

재조합 hTPO를 생산하는 형질전환 닭의 개발

권모선 · 구본철 · 노지열 · 이현아 · 김태완[†]

대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실

Generation of Transgenic Chickens that Produce Bioactive Human Thrombopoietin

Mo Sun Kwon, Bon Chul Koo, Ji Yeol Roh, Hyuna Lee and Teoan Kim[†]

Department of Physiology, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu 705-718, Korea

ABSTRACT

We report here the generation of transgenic chickens that produce human Thrombopoietin (hTPO) using replication-defective Moloney murine leukemia virus (MoMLV)-based vectors packaged with vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G). For the retrovirus vectors, we used hCMV (human Cytomegalovirus) internal promoter to drive the hTPO gene. After confirming the expression of the hTPO gene in various target cells, the concentrated solution of recombinant retrovirus was injected beneath the blastoderm of non-incubated chicken embryos (stage X). The biological activity of the recombinant hTPO in target cell was significantly higher than its commercially available counterpart. Out of 132 injected eggs, 11 chicks hatched after 21 days of incubation and 4 hatched chicks were found to express vector-encoded hTPO gene. However, 3 out of the 4 transgenics died within one month of hatching. The major significance of this study is that it is one of the very few successful reports on the production of transgenic chickens as bioreactors aiming mass production of commercially valuable and biological active human cytokine proteins.

(Key words : Transgenic chicken, Human thrombopoietin (hTPO), Retrovirus vector, Bioreactor, Biological activity)

요 약

본 연구는 vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G)으로 피막이 형성되는 replication-defective MoMLV-based vector를 이용한 hTPO 형질전환 닭의 생산에 관한 연구이다. 실험에 사용한 retrovirus vector의 구조는 hTPO 유전자의 발현 조절을 위해 internal promoter인 hCMV promoter를 이용하였으며 외래 유전자의 발현을 증가시키기 위해 woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPRE) 서열을 도입하였다. 재조합한 vector는 GP2 293 포장세포에 도입하여 virus를 생산하였으며 이 virus를 이용하여 감염시킨 여러 표적세포에서 hTPO의 발현과 생물학적 활성을 확인하였다. 재조합 hTPO의 생물학적 활성은 시판되고 있는 재조합 hTPO에 비해 우월한 것으로 확인되었다. hTPO 형질전환 닭의 생산을 위하여 1,000배 이상 고농도로 농축된 virus를 stage X 단계의 계란의 배반엽 층에 미세주입하여 대리난각 방법으로 배양하였다. 미세주입한 132개의 계란 중 21일 후에 11개의 계란에서 병아리가 부화하였으며 그 중 4마리가 형질전환 개체로 확인되었다. 그러나 생산된 4마리 중 3마리가 부화 후 1개월 이내에 원인불명으로 사망하였다. 본 연구의 의의는 상업적 이용 가능성이 있는 생물학적 활성을 가진 사람의 cytokine 단백질의 대량 생산을 위한 생체 반응기로서의 형질전환 닭 개발의 실례를 제공하는 데 있다.

서 론

바이오의약품으로 사용되는 재조합 단백질은 그 단백질의 유전자가 전이된 미생물, 식물, 동물세포, 그리고 동

물에서 생산될 수 있다(Houdebine, 2008). 미생물과 식물에서 재조합 단백질을 생산하는 경우, 단시간 내에 저비용으로 대량 생산이 가능한 장점이 있으나, 인체 내에서 발현되는 단백질 형태와 구조적인 차이를 나타내어 활성을 가지지 못하거나 인체 투여 시 면역 거부 반응을 나

* 이 논문은 2005년도 정부 지원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원(KRF-2005-050-C00004)과 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 것임.

[†] Corresponding author : Phone: +82-53-650-4470, E-mail: takim@cu.ac.kr

타내게 된다(Hamilton 등, 2003; Ma 등, 2005). Chinese Hamster Ovary (CHO) 등의 동물세포를 이용하는 경우에는 재조합 단백질이 당화(glycosylation) 등의 번역 후 변형(posttranscriptional modification)이 일어난 형태로 배양액 내로 분비됨으로써 인체 내에서 발현되는 원래의 단백질과 매우 유사한 형태를 나타내게 된다(Houdebine, 2002). 그러나 생산량이 매우 적고 생산 system의 구축이나 유지에 있어서 매우 높은 비용이 소모된다는 단점이 있으며, 생산된 단백질의 당화 구조가 매우 불안정한 것으로 알려져 있다(Houdebine, 2002; Thiel, 2004). 이에 비해 동물을 형질전환체로 사용하여 재조합 단백질을 생산할 경우 적은 비용으로 대량 생산이 가능하며 계통이 확립된 후에는 여러 세대에 걸쳐서 지속적인 생산이 가능하다(Fontes 등, 1999). 그리고 번역 후 단백질의 구조 변형이 적절히 일어남으로써 인체에 적용 시 면역 거부 반응을 감소시킬 수 있다(Clark, 1998; Houdebine, 2006). 동물에서 생산되는 재조합 단백질은 주로 우유로 분비되는데 우유에 포함된 다양한 단백질과 지질로 인해 분리 및 정제 과정이 복잡하고 어렵다. 또한, 대부분 포유류의 세대 간격이 길어서 충분한 수의 형질전환 개체의 확보에 많은 시간과 노력, 그리고 비용이 소모된다. 이에 반해 가금의 난으로부터 재조합 단백질을 생산하는 경우에는 대체로 짧은 세대 간격과 저렴한 사육 비용, 그리고 다량의 난의 확보가 용이하다(Ivarie, 2003; Lillico 등, 2005). 또한, 난에 포함된 재조합 단백질의 분리 정제 시에도 우유에 비해 적은 종류의 단백질과 지질이 포함되어 있는 관계로 보다 단순한 과정이 요구된다. 뿐만 아니라 일부 난에서 생산된 재조합 단백질 중에서는 타 포유동물에서 생산된 경우보다 원래 단백질의 당화 양상이 더 유사한 경우도 보고되었다(Raju 등, 2000).

