

## In Vitro에서의 Tetracycline Inducible Expression System에 의한 재조합 돼지 성장호르몬 유전자의 발현

권모선 · 구분철 · 김태완<sup>†</sup>

대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실

### 초 록

본 연구에서는 돼지의 체지방을 감소시키고 성장을 촉진시키는 인자인 PGH를 cloning하여 이 유전자를 외래 유전자의 발현이 유도적으로 조절되는 Tet system에 도입하고자 하였다. 또한 유전자의 발현이 turn on되었을 때 그 발현 정도를 최대화하기 위하여 WPRE 서열을 도입하였다.

구축된 각각의 vector는 retrovirus 생산 세포주에 도입하여 virus를 생산하였으며 이를 여러 종류의 표적세포에 감염시켜서 PGH 유전자의 발현을 확인한 결과,  $1 \times 10^6$  세포에서 350~2,100 ng의 PGH가 분비되었으며 특히 PFF 세포에서 가장 높은 발현을 나타내었다. Tet system에 도입된 PGH의 발현이 유도적으로 조절되는지를 PFF 세포에서 확인한 결과, 유도 효율이 2~6배로 나타났으며 WPRE 서열이 rtTA 유전자의 downstream에 위치한 조건에서 가장 높은 유도 효율을 나타내었다. 이러한 PGH 유전자의 유도적인 발현의 조절은 고급육 생산의 형질전환 돼지 연구에 있어서 가장 큰 문제점이 되는 PGH 유전자의 과도한 발현에 의한 생리적인 부작용을 최소화할 수 있는 해결 방안으로 제시될 수 있을 것이다.

(주제어 : PGH, Tetracycline-inducible expression system, WPRE, PFF)

### 서 론

1980년대에 성장호르몬 유전자를 이용한 수퍼 생쥐의 생산(Palmiter 등, 1982) 이후로 축산 분야에서는 소, 돼지, 토끼, 면양 등의 가축과 닭과 오리 등의 가금류 대상으로 하여 성장의 촉진과 육질의 향상, 그리고 산유량의 증가 등을 목적으로 활발한 연구가 이루어지고 있다. 이러한 목적을 달성하기 위한 여러 후보 물질 중에서 성장호르몬(somatotropin)이 가장 오래 전부터 각광을 받아 왔었는데, 돼지의 성장호르몬(porcine growth hormone; PGH)은 뇌하수체 전엽에서 만들어지는 150여 개의 아미노산으로 구성된 단일 사슬의 단백질로서 체성장과 지방 조직의 이화작용에 관여하는 것으로 알려져 있다. 실제 돼지에 대한 성장호르몬의 투여는 증체율과 사료 효율의 증가를 유발하며 지방층의 감소와 살코기의 증가에 의한 육질의 개선 효과도 큰 것으로 보고되었다(Campbell 등, 1991; Etherton 등, 1993; Etherton과 Bauman, 1998; King 등, 2000). 그러나 그 효과가 일시적이며 복잡한 투여 방법과 인건비, 그리고 값비싼 성장호르몬의 구입비 및 과도한 투여량에서 비롯되는 개체의 식욕부진 현상이나 번식장애 현상 등의 여러 생리적인 부작용이 큰 문제점으로 나타났다(Smith와 Kasson, 1991; Evock 등, 1988). 이상의 여러 문제점을 해결하기 위한 방법으로 PGH 유전자를 직접 돼지의 생식선에 도입하

여 발현시켜서 성장호르몬의 분비 능력이 유전적으로 향상된 형질전환 돼지의 생산이 시도되었다(Ebert 등, 1988; Miller 등, 1989; Vize 등, 1988). 그러나 생산된 형질전환 돼지는 다른 가축에서와는 달리 체중의 극적인 증가 등의 효과는 없었으며 기대한 것보다 성장이 저조하거나 면역성의 저하, 신체적 이상(위궤양, 피부각화, 무기력증, 사지 장애), 그리고 불임 등의 부작용이 많이 나타났다(Hammer 등, 1985; Pursel 등, 1987; Ebert 등, 1988). 이는 외래에서 도입된 성장 호르몬 유전자의 지속적인 고수준의 발현에 기인한 생리적인 부작용의 결과로 보이는데 아직까지도 뚜렷한 해결 방안을 찾아내지 못했다. 따라서 형질전환 돼지의 개발은 외래 유전자의 cloning 뿐만 아니라 이를 유도적이거나 한정적인 조직에 국한시켜서 발현되도록 하는 발현 조절 system이 요구된다.

이에 본 연구에서는 tetracycline 계열의 물질에 의해서 외래 유전자의 발현이 유도적으로 조절되는 tetracycline inducible expression system을 도입하고자 하였다(Gossen과 Bujard, 1992; Gossen 등, 1995). 이 system은 transcriptional transactivator(tTA)와 TRE(tetracycline response element)의 두 요소들로 이루어져 있으며 Tet-Off와 Tet-On system으로 대별된다. 전자는 tetracycline이 없는 경우에 발현이 turn on되고 후자는 tetracycline이 존재할 경우 transactivator가 TRE에 결합하여 외래 유전자의 발현을 turn on 시키는데 전자와의 주된 차이점은 염기 서열이 역

\* 본 연구는 한국과학재단 우수연구센터(R11-2002-100-01005-0) 지원으로 수행되었음.

