

닭 생식반월의 Busulfan 가온 주입방법에 의한 원시생식세포 제거 효과

정 동 기[†]

제주대학교 생명자원과학대학 생물산업학부 동물자원과학과, 아열대농업생명과학연구소

Depletion Effects of Chick Germinal Crescent's Primordial Germ Cells by Heat Activated Busulfan Injection

Dong Kee Jeong[†]

Dept. of Animal Biotechnology, College of Applied Life Science, and the Research Institute for Subtropical Agriculture and Biotechnology, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

ABSTRACT : This study was conducted to identify optimistic primordial germ cells(PGCs) migration activity using heat activated busulfan treatment for the increasing germline chimerism. Donar PGCs viability tests of important conditions for useful germ line chimerism indicated approximately 70~80% viability was time dependent. Transplantation experiments of PGCs into recipient embryos after busulfan treatment, showed the treatment group having 23.5% viability. By comparison, the control group showed 4.8% viability. The 96 hour treatment group and the 118 hour treatment group of the cultured PGCs showed high migration activity. Generally, the transplantation method would consider morphological and physiological characteristics before transplantation. In the present study, the effect of busulfan on migration activity showed viability highest at 53.4% after 48-hour incubation time. However, a previous study showed the best condition for transplantation time to be prior to the 48-hour incubation period, when the chicken embryo does not yet have a developed blood vessel system. In conclusion, an important condition for the production of a transgenic chicken is that most donor PGCs migrate into the recipient embryo without any inhibitory factors. The present results suggest, perhaps by using this modified method of transplantation, it can produce a more efficient chimeric germ line, transgenic chicken.

Key words : Primordial germ cells, Migration activity, Busulfan, Germline chimeric chicken, Transgenic chicken.

요 약 : 본 연구는 생식선 키메라 생산효율을 높이기 위한 방법으로 busulfan 가온 주입법을 이용하여 효과적인 원시생식세포의 이동능력을 검증하였다. 효율적인 생식선 키메라 닭 생산에서 중요한 요건 중 하나인 공여체 원시생식세포의 생존율을 측정한 실험에서는 시간이 지남에 따라 생존율에 변화를 보였으나, 평균 70~80%를 유지하고 있었으며, busulfan 처리 유무에 따른 공여체 원시생식세포 이동능력은 형광염색 후 주입한 실험에서 대조구가 4.8%인 반면 실험구는 23.5%를 나타냈다. 이식전 원시생식세포 배양 조건에 따라, 96시간과 118시간 배양 처리구에서 높은 이동능력을 보여 주었다. 원시생식세포의 형태학적, 생리학적 특징을 응용한 이식방법은 매우 효과적일 것이다. 그리고 본 연구에서는 생식반월의 발달단계 별 busulfan 처리 효과는 48시간이 가장 높은 53.4%였으며, 그러나 본 연구에서는 생식반월 유래 원시생식세포 이식은 48시간 이전, 혈관계가 발달하기 직전으로 가장 높은 효율을 보였다. 결론적으로 생식선 키메라 방법을 통한 형질 전환 닭 생산 연구의 가장 큰 관건은 최대한 많은 수의 공여체 원시생식세포가 수용체의 저해작용 없이 안정적으로 수용체 gonad로 이동하여 분화하는 것으로, 본 연구 결과를 토대로 개선된 방법을 이용하면 높은 효율의 생식선 키메라 닭이 생산될 것으로 사료된다.

서 론

[†] Correspondence: Dept. of Animal Biotechnology, College of Applied Life Science, and the Research Institute for Subtropical Agriculture and Biotechnology, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea, Tel: +82-64-754-3331, Fax: +82-64-725-2403, E-mail: dkjeong@cheju.ac.kr

