

hEPO 유전자의 발현이 조절되는 형질전환 닭의 생산

구본철 · 권모선 · 김태완[†]

대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실

Generation of Transgenic Chickens Regulating hEPO Gene Expression

Bon Chul Koo, Mo Sun Kwon and Teoan Kim[†]

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

ABSTRACT

We report here the production of transgenic chickens that can regulate human erythropoietin (hEPO) gene expression. The glycoprotein hormone hEPO is an essential for viability and growth of the erythrocytic progenitors. Retrovirus vector system used in this study has two features including tetracycline-controllable promoter and woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulator element (WPRE). The former is for to reduce the possibility of physiological disturbance due to constitutional and unregulated expression of hEPO gene in the transgenic chicken. The latter is for maximum expression of the foreign gene when we turn-on the gene expression. A replication-defective Moloney murine leukemia virus (MoMLV)-based vectors packaged with vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G) was injected beneath the blastoderm of non-incubated chicken embryos (stage X). Out of 325 injected eggs, 28 chicks hatched after 21 days of incubation and 16 hatched chicks were found to express the hEPO gene delivered by the vector. The biological activity of the recombinant hEPO in transgenic chicken serum was comparable to its commercially available counterpart. The recombinant hEPO in transgenic chicken serum had N- and O-linked carbohydrate similar to that produced from *in vitro* cultured cells transformed with hEPO gene.

(Key words : Transgenic chicken, Human erythropoietin (hEPO), Tet system, Retrovirus vector)

서 론

hEPO는 적혈구계 전구세포의 증식 및 성숙에 관여하는 당단백질 호르몬으로서 주로 신장에서 생산된다(Jelkmann, 2004). 이 당단백질은 165개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 3개의 N-당 잔기와 1개의 O-당 잔기를 가지고 있다(Rush 등, 1995; Jelkmann, 2004). 이 당 잔기 부분은 hEPO의 반감기와 *in vivo*에서의 활성에 관여하는 부위로 알려져 있다(Elliott 등, 2004). 지금까지 몇몇의 선행된 연구에서 형질전환 포유류의 유증을 통한 hEPO의 생산을 시도하였으나, 생산량이 매우 미미하여 상업적으로 성공된 사례는 전무한 상태이다(Aguirre 등, 1998; Park 등, 2006). 이러한 현상은 hEPO와 포유류의 개체 자체에서 생산되는 EPO의 높은 유전적 상동성으로 인해 개체의 생리적인 부작용을 유발하기 때문인 것으로 추정된다(Penno 등, 2010). 또한, 포유류는 생리활성 단백질의 생산을 위한 생체반응기로 사용하기에 몇 가지 단점을 가지는데, 방대한 사육 시설 및 고가의 사육 비용이 요구되고 긴 성숙 기간이 필요하

다. 또한, 단백질 분리 과정이 복잡하며 프리온과 관련된 질병에 노출될 위험이 있다(Dyck 등, 2003; Whitelaw, 2004). 이에 반해 조류를 생체반응기로 이용할 경우, 난백을 통한 단백질 생산이 가능하여 분리 정제가 용이하고 인체에서 발현되는 단백질과 매우 유사한 당화 과정이 일어나는 것으로 알려져 있다(Raju 등, 2000; Lillico 등, 2005). 실제로 Kodama 등(2008)의 연구에서 닭에서 발현된 EPO가 hEPO와 유사한 형태의 당 잔기와 생물학적 활성을 가지는 것으로 보고되었다. 또한, 짧은 세대 간격과 다산성, 그리고 비교적 적은 사육 비용 등의 장점을 가진다(Ivarie, 2003). 이러한 장점 때문에 최근에는 유전적으로 상관관계가 비교적 적은 조류를 이용한 인간의 생리활성 단백질 생산 연구가 시도되고 있다. 현재까지 형질전환 닭을 이용하여 생산된 치료용 단백질로는 monoclonal antibody (Kamihira 등, 2005; Zhu 등, 2005), human interferon α -2b (Rapp 등, 2003), single chain Fv-Fc fusion protein (Kamihira 등, 2005), hEPO (Kodama 등, 2008; Penno 등, 2010), 그리고 hG-CSF (Kwon 등, 2008) 등이 있다. 몇몇의 경우를 제외하고 대부분의 연구에서는 다음 세대로의 유전자 전이가 확

* 이 논문(또는 저서)은 2007년도 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2007-359-F00006).

