



소 β -casein 유전자 영역에서 소 Insulin-like Growth Factor 1을 생산하기 위한 Knock-in Vector

김상영¹ · 박다솜¹ · 김세은¹ · 구덕본² · 강만중^{1,†}

¹전남대학교 농업생명과학대학 동물자원학부

²대구대학교 공과대학 생명공학과

Knock-in Vector for Expression of Insulin-like Growth Factor 1 on the Bovine β -casein Gene Locus

Sang Young Kim¹, Da Som Park¹, Se Eun Kim¹, Deog-Bon Koo² and Man-Jong Kang^{1,†}

¹Department of Animal Science, College of Agriculture and Life Science,
Chonnam National University, Gwangju 61186, Republic of Korea

²Department of Biotechnology, College of Engineering, Daegu University, Gyeongsan 38453, Republic of Korea

ABSTRACT

The production of therapeutic protein from transgenic domestic animal is the major technology of biotechnology. *Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)* is known to play an important role in the growth of the animal. The objective of this study is construction of knock-in vector that bovine IGF-1 gene is inserted into the exon 7 locus of β -casein gene and expressed using the gene regulatory DNA sequence of bovine β -casein gene. The knock-in vector consists of 5' arm region (1.02 kb), *bIGF-1 cDNA*, *CMV-EGFP*, and 3' arm region (1.81 kb). To express *bIGF-1* gene as transgene, the *F2A* sequence was fused to the 5' terminal of *bIGF-1* gene and inserted into exon 7 of the β -casein gene. As a result, the knock-in vector is confirmed that the amino acids are synthesized without termination from the β -casein exon 7 region to the *bIGF-1* gene by DNA sequence. These knock-in vectors may help to create transgenic dairy cattle expressing bovine *bIGF-1* protein in the mammary gland via the expression system of the bovine β -casein gene.

(Key words : Knock-in, *Insulin-like growth factor 1*, β -casein gene locus)

서 론

Insulin-like growth factor1(IGF-1)은 인슐린과 분자 구조가 유사한 호르몬으로서 어린 동물의 성장에 중요한 역할을 하고, 뇌하수체 전엽에서 만들어지고 혈류로 방출된 성장 호르몬에 의하여 간으로부터 IGF-1이 생성되는 것으로 알려져 있으며, IGF-1은 전신의 신체 성장을 자극하고, 신체의 거의 모든 세포, 특히 골격근, 연골, 뼈, 간, 신장, 신경, 피부, 조혈 세포 및 폐 등의 성장 촉진 효과를 가지는 것으로 보고되고 있다(Yakar 등, 2002). 1994년 사람 IGF-1이 토끼 유선에서 생산되는 형질전환 토끼가

생산되었으며, 유즙 1리터당 1 g의 IGF-1이 생산되었다고 보고하였다(Brem 등, 1994). 또한 다른 연구 그룹에서도 1998년 사람 IGF-1이 토끼 유선에서 발현되는 형질전환 토끼를 생산하였다고 보고하였으며, 모든 형질전환 토끼는 생리활성이 있는 IGF-1을 1 mL 유즙당 360±15에서 678±8 mg을 생산하였다고 보고하고 있다(Zinovieva 등, 1998).

형질전환 동물에 의하여 재조합 단백질의 생산은 동물 생명공학에 있어서 중요한 하나의 목표로 알려져 있다(Houdebine, 2000; Houdebine, 2009). 유즙으로부터 재조합 단백질의 생산은 우유 단백질이 자연적으로 분비되기 때문에 많은 연구자들이 유즙으로부터의 재조합 단백질 생산을 위하여 형질전환 동물을 개발하고 있다(Houde-

* This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through Agri-Bio industry Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAF-RA) (No. 2016300060).

† Corresponding author : Phone: +82-62-530-2113, E-mail: mj kang@jnu.ac.kr

bine, 2009). 이러한 형질전환 동물의 안정적 발현을 위하여 최근에는 유전자 적중 방법에 의하여 동물을 생산하고자 하는 노력이 있다(McCreath 등, 2000; Liu 등, 2013; Liu 등, 2014).

