한국가축위생학회지 제43권 제4호 (2020)
Korean J Vet Serv, 2020, 43(4), 227-236
ISSN 1225-6552, eISSN 2287-7630
https://doi.org/10.7853/kjvs.2020.43.4.227

Korean Journal of
Veterinary Service
Available online at http://kjves.org

< Original Article >

3D8 scFv 형질전환 돼지 개발 및 PRRS 저항성 평가

이휘철[1] · 이건섭[1] · 김지윤[1] · 양 현[1] · 이보람[1] · 박미령[1] · 황인설[1] · 이풍연[1] · 변승준[1] · 김원일[2] · 오건봉[1]*

농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오공학과[1], 전북대학교 수의과대학[2]

Production of a transgenic pig expressing 3D8 single chain variable fragment (scFv) and its evaluation of PRRS resistant

Hwi-Cheul Lee[1], Gunsup Lee[1], Ji-Yoon Kim[1], Hyeon Yang[1], Bo Ram Lee[1], Mi-Ryung Park[1], In-Sul Hwang[1], Poongyeon Lee[1], Sung-June Byun[1], Won-Il Kim[2], Keon Bong Oh[1]*

[1]Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, RDA, Wanju 55365, Korea
[2]College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Iksan 54596, Korea

(Received 8 November 2020; revised 9 December 2020; accepted 9 December 2020)

Abstract

In this study, we have developed 3D8 scFv transgenic pig (TG) by microinjection of fertilized one-cell pig zygotes (2.17%). The effect of 3D8 scFv TG on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) resistance were evaluated through PRRSV VR2332 (1×10^3 $TCID_{50}$/mL) challenge and transmission experiments. As a result, the average daily weight gain (ADWG) of TG increased compared to the wild type pigs (WT) in PRRSV challenge groups and the serum viremia levels of the TG was significantly lower than of WT on the 7 day and 21 day after infection, meaning that the viral shedding was suppressed by 3D8 scFv expression. These results suggest that the expression of 3D8 scFv in pig could suppress spreading of infected virus to pigs sharing a room.

Key words : Transgenic pig, 3D8 scFv, PRRS, Evaluation

서 론

Single chain variable fragment (scFv)는 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변부위가 펩타이드 결합을 하고 있는 27kDa의 재조합 항체로 일반적으로 기초연구 및 의약학 분야에 이용되고 있다. 3D8 scFv는 자가면역질환 모델인 MRL-lpr/lpr 생쥐의 비장에서 분리되었고 인체의 전신에 나타나는 홍반성낭창(lupus erythematosus)과 유사한 자가면역질환을 유발한다(Kwon 등, 2002). 3D8 scFv가 핵산을 가수분해하고 세포막 단백질을 통해 세포 내로 들어갈 수 있는 특징 때문에 다양한 항바이러스 효과에 대한 응용을 기대해 왔다(Jang 등, 2009). 항DNA 항체(Anti-DNA antibody) (Komissarov 등, 1999)는 일반적으로 염기서열 특이성을 보이지 않지만(Marion 등 1997; Jang과 Stollar, 2003), 특정 단일가닥 DNA (Eivazova 등, 2000) 및 이중가닥 DNA (Kubota 등, 1986), 또는 poly (dT), poly (dG-dC) 염기서열을 포함한 단일가닥 혹은 이중가닥 DNA에 특이성을 보이는 것으로 분류할 수 있다(Marion 등 1997; Jang과 Stollar, 2003). Jang 등(2009)은 항DNA 항체인 3D8 scFv가 DNA 뿐만 아니라 RNA에 대해서도 핵산가수분해능을 가졌음을 보고하였다. 이러한 핵산가수분해능에 주목하여 최근 형질전환 닭을 개발하여 그 유효성을 평가하였으며, 특히, 3D8 scFv가 과발현되는 형질전환 닭에서 조류 인플루엔자(H9N2) (Byun 등, 2017), 뉴캐슬 질병 바이러스(NDV) (Byun 등, 2020) 및 감염성 기관지염 바이러스(Infectious bronchitis virus) (Lee 등, 2019)가 억제된다는 사실이 보고되고 있

*Corresponding author: Keon Bong Oh, E-mail. keonoh@korea.kr
ORCID https://orcid.org/0000-0002-0651-0306

Copyright © 2020, The Korean Society of Veterinary Service. All Rights Reserved.

다. 이처럼 3D8 scFv가 다양한 질병 바이러스에 대해 항바이러스 효과가 있음을 최근까지 보고되고 있다.

돼지생식기호흡기증후군 바이러스(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)는 25년 이상 전 세계적으로 경제적으로 돼지 산업을 위협하는 가장 심각한 전염병 원인균 중 하나로 1987년 미국에서 처음으로 그 증상이 인식되었고(Keffaber, 1989; Hill, 1990) 유럽에서는 1990년에 보고되었다(Wensvoort 등, 1991). 이러한 돼지생식기호흡기증후군(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)는 임신돈에서는 낙태, 조산, 태아사망 등의 광범위한 생식장애로, 자돈에서는 심각한 호흡부전 등의 증상으로 나타난다(Goyal, 1993; Rossow, 1998). PRRSV로 인해 돼지 생산에 있어 상당한 손실을 초래하고 있으며, 미국에서는 한 해 동안 664백만 달러의 경제적 손실로 최근 8년간 18.5% 증가했다(Neumann 등, 2005; Holtkamp 등, 2013). 반면 PRRS에 의한 국내 양돈산업에 미치는 경제적 손실은 모돈 규모로 산출하면 약 1,000억원, 사료 가격과 돈가 및 생산 원가를 변경하면 약 2,400억원의 손실을 예측하였다(양, 2019).