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

인되지 않았는데, 이는 유전적인 상동성이 낮더라도 외래 유전자의 지속적인 발현에 의한 개체의 생리적인 부작용이 유발됨으로써 다음 세대 생산이 정상적으로 이루어지지 않은 것으로 추정된다. 이를 극복하기 위하여 본 연구에서는 외래 유전자의 발현을 인위적으로 조절할 수 있는 Tet system (Gossen과 Bujard, 1992)을 도입하여 형질전환 닭을 생산하고자 하였으며, 생산된 개체 내에서 hEPO 유전자의 발현 조절이 가역적으로 이루어지는지의 여부를 확인하고자 하였다. 또한, 생산된 재조합 hEPO의 생물학적 활성 및 당 잔기 분석을 확인하여 형질전환 닭이 생리활성 물질의 대량 생산을 위한 생체반응기로서의 가능성을 가지는지를 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

Retrovirus의 생산

본 실험에서 사용한 pTet2-EPO vector는 본 연구실에서 보유하고 있는 vector로서(Fig. 1), 이 vector의 원리는 다음과 같다. 먼저 reverse tetracycline-controlled transactivator (rtTA)가 발현되어 tetracycline 유도체인 doxycycline과 단위체를 형성하게 되고, 이 단위체가 tetO 서열이 포함되어 있는 tetracycline response element (TRE) 부위에 결합하여 hEPO 유전자의 발현을 유도하게 된다(Gossen 등, 1995). TRE 서열은 transactivator와의 결합친화성과 특이성이 강화된 TREtight 서열을 사용하였으며, 유도 조건에서의 hEPO 유전자의 발현을 극대화하기 위하여 WPRE 서열을 첨가하였다.

Virus의 생산은 본 연구실에서 구축한 방법을 이용하였다(Kim, 2002). 먼저 pTet2-EPO 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 hygromycin B (150 μ g/ml)가 첨가된 배양액에서 2주간 배양하여 GP2 293-Tet2-EPO 세포주를 구축하였다. 이 세포주에 vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G) 유전자를 가진 pVSV-G (Clontech, USA) plasmid를 일시적으로 transfection하여 48시간 후에 virus 배양액을 수확하였다. 생산된 virus는 NIH3T3 세포에 감염시켜서 감염가를 측정하였다.

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.

고농축 Virus의 생산과 닭의 배아의 Virus 감염

닭의 배아에 감염시키기 위한 virus는 GP2 293-Tet2-EPO 세포에 pVSV-G를 transfection하여 생산한 virus를 4°C, 50,000×g의 속도에서 90분간 fixed-angle rotor (Beckman 70Ti)를 이용한 초원심분리 방법으로 1,000배 이상 농축하여 준비하였다. 농축한 virus stock은 0.45 μ m pore-size의 cellulose acetate filter를 이용하여 여과한 후 -70°C에 보관하였다.

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 이용하기 위한 계란은 둔단부를 직경 3.4 cm로 절단하여 증류수로 수세한 후 건조시켜 두었다. 본 실험에 사용된 유정란은 하이브라운 산란계종으로, 60±3 g 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 미세주입하였다. Virus가 주입된 계란은 배양 전날 준비해 둔 가온한 수양성 난봉으로 대리난각 내부를 완전히 채운 후 vinyl wrap으로 밀봉하여 37.5°C의 온도와 상대 습도 60% 조건의 부화기에 입란하여 15분 주기로 90° 각도로 전란시키면서 3일간 일차배양하였다. 일차 배양한 계란은 종란의 무게보다 약 25 g 정도 더 무거운 계란의 둔단부를 4 cm 직경으로 절단하여 준비한 대리난각으로 다시 옮겨서 wrap으로 밀봉하여 37.5°C의 온도와 상대 습도 60% 조건의 부화기에 입란하여 30분 주기로 30° 각도로 전란시키면서 15일간 이차배양하였다. 발생 19일째 이후에는 37°C의 온도와 상대 습도 75% 조건의 발생기로 계란을 옮긴 후 전란하지 않는 상태에서 부화할 때까지 배양하였다. 배양하는 기간 동안 3일, 18일, 21일째에 계란의 발생 진행 여부와 부화율을 관찰하였다.

생산된 형질전환 닭의 분자생물학적 검증

부화한 개체의 형질전환 여부를 확인하기 위하여 Genomic DNA PCR과 ELISA 분석을 실시하였다. 먼저 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. hEPO에 해당하는 primer로 forward primer는 5'GCTGAACACTGC-AGCTTGAATGAG 3', reverse primer는 5'GGAAGAGT-TGCGGAAAGTGTGTCAG 3'로 340 bp의 단편으로 증폭되며, Hyg^R에 해당하는 primer로 forward primer는 5'GCT-CTCGATGAGCTGATGCTTTG 3', reverse primer는 5'TC-TGCTGCTCCATACAAGCCAAC 3'로 208 bp의 단편으로 증폭된다. 대조구인 닭의 GAPDH 유전자에 대한 forward



Fig. 1. Structure of pTet2-EPO retrovirus vector. LTR, long terminal repeat; Hyg^R, Hygromycin B resistant gene; TREtight, modified version of the tetracycline-response element (TRE); hEPO, human erythropoietin gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; PGK, human phosphoglycerate kinase promoter; rtTA2SM2, reverse tetracycline transactivator.

primer는 5'TAGTGGTGCAGACTGGGTAGAGCGAA 3'이며, reverse primer는 5'TCCTCTGGAGTGGCAAGAGGA-GAAAG 3'로 275 bp의 증폭 크기를 가진다. 각 병아리의 혈액으로부터 분리한 genomic DNA 0.1 µg은 10 pmol의 각 primer를 2X GoTag Green Master Mix (Promega, USA)와 혼합하여 최종적으로 20 µl의 PCR 반응액으로 준비하였다. PCR 반응은 초기 변성을 위하여 94°C에서 5분간 방치한 다음, 94°C에서 30초, 54°C에서 30초, 72°C에서 30초간 반응하는 cycle을 35회 반복 실시한 후 최종 신장을 위해 72°C에서 7분간 반응하였다.

