

대리모의 준비 조건 변화를 통한 복제미니돼지의 생산

허창기¹, 양혜영¹, 이은경¹, 한주희^{1,2}, 박천규^{1,2}, 신태순², 이홍구², 강한석², 안중덕^{1,*}, 조성근^{2,*}
¹조아제약(주) 조아생명공학연구소, ²부산대학교 동물생명자원학과

Production of Cloned Miniature Pig by Surrogate Mother Conditions

Chang-Gi Hur¹, Hae-Young Yang¹, Eun-Kyeong Lee¹, Joo-Hee Han^{1,2}, Chun-Gyu Park^{1,2}, Teak-Soon Shin²,
Hong-Gu Lee², Han-Seok Kang², Jong-Deok Ahn^{1,*} and Seong-Keun Cho^{2,*}

¹CHO-A Biotechnology Research Institute, CHO-A Pharmaceutical Co. Ltd., Yeo-Ju 469-841, Korea
²Department of Animal Science, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

ABSTRACT

Somatic cell nuclear transfer (SCNT) for miniature pig has been developed for xenotransplantation and many other biomedical experiments. However, the efficiency of SCNT is still very low due to many factors. To optimize the surrogate mother condition for improvement of cloned miniature pigs efficiency, we investigated the effect of the status of surrogate mother on pregnancy, farrowed rate in SCNT pigs. After SCNT with mesenchymal stem cells as donor cells, the SCNT embryos were surgically transferred into the oviduct of surrogated pigs. To compare the effects of status of surrogate pigs on pregnancy, surrogate pigs were prepared by artificial abortion at day 20~29 (Group 1), 30~39 (Group 2), and 40~45 (Group 3) of gestation. After SCNT embryos transfer in three different status of surrogate pigs, Group 2 (56.3%) and 3 (55.6%) had significantly ($p<0.05$) higher the pregnancy rate than group 1 (0%) at day 30 of gestation. The status of ovulation in surrogate pig also was investigated. Post-ovulation status (54.8%) had higher proportion than pre-ovulation status (38.7%) and ovulation status (6.5%). We obtained 19 cloned miniature piglets from seven surrogate gilts and five piglets are living healthy but fourteen piglets died soon after birth or stillbirth. The weights of piglets greatly differ from 254 to 1,296 g. Microsatellite analysis showed that cloned piglets were genetically different from the surrogate mother and cloned piglets were genetically equal to the donor cell. In conclusion, the present result indicates that artificially abortion method can improve the efficiency of pregnancy after SCNT in pigs. This study will provide available method for the further study and application in the field of xenotransplantation.

(Key words : nuclear transfer, surrogate mother, miniature pig, mesenchymal stem cells, porcine embryo)

서 론

미니돼지는 해부/생리학적으로 인간과 유사해 이종간 장기 이식이나 수술 및 질병 연구를 위한 모델 동물로써 사용되어져 왔다(Prather 등, 2003; Zhao 등, 2009). 최초의 체세포 복제 돼지는 Onishi 등(2000)과 Polejaeva 등(2000)에 의해 최초로 생산되어진 이후 많은 연구자들에 의해 연구되어지고 있으며, Lai 등(2002)에 의해 초급성 면역거부반응 관련 유전자인 α -1,3 Galactosyltransferase(GalT)가 제거된(knock-out)된 형질전환 복제 돼지가 생산되면서 미니돼지를 이용한 질환 모델 및 장기이식용 형질전환 동물의 생산에 대한 연구가 활발하게 진행되어졌다(Phelps 등, 2003; Kolber-Simonds 등,

2004; Loveland 등, 2004; Nottle 등, 2007). 이러한 많은 연구에도 불구하고 형질전환 복제동물의 생산 효율은 여러 가지 문제점들로 인하여 극히 낮은 실정이다. 이러한 효율을 향상하기 위해서 기본적으로 체외 배양 시스템의 개선 및 복제란의 생산율을 증진시키기 위한 연구들이 수행되어졌으며(Kobayashi 등, 2007; Hwang 등, 2008), 복제란에서의 유전자 발현에 대한 연구(Park 등, 2010; Park 등, 2011)를 통한 생산 효율의 개선 또한 시도되어졌다. 복제 돼지 생산을 위한 대리모의 선발 방법은 돈군에서 자연 발정 돼지를 선발해서 사용하는 방법(Takahagi 등, 2005; Kurome 등, 2006), 발정 유도 호르몬의 일정기간 구강 투여하여 비임신돈을 발정동기화 하여 사용하는 방법과 임신돈의 강제 유산을 통한 발정동기화 방법