인간의 유전자 지도가 완성되는 시점에, 앞으로는 이러한 유전자의 기능을 밝혀내는 기능 유전체학의 발달로 각 질환

에 대한 치료제가 속속 개발될 전망이다. 최근까지는 이러한 유전자 재조합된 의약품은 주로 대장균이나 미생물을 이용하여 대량으로 생산하여 이를 이용하여 왔다(Being-Tadmor, 1993). 그러나 이러한 생산은 생산비와 사람에게 적용될 때 부작용이 문제점으로 대두되고 있었다. 그러나 형질 전환 동물을 통한 생물 반응기는 이러한 문제를 다소나마 해결해 줄 수 있는 해결책으로 생각되었으나, 동물에 따라서 형질 전환 동물을 만드는 일이 고비용, 저효율의 문제점은 마찬가지였다. 닭의 경우에도 형질 전환 닭 생산은 현재 몇몇 연구자들이 성공한 바 있으나(Salter et al., 1987; Vick et al., 1993), 궁극적인 산업적 목적의 닭의 생산은 여전히 많은 난관을 극복해야 한다. 포유류는 대부분의 형질 전환 동물의 생산방법으로 미세주입법을 사용하고 있으며, 최근에는 ES 세포를 이용하거나(Neilan and Barsh, 1999), 핵치환을 통하여(Kuhholzer et al., 2000) 시도하고 있다. 그러나 조류의 경우는 형태학적, 생리학적 특이성으로 이러한 방법을 적용하기가 어려워 대부분 원시생식세포나 원시배반엽세포를 이용하거나 일부 체외배양법을 이용한 one cell의 oocyte를 이용하는 경우도 있다(Etches et al., 1996; Sang and Perry, 1989). 원시생식세포(primordial germ cells, PGCs)는 각 생물의 유전적 정보를 지니며 단일한 세포적 그리고 분자적 기작을 통하여, 이러한 특징을 세대를 거쳐 자손에게 전달할 수 있는 특징을 지니고 있는 세포이다. 조류에 있어서 원시생식세포는 외배엽을 통하여 배양 1일째가 되면 원시생식세포의 형태로 발전한 세포가 생식반월로 모인다(Ginsburg and Eyal-Giladi, 1986; Swift, 1914). 이렇게 모인 원시생식세포는 배자가 발달함에 따라 조류만의 특징인 배자 외 혈관계가 형성되기 시작하는 Hamburger-Hamilton stage 13(Hamburger와 Hamilton, 1951)에 혈관계로 유입된다. 그리고 유입된 원시생식세포는 이동을 시작하여 원시생식기(embryonic gonad)에 정착하게 된다. 이러한 특징은 외래에서 원시생식세포를 분리하여 이를 다시 초기 배자의 혈관에 주입시켜 생식선 키메라 닭 생산이 가능하게 하였다. 그러나 지금까지 일부 연구자를 제외하고 대부분의 경우 키메라 닭의 효율은 매우 낮다. 최근 Naito et al.(1994a)이 일부 개체에서 98%의 효율을 보인 것을 제외하고, Park et al.(2003)의 연구에서도 가장 좋은 효율일 경우가 50% 이상을 얻지 못하였다. 이것도 또한 평균 효율이 아닌 일부 개체에서만 나타나고 있다. 생식선에 busulfan을 주입하여 성세포에 영향을 주고 성세포를 제거한 후 이를 재생

시키기 위하여 외래 성세포를 주입한 연구들이 진행되고 있다. 최근에는 Furuta & Fujihara(1999)가 닭의 배자에 busulfan을 처리하고 처리한 배자에 원시생식세포를 주입하여 증식이 원활하게 이루어짐을 보고하였다. 또한, Song et al.(2005)은 busulfan을 주입한 닭의 배자에 원시생식세포를 주입하여 생식선 키메라의 효율을 높인 결과를 보고하였다. 그리고 Lue et al.(2007)은 마우스에 busulfan을 처리하고 testis에 외래 원시생식세포가 아닌 중간엽 줄기세포를 주입하여 niche 형성을 확인하였다. 그리고 Shinohara et al.(2006)은 정원줄기세포 이식 실험에서 수용체 동물의 busulfan 처리시 골수 파괴를 방지할 목적으로 정원줄기세포 이식과 함께 골수 이식을 시도하여 busulfan의 부작용을 최소화했다는 보고를 하고 있다. 본 연구에서는 수정후 산란한 수정란 상태인 닭의 알에 busulfan 가온법을 이용하여 주입하여 초기 배반엽 상태의 수용체 줄기세포를 제거하고 부작용을 최소화하는 조건으로 공여체 줄기세포의 최적 이식율을 위한 조건 실험을 실시하였으며, 이를 통하여 최적의 생식선 키메라 닭뿐만 아니라 복제 닭 생산을 위한 기초 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

본 실험은 제주대학교 부속 동물사육장에서 사육중인 실험축을 사용하여 Hamburger-Hamilton(1951)의 배 발달단계에 따라 37.5°C, 상대습도 60~70%인 부화기에서 배양하였다. Germinal crescent로부터 분리방법은 24시간 배양한 수정란에서 배자가 포함된 난황 부위를 PBS(phosphate buffered saline)가 담긴 큰 접시에 옮긴 후 실체 현미경 하에서 수술칼을 이용하여 germinal crescent 부분만을 분리한 후 이를 파이펫을 이용하여 수집하였다. 수집된 germinal crescent는 파이펫을 이용하여 잘게 부수어 생식세포를 분리하였다. Blood로부터 분리하는 부화 54~57시간 된 배자의 혈관이나 심장에 내경이 50 μm 인 미세 파이펫을 찢어 넣은 후 mouth pipetting 방법에 의하여 혈액을 조심스럽게 채취하였다. Ficoll 원심분리에 의한 생식세포 순수 분리는 10% Ficoll 용액과 세포를 혼합하여 300 μL 로 맞추고 16% Ficoll 900 μL 를 원심분리 튜브 아래에 넣고 그 위에 10% Ficoll과 세포의 혼합액을 조심스럽게 올려놓은 후, 2,500 rpm에서 30분간 원심분리하였다. 원심분리가 끝난 후 10%와 16%의 경계면에서 생식세포를 분리한 후 희석하여 사용하였다. 원시생

