

Original Article

돼지 유도만능줄기세포 유래 복제란의 특성 분석

권대진¹, 오재돈², 박미령³, 황인설³, 박응우³, 황성수^{3,*}

¹전북대학교 국제농업개발협력센터, ²전북대학교 동물생명과학과, ³농촌진흥청 국립축산과학원

Developmental Characteristics of Cloned Embryos Reconstructed with Induced Pluripotent Stem Cells in Pigs

Dae-Jin Kwon¹, Jae-Don Oh², Mi-Ryung Park³, In-Sul Hwang³, Eung Woo Park³ and Seongsoo Hwang^{3,*}

¹International Agricultural Development and Cooperation Center, Chonbuk National University, Jeonju 54896, Korea

²Department of Animal Biotechnology, Chonbuk National University, Jeonju 54896, Korea

³National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

Received September 11, 2019

Revised September 23, 2019

Accepted September 24, 2019

*Correspondence

Seongsoo Hwang

E-mail: hwangss@rda.go.kr

ORCID

<https://orcid.org/0000-0002-0512-7049>

ABSTRACT In general, cloned pigs have been produced using the somatic cell nuclear transfer (SCNT) technique with various types of somatic cells; however, the SCNT technique has disadvantages not only in its low efficiency but also in the development of abnormal clones. This study aimed to compare early embryonic development and quality of SCNT embryos with those of induced pluripotent stem cells (iPSCs) NT embryos (iPSC-NTs). Ear fibroblast cells were used as donor cells and iPSCs were generated from these cells by lentiviral transduction with human six factors (Oct4, Sox2, c-Myc, Nanog, Klf4 and Lin28). Blastocyst formation rate in iPSC-NT (23/258, 8.9%) was significantly lower than that in SCNT (46/175, 26.3%; $p < 0.05$). Total cell number in blastocysts was similar between two groups, but blastocysts in iPSC-NT had a lower number of apoptotic cells than in SCNT (2.0 ± 0.6 vs. 9.8 ± 2.9 , $p < 0.05$). Quantitative PCR data showed that apoptosis-related genes (*bax*, *caspase-3*, and *caspase-9*) were highly expressed in SCNT than iPSC-NT ($p < 0.05$). Although an early development rate was low in iPSC-NT, the quality of cloned embryos from porcine iPSC was higher than that of embryos from somatic cells. Therefore, porcine iPSCs could be used as a preferable cell source to create a clone or transgenic animals by using the NT technique.

Keywords: apoptosis, cloning efficiency, *in vitro* development, porcine induced pluripotent stem cells, somatic cell nuclear transfer

서론

체세포 핵이식 기술(somatic cell nuclear transfer; SCNT)은 유용 물질을 생산하거나 장기이식을 위한 형질전환 동물을 생산하기 위한 효과적인 방법으로 다양한 종류의 형질전환 동물의 생산에 이용되고 있다(Lai 등, 2002; Lutz 등, 2013; Kwon 등, 2017a). 하지만 체세포 복제동물 생산 효율은 일반적으로 1-3% 내외로 매우 낮은 것으로 알려져 있으며(Van Thuan 등, 2010), 체세포복제 효율은 공여세포의 종류, 체외배양 기술 및 핵이식 방법 등 다양한 요인들에 의해 기인되는 공여세포와 수핵란 세포질간의 불완전한 상호작용에 의한 것으로 여겨지고 있다(Narbonne와 Gurdon, 2012). 최초의 체세포 핵이식 복제동물인 복제양 Dolly의 경우 초기 노화가 진행되었으며, 비정상적으로 짧은 telomere가 그 원인으로 보고되었다(Shiels 등, 1999). 노화된 세포를 공여세포로 이용하였다 할지라도 정상적인 telomere를 갖는 복제산자를 생산할 수 있는 것으로 밝혀져, 거의 모든 세포를 핵이식 공여세포로 활용할 수 있으나(Cibelli 등, 1998; Tian 등, 2000), 보다 근본적으로 공여세포의 생물학적/유전적 특성에 따라 이식된 핵의 리프로그래밍과 이후 핵이식 복제 효율이 크게 좌우될 수 있는 것으로 보인다.

돼지는 사람과 유전적, 생리학적으로 가장 유사한 동물로 사람의 질병 및 장기이식을 위한 모델동물로 다양한 연구가 진행되고 있다(Rogers 등, 2008; Yan 등, 2018). 배아줄기세포(embryonic stem cell, ESC)는 이러한 연구를 위한 최적의 세포라 할 수 있으나, 돼지에서는 아직까지 ESC가 확립되지 않았다. 따라서 분화된 체세포를 미분화 상태로 리프로그래밍 시킬 수 있는 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC) 유도 기술을 활용한 다양한 연구가 이루어지고 있다(Esteban 등, 2009; Wu 등, 2009). 한편으로 착상 전 체세포 핵이식란의 경우 비정상적인 DNA methylation, histone modification, X chromosome inactivation과 같은 후생적 변화의 문제로 인해 생산 효율이 낮아지는 것으로 알려져 있으므로(Matoba 등, 2014), ESC이나 iPSC의 경우 체세포보다 미분화되어 있으므로 핵의 리프로그래밍이 보다 정상적으로 이루어질 것으로 여겨지고 있다. 소 체세포 핵이식에 있어서 Cibelli 등(2000)이 10.7%의 높은 효율을 보고한 바 있으며, Saito 등(2003)은 ES-like cell 유래 핵이식란을 이식하여 30% 이상의 산자율을 얻어 미분화 상태의 세포가 리프로그래밍에 더 적합한 것으로 보고하였다. 하지만 돼지의 경우 iPSC를 이용한 핵이식에서 체세포를 이용하였을 경우보다 체외 발육율은 더 낮을 뿐만 아니라 산자 생산도 더 어려운 것으로 보고되고 있다(Zhou 등, 2010; Fan 등, 2013; Yu 등, 2018).