본 연구에서 형질전환 닭을 통해 생산하고자 하는 TPO는 혈소판 생산에 있어서의 일차 조절자로서(Kaushansky, 1998) 거대핵세포형성(megakaryocytopoiesis)을 자극하고 단독 또는 다른 cytokine과 연계되어 조혈모세포의 생존과 증식에 중요한 역할을 한다(Sitnicka 등, 1996). 인체 내에서의 TPO의 생산은 절반 이상이 간에서 이루어지며(Qian 등, 1998) 일부는 신장과 골격근에서도 생산된다. 재조합 TPO는 여러 원인에 의한 혈소판 감소증, 재생불량성 빈혈이나 골수 부전증 등의 치료제로 사용되고 있으며(Vadhan-Raj 등, 2000), 1 g 당 10억 원 정도로 매우 고가의 생리활성물질이다.

본 연구는 외래 유전자의 성공적인 전이를 위한 효율적인 retrovirus vector system을 구축하여 고가의 생리활성물질인 hTPO를 생산하는 생체 반응기로서의 형질전환 닭을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

Retrovirus Vector의 구축과 Virus 생산

본 실험에서 사용한 pLNCTPOW vector는 CMV promoter의 조절 하에 hTPO 유전자가 위치하고 외래 유전자의 발현 촉진을 위한 WPRE 서열이 보완된 구조로서 다음과 같은 과정에 의해 구축되었다. 본 연구실에서 보유하고 있는 pGEM-hTPO vector를 EcoRI 과 Klenow

pLNCTPOW

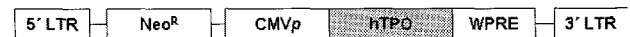


Fig. 1. Structure of pLNCTPOW retrovirus vector. LTR, long terminal repeat; Neo^R, Neomycin resistant gene; CMVp, cytomegalovirus promoter; hTPO, human thrombopoietin gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element.

fragment, 그리고 HindIII로 처리하여 hTPO 단편을 분리한 후 이를 HpaI 과 HindIII를 처리한 pLNCXW와 재조합하였으며 전체적인 구조는 Fig. 1과 같다.

Retrovirus를 생산하기 위하여 구축한 vector는 Gibbon ape leukemia virus의 피막 유전자가 발현되는 PT67 (Clontech, USA) 포장세포에 calcium phosphate 방법으로 transfection하였다. PT67에서 생산된 virus는 Moloney murine leukemia virus의 gag과 pol 유전자가 발현되는 GP2 293 (Clontech, USA) 세포에 감염시켜서 G418 (800 μ g/ml)이 첨가된 배양액에서 2주간 배양하여 GP2 293-LNCTPOW 세포주를 구축하였다. 이 세포주에 VSV-G 유전자를 가진 pVSV-G (Clontech, USA) plasmid를 일시적으로 transfection하여 48시간 후에 virus 배양액을 수확하였다. 생산된 virus는 소의 태아섬유아세포인 BFF, 닭의 배아섬유아세포인 CEF, 사람의 자궁경부암세포인 HeLa, 생쥐의 배아섬유아세포인 NIH3T3, 그리고 돼지의 태아섬유아세포인 PFF 세포에 감염시켜서 600 μ g/ml의 G418이 첨가된 배양액으로 2주간 선별하여 외래 유전자가 전이된 각각의 세포주를 확립하였다.

실험에 사용한 모든 세포들은 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였으며, 4.5 g/l glucose (GibcoBRL, USA), 10% fetal calf serum (Hyclone, USA), 100 U/ml의 penicillin과 100 μ g/ml의 streptomycin (Hyclone, USA)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Hyclone, USA) 배지에서 배양하였다.

재조합 hTPO의 생물학적 활성 측정

형질전환 세포주에서 발현되는 hTPO의 정량 분석

구축한 각 세포주의 배양액을 수확하여 0.22 μ m의 pore size를 가진 cellulose acetate filter로 여과한 후 100 μ l를 덜어내어 2배씩 단계적으로 희석하여 Human Tpo Quantikine ELISA kit (R&D systems, USA)을 사용해서 정량을 실시하였다. 먼저 여러 단계의 농도로 희석한 standard와 각 sample을 plate의 각 well에 200 μ l씩 넣어서 실온에서 3시간 방치한 후 wash buffer로 4회 수세하였다. 각 well에 200 μ l의 anti-hTPO-HRP conjugate를 더한 후 실온에서 1시간 방치한 후 wash buffer로 4회 수세하였으며, 200 μ l의 tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution을 각 well에 더하여 빛을 차단시킨 상태로 실온에서 30분간 방치한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 본 실험은 3회 반복 실시하였다.