식세포의 생존을 측정은 Trypan blue로 염색하여 염색된 세포를 측정 후 효율을 계산하였다. 원시생식세포의 형광 염색방법은 PKH-26 형광염색 kit A(Sigma)를 사용하여 염색하였다. 형광염색방법은 Horan et al.(1990)이 제시한 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 형광 염색된 원시생식세포의 미세 주입을 위하여 수용체 배자가 있는 달걀의 침단부에 직경 1 cm 되는 구멍을 만든 후 배자를 개방시키고 실체현미경하에서 각각 수용체 배자 내로 바늘 끝 내부 직경이 25 μm 인 미세 바늘을 이용하여 미세 주입하였다. 미세 주입이 끝난 수용체 배자는 파라핀 필름을 이용하여 두 겹으로 밀봉하였다. 형광현미경 관찰을 통한 세포 관찰을 위하여 5.5일령까지 배양된 배자로부터 추출한 원시생식기는 Trypsin-EDTA 분리방법을 이용하여 원시생식세포를 분리하여 이를 형광현미경하에서 관찰하여 전체 원시생식세포 중 형광을 띠고 있는 원시생식세포의 수를 측정 후 이를 이용하여 효율을 계산하였다. 24시간 배양한 수정란 배자에 대한 busulfan 처리는 80 mg의 busulfan을 37~42°C 정도로 미리 가온시킨 DMSO 4 mL에 녹인 다음 16 mL의 가온된 증류수를 첨가하여 완전하게 용해시켰다. 용해된 busulfan은 가온 상태에서 배자 상단부 난백을 통과시켜 정확하게 10 μL 를 주입한 후 파라핀필름으로 봉하고 부화기를 이용하여 배양하였다. 공여체 원시생식세포 주입은 36시간 만에 배자 중앙부의 epiblast에 PKH-26으로 염색시킨 후 원시생식세포를 3,000개씩 주입하였다. 그 후 배양을 진행하면서 공여체 원시생식세포를 여러 방법으로 검사하여 결과를 분석하였다. 본 실험의 통계적 처리는 student-t test를 통하여 유의성을 검증하였다. 공여체 원시생식세포의 이동능력을 검증하기 위하여 배양 후 62시간째 혈액을 추출한 후 공여체 원시생식세포 유무를 검증하기 위하여 공여체로 사용한 오골계 특이 마커를 이용하여 PCR를 실시하여 공여체 원시생식세포의 이동능력을 검증하였다.

결 과

닭의 원시생식세포가 가지고 있는 특징을 이용하여 가장 효율적인 생식선 키메라 닭 생산을 위하여 공여체 원시생식세포의 생존율이 중요한 요인이다. 그래서 생식반월, 배자 혈액 그리고 원시생식기의 각각 다른 발달 단계로부터 분리한 원시생식세포를 *in vitro* 상태에서 여러 가지 처리조건에

Table 1. Viability of PGCs from germinal crescent by various treatments

Treatment	Time		
	2 hour	4 hour	6 hour
I	94.05±0.75	90.11±7.45	84.04±6.77
II	87.01±2.38	80.08±0.94	82.07±6.12
III	87.04±1.70	84.41±6.14	74.01±9.17
IV	83.09±2.94	72.06±3.33	70.66±5.49

I : Sham, II: Ficoll, III: Ficoll+electroporation, IV: Ficoll+DNA+electroporation.

따른 생존율을 측정하였다(Table 1). 대조구(I)는 각 단계에서 분리한 원시생식세포를 아무 처리하지 않고 시간에 따른 생존율을 측정하였으며, 두 번째 실험구(II)는 분리한 원시생식세포를 Ficoll를 이용하여 원심분리한 후 Ficoll이 생존율에 미치는 영향을 측정하였다. 그리고 세 번째 실험구(III)는 형질 전환 닭을 생산할 때 이용되는 방법으로 외래 DNA 전이시 사용되는 전기충격법이 생존율에 미치는 영향을 측정하였다. 그리고 마지막으로 세 번째 실험구에 추가 조건으로(실험구 IV) 외래 DNA를 첨가하여 유전자 전이시 나타나는 생존율 변화를 시간별로 측정하였다. 그림에서 보듯이 대조구에서는 시간이 지남에 따라 생존율의 변화는 있었으나, 평균 80%를 유지하고 있었다. Table 1에서 보면, 시간이 지남에 따라 생존율이 낮아지고 있음을 알 수 있었다. 그러나 실험구(III)와 실험구(IV)에서는 DNA 유무에 따른 생존율 비교에서 큰 차이를 보이지 않았다. 주입한 busulfan의 수용체 배자내의 원시생식세포 제거 능력 및 이식된 공여체 원시생식세포의 이동능력을 검사하기 위하여 혈액 이동 중의 원시생식세포가 germinal ridge로 이동중인 시간인 64시간째 혈액을 추출하여 공여체 원시생식세포의 효율을 검사하였다(Fig. 1). 결과에서 보는 바와 같이 대조구에 비하여 실험구는 23.5%의 효율로 정상적인 효율의 4.8%에 비하여 4배 정도 효과적으로 개선된 것을 확인할 수 있었다. 본 연구에서는 가장 효율적인 원시생식세포의 수용체 생식기로 이동 후 완전하게 공여체 생식세포로의 분화를 목적으로 하고 있다. 그래서 생식 반월 유래의 원시생식세포를 단기간 배양하여 활성화를 유도하고, 이를 Etches et al.(1996)의 방법에 따라 이식하여 효율적인 이동능력을 확보하기 위하여 24, 48, 72, 96, 118시간 배양하여 각각 36시간째 이식하고 5.5 day의 배자 gonad로부터 분리한 원시생식세포를 분리하여 측정할 결