PRRSV는 *Arteriviridae*과에 속하는 positive-sense single-strand RNA 바이러스로 유전적으로 유럽형(Type 1)과 북미형(Type 2)으로 구분되며 이들의 전반적인 질병 표현형, 임상 증상, 게놈의 구성 등이 모두 비슷하지만, 뉴클레오타이드 수준에서는 30～40% 차이가 난다(Benfield 등, 1992; Collins 등, 1992; Nelsen 등, 1999). PRRSV는 내적 환경적응 능력 및 진화 능력을 가지고 있기 때문에 높은 빈도의 돌연변이와 재조합에 의한 새로운 종의 출현이 반복되면서 세계적 유행성이 지속되어져 왔다(Goldbreg 등, 2003; Murtaugh 등, 2010; Meng, 2012). 현재까지 많은 연구자들이 PRRSV를 효과적으로 제어하고 예방을 위하여 백신개발 등 다양한 연구를 진행해 왔다. PRRSV에 대한 백신개발 등의 연구와는 다르게 유전자 조작 기술을 이용하여 PRRSV의 수용체를 제거한 형질전환 돼지 개발(Whitworth 등, 2016) 및 항바이러스 작용에 관여하는 물질을 과발현시키는 시스템(Lu 등, 2017) 등을 통해 PRRSV에 내성을 가지는 돼지의 개발 연구도 진행되어왔다. 하지만 외부 바이러스 유래 핵산에 대해 범용적으로 대응할 수 있는 돼지의 개발 연구는 미비한 실정으로 관련 기초연구가 필요하다.

따라서, 본 연구의 목적은 양돈농가에 엄청난 경제적 손실을 초래시키는 PRRSV에 대해 그 저항성을 가지는 형질전환 돼지의 개발이다. 이를 위해 우리는 핵산가수분해능을 가진 항DNA 항체인 3D8 scFv가 과발현되는 발현벡터를 이용하여 유전자 미세주입을 통해 형질전환 돼지를 생산하고 그 유효성을 평가하였다.

재료 및 방법

형질전환 돼지 개발 및 유전자 검정

3D8 scFv 발현 벡터 및 유전자 미세주입

핵산가수분해 기능이 있는 3D8 scFv 유전자를 과발현 시키기 위해 동물 발현 벡터인 pcDNA3.1/V5-His에 클로닝(6220 bp)한 것을 성균관대학교 유전공학과로부터 제공받았으며, 벡터 맵에 대한 모식도를 Fig. 1A에 나타내었다. 발현벡터는 제한효소 *Nru* I으로 처리한 후 아가로스 겔(0.9%)에 전기영동하였다. 목적의 DNA 단편(3,533 bp)을 아가로스 겔에서 회수하여 정제 후, 최종 농도 2～4 ng/μL로 희석하였다. 이후 유전자 미세주입, 수정란 채란 및 이식 등은 기존의 방법과 동일하게 진행하였다(Lee 등, 2011). 유전자 미세주입을 통해 생산된 수컷 F0 개체는 성 성숙 후 암컷 일반 돼지와 자연교배를 통해 후대를 증식시켰다.

PCR RFLP 및 RT-PCR

혈액에서 추출된 게놈 DNA 혹은 cDNA를 주형으로 하여 프로모터와 3D8 scFv 유전자의 일부를 증폭시키는 프라이머 쌍(sense primer: 5'-tacatcaatgggcgtggatag-3', antisense primer: 5'-acggtgactgaggttccttg-3')과 house keeping gene인 GAPDH를 증폭시키는 프라이머 쌍(sense primer: 5'-atcaaatggggtgatgctgg-3', antisense primer: 5'-ttgctgacgatcttgagggag-3')을 이용하여 각각 646 bp 및 194 bp의 단편을 증폭시켰다. 증폭된 PCR 산물을 *Dra* III 제한효소로 처리하고 1.8%의 아가로스 겔에 전기영동하여 402 bp 및 244 bp의 단편에 의한 목적 유전자의 도입 유무를 확인하였다. 혈액에서 total RNA는 ZR Whole-Blood Total RNA kit (Zymo Research, USA) 및 TRIzol reagent (Invitrogen, USA)를 이용하여 사용법에 따라 추출하였다. cDNA는 1 μg의 total RNA를 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, USA)의 사용법에 따라 최종 20 μL에 반응시켜 합성하였다. PCR RFLP 및 RT-PCR은 최초 94℃에서 5분간 반응시킨 뒤 94℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 30초를 총 35회 반복하여 증폭하였으며, 최종 72℃에서 5분간 반응시