<sup>†</sup> Corresponding author : T. A. Kim, Department of Physiology, Catholic University of Daegu School of Medicine. TEL : 053-650-4470, E-mail : takim@cu.ac.kr

방향인 tTA, 즉 rtTA(reverse transcriptional transactivator)의 사용에 있다. 본 연구에서는 필요시에만 tetracycline 계의 물질을 첨가하여 유전자의 발현을 turn on할 수 있는 후자의 system을 사용하였다. 또한 기존의 two vector system이 가지는 virus 생산세포주의 구축시 co-transfection에 의한 감염가의 저하 현상과 두 가지의 선별 표지 유전자에 해당하는 항생제 사용에 의한 세포의 부정적 영향 등의 문제를 해결하기 위하여 rtTA 단백질을 발현하는 유전자 서열과 TRE 부분에 해당하는 서열을 한 vector 내에 위치시킨 pRevTRE-GFP-RSVp-rtTA 재조합 vector를 근간으로 하여 PGH 유전자를 도입하고자 하였다. 뿐만 아니라 외래 단백질의 발현 효율을 증대시키는 것으로 알려진 WPRE(woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) 서열(Donello 등, 1998; Zufferey 등, 1999)을 vector 상의 여러 위치에 도입하여 가장 효율적인 system을 구축하고자 하였으며 cloning한 PGH 유전자의 유도적인 발현을 in vitro에서 확인하고자 하였다.

본 연구에서 구축한 one vector 형태의 Tet system은 외래 유전자의 발현 조절을 신속하고 효율적으로 유도하기 때문에 형질전환 동물의 생산이나 유전자 치료에 적용함에 있어서 생리적인 부작용을 가장 최소화하면서 또한 효율적인 유전자의 발현 방법을 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

## 실험 방법

### 세포배양

본 실험에서 사용한 PT67(Clontech, USA)과 GP293(Clontech, USA), HeLa(사람의 자궁경부암 세포, ATCC CCL 2), NIH3T3(생쥐의 배아 섬유아세포, ATCC CRL 1658), 그리고 PFF(돼지의 태아섬유아세포, porcine fetal fibroblast)는 10%의 FBS(HyClone, USA)와 penicillin(100 U/ml) - streptomycin(100 µg/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% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 배양하였다.

### 돼지의 성장호르몬 유전자의 Cloning

PGH 유전자의 cloning은 genbank에서 찾은 mRNA 서열(accession number X53325)을 참고로 하여 수행하였다. RT-PCR의 주형은 돼지의 뇌하수체 조직에서 분리한 total RNA를 사용하였으며, 분리한 RNA는 0.5 µM의 +, - primer, 0.2 mM dNTP, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 U AMV Reverse Transcriptase(Promega, USA), 5 U TflDNA Polymerase (Promega, USA), AMV/Tfl 5× Reaction Buffer(Promega, USA)와 혼합하여 RT-PCR을 실시하였다. + strand primer 로 5'TGTGACTGGCTGCAGGCCCTCC3', - strand primer 로 5'GGTACTGGGGAGGGGCAACAGAGATG3'를 사용하였으며, 반응 과정은 역전사를 위하여 48°C에서 45분, 94°C에서 2분간 반응시키고, 2차 cDNA 합성과 PCR 증폭을 위하여 94°C에서 1분, 63°C에서 1분, 68°C에서 1분간 반응하는 cycle을 35회 실시하였다. 증폭된 단편은 pGEM-T Easy vector(Promega, USA)에 도입하여(pGEM-T Easy-PGH로 명명) T7 promoter primer를 이용하여 sequencing

하였다.

### WPRE의 Cloning

외래 유전자의 발현을 촉진하는 인자인 WPRE 단편은 WHV(woodchuck hepatitis virus)의 전체 서열의 cDNA를 주형으로 +strand primer인 5'TCTGTTCCTGTAATC-AACCTCTGG3'와 - strand primer인 5'GAGCCCGA-GGCGAAACAG3'를 이용한 PCR을 통해 cloning하였다.

PCR은 10 ng의 주형 DNA에 50 pmole의 각 primer, 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 U Taq polymerase (Promega, USA), 그리고 10× Taq polymerase buffer(Promega, USA)를 혼합한 후 94°C에서 5분간 방치 후, 94°C에서 30초, 53.5°C에서 30초, 72°C에서 30초간 반응을 30회 반복 실시하였다. 그 결과 생성된 WPRE 단편은 pGEM-T Easy vector 내로 도입하여 sequencing하였다.