ELISA 분석은 hEPO 유전자의 발현 유도를 위한 doxycycline 식이 전과 후 시기에 각각 실시하였다. 먼저 각 개체의 혈액을 채취하여 혈장을 분리한 후 Quantikine IVD Epo kit (R&D systems Cat. No. DEP00, USA)을 사용하여 ELISA를 실시하였다. 전이된 hEPO 유전자의 발현을 유도하기 위하여 tetracycline 유도체인 doxycycline을 사료 100 g당 50 mg의 농도로 첨가한 식이를 2주간 실시한 후 각 개체의 혈액을 채취하여 ELISA를 실시하였다. ELISA 과정은 다음과 같다. 먼저 standard와 각 sample을 microplate의 각 well에 200 µl씩 넣어서 실온에서 3시간 방치한 후 wash buffer로 4회 수세하였다. 각 well에 200 µl의 anti-hEPO-HRP conjugate를 더한 후 실온에서 1시간 방치한 후 wash buffer로 4회 수세하였으며, 200 µl의 tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution을 각 well에 더하여 빛을 차단시킨 상태로 실온에서 30분간 방치하였다. Stop solution을 더하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

형질전환 닭에서의 hEPO 유전자의 유도적 발현 분석

형질전환 닭에서 Tet system을 이용한 hEPO 유전자의 유도적 발현이 일어나는지를 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 생산된 형질전환 개체 중 무작위로 4마리를 선별하여 각 개체의 혈액을 채취하여 혈장을 분리한 후 ELISA를 실시하였다. 이는 대조군으로 유전자 발현 유도 전의 상태에서의 hEPO 발현량을 측정하기 위함이다. 전이된 hEPO 유전자의 발현을 유도하기 위하여 tetracycline 유도체인 doxycycline을 사료 100 g당 50 mg의 농도로 첨가한 식이를 2주간 실시한 후 다시 doxycycline이 첨가되지 않은 사료를 2주간 식이하였다. 1주 간격으로 각 개체의 혈액을 채취하여 혈장을 분리한 후 ELISA를 실시하였다.

재조합 hEPO의 생물학적 활성 측정

hEPO의 생물학적 활성도 측정은 EPO에 의해 증식이 유도되는 세포인 TF-1 세포(human erythroleukemia cell line)에 재조합 hEPO를 다양한 농도로 첨가하여 일정 시간 배양한 후, TF-1 세포의 증식 정도를 확인하는 방법으로 수행하였다(Kitamura 등, 1989).

먼저 형질전환 닭의 혈장을 5배 용량의 PBS와 혼합하여 준비한 후, 동량의 포화암모늄 용액과 혼합하여 1시간 동안 교반하였다. 이 반응액을 3,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 분리한 후 centricon (M.W. 10,000) (Millipore, USA)을 이용하여 농축하였으며, PBS를 첨가하여 수세함으로써 반복적으로 염을 제거하였다. 이 과정을 거치지 않은 혈장을 TF-1 세포에 적용할 경우, 세포가 모두 사멸하는 것으로 확인되었다. TF-1 세포는 10% FBS와 2 ng/ml

의 rhGM-CSF가 첨가된 RPMI-1640 배지에서 키운 후 2×10^5 /ml 세포를 96 well microplate에 50 µl씩 첨가하였다. Standard (5,000 IU/ml)와 ELISA 방법을 이용하여 정량한 sample을 동일한 농도(40 IU/ml)로 보정하여 2배씩 단계별로 희석한 후 각 well에 50 µl씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂에서 48시간 동안 반응시켰다. 세포의 증식 정도는 Cell Proliferation Kit I (Roche, Germany)으로 측정하였는데, 먼저 각 well에 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-dimethylthiazolium bromide (MTT) labeling reagent를 10 µl씩 첨가한 후 37°C, 5% CO₂에서 4시간 동안 반응시킨 다음 solubilization solution을 각 well에 100 µl씩 첨가하여 16시간 동안 방치하였다. 반응이 종결된 plate는 microplate reader로 595nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며 본 실험은 3회 반복 실시하였다.