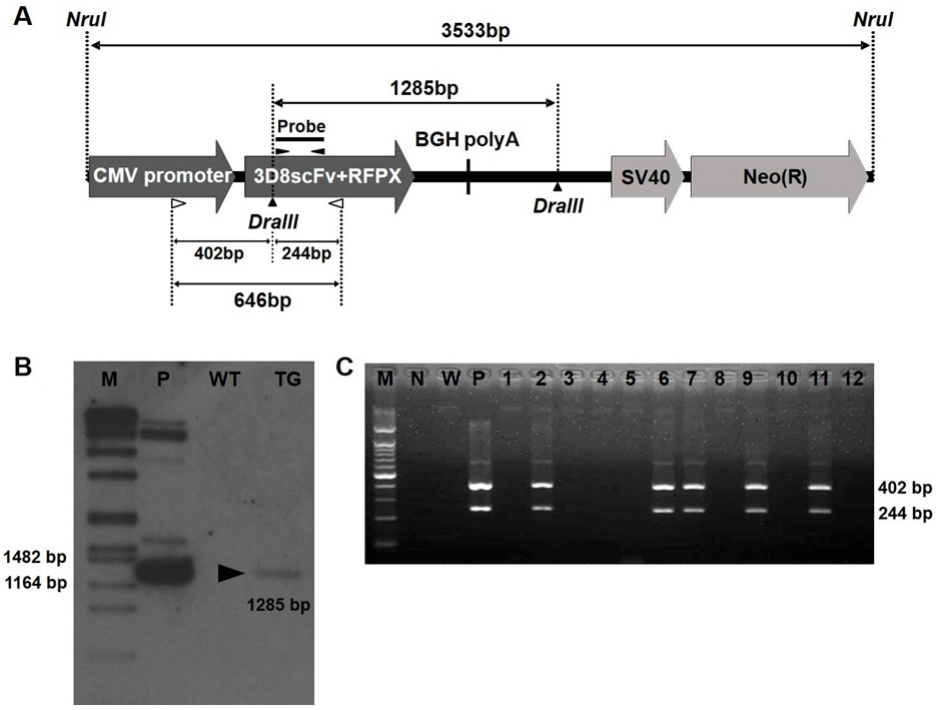

Fig. 1. Structure of 3D8 scFv expression cassette and strategy to screen 3D8 scFv integration event. (A) Schematic diagram of the cassette. *Nru* I was used to isolate 3D8 scFv expression cassette from the vector. *Dra* III was used to detect the cassette integration into chromosome using Southern blot analysis. Arrows indicate the PCR and RT-PCR primers used to verify integration event, whose size of the products are presented as numbered bp. (B) Verification of integration event by Southern blot analysis. Positive band corresponded to predicted size at third lane indicate transgenic pig. The result is shown as an example. (C) Verification of transmission of the cassette to progenies by PCR RFLP analysis. As described in materials and methods, specific primers for 3D8 scFv were used and resulted in products as two bands. M, DNA molecular weight marker VII (B), 100 bp size marker (C); P, positive control; N, negative control; WT, wild type pig; TG, 3D8 scFv transgenic pig; W, water; 1～12, newborn piglets.

켰다.

Southern blot

Probe는 sense primer 5'-ggccttgagtggattggata-3'와 antisense primer 5'-acggtgactgaggttccttg-3'에 의해 증폭된 224 bp를 주형으로 해서 DIG DNA Labeling Kit (Roche, USA)을 이용하여 준비하였다. 혈액으로부터 추출된 genomic DNA를 제한효소 *Dra* III으로 처리하여 10시간 반응시킨 후, 페놀 정제하였다. 정제된 DNA 10 μg을 0.8% 아가로스 겔에서 전기영동하여 나일론 membrane에 전사시킨 후 probe을 18시간 동안 hybridization 한 후, 세척, blocking, 항체결합, 세척 및 검출 순으로 확인하였다.

항바이러스 저항성 평가

바이러스

실험에 사용한 바이러스는 북미형 표준 바이러스인 PRRSV VR2332주를 사용하여 MARC-145 세포에 자체 배양하였고 역가 1×10^3 $TCID_{50}$/mL로 조정하여 시험에 사용하였다.

시험동물

시험동물(Landrace)은 국립축산과학원에서 생산한 유전자 검정이 확인된 3D8 scFv 형질전환(TG) 자돈과 일반돼지(WT) 자돈으로 약 4주령에 전북대학교 수의과대학 동물질병진단센터로 이송하여 시험 전에 축사 환경에 안정시켰다. 바이러스 저항성 평가는 모든 개체에서 PRRS 음성을 확인한 후 진행하였다. 시험에 사용된 자돈 수는 직접감염에 6두와 간접감염에 12두를 사용하였다.

시험설계

PRRSV 감염에 대한 저항성 평가는 직접감염 그룹(Challenge groups)과 간접간염 그룹(Transmission groups)으로 구분하여 진행하였으며, 직접감염 그룹은 형질전환 자돈 혹은 일반돼지 자돈에 PRRSV VR2332 표준주를 1×10^3 $TCID_{50}$/mL의 바이러스 역가로 양쪽 비

강에 1 mL씩 총 2 mL의 바이러스를 공격접종하고 형질전환 자돈 및 일반돼지 자돈을 동일한 공간에서 사육하고 3주간 관찰하였다. 채혈은 공격 접종 전(0일)과 공격 접종 후 7일, 14일 그리고 21일째에 실시하여 혈청을 확보하였고 동시에 체중도 계측하였다. 바이러스 접종 21일째에 모든 돼지는 안락사를 통하여 부검을 실시하고 폐병변을 검사하였다. 바이러스 저항성 평가는 총 4회 실시하여 3회까지의 결과만 정리하였으며, 실험 그룹 등 전체적인 실험 모식도를 Fig. 2에 나타내었다.

바이러스 농도 측정

Viral RNA는 MagMAX Viral RNA isolation kit (Ambion, Applied Biosystem, Life Technologies, Inc.)를 이용하여 kit 사용법에 따라 혈청에서 추출하였다. 혈중 바이러스 농도는 Prime-Q PCV2 PRRSV Detection kit (Genet Bio, Inc., Daejun, Korea)를 이용하여 one-step RT-qPCR을 사용법에 따라 7500 Fast real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)에서 수행하였다. PCR 조건은 cDNA 합성을 위해 50℃에서 20분 반응시키고, 95℃에서 10분 predenaturation 후, 95℃에서 10초, 60℃에서 30초를 총 40회 반복하였다. PRRSV 농도를 계산하기 위하여 PRRSV VR2332주의 titration을 통하여 작성된 standard curve를 이용하여 threshold cycle (C_t) 값을 바이러스 역가 ($TCID_{50}$/mL) 값으로 변환하였다.

항체역가 측정

수집된 혈청에 대한 PRRSV 특이 항체역가는 시판되는 ELISA kit (Bionote, Hwasung, Korea)를 구입하여 사용법에 따라 측정하였으며, S/P ratio가 0.4 또는 그 이상일 때 PRRSV 항체에 대한 positive 값으로 간주하였다.

통계처리

엑셀파일에 수집된 데이터는 GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, CA, UAS)를 이용하여 그래프를 그렸고, SAS (Statistical Analysis System) Enterprise Guide 7.1 프로그램의 Bonferroni t-Test를 이용하여 처리구 간 유의성 분석을 실시하였다($P<0.05$).

결 과

형질전환 돼지 개발 및 유전자 검정

F0 및 F1 형질전환 돼지 생산

pcDNA3.1/V5-His-3D8 scFv 벡터를 *Nru* I 제한효소로 V5-His-3D8 scFv (3D8 scFv) 절편을 분리하고 정제하였다. 정제된 3D8 scFv 유전자를 611개의 수정란 전핵에 미세주입한 후 26두의 대리모에 이식하였다. 그 결과 대리모 26두 중에서 임신된 13두가 임신이 되었다. 이들 13두의 임신한 대리모로부터 총 92두의 자돈이 생산되었으며, 그 중 2두의 대리모에서 각 1두씩 3D8 scFv 유전자가 삽입된 형질전환 자돈 2두(F0)를 확인하였다. 즉, 유전자 미세주입에 의해 생산된 총 92두의 자돈에서 2두만 목적의 유전자가 삽입되는 전이율 약 2.17%를 보였으며, 형질전환 수컷 자돈과 일반돼지 암컷 4두를 자연교배하여 생산한 후대 총 37두의 자돈(F1) 중 18두에서 목적의 유전자가 확인되는 약 48.6%의 효율로 후대에 전달되었다(Table 1).