Mo7e 세포를 이용한 재조합 hTPO의 생물학적 활성 측정

각 세포 배양액은 정량한 결과를 바탕으로 하여 100 ng/ml의 농도가 되도록 희석하여 준비해 두었다. hTPO의 생물학적 활성 측정에 주로 사용되는 거핵모세포주(megakaryoblastic cell line)인 Mo7e (Avanzi 등, 1988)

세포를 96 well microplate의 각 well에 3×10^4 개씩 seeding한 후 대조구로 사용하기 위한 재조합 hTPO 단백질 (R&D system, USA)과 동량의 hTPO가 포함된 각 세포의 배양액을 2배씩 단계적으로 희석하여 각 well에 50 μ l씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 48시간 배양하였다. hTPO에 의한 Mo7e 세포의 증식 활성을 확인하기 위하여 Cell Proliferation Kit I (Roche, Germany)를 사용하여 MTT assay를 실시하였다. 각 well에 10 μ l의 MTT labelling reagent를 더해준 후 4시간동안 반응시킨 후 100 μ l의 solubilization solution을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 16시간 방치하였다. 반응이 종결된 plate를 microplate reader를 이용하여 595 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 본 실험은 3회 반복 실시하였다.

고농축 Virus의 생산과 닭의 배아로의 Virus 감염

고농축 Virus의 생산

닭의 배아에 감염시키기 위한 고농축 virus는 GP2 293-LNCTPOW 세포에 pVSV-G를 transfection하여 생산한 virus가 포함된 배양액을 4°C, 50,000×g의 속도에서 90분간 fixed-angle rotor (Beckman 70Ti)를 이용한 초원심분리 방법으로 1,000배 이상 농축하여 준비하였다. 상층액을 완전히 제거한 후 침전물에 DMEM을 첨가하여 4°C에서 16시간 방치한 후 재부유하였다. 농축한 virus stock은 0.45 μ m pore-size의 cellulose acetate filter를 이용하여 여과한 후 다음 실험 직전까지 -70°C에 보관하였다.

닭의 배아로의 Virus 감염

본 연구에서는 stage X (Eyal-Giladi와 Kochav, 1976) 시기의 배반엽층에 virus를 미세주입한 후 대리난각 방법(Petitte와 Mozdziaik, 2002)을 이용하여 배아를 배양하고자 하였다. 먼저 대리난각으로 사용하기 위한 계란은 둔단부를 직경 3.4 cm로 절단하여 증류수로 수세한 후 건조시켜 두었다. 본 실험에 사용된 유정란은 하이브라운 산란계종으로, 60±3g 무게의 종란을 선택하였다. 부화를 시작하지 않은 stage X 시기의 배아를 가진 종란을 파각하여 내용물을 대리난각으로 옮긴 후 본 연구실에서 개량한 manipulator와 특수가공한 microinjection pipette (SIGMA, pipette, microcapillary, 50 μ l, 100 mm length)을 이용하여 10 μ g/ml 농도로 polybrene이 첨가된 virus stock 3 μ l를 계란의 배반엽층에 미세 주입하였다. Virus의 주입이 끝난 후 배양 전날 준비해 둔 가온한 수양성 난백으로 대리난각을 완전히 채운 후 vinyl wrap으로 밀봉하여 37.5°C의 온도와 상대 습도 60% 조건의 부화기에 입란하여 15분 주기로 90° 각도로 전란시키면서 3일간 배양하였다. 3일간 배양 후 종란의 무게보다 약 25g 정도 더 무거운 계란을 선별하여 둔단부를 4 cm 직경으로 절단한 대리난각으로 내용물을 모두 옮겼다. 다시 wrap으로 밀봉하여 37.5°C의 온도와 상대 습도 60% 조건의 부화기에 입란하여 30분 주기로 30° 각도로 전란시키면서 15일간 배양하였다. 19일째부터는 계란을 37°C의 온도와 상대 습도 75% 조건의 발생기로 옮긴 후 전란하지 않는 상태에서 부화할 때까지 배양하였다. 배

양하는 동안 3일, 18일, 21일째에 계란의 발생 진행 여부와 부화율을 관찰하였다.

생산된 형질전환 닭의 분자생물학적 검정

Genomic DNA PCR

부화한 병아리로부터 채취한 혈액으로부터의 genomic DNA의 분리는 G-DEX II genomic DNA extraction kit (Intron Biotechnology, Korea)을 이용하여 실시하였다. PCR 반응에 사용한 각 primer의 서열은 다음과 같다. hTPO에 해당하는 primer로 forward primer는 5'TGCTGCCTGCTGTGGACTTTAG 3', reverse primer는 5'ACCTGGAGGTTTGGTTCAGCAG 3'로 558 bp의 단편으로 증폭되며, Neo에 해당하는 primer로 forward primer는 5'ACGTTGTCACCTGAAGCGGGAAG 3', reverse primer는 5'GCAATATCACGGGTAGCCAACG 3'로 442 bp의 단편으로 증폭된다. GAPDH 유전자에 대한 forward primer는 5'ACGCCATCACTATCTTCCAGGAG 3'이며, reverse primer는 5'CAGCAGCCTTCACTACCCTCTTG로 582 bp의 증폭 크기를 가진다. 각 병아리의 혈액으로부터 분리한 genomic DNA 1 μ g은 50 pmol의 각 primer, 5 μ l의 10X PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM의 각 dNTP, 그리고 2.5 U Taq polymerase (Promega, USA)와 혼합한 후 최종적으로 50 μ l의 PCR 반응액으로 준비되었다. PCR 반응은 초기 변성을 위하여 94°C에서 5분간 방치한 다음, 94°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 30초간 반응하는 cycle을 35회 반복 실시한 후 최종 신장을 위해 72°C에서 7분간 반응하였다.