본 연구에서는 돼지 체세포 및 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell; iPSC)를 이용하여 핵이식 복제란의 생산 효율을 검토하고, 생산된 배반포의 apoptosis와 전능성 인자의 유전자 발현을 조사하여 공여세포로서의 iPSC와 핵이식란의 질적 특성과의 연관성을 검토하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

난자 및 공여세포의 준비

난소는 도축장으로부터 회수하여 36°C 조건으로 운반하였다. 세척액, Tyrode's lactate-Hepes containing 0.1% (w/v) polyvinyl alcohol (PVA)으로 처치 후 난구세포-난자복합체(cumulus-oocyte-complexes, COCs)를 선별하였다. 선별 후 체외성숙 배양액(10% fetal bovine serum (FBS), 0.1% PVA, 3.05 mM D-glucose, 0.91 mM sodium pyruvate, 0.57 mM cysteine, 0.5 µg/mL LH, 0.5 µg/mL FSH, 10 ng/mL EGF, 75 µg/mL penicillin G, and 50 µg/mL streptomycin가 첨가된 TCM-199 (Gibco-BRL))으로 세척 후 체외성숙에 공시하였다.

돼지 체세포 및 iPSC는 이전 연구에서 생산된 세포를 이용하였다(Kwon 등, 2013). 돼지 체세포는 국립축산과학원의 MGH (Massachusetts General Hospital) 미니돼지의 귀조직 일부를 회수하여 분리 및 배양하였다. 회수한 귀조직은 잘게 잘라 0.05% trypsin과 0.02 mM EDTA가 함유된 PBS 액으로 39°C 조건으로 30분간 배양하였다. 1,200 rpm으로 5분간 원심분리하여 세포를 회수하였으며, 이후 세포배양액(15% FBS와 75 µg/mL antibiotics가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco-BRL))으로 38.7°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 3회 계대배양 후 CELLBANKER®1 동결액으로 동결 보존하였으며 일부는 iPSC 생산에 이용하였다.

iPSC의 생산은 Lentiviral transduction은 viPS Vector Kit (Thermo Fisher Scientific)을 이용하였으며, 제조사의 방법에 준하여 실시하였다. 돼지 귀세포는 1.5 × 10⁴ cells/cm² 농도로 4-well culture dish에서 24시간동안 배양하였으며, 리프로그래밍을 유도하기 위하여 lentiviral vectors (POU5F1, NANOG, SOX2, C-MYC, KLF4, and LIN28)를 첨가하였다. 이후 24시간째에 세포를 회수하고 줄기세포 배양액(DMEM/F12, 10% Knockout Serum Replacement (KSR; Invitrogen), 10% FBS (Invitrogen), 50 units/mL penicillin (GIBCO), 50 µg/mL streptomycin (GIBCO), 2 mM L-glutamine (GIBCO), 0.1 mM nonessential amino acids (NEAAs, GIBCO), 1 µM β-mercaptoethanol, 20 ng/mL basic fibroblast growth factor-2 (bFGF; R&D Systems), 20 ng/mL leukemia inhibitory factor (LIF; Sigma))을 이용하여 mitomycin C가 처리된 mouse embryonic fibroblasts (iMEFs)로 옮겨 배양하였다. 배양 18-21일차에 형성된 콜로니를 회수하여 같은 조건으로 계대배양 하였다. Feeder free 조건에서 배양하기 위하여 0.05% trypsin과 0.02 mM EDTA가 함유된 PBS 액으로 세포를 분리한 후 growth-factor-reduced Matrigel (diluted 1 : 100 in DMEM/F12; BD Biosciences)이 코팅된 dish로 옮겨 배양하였다.

핵이식란의 생산

체외에서 성숙시킨 난포란을 1 mL의 TCM 199액이 들어있는 원심관에 옮겨 vortex mixer로 3분간 처리하여 난구세포를 제거한 후, 세포질의 색조가 균일하고 제1극체가 확인된 난자만을 수핵란용으로 사용하였다. 미수정란의 염색체 제거는 10 µg/mL Hoechst 33342 및 5 µg/mL cytochalasin B (CB)가 함유된 PBS (modified phosphate buffered saline; mPBS)액 내에서 염색체의 유무를 확인하여 탈핵하였다. Donor세포는 injection pipette으로 흡입하여 탈핵을 실시한 구멍을 통하여 탈핵란 세포질의 위관강내로 주입하였다.

핵이식란의 전기융합은 BTX 2001 Electro Cell Manipulator (BTX) 및 1.0 mm폭의 wire chamber를 사용하여 전기융합을 실시하였다. 핵이식란은 0.1 mM MgSO₄, 0.05 mM CaCl₂, 0.05 mg/mL BSA를 첨가한 0.3 M mannitol 액을 이용하였으며, 1.5 kV/cm의 직류(DC)전류를 30 µsec 간 2회 통전하였다. 융합란은 PZM-3액을 이용하여 38.7°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 배양 후 2일차에 분할율을 검토하였으며 6일차에 배반포율을 검토하였다.