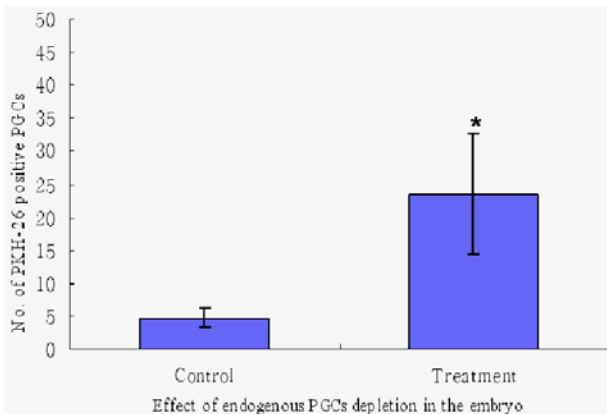


Fig. 1. Depletion effect of endogenous PGCs in the embryos by treated heat activated busulfan before PKH-26 labeled donor PGCs injection(PGCs from one embryo and whole PGCs injected into recipient embryonic germinal crescent). The asterisks indicate significant differences from control values(* $P < 0.05$).

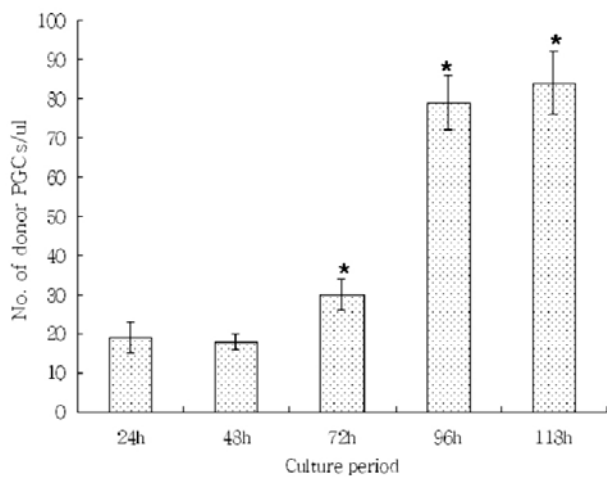


Fig. 2. Migration efficiency of cultured donor PGCs. Donor PGCs were checked PKH-26 fluorescence emission in 5.5 day old recipient embryos(PGCs from one embryo and whole PGCs injected into recipient embryonic germinal crescent). *Significant at $P < 0.05$.

과는 Fig. 2와 같다. 배양시간에 따라 이동능력을 측정 한 결과 72시간까지 배양할 경우는 μL 당 18~28개 정도가 관찰 되었으나, 96시간과 113시간에서는 80개 정도로 상승하여 높은 효율의 공여체 원시생식세포 이동능력과 수용체의 germinal ridge에서의 분포율을 확인할 수 있었다. 113시간 이

상의 배양실험에서는 배양조건이 원활하지 않았다. 그래서 본 연구에서는 다른 성장인자를 첨가하지 않은 상태에서 10% FBS와 DMEM만으로 배양한 최대치를 5일간으로 잡고 본 연구를 진행하게 되었다. 분리된 원시생식세포의 특징을 규명하기 위하여 이전 연구에서 확립한 Ficoll 방법에 따라 원시생식세포를 분리하였다(Fig. 3. A와 B). 생식 반월에서 분리한 원시생식세포는 Ficoll 분리 전후의 상태가 확연하게 구분이 가능한데, 그 이유는 다른 부유 세포 및 주변 세포들에 의하여 구분하기가 매우 어렵기 때문이다. 정확한 규명을 위하여 원시생식세포의 당단백질을 염색하는 PAS 염색방법을 통하여 정확하게 원시생식세포를 구별하고 이 세포를 공여체의 이식재료로 사용할 수 있었다. Fig. 3의 D 그림은 PKH-26으로 염색 후 이식한 원시생식세포가 이동 후 수용체 배자의 혈액내에서 발견된 사진이다. 이는 바로 세포의 분포를 현미경으로 관찰한 결과이며, 이 방법을 통하여 효율을 검증하고 생식세포에의 busulfan의 효과를 검증할 수 있었다. 본 연구에서 사용된 공여체 원시생식세포는 본

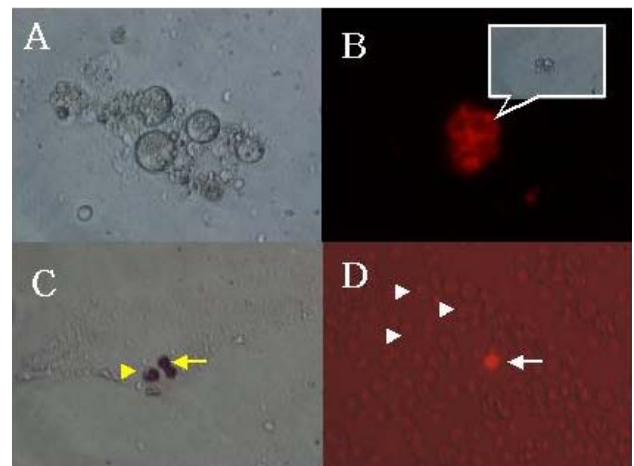


Fig. 3. Primordial germ cells from germinal crescent and 5.5 day old embryos. (A) PGCs from germinal crescent after Ficoll gradient centrifugation. (B) PKH-26 labeled PGCs from germinal crescent. (C) PGCs from 5.5 day old embryos after PAS staining. Yellow arrow indicated cell division of PGCs and yellow arrow head showed PAS stained PGCs. (D) PKH-26 labeled PGCs in blood from 5.5 day old embryos after transplantation of PKH-26 labeled germinal crescent derived PGCs. White arrow indicated PKH-26 labeled PGCs that were derived from germinal crescent and arrow heads showed blood cell in 5.5 day old embryo.