ELISA 분석

ELISA 분석은 2월령의 형질전환 닭에서 채취한 혈액의 혈장만을 분리하여 원액에서부터 2배수로 단계적으로 희석한 후 Human Tpo Quantikine ELISA kit (R&D systems, USA)을 사용하여 실시하였다. 분석 과정은 세포에서 발현된 hTPO의 측정과 동일한 방법으로 진행하였다.

결 과

재조합 hTPO 단백질의 생물학적 활성 측정

LNChTPOW virus에 감염된 각 세포 배양액을 수확하여 ELISA를 이용하여 hTPO 농도를 측정한 결과, CEF에서 13.5 μ g/ml의 가장 높은 농도를 나타내었으며, 다른 일차 배양세포인 BFF와 PFF에서는 각각 0.98 μ g/ml와 0.88 μ g/ml의 상대적으로 저조한 농도를 보였다(Fig. 2). NIH3T3에서는 7.97 μ g/ml, HeLa에서는 4.98 μ g/ml의 농도로 정량되었다(Fig. 2). 이 양을 기준으로 대조구인 재조합 hTPO와 동량의 hTPO가 포함되도록 각 세포 배양액을 희석하여 Mo7e 세포 배양에 공급한 후 세포의 증식 촉진 정도를 측정하여 생물학적 활성을 조사하였다. 대조구와 세포 배양액의 hTPO는 모두 0.1 ng/ml 이상의 농도에서 Mo7e 세포의 증식을 촉진하기 시작하는 것으로 확인되었다. 대부분의 세포에서 생산된 hTPO는 대조구로 사용한 재조합 hTPO보다 생물학적 활성이 우

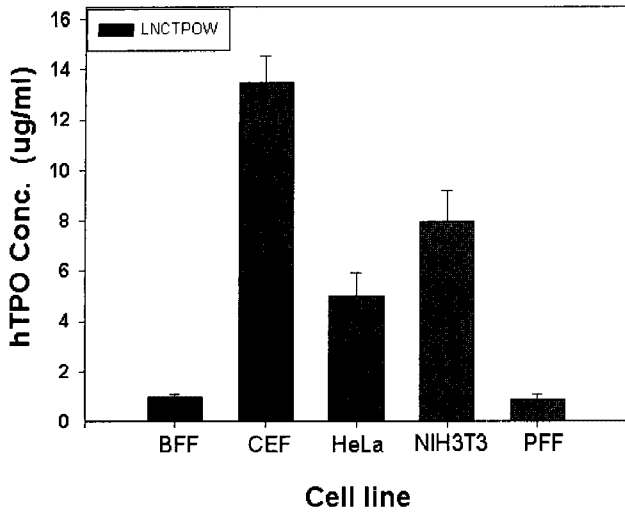


Fig. 2. Quantification of hTPO levels secreted from bovine fetal fibroblasts (BFFs), chicken embryonic fibroblasts (CEFs), human cervical carcinoma cells (HeLa), mouse embryonic fibroblasts (NIH-3T3), and porcine fetal fibroblasts (PFFs) infected with LNCTPOW. The concentration of the hTPO released into the medium was determined by ELISA as described in the Materials and Methods. The data were obtained from experiments performed in triplicate and are presented as the mean+SD.

월한 것으로 확인되었으며, 특히 CEF-LNCTPOW에서 발현된 hTPO는 현저하게 높은 활성을 나타내었다(Fig. 3). 즉, 가장 높은 생물학적 활성을 나타낸 CEF-LNCTPOW의 hTPO와 대조군으로 사용한 재조합 hTPO를 동량으로 첨가하여 Mo7e 세포의 증식 촉진 정도를 비교해 본 결과, 대조군 hTPO에 비해 세포에서 발현된 hTPO가 매우 높은 증식 촉진 현상을 보였다(Fig. 3-A). 이는 동일한 정도의 Mo7e 세포 증식 촉진을 유도할 경우 세포에서 발현된 hTPO가 대조군 hTPO에 비해 훨씬 적은 양이 요구됨을 의미한다. hTPO 유전자가 전이되지 않은 정상 세포의 배양액에서는 hTPO의 생물학적 활성이 나타나지 않았다(data not shown).

형질전환 닭의 부화율 및 형질전환 여부 검정

여러 조건에서 부화한 각 병아리들의 부화율을 확인한 결과, 대리난각만 실시한 대조군에서는 90%의 부화율을 나타내었으며, DMEM 배지만을 주입한 실험군에서는 약 30%의 부화율을 나타내었다(Table 1). 이러한 현상은 배아에 배지를 주입하는 과정에서 생기는 물리적인 충격에 의한 발생 효율의 저하에 의한 것으로 추정된다. LNCTPOW virus를 주입한 실험군에서는 약 8.3%의 저조한 부화율을 나타내었는데(Table 1), 이는 virus의 미세주입에 의한 물리적인 영향뿐만 아니라 전이된 외래 유전자의 지속적인 발현에 의한 개체의 생리적인 부작용도 원인으로 작용한 것으로 보인다.

