

# 녹색형광단백질 유도 발현으로 형질전환 복제개 생산

**생**명공학기술의 발달로 여러 종류의 포유 동물에서 체외성숙, 체외수정 및 핵이식 기법 등 성공한 사례가 보고되고 있으나 아직까지 개의 경우는 제한된 연구팀만이 복제에 성공했다. 필자의 연구팀에서는 2005년 복제 개 스누피(Snuppy)를 성공적으로 생산했고, 현재까지 개과 동물의 체세포 복제 생산에 관한 기술개발을 통해 개복제의 효율성을 높여왔다. 이러한 기술력을 바탕으로 필자의 연구팀은 형질전환복제개 생산 기술의 확립을 통한 질환모델개 생산 기반을 마련하고자 연구를 진행해 왔다.

#### 유전자조작기법으로 원하는 질환모델동물 생산

연구자들은 오래전부터 인간의 질병을 연구하기 위해 여러 동물 모델을 만들어 사용해왔다. 과거에는 돌연변이나 우연에 의지해 왔지만, 현재에는 유전자조작기법을 적용해 우리가 원하는 질환모델동물을 생산하기 위한 연구가 진행되고 있다. 형질전환 동물생산을 위한 외래 유전자도입 방법으로 고든 등이 제시한 전핵 내 미세주입법이 많이 사용되고 있는데, 이 방법은 외래유전자를 수정란의 전핵에 직접 주입하는 방법으로 마우스와 같은 소동물에서 많이 이용되고 있다. 하지만 사람과 그 크기가 유사한 대동물에서는 극히 낮은 생산효율(소 0.5%, 돼지 1.5%, 양 2.5%)을 보이며 대부분의 경우 모자익시증이 나타나는 단점이 있다.

이를 극복하기 위해 외래유전자가 도입된 형질전환 체세포를 이용한 체세포동물 복제 기술이 대안으로 제시되고 있다. 필자의 연구팀에서는 이미 빨강형광단백질(RFP)을 발현하는 비글인 루피(Ruppy) 6두 생산을 보고한 바가 있다. 루피의 경우에는 외래유전자인 빨강형광단백질이 배아 상태부터 지속적으로 발현이 되는 벡터 시스템이 도입된 형질전환

체세포를 이용하여 만들어졌다. 그러나 이러한 벡터 시스템의 경우 외래 유전자 대신 질병 유전자가 벡터에 도입되었을 때 배아 발달이 정상적으로 이루어지지 않아서 산자까지 생산이 안 될 수도 있다. 따라서 벡터에 도입한 외래유전자를 원하는 시기에 발현할 수 있는 시스템이 실제 질병모델 동물 생산에 있어서 중요하다. 이러한 기술이 개발된다면 복제개 생산 및 비 설치류 개과동물의 질환모델동물 복제에 있어서 우리나라가 세계적으로 기술 우위를 점할 수 있으며, 이전 연구를 토대로 외래유전자의 발현이 조절가능한 형질전환 복제개 생산은 충분히 성공할 수 있다.

#### 테트라사이클린·유도체로 유전자 발현 조절

이에 연구팀은 유도 전이유전자의 도입을 위한 벡터를 제작하기 위해 거대세포바이러스 프로모터(CMV)에 의해 조절되는 트랜스사이클린 제어 트랜스액티베이터(tTA)나 리버스 트랜스사이클린 제어 트랜스액티베이터(rtTA)를 발현하는 전사요소 융합 유전자, 그리고 pCMV와 텔 오퍼레이터 DNA 서열(tetO)과 결합한 정보제공 유전자의 두 개로 이루어진 테트라사이클린 및 그 유도체에 의해 유전자 발현이 조절되는 체계를 작성하였다. 연구에서 사용된 텔-온 체계에서는 테트라사이클린 및 그 유도체가 있으면 tTA는 tetO에 결합하여 전사를 활성화시키지만 테트라사이클린 및 그 유도체가 없으면 tTA가 tetO에 결합할 수 없기 때문에 전사가 중단되도록 작성하였다.