### Retrovirus Vector의 구축

#### 1) pLNC-PGH

pLNC-PGH는 pGEM-T Easy-PGH의 PGH 단편을 p-LNCX(genbank accession number M28247)에 있는 CMV promoter의 downstream에 도입하여 구축하였는데 Cla I 을 처리한 pLNCX와 양 말단에 EcoR I 부위를 가진 cDNA 조각을 Klenow로 처리하여 재조합하였다(Fig. 1).

#### 2) Tetracycline Inducible Expression Vector

PGH를 유도적으로 발현시키기 위한 Tet system의 구축은 rtTA 단백질을 발현하는 유전자 서열과 TRE 부분에 해당하는 서열을 한 vector 내에 위치시킨 pRevTRE-GFP-RSVp-rtTA 재조합 vector를 근간으로 하여 cloning하였다. 이 vector에서 GFP 유전자를 제거하고 전 단계에서 cloning한 PGH를 도입하였으며 외래 유전자의 발현을 촉진하는 것으로 알려진 WPRE 서열을 여러 위치에 도입하여 가장 효율적인 vector system을 선별하고자 하였다(Fig. 1).

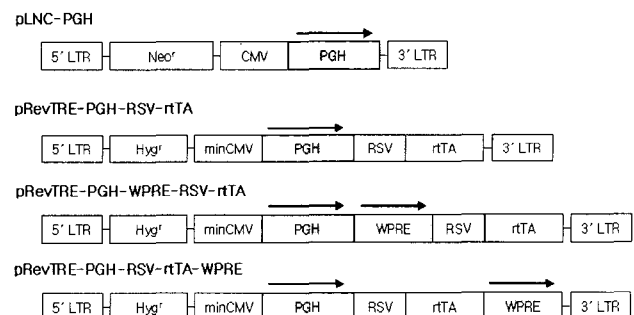


Fig. 1. Construction of retrovirus vectors. LTR, long terminal repeat; Neor, G418 resistant gene; CMV, human cytomegalovirus promoter; PGH, porcine growth hormone gene; Hyg', Hygromycin resistant gene; minCMV, human cytomegalovirus immediate early minimal promoter; RSV, Rous sarcoma virus promoter; rtTA, reverse transcriptional transactivator consist of the reverse tetracycline repressor (rtTetR) fused to a VP16 transactivation domain; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element. Length of each sequence is not drawn to scale.

**Retrovirus Vector의 생산**

재조합한 각각의 retrovirus vector는 PT67에 calcium phosphate 방법으로 transfection하였다. pLNC-PGH가 도입된 PT67 세포는 G418(600 µg/ml)이 첨가된 배지에서 2주간 선별하여 Neo<sup>R</sup> (G418 resistant) 세포군을 확립하였으며 이 세포들을 DMEM/FBS (10%)에서 48시간 배양하였다. 이 virus를 포함하는 배양액을 수확하여 pseudotype의 retrovirus 생산세포인 GP293에 감염시켰다. PT67에서와 마찬가지로 G418 (600 µg/ml)이 첨가된 선별용액으로 2주간 배양한 후 선별된 Neo<sup>R</sup> (G418 resistant) GP293-LNC-PGH 세포에 calcium phosphate 방법으로 VSV-G의 피막 단백질 유전자를 포함하는 20 µg의 pHCMV-G를 일시적으로 transfection하였다. 48시간이 경과한 후 retrovirus가 포함된 배양액을 수확하여 0.45 µm pore-size의 cellulose acetate filter를 이용하여 여과한 후 다음 실험에 사용하기 전까지 -70°C에 보관하였다.

Tetracycline에 유도적으로 발현이 조절되는 system의 retroviral vector인 RevTRE-PGH-RSVp-rtTA, RevTRE-PGH-WPRE-RSVp-rtTA, 그리고 RevTRE-PGH-RSVp-rtTA-WPRE도 LNC-PGH와 동일한 방법으로 virus 생산 세포주를 확립하였다. 다만, 이 vector는 hygromycin 저항 유전자를 선별 유전자로 포함하고 있기 때문에 G418이 첨가된 선별용액 대신에 hygromycin(150 µg/ml)이 첨가된 선별용액을 사용하였으며 확립된 GP293 virus 생산 세포주에서의 virus의 생산도 전자와 동일한 방법으로 수행하였다.

**In vitro에서 돼지 성장호르몬의 생산 여부 확인**

**1) 표적세포의 감염**

수확한 virus stock 중 LNC-PGH는 하루 전날 60 mm dish에 1×10<sup>6</sup>개로 준비해 둔 표적세포(HeLa, NIH3T3, PFF)에 감염시켰다. 4 ml의 배양액과 virus stock 10 µl을 표적세포에 더해주고 polybrene을 5 µg/ml 농도로 첨가하였다. 24시간 경과 후 세포를 3일 간격으로 G418(600 µg/ml)이 첨가된 선별배양액으로 갈아주어 Neo<sup>R</sup> CFU/ml (G418 resistant colony forming unit per milliliter)를 측정하였다.

RevTRE-PGH-RSVp-rtTA, RevTRE-PGH-WPRE-RSVp-rtTA, 그리고 RevTRE-PGH-RSVp-rtTA-WPRE virus는 PFF 세포에 감염시킨 후 hygromycin(150 µg/ml)으로 선별하여

각각의 세포주를 확립하고 감염가(titer)를 측정하였다.