유전자 도입 및 발현 검정

Fig. 1A는 형질전환 돼지를 생산하기 위하여 수정란에 미세주입 시킨 3D8 scFv 유전자의 발현 시스템의 모식도이다. 이러한 발현 시스템이 게놈 상에 제대로 삽입되었는지 southern blot과 PCR 유전자 증폭으로 확인하였다. Southern blot은 제작된 탐침자(probe)를 이용하여 게놈 DNA를 제한효소 *Dra* III로 처리했

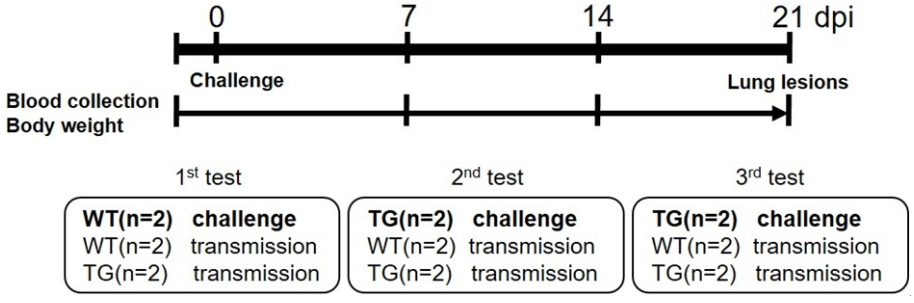

Fig. 2. Scheme of virus challenging experiment. WT, wild type pig; TG, 3D8 scFv transgenic pig; dpi, days post infection.

Table 1. Summary for embryo transfer to generate 3D8 pig and propagation of the pigs

Class	No. of recipient	No. of piglet			Transgenic pig			Gene transfer rate (%)	Method of production
		Male	Female	Total	Male	Female	Total		
F0	26*	36	56	92	1	1	2	2.17	Microinjection
F1	4†	25	12	37	13	5	18	48.6	Natural mating

*A total of 611 microinjected embryos were transferred into 26 recipients. †Natural mating between F0 male founder (TG) and four wild type female pigs.

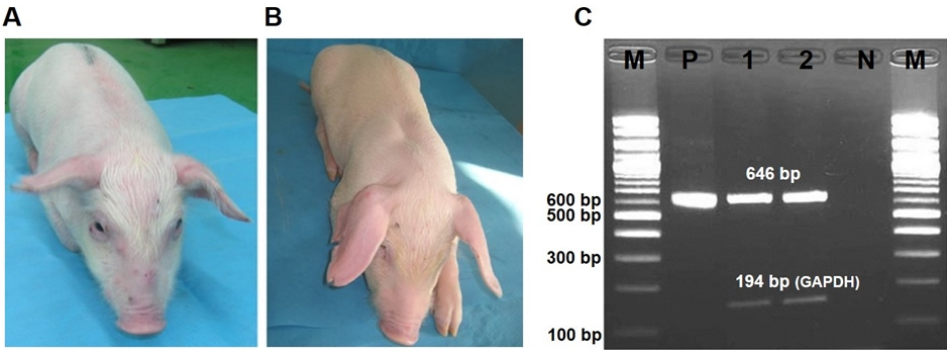

Fig. 3. Transgenic founder pigs express 3D8 scFv. (A, B) Successfully generated 3D8 scFv transgenic founder. (C) RT-PCR for 3D8 scFv expression in blood of two transgenic founders (1, 2) and wild type (N) pigs. The size of specific product for the 3D8 scFv is shown to Fig. 1A.

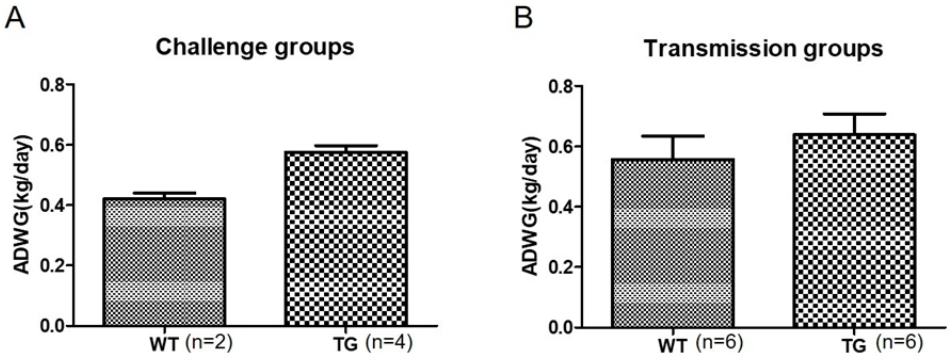

Fig. 4. The levels of average daily weight gain (ADWG) of pigs in challenge (A) and transmission (B) groups after challenge with PRRSV VR2332. WT, wild type pig; TG, 3D8 scFv transgenic pig.

을 때 분리되는 1,285 bp DNA 단편을 확인하였다(Fig. 1B). 삽입된 유전자의 확인을 위해 염기서열 특이적으로 설계된 PCR 프라이머를 이용하여 게놈 DNA를 주형으로 646 bp 단편을 증폭하였다. PCR 증폭된 646 bp의 단편을 제한효소 *Dra* III를 처리하여 아가로스 겔 상에서 예상되는 두 개의 DNA 단편(244 bp 및 402 bp)을 확인하였다(Fig. 1C). 또한, 생산된 2두의 F0 형질전환 돼지의 혈액에서 3D8 scFv가 mRNA의 수준에서도 발현하는 것을 확인하였다(Fig. 3C).