* 이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

* Correspondence : E-mail : siiljung@hanmail.net(안중덕), skcho@pusan.ac.kr(조성근)

(Guthrie와 Polge, 1978) 등이 시도되었다. 자연 발정 돼지 선발 방법은 간단하고 손쉬운 방법이지만, 많은 개체수를 확보하고 있어야 한다는 단점이 있으며, 대규모 돈군을 확보하지 못하고 연구를 수행하는 연구 그룹에 있어서는 비용과 시간 소모가 많으나, 복제란 생산 시기와 대리모 조건을 조절 가능한 임신돈의 강제 유산을 통한 발정동기화 방법이 가장 효율적이라 사료되었다. 따라서 본 연구에서는 강제 유산을 통한 대리모의 선발 방법에 따라 임신율과 분만을 및 그에 따른 생산 효율과 복제 산자의 검증에 대하여 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시약

본 연구에 사용된 시약은 Sigma-Aldrich Chemical(St, Louis, Mo, USA)사 제품을 사용하였으며, 그 외의 제품은 별도 표기하였다.

2. 난자의 채란과 체외성숙 및 체외배양

연구에 사용된 난소는 도축장에서 채집하여 28~32°C 로 유지된 생리식염수가 든 보온병에 담아 운반하였으며, 난포란을 채란하기 전 난소 주위의 지방과 결합 조직을 제거하고, 생리식염수로 3~4회 세척하였다. 그리고 18-G 주사바늘이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 3~6 mm의 가시난포를 흡입하였다. 난포란의 채란은 0.1 mg/ml PVA가 첨가된 TALP-HEPES(Prather 등, 1995) 배양액에서 수행하였으며, 회수된 난포액은 10 분간 항온 수조에 정치시킨 뒤 스포이드로 상층액을 제거하고 0.1 mg/ml PVA가 첨가된 신선한 TALP-HEPES 배양액을 채워 넣는 세척 과정을 2~3회 실시하였다. 세척과정 후 침전된 하부액만을 10 ml의 피펫으로 흡입하여 TALP-HEPES 배양액이 담긴 직경 100 mm 배양 접시에 옮겨 실체현미경(Olympus Co., Japan)을 이용하여 난구 세포가 풍부한 난포란을 수집하였고, 수집된 난포란은 체외성숙용 기본배양액 NCSU-23(Petters와 Wells, 1993)으로 4~5회 세척하면서 선발하였다. 난포란은 난구세포의 부착 정도와 세포질의 충실도에 따라 선발하였으며, 최소한 2층 이상의 난구세포층으로 되어 있고, 세포질이 균일하고 충실한 것을 최종적으로 선발하여 체외성숙용 배양액이 500 μ l씩 들어 있는 4-well dish(Nunc, Denmark)에 150~200 개의 난포란을 넣어 5% CO₂, 99% 습도, 39°C CO₂ 배양기에서 22시간 동안 호르몬이 첨가된 체외성숙용 배양액에서 배양하고, 다음 22시간은 호르몬이 첨가되지 않은 배양액에서 배양하여 총 44시간 동안 체외성숙을 유도하였다.

체외성숙을 위해 사용한 배양액은 NCSU-23을 기본 배양액으로 하여, 10% 돼지 난포액, 0.57 mM cysteine, 10 ng/ml epidermal growth factor, 10 IU/ml eCG와 10 IU/ml hCG를 첨가

하여 제조하여 사용하였다. 체외 발달 배양액은 Porcine Zygote Medium(PZM)-5(Yoshioka 등, 2002) 배양액을 기본으로 하여 0.4% BSA를 첨가하여 사용하였다.

3. 공여세포의 준비

복제 돼지 생산에 사용된 공여세포는 미니돼지의 대퇴골골수 유래 중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cell)를 사용하였으며, Mesenchymal stem cell의 분리는 Ringe 등(2002)의 방법에 준하여 분리하였다. 공여세포는 세포가 배양접시에 80% 이상 자랐을 때, 0.05% trypsin과 EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 1/3~1/4씩 나누어 계대하며, 핵이식에 사용될 공여 세포는 계대배양 후 세포가 배양접시에 monolayer를 충분히 형성하여 confluency 상태로 2~3일 정도 배양함으로써 G₀나 G₁ 단계로 유도한 다음 공여세포로 사용하였다.