Apoptosis 분석(TUNEL assay)

배양 6일차 배반포는 PBS/PVP (0.1% polyvinylpyrrolidone)으로 세척 후 4% paraformaldehyde 액으로 4°C에서 24시간동안 고정하였다. 0.5% Triton X-100으로 permeabilization 후 *in situ* cell death detection kit (TMR red, Roche)으로 39°C 조건에서 1시간동안 반응시켜 apoptotic cell을 염색하였다. 이후 10 µg/mL Hoechst 33342가 함유된 Prolong antifade Kit (Molecular Probes)을 이용하여 슬라이드에 고정하였다. Apoptotic cell은 epifluorescent microscope (Nikon) 하에서 검사하였다.

Embryonic quality 분석

배양 6일차에 생성된 배반포에 대하여 FastLane Cell cDNA Kit (Qiagen, Valencia, USA)을 이용하여 cDNA를 제공된 방법에 따라 준비하였다. Real-Time RT-PCR은 Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (Qiagen, USA) 및 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies, USA)를 이용하여 분석하였다. 분석에 사용된 primer는 Table 1에 제시하였다. Real-Time RT-PCR의 증폭조건은 95°C에서 1분간 pre-incubation 과정을 거친 후 95도에서 15초 동안 denaturation 후 60°C에서 1분간 annealing의 과정을 40회 반복하도록 조작하였다. 각 유전자에 대한 발현량은 2^{ΔΔCT} 방법을 이용하여 비교하였다.

통계분석

모든 처리에 대한 실험은 3회 이상 반복 실시하였으며, 세포수를 제외한 모든 결과에 대해 Statistical Analysis System (SAS Institute, Inc., USA)의 General Linear Models 절차를 이용한 Duncan's multiple range test로 유의성을 검토하였다. 세포수는 t-test를 이용하여 유의성을 검토하였다. 유의차는 *p* < 0.05 일 때 통계적 차이가 있는 것으로 판단하였다.

결 과

돼지 iPSC 배양

돼지 iPSC은 Kwon 등(2013)에 의해 생산된 세포를 이용하였다(Kwon 등, 2013). LIF에 의존적이며, 둌 형태의 콜로니를 형성하고, 지지세포가 없이 matrigel이 코팅된 배양접시에서 배양 시에도 AP가 강하게 발현되는 특징을 가지고 있다(Fig. 1). 또한 면역형광 염색방법을 이용하여 줄기세포 인자의 발현을 검토한 결과, Oct4와 Nanog가 강하게 발현되었다. 핵이식 공여세포로 이용하기 위하여 trypsin-EDTA가 함유된 PBS액으로 처리하였을

Table 1. Primer sets for real time RT-PCR

Gene	Primer sequences (5' to 3')	Product size (bps)	References
<i>Oct4</i>	F-AGCGCTTCAGAAAGATCTCG R-GAGCTGCAAAGCCTCAAAC	157	NM_001113060.1
<i>Dnmt3b</i>	F-CCTACCTCACCATCGACCTC R-CCTGATACTCTGAGCTGTCTGC	158	DQ000310.1
<i>Caspase-3</i>	F-GCCATGGTGAAGAAGGAAAA R-GTCCGTCTCAATCCCACAGT	179	AM410991.1
<i>Caspase-9</i>	F-AACCTGACTGCCAAGCAAAT R-ATAAACAGCCCCTGGGAACT	182	AY785158.1
<i>Bax</i>	F-CCTTTTGCTTCAGGGTTTCA R-ATCCTCTGCAGCTCCATGTT	165	XM_003127290.2
<i>Bcl-XL</i>	F-CTGAATCAGAAGCGGAAACC R-CCTCCGGTACCTCAGTTCAA	188	AF216205.1
<i>Gapdh</i>	F-CTGCGCTCTCTGCTCCTC R-ACAATGTCCACTTTGCCAGA	161	NM_001206359.1