항바이러스 저항성 평가

일당 증체량 및 폐병변 지수

3D8 scFv 형질전환 돼지가 PRRSV에 직접 혹은 간접적으로 감염이 되었을 때 일당 증체량과 폐병변에 미치는 영향을 평가하였다. PRRSV에 직접 감염된 공격접종 그룹(Challenge groups)과 이들과 동일한 공간에서 사육된 간접감염 모델인 전파 그룹(Transmission groups)에서 일당 증체량은 일반돼지(WT)와 형질전환 돼지(TG) 간의 유의한 차이는 보이지 않았다. 하지만, 공격접종 그룹에서 WT (0.42±0.03 kg/day) 대비 TG (0.53±0.12 kg/day)군에서 일당 증체량이 다소 높은 경향을 보였다(Fig. 4A). 한편, 폐병변 지수는 전파 그룹에서는 WT vs. TG간 차이가 없었지만 공격 접종 그룹에서는 WT군이 10±0.0, TG군이 35±10으로 유의한 차이를 보였다(Fig. 5A).

PRRSV에 대한 혈청 내 항체역가

PRRSV에 대한 TG의 저항성을 평가하기 위해 공격접종 그룹 내 WT 및 TG군의 돼지 양쪽 비강에

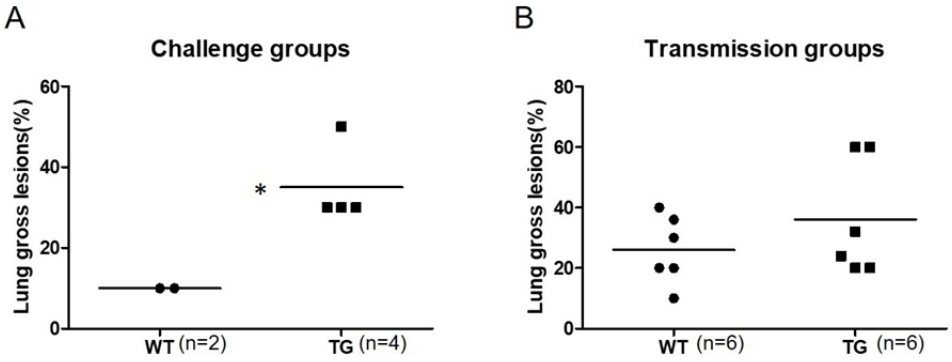

Fig. 5. Distribution of the individual lung gross lesions in challenge (A) and transmission (B) groups after challenge with PRRSV VR2332. The asterisk indicates significant ($P<0.05$) difference between WT and TG. The solid line represents the average value. WT, wild type pig; TG, 3D8 scFv transgenic pig.

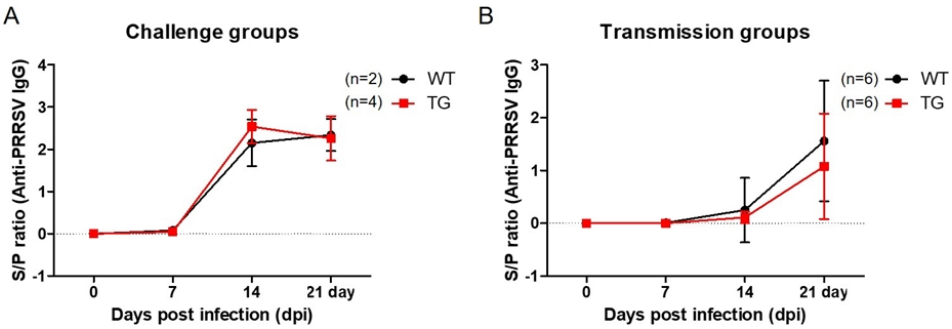

Fig. 6. The levels of anti-PRRSV antibody in serum obtained from pigs of PRRSV VR2332 challenge (A) and transmission (B) groups. The positive responses were determined at s/p ratio of 0.4 or higher. Error bars represent standard deviation. WT, wild type pig; TG, 3D8 scFv transgenic pig.

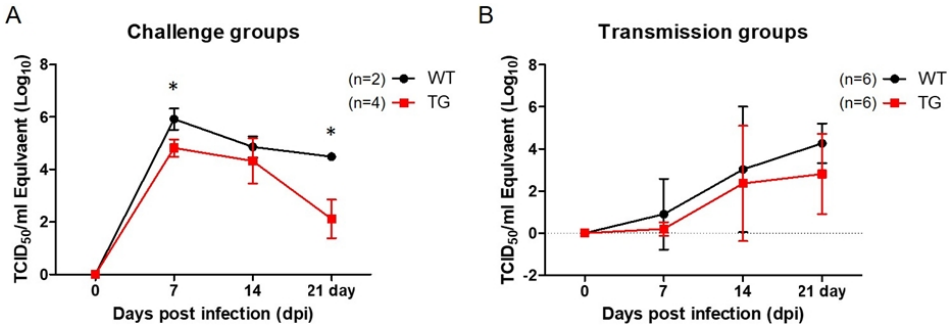

Fig. 7. The levels of viremia in serum obtained from pigs of PRRSV VR2332 challenge (A) and transmission (B) groups. The asterisk indicates significant ($P<0.05$) difference between WT and TG. Error bars represent standard deviation. WT, wild type pig; TG, 3D8 scFv transgenic pig.

PRRSV를 공격 접종 후 혈청 내 항체역가를 조사하였다. 그 결과 7일째까지는 혈청 항체가가 WT (0.08±0.09) 및 TG (0.05±0.07)군 모두에서 극히 낮게 검출되었다. 한편, 14일째부터 항체가가 급격히 상승되어 21일째까지 WT 및 TG에서 각각 2.34±0.38, 2.26±0.53로 유지되었지만 유의적인 차이는 없었다(Fig. 6A). 전파 그룹에서의 항체가는 두 군 모두 14일째까지 큰 변화 없다가 21일째에 WT군에서 1.56±1.14, TG군에서 1.08±1.00이였고 유의성은 없었다(Fig. 6B).

혈청 내 PRRSV 농도

PRRSV의 공격접종 후 혈액 내에 존재하는 바이러스 수준을 평가하였다. 혈청 내 바이러스 농도는 7일째 $\log_{10}$ ($TCID_{50}$/mL)가 WT군에서 5.92±0.40, TG군에서 4.82±0.33로 TG군에서 더 낮은 유의성을 보였다. 한편 $\log_{10}$ ($TCID_{50}$/mL)는 7일째 대비 21일째 TG군은 급격히 감소되어 2.12±0.73인 반면 WT군은 천천히 감소되어 4.49±0.11로 유의한 차이가 나타났다(Fig. 7A). 바이러스 전파 그룹에서의 혈청 내 바이러스 농도는 관찰 한 전 기간 동안 WT 및 TG군간 의미 있는 차이는 없었고 TG군에서 약간 낮은 경향을 보였다(Fig. 7B).

