

Feasibility of Coculture Method for Production of Chimeric Mice Using J1 Embryonic Stem Cells

Hye-Jun Shin^{1,2}, Sung-Sik Park¹, Sun-Uk Kim^{1,3}, Sang-Mi Cho¹, Ying-Hao Han^{1,2}, Hyun-Sun Kim¹, Sang-Geun Kim^{1,2}, Dong-Seok Lee^{1†} and Dae-Yeul Yu¹

¹Laboratory of Human Genomics, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-806, Korea

²College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

³Laboratory of Reproductive and Developmental Biology, School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

The demand for the production of gene-defective mice from embryonic stem (ES) cells is increasing to clarify decisive gene function in vivo. Although blastocyst injection is widely used to generate ES cell-mediated knockout mice, coculture method has been alternatively used because of several advantages, such as low cost and simple procedure. Thus, this experiment was designed to demonstrate the feasibility of the coculture method using J1 ES cells, which are known to be efficient for blastocyst injection. Eight-cell embryos were harvested from 2.5 days post-coitum (dpc), denuded with acid tyrode's solution, and transferred onto trypsinized J1 ES cells. Aggregation was carried out following two typical methods, which are simple coculture method and aggregation in groove prepared by aggregation needle. Successfully aggregated-embryos were developed to blastocysts for 24 h and transferred into uterus of pseudo-pregnant foster mother. Chimeric offspring was judged by coat pigmentation. In this study, we could obtain chimeric mice from all the two aggregation methods, but the chimera production efficiencies in coculture using groove were three times higher at least than those in the other group. In conclusion, these observations suggest that coculture method should be available for production of knockout mice from J1 ES cells. Presently, the germ-line transmission rates of the chimeras produced from the two methods are under investigation.

Key Words: Embryonic stem cell, Coculture aggregation, Chimeric mice

서 론

초기 수정란에서의 발생과정과 유전적 조절 연구는 생쥐 배아줄기세포 (embryonic stem cell, ES cell)의 개발과 더불어 유전자의 기능연구에 많은 가능성과 기회를 제공하여 왔다. 이러한 배아줄기세포는 배반포의 내부세포괴 (inner cell mass, ICM)로부터 유래된 것으로서 체외에서 배양한 후에도 다능성을 유지하는 것으로 알려져 있다 (Evans et al., 1981; Martin, 1981). 이와 더불어 비교적 무제한적으로 증식이 가능하다는 특성 때문에 삽입된 유전자에 의한 상동적 재조합 (homologous recombination)에 의하여 특정 유전자를 결손 시키는 것

이 가능하였다 (Gossler et al., 1989; Friedric et al., 1991; Robertson, 1987). 이와 같은 방법을 이용하여 만들어진 유전자결손 생쥐들은 유전자의 기능 연구에 있어 매우 효과적으로 이용되고 있으나 많은 방법적인 복잡성은 개선의 여지가 필요한 실정이다.

유전자결손 생쥐를 효율적으로 생산하기 위해서는 카이미라 (chimeras) 생쥐의 생산성을 재고하는 것이 중요하다. 가장 보편적인 방법으로는 미세하게 세공된 유리바늘을 이용하여 배반포의 포배강에 배아줄기세포를 직접 주입하는 배반포 미세주입법이 있다 (Bradley, 1987). 이 방법은 생식선 이행능을 가진 카이미라 생쥐의 생산성이 높은 것으로 보고 되어 널리 이용되고 있으나, 많은 시간, 노력 및 숙련을 요하는 단점이 있다. 더욱이 이 기술을 수행하는 데에는 pipette puller, microforge, grinder 및 micromanipulator와 같은 고가의 특수한 장비들을 필요로 하기 때문에 비용면에서도 매우 제한적이다. 이와는 대조적으로 투명대를 제거한 수정란과 배아줄기세포를 공배양하여 응집 카이미라를 생산

* 논문 접수: 2004년 11월 10일
수정 재접수: 2004년 12월 10일

† 교신저자: 이동석, (우) 305-806 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 한국생명공학연구원 인간유전체연구소
Tel: 042-860-4349, Fax: 042-860-4608
e-mail: lee10@mail.kribb.re.kr

하는 기술은 비교적 적은 숙련을 요할 뿐만 아니라 비용절감 효과를 큰 장점으로 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 특히 많은 수의 카이미라 수정란을 생산할 수 있다는 장점은 비교적 낮은 카이미라의 생산성을 극복할 수 있을 것으로 기대되고 있다. 따라서 본 연구에서는 공배양 방법을 통한 카이미라 생쥐의 생산 가능성을 조사하고 유전자결손 생쥐 생산에 가장 널리 이용되고 있는 J1 배아줄기세포의 이용성을 극대화 하고자 한다.