형질전환 세포와 닭에서의 재조합 hEPO의 당 잔기 분석

본 실험의 목적은 hEPO 유전자가 전이된 CHO 세포와 CEF 세포, 그리고 hEPO 형질전환 닭의 혈장에서 발현된 재조합 hEPO 당단백질의 당 잔기 상이성을 분석하고자 하는 것이다. Tet2-hEPO virus를 CHO와 CEF 세포에 감염시킨 후 hygromycin B (150 µg/ml)이 첨가된 배양액으로 2주간 선별하여 CHO-Tet2-hEPO와 CEF-Tet2-hEPO 세포주를 구축하였다. 사용한 시료 중 세포배양액은 100mm dish 당 1×10^6 개로 세포를 준비하여 48시간 배양 후 수확하여 사용하였고, 혈장은 닭의 혈액을 채취 후 원심분리를 이용해 혈구를 제거한 후 순수 혈장만 이용하여 실험하였다. 먼저 CHO-hEPO와 CEF-hEPO, 그리고 형질전환 닭의 혈장에 함유된 hEPO의 농도를 EPO ELISA kit (R&D systems, USA)를 이용하여 확인하였다. 농도가 확인된 hEPO는 N-당화를 조사하기 위하여 N-결합 탄수화물을 선택적으로 분해하는 peptide N-glycosidase F (PNGase F)를 이용하여 N-당기를 제거하였고, O-당화를 조사하기 위하여 O-결합 탄수화물을 선택적으로 절단하는 O-glycosidase를 처리하였다. 그리고 O-말단 잔기에 결합하여 O-glycosidase의 반응을 저해하는 acetyl-neuraminic acid (sialic acid)를 제거하기 위하여 neuraminidase를 사용하여 좀 더 효율적으로 O-glycosidase가 반응하도록 하였다. 각각의 단백질은 정량을 통해 20 µg을 실험에 사용하였으며, 당 절제효소를 처리하기에 앞서 glycoprotein denaturing buffer를 이용하여 100°C에서 10분 끓여 각각의 당단백질을 denaturation 시켰다. Sample에 PNGase F를 1 µl 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 반응하였고, PNGase F와 O-glycosylase, Neuraminidase를 동시에 처리할 때는 각각의 당 절제효소를 1 µl씩 첨가해 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 당 절제효소에 의해 당기가 제거된 hEPO는 western blot을 이용하여 양상을 확인하였다.

결 과

형질전환 닭의 부화율 및 형질전환 여부 검정

농축한 virus를 미세주입하여 대리난각 방법으로 생산한 형질전환 닭은 PCR과 ELISA 분석을 이용하여 형질전환 여부를 확인하였다. Virus를 주입하지 않고 대리난각만 실시한 대조군에서는 90%의 부화율을 나타내었으며, virus를

Table 1. Hatchability and transgenic efficiency of virus injected eggs

Treatment	Number of eggs injected	Number of embryos 3 days post-injection (%)	Number of hatched chicks (%)	Number of chickens confirmed to be transgenic ^a
No injection	30	29 (96.7)	27 (90.0)	
Virus injection I	75	43 (57.3)	8 (10.7)	7
Virus injection II	250	129 (51.6)	20 (8.0)	9
Total	325	172 (52.9)	28 (8.6)	16

^a Chicks with detectable hEPO by PCR and ELISA were counted as transgenics.

주입한 실험군은 각각 10.7%와 8%의 부화율을 나타내었다 (Table 1). 이러한 현상은 virus의 미세주입 시 발생하는 물리적인 영향과 virus 자체에 의한 개체의 생리적인 부작용이 원인인 것으로 추정된다.

Virus를 주입한 실험군에서 8마리와 20마리가 각각 부화하였으며, 1개월 미만 시기에 원인 불명으로 폐사한 개체를 제외한 각각 7마리와 12마리를 대상으로 PCR과 ELISA 분석을 실시하였다. 그 결과, 1차 실험군에서는 7마리 모두 형질전환 개체로 확인되었으며, 2차 실험군에서는 12마리 중 11마리가 형질전환 개체인 것으로 확인되었다(Fig. 2; Table 1). 각 개체의 genomic DNA를 주형으로 하여 실시한 PCR에서는 hEPO 유전자뿐만 아니라 Hygromycin resistant 유전자의 존재 여부를 확인하였고, 대조군으로 닭의 GAPDH 유전자에 대한 PCR 반응도 동시에 실시하였다(Fig. 2). PCR에서 형질전환된 것으로 확인된 모든 개체는 hEPO 유전자의 발현을 유도한 조건에서 혈액 내 hEPO의 농도가 유도 전에 비해서 월등히 높아진 것을 ELISA 분석을 통해서 확인할 수 있었다(Fig. 3). 발현 유도 조건에서 가장 높은 발현을 보인 개체는 249번으로 약 1.5×10^5 mIU/ml의 농도를 나타내었다.

hEPO 유전자의 유도적 발현 분석

형질전환 닭에서 Tet system을 이용한 유전자의 유도적 발현이 가역적으로 일어나는지를 확인하기 위하여 Tet2-EPO 개체 중 무작위로 4마리를 선택하여 doxycycline의 공