고 찰

본 연구에서는 CMV promoter에 의해 3D8 scFv 유

전자가 과발현되는 형질전환 돼지를 유전자 미세주입법에 의해 transgene의 전이율이 2.17%의 효율로 F0 2두를 생산하였다. 현재까지 여러 연구자들이 미세주입법을 이용하여 형질전환 동물을 생산하였지만, 그 생산 효율은 약 1%에 그치고 있다(Nottle 등, 2001; Uchida 등, 2001). 본 그룹에서도 과거 동일한 방법으로 hEPO (human erythropoietin) (박 등, 2006) 및 mPea15 (mouse phosphoprotein enriched in astrocytes) 형질전환 돼지(Lee 등, 2011)를 각각 2.13% 및 1.96%의 효율로 생산하였지만, Lee 등(2009)에 의해 생산된 재조합 hvWF (human von willebrand factor)을 발현하는 형질전환 돼지는 19.2%의 효율로, 보고된 생산효율에 비해 상당히 높았다. 이처럼 유전자 미세주입법에 의한 형질전환 동물의 생산은 효율적인 측면에서 아직 불안정한 상태임을 확인하였으며, 현재는 고전적인 gene targeting 방법 보다 정확도와 효율성을 높인 진보된 유전자 편집 방법들이 형질전환 동물 생산에 이용되고 있다. 목적 유전자인 3D8 scFv의 삽입 유무의 검정은 PCR-RFLP와 southern blot을 통하여 게놈 상에 도입되었음을 확인하였다(Fig. 1). 본 연구에서는 비록 단백질 수준에서 그 발현 정도를 확인하지 않았지만, mRNA 수준에서 다양한 조직에 발현되는 것을 확인하였다.

본 연구에서 생산된 3D8 scFv 발현 형질전환 돼지에 대한 바이러스 저항성을 평가하기 위하여 우리는 2017년부터 2019년 까지 총 4회의 실험을 진행하였다. 여기서는 4번째의 실험결과는 제외하고 실험설계 모식도(Fig. 2)에서 보여주는 것처럼 3회에 걸쳐 실시된 결과에 대한 내용을 정리하였다. 4번째 실험결과는 3D8 scFv 유전자의 기능에 대한 정 반대의 결과, 즉 전파그룹의 TG군에서는 7일째 PRRSV 특이 항체가 및 바이러스 증식이 관찰되어 21일째 감소되는 반면, WT군에서는 21일째까지 전혀 검출되지 않는 이전 3회의 결과 양상과 달리 완벽하게 PRRSV에 저항성을 보이는 결과가 도출되었다. WT군에서 완벽한 바이러스 저항성을 보였던 4번째 실험 결과는 최근 PRRSV의 수용체로 알려진 CD163 유전자가 제거된 형질전환 돼지(Whitworth 등, 2016)에서 나타나는 결과와 일치하였다. 따라서, 실험적 오류 등을 고려하여 4번째 실험 결과는 다른 3회의 실험결과에 영향을 미칠 것으로 사료되어 제외하였다.

일반적으로 어린 자돈이 PRRSV에 감염이 되었을 경우, 기침과 발열을 포함한 호흡기 질환을 유발하고 성장능력이 저하된다. 본 연구에서는 PRRSV의 직접 감염 및 간접감염이 WT과 TG군의 일당 증체량에 있어 유의성 있는 영향을 주지 않았으나 직접감염 그룹의 TG (0.53±0.12 kg/day)군이 WT (0.42±0.03 kg/day)군 대비 약 0.11 kg/day으로 다소 높았다. 일당 증체량이 감염돼지의 유전적 차이에서 기인(Niu 등, 2016)할 수 있는 요소는 고려하지 않았지만, Ruanist와 Charerntantanakul (2020)의 실험결과 중 4주령의 일반돼지의 일당 증체량이 0.51±0.06 kg/day, Jeong 등(2019)의 0.508 kg/day와 비교할 때 본 연구의 직접 감염 그룹의 TG (0.53±0.12 kg/day)군(Fig. 4A)과 유사한 수치를 보였다. 한편, 폐병변 지수는 예상외로 직접감염 그룹의 TG군에서 오히려 유의성(Fig. 5A) 있게 높게 나타나 3D8 scFv가 폐에서의 바이러스 증식을 억제시키는 핵산 가수분해 능을 발휘 못하는 등 폐병변과의 직접적인 연관성을 찾지 못했다. 다만, 이러한 결과로부터 일당 증체량에 한해서는 TG군이 PRRSV에 대한 저항성이 있다고 사료된다.

PRRSV 특이 항체가 형성은 직접 및 간접감염 그룹에서 각각 공격 접종 후 14일째 및 21일째 높은 수준으로 관찰되었고 WT 및 TG군간 의미 있는 차이는 보이지 않았다. 또한 간접감염 그룹에서 항체가 형성이 1주일 늦게 관찰되는 등 일반적인 바이러스 감염에 따른 항체형성 현상을 관찰함으로써 본 연구가 PRRSV의 공격접종 및 전파가 정상적으로 진행되었음을 간접적으로 확인하였다. 바이러스 혈증(viremia)은 직접감염 그룹에서 7일째 최고 농도를 보이다가 21일째 WT군은 완만하게, 반면 TG군은 급격히 감소하는 현상을 관찰하였다. TG군이 WT군에 비해 7일과 21일째 유의하게 바이러스 농도가 낮은 것은 PRRSV의 증식에 3D8 scFv 의 핵산가수분해 작용으로 바이러스 증식을 억제한 것으로 생각된다. 실질적으로 형질전환 닭의 세포 내에서 발현하는 3D8 scFv 단백질은 미니 항체로써 조류 인플루엔자 전파를 억제한다는 사실을 보고하고 있다(Byun 등, 2017). 또한, 3D8 scFv의 활성이 DNA 및 RNA 바이러스에 대항하여 작용하는 다면적인 기능으로부터 항바이러스제로서의 유용성(Lee 등, 2015)과 닭의 성장 촉진(Sureshkumar 등, 2020) 등을 보여 주기도 했다. 이러한 결과에서 3D8 scFv은 바이러스 종류에 상관없이 외부 유래의 핵산에 대해서 특이적으로 작용하여 가수분해하는 것을 재확인하였다. 한편 전파모델인 간접감염 그룹에서는 바이러스 혈증이 14일째 증가하여 21일째까지 지속되지만 WT 및 TG군간 유의성 있는 차이는 없었다.