재료 및 방법

1. 8-세포기 수정란의 준비

실험에 공시된 모든 생쥐는 온도 22±1°C, 습도 45±10% 및 12시간 동안 (AM 7:00~PM 7:00) 조도가 유지된 specific pathogen-free/virus antibody-free 환경하에서 사육되었다. 6주령의 ICR 암컷 생쥐의 복강에 5 IU의 pregnant mare's serum gonadotropin (Folligon, Intervet Co., The Netherlands)를 복강 주사하고 그로부터 46~48시간 후에 5 IU의 human chorionic gonadotropin (Chorulon, Intervet Co., The Netherlands)을 복강 주사하여 과배란을 유도하였다. 과배란 유도된 암컷 생쥐를 동종의 수컷 생쥐와 1:1로 교미시켰으며, 다음날 오전에 질전 (vaginal plug)을 확인하여 임신 여부를 판단하였다. 교미일로부터 2.5일 후에 암컷 생쥐를 경추 탈골로 도살하고 복강을 절개하여 난관 (oviduct) 및 자궁 (uterus)을 적출하였다. 0.4% BSA가 첨가된 M2 배양액 (Quinne et al., 1982)을 난관누두부 (ampulla)로부터 관류시킴으로써 8-세포기 수정란을 회수하였으며, acid tyrode's 용액을 이용하여 투명대를 제거한 후 응집에 사용되었다.

2. 배아줄기 세포의 배양

J1 배아줄기세포의 배양은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen)을 기본 배양액으로 하여 10% fetal bovine serum (FBS, HyClone), 5% ES-qualified FBS (Invitrogen), 0.1 mM β-mercaptoethanol (Sigma-aldrich), 1×nonessential amino acids (Invitrogen), antibiotics (Invitrogen) 및 1000 IU의 leukemia inhibitory factor (Chemicon)를 첨가하여 사용하였다. Feeder layer는 임신 13.5일령의 생쥐 태아로부터 회수한 섬유아세포 (mouse embryonic fibroblast, MEF)를 10 μg/ml mitomycin C (Sigma-aldrich)로 3시간 처리하여 준비하였다. 본 실험에서 사용된 J1 배아줄기세포는 peroxiredoxin 유전자를 결실시키는 데 사용된 세포를 subcloning하여 사용하였다.

3. 8-세포기와 ES 세포의 공배양

응집 카이미라의 생산은 단순 공배양 (Woods et al., 1993) 및 aggregation needle을 이용한 공배양법을 이용하였다. 간단히 요약하면, log phase에서 증식 중인 J1 배아줄기세포를 0.25% trypsin/5.3 mM EDTA를 처리하여 분리하고, 30분 동안 37°C, 5% CO₂ Incubator에서 배양하여 상층액을 회수함으로써 용기 바닥에 먼저 고착된 MEF를 제거하였다. 단순 공배양법에 의한 응집 카이미라의 생산을 위해 배아줄기세포의 농도를 1.5×10⁶/ml로 조정된 후 60 mm 배양 용기 (Nunc)에 20 μl의 미세액적으로 제조하였으며, 각 미세액적 내에 약 5~10개의 투명대가 제거된 8-세포기 수정란을 옮겨 2시간 동안 공배양하였다 (Fig. 1). 배양 후 8-세포기 수정란의 표면에 부착된 ES 세포의 수가 5~6개가 되도록 피펫팅하여 조정하였다. 응집이 완료된 수정란은 0.4% BSA가 첨가된 M16 배양액 (Whittingham, 1971)에 넣어 20시간 동안 37°C, 5% CO₂ incu-