**2) RT-PCR을 이용한 성장호르몬의 생산 여부 확인**

감염과 선별과정이 끝난 각 세포는 trizol을 이용하는 방법으로 전RNA를 분리한 후 RT-PCR을 실시하였는데 반응과정과 사용한 primer는 PGH 유전자의 cloning 단계와 동일한 것으로 사용하였다. 정상적인 전사과정이 일어나고 있음을 확인하기 위하여 각 세포의 RNA를 GAPDH 유전자에 대한 primer로 RT-PCR을 수행하였는데 각각의 세포주에 해당하는 primer를 이용하였다(Table 1). RT-PCR 반응 과정은 48°C에서 45분, 94°C에서 2분간 반응시키고, 2차 cDNA 합성과 PCR 증폭을 위하여 94°C에서 1분, 54°C에서 1분, 68°C에서 1분간 반응하는 cycle을 35회 실시하였다.

**3) PGH의 ELISA**

각각의 세포들을 DMEM/FBS 배지에서 24시간 배양한 후 그 배양액을 1:100으로 희석하여 PGH ELISA kit (DSL-10-73100, USA)를 사용하는 two-step sandwich-type immunoassay 방법으로 ELISA를 수행하였다. Standard에 해당하는 재조합 PGH, 대조구, 실험구는 anti-PGH antibody로 피막이 형성된 well에서 반응시킨 후 수세하였으며 HRP(horseradish peroxidase)로 표식이 된 anti-PGH detection antibody를 처리하였다. 다시 수세한 후 각 well에 기질인 TMB(tetramethylbenzidine)를 첨가하여 반응시킨 다음 일정 시간 경과 후 반응 종결 용액을 첨가하여 450 nm의 파장에서 microplate reader를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

Tet system에 있어서 PGH 유전자의 유도적 발현 여부의 확인은 확립한 각각의 세포주를 DMEM/tetracycline free FBS 배지와, 이 배지에 doxycycline(1 µg/ml)이 첨가된 배지에서 각각 48시간 배양한 후, 그 배양액을 수확하여 1 : 10으로 희석하여 전자와 동일한 ELISA 방법으로 수행하였다.

**결과 및 고찰**

**돼지의 성장호르몬 유전자의 Cloning**

RT-PCR 방법을 이용하여 cloning한 PGH 유전자는 primer 제작시 예상한 단편의 크기와 일치되는 652 bp로

**Table 1. Primers used for GAPDH analysis**

Cell line	Species	Sequence	Product size (bp)
CEF	Chicken	ACGCCATCACTATCTTCCAGGAG (+) CAGCAGCCTTCACTACCCCTCTTG (-)	582
HeLa	Human	GGTGTGAACCATGAGAAGTATGACAA (+) GTCTCTCTTCTCTTGTGCTCTTG (-)	658
NIH3T3	Mouse	TGAGTATGTCGGGAGTCTACIGGGIG (+) CTGTAGCCGTATTCATGTGCATACCA (-)	686
PFF	Pig	TCCACTACATGGTCTACATGTTCCAG (+) ATGTCATCATATTTGGCAGGTTTCTC (-)	655

```

1 NTGACCATGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGNCACCTATAGAATACTCAAGCTATGCATCC
61 AACGCGTTGGGAGCTCCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAGTAGTGA
121 TTTGTGATGGCTGCAGGCCCTCGGACCTCCGCGCTCCTGGCTTTCGCCCTGCTCTGCCTG
      M A A G P R T S A L L A F A L L C L
181 CCCTGGACTCGGGAGGTGGGCGCCTTCCAGCCATGCCCTTGTCCAGCCTATTTGCCAAT
      P W T R E V G A F P A M P L S S L F A N
241 GCCGTGCTCCGGGCCAGCACCTGCACCAACTGGCTGCCGACACCTACAAGGAGTTTGAG
      A V L R A Q H L H Q L A A D T Y K E F E
301 CGCGCTACATCCCGGAGGGACAGAGGTACTCCATCCAGAACGCCAGGCTGCCTTCTGC
      R A Y I P E G Q R Y S I Q N A Q A A F C
361 TTCTCGGAGACCATCCAGCCCCACGGGCAAGGACGAGGCCAGCAGAGATCGGACGTG
      F S E T I P A P T G K D E A Q Q R S D V
421 GAGCTGCTGCGCTTCTCGCTGCTGCTCATCCAGTCGTGGCTCGGGCCCGTGCAGTTCCTC
      E L L R F S L L L I Q S W L G P V Q F L
481 AGCAGGGTCTTACCAACAGCCTGGTGTGTTGGCACCTCAGACCGGTCTACGAGAAGCTG
      S R V F T N S L V F G T S D R V Y E K L
541 AAGGACCTGGAGGAGGGCATCCAGGCCCTGATGCGGGAGCTGGAGGATGGCAGCCCCCGG
      K D L E E G I Q A L M R E L E D G S P R
601 GCAGGACAGATCCTCAAGCAAACCTACGACAAATTTGACACAACTTGCAGTGTATGAC
      A G Q I L K Q T Y D K F D T N L R S D D
661 GCGCTGCTTAAGAACTACGGGCTGCTCTCCTGCTTCAAGAAGGACCTGCACAAGGCTGAG
      A L L K N Y G L L S C F K K D L H K A E
721 AATACCTGCGGGTCATGAAGTGTGCGCGCTTCGTGGAGAGCAGCTGTGCCTTCTAGTTGC
      N T C G S *
781 TGGGCATCTCTGTTGCCCTCCCCAGTACCAATCGAATTACCCGCGGCNGGCCATGGCGN
841 GCCGGGNAGAAAAAANGGGGTTNTNTCCCAAANGTTAGNTCNNGNAAA