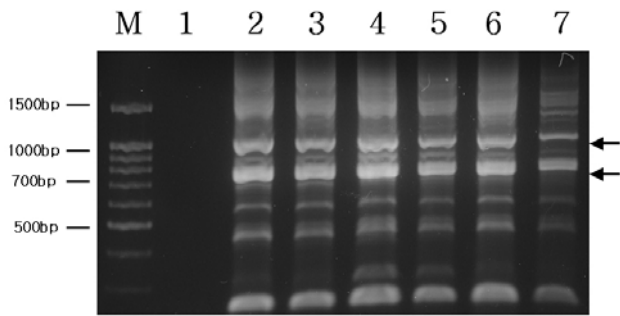


Fig. 4. PCR analysis of donor driven ogol chicken specific marker for the detection of PGCs migration activity. Lane 1: H₂O, lane 2~5: donor cell injected gonads, lane 6: ogol positive DNA, lane 7: unrelated chicken DNA. Arrows indicated ogol specific marker bands.

연구실에서 보유하고 있는 오골계의 배자를 사용하였고, 기존의 연구된 오골계 특이 마커를 이용하여 primer를 제작하였으며, 이를 이용하여 공여체 세포의 이동 능력 여부를 검증할 수 있었다(Fig. 4). 그림에서처럼, 일단, PKH-26으로 염색된(Fig. 3) 상태로 일차로 검증할 수 있는데, 실험을 진행하면서 형광에 의하여 나타나는 세포들이 상태에 따라 다른 세포가 형광을 발하면서 결과 해석에 어려움을 겪곤 한다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 오골계 특이 마커를 이용하여 PCR 증폭을 통하여 검증할 수 있었다. 그림에서 실험구인 2, 3, 4, 5번 밴드가 6번의 오골계 특이 마커와 동일한 밴드를 보이고 있었으며, 다른 품종에서는 나타나지 않았다. 이를 통하여 형광염색 오류를 보정할 수 있었다. 본 연구에서는 또한 사용한 busulfan의 양 및 처리 시간에 따른 효과를 분석하였다(Table 2). Table 2에서 보는 바와 같이 48시간때 처리한 것이 53.4%로 24시간 처리보다 효율이 좋았다. 그러나 본 연구에서는 공여체 원시생식세포의 이동 능력

의 최적화 모델 개발이므로 공여체 원시생식세포 주입 시간과의 편차를 위하여 24시간으로 한정하여 실험을 수행하였다. 이는 수용체 배자에서의 busulfan의 반감기를 고려한 연구로 최대한 공여체 원시생식세포에 영향을 주지 않는 최적의 시간이 선택되었다. Busulfan 처리는 수용체 배발달에 따라(0시간, 24시간, 48시간) busulfan 용액을 수용체 배자에 주입한 후 5.5일령까지 배양한 다음, 5.5일령 배자의 원시생식기내의 원시생식세포의 수를 측정하였다(Table 2). busulfan 양은 Aige-Gil과 Simkiss (1991b)의 실험에 따라 100 µg을 사용하였다.

고 찰

형질 전환 닭을 생산하기 위한 여러 가지 방법들이 수행되어 왔다. 이러한 방법들은 포유류에서 사용되었던 레트로바이러스 방법이나, 1세포기의 수정란에 미세 주입하는 방법, 그리고 배반엽 세포를 이용하는 방법, 그리고 최근 ES 세포나 EG 세포를 이용하는 방법 등이 이용되고 있다. 그러나 이중 대부분은 생식세포를 이용하여 1차적으로 생식선 키메라를 생산한 다음, 그 생식선 키메라에 전이된 외래 DNA를 PCR이나 Southern 방법을 통하여 확인함으로써 형질 전환 닭을 생산하고 있다. 이때 사용되는 것이 주로 배반엽세포와 원시생식세포인데, 이는 자손에게 전달해 줄 모든 유전적 정보를 지니고 있기 때문이다. 그리고 또한 벡터로 사용될 세포의 순수 분리 기술 등도 확립되고 있으며, 이러한 방법의 장점은 *in vitro* 상태에서 다루기가 편리하고, 유전자 전이도 용이하기 때문이다. 그러나 현재까지 원시생식세포를 이용한 결과들은 대부분 낮은 효율의 키메라 닭을 생산하거나 일부 개체에서만 높은 효율을 나타내고 있다(Naito et al., 1994b). 그중에도 높은 효율의 생식선 키메라를 이용한 형

Table 2. Index of sterility in the gonads were treated with heat activated busulfan during germinal crescent period