Table 1. Production of chimeras by ES cell-embryo coculture

J1 ES Subclones	No. of embryos aggregated	No. (%) of blastocysts transferred ^a	No. (%) of pregnant/FM used	No. (%) of pups		No. (%) of chimeras produced ^d
				Born ^b	Survived ^c	
#1	466	332 (71.2)	8/13 (61.5)	22 (6.7)	18 (81.8)	1/18 (5.5)
#2	380	268 (70.5)	5/8 (62.5)	18 (6.8)	13 (72.2)	2/13 (15.3)

Abbreviations are FM, foster mother. ^aSome newborn mice died due to cannibalism and/or artificial accidents. ^bBirth rate=no. of pups born/no. of blastocysts used. ^cSurvival rate=no. of pups survived/no. of pups born. ^dChimera productivity=no. of chimeras/ no. pups survived.

Table 2. Production of aggregation chimeras by aggregation needle

J1 ES Subclones	No. of embryos aggregated	No. (%) of blastocysts transferred ^a	No. (%) of pregnant/FM used	No. (%) of pups		No. (%) of chimeras produced ^d
				Born ^b	Survived ^c	
#1	359	312 (86.9)	7/12 (58.3)	16 (5.2)	11 (68.7)	4/11 (36.3)
#2	413	336 (81.4)	7/13 (53.8)	19 (5.7)	14 (73.6)	5/14 (35.7)

Abbreviations are FM, foster mother. ^aSome newborn mice died due to cannibalism and/or artificial accidents. ^bBirth rate=no. of pups born/no. of blastocysts used. ^cSurvival rate=no. of pups survived/no. of pups born. ^dChimera productivity=no. of chimeras/ no. pups survived.

