. 1990. Isolation and structure determination of the intact sialylated N-linked carbohydrate chains of recombinant human follitropin expressed in Chinese hamster ovary cells. *Eur. J. Biochem.* 193: 263-271.
3. Keene, J. L., Matzuk, M. M., Otani, T., Fauser, B. C. J. M., Galway, A. B., Hsueh, A. J. W., and Boime, I. 1989. Expression of biologically active human follitropin in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 264: 4769-4775.
4. 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: 163-169.
5. Klein, J., Lobel, L., Pollak, S., Ferin, M., Xiao, E., Sauer, M. and Lustbader, J. W. 2002. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of single-chain recombinant human follicle-stimulating hormone containing the human chorionic gonadotropin carboxyterminal peptide in the rhesus monkey. *Fertil. Steril.* 77: 1248-1255.
6. Lin, S., Galiano, N., Culp., 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.
7. Mannaerts, B., Leeuw, R. de, Ravestein, A. Van, Wezenbeek, P. Van, Schuurs, A. and Kloosterboer, H. 1991. Comparative *in vitro* and *in vivo* studies on the biological characteristics of recombinant human follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 129: 2623-2630.
8. Matzuk, M. M., Hsueh, A. J., Lapolt, P., Tsafiri, A., Keene, J. L. and Boime, I. 1990. The biological role of the carboxyl-terminal extension of human chorionic gonadotropin beta-subunit. 1990. *Endocrinology* 126:376-383.
9. Muyan, M. and Boime, I. 1998. The carboxyl-terminal region is a determinant for the intracellular behavior of the chorionic gonadotropin β subunit: effects on the processing of the Asn-linked oligosaccharides. *Mol. Endocrinol.* 12: 766-772.
10. Pierce, J. and Parsons, T. 1981. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* 50: 465-495.
11. Rohdewohld, H., Weiher, H., Reik, W., Jaennisch, R. and Breindi, M. 1987. Retrovirus integration and chromatin structure: Moloney murine leukemia proviral integration sites map near DNase I-hypersensitive sites. *J. Virol.* 61: 336-343.
12. Sano, T., Glazer, A. N. and Cantor, C. R. 1992. A streptavidin-metallothionein chimera that allows specific labeling of biological materials with many different heavy metal ions. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. USA 89: 1534-1538.
13. Sugahara, T., Pixley, M. R., Minami, S., Perlas, E., Ben-Menahem, D., Hsueh, A. J. W. and Boime, I. 1995. Biosynthesis of a biologically active single peptide chain containing the human common and chorionic gonadotropin subunits in tandem. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 2041-2045.
 14. Sugahara, T., Grootenhuis, P. D. J., Sato, A., Kudo, M., Ben-Menahem, D., Pixley, M. R., Hsueh, A. J. W. and Boime, I. 1996. Expression of biologically active fusion genes encoding the common subunit and either the CG β or *FSH* β subunits: role of linker sequence. Mol. Cell Endocrinol. 125: 71-77.
 15. Takeuchi, M., Inoue, N., Strickland, T. W., Kubota, M., Wada, M., Shimizu, R., Hoshi, S., Kozutsumi, H., Takasaki, S. and Kobata, A. 1989. Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 7819-7822.
 16. Temin, H. M. 1989. Retrovirus variation and evolution. Genome 31: 17-22.
- (접수일자: 2003. 5. 10. / 채택일자: 2003. 7. 2.)