

형질전환동물의 생산과 이용

진 동 일

선문대학교 식량자원학부

1. 요약

외래 유전자를 이식하여 형질전환동물을 생산하는 방법은 현재 약 3가지 정도가 실제 이용되고 있다. 현재 가장 많이 사용되고 있는 방법으로는 DNA 미세주입법인데 생쥐와 비교하여 다른 동물에서의 형질전환효율은 상당히 낮은 것으로 나타나 형질전환가축의 생산을 위해서는 많은 비용과 시설 및 노동이 필요하여 실용성에 문제를 갖고 있다. 각 가축에 적합한 DNA 미세주입 조건을 확립시키고 형질전환동물의 생산효율을 높이는 연구가 필요하다. 가축에서 형질전환기술이 실제로 응용되고 있는 분야로는 의약분야로 대량생산이 어려운 의약품을 형질전환가축의 젖으로 합성 분비시키게 함으로써 생리적으로 활성이 있는 의약품의 대량생산이 가능할 것으로 예상된다. Growth Hormone 이나 Growth Factor들을 이용한 성장과 관련된 형질전환가축의 기술은 예상했던 것보다 큰 성과는 없었는데 이식 유전자의 과잉발현으로 인한 부작용으로 실용화될 수 없었다. 그러므로 형질전환동물의 실용화를 위해서는 효율적인 유전자 이식방법의 개발과 이식 유전자의 발현으로 인한 부작용을 최소화 하면서 좋은 표현형을 얻을 수 있도록 이식유전자의 발현을 인위적으로 조절할 수 있는 regulatory system의 개발과 가축의 경제형질에 관여하는 유전자의 식별이 필요하다.

2. 유전자 이식방법의 가치

DNA를 수정란의 전핵으로 미세주입에 의해 외래 유전자를 여분으로 갖는 형질전환동물의 생산이 가능해지면서 축산분야에서 형질개량을 위한 수단으로 형질전환생산기술은 큰 주목을 받아 왔다. 그 동안 가축의 형질개량은 주로 유전형질의 선발에 의해 이루어져 왔고 지금까지의 선발효과는 경제형질의

개량에 큰 기여를 해 왔다. 그러나 오랫동안의 선발로 인해 각 축종내에 유전적 변이가 적어져 선발효과가 감소하고 있으며 축군내 유전적 변이를 고정시키는데 상당한 기간과 비용이 소모된다. DNA 재조합(recombinant DNA) 기술과 유전자 이식(gene transfer) 방법은 가축의 이러한 유전적 변이와 효율의 문제를 극복해 줄 있을 것으로 예상된다. 유전자 이식방법을 이용하여 유용 유전자를 종축내에 직접 이식함으로써 빠른 개량효과를 얻을 수 있고 축군내에 새로운 유전적 변이를 창출시킬 수 있다. 또한 전통적인 교미방법으로는 가능하지 않은 다른 종간의 유전정보의 교환이 가능하다. 그리고 이론적으로 불량형질에 관여하는 유전자를 제거하거나 불활성화 시킬 수 있고 유용 유전자로 대체도 가능하다. 그러나 이러한 유전자 이식방법의 잇점에도 불구하고 축산에서 실용화되지 못하고 있는 것에는 몇가지 이유가 있다. 첫째, 현재의 유전자 이식방법은 생산효율이 낮아 형질전환가축을 생산하는데 많은 비용과 시간이 소요된다. 둘째, 경제형질에 관여하는 유전자들이 아직 확인되고 있지 않아 이용 가능한 유전자의 수가 극히 제한되어 있다. 셋째, 유전자 발현에 관여하는 조절기작에 대해 아직 충분히 알려져 있지 않아 형질전환동물에서의 이식유전자의 생리적 효과를 예측할 수 없다. 그러나 그 동안 형질전환 소, 돼지, 양, 염소, 토끼 등이 생산되어 그 가능성을 열어 놓고 있다(1, 2).