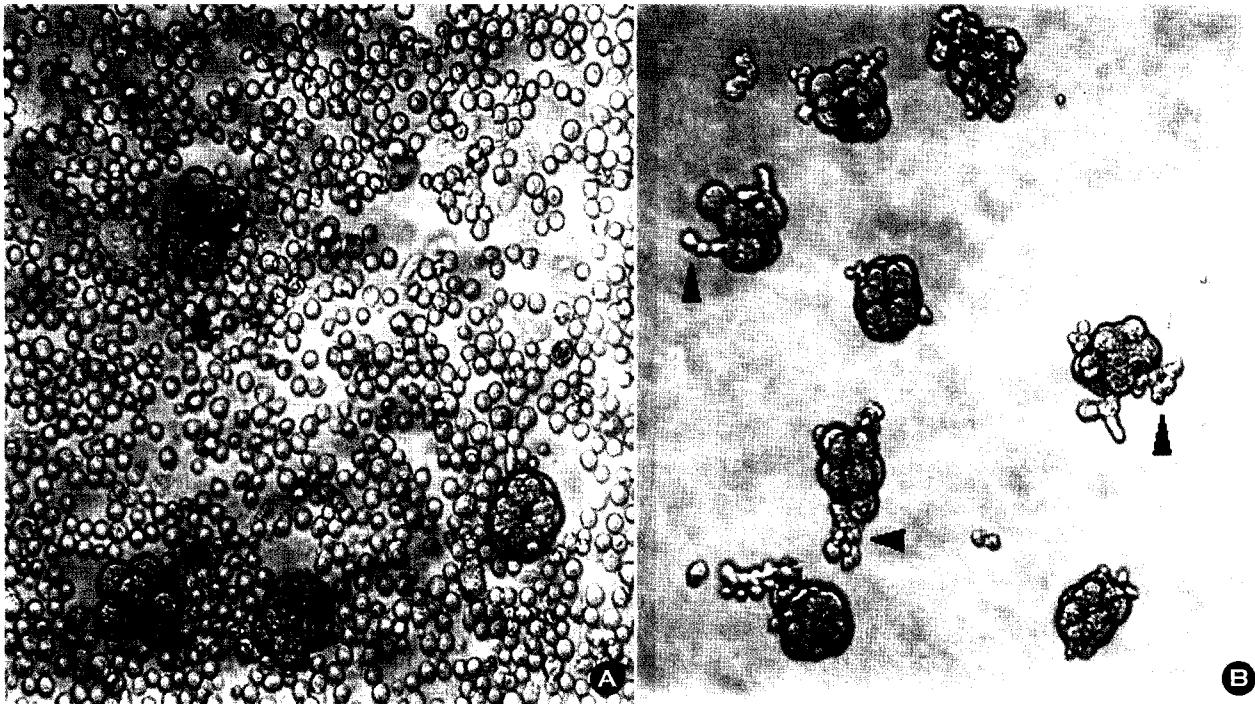


Fig. 1. ES cell-embryo coculture. (A) Eight-cells (arrowhead) settled on a lawn of J1 ES cell. (B) Compacted eight-cell embryos with single cells or groups of J1 ES cells attached (arrowheads) after a 2 hr coculture. These embryos were moved to M16 droplets for overnight culture to the blastocyst stage.

bator에서 배양하였다. 또 다른 응집 카이미라의 생산 방법은 60mm 배양 용기의 바닥에 darning needle (aggregation needle) (BLS, Budapest, Hungary)을 이용하여 홈을 만든 후, 투명대가 제거된 8-세포기 수정란을 하나씩 넣고, 개개의 세포로 된 ES 세포를 10~15개 정도로 조정하여 넣어준 뒤 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다 (Fig. 2).

4. 응집 카이미라 생쥐의 생산

배반포로 발달시킨 카이미라 (chimeras) 수정란은 위임신유기 2.5일령의 대리모의 왼쪽 자궁에 15~25개씩 이식하였다. 태어난 새끼들 중 모피의 색을 관찰하여 카이미라 생쥐의 선별 및 정도를 판단하였다.

결 과

1. 단순 공배양법에 의한 카이미라 생쥐의 생산

J1 배아줄기세포 subclone를 단순 공배양법에 의하여 카이미라 생쥐를 생산한 결과는 Table 1에 정리하였다. 2개의 subclone과의 응집에 사용된 8-세포기 수정란은 각각 466 및 380개이며, 이들로부터 총 332 및 268개의 카이미라 배반포를 생산하여 각각 8 및 5마리의 임신된 대리모로부터 각각 22 (6.7%) 및 18마리 (6.8%)의 산자를 얻을 수 있었다. 대리

모의 포유 중 각각 18 (81.8%) 및 13 (72.2%) 마리의 산자가 생존하였고, 모피색의 관찰 결과 카이미라의 생산효율은 각각 5.5 및 15.3%인 것으로 조사되었다.

2. Aggregation needle을 이용한 응집 카이미라 생쥐의 생산

Aggregation needle을 이용하여 만든 홈에서 24시간 동안의 공배양 결과는 Table 2에 정리하였다. 2개의 J1 배아줄기세포 subclone과 응집된 각각 359 및 413개의 8-세포기 수정란으로부터 총 312 및 336개의 카이미라 배반포를 생산하였으며, 대리모에 이식한 후 각각 16 (5.2%) 및 19마리 (5.7%)의 산자를 얻을 수 있었다. 대리모의 포유 중 각각 11 (68.7%) 및 14 (73.6%) 마리의 산자가 생존하였고, 모피 색을 관찰한 결과 각각에서 4 (36.3%) 및 5마리 (35.7%)의 카이미라 생쥐를 얻을 수 있었다 (Fig. 3).

고 찰

배아줄기세포에 상동적 재조합법으로 유발시킨 유전자 결손은 생체내의 유전자의 기능을 밝혀내는데 있어 매우 결정적이고 효율적인 방법이라 할 수 있다 (Gossler et al., 1989; Friedrich et al., 1991). 그러나 이러한 과정은 매우 복잡하고 많