4. 핵이식

체의 성숙된 MII 기의 수핵 난자를 0.1% hyaluronidase가 첨가된 D-PBS에 넣어 난구세포를 제거하고, TALP-HEPES로 세척한 다음, 50 mM sucrose와 0.4% BSA가 첨가된 NCSU-23 배양액에서 세포질이 양호하고 균질한 난자만을 선발하였다. 핵이식은 NCSU-23에 0.4% BSA가 첨가된 배양액 소적에 7.5 μ g/ml의 cytochalasin B와 50 mM sucrose를 첨가하여 사용하였으며, enucleation pipette을 이용하여 수핵난자의 제1극체와 주변 세포질을 흡입하여 핵을 적출하였다. 이후 G₀나 G₁으로 유도한 공여세포를 injection pipette에 loading한 후 탈핵된 난자의 세포질이 제거된 공간에 세포질과 부착되게 주입하였다. 핵이식이 완료된 난자의 융합은 전기세포 융합장치(BTX, USA)로 실시하였다. 전기융합 배양액은 0.1 mM CaCl₂ 및 0.1 mM MgCl₂가 첨가된 0.28 M Mannitol 용액에 2~3분간 평형을 실시한 다음, 핵이식란을 전기 융합용 chamber로 옮겨, 양 전극 사이에 일렬로 정렬한 다음 난자의 이식되어진 공여세포는 전극의 양극(+)쪽으로 향하게 하고, 세포질은 음극(-)쪽으로 향하게 하여 전기 자극을 가하였다. 전기융합 및 활성화는 1.5 kV/cm, 50 μ sec, 2 pulse를 주어 수정란의 융합과 전기활성화를 동시에 처리 후, 0.4% BSA가 첨가된 PZM-5 배양액에서 1~2일 동안 체외배양을 실시하였다.

5. 대리모의 준비와 복제 수정란 이식 및 임신 진단

복제 수정란을 이식하기 위하여 사용된 대리모는 6~8개월령의 120~150 kg 미경산돼지를 인공수정하고, 임신이 확인된 20~45일의 대리모에 Estron 2.5 ml(bioveta, Czech Republic)을 피하 주사하여 유산을 유도한 후 48시간이 경과되었을 때 Estron과 PMSG 1000 IU(Daesung, Korea)를 혼합하여 주사하였다. 그 후 72시간 전후로 hCG 1,000 IU(Daesung, Korea)를 피하 주사하여 과배란을 유도시켰으며, 48시간 후에 외과적

인 수술 방법으로 복제 수정란을 대리모에 이식하였다. 호르몬 처리된 수란돈은 7 ml Stresnil(Janssen, UK)을 근육주사하여 진정시킨 후 2.5 ml Zoletil(Vervac S.A., France)과 7.5 ml Narcoxyl(intervet, Holland)을 혼합하여 귀 정맥에 주입하여 전신 마취를 유도하였다. 마취된 수란돈의 정중선을 따라 약 10~15 cm를 절개하여 자궁을 노출시킨 뒤 난소 표면의 출혈체 혹은 난포 상태를 확인한 후, 150~160개 수준의 1~4세포기 복제 수정란을 좌·우측 난관 팽대부에 각각 이식하였다. 수란돈의 임신 여부는 수정란 이식 후 30~35일째에 초음파 진단기를 이용하여 확인하여 태낭이 깨끗하고 확실한 것만 임신으로 판단하였으며, 60일령까지는 매일 외음부를 시각적으로 판단하여 재발정 확인을 하였다. 90일령 정도 되었을 때 다시 초음파기기를 이용하여 산자를 확인한 후 분만에 정일 2주 전에 분만실로 이동하여 충분한 휴식과 사료를 급여하고, 하루에 최소 2회 이상에 걸쳐 계속적인 관찰을 하였으며, 분만 징후가 나타나면 조용한 상태에서 자연 분만을 유도하여 정상적인 분만이 진행되도록 보조하였다.

6. 유전자 동일성 검사

유전자 동일성 검사는 유전자 분석 전문 업체에 의뢰하여 실시하였으며, 조직 sample과 세포로부터 DNA를 추출한 다음 성염색체 X 그리고 개체마다의 다형성이 높은 상염색체의 6개의 STR 부위(SW936, SW951, SW787, S0005, SW72, SW24)를 선정하여 형광 Dye가 붙여진 Oligo로 PCR(Polymerase Chain Reaction) 반응을 실시하여 DNA를 증폭하였으며, 자동 염기서열 분석장치(ABI 3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems)를 이용하여 fragment analysis 방법으로 검사를 수행하였다.