```

Fig. 2. Nucleotide and amino acid sequence of the porcine GH. The sequences of cDNA primers used in RT-PCR are shaded.

153개의 아미노산을 암호화하며 sequencing한 결과는 Fig. 2와 같다.

이 결과는 genbank의 PGH 유전자의 핵산 서열과 동일하며 인간의 GH와 약 60%의 상동성을 나타내었다.

#### WPRE의 Cloning

외래유전자의 발현을 증강시키는 것으로 알려진 WPRE는 WHV clone으로부터 cloning하였으며 619 bp 크기의 단편으로 이 서열은 WHV genomic DNA 서열(GenBank

accession number M11082)의 WPRE 부분과 정확하게 일치하였다.

#### Retrovirus Vector System의 구축

전단계에서 cloning한 PGH 유전자가 in vitro에서 활성을 가진 PGH의 생산 여부를 확인하기 위하여 pLNC-PGH를 재조합하였다(Fig. 1).

Tet system의 구축은 rtTA 단백질을 발현하는 유전자 서열과 TRE 서열을 한 vector 내에 위치시킨 one vector 형

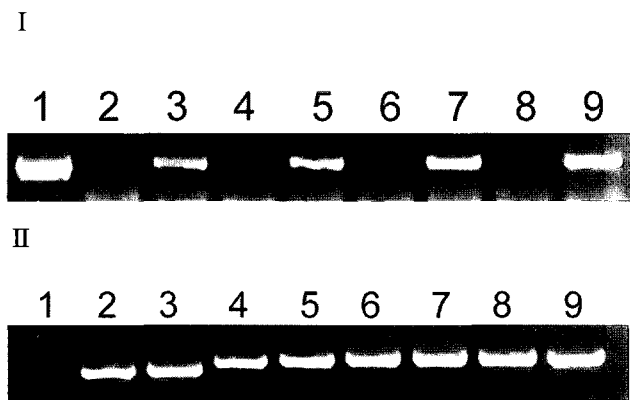
태로 이 vector는 tetracycline 계열의 물질이 존재하면 rtTA 단백질이 그 물질과 결합하여 그 복합체가 TRE 부분에 결합함으로써 minCMV promoter 하의 PGH 유전자의 발현을 유도한다. 또한 turn on 되었을 경우 PGH의 발현을 더욱 증가시키기 위하여 WPRE 서열을 여러 위치에 도입함으로써 가장 효율적인 vector system을 선별하고자 하였다.

앞에서 구축된 retrovirus vector는 최종적으로 GP293 세포에 도입되어 virus 생산 세포주를 확립하였다. 이 세포주에서 생산된 virus는 숙주세포의 범위가 넓고 초원심분리 방법을 이용하여 고감염가의 고농축 virus 배양액을 얻을 수 있는 장점을 가지고 있다(Lin 등, 1994). 수확한 virus stock 중 LNC-PGH는 여러 종류의 표적세포에 감염시켰으며 각 세포에서 Neo<sup>R</sup> titer를 측정된 결과 세포주에 따라서 약간의 차이를 나타내었으나  $1 \times 10^6 \sim 1.2 \times 10^6$  Neo<sup>R</sup> CFU/ml의 감염가를 나타내었다. PFF 세포에 감염시킨 RevTRE-PGH-RSVp-rtTA, RevTRE-PGH-WPRE-RSVp-rtTA, 그리고 RevTRE-PGH-RSVp-rtTA-WPRE virus도 LNC-PGH와 유사한 감염가를 나타내었다.