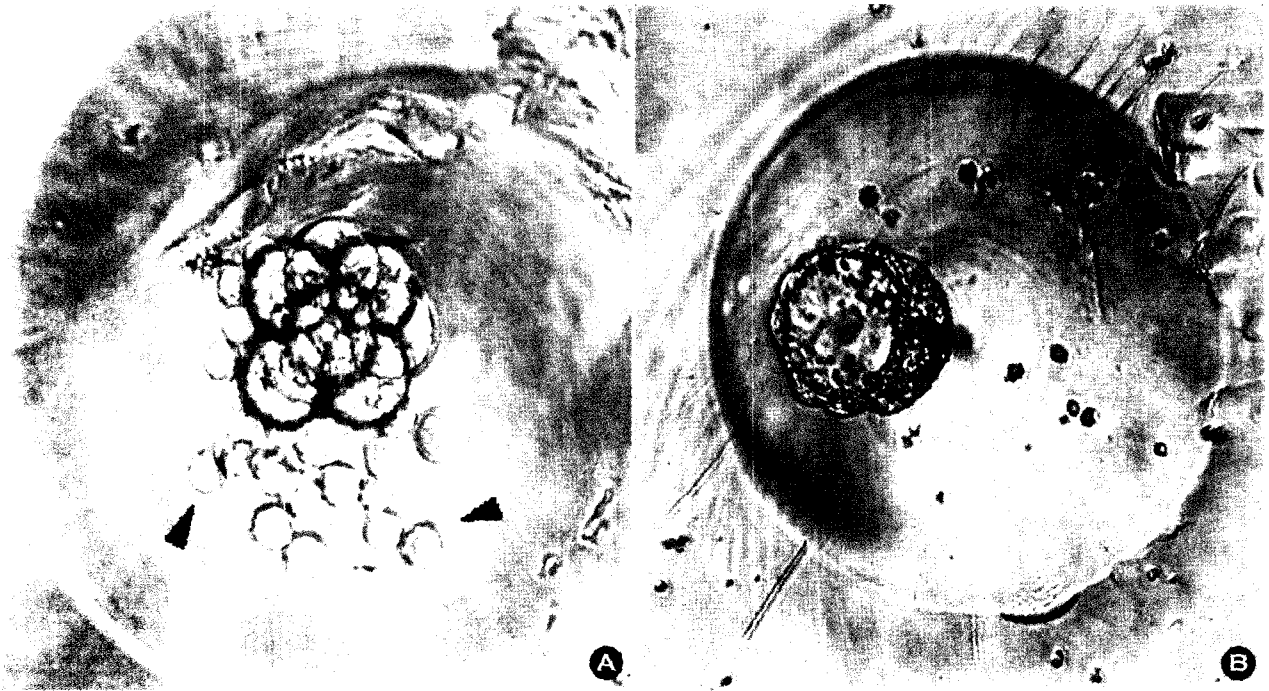


Fig. 2. Embryo-ES cell aggregation coculture. (A) Single embryo of eight-cell (arrowheads) and cluster containing 10~15 ES cells were grooved in a hole made by an aggregation needle. (B) The embryo-ES cell aggregate cultured with M16 for 24 hr.



Fig. 3. Production of chimeras by aggregation. Chimeric mice prepared from coculture of CD1 (albino) embryos with J1 ES cells derived from 129 Sv (agouti) strain of mice. The chimeric mice were mated with CD1 mice at 8 weeks old, finding for the germ-line transmission.

은 비용을 요하기 때문에 방법적인 개선을 위한 다양한 연구가 있어 왔다. 특히, 카이미라 수정란을 제작하는데 있어 기존에 행해져 오던 실험 방법들의 이러한 문제점을 보다 개선하기 위하여 투명대가 제거된 초기배와의 공배양법이 고안되었다. 이 방법은 배반포에 미세주입하는 방법에 비하여 고가의 장비나, 특수한 기술 또는 많은 숙련을 요하지 않기 때문에 유전자 조작한 생쥐의 생산을 보다 용이하게 할 수 있다 (Gen et al., 1999). 카이미라 생쥐의 생산 효율은 생쥐의 과

배란 유도시의 반응이나 회수한 수정란의 상태 그리고 이식되었을 때 배아줄기세포와 수정란의 계통적 조화 (strain compatibility) 등 여러 가지 요인들에 의해 결정되며 (Schuster-Gossler et al., 2001), 본 연구에서 도출된 결과들은 국내에서는 최초로 미세주입에 전적으로 이용되어온 J1 세포 또한 간단한 공배양법에 의해 카이미라 생쥐를 생산할 수 있음을 보여준 것이라 할 수 있다.

