

형질전환 닭에서 GFP 유전자 전이 연구

장예진¹ · 지미란¹ · 전미향¹ · 김점순¹ · 김경운¹ · 한덕우¹ · 정학재¹ · 양병철¹ ·
류재규¹ · 박진기¹ · 김태완² · 변승준^{1,*}

¹국립축산과학원 동물바이오통과, ²대구가톨릭대학교 의과대학

Analysis of the Foreign Gene Transmission in the GFP Transgenic Chickens

Ye-Jin Jang¹, Mi-Ran Ji¹, Mi-hyang Jeon¹, Jeom Sun Kim¹, Kyung-Woon Kim¹, Deug-Woo Han¹, Hak-Jae Chung¹,
Byoung-Chul Yang¹, Jae Gyu Yoo¹, Jin-Ki Park¹, Teoan Kim² and Sung June Byun^{1,*}

¹National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

²Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu 705-718, Korea

ABSTRACT This study was performed to analyze the generational transmission and the expression of the foreign gene in the GFP transgenic chickens. The transmission rate and the expression of the GFP gene was investigated from the GFP transgenic rooster (G2) as the first founder to the ninth (G8). Analysis of GFP expression in hatched chickens was used the UV lamp. When GFP was expressed in the wings, bill and legs of a chick, the bird only was selected as a transgenic chick. The average transmission rate of the overall transgenic was 38~58%. These results showed that the transmission of the GFP gene in the transgenic chickens in accordance with the laws of Mendel's continues to the next generation without gene silencing.

(Key words : chicken, GFP, gene transmission)

서 론

최근 의학과 생명공학 기술의 발달은 사람의 질병과 관련 된 원인들을 하나씩 규명하게 됨에 따라 사람의 질병 치료 및 예방에 필요한 의료용 단백질의 수요가 폭발적으로 늘어나고 있는 상황이다(Durocher and Butler, 2009). 이러한 환경 변화는 의료용 단백질 생산의 중요성이 크게 부각되는 계기가 되었고, 기존 생산 방법 즉 생체 반응기(bioreactor)에 대장균, 곤충 또는 동물세포를 배양하여 생산하는 방법이 아닌 새로운 생산 방법들을 고려하게 되었다(Harrison and Jarvis, 2006; O'Callaghan and James, 2008; Ward et al., 2004). 동물생명공학기술의 발달은 새로운 단백질 생산 수단으로 형질전환 가축을 이용한 단백질 생산을 가능하게 하였고, 특히 닭은 계란 생산이라는 특징으로 인해 의료용 단백질 생산의 훌륭한 생체반응기 동물로서 가치를 가지게 되었다.

포유동물의 유선은 재조합 단백질 생산의 대상으로서 큰 매력을 가지며, 일부 성공한 사례가 보고되고 있다(Kling, 2009).

그러나 포유동물은 대량 번식을 위하여 비교적 큰 사육 면적과 상대적으로 긴 성 성숙 기간 등이 필요하다. 이에 반해 닭은 짧은 세대간, 연중 계란 생산 가능, 번식에 필요한 작은 공간, 짧은 시간에 큰 군집으로 형성, 그리고 프리온 단백질 관련 질병이 없는 등 포유류에 비하여 여러 가지 장점들이 있다. 최근 암탉이 생산한 계란의 난백에 사람에게 필요한 의료용 단백질을 분비하는 형질 전환 닭 생산 성공 사례들이 보고되고 있다(Kwon et al., 2010; Lillico et al., 2005; Zhu et al., 2005). 그러나 형질전환 닭을 하나의 생체반응기로 이용에는 형질전환 닭이 가지는 외래 유전자가 안정적으로 다음 세대에 전달되고, 더불어 전달된 외래 유전자가 침묵 등의 후성학적인 요인들에 의해 유전자 발현이 되지 않는 문제점들이 없어야 한다.