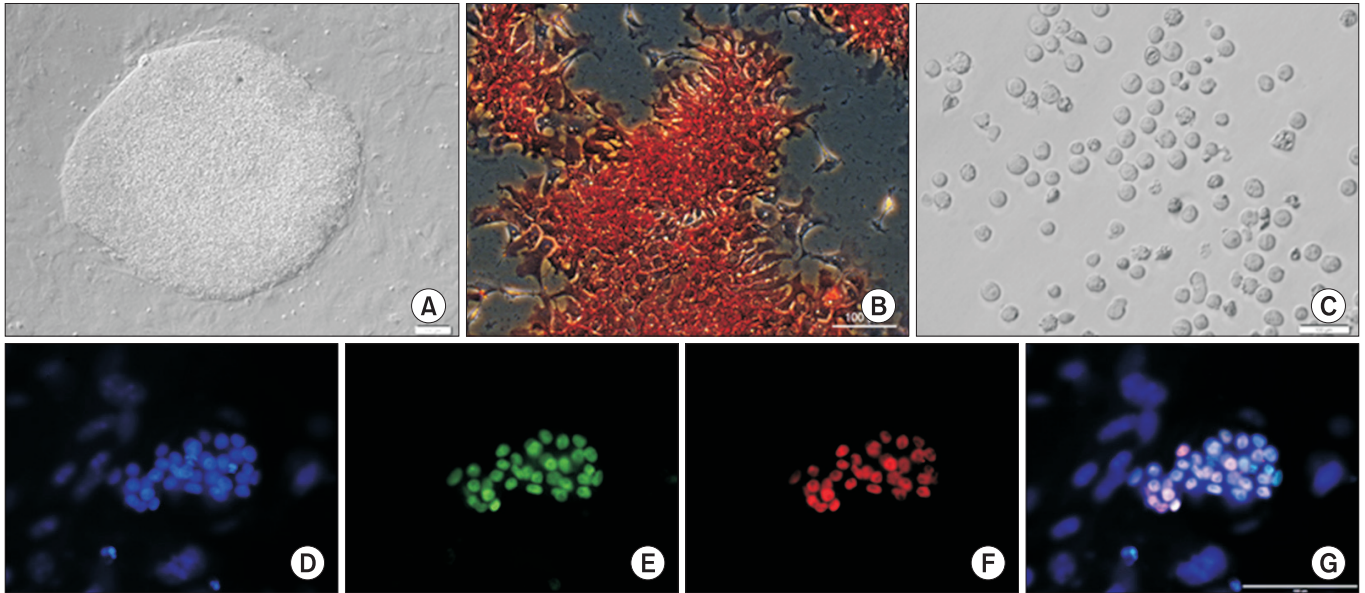


Fig. 1. Morphologies and pluripotent related gene expressions of porcine iPSCs. Colony morphology and alkaline phosphatase expression of porcine iPSCs on feeder (A) and matrigel coated plate (B). Porcine iPSCs were treated with trypsin-EDTA (C). Porcine iPSCs were positive for Oct4 (E) and Nanog (F) antibodies (D: DAPI, G: merged). Scale bars indicate 100 μ m.

Table 2. Development of nuclear transferred embryos with somatic cells or iPSCs in pigs

Donor cells	No. of NTs	Number of embryos (%)				Cell No. in blastocysts (\pm SEM)
		2-cell	Fragment	> 4-cell	Blastocyst	
SCNT	175	144 (82.3)	21 (12.0)	87 (49.7)	39 (26.3) ^a	32.3 \pm 8.8
iPSC-NT	258	193 (74.8)	28 (10.9)	119 (46.19)	23 (8.9) ^b	30.2 \pm 2.9

^{a,b}Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

경우 단일세포로 쉽게 분리가 되었으며, 핵/세포질 비율이 높게 나타났으며, 실제현미경 하에서 쉽게 interphase 핵의 형태를 확인할 수 있었다(Fig. 1).

체세포 및 iPSC 핵이식

귀 체세포 및 iPSC를 공여세포로 이용하여 핵이식을 실시하였으며 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 미세조작에 있어서 iPSC 이 체세포 보다 더 민감한 것으로 보이나 융합율에 있어서는 두 구간에 차이가 없었다(미제시). 2-cell 난할율은 SCNT의 경우 70.8% (108/153), iPSC-NT의 경우 66.8% (125/187)로 체세포가 다소 높은 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. Fragment의 경우에도 13.1% vs 12.3%로 두 구간에 차이는 없었다. 배반포 발육에 있어서는 SCNT 구가 25.5% (39/153)로 iPSC-NT의 5.9% (11/187)보다 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). 하지만 배양 6일차 생산된 배반포에서의 세포수는 SCNT 구가 33.5 ± 7.9 , iPSC-NT 구가 30.2 ± 2.9 로 차이가 없었다.

생산된 배반포의 apoptosis를 검토한 결과, SCNT 구 유래 배반포의 경우 9.8 ± 2.9 로 나타났으며, iPSC-NT 구의 경우에

는 2.0 ± 0.6 으로 나타나 유의적으로 apoptosis가 낮게 나타났다(Fig. 2, $p < 0.05$).

배반포에서 유전자 발현 양상

두 처리구로부터 생산된 배반포에서 줄기세포 관련인자인 *Oct4*, 리프로그래밍 관련 인자로는 *Dnmt3b*, apoptosis 연관인자인 *Bax*, *Bcl-xl*, *Caspase-3*와 *Caspase-9*의 mRNA 발현을 검토하였다(Fig. 3). *Oct4* 및 *Dnmt3b*의 경우 iPSC-NT 유래 배반포에서 유의적으로 높게 발현되었다($p < 0.05$). *Bax*의 경우 두 구간에 유의적 차이는 없었으며, *Bcl-xl*의 경우 iPSC-NT 구에서 높게 발현되었다($p < 0.05$). *Caspase-3*와 *Caspase-9*의 mRNA 발현 또한 SCNT 구에서 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$).