7. 통계적 분석

모든 실험 결과는 SPSS program의 ANOVA를 이용하여 통계학적 유의성을 검증하였으며, $p < 0.05$ 일 때 통계적 차이가 있는 것으로 판단하였다.

결 과

1. 대리모의 강제 유산 시기에 따른 임신율과 분만을

대리모로 이용되는 일반 돼지의 강제 유산 시기에 따른 임신율과 난소 상태에 대한 결과는 Table 1과 같다. 대리모로 이용된 일반 돼지의 강제 유산 임신일령에 따른 임신율을 조사하기 위하여 대리모의 임신일령을 각각 20~29일, 30~39일과 40~45일로 나누어 임신율을 조사한 결과, 복제란 이식 후 30일째 임신율이 각각 0%, 56.3%와 55.6%로 나타나 30~39일령과 40~45일령 이상에서 유산시킨 대리모 그룹이 20~29일령에 유산시킨 대리모 그룹보다 유의적으로 높은($p < 0.05$) 임신율을 나타내었다. 또한 각 그룹별 난소의 상태는 배란 중일 때가 16.7%, 6.2% 및 0%로 나타났으며, 배란 전일 때가 33.3%, 43.8% 및 33.3%로 나타났으며, 배란 후가 50.0%, 50.0% 및 66.7%로 나타나 배란 후의 출현 빈도수가 다소 높게 나타나는 경향을 나타내었다. 생산된 1~4 세포기의 복제 수정란을 좌·우측 난관에 150~160개 수준으로 이식하였고, 이식 후 임신 115일째에 대리모 5두로부터 제왕절개를 통하여 10마리의 산자를 생산하였으나 모두 분만 직후 사산하였으며, 이식 후 임신 117일째에 대리모 2두로부터 자연 분만을 통하여 생산된 9마리의 산자에서 4마리는 사산하였고, 5마리는 정상으로 분만되었다. Fig. 1은 복제 수정란 이식에 의해 임신 117일째에 자연 분만을 통하여 생산된 복제 미니돼지의 사진이다.

2. 복제 미니돼지의 분만 시 산자의 체중과 분만 상태

Table 2는 복제 미니돼지 분만 시 체중, 태반의 무게, 임신 기간 및 분만 상태를 나타내었다. 제왕절개에 의해 분만된 10마리는 모두 사산이었으며, 제왕절개 후 체중은 평균 534 g으로 나타났다. 자연 분만에 의해 생산된 9마리의 생시 체중은 작게는 254 g부터 가장 크게 출산한 개체는 1,296 g으로 평균 604 g을 나타냈으며, 태반의 무게는 14 g부터 280 g으로 평균 101 g으로 나타났다. 자연 분만에 의해 생산된 9마리의 산자에서 5마리는 정상으로 태어났으며, 4마리는 사산 및 기형으로

Table 1. Ovulation conditions and pregnancy rate of age at abortion recipient

Days of abortion	No. of recipient	Ovulation condition (%)			Pregnancy rate (%)	Delivery/pregnancy (%)	Delivery/no. of recipient (%)
		Pre-ovulation (%)	Ovulation (%)	Post-ovulation (%)			
20~29	6	2 (33.3)	1 (16.7)	3 (50.0)	0 (0) ^b	0 (0)	0 (0)
30~39	16	7 (43.8)	1 (6.2)	8 (50.0)	9 (56.3) ^a	5 (55.6)	5 (31.3)
40~45	9	3 (33.3)	0 (0)	6 (66.7)	5 (55.6) ^a	2 (40.0)	2 (22.2)
Total	31	12 (38.7)	2 (6.5)	17 (54.8)	14 (45.2)	7 (50.0)	7 (22.6)

*Values with different superscript differ significantly ($p < 0.05$).

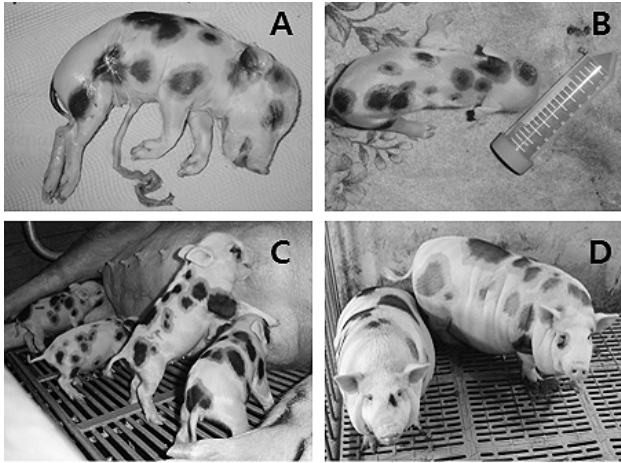


Fig. 1. Miniature pigs by somatic cell nuclear transfer. A: Stillbirth piglet, B: Newborn piglets (254 g), C: 3 days after birth, D: 122 days after birth.