본 연구에서는 카이미라 생쥐를 생산하기 위하여 공배양 응집법을 사용하였으며 그 과정에서도 배아줄기세포와 수정란의 응집과정에 있어 약간의 차이를 두어 실험하였다. 첫 번째 단순 공배양 방법은 배아줄기세포를 배양 용기에 먼저 배양한 후 그 위에 수정란을 올려놓아 응집을 유도한 것으로써 (Fig. 1A) 현미경 하에서 확인한 결과 응집이 성공적으로 이루어졌음을 확인할 수 있었다 (Fig. 1B). 또 다른 방법은 배양 용기에 aggregation needle 로 홈을 만들고 그 안에 한 개의 수정란 (Fig. 2A)과 1~15개의 배아줄기세포를 넣어 24시간 동안 응집을 유도한 것으로써 응집이 성공적으로 이루어졌음을 확인할 수 있었다 (Fig. 2B). 이 두 방법 모두를 통해서 유사한 산자 출생률 및 생존율을 얻을 수 있었으나 카이미라의 생산효율은 두 번째 방법이 우수한 것으로 조사되었다. 이러한 결과는 수정란의 표면에 붙은 배아줄기세포의 숫자, 공배양 시간 및 응집력을 증가시키는 환경조성의 중요성을 시사한다 할 수 있다. 또한 응집 수정란의 배반포 발달

률에 있어 단순 응집법 (71.2 및 70.5%, Table 1)에 비해 두 번째 방법 (86.9 및 81.4%, Table 2)이 월등히 높은 것으로 조사되어, 여러 가지 측면에서 후자의 방법이 보다 효율적이라 판단되었다. 그러나 이러한 응집 배양간 결과의 차이가 심각하게 존재한다 할지라도 본 연구에 사용된 두 가지 방법 모두에서 카이미라 생쥐를 양산 할 수 있었기 때문에 J1 배아줄기세포를 이용한 유전자결손 생쥐 생산에 미세주입과 마찬가지로 공배양 기법 또한 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 기대되었다. 현재 태어난 카이미라 생쥐의 생식선 이행 능력을 검증하기 위하여 역교배를 실시하고 있으며, 이와 더불어 공배양 방법의 개선을 통하여 카이미리즘 빈도를 재고하기 위한 다각적인 방법을 모색 중에 있다.

Acknowledgement

This work was supported by the 21st Century Frontier program in Functional Human Genome Project of Korea Grant No. HGC030-0324 and a grant from KRIBB Research Initiative program.

REFERENCES

- Bradley A. Production and analysis of chimeric mice. In: Robertson EJ (eds.), *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells*. IRL Press, Oxford. 1987: 113-152.
- Evans MF, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981. 292: 154-156.
- Friedric G, Soriano P. Promoter traps in embryonic stem cells: A genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev*. 1991. 5: 1513-1523.
- Gossler A, Joyner AL, Rossant J, Skarnes WC. Mouse embryonic stem cells and reporter constructs to detect developmentally regulated genes. *Science*. 1989. 244: 463-465.
- Gen K, Yoichi Y, Kayo Y, Yutaka S, Soh O, Yuka N, Takashi M, Junji T. Easy assessment of ES cell clone potency for chimeric development and germ-line competency by an optimized aggregation method. *J Biochem Biophys Methods*. 1999. 39: 137-142.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981. 78: 7634-7638.
- Robertson EJ. Embryo-derived stem cell lines. In: Robertson EJ (eds.), *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford. 1987: 71-112.
- Schuster-Gossler K, Lee AW, Lerner CP, Parker HJ, Dyer VW, Scott VE, Gossler A. Use of coisogenic host blastocysts for efficient establishment of germline chimeras with C57BL/6J ES cell lines. *Biotechniques*. 2001 31: 1022-1026.
- Wood SA, Allen ND, Rossant J, Auerbach A, Nagy A. Non-injection methods for the production of embryonic stem cell-embryo chimeras. *Nature*. 1993. 365: 87-89.
- Wood SA, Pascoe WS, Schmidt C, Kemler R, Evans MJ, Allen ND. Simple and efficient production of embryonic stem cell-embryo chimeras by coculture. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993. 90: 4582-4585.