3. 형질전환동물의 생산을 위한 유전자 이식 방법

DNA microinjection(DNA 미세주입법)은 현재 형질전환동물을 생산하는데 가장 확실한 방법으로 가축에서는 대부분 이 방법이 이용되고 있다. 주입된 DNA는 형질전환동물의 genome에 정착되어 자손에 전달된다. 이 방법은 1980년대 초 생쥐에서 개발되어 기초 분자생물학과 의학분야에 큰 기여를 하고 있다. 정제된 DNA를 micromanipulator를 이용하여 one-cell stage embryo의 전핵(pronucleus)으로 주입한 후 recipient의 난관에 이식하여 새끼를 얻는다. 새끼들의 DNA를 추출하여 Southern blot analysis나 polymerase chain reaction으로 형질전환동물을 식별하고 교미시켜 다음세대에도 전달되는지를 확인하고 line을 성립해 놓는다. 이 방법에 의한 형질전환 효율은 injection 조건에 따라 실험실마다 약간의 차이는 있지만 생쥐의 경우 DNA를 주입한 embryo수에 대해 약 2 - 5 % 가 형질전환생쥐로 태어난다(3). 그러나 가축에서의 형질

전환율은 생쥐보다 훨씬 낮은데 지금까지 보고된 가축의 효율은 0.02 - 1 % 인 것으로 나타나고 있다(4, 5). 가축에서의 낮은 효율의 원인으로는 microinjection condition을 생쥐의 것을 그대로 이용하고 있는 것인데 크기와 생리가 다른 가축의 embryo에 적합한 조건을 정립하는 것이 필요하다. 그외 소와 돼지의 embryos는 세포질내에 지방이 축적되어 있어 원심분리를 한 후 전핵을 볼 수 있고 토끼와 양의 전핵은 differential interference-contrast (DIC) microscope를 사용하여 볼 수 있다. 또한 생쥐와 비교하여 가축에서의 수정란 이식 기술이 아직 완벽하게 정립되어 있지 않고 in vitro culture system도 적합한 조건이 아니므로 embryo의 생존성을 낮추어 전체적인 효율에 영향을 미치게 된다. 최근에 난소로부터 다량의 미성숙 oocyte를 in vitro maturation과 in vitro fertilization 시켜 zygote를 생산하는 방법은 이러한 효율문제를 어느 정도 해결하는데 기여할 것으로 예상된다(6).

외래 유전자를 retrovirus vector를 이용하여 embryo에 이식할 수 있는데 현재 생쥐와 조류에서 이 방법에 의해 형질전환동물이 생산되었다(7, 8). retrovirus의 생활사중 자신의 genome을 host cell의 chromosome에 정착시키는 원리를 이용하여 유전자를 retrovirus genome의 일부를 제거하고 삽입하여 retrovirus particle에 packaging하는 system(helper cell)에서 조작된 유전자를 가진 retrovirus를 생산하게 된다. 그러므로 embryo를 이 retrovirus로 infection 시키면 embryo의 chromosome에 retroviral genome이 정착하게 되고 외래유전자를 가진 동물을 생산할 수 있다. 이 방법은 DNA microinjection에 비해 특별한 기구나 기술이 필요없고 한꺼번에 많은 세포를 infection시킬 수 있어 조류와 같이 세포분열이 상당히 진행된 embryo의 infection에 유용하게 사용될 수 있다. 단지 이 retrovirus vector가 생쥐와 조류에서만 개발되어 있고 다른 가축에서는 이들의 vector가 효율이 낮거나 적용될 수가 없어 이용되지 못하고 있다. 또한 외래유전자의 크기가 제한되어 있고(약 10 kb 미만) retrovirus의 조절작용으로 인해 유전자 발현을 저해하는 단점이 있다(9).