Treat time	Exp. No. Dose(µg)	1	2	3	4	5	6	Ave.	Sterility(%)
0 hr	0	2,743	2,948	2,942	3,010	3,000	2,815	2,810	0
	100	2,516	2,754	2,841	2,959	2,754	2,417	2,707	3.7
24 hr	0	2,643	3,319	3,566	2,320	2,000	3,111	2,827	0
	100	1,444	2,559	3,218	1,694	1,667	2,000	2,097	25.8
48 hr	0	5,114	4,684	3,649	3,041	3,655	3,854	2,913	0
	100	1,200	2,000	1,150	994	1,314	1,481	1,357	53.4

질 전환 닭 생산 보고는 거의 없는 실정이다. 이는 생식선 키메라 닭이 생산되었다고 해도 외래 유전자의 염색체 상의 삽입되는 가능성이 매우 낮은 이유에 있을 것이다. 그러므로 이러한 문제점을 해결하는 방법은 직접적으로 외부에서 주입한 원시생식세포가 몇 %의 효율로 수용체 배자의 원시생식기에 도착하는지에 대한 정확한 결과와 생식선 키메라의 중요한 관건인 외부 원시생식세포의 상대적 비율의 제고 그리고 또한 주입된 원시생식세포의 성세포 분화 시까지의 생존율의 문제가 가장 중요하리라 보며, 본 연구는 이러한 문제점을 해결할 목적으로 수행하였다. 본 연구에서는 *in vitro* 상태에서 분리한 원시생식세포가 얼마나 오래 동안 일정 정도의 생존율을 유지하는지를 측정하였으며, 그 외에 Ficoll과 유전자 전이 시 처리하는 여러 조건 속에서 최종적으로 수용체 배자의 혈관 내에 주입하기 직전의 생존율이 궁극적으로 성세포로 분화 시 생존율을 좌우하고 수용체 배자와의 공동적으로 정자나 난자를 생산할 수 있는 기능을 획득할 것으로 생각되었다. 결과적으로 6시간 정도까지는 평균 70~80%의 생존율을 보이는 것을 확인하고 최소한 6시간 이전에 수용체 배자에 주입하는 것이 좋다는 것을 알 수 있었다. 그러나 Ficoll을 이용한 순수 분리시(실험구 II)는 다른 실험구에 비하여 생존율이 낮아짐을 확인하였다(Table 1). 그러나 이는 Ficoll이 원시생식세포의 생존율에 영향을 준 것으로 이러한 문제점은 실험구 III, 실험구 IV를 수행하면서 해결이 되었는데, 이는 Ficoll 분리 시 2회의 수세 과정이 있는데 2회 수세로는 원시생식세포에 묻은 Ficoll의 성분이 완전히 수세되지 않아 생존율을 낮추는 원인이 되었으나, 실험구 III, 실험구 IV에서는 실험구 III의 방법에 전기충격법을 사용하면서 2회 이상의 수세를 더 거치므로 실험구 III보다 처리조건이 더 많음에도 불구하고 생존율이 더 높아짐으로 알 수 있었다. 그러므로 실험구 III에서 얻은 결론은 3회 이상의 수세를 하여 충분히 Ficoll 성분을 제거하는 것이 좋음을 알 수 있었다. 다른 배발달 단계에서 분리한 원시생식세포중 혈액에서 분리한 원시생식세포가 여러 처리조건에도 불구하고 가장 높은 생존율을 나타냈다. 일부 연구에서는 이러한 높은 생존율의 원인이 혈관을 타고 이동하는데 있어 높은 에너지가 요구되는데, 이때 혈액 속에서 분리한 원시생식세포가 가장 많은 글라이코젠을 함유하고, 이를 에너지원으로 사용하기 때문이라고 하였다. 그리고 이러한 생존율과 마찬가지로 본 연구 목적 중에 중요한 요인이 수용체 배자의 원시생식세포의 상