Whitworth 등(2016)에 의해 폐 대식세포 표면에 존

재하는 CD163 단백질을 제거한 형질전환 돼지에서 공격접종 후 전혀 바이러스 혈증과 항체형성이 관찰되지 않은 결과와 비교하면 본 연구의 결과는 바이러스 저항성에 대한 효과가 미약하다고 할 수 있다. 이러한 결과는 PRRSV에 대해 특이적으로 작용(PRRSV 수용체 CD163 제거)하느냐 혹은 3D8 scFv처럼 바이러스 유래 핵산 등에 범용적으로 영향을 미치는 비특이적 작용(핵산 가수분해능)에 의한 차이로 생각된다. 하지만, Lu 등(2017)은 HDAC6 (histone deacetylase 6)가 체내에서 다양한 바이러스 라이프 사이클에 관여하는 것에 주목하여 HDAC6 과발현 형질전환 돼지에서 PRRSV에 저항성을 나타내는 것을 증명하였다. 이처럼 3D8 scFv 과발현 형질전환 돼지는 비록 다른 PRRSV에 항바이러스능이 있는 이미 보고된 형질전환 돼지의 결과보다는 확실하게 나타나지 않았지만, 일차적으로 PRRSV 배출 억제를 통한 결과로부터 돼지에 있어 항바이러스능에 대한 가능성을 확인하였다. 하지만, TG 군에서의 더 높은 폐병변 지수와 TG 및 WT 군간 차이 없는 항체가 수준에 대한 원인은 향후 추가적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 핵산가수분해 기능을 가진 3D8 scFv 유전자가 과발현되는 형질전환 돼지를 생산하였고 이들의 핵산가수분해 기능 즉 항바이러스능에 대하여 검증하기 위한 PRRSV 공격접종 및 전파실험을 진행하였다. PRRSV 직접감염 그룹에서 3D8 scFv 과발현 형질전환 돼지는 일당 증체량이 대조군 대비 증가했으며, 혈액 내 바이러스 농도 수준은 공격접종 후 21일째 급격히 감소하였다. 이러한 결과는 돼지에 있어 3D8 scFv 유전자의 발현이 PRRSV에 대한 항바이러스능을 발휘한다는 사실을 뒷받침하며, 향후 돼지 전염병 바이러스 예방 관련 연구에 기여 할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ 01094402)의 지원에 의해 수행되었습니다.

CONFLICT OF INTEREST

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

ORCID

Hwi-Cheul Lee, https://orcid.org/0000-0002-7644-2839
Gunsup Lee, https://orcid.org/0000-0001-9748-6796
Ji-Yoon Kim, https://orcid.org/0000-0002-6422-5829
Hyeon Yang, https://orcid.org/0000-0003-4162-4410
Bo Ram Lee, https://orcid.org/0000-0002-0537-6205
Mi-Ryung Park, https://orcid.org/0000-0001-5452-5281
In-Sul Hwang, https://orcid.org/0000-0003-2949-3075
Poongyeon Lee, https://orcid.org/0000-0003-2447-0392
Sung-June Byun, https://orcid.org/0000-0001-6909-1025
Won-Il Kim, https://orcid.org/0000-0002-0465-0794
Keon Bong Oh, https://orcid.org/0000-0002-0651-0306

REFERENCES

양승혁. 2019. PRRS가 한국 양돈산업에 미치는 경제적 손실. 한돈 11: 310-315.

Benfield DA, Nelson E, Collins JE, Harris L, Goyal SM, Robison D, Christianson WT, Morrison RB, Gorcyca D, Chladek D. 1992. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). J Vet Diagn Investig 4: 127-133.

Byun SJ, Choi H, Sureshkumar S, Yuk SS, Kwon JH, Noh JY, Jung SK, Kim JS, Oh KB, Yang H, Lee G, Lee HC, Woo JS, Song CS. 2020. The 3D8 single chain variable fragment protein suppresses Newcastle disease virus transmission in transgenic chickens. BMC Vet Res 6: 273.

Byun SJ, Yuk SS, Jang YJ, Choi H, Jeon MH, Erdene-Ochir TO, Kwon JH, Noh JY, Sun Kim J, Gyu Yoo J, Song CS. 2017. Transgenic Chickens Expressing the 3D8 Single Chain Variable Fragment Protein Suppress Avian Influenza Transmission. Sci Rep 7: 5938.

Collins JE, Benfield DA, Christianson WT, Harris L, Hennings JC, Shaw DP, Goyal SM, McCullough S, Morrison RB, Joo HS. 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. J Vet Diagn Investig 4: 117-126.

Eivazova ER, McDonnell JM, Sutton BJ, Staines NA. 2000. Specificity and binding kinetics of murine lupus anti-DNA monoclonal antibodies implicate different stimuli