고 찰

질환모델 동물을 이용하여 사람의 조혈작용, 면역조절, 감염질환, 암 및 재생의학 부분 등 광범위하게 연구되고 있다(Shultz 등, 2007). 대부분의 연구는 마우스를 이용하여 진행되어 왔으나, 마

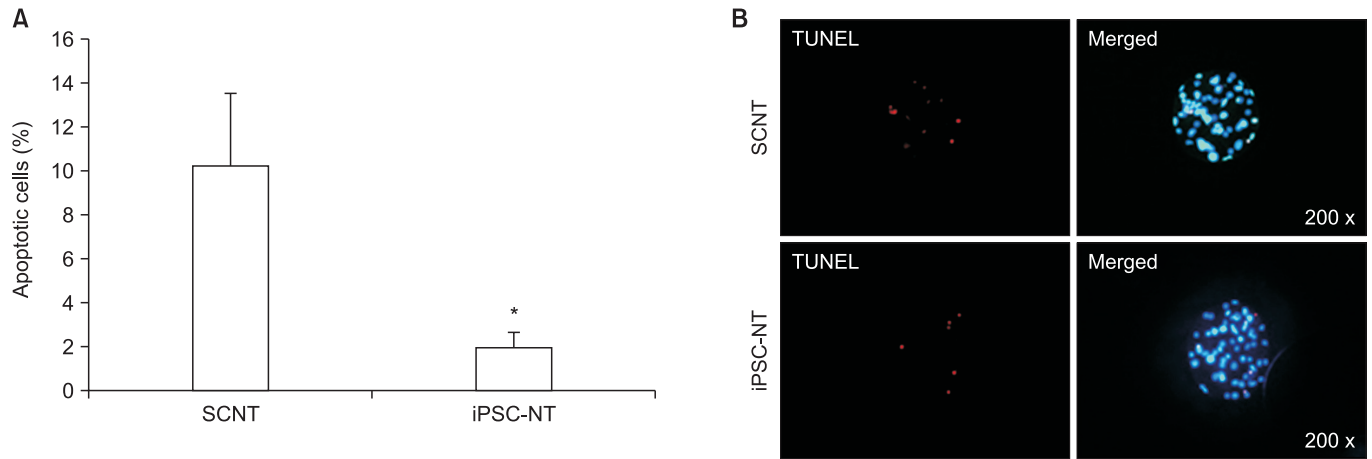


Fig. 2. Apoptotic cells index (A) and TUNEL positive cells (B) in SCNT and iPSC-NT embryos. Apoptotic cells in blastocysts were analyzed using TUNEL kit and DNA was stained with DAPI. (*) means significantly different ($p < 0.05$), error bars represent standard error of the mean (\pm SEM). (B) x 200 magnification.

우스로부터 확립된 많은 결과들을 사람에게 적용하기에 적합하지 않은 것으로 알려져 있다(Hunter, 2012). 이와 관련하여 돼지는 생리학적, 해부학적, 유전적으로 사람과 가장 가까운 동물로 질병에 관한 연구동물로 활용하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 최근 다양한 방법을 이용한 돼지 iPSC이 생산되고 있으며, 6-factor를 이용하여 iPSC을 생산하였을 경우 4-factor를 이용한 경우보다 chimera 생산 효율이 높은 것으로 보고되었다(West 등, 2011; Fujishiro 등, 2012). 본 연구에서는 6-factor를 이용하여 생산된 iPSC을 핵이식에 이용하였다. 본 연구에서 이용한 iPSC은 LIF에 의존적이며, 마우스 줄기세포와 유사한 형태로 배양이 가능하였다. 또한 60회 이상 계대배양 하여도 줄기세포의 특성을 유지하고 있었으며, 이후 3-germ layer로 분화될 수 있는 테라토마 형성도 가능하였다. 돼지 iPSC의 세포주기를 분석한 결과 G0/G1, S, G2/M기 분포는 각각 37.5 ± 0.2 , 34.0 ± 0.6 , 28.5 ± 0.4 로 나타났다(Kwon 등, 2017b). 이러한 특성을 가지고 있는 돼지 iPSC를 핵이식 공여세포로 이용하였을 경우 배반포 발육 및 초기배의 특성을 분석하였다.

마우스의 경우 ESC이 MEF 보다 핵이식 공여세포로서 더 효율적이며, MEF 세포를 iPSC로 유도 후 핵이식에 이용할 경우 ESC과 같이 높은 효율을 얻을 수 있다(Zhou 등, 2010). 하지만 본 연구에서 돼지 iPSC을 핵이식 공여세포로 사용한 결과 배반포 발육율이 분화된 체세포를 공여세포로 사용하였을 때 보다 현저히 저하되었다. Fan 등(2013)은 일반적으로 사용하고 있는 핵이식 기술을 이용하여 생산한 11,923개의 돼지 iPSC-NT 복제란을 71두의 대리모에 이식하여 그 중 25%에서 임신을 확인하였으나 산자는 얻지 못하였다. 하지만 핵이식 전 iPSC에 histone acetylation 유도제를 처리하여 배반포 발육율이 향상됨을 확인하였으며, transgene의 발현을 제어하기 위하여 Dox system을 이용하여 iPSC을 생산하고 분화를 유도한 후 핵이식 공여세포로 사용하여 iPSC-NT 산자를 얻을 수 있었다. 따라서 공여세포의 epigenetic

상태와 리프로그래밍을 위한 transgene의 발현여부가 핵이식 성공에 크게 영향을 하는 것으로 사료된다. 본 연구 결과 분할율은 차이가 없었으나 이후 배반포 발육율이 현저히 떨어졌다. 이는 본 연구에 사용된 iPSC의 경우 리프로그래밍 인자들이 계놈에 integration되는 형태로서 이식된 iPSC에 silencing 되지 않은 리프로그래밍 인자에 의해 핵이식 난자 내에서 리프로그래밍이 정상적으로 이루어지지 않았을 것으로 사료된다. 하지만 iPSC-NT 복제란의 경우 SCNT란에 비해 유의적으로 낮게 apoptosis가 발생하여 이와 관련된 유전자의 발현을 분석하였다.