대적 비율의 감소를 들 수 있는데, 많은 연구자들이 이러한 목적을 달성하기 위해 여러 연구들을 보고하였다(Aige-Gil & Simkiss, 1991a; Hallet & Wentworth, 1991; Naito et al., 1994b). 본 연구에서 busulfan이 직접적으로 배자의 성세포에 영향을 끼치고 난 후 새롭게 유전자 조작된 외래 원시생식세포에 부정적인 영향을 배제하기 위한 실험조건에서 여러 단계의 사전실험을 거친 결과, busulfan 주입 후 최소 24시간의 공백을 두었을 때 가장 적은 영향을 주입한 공여체 원시생식세포에서 나타나는 것을 알 수 있었다(미발표 결과). 그러므로 가장 적절한 시간에 busulfan을 처리하기 위하여 수정란을 부화기 입란 후 24시간 정도 지나면 배자의 형태가 뚜렷하게 나타나는 시기에 busulfan을 처리하였으며, 24시간 후인 배양 후 48시간 혈관이 발달하기 바로 직전의 외배엽 공간에 원시생식세포를 주입하였다. 비교구와 비교했을 때 실험구에서는 4배의 높은 효율로 공여체 원시생식세포 이동능력을 확인할 수 있었다. 이는 효과적으로 수용체 배자의 원시생식세포의 발달을 저해하고 대신 공여체 원시생식세포가 분열과 이동을 원활하게 하는 효과가 있음을 간접적으로 확인한 결과이다(Fig. 1). Naito et al.은 1994년 보고 논문에서 수용체 배자의 혈액을 추출하여 효율을 높이는 실험을 실시한 바 있으나, 정확하게 *in vivo* 상태에서 효율을 측정할 결과 보고는 없었으며, 단지 많은 실험을 통하여 얻은 많은 개체중 일부 개체에서만 높은 효율의 생식선 키메라 닭을 생산 보고한 바 있다. Naito et al.(1994)이 보고한 결과의 문제점은 일관성 있게 일정 정도의 높은 효율(최소한 50%)의 키메라가 생산되어야, 그 다음 단계의 형질 전환 닭 생산시 적은 노력과 비용으로 단기간에 원하는 닭을 생산할 수 있기 때문이다. 그러므로 본 연구의 의의는 지금까지 얻은 결과를 토대로 최적의 키메라 효율을 높이는 방법을 개발할 수 있다는 것이다. Fig. 2의 결과는 공여체 원시생식세포의 발달단계를 수용체 배자와 맞을 경우, 좀더 효과적으로 이동할 것이라는 가설을 가지고 정확한 배자간의 배양시간을 맞추기 위하여 분리한 원시생식세포를 시간대별 배양 원시생식세포를 주입하였다. 결과적으로 96시간과 118시간 배양한 실험에서 그 이전의 결과보다 높은 결과를 얻을 수 있었는데, 그 이유는 아직 알 수 없으나 배양조건에서 여러 가지 영양물질을 흡수한 원시생식세포의 활성 배가에 어느 정도 도움을 주었을 것으로 생각되지만 좀더 정확한 원인은 추가 실험이 필요할 듯하다(Chang et al., 1997). 결과적으로

적절한 배양을 통하여 생식반월 유래의 원시생식세포는 활성도가 개선되어 비교적 많은 공여체 세포가 이동할 수 있었다. 그리고 60시간 이후에는 이미 도착한 원시생식세포가 일부는 성세포로 분화를 시작하는 시기로 그에 따른 영향으로 나중에 이동하는 원시생식세포가 영향을 받는 것이 아닌가 생각된다. 왜냐하면 원시생식세포의 생존율에는 문제가 없음이 실험 결과를 알 수 있었으며, 기존의 다른 연구에서는 이동하는 원시생식세포 중 일부만만이 원시생식기가 아닌 다른 기관으로 이동하는 것으로 알려져 있으며, 공여체 원시생식세포가 전부 이동을 마쳤다면, 기존의 수용체 배자의 원시생식세포와의 차이가 많이 나지 않기 때문이다. 그리고 본 연구에서는 Simkiss의 연구 방법을 약간 변형하여 가온 busulfan을 100 μ g을 기준으로 배양 배자의 시간에 따라 처리하였다. 결과적으로, 24시간 25.8%에서 48시간 53.4%의 제거 효율을 얻을 수 있었다. 그러나 busulfan 주입 시간을 결정할 때 가장 효율이 좋은 48시간을 택하지 않고 24시간을 택한 이유는 생식반월 유래 원시생식세포는 혈관 발달 이전에 주입해야 하기 때문이다. 그러므로 만일, 다른 기관 유래의 원시생식세포의 경우는 48시간대 busulfan 주입 후 64시간 이전 단계에서 주입해도 무방할 것 같다. 대부분의 원시생식세포가 혈관계로 도입되고 이동을 거쳐 대부분 germinal ridge로 이동하기 때문이다. 본 연구를 통하여 얻어진 주입 시간과 busulfan의 효과는 좀더 효율적이고 잠재성이 높은 원시생식세포 또는 줄기세포가 확보될 수 있을 것으로 생각되며, 이를 통한 세포의 재 프로그래밍 기작을 밝히는 중요한 단서가 될 것으로 사료된다. 또한, 이는 기존에 아직 체세포 복제가 성공하지 못한 닭의 체세포 성공을 시도할 수 있는 중요한 연구 단서가 될 수 있을 것으로 생각되며, 추후 추가적인 연구가 필요할 것이다. 대부분의 원시생식세포의 특징을 통하여 다른 세포와 원시생식세포를 구분하는 실험을 PAS 염색을 통하여 이루어진다. 그러므로 본 연구에서도 Ficoll 방법을 통하여 분리된 세포를 PAS 염색을 통하여 확인하였으며, 이를 PKH-26 염색으로 공여체 PGC임을 증명하였다. 여러 연구 보고와 이전의 실험을 통하여 보면 본 연구에서 사용된 PKH-26의 형광 파장대가 여러 조직에서 염색 유무와 상관 없이 발견되는 경우가 발견된다. 그러므로 본 연구에서는 좀더 정확한 분석이 필요했으며, 그 방법으로 공여체 닭을 이미 기존의 연구를 통하여 특이 마커가 개발된 오플게를 이용하여 primer를 제작하고 검증할 수 있었다. 이

는 정확하게 공여체 원시생식세포의 존재 유무를 검증해 주는 결과로 추후 생식선 키메라 검증 실험시 효과적으로 사용될 것으로 사료된다.