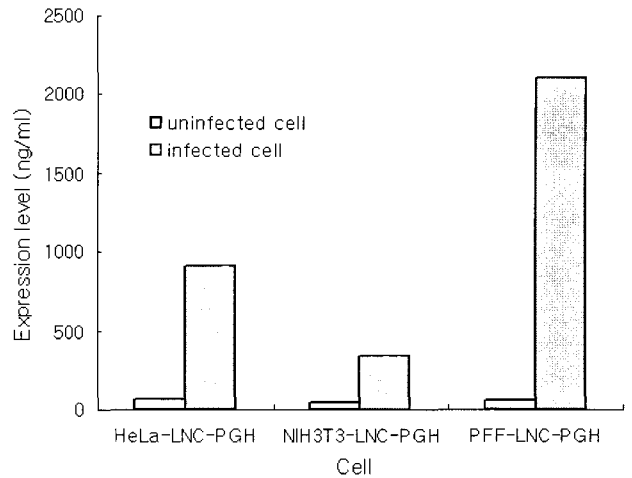
**PGH 유전자의 발현 확인**

**1) RT-PCR을 이용한 PGH의 생산 여부 확인**

감염과 선별과정이 끝난 PGH 유전자가 전이된 표적세포에서 분리한 RNA를 주형으로 하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과 primer 제작시 예상한 단편의 크기와 일치되는 652 bp의 크기를 확인하였으며 유전자가 전이되지 않은 대조구 세포의 RNA를 주형으로 RT-PCR을 수행한 것은 PGH에 해당하는 단편이 검출되지 않았다(Fig. 3). 이러한 결과는 숙주세포의 genomic DNA 서열과 PGH 유전자 서열 사이에 상동적인 서열이 존재하지 않는 것을 나타내며 구축한 retrovirus vector가 여러 종의 세포에 대해 감염성이 제한되지 않음을 보여주는 것이다. 정상적인 전사과정



**Fig. 3. Determination of expression of the PGH and GAPDH genes in various target cells using RT-PCR.** I. PGH expression. 1: plasmid DNA (pLNC-PGH), 2 and 3: cell line CEF, 4 and 5: cell line HeLa, 6 and 7: cell line NIH3T3, 8 and 9: cell line PFF. 2, 4, 6 and 8 were uninfected cells. 3, 5, 7 and 9 cells were infected with the LNC-PGH virus. II. GAPDH expression. 1: H<sub>2</sub>O, 2 and 3: cell line CEF, 4 and 5: cell line HeLa, 6 and 7: cell line NIH3T3, 8 and 9: cell line PFF. 2, 4, 6 and 8 cells were uninfected, while 3, 5, 7 and 9 cells were infected with the LNC-PGH virus.



**Fig. 4. ELISA analysis of PGH expression in target cells.** The expression level of the PGH protein in various target cell was estimated by the ELISA analysis. The sensitivity of the ELISA was 0.3 ng/ml.

이 일어나고 있음을 확인하기 위하여 각 세포의 RNA를 GAPDH 유전자에 대한 primer로 RT-PCR을 수행하였는데 그 결과 각 세포주에 대한 대조구와 실험구 양쪽에서 동일한 크기와 양상의 단편을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

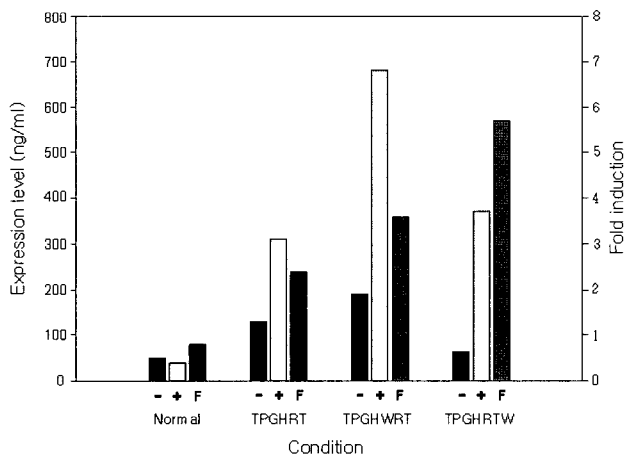
**2) PGH의 ELISA**

LNC-PGH virus에 감염되어 PGH 유전자가 전이된 표적세포들과 대조구인 세포들을 24시간 배양한 후 그 배양액을 수확하여 ELISA를 수행하였다. 그 결과 감염되지 않은 정상세포에서는 약 50 ng/ml 미만의 PGH가 나타난데 비해서 PGH 유전자가 전이된 표적세포에서는 350~2,100 ng/ml의 PGH가 측정되었다(Fig. 4). 이는 본 실험에서 생산된 재조합 PGH가 *in vitro*에서 활성을 가지며, 세포주에 따라 발현 정도의 차이가 남을 의미한다. 특히 돼지세포인 PFF에서 가장 많이 발현되었으며 이러한 결과는 돼지를 대상으로 한 *in vivo* 실험시 이 재조합 유전자의 발현이 효율적으로 일어날 가능성을 제시하고 있다.