Apoptosis는 caspase family 및 이들에 의해 조절되는 Bcl-2 family과 밀접하게 연관되어 있으며, 초기배 발달과정에서 부적절한 배양조건이나 다양한 요인들에 의해 발생한다(Betts와 King, 2001). 또한 비정상적인 염색체 구성이나 발육상태를 보이는 수정란에 대하여 조기에 사멸시켜 정상적인 산자의 생산을 보호하는 것으로 알려져 있다(Hardy, 1997). Apoptosis에 의해 발생된 손상된 DNA는 TUNEL assay를 통하여 확인할 수 있으며, Caspase-3의 경우, 형태적으로 TUNEL에 반응된 apoptosis로 판단되는 핵에서 강하게 발현된다(Gjorret 등, 2007). 따라서 TUNEL assay를 통한 apoptosis 분석자료는 초기배를 질적으로 판단할 수 있는 중요한 기준으로 활용될 수 있다. 본 연구에서 iPSC-NT 복제란의 경우 Caspase-3 및 Caspase-9과 이들에 의해 조절되는 Bcl-xL의 유전자 발현이 SCNT란에 비해 높게 나타났다. 이전 연구에서 형태적으로 우수한 grade I 난자의 경우 grade IV 난자에서 보다 Bax 발현이 낮게 나타났으며, Bcl-2 발현이 Bax 보다 높게 나타난 반면, grade IV 난자의 경우 Bcl-2 발현이 Bax 보다 낮게 나타나 Bcl/Bax 비율에 따라 apoptosis가 조절되는 것으로 보고하였다(Yang과 Rajamahendran, 2002). 따라서 생산된 배반포의 경우 iPSC-NT 복제란이 SCNT란보다 질적으로 우수한 것으로 여겨진다.

초기배 발육과 연관된 유전자인 Oct4와 Dnmt3b의 발현을 검

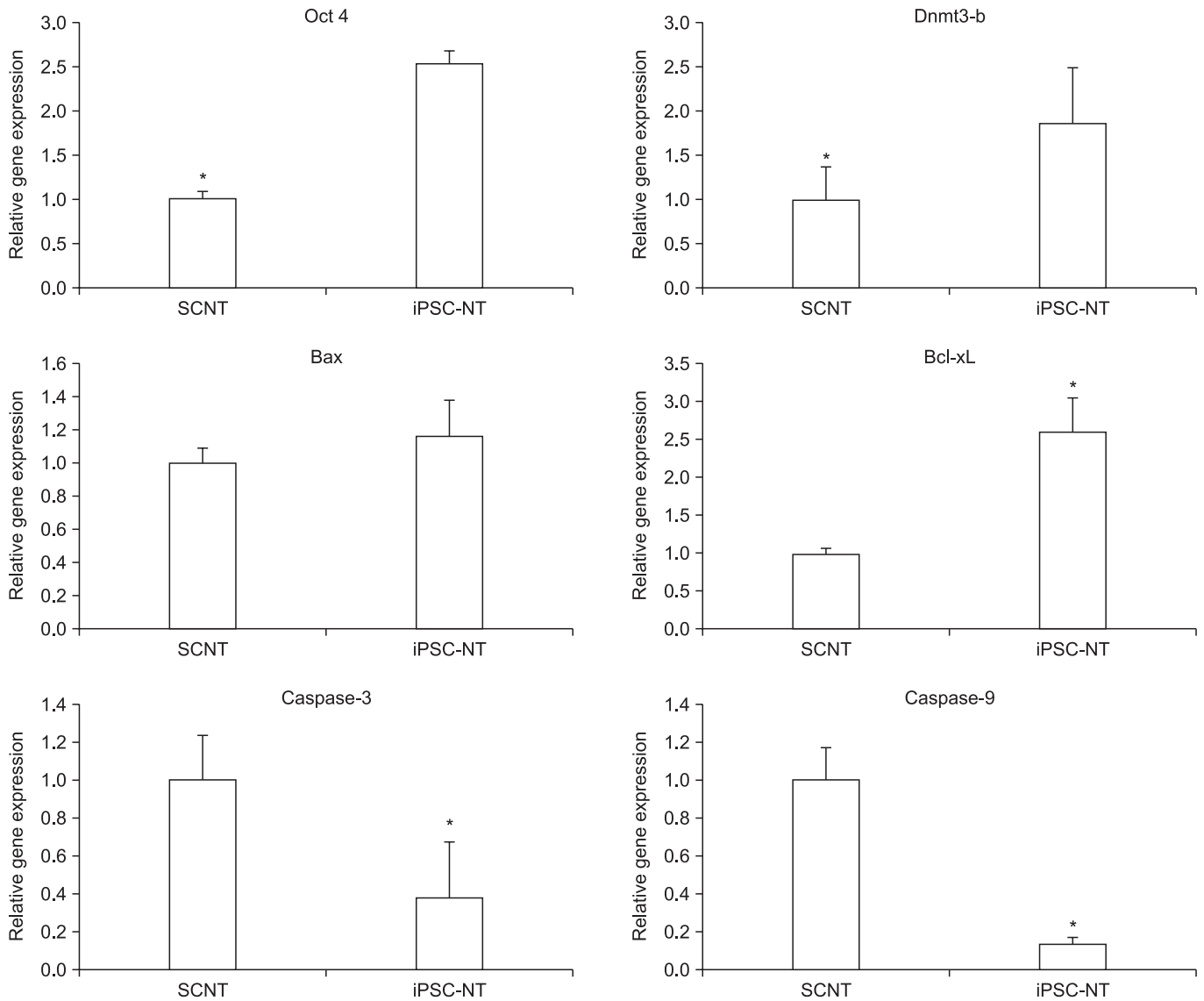


Fig. 3. mRNA expression were analyzed in SCNT and iPSC-NT embryos by real time PCR. (*) means significantly different ($p < 0.05$), error bars represent standard error of the mean (\pm SEM).