앞으로 연구는 busulfan의 최대 제거 효율 조건을 확립하고 busulfan 반감기에 의한 역가가 제거되었을 때 최적 조건을 통하여 고효율의 키메라 및 복제 닭 연구를 진행할 수 있을 것이다. 상업적 단백질 생산을 위한 바이오리액터(Bio-reactor) 시스템으로서의 형질 전환 닭의 생산은 무엇보다도 외래 유전자의 전이가 매우 중요한 요인이다. 그러므로 본 연구에서 사용된 원시생식세포는 이러한 관점에서 보았을 때 *in vitro* 상태에서 유전자 전이가 자유로우며, 또한 이 원시생식세포를 이용하여 EG cell을 확립하였을 경우, 마우스나 다른 포유류에서 시도하고 있는 특정한 지놈상에 유전자 조작이 가능하여 다양한 형태의 knock-out이나 knock-in된 닭을 생산할 수 있는 장점을 가지고 있다. 그러므로 이러한 결과를 얻기 위한 균일한 효율의 생식선 키메라 닭의 생산은 매우 중요한 연구 주제이며, 앞으로 본 연구 방법을 통하여 높은 효율의 생식선 키메라 닭이 생산될 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2006년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국 학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2006-521-F00046).

인용문헌

- Aige-Gil V, Simkiss K (1991a) Sterilising embryos for transgenic chimeras. *Bri Poult Sci* 32:427-438.
- Aige-Gil V, Simkiss K (1991b) Sterilisation of avian embryos with busulfan. *Res Vet Sci* 50:139-144.
- Being-Tadmor B (1993) Biopharmaceuticals go to market: patterns of worldwide development. *Bio-Technology* 11: 168-172.
- Chang IK, Jeong DK, Hong YH, Park TS, Moon YK, Ohno T, Han JY (1997) Production of germline chimeric chickens by transfer of cultured primordial germ cells. *Cell Biol Int* 21:495-499.
- Etches RJ, Clark ME, Toner A, Liu G, Verrinder-Gibbins

- AM (1996) Contribution to somatic and germline lineage of chicken blastodermal cells maintained in culture. *Mol Reprod Dev* 45:291-298.
- Furuta H, Fujihara N (1999) Proliferation of exogenously injected primordial germ cells(PGCs) into busulfan-treated chicken embryos. *Asian J Androl* 1:187-190.
- Ginsburg M, Eyal-Giladi H (1986) Temporal and spatial aspects of the gradual migration of primordial germ cells from the epiblast into the germinal crescent in the avian embryo. *J Embryol Exp Morph* 95:53-71.
- Hamburger V, Hamilton HL (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J of Morph* 88:49-67.
- Hallett JS, Wentworth BC (1991) The effects of busulfan on gonadal differentiation and development in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Poult Sci* 70:1619-1623.
- Horan PK, Melnicoff MJ, Jensen BD, Slezak SE (1990) Fluorescent cell labeling for *in vivo* and *in vitro* cell tracking. *Methods Cell Biol* 33:469-490.
- Kuhholzer B, Tao T, Machaty Z, Hawley RJ, Greenstein JL, Day, BN, Prather RS (2000) Production of transgenic porcine blastocysts by nuclear transfer. *Mol Reprod Dev* 56:145-148.
- Lue Y, Erkkila K, Liu P, Ma K, Wang C, Hikim A, Swerdloff R (2007) Fate of bone marrow stem cells transplanted into the testis. *Am J Pathol* 170:899-908.
- Naito M, Tajima A, Yasuda Y, Kuwana K (1994a) Production of germline chimeric chickens with high transmission rate of donor-derived gametes, produced by transfer of primordial germ cells. *Mol Reprod Dev* 39:153-161.
- Naito M, Sasaki E, Ohtaki M, Sakurai M (1994b) Introduction of exogenous DNA into somatic and germ cells of chickens by microinjection into the germinal disc of fertilized ova. *Mol Reprod and Dev* 37:167-171.
- Neilan EG, Barsh GS (1999) Gene trap insertional mutagenesis in mice: new vectors and germ line mutations in two novel genes. *Transgenic Res* 8:451-458.
- Park TS, Jeong DK, Kim JN, Song GH, Hong YH, Lim JM, Han JY (2003) Improved germline transmission in chicken chimeras produced by transplantation of gonadal primordial germ cells into recipient embryos. *Biol Reprod* 68:1657-1662.
- Salter DW, Smith EJ, Hughes SH, Wright SE, Crittenden LB (1987) Transgenic chicken: Insertion of retroviral genes into the chicken germ line. *Virology* 157:236-240.
- Sang H, Perry MM (1989) Episomal replication of cloned DNA injected into the fertilized ovum of hen, *Gallus domesticus*. *Mol Reprod Dev* 1:98-106.
- Shinohara T, Kato M, Takehashi M, Lee J, Chuma S, Nakatsuji N, Kanatsu-Shinohara M, Hirabayashi M (2006) Rat produced by interspecies spermatogonial transplantation in mice and *in vitro* microinsemination. *Proc Natl Aca Sci USA* 103:13624-13628.
- Song YH, D'Costa S, Pardue S, Petite J (2005) Production of germline chimeric chickens following the administration of a busulfan emulsion. *Mol Reprod Dev* 70:438-444.
- Swift CH (1914) Origin and early history of the primordial germcells in the chick. *Anat Rec* 202:483-515.
- Vick L, Luke G, Simkiss K (1993) Transgenic birds from transformed primordial germ cells. *Proc Biol Sci* 251:179-182.