앞의 LNC-PGH virus를 이용하여 유전자가 전이된 세포는 PGH가 지속적으로 생산되는 체제로서 *in vivo*에 적용시 개체의 생리적인 부작용을 초래할 수 있다. 이를 최소화하기 위하여 외래 유전자의 발현을 유도적으로 조절할 수 있는 system이 요구되며 이러한 system의 요소로는 metallothionein promoter(Vize 등, 1988; Miller 등, 1989), heat shock promoter, steroid responsive element 등이 있다. 그러나 이 인자들은 낮은 유도 수위와 유도 인자의 개체에 미치는 부정적인 생리학적 영향으로 인해 제한적인 성공률을 나타내었다(Yarranton, 1992). 이러한 관점에서 가장 괄목할 만한 진전은 tetracycline 조절 system의 개발이다(Gossen과 Bujard, 1992; Gossen 등, 1995). 이 system은 VP16 활성 domain과 대장균에서 유래한 Tet repressor의 결합으로 이루어진 transcriptional transactivator(tTA)를 포함하고 있는데 tetracycline의 존재 하에서는 외래 유전자의 발현이 저해되는 Tet-off system이 개발되었으며(Gossen과 Bujard, 1992), 그 후 Tet repressor의 서열이 역방향으로 이루어진 reverse transactivator를 포함하는 Tet-

On system도 구축되었다(Gossen 등, 1995). 이 system은 tetracycline 유도체가 존재하면 rtTA가 TRE(tetracycline response element) 부분에 결합되어 외래 유전자의 발현을 유도한다(Tet-On)(Furth 등, 1994; Gossen 등, 1995). 이상의 개발 초기의 system은 TRE와 tTA/rtTA가 서로 다른 plasmid에 존재하는 two vector system이었으나 후에 이 system은 one vector plasmid 형태로 보완이 되었다. 이 vector는 기존의 two vector system에 비해서 매우 효과적이며 단단한 발현의 조절이 가능하여 800배 이상의 발현 조절 효율을 나타내는 것으로 보고되었다(Schultze 등, 1996). 이러한 Tet system에서는 유도물질로 더해지는 Dox의 농도가 매우 낮은 상태에서 작동하기 때문에 세포 자체의 독성을 유발할 가능성이 매우 적은 것으로 보고되고 있다(Bohl 등, 1997; Mayford 등, 1996).

이상의 여러 장점을 가진 Tet system의 PGH 유전자의 유도적 발현 여부의 확인을 위해서 구축된 여러 세포주를 DMEM/tetracycline free FBS 배지와 이 배지에 doxycycline(1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )이 첨가된 배지에서 각각 48시간 배양한 후, 그 배양액을 수확하여 ELISA를 실시하였다. 그 결과 virus가 감염되지 않은 정상세포에서 50 ng/ml 이하의 값을 나타낸 데 비하여 유전자가 도입된 세포에서는 50~700 ng/ml의 다양한 값을 나타내었다. 특히 doxycycline이 첨가되어 turn on된 조건에서는 그렇지 않은 경우에 비해서 2~6배 높은 측정값을 나타내었다. WPRE의 위치에 따른 유전자의 발현 정도를 비교하였을 때, PGH의 절대적인 발현양에 있어서는 WPRE가 PGH 유전자 다음에 위치한 RevTRE-PGH-WPRE-RSVp-rtTA의 경우에서 680 ng/ml로 가장 높게 나타났으며 유도 효율은 WPRE가 rtTA 단백질 다음에 위치한 RevTRE-PGH-RSVp-rtTA-WPRE의 경우가 5.7배로 유전자 발현의 turn on/off가 가장 잘 이루어지는 것으로 나타났다(Fig. 5).



**Fig. 5. Determination of doxycycline induction of the PGH gene in PFF cell using ELISA analysis and indicated with the fold induction for each condition of transformed PFF cells.** The sensitivity limit of the ELISA was 0.3 ng/ml. Normal: uninfected PFF, TPGHRT: PFF infected with RevTRE-PGH-RSV-rtTA. TPGHWRT: PFF infected with RevTRE-PGH-WPRE-RSV-rtTA. TPGHRTW: PFF infected with RevTRE-PGH-RSV-rtTA-WPRE. -: cells grown in the doxycycline free media with tetracycline free FBS. +: cells grown in the media supplemented with doxycycline (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). F: fold induction.

Doxycycline이 존재할 경우 외래 유전자의 가장 높은 발현을 나타내는 Tet system인 RevTRE-PGH-WPRE-RSV-rtTA에서 PGH의 발현량은 전자의 LNC-PGH 경우에 비하여 약한 것으로 나타났다(Tet-PGH : LNC-PGH = 1 : 3). 그러나 발현을 유도적으로 조절할 수 있는 Tet system의 도입은 기존의 일반 promoter의 지속적인 turn on에 의해 발생하는 형질전환 개체의 부정적인 생리적 변화(Ebert 등, 1988; Vize 등, 1988)를 최소화하기 위한 필요불가결한 요소라고 할 수 있으며 이 system의 도입으로 보다 효율적인 형질전환 동물의 생산이 가능할 것으로 기대된다.