hTPO와 neomycin 저항성 유전자, 그리고 GAPDH 유전자에 대한 PCR을 실시한 결과, 부화한 11마리 중 4마리의 병아리가 형질전환 개체로 확인되어 약 36.4%의 형질전환율을 나타내었다(Table 1; Fig. 4). 4마리(No. 1, 2, 7, 9)의 병아리 중 3마리(No. 1, 2, 9)는 4주령 정도가 지나서 폐사하였다. 남은 1 마리(No. 7)의 형질전환 닭

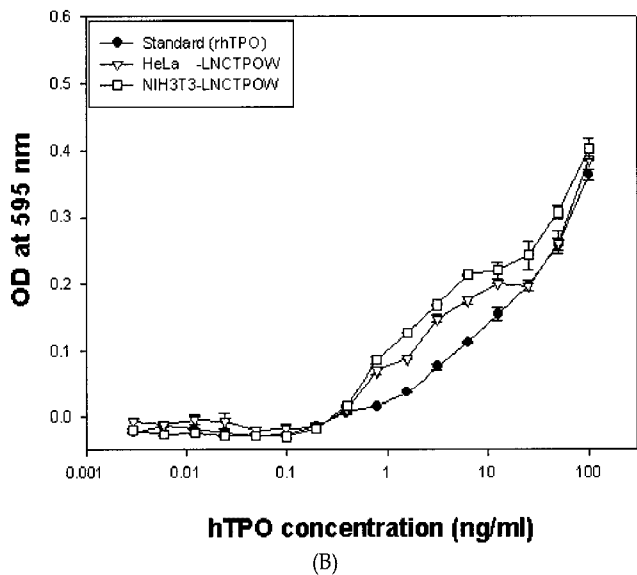
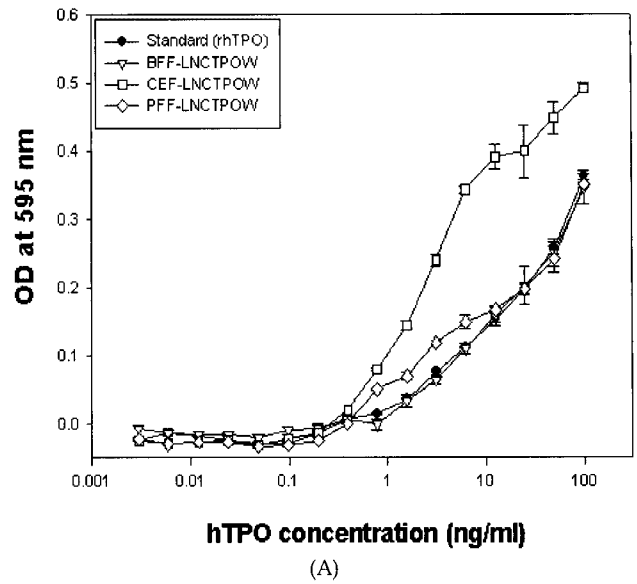


Fig. 3. Bioassay of hTPO in various target cells on the proliferation of Mo7e cells. Various concentration of hTPOs were added to each well, and the incubation was continued for additional 2 days. The data were obtained from experiments performed in triplicate and are presented as the mean+SD.

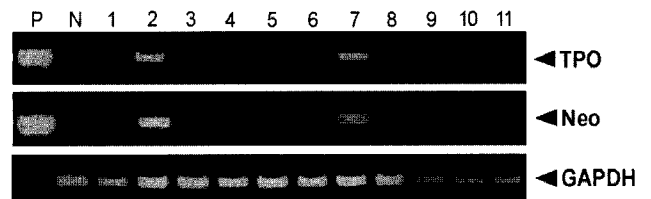


Fig. 4. Detection of the hTPO gene in the Go transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the 11 hatched chickens after virus injection and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pLNCTPOW), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken were used, respectively.

Table 1. Hatchability and transgenic efficiency of manipulated chicken embryos

Treatment	Number of eggs	Number of embryos 3 days post-injection (%)	Number of hatched chicks (%)	Number of transgenic chicks (%) ^a
No injection	50	47 (94.0)	45 (90.0)	
DMEM injection	60	35 (58.3)	18 (30.0)	
Virus injection	132	62 (47.0)	11 (8.3)	4 (36.4)

^a Only chicks with detectable hTPO by PCR were counted as transgenics.

혈액의 혈장에서 ELISA를 이용하여 hTPO의 발현 정도를 측정하였더니 1.62 µg/ml의 농도로 나타났다.