유전자 적중방법은 상동유전자 재조합을 이용하여 외래 유전자로 변이된 유전자를 특정 유전자 위치에 삽입하여 내인성 유전자 발현을 억제하는 knock-out 방법과 유전체 상의 특정 위치에 외래유전자를 삽입하여 내인성 유전자의 유전자 발현 조절 염기서열을 이용하여 외래유전자를 발현시키는 knock-in 방법이 있다(Yáñez과 Porter, 1998; Müller, 1999; Clark 등, 2000). 가축에 있어서 유전자 적중에 의하여 재조합 단백질을 유즙으로부터 생산하고자 하는 연구는 2000년도에 McCreath 등에 의하여 양의 β -lactoglobine 프로모터를 사용하여 유전으로부터 인간 α 1-antitrypsin이 양의 α 1(I) procollagen (COL1A1) 위치에서 발현할 수 있는 복제양이 생산되었다는 보고가 최초로 알려지고 있다.

최근에는 유전자 가위인 Zinc Finger Nuclease (ZFN), Transcription activator-like effector nuclease (TALEN), Clustered regularly interspaed short palindromic repeats/Cas9 (CRISPR/Cas9)를 이용하여 보다 효과적으로 형질전환동물을 생산하고 있다(Gaj 등, 2013). 이러한 유전자 가위의 한 종류인 ZFN을 이용하여 소 β -casein 유전자 위치에서 *lysozaphin*이 발현되는 knock-in된 소를 생산되었으며(Liu 등, 2013), 또한 소 β -casein 유전자 위치에 사람 *lysozyme* 유전자가 knock-in된 소는 유방염에 저항성을 가지는 것으로 보고되고 있다. 2016년도에는 CRISPR/Cas9을 이용하여 소 β -casein 유전자 엑손 3위치에서(Liu 등, 2014) 사람 FGF2가 발현하는 벡터와 체세포가 개발된 것으로 보고되고 있다(Jeong 등, 2016). 그러나 소 β -casein 유전자의 exon 7 위치 β -casein 함께 외래 유전자가 발현할 수 있는 knock-in 벡터가 개발된 바는 없다.

따라서 본 연구에서는 젖소 β -casein 유전자의 exon 7 위치에서 소 IGF-1이 소 β -casein과 함께 발현할 수 있는 knock-in 벡터를 제작하였다.

재료 및 방법

RT-PCR에 의한 소 IGF-1 cDNA의 동정

RT-PCR에 이용할 total RNA는 젖소의 유선조직으로부터 QIAgen RNeasy Mini Kit(QIAgen, Germany)를 이용하여 정제하였다. 먼저 cDNA를 합성하기 위하여 정제된 Total RNA 5 μ g과 Random primer (Takara, Japan) 240 ng을 전체 12 μ L 멸균증류수에 포함되도록 0.2 mL PCR tube에 넣은 후 70°C에서 10분 배양하였다. 그 후 열을 위에서 5X First strand buffer 4 μ L, 0.1M dTT 2 μ L, 10 mM dNTP 1 μ L를 각 tube에 분주한 다음 25°C에서 10분 반응 후 42°C 2분 반응시킨 다음 Reverse Transcriptase Superscript II(Invitrogen, USA) 1 μ L(200 unit)를 넣은 후 42°C 50분, 55°C 30분 연속 반응시켰다.

반응 후 Ecoli RNase A (TaKaRa, Japan)를 1 μ L(2 unit)를 넣은 다음 37°C에서 20분 반응 시킨 후 사용 전까지 -20°C에 저장하였다. 소 IGF-1 cDNA를 동정하기 위하여 다음과 같이 합성된 cDNA를 이용하여 PCR를 수행하였다. PCR은 합성한 cDNA 2 μ L를 주형으로 사용하였고, *KpnI* 제한효소 site가 포함된 소 IGF-1 특이적 sense primer(GCGGTACCATGGGAAAATCAGCAGTCTTCCA A)와 *XbaI* 제한효소 site가 포함된 소 IGF-1 특이적 anti-sense primer(GCTCTAGACTACATTCTGTAGTTCTTGTTCCT)를 이용하였으며, Ex Taq DNA polymerase(TAKARA, Japan)를 이용하여 증폭하였다. PCR 조건은 Ex Taq DNA polymerase를 이용하여 denaturation 94°C 30초, annealing 58°C 30초, extension 72°C 1분을 1 cycle로 35 cycle을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 1% 아가로스 젤에서 전기영동을 통해 확인하였으며, 확인된 PCR 산물은 Gel Elution을 통해 정제한 후 Ligation mix (TAKARA, Japan)를 이용하여 pGEM T-easy 벡터(Promega Co, USA)에 클로닝하였다. 확보된 pGEM T-easy-*bIGF-1* 플라스미드는 DNA 염기서열을 결정한 후 Genetyx-win (version 4.0)을 사용하여 염기서열을 분석하였다.