또한 유전자의 체세포 내 도입 및 도입된 체세포의 선별, 계대 배양 및 동결보존을 위해 감염 및 트랜스펙션된 세포로부터 수거한 바이러스-함유 배지는 여과 후, 개의 섬유아세포들을 감염시키는데 사용하였다. 바이러스 벡터의 감염을 통하여 외부 유전자가 도입된



글 **이병현** 서울대학교 수의과대학 교수  
bclee@snu.ac.kr  
글쓴이는 서울대학교 수의학과 졸업 후 동대학원에서 석사·박사학위를 받았다. 미국 뉴올리언스 대학 방문교수, 시카고 메디컬 스쿨 방문교수 등을 지냈으며, 현재 RNL 바이오스타 이사, 서울대학교 동물병원 원장 등을 겸임하고 있다.

세포는 하이그로마이신(150 $\mu$ g/ml)이 함유된 배지에 6일간 배양하여 외부 유전자가 발현하는 세포만을 선발 및 증식시킨 후, 트립신 효소처리에 의해 단세포로 만들었다. 항생제를 통한 선별 과정이 이루어진 후 정상 배양액으로 전환하고, 증식 배양한 세포의 효율적 보존을 위해 최적 조건을 확립하여 각 단계마다 동결을 실시하였다.

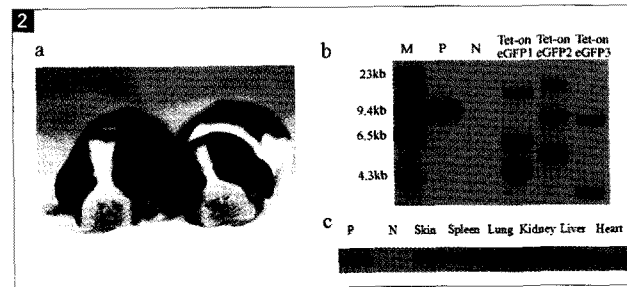
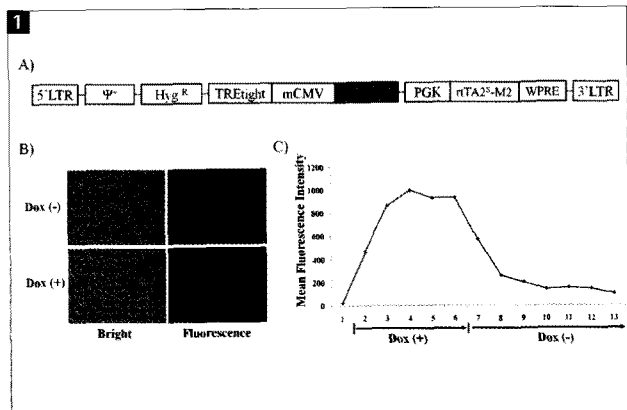
확립된 형질전환 체세포주에서 외부 도입 유전자의 발현 조절 여부 검증을 위해 형질전환 세포는 10% FBS가 포함된 DMEM 배지로 배양하였다. TRE 부위가 테트라사이클린 및 그 유도체에 제대로 반응하는지 살펴보기 위해서 1 $\mu$ g/ml의 독시사이클린을 가감하여 eGFP의 발현을 관찰하였고, FACS 분석을 실시하였다.

형질전환 복제란에서의 외래 유전자 발현 조절 연구를 위해 개의 형질전환 세포주와 소 난자를 사용하여 이용한 이종 간 체세포 핵이식 후 발달률을 관찰하여 형질전환 개 생산의 가능성을 타진하고, 생산한 이종 간 형질전환 체세포 핵이식란에서 도입된 외래 유전자의 유도에 의한 조절 여부 검증하였다.

최종적으로 형질전환 복제개의 생산은 체내 성숙 난자를 회수하여 핵을 제거한 뒤, 체세포 핵이식 과정을 통하여 복제 배아를 생산하여 대리모에 이식하였다. 이식 후 최소 26일 이후에 초음파를 사용하여 임신진단을 실시하였고, 이식 후 60일 쯤에 제왕절개를 통해 복제개를 생산하였다. 형질전환 복제개의 2세 생산은 형질전환 복제개가 성 성숙에 도달하여 발정이 왔을 때 혈청 프로게스테론 농도를 검사하여 배란일을 예측하고, 배란 이틀 뒤에 야생형의 비글과 인공수정을 실시하였다.