고 찰

동물을 생체반응기로 이용한 바이오 의약품의 대량 생산에 관한 연구는 지금까지 주로 우유, 노 또는 혈액을 통하여 백혈구 증식인자, 조혈인자, 항체 등 고가의 생물 의약품을 배출시키는 소, 돼지, 흑염소 등의 개발에 중점을 두어 진행되어 왔다(Houdebine, 2008). 그러나 현재까지 많은 시간과 비용이 투자되었음에도 불구하고 형질 전환 가축을 이용한 바이오 의약품의 경제적인 성공 사례는 혈액 응고에 관련된 Antithrombin III (Edmunds 등, 2005), 선천성 폐기종 관련 α_1 -Antitrypsin (Archibald 등, 1990)과 폼페병(Pompe's disease)이라는 근육 질환 관련 α -Glucosidase (van den Hout 등, 2000) 등과 같은 몇몇의 경우에 국한되고 있다. 이와 같이 미미한 성공 사례의 근본 원인은 대부분 포유류들의 긴 세대 간격, 천문학적 비용과 많은 시간, 그리고 외래 단백질이 체내에서 과잉 발현되므로 인해 발생하는 형질전환 동물의 생리적인 부작용 때문으로 요약할 수 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 본 연구에서는 생체 반응기의 대상으로 포유류 대신 가금을 선택하였다. 생체 반응기로서 가금이 포유동물에 비해 갖는 장점은 첫째, 성숙 기간과 세대 간격이 짧으며, 둘째, 포유류에 비해 번식 능력이 대단히 높기 때문에(연간 300여개의 계란을 생산) 비교적 적은 노력과 비용으로 많은 개체를 대상으로 하는 실험이 가능하다는데 있다(Han 등, 1994; Naito 등, 1994). 또한, 각 계란의 난백에는 총 3 g 정도의 단백질 성분이 있으며, 단백질의 종류는 8가지 뿐이다. 따라서 형질전환 포유동물의 젖에 비하여 형질전환 닭의 계란에 함유된 재조합 단백질을 분리 및 정제하는 것이 훨씬 용이하다. 현재까지 형질전환 닭으로부터 발현을 시도한 재조합 단백질로는 단일 클론 항체(Zhu 등, 2005), single chain Fv- Fc fusion protein (Kamihira 등, 2005), 사람의 EPO (Kodama 등, 2008), 사람의 G-CSF (Kwon 등, 2008) 등이 있으나 경제적 가치가 입증된 성공적인 사례는 전무한 실정이다.

형질전환 가금을 생산하기 위한 외래 유전자의 전이 방법에는 lentivirus vector를 사용하는 방법(McGrew 등, 2004), retrovirus vector를 사용하는 방법(Harvey 등, 2002; Kamihira 등, 2005; Koo 등, 2006), ES 세포에 DNA를 transfection하는 방법(Zhu 등, 2005), 그리고 분리한 PGC

세포에 virus를 이용한 유전자 전이를 실시하여 다시 배아로 주입하는 방법(Park 등, 2003; van de Lavoie 등, 2006) 등이 있다. 본 연구에서는 이 방법 중 기술적인 용이성과 높은 유전자 전이의 효율성을 가진 retrovirus vector system을 이용하여(Kwon 등, 2004) 형질전환 닭을 생산하는 방법을 확립하고 나아가 사람의 TPO를 발현하는 형질전환 닭의 생산에 최종 목적을 두었다. Virus vector에 의한 유전자 전이에 있어서 가장 문제시되는 생물학적 안정성의 확보는 oncogene 서열이 완전히 제거된 virus vector를 사용하고 표적세포의 genome에 삽입되었을 경우에 발생할 수 있는 homological recombination이 일어나지 않도록 상이한 종의 virus vector를 사용하였다(Kim, 2002). hTPO 유전자의 전이를 위한 retrovirus vector는 MoMLV 유래의 vector로서 초기 배발달에 있어서 cytosine 잔기의 *de novo* methylation에 의한 LTR promoter의 불활성에 의한 유전자 발현의 silencing이 문제시되고 있다(Jahner 등, 1982; Mizuarai 등, 2001). 이를 해결하기 위하여 본 연구에서는 internal promoter인 CMV promoter를 사용하였으며, 외래 유전자의 발현율을 증가시키기 위하여 retrovirus vector에 WPRE (Zufferey 등, 1999) 서열을 도입하였다. 이 WPRE 서열은 본 연구자의 발표 논문에서 이미 단백질 발현의 촉진에 큰 영향을 나타내는 것으로 보고되어 있으며, GFP 유전자가 전이된 형질전환 닭의 생산 연구에도 사용되었다(Koo 등, 2006; Kwon 등, 2008). 본 연구의 수행에 있어서 외래 유전자가 전이될 표적세포는 기술적인 용이성 때문에 갖 산란된 계란(stage X)의 배반엽세포로 한정하였다. 조류의 수정란은 수정 후부터 산란 직후까지 계속 분열하기 때문에 stage X 계란의 배반엽은 이미 60,000개 이상의 세포로 구성되어 있는데(Eyal-Giladi 등, 1981), 고농도의 virus stock을 사용하지 않을 경우 높은 mosaicism으로 인해 형질전환 닭의 생산율은 현저히 낮아지게 된다. 이를 해결하기 위하여 본 연구에서는 1,000배 이상의 농도로 virus의 농축이 가능하고 감염성의 손실이 전혀 없는 것으로 확인된 VSV-G pseudotyped retrovirus vector system (Burns 등, 1993)을 사용하였다.

형질전환 닭의 혈액에 포함된 hTPO의 농도는 1.62 µg/ml로 나타났는데, 이는 1999년 Sohn 등의 연구 결과에서 나타난 hTPO 형질전환 생쥐의 우유에서 발현된 농도인 0.02에서 1,500 µg/ml에 비해 낮은 수치이다. 이는 형질전환 생쥐의 경우에는 유전자의 전이가 한 개의 세포인 수정란의 단계에서 이루어져서 생산된 생쥐의 모든 세포에 외래 유전자가 전이된 반면, 닭의 경우에는 약 60,000 여개의 세포가 존재하는 stage X의 배반엽층에

유전자를 전이시킴으로써 형질전환되지 않은 세포들이 많이 존재하기 때문이다. 따라서 G_1 이 생산되면 재조합 단백질을 발현하는 세포 수가 증가하게 되고 hTPO의 농도도 증가할 것으로 예상된다. 본 연구실에서 생산한 hG-CSF 닭의 경우에서도 G_0 에 비해 G_1 에서 높은 농도의 재조합 hG-CSF가 확인되었다(Kwon 등, 2008).