Knock-in 벡터의 구축

기존에 보고된 DT-A_tEndo Knock-in 벡터 II (Kim 등, 2017)를 먼저 *NotI-SalI* 제한효소로 절단한 다음 pBSK(-)에 sub-cloning 하였다. 이렇게 확보된 pBSK(-)-tEndo Knock-in 벡터를 *EcoRI*과 *HindIII*로 절단하여 neo 저항성 유전자를 제거하고, EGFP를 marker로 사용하기 위하여 CMV-EGFP-PolyA/*EcoRI-HindIII* 단편을 sub-cloning 하여 pBSK(-)-m-b β CE5'-F2A-tEndo-polyA-EGFP-polyA-b β CE3' knock-in 벡터를 제작하였다. 최종 소 IGF-1이 삽입된 knock-in 벡터를 제작하기 위하여 pBSK(-)-m-b β CE5'-F2A-tEndo-polyA-EGFP-polyA-b β CE3' knock-in 벡터를 *KpnI*과 *XbaI* 제한효소로 절단하여 tEndo DNA 부분을 제거한 다음 소 IGF-1/*KpnI-XbaI* 단편을 ligation 하여 최종 pBSK(-)-m-b β CE5'-F2A-bIGF-1-polyA-EGFP-polyA-b β CE3' knock-in 벡터를 완성하였다. 최종 완성된 벡터는 염기서열 결정에 의하여 염기서열의 이상 여부를 확인하였으며 또한 *NotI*, *KpnI*, *EcoRI*, *HindIII*, *SalI* 제한효소로 절단하여 각 DNA 단편의 크기로 벡터 구축 여부를 확인하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 전신의 신체 성장을 자극하고, 신체의 거의 모든 세포의 성장 촉진 야기하는 소 IGF-1 유전자가 소 β -casein exon 7의 3' 말단에서 β -casein과 함께 발현할 수 있는 knock-in 벡터를 구축하였다.

본 연구에서 구축된 knock-in 벡터는 소 β -casein 유전자의 마지막 1개의 코돈(GTC)이 엑손 8에 존재하므로 knock-in 벡터의 5' arm 구축시 엑손 7의 마지막 부분에 GTC를 삽입하여 소 β -casein 유전자로부터 소 β -casein

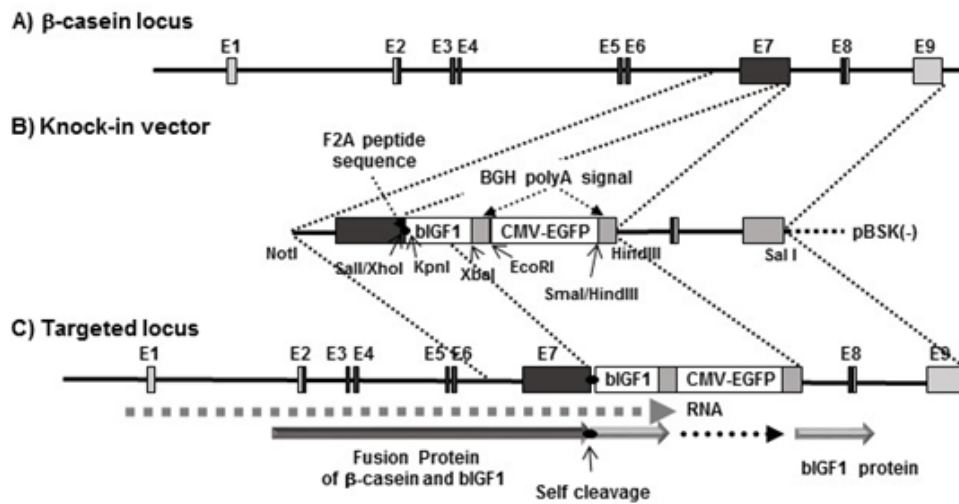


Fig. 1. Knock-in vectors and knock-in system for expression of *bIGF-1* gene on the bovine β -casein Exon 7 locus. A) Genome DNA structure of bovine β -casein gene locus. B) Knock-in vectors for expression of *bIGF-1* gene on the bovine β -casein locus. The knock-in vectors were consisted with 1.02 kb fragment as the 5' recombination arm and 1.81 kb fragment as the 3' recombination arm. C) Targeted structure of knock-in vector by homologous recombination. The *bIGF-1* transgene is expressed by β -casein gene regulatory DNA sequence and the mRNA is translated with β -casein by ribosome. The *bIGF-1* peptide is cleavage from β -casein using 2A self-cleavage system during the translation.