또한 결과 *Oct4*와 *Dnmt3b* 모두 iPSC-NT 유래 배반포에서 높게 발현되었다. 전능성 관련 인자의 발현은 초기배의 리프로그래밍에 있어서 중요한 역할을 가지고 있으며, 배 발달 과정에서 크게 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Eckardt와 McLaughlin, 2004). 복제란의 경우 전능성 관련인자들의 발현은 체내 발생란보다 낮은 것으로 보고되고 있어 초기배를 질적으로 판단할 수 있는 지표로 이용하고 있다(Jeong 등, 2013).

또한 *Dnmt3a*와 *Dnmt3b*는 초기 착상배아에 새로운 methylation을 구성하는데 중요한 역할을 가지고 있으며, 비활성 되었을 경우 초기배 발육에 치명적인 것으로 알려져 있다(Okano 등, 1999). SCNT보다 iPSC-NT 유래 배반포의 질적 수준이 높으므로 사료되나, 돼지에서 iPSC-NT 유래 산자 생산율은 SCNT보

다 낮아 착상 후 발생과 관련된 유전자 발현이 비정상적으로 발생하는 것으로 보고되고 있으므로 초기배 뿐만 아니라 착상 후 발생에 관련된 인자들의 리프로그래밍에 대하여 다양한 연구가 요구된다(Yu 등, 2018).

결론

본 연구에서 돼지 iPSC를 생산하고 이를 이용하여 핵이식 복제란의 생산 효율을 검토하였다. 배반포 발육율에 있어서 iPSC-NT (23/258, 8.9%)가 SCNT (46/175, 26.3%; $p < 0.05$)보다 낮게 나타났다. 두 처리 모두에서 생산된 배반포의 세포수는 차이가 없었으나, SCNT 유래 배반포에서 iPSC-NT 유래 배반포에

비해 apoptosis가 높게 나타났다(2.0 ± 0.6 vs. 9.8 ± 2.9 , $p < 0.05$). 또한 apoptosis 관련 유전자 중 *Bcl-xL*은 SCNT 유래 배반포에서 낮게 발현된 반면, *Caspase-3*, *Caspase-9*은 높게 발현되었다. 전능성 인자(Oct-4)의 유전자 발현의 경우 iPSC-NT 유래 배반포에서 높게 나타났다. 결과적으로 iPSC-NT 핵이식란의 경우 초기 발육율은 낮으나 생산된 배반포는 질적으로 우수한 것으로 나타나 iPSC를 핵이식 공여세포로서 다양하게 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

CONFLICTS OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

ACKNOWLEDGEMENTS

본 연구는 한국학술진흥재단 기초연구사업(NRF-2017R1D-1A1B03029465), 농촌진흥청 차세대 바이오그린 21 프로그램(PJ01315101), 농촌진흥청 축산시험연구(PJ01319002)의 지원을 받아 수행되었다.

ORCID

Dae-Jin Kwon: <https://orcid.org/0000-0002-9512-2283>
 Jae-Don Oh: <https://orcid.org/0000-0001-7756-1330>
 Mi-Ryung Park: <https://orcid.org/0000-0001-5452-5281>
 In-Sul Hwang: <https://orcid.org/0000-0003-2949-3075>
 Eung Woo Park: <https://orcid.org/0000-0002-8773-2452>
 Seongsoo Hwang: <https://orcid.org/0000-0002-0512-7049>