Table 2. The birth weight of miniature piglets and delivery conditions

Piglet* No.	Birth weight (g)	Placenta weight (g)	Gestation period (day)	Delivery condition
A-1	528	-	115	Stillbirth
A-2	442	-	115	Stillbirth
B-1	690	-	115	Stillbirth
C-1	490	-	115	Stillbirth
D-1	395	-	115	Stillbirth
D-2	524	-	115	Stillbirth
D-3	550	-	115	Stillbirth
E-1	452	-	115	Stillbirth
E-2	680	-	115	Stillbirth
E-3	593	-	115	Stillbirth
F-1	552	80	117	Normal
F-2	572	80	117	Normal
F-3	254	14	117	Stillbirth
F-4	382	69	117	Stillbirth
F-5	608	88	117	Normal
F-6	604	92	117	Stillbirth
F-7	486	78	117	Normal
G-1	682	130	117	Normal
G-2	1,296	280	117	Stillbirth
Mean ± SD	567 ± 208	101 ± 73		

*A~E: Cesarean delivery, F and G: normal delivery.

태어났다.

3. 복제미니돼지의 유전자적 검증

Table 3은 자연 분만 후 성체까지 성장한 4두의 복제미니돼지의 유전자 감식 결과이다. 7개 STR부위에 대한 유전자 동일성 검사 결과를 각각 나타내고 있다. 7종의 마커를 이용하여 유전자 감식을 통한 친자 확인을 실시한 결과, 대리모와는 전혀 다른 양상을 나타내었으며, 핵이식에 사용된 donor cell 과는 동일한 양상을 나타내 대리모와 산자간의 친자관계가 성립되지 않음을 확인하였고, STR marker의 증폭결과는 Table 3에서 나타난 바와 같이 대리모의 영향을 받지 않고 donor cell을 이용한 핵이식 방식에 의해 생산된 산자임을 증명하였다.

고 찰

본 연구는 미니돼지의 중간엽 줄기세포를 공여세포로 이용하여 복제동물을 생산하는데 있어서 대리모 준비 시 대리모의 유산 일령과 유산 일령에 따른 난소의 상태에 따라 이식 후 임신 효율과 분만에 대한 내용과 체세포 복제 방법을 이용하여 미니돼지의 생산과 생산된 자돈의 유전자 감별은 통한 검증에 대한 내용을 기술하였다.

돼지의 경우, 체내 수정란을 이용한 비외과적 이식 방법으로 산자생산을 보고한 바 있지만(Martinez 등, 2004), 현재까지도 효율적인 체외배양 방법 및 효율적인 비외과적 이식 방법이 개발되지 않아 복제란 생산 후 2일 이내에 외과적 이식 방법을 이용하여 형질전환 돼지 및 복제 돼지를 생산하고 있는 실정이다. 복제 돼지 생산에 있어서 대리모의 상태와 발정동기화는 이식후 체내에서 수정란 발달을 위한 매우 중요한 부분이다. 복제 돼지를 생산하는 연구그룹들은 자연 발정 시기에 eCG

Table 3. Microsatellite of recipient, donor cell and cloned miniature piglets

Marker	Recipient (M15)	Donor cell (MSCs)	M15-1	M15-2	M15-5	M15-7
SW936	108	118	118	118	118	118
SW951	127	139	139	139	139	139
SW787	157	152	152	152	152	152
S0005	246	207	207	207	207	207
SW72	112	121	121	121	121	121
SW24	117	103	103	103	103	103
X	218	220	220	220	220	220

또는 hCG를 주사하고 대리모로 사용하는 방법(Takahagi 등, 2005; Kurome 등, 2006; Koo 등, 2010)과 Guthrie와 Polge (1978)가 보고한 PGF₂α를 주사하여 강제 유산을 유도하였다. 본 연구에서는 임신된 일반 돼지에 강제 유산을 유도한 후 대리모로 사용하였다. 이는 자연 발정시기의 돼지를 대리모로 사용하는 방법은 대리모의 준비가 임신돈을 강제 유산 시켜 사용하는 방법보다 간단하나, 돈군이 형성되지 않은 소규모 연구소나 연구 단체에서는 자연 발정 돼지를 선별해 대리모로 이용할 수 없는 실정이다. 따라서 복제란의 생산 시기와 대리모의 배란 시기를 맞출 수 있는 장점이 있는 강제 유산 후 대리모로 사용하는 방법을 이용하였다.