따라서 본 연구는 녹색형광단백질(GFP)을 발현하는 형질 전환 닭을 이용하여, 형질전환 닭에 도입된 외래 유전자인 GFP가 닭의 다음 세대로 안정적으로 전이되고, 생산된 후대 형질전환 닭들에서도 정상적으로 단백질을 발현하는지를 조

* To whom correspondence should be addressed : pcs1778@korea.kr

사하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 동물

본 연구에 사용한 닭은 2005년 대구가톨릭대학교에서 분양받은 GFP 형질전환 닭이었다. GFP 유전자는 RSV(Rous sarcoma virus) 프로모터에 조절되어 녹색형광단백질을 닭의 모든 조직에서 발현하도록 디자인되었고, 재조합 retrovirus에 의하여 닭 수정란으로 전달된 GFP 유전자는 형질전환 닭의 26번 염색체에 provirus 형태로 존재하였다(Kwon et al., 2004; Koo et al., 2007). 그리고 후대 형질전환 닭 생산에 필요한 암탉들은 국립축산과학원 동물바이오공학과 계사에 보유하고 있는 실용계인 하이라인 브라운을 사용하였다.

2. GFP 유전자 전이양상 조사

외래 유전자 전이 및 발현 양상 조사는 heterozygote인 제3세대(G2) GFP 형질전환 수탉을 최초 부계로 사용하여 최종적으로 제9세대(G8) 형질전환 닭 생산까지 총 5년에 걸쳐 6세대를 연속적으로 생산하면서 형질전환 닭에서 GFP 유전자 전이 및 발현을 조사하였다. 제4세대(G3) 형질전환 닭은 제3세대(G2) GFP 형질전환 수탉에서 마사지법으로 채취한 정액을 실용계인 하이라인 브라운 암컷들에 인공수정 한 후, 생산된 수정란들을 21일 동안 부화기에서 배양하여 병아리를 부화하는 방법으로 생산하였다. 제9세대(G8) 형질전환 닭들은 이와 같은 방법으로 총 6번의 교배를 통하여 생산되었다. 다음 세대 형질전환 닭에 필요한 부계 닭 선발은 성숙이 완전히 이루어진 시점인 생후 8개월 전후에서 생존하고 있는 형질전환 수탉들 가운데 무작위 선택 방법을 이용하였고, 선발된 부계 수탉 1수의 정액만을 정상 암탉들에 인공수정하는 방법으로 진행하였다. 부화한 병아리들의 유전분석은 genomic PCR과 육안 분석을 병행하였다. 1차 분석은 육안으로 자외선 램프 아래에서 병아리들을 관찰하고, 날개, 부리와 다리에서 녹색형광단백질을 발현하는 병아리들만을 선발하였다. 2차 분석은 선발된 병아리들을 PCR 방법으로 재검증하였다. PCR 유전분석은 육안으로 선발된 병아리들의 날개 정맥에서 혈액 채취, genomic DNA 분리(Genomic DNA purification kit, Promega), PCR의 순서로 실시하였다. PCR은 GFP-F: 5-GACTTCAAGGAGGACGGCAACA-3, GFP-R: 5-TCTCGTTGGGGTCTTTGCTCAG-3 primer들과 taq-polymerase로 AccuPrime SuperMix II(Invitrogen)를 사용하여 94°C-2분, 94°C-45초, 59°C-30초, 68°C-20초의 조건에서

30회 증폭하는 방법으로 수행하였다.

3. 통계 분석

본 연구를 통해 얻은 결과들은 Chi-square 검정을 이용하여 유의성 검증을 실시하였다.