for their production. Immunology 101: 371-377.
Goldberg TL, Lowe JF, Milburn SM, Firkins LD. 2003. Quasispecies variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during natural infection. Virology 317: 197-207.
Goyal SM. 1993. Porcine reproductive and respiratory syndrome. J Vet Diagn Investig 5: 656-664.
Hill H. 1990. Overview and history of mystery swine disease (swine infertility and respiratory syndrome). Proceedings of the Mystery Swine Disease Committee Meeting. 29-31.
Holtkamp DJ, Kliebenstein JB, Neumann EJ, Zimmerman JJ, Rotto HF, Yoder TK, Wang C, Yeske PE, Mowrer CL, Haley CA. 2013. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. J Swine Heal Prod 21: 72-84.
Jang JY, Jeong JG, Jun HR, Lee SC, Kim JS, Kim YS, Kwon MH. 2009. A nucleic acid-hydrolyzing antibody penetrates into cells via caveolae-mediated endocytosis, localizes in the cytosol and exhibits cytotoxicity. Cell Mol Life Sci 66: 1985-1997.
Jang YJ, Stollar BD. 2003. Anti-DNA antibodies: aspects of structure and pathogenicity. Cell Mol Life Sci 60: 309-320.
Jeong CG, Khatum A, Nazki S, Lee SI, Kim TH, Kim KS, Park CK, Kim WI. 2019. Production and evaluation of PRRS resistant pigs. Korea J Vet Serv 42: 1-7.
Keffaber KK. 1989. Reproductive failure of unknown etiology Am. Assoc. Swine Pract. Newslett 1: 1-10.
Komissarov AA, Deutscher SL. 1999. Thermodynamics of Fab-ssDNA interactions: contribution of heavy chain complementarity determining region 3. Biochemistry 38: 14631-14637.
Kubota T, Akatsuka T, Kanai Y. 1986. A monoclonal anti-double stranded DNA antibody from an autoimmune MRL/Mp-lpr/lpr mouse: specificity and idiotype in serum immunoglobulins. Immunol Lett 17: 53-58.
Kwon MH, Lee MS, Kim KH, Park S, Shin HJ, Jang YJ, Kim HI. 2002. Production and characterization of an anti-idiotypic single chain Fv that recognizes an anti-DNA antibody. Immunol Invest 31: 205-218.
Lee G, Cho S, Hoang PM, Kim D, Lee Y, Kil EJ, Byun SJ, Lee TK, Kim DH, Kim S, Lee S. 2015. Therapeutic Strategy for the Prevention of Pseudorabies Virus Infection in C57BL/6 Mice by 3D8 scFv with Intrinsic Nuclease Activity. Mol Cells 38: 773-780.
Lee G, Choi H, Sureshkumar S, Jung SK, Kim JS, Oh KB, Kim KW, Yang H, Kim DH, Byun SJ. 2019. The 3D8 single chain variable fragment protein suppress infectious bronchitis virus transmission in the transgenic chickens. Res Vet Sci 123: 293-297.
Lee HC, Kim HM, Lee SH, Oh KB, Chung HJ, Yang BC, Kim KW, Lee PY, Park JK, Chang WK. 2011. Production of a transgenic enriched in pig overexpressing phosphoprotein astrocytes 15 (PEA 15). Reprod Dev Biol 35: 239-245.
Lee HG, Lee HC, Kim SW, Lee P, Chung HJ, Lee YK, Han JH, Hwang IS, Yoo JI, Kim YK. 2009. Production of recombinant human von Willebrand factor in the milk of transgenic pigs. J Reprod Dev 55: 484-490
Lu T, Song Z, Li Q, Li Z, Wang M, Liu L, Tian K, Li N. 2017. Overexpression of Histone Deacetylase 6 Enhances Resistance to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Pigs. PLoS One 12: 1.
Marion TN, Krishnan MR, Desai DD, Jou NT, Tillman DM. 1997. Monoclonal anti-DNA antibodies: structure, specificity, and biology. Methods 11: 3-11.
Meng XJ. 2012. Spread like a wildfire—the omnipresence of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its ever-expanding association with diseases in pigs. Virus Res 164: 1-3.
Murtaugh MP, Stadejek T, Abrahante JE, Lam TT, Leung FC. 2010. The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Virus Res 154: 18-30.
Nelsen CJ, Murtaugh MP, Faaberg KS. 1999. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. J Virol 73: 270-280.
Neumann EJ, Kliebenstein JB, Johnson CD, Mabry JW, Bush EJ, Seitzinger AH, Green AL, Zimmerman AJ. 2005. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. J Am Vet Med Assoc 227: 385-392.
Niu P, Shabir N, Khatun A, Seo BJ, Gu S, Lee SM, Lim SK, Kim KS, Kim WI. 2016. Effect of polymorphisms in the GBP1, Mx1 and CD163 genes on host responses to PRRSV infection in pigs. Vet Microbiol 182: 187-195.
Nottle MB, Haskard KA, Verma PJ, Du ZT, Grupen CG, McIlfatrick SM, Ashman RJ, Harrison SJ, Barlow H, Wigley PL, Lyons IG, Cowan PJ, Crawford, RJ, Tolstoshev PL, Pearse MJ, Robins AJ, d'Apice AJ. 2001. Effect of DNA concentration on transgenesis rates in mice and pigs. Transgenic Res 10: 523-531.
Rossow KD. 1998. Porcine reproductive and respiratory syndrome. Veterinary Pathology 35: 1-20.
Ruansit W, Charerntantanakul W. 2020. Oral supplementation of quercetin in PRRSV-1 modified-live virus vaccinated pigs in response to HP-PRRSV-2 challenge. Vaccine 38: 3570-3581.
Sureshkumar S, Jung SK, Kim D, Oh KB, Yang H, Lee HC, Jo YJ, Lee HS, Lee S, Byun SJ. 2020. Administration of L. salivarius expressing 3D8 scFv as a feed additive improved the growth performance, immune homeostasis, and gut microbiota of chickens. Anim Sci J 91: e13399.
Uchida M, Shimatsu Y, Onoe K, Matsuyama N, Niki R, Ikeda JE, Imai H. 2001. Production of transgenic miniature pigs by pronuclear microinjection. Transgenic Res 10: 577-582.
Wensvoort G, Terpstra C, Pol JMA, ter Laak EA, Bloemraad M,

de Kluyver EP, Kragten C, van Buiten C, den Besten A, Wagenaar F, Broekhuijsen JM, Moonen PLJM, Zetstra T, de Boer EA, Tibben HJ, de Jong MF, van 't Veld P, Greenland GJR, van Gennep JA, Voets MTH, Verheijden JHM, Braamskamp.J. 1991. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. Veterinary Quarterly 13: 121-130.

Whitworth KM, Rowland RR, Ewen CL, Trible BR, Kerrigan MA, Cino-Ozuna AG, Samuel MS, Lightner JE, McLaren DG, Mileham AJ, Wells KD, Prather RS. 2016. Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Nat Biotechnol 34: 20-22.