Koo 등(2010)은 이식시 난소의 배란 상태에 따른 임신율은 자연 발정 체크로 선발된 대리모로부터 배란전인 상태일 때 36.3%의 임신율을 보였고, 배란 후 상태일 때 22.7%로 배란 전 상태일 때가 유의적으로 높은 임신율을 나타낸다고 보고하였다. 본 연구에서는 임신 20일령부터 45일령 사이인 임신돈을 강제 유산시켜 발정동기화 하는 방법을 이용하였을 때는 배란후의 난소 상태의 빈도가 높게 나타났었으며, 전체적인 임신율은 45.2%를 나타내었다. 본 연구에서는 강제 유산 시 임신일령에 따른 임신율은 30~39일, 40~45일의 그룹이 20~29일 그룹보다 유의적($p < 0.05$)으로 높게 나타나 대리모 선발시 임신 30일 이상인 개체를 대리모로 사용하는 것이 바람직하다고 사료된다. 이러한 차이는 임신일령에 따른 태아의 발달 상태에 따른 자궁의 상태가 상이함에 따라 유산 후의 자궁 회복과 관련이 있을 것으로 추정되나, 정확한 규명을 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 돼지의 경우, 이식 난자 수에 따라라도 생산 효율의 차이를 나타내며, 고 보고(Fujimura 등, 2008; Ahn 등, 2011)된 바 있어 본 연구에서는 150~160개를 각각의 난관에 이식하였다. 미니복제 돼지의 생산을 위한 대리모로는 Landrace + Yorkshire 교잡종을 사용하였으며, 일반적으로 알려진 돼지의 평균 임신 기간인 114일과 비교하였을 때 본 연구에서 자연 분만에 의해 생산된 돼지는 117일령에 분만하여 복제 미니돼지 생산에 있어 일반 돼지를 대리모로 사용할 수 있음을 확인하였다(Kurome 등 2008). 그러나, 복제 돼지 생산에 있어서 You 등(2010)은 임신기간이 115일령부터 118일령까지 다양하게 보고한 바 있어 분만 일령을 예측하기에는 다소 어려움이 있다고 사료된다. 본 연구에서 생산된 복제미니돼지의 분만 시 평균 체중이 567 g으로 나타나, 일반 미니돼지의 신생아돈에서 알려진 생시체중과 유사함을 나타내었으나, 생시체중의 범위는 254 g에서 1,296 g으로 다양하게 나타났다. 또한 자연 분만중 복제 미니돼지는 9마리 중 5마리만 정상적으로 분만하여 사산율이 44.4%로 나타나, Kurome 등(2006)이 보고한 15% 보다 높게 나타났다. 또한 임신 115일령에 제왕절개 방법을 이용하여 분만을 시도한 5두의 대리모는 분만 직후 모두 사산하여, 생존

산자를 확보하지 못하였다. 이는 모든의 마취 시 신속한 처리에도 불구하고 자돈이 마취되는 현상 및 대부분의 산자가 양수를 먹고 태어나 회복하지 못하였다. 성체까지 성장한 4두의 미니돼지의 유전자 감식 결과는 국제적으로 공인된 마커를 사용하여 생산된 산자는 대리모와 유전적 연관성이 전혀 보이지 않았으며, 사용된 donor cell과는 정확히 일치하는 결과를 나타내었고, 생산된 산자들 간의 결과, 또한 정확히 일치함으로써 체세포 복제란 유래의 산자임을 확인하였다.

이러한 결과를 볼 때 본 연구는 대리모의 조건에 따른 임신율과 산자 생산율 및 생산 가능성에 대해 연구하였으나, 20~29일령의 대리모 공시두수가 적고, 임신율이 0%로 나타나 지속적인 연구가 필요하다고 보여지며, 성공적인 복제 돼지의 생산을 위해서는 좋은 복제란의 생산뿐만 아니라 대리모의 선택과 처리방법 또한 매우 중요하다고 사료된다. 본 연구의 결과는 복제미니돼지 생산, 장기이식용 및 질환 모델용 형질 전환 돼지를 생산하는데 있어 대리모의 처리 방법과 이식 생산 등에 대한 내용을 제시하고, 일반 돼지를 대리모로 사용하여 미니돼지 생산이 가능함을 확인하였다.