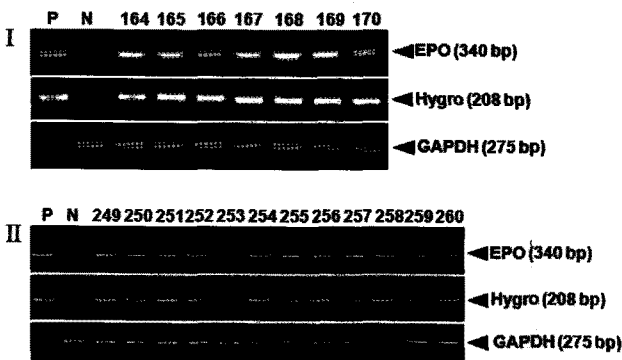


Fig. 2. Detection of the hEPO gene in the G₀ transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the 19 hatched chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTet2-EPO), and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken were used, respectively.

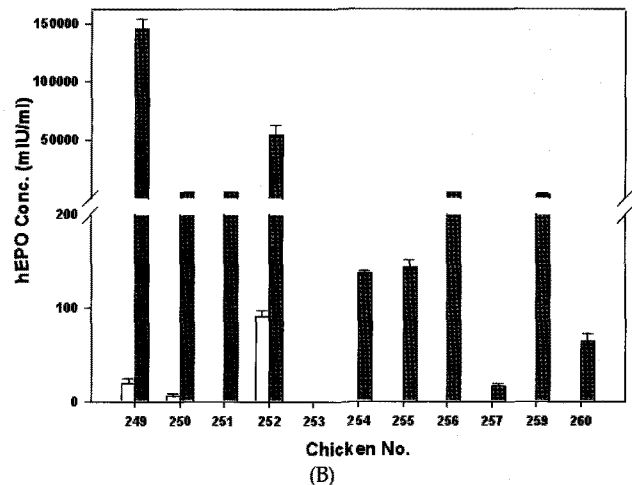
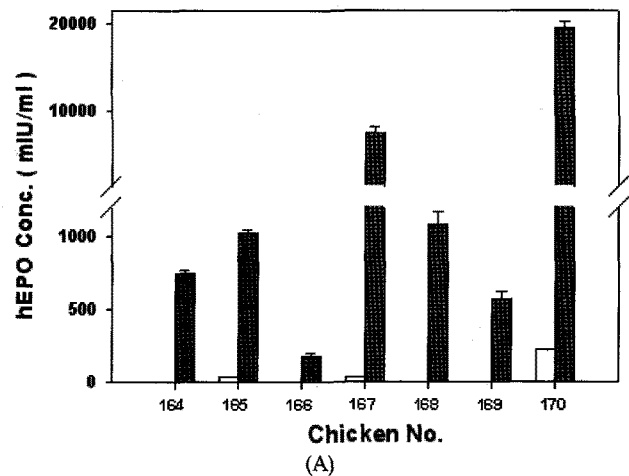


Fig. 3. ELISA analyses of the hEPO gene expression in G₀ transgenic chickens fed doxycycline. Open box indicates pre-doxycycline feeding; filled box indicates feeding with doxycycline for 2 weeks.

급 여부에 따른 hEPO의 발현 양상을 혈액 내의 hEPO 농도의 변화를 ELISA 방법으로 측정하였다. 실험 결과, doxycycline을 공급하는 2주간 혈액 내의 hEPO 농도는 전반적으로 증가하였으며, doxycycline을 식이에서 제거한 일주일 후 혈장의 hEPO 농도는 doxycycline을 식이로 공급하기 전의 혈장 내 농도와 거의 근접한 수치로 저하되었으며, 2주 후에는 hEPO의 농도는 식이 전 농도와 유사한

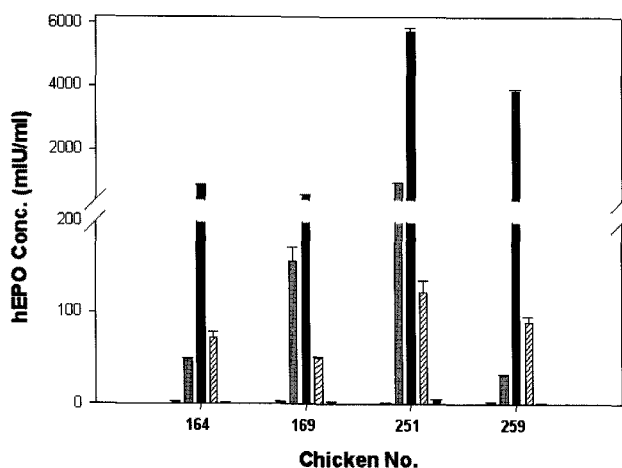


Fig. 4. Turn-on and turn-off of hEPO expression. The levels of hEPO secreted into the blood of 16~18 week-old chicken measured ELISA as described in the Materials and Methods. □, ▨, and ■ indicate hEPO concentration in serum of G α transgenic chicken fed with doxycycline for 0, 7 and 14 days respectively. ▨ and ▨ indicate hEPO concentration in serum of same chicken fed without doxycycline for 7 and 14 days, respectively.