### 형질전환 복제개에서 외래 유전자 발현 유도

연구성과로는 첫째, 확립된 형질전환 체세포주에서 외부 도입 유전자의 발현 조절 여부를 검증했다. 1 $\mu$ g/ml의 독시사이클린을 배지에 첨가하여 형질전환 체세포를 배양하였을 때, 24시간 후에 eGFP 유전자가 발현하는 것을 관찰하였다. 이 형질전환 체세포주에 일주일 동안 eGFP 유전자를 발현시킨 뒤 배지에서 독시사이클린을 제거하여 eGFP 유전자의 발현 감소 여부를 FACS로 분석하였더니 제거 후 약 일주일 뒤에 발현이 기저단계로



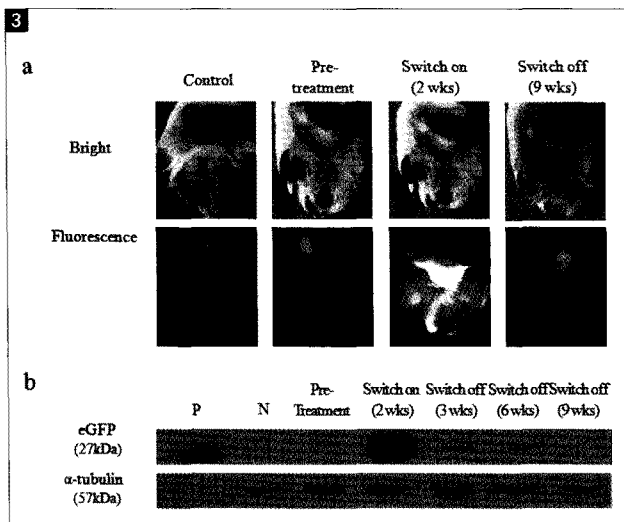
▶▶ 1 (a)형질전환 세포주에서 독시사이클린 처리에 따라 조절되는 eGFP 발현. (b)독시사이클린을 24시간 동안 처리하기 전, 후의 사진. (c)독시사이클린을 5일 동안 처리하는 동안 eGFP 발현 양상의 변화를 FACS로 분석. 2 뱃-온 eGFP 개(a)와 세 마리의 형질전환 복제개에서의 외래유전자 검출(b) 및 첫째(뱃-온 eGFP 1)의 각 장기에서 외래유전자의 검출(c)

감소하였다(그림 1 참조).

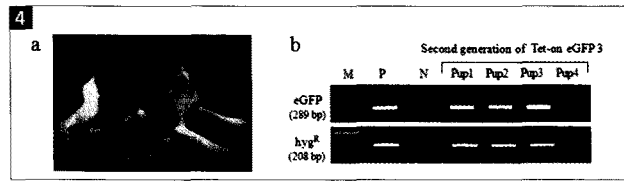
둘째, 형질전환 복제개 생산이다. 총 203개의 체내 성숙 난자를 회수하였고, 182개의 난자에서 핵을 제거한 뒤,

### 뱃-온 eGFP 개의 생산

대리모	회수된 체내성숙 난자 수	탈핵 난자 수	융합된 배아수 (%)	대리모에 이식된 배아수	임신 진단 태아수
1	15	15	100	15	0
2	33	33	48.5	16	0
3	14	14	64.3	9	0
4	19	19	68.4	12	0
5	17	11	90.9	10	0
6	16	16	87.5	14	0
7	45	33	75.8	22	1
8	18	18	88.9	16	1
9	26	23	91.3	21	1
합계	203	182	76.4	135	3



▶▶ 3 독시사이클린 투여 후 태근 발에서 녹색형광유전자의 발현 관찰(a)과 피부조직에서 녹색형광단백질의 생산 관찰(b)  
4 2세들을 분만한 뱃-온 eGFP3(a)과 2세들에서 외래유전자의 검출(b)



135개의 복제 배아를 생산하여 9마리의 대리모에 이식하였다. 이식 후 최소 26일 이후에 초음파를 사용하여 임신 진단을 실시하였고, 3마리가 임신이 된 것을 확인하였다. 임신된 3마리의 대리모는 각각 형질전환 복제개(뱃-온 eGFP개)를 1마리씩 생산하여 대리모 대비 임신율은 33%를 기록하였다. 또한, 세 마리의 뱃-온 eGFP개의 계놈에 모두 eGFP 유전자가 삽입되어 있음을 서던 블롯을 통하여 검증하였다(그림 2 참조).