결과 및 고찰

인공수정 방법으로 생산된 후대병아리들 가운데 형질전환 병아리는 자외선 램프 아래에서 부리, 벗, 다리, 그리고 날개 안쪽 부위에 선명하게 녹색형광단백질이 발현됨을 확인하였고, 이들만을 형질전환 병아리로 선발하였다. Fig. 1은 선발된 제9세대(G8) 형질전환 병아리들에서 GFP 발현 모습을 보여주고 있다. 처음 제4세대(G3) 형질전환 닭의 유전 분석은 자외선 램프를 이용한 육안 판별과 부화한 병아리들의 혈액에서 추출한 genomic DNA를 이용한 RCR 유전 분석 방법을 병행하였다(Fig. 2). PCR 유전 분석 결과는 육안으로 선발된 15수의 병아리들이 모두 PCR 유전 분석에서 형질전환 양성으로 판정됨에 따라 이후부터는 분석의 편의성을 고려하여 육안 분석만으로 형질 전환 여부를 판별하였다.

제3세대(G2) GFP 형질전환 수탉으로부터 제9세대(G8) 형질전환 닭들까지 총 6세대 동안 생산된 형질전환 닭들은 모두 heterozygote이었고, 이들의 GFP 유전자 전이율 즉 형질전환 비율은 Table 1과 같았다. 부화한 병아리들에서 형질전환 병아리 생산 비율은 Chi-square 검정으로 분석한 결과, $\chi^2=2.94$ 그리고 $P\text{-value}=0.71$ 을 나타내었고, 이를 유의수준 5%

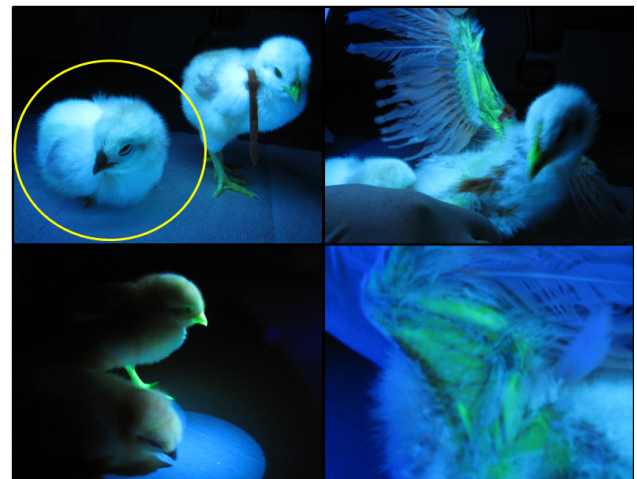


Fig. 1. Expression of the GFP gene in the G8 transgenic chicks produced from mating of female and the G7 hemizygous male bird. The yellow circled chick is a non-transgenic.

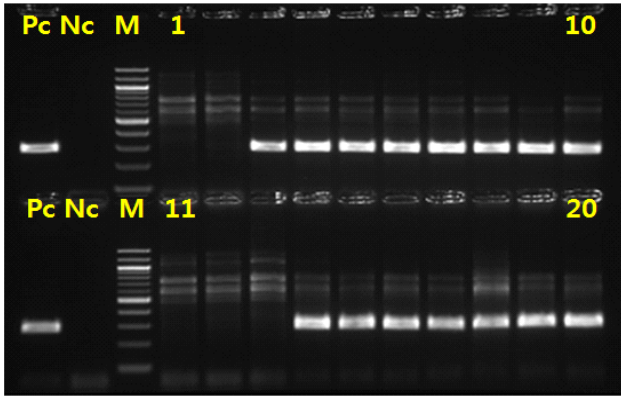


Fig. 2. PCR for the detection of the GFP gene. The genomic DNA was isolated from the blood of the G3 transgenic chicks. M: 100bp DNA ladder; PC: positive control; NC: negative control; lane 1, 2 and 11~13: wild-types; lane 3~10 and 14~20: the G3 transgenic chickens.

Table 1. Ratio of the transgenic chicks in the hatched chicks

Generation	No. of hatched chicks	No. of transgenic chicks (%)
G3	29	15 (52)
G4	33	16 (48)
G5	54	21 (39)
G6	39	21 (54)
G7	34	15 (44)
G8	80	47 (59)
Total	269	135 (50)

그리고 자유도 5로 유의성 검정 결과 생산된 닭들의 형질전환 비율은 멘델의 유전 법칙에 따름을 알 수 있었다.