수준으로 낮아졌다(Fig. 4). 따라서 본 연구에 적용된 유전자 전이 system인 Tet system은 유전자 발현 조절이 매우 신속하고 효율적으로 일어남을 확인할 수 있었으며, 이 system에 의해 생산된 형질전환 닭은 외래 단백질 발현에 의한 생리적인 부작용을 감소시킬 수 있을 것으로 생각된다.

재조합 hEPO의 생물학적 활성 측정

형질전환 닭에서 발현된 재조합 hEPO 단백질의 생물학적 활성은 TF-1 세포의 증식을 촉진하는 정도를 MTT kit을 사용하여 분석하는 방법으로 확인하였다. 그 결과, 닭의 혈

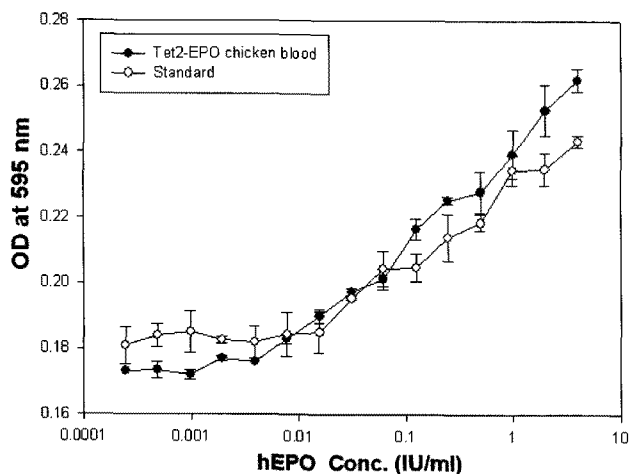


Fig. 5. Bioassay of recombinant hEPO produced from transgenic chicken or CHO cells by measuring. Various concentration of hEPOs were added to each well of TF-1 cells. After incubation for 2 days, proliferation of TF-1 cells was evaluated as described in Materials and Methods. The data were obtained from experiments performed in triplicate and are presented as the mean \pm SD.

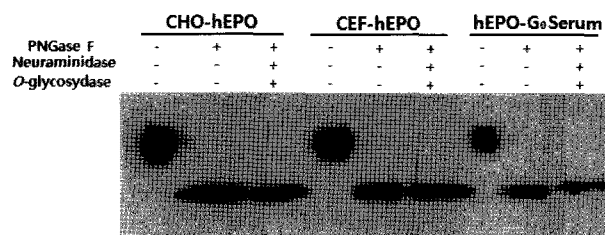


Fig. 6. Deglycosylation assays. The three recombinant hEPO molecules were N-deglycosylated with PNGase F(lanes 2, 5 and 8) or treated with a combination of Neuraminidase, O-glycosylase and PNGase F (lanes 3, 6 and 9). Lanes 1, 4, 7: fully glycosylated CHO-hEPO, CEF-hEPO and serum-hEPO respectively. Sample analyzed by Western blotting.

장에 포함된 재조합 hEPO는 대조구로 사용한 CHO 세포 유래의 hEPO에 비해 생물학적 활성이 높은 것으로 확인되었으며, 특히 0.1 IU/ml 이상의 농도에서는 더 높은 활성을 나타내었다(Fig. 5). 대조구로 사용한 hEPO 유전자가 전이되지 않은 정상 닭의 혈장에서는 ELISA 측정을 통한 hEPO의 농도나 생물학적 활성이 나타나지 않았다.

형질전환 세포와 닭에서의 재조합 hEPO의 당 잔기 분석

ELISA로 확인된 각각의 hEPO를 PNGase F를 이용하여 N-당기를 제거한 후 Western blot을 실시한 결과 CHO-hEPO, CEF-hEPO, 그리고 닭의 혈장 내의 hEPO들은 거의 유사한 크기를 나타내었다. 이러한 결과를 바탕으로 모든 실험군에서 N-당화가 유사한 양상으로 일어난 것으로 추정할 수 있다. 또한 PNGase F, Neuraminidase와 O-glycosylase를 처리한 실험에서도 유사한 크기의 hEPO 단편을 확인할 수 있었으며, 이는 세 종류의 hEPO에 결합된 O-말단 잔기가 거의 동일한 수준으로 포함하고 있음을 의미한다(Fig. 6).