셋째, 형질전환 복제개에서 외래 유전자의 발현 유도를 검증했다. 형질전환 복제개에게 100mg/kg의 독시사이클린을 격일로 2주간 급여하였다. 그 결과, 피부에서 녹색형광유전자가 발현되는 것을 관찰하였고, 급여를 중단한 지 9주 만에 피부에서의 발현이 사라지는 것을 확인하였다. 투여 2주 후와 투여 중단 후 3주, 6주, 9주째에 피부조직을 채취하여 녹색형광유전자 단백질이 소실되는 것을 웨스턴 블롯을 통하여 검증하였다(그림 3 참조).

넷째, 형질전환 복제개의 2세 생산이다. 성 성숙에 다다른 뱃-온 eGFP3과 야생형 비글 사이에서 인공수정을 실시하였고, 60일 후에 4마리의 산자가 생산되었다. 수컷 한 마리와 암컷 세 마리였고, 몸무게는 각각 140g, 180g, 180g, 230g 이었다. 이 중 세 마리의 계놈에서 eGFP 외래유전자가 삽입되어 있음이 PCR로 검증되었다(그림 4 참조).

### 특정 질환 원인 규명·치료 가능해질 것

이번 연구를 통하여 외래유전자의 발현이 조절 가능한 형질전환복제개 생산 기술을 확립하였다. 이러한 기술력을 바탕으로 유용유전자 도입 형질전환 복제개의 생산을 통해 인간 질환 발생 기전에 관한 연구와 유전자 발현 양상 등에 관한 연구 수행이 필요하다. 현재까지 인간 질환 발생 및 치료 관련 연구를 위한 동물 모델에서 주로 사용되는 설치류는 인류의 의약품 개발 및 치료기술 개발에 큰 역할을 해 왔다. 그러나 계통발생학적으로 사람과는 거리가 멀기 때문에 형질전환 설치류 모델의 병리 병변 및 증상이 사람에서 관찰되는 것과 큰 차이를 보이는 경우가 있는 것이 사실이다. 그렇기 때문에 설치류 모델에서 나온 결과를 토대로 임상 시험을 진행하기에는 많은 한계가 있었다. 개는 설치류에 비해 사람과 계통발생학적인 거리가 가깝고 오랜 세월을 함께 생활해 왔기 때문에 설치류에 비해 동물모델로서 보다 적합하다.

따라서 체세포 핵이식 기법을 통해 질환관련 유전자가 도입 혹은 제거된 형질전환 복제개를 생산하여 특정 질환에 대한 원인 규명과 질환의 치료에 대한 대안을 제시할 수 있다. 이를 바탕으로 질환 진단 시 현재보다 더 적합한 진단 시스템을 확립하는데 응용될 수 있고, 동시에 원인에 따라 보다 정밀한 치료법의 개발이 이루어 질 수 있다. 또한, 신약개발 분야에 있어 원인을 제거하거나 억제할 수 있는 새로운 치료 약물의 개발에 매우 유용하게 응용될 수 있다. 뿐만 아니라 유전자 적중기술을 통해 아직까지 그 기능이 규명되지 않은 유전자의 기능을 밝히는데 응용될 수 있다. 이렇듯 유용유전자가 도입된 형질전환 복제개의 생산은 의학, 수의학, 약학, 유전학 등의 분야에서 응용될 뿐 아니라 다양한 포유동물의 생명현상에 관한 연구가 가능하게 되어 과학계의 발전에 일조할 것으로 기대된다. **ST**