아미노산이 정상적으로 합성될 수 있도록 하였다(Fig. 1 과 2). 그리고 소 *IGF-1* 유전자는 단백질 합성 시 β -casein 으로부터 분리될 수 있도록 F2A 염기서열과 연결하여 5' arm의 뒤쪽에 연결되어 있으며 소 *IGF-1* 유전자는 BGH polyA 신호서열에 의하여 mRNA가 성숙할 수 있도록 BGH polyA 신호서열을 소 *IGF-1* 유전자 뒤쪽에 연결하여 knock-in 벡터를 완성하였다(Fig. 1). Figure 1에 제시한 바와 같이 이러한 벡터가 소 β -casein 유전자 위치에 knock-in되면 원래 소 β -casein 유전자 위치에 knock-in 벡터가 삽입되므로 소 β -casein 유전자의 프로모터와 인핸서를 포함한 유전자 조절 염기서열을 모두 이용하여 mRNA가 발현될 수 있다. 이렇게 mRNA가 합성되면 소 β -casein의 mRNA는 소포체에 결합된 리보솜에 의하여 아미노산이 합성되고, 아미노산 합성 중 2A site에서 펩타이드가 분리되어 뒤쪽에 있는 소 *IGF-1* 아미노산이 분리되면서 합성될 수 있으며, 또한 소 β -casein 아미노산과 2A 펩타이드와의 분리는 furin cleavage site(RKRR)에서 분리가 될 수 있도록 고안되어 있다(Fig. 1과 2). 이러한 knock-in 벡터는 염기서열 결정과 *NotI*, *KpnI*, *EcoRI*, *HindIII*, *Sall* 제한효소 절단에 의하여 각 DNA단편이 정상적으로 연결되어 있음을 확인하였다(Fig. 3).

2000년 McCreath 등은 양의 $\alpha 1$ procollagen 유전자 위치에서 Ovine β -lactoglobulin 프로모터에 의하여 사람 $\alpha 1$ -antitrypsin이 생산되는 양을 복제방법에 의하여 유전자 적중 동물을 가축에서 최초로 생산하였으며, 우유 1 mL 당 650 ug의 사람 $\alpha 1$ -antitrypsin이 생산된다고 보고하였다. 이러한 연구결과는 본 연구에서 소 β -casein 유전자의 내인성 유전자 조절염기서열을 이용하여 소 *IGF-1* 유전자를 발현하고자 하는 시스템과는 다소 다른 knock-in

방법을 이용하였다. 또한 Shen 등(2007)은 산양의 β -casein 유전자의 엑손 2에 있는 시작 코돈인 ATG 위치에 사람 tissue plasminogen activator mutant가 발현할 수 knock-in 벡터를 구축하였다고 보고하였으나, 본 연구에서는 엑손 7 뒤쪽에 외래유전자를 삽입할 수 있도록 벡터가 고안되어 Shen 등(2007)의 방법에 의하여 β -casein 유전자가 knock-out되는 것과는 다른 시스템을 적용하고 있다. 그리고 소에서는 β -casein 유전자의 인트론 2에서 lysostaphin 유전자와 사람 lysozyme 유전자가 발현될 수 있는 벡터가 개발되었으며, 이들 벡터를 이용하여 lysostaphin와 사람 lysozyme이 젖소의 유즙으로부터 발현하는 젖소가 생산되었다고 보고하고 있다(Liu 등, 2013; Liu 등, 2014). 이들 연구자는 외래 유전자의 발현을 인트론에서 유도하고 있으므로 스플라이싱 영향에 의하여 원래 내인성 β -casein 유전자만큼의 발현을 유도하지 못할 것으로 추측된다.