### Expression of the Recombinant Porcine GH Gene In Vitro Using Tetracycline Inducible Expression System

Kwon, Mo Sun, Bon Chul Koo and Teoan Kim

Department of Physiology, Catholic University of Daegu School of Medicine

#### ABSTRACT

We cloned cDNA of the PGH(porcine growth hormone) gene and constructed retrovirus vector designed to express PGH gene under the regulation of CMV (cytomegalovirus) promoter. To maximize the expression, WPRE(woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) sequence was placed at the downstream of the PGH gene. After infection with recombinant viruses, approximately  $1 \times 10^6$  PFF(porcine fetal fibroblast) cells released PGH protein into the media as much as 1,400 ng. In a subsequent experiment, a modifications of the retrovirus vector was made to express the PGH gene in a tetracycline-inducible manner. In PFF cells carrying these viral vector sequences, addition of doxycycline to the media resulted in 2~6 fold increase in PGH synthesis. In the modified retrovirus vectors, the WPRE sequence also played a role in boosting the effect of the tetracycline induction. This result indicates that our tetracycline-inducible expression system might be a promising candidate in alleviating the complicate physiological problems caused by constitutive expression of the exogenous genes in the transgenic animals.

(Key words : PGH, Tetracycline-inducible expression system, WPRE, PFF)

#### 인용문헌

- Bohl D, Naffakh N, Heard JM (1997): Long-term control of erythropoietin secretion by doxycycline in mice transplanted with engineered primary myoblasts. *Nat Med* 3:299-305.
- Campbell RG, Johnson RJ, Taverner MR, King RH (1991): Interrelationships between exogenous porcine

- somatotropin (pST) administration and dietary protein and energy intake on protein deposition capacity and energy metabolism of pigs. *J Anim Sci* 69: 1522- 1531.
3. Donello JE, Loeb JE, Hope TJ (1998): Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Virol* 72:5085-5092.
  4. Ebert KM, Low MJ, Overstrom EW, Buonomo FC, Baile CA, Roberts TM, Lee A, Mandel G, Goodman RH (1988): A moloney MLV-rat somatotropin fusion gene produces biologically active somatotropin in a transgenic pig. *Mol Endocrinol* 2:277-283.
  5. Etherton TD, Bauman DE (1998): Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiol Rev* 8:745-61.
  6. Etherton TD, Etherton K, Mills EW (1993): Recombinant bovine and porcine somatotropin: safety and benefits of these biotechnologies. *J Am Diet Assoc* 93:177-180.
  7. Evock CM, Etherton TD, Chung CS, Ivy RE (1988): Pituitary porcine growth hormone (pGH) and a recombinant pGH analog stimulate pig growth performance in a similar manner. *J Anim Sci* 66:1928-1941.
  8. Furth PA, Onge L, Boger H, Gruss P, Gossen M, Kistner A, Bujard H, Hennighausen L (1994): Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:9302-9306.
  9. Gossen M, Bujard H (1992): Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5547-5551.
  10. Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H (1995): Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268:1766-1769.
  11. Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE Jr, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD, Brinster RL (1985): Production of transgenic rabbits, sheep and pig by microinjection. *Nature* 315:680-683.
  12. King RH, Campbell RG, Smits RJ, Morley WC, Ronnfeldt K, Butler K, Dunshea FR (2000): Interrelationships between dietary lysine, sex and porcine somatotropin administration on growth performance and protein deposition in pigs between 80 and 120 kg live weight. *J Anim Sci* 78:2639-2651.
  13. Lin S, Galiano N, Culp, Burns JC, Friedmann T, Yee JK, Hopkins N (1994): Integration and germ-line transmission of a pseudotyped retroviral vector in zebrafish. *Science* 265:666-668.
  14. Mayford M, Bach ME, Huang YY, Wang L, Hawkins RD, Kandel ER (1996): Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science* 274:1678-1683.
  15. Miller KF, Bolt DJ, Pursel VG, Hammer RE, Pinkert CA, Palmiter RD, Brinster RL (1989): Expression of human or bovine growth hormone gene with a mouse metallothionein-1 promoter in transgenic swine alters the secretion of porcine growth hormone and insulin-like growth factor- I. *J Endocrinol* 120: 481-488.
  16. Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Birnberg NC, Evans RM (1982): Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300:611-615.
  17. Pursel VG, Rexroad CE Jr, Bolt DJ, Miller KF, Wall RJ, Hammer RE, Pinkert CA, Palmiter RD, Brinster RL (1987): Progress on gene transfer in farm animals. *Vet Immunol Immunopathol* 17:303-312.
  18. Schultze N, Burki Y, Lang Y, Certa U, Bluethmann H (1996): Efficient control of gene expression by single step integration of the tetracycline system in transgenic mice. *Nat Biotechnol* 14:499-503.
  19. Smith VG, Kasson CW (1991): The interrelationship between crude protein and exogenous porcine somatotropin on growth, feed and carcass measurement of pig. *J Anim Sci* 69:571-577.
  20. Vize PD, Michalska AE, Ashman R, Lloyd B, Stone BA, Quinn P, Wells JRE, Seamark RF (1988): Introduction of a porcine growth hormone fusion gene into transgenic pigs promotes growth. *J Cell Sci* 90: 295-300.
  21. Yarranton GT (1992): Inducible vectors for expression in mammalian cells. *Curr Opin Biotechnol* 3:506-511.
  22. Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ (1999): Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 73:2886-2892.
- (접수일자: 2005. 3. 10. / 채택일자: 2005. 3. 25.)