제9세대(G8) GFP 형질전환 닭은 입란한 118개 종란 가운데 98개가 수정란으로 확인되었고, 이들로부터 80수의 병아리들이 부화하였고, 이들 가운데 형질전환 병아리는 47수이었다. 제9세대 형질전환 닭의 부화율은 수정란 기준으로 82% (80/98)이었다. 제9세대 형질전환 닭의 부화율은 본 실험실의 일반 닭 부화율(80~85%)과 큰 차이가 없음을 확인할 수 있었다. 각각의 세대별로 생산된 형질전환 닭들의 성비는 육안으로 암수 구별이 가능한 시기 이전에 폐사 또는 병아리 시기에 도태한 형질전환 병아리들을 제외하고, 성계로 성 성숙이 완료된 형질전환 닭들의 성비는 Table 2와 같았다.

비록 제4세대(12/15, 80%)와 제8세대(10/13, 77%)에서 상대적으로 수컷의 비율이 매우 높게 나타났으나, 전체 평균으

Table 2. Ratio of the sex in the adult transgenic chickens

Generation	No. of adult transgenic chickens	No. of adult males (%)
G3	15	12 (80)
G4	14	8 (57)
G5	21	13 (62)
G6	19	8 (42)
G7	13	10 (77)
G8	20	9 (45)
Total	102	60 (59)

로 보았을 때 대략 59%가 수컷이었다. 성 구별이 가능한 시기 까지 생존하였던 102수의 형질전환 닭들 가운데 62수가 수컷이었다. 이러한 성비 결과를 Chi-square 검정을 이용 생산된 전체 형질전환 닭들의 암수 성비를 분석한 결과, $\chi^2=5.66$ 그리고 $P\text{-value}=0.34$ 를 나타내었고, 이를 유의수준 5% 그리고 자유도 5로 유의성 검정 결과 생산된 형질전환 닭들은 일반적인 암수 생산 비율인 1:1 비율을 따름을 보여 주고 있었다. 통계 분석 결과, 전체적인 암 수 비율이 기대 비율인 1:1의 범위를 벗어나지 않는 것으로 나타남에 따라 상대적으로 개체수가 적었던 제4세대(15수)와 제8세대(13수)에서 수컷의 비율이 높은 현상은 세대의 개체수가 많았다면 일반적인 기대 비율인 1:1에 가깝게 나타나게 될 것으로 사료되어진다. 본 연구는 형질전환 닭에서 인위적으로 주입된 외래 유전자가 닭의 세대간 전이가 명확하게 일어나며, 다음 세대로 전이된 유전자의 지속적으로 안정적인 발현 여부를 GFP 형질전환 닭을 이용하여 조사하고자 하였다. 비록 형질전환 닭에서 주입한 외래 유전자의 후대 병아리로의 전이율을 조사한 연구들은 많이 있었으나, 대부분이 제3세대(G2)까지이며, 많게는 제5세대(G4)까지 후대들을 생산하고 조사한 보고들이 있었다. 그리고 이들 후대계의 형질전환 비율은 부모의 한쪽이 heterozygote이고, 나머지가 wild-type인 경우 44~62%이었다. 이러한 형질전환 비율은 멘델의 유전 법칙을 따르고 있음을 보여주었다. 그러나 예외의 경우로 후대계의 형질전환 비율이 20~30% 내외로 나타는 경우도 보고되고 있었다. 연구에서는 50% 형질전환 비율이 되지 않는 이유를 주입한 외래 유전자 단백질 발현 혹은 염색체상에 외래 유전자 삽입에 따른 기존 유전자 파괴에 따른 수정란의 발생에 영향을 주었을 가능성을 제시하고 있다(Koo et al., 2007; Kwon et al., 2010; Scott and Lois, 2005). 그러나 본 연구는 기존의 연구들보다 훨씬 많은 형질전환 닭 후대 세대들을