REFERENCES

- Betts D, King W. 2001. Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology*. 55:171-191.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de León FA, Robl JM. 1998. Cloned Transgenic Calves Produced from Nonquiescent Fetal Fibroblasts. *Science* 280:1256-1258.
- Eckardt S, McLaughlin KJ. 2004. Interpretation of reprogramming to predict the success of somatic cell cloning. *Animal Reproduction Science*. 82:97-108.
- Esteban MA, Xu J, Yang J, Peng M, Qin D, Li W, Jiang Z, Chen J, Deng K, Zhong M. 2009. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig. *Journal of Biological Chemistry*. 284:17634-17640.
- Fan N, Chen J, Shang Z, Dou H, Ji G, Zou Q, Wu L, He L, Wang F, Liu K. 2013. Piglets cloned from induced pluripotent stem cells. *Cell Research*. 23:162.
- Fujishiro S-h, Nakano K, Mizukami Y, Azami T, Arai Y, Matsunari H, Ishino R, Nishimura T, Watanabe M, Abe T. 2012. Generation of naive-like porcine-induced pluripotent stem cells capable of contributing to embryonic and fetal development. *Stem Cells and Development*. 22:473-482.
- Gjorret JO, Fabian D, Avery B, Maddox-Hyttel P. 2007. Active caspase-3 and ultrastructural evidence of apoptosis in spontaneous and induced cell death in bovine in vitro produced pre-implantation embryos. *Molecular Reproduction and Development*. 74:961-971.
- Hardy K. 1997. Cell death in the mammalian blastocyst. *Molecular Human Reproduction*. 3:919-925.
- Hunter KW. 2012. Mouse models of cancer: does the strain matter? *Nat Rev Cancer*. 12:144-149.
- Jeong YI, Park CH, Kim HS, Jeong YW, Lee JY, Park SW, Lee SY, Hyun SH, Kim YW, Shin T, et al. 2013. Effects of Trichostatin A on In vitro Development of Porcine Embryos Derived from Somatic Cell Nuclear Transfer. *Asian-Australas J Anim Sci*. 26:1680-1688.
- Kwon D-J, Kim D-H, Hwang I-S, Kim D-E, Kim H-J, Kim J-S, Lee K, Im G-S, Lee J-W, Hwang S. 2017a. Generation of α -1,3-galactosyltransferase knocked-out transgenic cloned pigs with knocked-in five human genes. *Transgenic Research*. 26:153-163.
- Kwon DJ, Hwang IS, Kwak TU, Yang H, Park MR, Ock SA, Oh KB, Woo JS, Im GS, Hwang S. 2017b. Effects of Cell Cycle Regulators on the Cell Cycle Synchronization of Porcine induced Pluripotent Stem Cells. *Dev Reprod*. 21:47-54.
- Kwon DJ, Jeon H, Oh KB, Ock SA, Im GS, Lee SS, Im SK, Lee JW, Oh SJ, Park JK, et al. 2013. Generation of leukemia inhibitory factor-dependent induced pluripotent stem cells from the Massachusetts General Hospital miniature pig. *Biomed Res Int*. 2013:140639.
- Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, et al. 2002. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*. 295:1089-1092.
- Lutz AJ, Li P, Estrada JL, Sidner RA, Chihara RK, Downey SM, Burlak C, Wang ZY, Reyes LM, Ivary B, et al. 2013. Double knockout pigs deficient in N-glycolylneuraminic acid and galactose alpha-1,3-galactose reduce the humoral barrier to xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 20:27-35.
- Matoba S, Liu Y, Lu F, Iwabuchi KA, Shen L, Inoue A, Zhang Y. 2014. Embryonic development following somatic cell nuclear transfer impeded by persisting histone methylation. *Cell*. 159:884-895.
- Narbonne P, Gurdon JB. 2012. Amphibian interorder nuclear transfer embryos reveal conserved embryonic gene transcription, but deficient DNA replication or chromosome segregation. *The International Journal of Developmental Biology*. 56:975.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 99:247-257.
- Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, Ostedgaard LS, Rokhlina T, Taft PJ, Rogan MP, Pezzulo AA, Karp PH, Itani OA. 2008. Dis-

- ruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science*. 321:1837-1841.
- Saito S, Sawai K, Ugai H, Moriyasu S, Minamihashi A, Yamamoto Y, Hirayama H, Kageyama S, Pan J, Murata T. 2003. Generation of cloned calves and transgenic chimeric embryos from bovine embryonic stem-like cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 309:104-113.
- Shiels PG, Kind AJ, Campbell KH, Waddington D, Wilmut I, Colman A, Schnieke AE. 1999. Analysis of telomere lengths in cloned sheep. *Nature*. 399:316.
- Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. 2007. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol*. 7:118-130.
- Tian XC, Xu J, Yang X. 2000. Normal telomere lengths found in cloned cattle. *Nature Genetics*. 26:272-273.
- Van Thuan N, Kishigami S, Wakayama T. 2010. How to improve the success rate of mouse cloning technology. *Journal of Reproduction and Development*. 56:20-30.
- West FD, Uhl EW, Liu Y, Stowe H, Lu Y, Yu P, Gallegos-Cardenas A, Pratt SL, Stice SL. 2011. Brief Report: Chimeric Pigs Produced from Induced Pluripotent Stem Cells Demonstrate Germline Transmission and No Evidence of Tumor Formation in Young Pigs. *Stem Cells*. 29:1640-1643.
- Wu Z, Chen J, Ren J, Bao L, Liao J, Cui C, Rao L, Li H, Gu Y, Dai H. 2009. Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system. *Journal of Molecular Cell Biology* 1:46-54.
- Yan S, Tu Z, Liu Z, Fan N, Yang H, Yang S, Yang W, Zhao Y, Ouyang Z, Lai C. 2018. A huntingtin knockin pig model recapitulates features of selective neurodegeneration in Huntington's disease. *Cell* 173:989-1002. e1013.
- Yang MY, Rajamahendran R. 2002. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Animal Reproduction Science*. 70:159-169.
- Yu D, Wang J, Zou H, Feng T, Chen L, Li J, Qi X, Li Z, Duan X, Xu C, et al. 2018. Silencing of retrotransposon-derived imprinted gene RTL1 is the main cause for postimplantational failures in mammalian cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 115:E11071-E11080.
- Zhou S, Ding C, Zhao X, Wang E, Dai X, Liu L, Li W, Liu Z, Wan H, Feng C. 2010. Successful generation of cloned mice using nuclear transfer from induced pluripotent stem cells. *Cell Research*. 20:850.