Jeong 등(2016)은 사람 FGF2가 소 β -casein 유전자 엑손 3위치에서 발현할 수 있는 벡터를 개발하고 보고하였으나, 이러한 벡터 구조도 내인성 소 β -casein 유전자를 knock-out시키고 외래 유전자인 사람 FGF2가 내인성 소 β -casein 유전자의 유전자 조절 염기서열에 의하여 발현될 수 있도록 고안되어 본 연구 결과의 벡터구조와는 다소 차이를 보이고 있다. 이러한 결과를 종합하여 보면 본 연구에서 개발된 knock-in 벡터는 내인성 소 β -casein 유전자를 knock-out 시키지 않으면서 소의 유용 단백질(소 *IGF-1*)을 생산하는데 적절한 벡터이고, 이들 벡터를 이용하여 유용단백질을 생산하는 knock-in 소 개발에 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

```

1  gagagccgacggcacttagcccaantctaaatcnaaatgaatttagaacttgaagccttgaagactcaagattaccacccttctaccaa
91  gaagttagcttagaagttggccattgttaagggaactccttgaattaaaaaacacataatgaacttagtcttcatataaacacaa
181 ataaacctcagactaaccttttaaagtctttttaaagtgaatctttctttgttatatgaaacagtttgcactatataccaaagtatgt
271 ccaccactctcagaccactcaagacagctgaataagctgttgaatctccaaacccctgatttgcacttgactctcgaatttcacctgt
361 aagaaagtggcttaattgagaaatcccttcaactgagcattttactcatcttagcttcaatgaccccaatttcttaaccacaaacaaatgga
451 attttcttctctctcttcaactgaattatgttttaaaagaggagataattcatcatgaataacaaatataaacctgcatatggaactca
541 agatttggcttcttcttcttcaagtagaactcagatataaattcaaccccttgcagacacagctcttagctctatcccttccctggcc
      D E L Q D K I H P F A Q T Q S L V Y P F P G 22
631 ccatccctaacagccctcccaaaaacatcccttcttcttcttcaaaccccttctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt
      P I P N S L P Q N I P P L T Q T P P V V V P P F L Q P E V M G 52
721 ctctcaaatgtagagacatgcttcaagcacaagaatgctcttccctaaataccagctgagcccttcttcaagcacaagcagcct
      V S K V K E A M A P K H K E M P F P K Y P V E P F T E S Q S 82
811 tgactctcactgactgttgaatactgcaacttcttctgcttcttcaagcacaagcagccttcttcaagcacaagcagccttcttcaagc
      L T L T D V E N L H L P L P L L Q S W M H Q P H Q P L P P T 112
901 tcgatgttcttcttcaagcagccttcttctgcttcttcaagcacaagcagccttcttcaagcacaagcagccttcttcaagcacaag
      V M F P P Q S V L S L S Q S K V L P V P Q K A V P Y P Q R D 142
991 tgccatcagcccttcttcttcaagcagccttcttcaagcacaagcagccttcttcaagcacaagcagccttcttcaagcacaagcag
      M P I Q A F L L Y Q E P V L G P V R G P F P I I V L E R K R 172
1081 ggctcttcttcaagcacaagcagccttcttcaagcacaagcagccttcttcaagcacaagcagccttcttcaagcacaagcagcctt
      R A P V K Q T L N F D L L K L A G D V E S N F A G P G T M G K 202
1171 tcaccagcttccaaaccaaattatttaagctgcttcttcaagcacaagcagccttcttcaagcacaagcagccttcttcaagcacaag
      I S S L P T Q L F K C C F C D F L K Q V K M P I T S S S H L 232
1261 tcatacttggcccttcttctgcttcttcaagcacaagcagccttcttcaagcacaagcagccttcttcaagcacaagcagccttctt
      F Y L A L C L L A F T S S A T A G P E T L C G A E L V D A L 262
1351 agttcttcttcaagcacaagcagccttcttcaagcacaagcagccttcttcaagcacaagcagccttcttcaagcacaagcagcctt
      Q F V C G D R G F Y F N K P T G Y G S S S R R A P Q T G I V 292
1441 atgactgcttcttcaagcacaagcagccttcttcaagcacaagcagccttcttcaagcacaagcagccttcttcaagcacaagcagc
      D E C C F R S C D L R R L E M Y C A P L K P A K S A R L 322
1531 ccagccacacacagcagccttcttcaagcacaagcagccttcttcaagcacaagcagccttcttcaagcacaagcagccttcttcaag
      A Q R H T D M P K A Q K E V H L K N T S R G S A G N K N Y R 352
1621 TGTAG
      M * 353
  
```

Fig. 2. Nucleotide and deduced amino acid sequence of β -casein gene fused bovine insulin-like growth factor 1. Nucleotide residues are numbered on the left and amino acids are numbered on the right. The *bIGF-1* cDNA were includes a 465 bp open reading frame encoding a protein of 155 amino acids (underlined amino acid). The underlined nucleotides were 5' homologous arm. Italics amino acids (*RKRK*) were indicated furine cleavage site. The arrow indicates a self-cleavage site in the 2A peptide during translation. The translation termination codon is indicated by asterisk.