생산하였고, 이들에게서 주입한 외래 유전자가 안정적으로 후대계로 전달되고 발현되는지를 처음으로 조사하였다. 총 6세대(G3~G9)에서 걸쳐 생산된 형질전환 닭들의 형질전환 비율은 각각의 세대별로 38~58%이었다. 이러한 유전자 전이 양상은 멘델의 유전 법칙에 따른 결과라 예상되며, GFP 유전자가 안전하게 후대로 전이되고 있음을 보여주고 있다. 본 연구 결과는 형질전환 닭이 가지고 있는 외래 유전자가 세대가 계속 진행되어도 유전자 침묵없이 멘델의 유전 법칙에 따라 다음 세대로 계속 전이됨을 보여주고 있으며, 이러한 연구 결과는 형질전환 닭을 하나의 생체 반응기로서의 활용 가능성을 보여주고 있다.

적 요

본 연구는 형질전환 닭에서 주입한 외래 유전자의 세대간 전이와 발현 양상을 조사하고자 하였다. 외래 유전자 전이 양상 조사는 제3세대(G2) GFP 형질전환 수탉을 최초 부계로 사용하여 최종적으로 제9세대(G8) 형질전환 닭을 연속적으로 생산하면서 GFP 유전자 전이 양상을 조사하였다. 형질전환 병아리 유전 분석은 자외선 램프 아래에서 부화한 병아리들의 날개, 부리와 다리에서 녹색형광단백질을 발현하는 병아리들만을 형질전환으로 선발하였다. 형질전환 닭에서 외래 유전자 전이율은 대략 38~58%이었다. 이는 유전자 전이가 멘델의 유전 법칙을 따르고 있음을 보여주고 있다. 연구 결과는 GFP 유전자가 유전자 침묵 없이 멘델의 유전 법칙에 따라 다음 세대로 계속 전이와 발현된다는 것을 보여주고 있다.

(색인어 : 닭, 녹색형광단백질, 유전자 전이)

사 사

본 연구는 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(PJ008146012012) 지원에 의해 수행되었음.

인용문헌

- Durocher Y, Butler M 2009 Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr Opin Biotechnol* 20:700-707.
- Harrison RL, Jarvis DL 2006 Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell expression system and engineering of insect cells to produce "mammalianized" recombinant glycoproteins. *Adv Virus Res* 68:159-191.
- Kling J 2009 First US approval for a transgenic animal drug. *Nat Biotechnol* 27:302-304.
- 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 2007 Production of germline transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein using a MoMLV-based retrovirus vector. *FASEB J* 20(13):2251-2260.
- 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(2):442-448.
- Kwon SC, Choi JW, Jang HJ, Shin SS, Lee SK, Park TS, Choi IY, Lee GS, Song G, Han JY 2010 Production of biofunctional recombinant human interleukin 1 receptor antagonist (rhIL1RN) from transgenic quail egg white. *Biol Reprod* 82:1057-1064.
- Lillico SG, McGrew MJ, Sherman A, Sang HM 2005 Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs. *Drug Discov Today* 10:191-196.
- O'Callaghan PM, James DC 2008 Systems biotechnology of mammalian cell factories. *Brief Funct Genomic Proteomic* 7:95-110.
- Scott BB, Lois C 2005 Generation of tissue-specific transgenic birds with lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(45):16443-16447.
- Ward M, Lin C, Victoria DC, Fox BP, Fox JA, Wong DL, Meerman HJ, Pucci JP, Fong RB, Heng MH, Tsurushita N, Gieswein C, Park M, Wang H 2004 Characterization of humanized antibodies secreted by *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microbiol* 70:2567-2576.
- 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 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.

(접수: 2012. 8. 1, 수정: 2012. 9. 10, 채택: 2012. 9. 17)