본 연구에서 발현시킨 hTPO의 생물학적 활성은 시판되고 있는 대조구에 비해 매우 우월한 활성을 나타내는 것으로 확인되는데 비해 Kodama 등(2008)이 보고한 형질전환 닭에서 발현시킨 cytokine 일종인 hEPO의 생물학적 활성 측정에 관한 연구 결과에서는 시판되고 있는 재조합 hEPO에 비해 거의 유사하거나 조금 우월한 정도의 활성을 나타내었다.

생산된 형질전환 닭 4마리 중에서 3마리가 생후 1개월 내에 특이한 병인이 나타나지 않고 폐사를 하였는데, 이는 기존의 특정 외래 유전자의 지속적인 발현에 의한 생리적인 부작용에 원인이 있거나(Ebert 등, 1988) 개체에 대한 사양 관리의 미비에 의한 것으로 추정되며 보다 정확한 폐사 원인은 추가적인 실험을 통해 알 수 있을 것이다. 이와 유사한 현상으로는 본 연구실에서 생산한 hG-CSF 형질전환 닭의 경우에도 부화 후 1개월 내에 폐사하였으며(Kwon 등, 2008), hEPO가 발현된 형질전환 토끼에서도 여러 가지 비정상적인 생리적 현상이 보고되었다(Massoud 등, 1996). 따라서 앞으로의 연구에서는 외래 유전자의 발현을 시기적, 조직적, 인위적으로 조절하기 위한 발현 조절 system의 구축에 주안점을 두어야 할 것으로 사료된다. 이상의 여러 가지 인자들이 포함된 hTPO 형질전환 닭의 생산에 관한 여러 연구 결과는 차후 형질전환 가금을 비롯한 여러 동물의 생산에 있어서 매우 중요한 분자생물학적, 생리학적인 정보와 기술을 제공할 수 있을 것이다.

인용문헌

1. Archibald AL, McClenaghan M, Hornsey V, Simons JP, Clark AJ (1990): High-level expression of biologically active human alpha 1-antitrypsin in the milk of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5178-5182.
2. Avanzi GC, Lista P, Giovinzano B, Moniero R, Saggio G, Benetton G, Codd R, Cattoretti G, Pegoraro L (1988): Selective growth response to IL-3 of a human leukaemic cell line with megakaryoblastic features. *Br J Haematol* 69:359.
3. Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK (1993): Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8033-8037.
4. Clark AJ (1998): The mammary gland as a bioreactor: Expression, processing and production of recombinant proteins. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3:337-350.
5. 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.
6. Edmunds T, Van Patten SM, Pollock J, Hanson E, Bernasconi R, Higgins E, Manavalan P, Ziomek C, Meade H, McPherson J, Cole ES (2005): Transgenically produced human antithrombin: structural and functional comparison to human plasma-derived antithrombin. *Blood* 91:4561-4571.
7. Eyal-Giladi H, Ginsburg M, Fabarov A (1981): Avian primordial germ cells are of epiblastic origin. *J Embryol Exp Morph* 65:139-147.
8. Eyal-Giladi H, Kochav S (1976): From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. *Dev Biol* 49:321-337.
9. Fontes CM, Ali S, Gilbert HJ, Hazlewood GP, Hirst BH, Hall J (1999): Bacterial xylanase expression in mammalian cells and transgenic mice. *J Biotechnol* 72:95-101.
10. Hamilton SR, Bobrowicz P, Bobrowicz B, Davidson RC, Li H, Mitchell T, Nett JH, Rausch S, Stadheim TA, Wischniewski H, Wildt S, Gerngross TU (2003): Production of complex human glycoproteins in yeast. *Science* 301:1244-1246.
11. Han JY, Shoffner RN, Guise KS (1994): Microinjection and expression of marker gene in the early chicken embryo. *Korean J Animal Sci* 36:244-251.
12. Harvey AJ, Speksnijder G, Baugh LR, Morris JA, Ivarie R (2002): Expression of exogenous protein in the egg white of transgenic chickens. *Nat Biotechnol* 20:396-399.
13. Houdebine LM (2002): Antibody manufacture in transgenic animals and comparisons with other systems. *Curr Opin Biotechnol* 13:625-629.
14. Houdebine LM (2006): Transgenic animal models and target validation. *Methods Mol Biol* 360:163-202.
15. Houdebine LM (2008): Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* doi:10.1016/j.cimid.2007.11.005.
16. Ivarie R (2003): Avian transgenesis: progress towards the promise. *Trends Biotechnol* 21:14-19.
17. Jahner D, Stuhlmann H, Stewart CL, Harbers K, Lohler J, Simon I, Jaenisch R (1982): *De novo* methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis. *Nature* 298:623-628.
18. Kamihira M, Ono KI, Esaka K, Nishijima KI, Kigaku R, Komatsu H, Yamashita T, Kyogoku K, Iijima S (2005): High-level expression of single-chain Fv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens by using a retro-