고 찰

생체반응기로서의 형질전환 닭을 개발하는 데 있어서 가장 큰 문제점은 낮은 외래 유전자의 전이율과 전이된 유전자의 지속적인 발현에 의한 개체의 생리적인 부작용을 유발하는 것이다. 이러한 문제점을 해결하기 위한 방안으로 첫째, 고감염성의 retrovirus를 1,000배 이상 농축하여 계란의 배반엽층에 주입함으로써 이미 60,000여 개 이상으로 분열한 배아세포에 대한 virus의 상대적인 입자 수를 증가시키고자 하였으며, 둘째, 외래 유전자의 발현을 인위적으로 조절할 수 있는 Tet system (Gossen과 Bujard, 1992)을 도입하여 형질전환 개체의 생리적인 부작용을 해결하고자 하였다. 고감염성의 virus는 초원심분리 방법을 이용한 농축 과정에서 감염성의 손상이 최소화되어야 한다. 이에 본 연구에서는 VSV-G를 피막 단백질로 가지는 MoMLV의 pseudotyped retrovirus vector system (Burns 등, 1993)을 사용하였다. 이 system은 고농도 농축 후에도 virus의 감염성이 저하되지 않는 것으로 보고되어 있다(Burns 등, 1993). 본 연구에 도입된 Tet system은 현재까지 알려진 외래 유전자의 조절 system 중 가장 널리 이용되고 있는 것으로, 미량

의 tetracycline 계열의 물질로 개체 내에서의 외래 유전자의 발현을 효율적으로 turn-on 또는 turn-off할 수 있다 (Gossen 등, 1995). 본 연구에서 사용한 Tet system은 기존의 tet system이 두 개의 vector를 이용한 것과는 달리 하나의 vector 내에 reverse transactivator인 $rtTA2^M2$ 와 tetracycline response element (TRE) 서열이 동시에 존재하는 one vector system으로서 유전자 전이에 있어서 기술적으로 용이하다(Koo 등, 2006). 또한, 유도체가 존재할 경우에만 외래 유전자의 발현이 유도되는 Tet On system이어서 유도체가 없는 조건에서 발현되는 off system에 비해 발현 유도체의 존재에 따른 개체의 생리적인 부작용을 최소화하는 데 더 적합한 형태이다(Urlinger 등, 2000). 이 외에도 발현 유도 조건에서 외래 유전자의 발현을 극대화시키기 위하여 retrovirus vector에 WPRE (Zufferey 등, 1999) 서열을 도입하였다. 이 WPRE 서열은 선행된 연구에서 이미 단백질 발현의 촉진에 큰 영향을 나타내는 것으로 보고되어 있으며, 형질전환 닭의 생산 연구에도 많이 사용되었다(Koo 등, 2006; Kwon 등, 2008; Penno 등, 2009).

본 연구에서 사용한 형질전환 가금의 생산 방법은 virus vector system을 이용한 배반엽 세포로의 유전자 전이법 (Harvey 등, 2002; McGrew 등, 2004; Kamihira 등, 2005; Koo 등, 2006; Kwon 등, 2008)이라고 할 수 있다. 형질전환 가금의 생산 방법에는 이 외에도 virus에 감염시킨 primordial germ cell (PGC)을 배아에 주입하여 형질전환 닭을 생산하는 방법(Park 등, 2003; van de Lavoie 등, 2006; Motono 등, 2010)과 ES 세포에 DNA를 transfection하는 방법(Zhu 등, 2005) 등이 있다. 이상의 여러 방법 중 virus를 배반엽 세포에 감염시키는 방법은 기술적으로 용이하고 다음 세대로의 유전자 전이의 효율성이 높은 장점을 가지고 있다(Kwon 등, 2004).

생산된 형질전환 닭의 혈장에서의 hEPO 농도는 개체에 따라서 매우 다양하게 나타났다. 이는 각 개체에 전이된 외래 유전자의 copy 수가 다르며 genome 상의 삽입된 부위에 따른 발현 정도의 차이에 기인하는 것으로 추정된다. 가장 높은 농도를 나타낸 개체는 249번 개체로 150 IU/ml의 값을 나타내었는데(Fig. 3), 이 값은 2008년 Kodama 등에 의해서 보고된 hEPO 형질전환 닭의 경우와 유사한 수치이다. 반면에 0.1 IU/ml 이하의 매우 낮은 농도를 나타내는 개체도 있었다. 이러한 현상은 배반엽세포에 virus를 감염시키는 과정에서 60,000여 개의 세포 전부에 대하여 외래 유전자를 전이시키는 것이 사실상 불가능하기 때문에 생산된 개체들이 대부분 mosaic으로서 개체별 변이가 다양하게 나타날 수밖에 없다. 유전자의 발현 유도가 가역적으로 일어나는가를 확인하기 위한 실험에서는 개체 내에서의 hEPO의 생산이 단시간 내에 가역적으로 조절됨을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이러한 결과는 외래 유전자의 발현에 따른 개체의 생리적인 부작용을 최소화할 수 있음을 의미하는 것이다. 본 연구에서 발현시킨 hEPO의 생물학적 활성은 대조구로 사용한 CHO 세포에서 생산하여 상업적으로 판매되는 hEPO에 비해 높게 나타났으며(Fig. 5), 이는 Kodama 등(2008)이 보고한 형질전환 닭에서 발현시킨 hEPO의 생물학적 활성 측정에 관한 연구 결과와 거의 동일한 결과이다. 또한, 당 잔기 분석 결과에서도 닭의 혈장 내로 분비된 hEPO와 각 세포에서 발현된 재조합 hEPO가 유사한 잔기를 가지고 있음을 확인되었는데(Fig. 6), 이러한 결과로 미루어 볼 때 형질전환 닭에서 생산된 hEPO의 반감기나

생물학적 활성이 양호한 것으로 추정된다.