인용문헌

1. Brem G, Hartl P, Besenfelder U, Wolf E, Zinovieva N, Pfaller R (1994): Expression of synthetic cDNA sequences encoding human insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in the mammary gland of transgenic rabbits. *Gene* 149:351-355.
2. Clark AJ, Burl S, Denning C, Dickinson P (2000): Gene targeting in livestock: a preview. *Transgenic Res* 9:263-275.
3. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd (2013): ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* 31:397-405.
4. Houdebine LM (2000): Transgenic animal bioreactors. *Transgenic Research* 9:305-320.

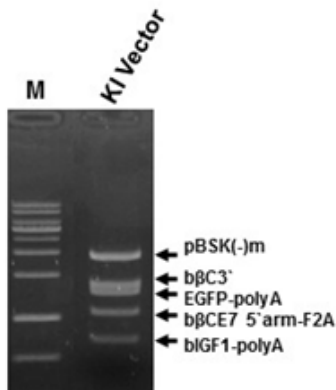


Fig. 3. Digestion analysis of knock-in vector by *NotI*, *Sall*, *EcoRI*, *HindIII* and *KpnI* restriction enzyme. M, size marker (1 kb ladder); KI vector, knock-in vector.

5. Houdebine LM (2009): Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 32:107-121.
6. Jeong YH, Kim YJ, Kim EY, Kim SE, Kim J, Park MJ, Lee HG, Park SP, Kang MJ (2015): Knock-in fibroblasts and transgenic blastocysts for expression of human FGF2 in the bovine β -casein gene locus using CRISPR/Cas9 nuclease-mediated homologous recombination. *Zygote* 24:442-456.
7. Kim SE, Park DS, Koo DB, Kang MJ (2017): Knock-in efficiency depending on homologous arm structure of the knock-in vector in the bovine fibroblasts. *Reprod Dev Biol* 41:7-16.
8. Liu X, Wang Y, Guo W, Chang B, Liu J, Guo Z, Quan F, Zhang Y (2013): Zinc-finger nickase-mediated insertion of the lysostaphin gene into the beta-casein locus in cloned cows. *Nat Commun* 4:2565.
9. Liu X, Wang Y, Tian Y, Yu Y, Gao M, Hu G, Su F, Pan S, Luo Y, Guo Z, Quan F, Zhang Y (2014): Generation of mastitis resistance in cows by targeting human lysozyme gene to β -casein locus using zinc-finger nucleases. *Proc R Soc B* 281:20133368
10. Müller U (1999): Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mech Dev* 82:3-21.
11. McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KHS, Colman A, Schnieke AE, Kind AJ (2000): Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* 29:1066-1069.
12. Shen W, Lan G, Yang X, Li L, Min L, Yang Z, Tian L, Wu X, Sun Y, Chen H, Tan J, Deng J, Pan Q (2007): Targeting the exogenous htPAm gene on goat somatic cell beta-casein locus for transgenic goat production. *Mol Reprod Dev* 74:428-434.
13. Yáñez RJ, Porter AC (1998): Therapeutic gene targeting. *Gene Ther* 5:149-159.
14. Yakar S, Rosen CJ, Beamer WG, Ackert-Bicknell CL, Wu Y, Liu JL, Ooi GT, Setser J, Frystyk J, Boisclair YR, LeRoith D (2002): Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest* 110:771-781.
15. Zinovieva N, Lassnig C, Schams D, Besenfelder U, Wolf E, Müller S, Frenyo L, Seregi J, Müller M, Brem G (1998): Stable production of human insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in the milk of hemi- and homozygous transgenic rabbits over several generations. *Transgenic Res* 7:437-447.

(Received: July 5 2017/ Revised August 29 2017/
Accepted August 29 2017)