결론

미니돼지의 복제는 많은 연구자들에 의해 여러 해 동안 이종간 장기이식이나 의료 실험을 위해 연구되어 왔으나, 복제 돼지 산자의 생산 효율은 극히 낮은 편이다. 본 연구에서는 효율적인 복제미니돼지의 생산을 위한 대리모의 상태를 최적화하기 위하여 대리모의 선발 방법과 처리 방법에 따른 대리모의 배란상태와 형질전환 복제란 이식시의 임신율과 분만을 및 산자 생산을 확인하였다. 미니돼지의 중간엽 줄기세포를 공여세포로 사용하였으며, 최종 임신율과 분만율은 각각 45.2%와 22.6%로 나타났다. 복제 미니돼지는 7두의 대리모에서 총 19마리를 생산하였으며, 자연 분만을 통한 2두의 대리모에서는 5마리의 건강한 산자를 생산하였으나, 4마리는 사산하였고, 제왕절개를 통한 5두의 대리모에서 생산된 10마리의 산자는 분만 직후 사망하였다. 제왕절개를 통하여 생산된 10마리 산자의 생시 체중은 평균 534 g으로 나타났으며, 자연 분만에 의해 생산된 9마리의 생시 체중은 작게는 254 g부터 가장 크게 출산한 개체는 1,296 g으로 평균 604 g을 나타냈으며, 태반의 무게는 14 g부터 280 g으로 평균 101 g으로 나타났다. 초위성체분석 결과 생산된 산자는 대리모와 유전적으로 다른 것으로 나타났고, 공여세포와는 유전적으로 일치하는 결과를 나타내어, 결론적으로 핵이식방법에 의해 생산된 산자임을 확인하였다. 본 연구 결과 임신된 대리모를 이용하여 강제 유산방법을 통한 대리모의 조건을 최적화함으로써 복제 미니돼지의 안정적 생산기반을 확립하여 이종간 장기이식과 같은 연구 분야의 더 나은 연구를 위한 기본 자료로 활용될 수 있