- viral vector. *J Virol* 79:10864-10874.
19. Kaushansky K (1998): Thrombopoietin. *N Engl J Med* 339:746-754.
 20. Kim T (2002): Retrovirus-mediated gene transfer. In: Pinkert CA (eds.). *Transgenic Animal Technology*. 2nd ed. Academic Press, San Diego, USA, pp 173-193.
 21. Kodama D, Nishimiya D, Iwata K, Yamaguchi K, Yoshida K, Kawabe Y, Motono M, Watanabe H, Yamashita T, Nishijima K, Kamihira M, Iijima S (2008): Production of human erythropoietin by chimeric chickens. *Biochem Biophys Res Commun* 367:834-839.
 22. Koo BC, Kwon MS, Choi BR, Kim JH, Cho SK, Sohn SH, Cho EJ, Lee HT, Chang W, Jeon I, Park JK, Park JB, Kim T (2006): Production of germline transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein using a MoMLV-based retrovirus vector. *FASEB J* 20:2251-2260.
 23. Kwon MS, Koo BC, Choi BR, Kim JH, Park Y-Y, Lee YM, Suh HS, Park YS, Lee HT, Kim J-H, Roh JY, Kim N-H, Kim T (2008): Generation of transgenic chickens that produce bioactive human granulocyte-colony stimulating factor. *Mol Reprod Dev* 75:1120-1126.
 24. Kwon MS, Koo BC, Choi BR, Lee HT, Kim YH, Ryu WS, Shim H, Kim JH, Kim NH, Kim T (2004): Development of transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein. *Biochem Biophys Res Commun* 320:442-448.
 25. Lillico SG, McGrew MJ, Sherman A, Sang HM (2005): Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs. *Drug Discov Today* 10:191-196.
 26. Ma S, Jevnikar AM (2005): Transgenic rice for allergy immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:17255-17256.
 27. Massoud M, Attal J, Thepot D, Pointu H, Stinnakre MG, Theron MC, Lopez C, Houdebine LM (1996): The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits. *Reprod Nutr Dev* 36:555-563.
 28. McGrew MJ, Sherman A, Ellard FM, Lillico SC, Gilhooley HJ, Kingsman AJ, Mitrophanous KA, Sang H (2004): Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep* 5:728-733.
 29. Mizuarai S, Ono K, Yamaguchi K, Nishijima K, Kamihara M, Iijima S (2001): Production of transgenic quails with high frequency of germ-line transmission using VSV-G pseudotyped retroviral vector. *Biochem Biophys Res Commun* 286:456-463.
 30. Naito M, Tagima A, Tagima T, Yasuda Y, Kuwana T (1994): Preservation of chick primordial germ cells in liquid nitrogen and subsequent production of viable offspring. *J Reprod Fertil* 102:321-325.
 31. 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.
 32. Petite JN, Mozdziak PE (2002): Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs. In Pinkert CA, editor. *Transgenic Animal Technology*, 2nd edn. San Diego: Academic Press. p279-306.
 33. Qian S, Fu F, Li W, Chen Q, deSauvage FJ (1998): Primary role of the river in thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells. *Blood* 87:4998-5005.
 34. Raju TS, Briggs JB, Borge SM, Jones AJ (2000): Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology* 10:477-486.
 35. Sitnicka E, Lin N, Priestley GV, Fox N, Broudy VC, Wolf NS, Kaushansky K (1996): The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells. *Blood* 87:4998-5005.
 36. Sohn BH, Kim SJ, Park H, Park SK, Lee SC, Hong HJ, Park YS, Lee K-K (1999): Expression and characterization of bioactive human thrombopoietin in the milk of transgenic mice. *DNA Cell Biol* 18: 845-852.
 37. Thiel KA (2004): Biomanufacturing from bust to boom... to bubble? *Nat Biotechnol* 22:1365-1372.
 38. Vadhan-Raj S, Verschraegen CF, Bueso-Ramos C, Broxmeyer HE, Kudelka AP, Freedman RS, Edwards CL, Gershenson D, Jones D, Ashby M, Kavanagh JJ (2000): Recombinant human thrombopoietin attenuates carboplatin-induced severe thrombocytopenia and the need for platelet transfusions in patients with gynecologic cancer. *Ann Intern Med* 132:364-368.
 39. Van de Lavoie MC, Diamond JH, Leighton PA, Mather-Love CM, Heyer BS, Bradshaw R, Kerchner A, Hooi LT, Gessaro TM, Swanberg SE, Delany ME, Etches RJ (2006): Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature* 441: 766-769.
 40. Van den Hout H, Reuser AJ, Vulto AG, Loonen MC, Cromme-Dijkhuis A, Van der Ploeg AT (2000): Recombinant human alpha-glucosidase from rabbit milk in Pompe patients. *Lancet* 356:397-398.
 41. Zhu L, van de Lavoie MC, Albanese J, Beenhouwer DO, Cardarelli PM, Cuison S, Deng DF, Deshpande S, Diamond JH, Green L, Halk EL, Heyer BS, Kay RM, Kerchner A, Leighton PA, Mather-Love CM, Morrison SL, Nikolov ZL, Passmore DB, Pradas-Monne A, Preston BT, Rangan VS, Shi M, Srinivasan M, White SG, Winters-Digiaccinto P, Wo-

- ng S, Zhou W, Etches RJ (2005): Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. *Nat Biotechnol* 23:1159-1169.
42. 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: 2008. 8. 18 / 채택일자: 2008. 9. 5)