이상의 hEPO 유전자의 발현이 유도적으로 조절되는 형질전환 닭의 생산에 관한 여러 연구 결과는 차후 형질전환 가금을 비롯한 여러 동물의 생산에 있어서 보다 더 효율적인 외래 유전자의 전이 system을 제공하고, 생리활성물질의 대량 생산을 위한 경제적인 생체반응기로서의 형질전환 닭의 생산 효율의 증대에 이바지할 수 있을 것이다.

인용문헌

1. Aguirre A, Castro-Palomino N, de la Fuente J, Castro FO (1998): Expression of human erythropoietin transgenes and of the endogenous wap gene in the mammary gland of transgenic rabbits during gestation and lactation. *Transgenic Res* 7:311-317.
2. 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.
3. Dyck MK, Lacroix D, Pothier F, Sirard MA (2003): Making recombinant proteins in animals-different systems, different applications. *Trends Biotechnol* 21:394-399.
4. Elliott S, Egrie J, Browne J, Lorenzini T, Busse L, Rogers N, Ponting I (2004): Control of rHuEPO biological activity: the role of carbohydrate. *Exp Hematol* 32:1146-1155.
5. 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.
6. 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.
7. Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Müller G, Hillen W, Bujard H (1995): Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268:1766-1769.
8. 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.
9. Ivarie R (2003): Avian transgenesis: progress towards the promise. *Trends Biotechnol* 21:14-19.
10. Jelkmann W (2004): Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med* 43:649-659.
11. 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 retroviral vector. *J*

- Virol 79:10864-10874.
12. Kim T (2002): Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs. In: Pinkert CA (ed) *Transgenic Animal Technology*, 2nd edn. Academic Press, San Diego, pp 173-193.
 13. Kitamura T, Tnaga T, Terasawa T, Chiba S, Kuwaki T, Miyagawa K, Piao Y-F, Miyazono K, Urabe A, Takaru F (1989): Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3 or erythropoietin. *J Cell Physiol* 140:323-334.
 14. 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.
 15. 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.
 16. Kwon MS, Koo BC, Choi BR, Kim JH, Park YY, Lee YM, Suh HS, Park YS, Lee HT, Kim JH, Roh JY, Kim NH, Kim T (2008): Generation of transgenic chickens that produce bioactive human granulocyte-colony stimulating factor. *Mol Reprod Dev* 75:1120-1126.
 17. 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.
 18. Lillico SG, McGrew MJ, Sherman A, Sang HM (2005): Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs. *Drug Discov Today* 10:191-196.
 19. McGrew MJ, Sherman A, Ellard FM, Lillico SG, Gilhooley HJ, Kingsman AJ, Mitrophanous KA, Sang H (2004): Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep* 5:728-733.
 20. Motono M, Yamada Y, Hattori Y, Nakagawa R, Nishijima K-i, Iijima S (2010): Production of transgenic chickens from purified primordial germ cells infected with a lentiviral vector. *J Biosci Bioeng* 109: 315-321.
 21. Park JK, Lee YK, Lee P, Chung HJ, Kim S, Lee HG, Seo MK, Han JH, Park CG, Kim HT, Kim YK, Min KS, Kim JH, Lee HT, Chang WK (2006): Recombinant human erythropoietin produced in milk of transgenic pigs. *J Biotechnol* 122:362-371.
 22. 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.
 23. Penno CA, Kawabe Y, Ito A, Kamihira M (2010): Production of recombinant human erythropoietin/FC fusion protein by genetically manipulated chickens. *Transgenic Res* 19:187-195.
 24. 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.
 25. 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.
 26. Rapp JC, Harvey AJ, Speksnijder GL, Hu W, Ivarie R (2003): Biologically active human interferon α -2b produced in the egg white of transgenic hens. *Transgenic Res* 12:569-575.
 27. Rush RS, Derby PL, Smith DM, Merry C, Rogers G, Rohde MF, Katta V (1995): Microheterogeneity of erythropoietin carbohydrate structure. *Anal Chem* 67: 1442-1452.
 28. Urlinger S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H, Hillen W (2000): Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: Novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7963-7968.
 29. 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.
 30. Whitelaw CB (2004): Transgenic livestock made easy. *Trends Biotechnol* 22:157-159.
 31. Zhu L, van de Lavoie MC, Albanese J, Beenhouwer DO, Cardarelli PM, Cuisson 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, Wong S, Zhou W, Etches RJ (2005): Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. *Nat Biotechnol* 23:1159-1169.
 32. 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: 2010. 9. 8 / 채택일자: 2010. 9. 14)