을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Ahn KS, Kim YJ, Kim M, Lee BH, Heo SY, Kang MJ, Kang YK, Lee JW, Lee KK, Kim JH, Nho WG, Hwang SS, Woo JS, Park JK, Park SB and Shim H. 2011. Resurrection of an alpha-1,3-galactosyltransferase gene-targeted miniature pig by recloning using postmortem ear skin fibroblasts. *Theriogenology* 75:933-939.
- Fujimura T, Takahagi Y, Shigehisa T, Nagashima H, Miyagawa S, Shirakura R and Murakami H. 2008. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase gene-deficient pigs by somatic cell nuclear transfer: a novel selection method for gal alpha 1,3-Gal antigen-deficient cells. *Mol. Reprod. Dev.* 75:1372-13788.
- Guthrie HD and Polge C. 1978. Treatment of pregnant gilts with a prostaglandin analogue, cloprostenol, to control oestrus and fertility. *J. Reprod. Fertil.* 52:271-273.
- Hwang IS, Park MR, Moon HJ, Shim JH, Kim DH, Yang BC, Ko YG, Yang BS, Cheong HT and Im GS. 2008. Osmolarity at early culture stage affects development and expression of apoptosis related genes (Bax- α and Bcl-xl) in preimplantation porcine NT embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 75:464-471.
- Kobayashi M, Asakuma S and Fukui Y. 2007. Blastocyst production by *in vitro* maturation and development of porcine oocytes in defined media following intracytoplasmic sperm injection. *Zygote* 15:93-102.
- Kolber-Simonds D, Lai L, Watt SR, Denaro M, Arn S, Augenstein ML, Betthausen J, Carter DB, Greenstein JL, Hao Y, Im GS, Liu Z, Mell GD, Murphy CN, Park KW, Rieke A, Ryan DJ, Sachs DH, Forsberg EJ, Prather RS and Hawley RJ. 2004. Production of α -1,3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 101:7335-7340.
- Koo OJ, Kang JT, Kwon DK, Park HJ and Lee BC. 2010. Influence of ovulation status, seasonality and embryo transfer method on development of cloned porcine embryos. *Reprod. Domest. Anim.* 45:773-778.
- Kurome M, Ishikawa T, Tomii R, Ueno S, Shimada A, Yazawa H and Nagashima H. 2008. Production of transgenic and non-transgenic clones in miniature pigs by somatic cell nuclear transfer. *J. Reprod. Dev.* 54:156-163.
- Kurome M, Ueda H, Tomii R, Naruse K and Nagashima H. 2006. Production of transgenic-clone pigs by the combination of ICSI-mediated gene transfer with somatic cell nuclear transfer. *Transgenic Res.* 15:229-240.
- Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ and Prather RS. 2002. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295:1089-1092.
- Loveland BE, Milland J, Kyriakou P, Thorley BR, Christiansen D, Lanteri MB, van Regensburg M, Duffield M, French AJ, Williams L, Baker L, Brandon MR, Xing PX, Kahn D and McKenzie IFC. 2004. Characterization of a CD46 transgenic pig and protection of transgenic kidneys against hyperacute rejection in non-immunosuppressed baboons. *Xenotransplantation* 11:171-183.
- Martinez EA, Caamaño JN, Gil MA, Rieke A, McCauley TC, Cantley TC, Vazquez JM, Roca J, Vazquez JL, Didion BA, Murphy CN, Prather RS and Day BN. 2004. Successful non-surgical deep uterine embryo transfer in pigs. *Theriogenology* 61:137-146.
- Nottle MB, Beebe LF, Harrison SJ, McIlpatrick SM, Ashman RJ, O'Connell PJ, Salvaris EJ, Fiscaro N, Pommey S, Cowan PJ and d'Apice AJ. 2007. Production of homozygous α -1,3-galactosyltransferase knockout pigs by breeding and somatic cell nuclear transfer. *Xenotransplantation* 14:339-344.
- Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H and Perry AC. 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 289:1188-1190.
- Park CH, Uh KJ, Mulligan BP, Jeung EB, Hyun SH, Shin T, Ka H and Lee CK. 2011. Analysis of imprinted gene expression in normal fertilized and uniparental preimplantation porcine embryos. *PLoS. One* 6:e22216.
- Park MR, Kim BK, Lee HC, Lee P, Hwang S, Im GS, Woo JS, Cho C, Choi SH, Kim SW and Ko YG. 2010. The imprinted messenger TNA expression in cloned porcine preimplantation embryos. *J. Emb. Trans.* 25:127-131.
- Petters RM and Wells KD. 1993. Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 48:61-73.
- Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, Boone J, Wells KD, Chen SH, Ball S, Specht SM, Polejaeva IA, Monahan JA, Jobst PM, Sharma SB, Lamborn AE, Garst AS, Moore M, Demetris AJ, Rudert WA, Bottino R, Bertera S, Trucco M, Starzl TE, Dai Y and Ayares DL. 2003. Production of α -1,

- 3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* 299:411-414.
- Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A and Campbell KH. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407:86-90.
- Prather RS, Boice ML, Gibson J, Hoffman KE and Parry TW. 1995. *In vitro* development of embryos from Sinclair miniature pigs: a preliminary report. *Theriogenology* 43:1001-1007.
- Prather RS, Hawley RJ, Carter DB, Lai L and Greenstein JL. 2003. Transgenic swine for biomedicine and agriculture. *Theriogenology* 59:115-123.
- Ringe J, Kaps C, Schmitt B, Buscher K, Bartel J, Smolian H, Schultz O, Burmester GR, Haupl T and Sittinger M. 2002. Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell Tissue Res.* 307:321-327.
- Takahagi Y, Fujimura T, Miyagawa S, Nagashima H, Shigehisa T, Shirakura R and Murakami H. 2005. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase gene knockout pigs expressing both human decay-accelerating factor and N-acetylglucosaminyltransferase III. *Mol. Reprod. Dev.* 71:331-338.
- Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IM and Iwamura S. 2002. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol. Reprod.* 66: 112-119.
- You J, Jeon YB, Hyun SH, Park SB and Lee E. 2010. Reproductive efficiency and characteristics of cloned miniature piglets produced from domestic commercial gilts. *J. Emb. Trans.* 25:215-219.
- Zhao J, Ross JW, Hao Y, Spate LD, Walters EM, Samuel MS, Rieke A, Murphy CN and Prather RS. 2009. Significant improvement in cloning efficiency of an inbred miniature pig by histone deacetylase inhibitor treatment after somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 81:525-530.
-
- (접수: 2012. 1. 5 / 심사: 2012. 1. 6 / 채택: 2012. 1. 20)