ES cell은 blastocyst 난자의 inner cell mass로 부터 분리할 수 있는데 미분화상태의 세포들로서 in vitro 상태에서 배양이 가능하며 정상 난자와 aggregation을 시키면 chimera를 형성하여 모든 조직으로 분화될 수 있는 pluripotency를 가지고 있다(10). 이러한 ES cell은 생쥐와 hamster등에서는 잘

정립되어 있지만 그외 동물에서는 아직 유전자 조작에 이용될 수 있을 만큼 정립되어 있지 않은데 그 이유로는 미분화된 상태를 유지시키면서 증식시켜야 하는 배양기술이 개발되지 못하고 있기 때문인 것으로 추정되는데 각 동물마다 수정란의 배양조건이 다르듯이 ES cell의 배양조건이 다를 것으로 추정되고 있다. 실제 생쥐에서 정립된 ES cell의 기술을 다른 동물에 적용하면 분리된 세포의 분열속도가 너무 느리고 fibroblast와 같은 cell로 분화된다. 생쥐에서 ES cell을 배양할 때는 분화를 방지하기 위하여 embryonic fibroblast와 co-culture를 하거나 leukemia inhibitory factors(LIF)나 differentiation inhibition factor(DIF) 또는 ciliary neurotropic factor(CNF)와 같은 growth factor를 사용하여 미분화의 조건을 유지하여 준다. ES cell은 미분화 상태이기 때문에 모든 조직으로 분화가 가능하다. morula stage embryo와 aggregation을 시키든지 blastocyst의 inner cell mass 부위로 injection을 하여 대리모의 자궁에 이식하면 chimera를 생산할 수 있다. 이 chimera는 거의 모든 조직에 ES cell로 부터 유래된 세포들과 donor embryo로 부터 유래된 세포들로 구성되어 있다. germ cell도 ES cell로 부터 유래된 것이 있어 다음 세대에 heterozygous 상태의 animal을 얻을 수 있고 이 heterozygous끼리의 교배에 의해 그 다음 세대에는 특정 gene loci가 전부 ES cell로 부터 유래된 homozygous animal을 얻을 수 있다. 그러므로 ES cell을 in vitro에서 배양하는 동안 유전자를 조작하고 유전자가 정확하게 조작된 ES cell line만을 selection하여 embryo와 aggregation하여 새끼를 얻고 교미에 의해서 유전자가 조작된 형질전환동물을 생산할 수 있다. 특히 DNA의 homologous recombination현상을 이용한 gene targeting은 특정 gene을 변형시킨 animal을 생산할 수 있으며 ES cell system이 잘 정립되어 있는 생쥐에서는 특정 gene을 파괴시켜(gene disruption) 그 gene의 기능이 없는 생쥐(knock-out mice)를 생산하여 in vivo 상태에서 gene의 기능을 규명하는데 이용되고 있으며 최근에는 gene duplication과 같은 특정 gene을 정확하게 4 배체, 6 배체 등의 여분으로 갖는 생쥐를 생산하여 gene product의 증가에 따른 표현형의 변화를 추정하는데 이용되고 있다(11, 12). 가축에서의 ES cell system은 ES cell을 분리하고 확인하는 초기 단계이나 앞으로 ES cell이 정립되면 가축을 개량하고 복제하는데 이용할 수 있을 것으로 기대된다. 특히 열성유전자의 치

환(gene replacement), 우성유전자의 복제(gene duplication) 등에 의한 방법으로 가축의 genome 조작이 가능하여 복합적인 유전자에 의해 나타나는 경제형질의 개량에 응용할 수 있다. ES cell 또는 ES-like cell들이 hamster, 토끼, 돼지, 양, 소 등에서 분리되었다는 보고가 있고 최근에 이들 cell line을 이용하여 chimeric animal을 만들었다는 보고가 있으나, 아직 germline transmission에 대한 보고는 없다(13, 14, 15). 가축에서 ES cell의 정립을 위해서는 pluripotency까지를 증명하는데 많은 비용과 시간이 소모되겠지만 ES cell의 이용성을 고려한다면 개발의 가치가 있다고 사료된다.

현재 형질전환동물의 생산을 높이기 위한 방법으로 연구되고 있는 것으로는 sperm-mediate gene transfer로써 정자를 DNA와 incubation시킨 후 oocyte와 in vitro fertilization을 하면 형질전환동물을 얻을 수 있다고 생쥐와 돼지에서 보고되고 있으나 아직 기술이 확립되어 있지 않고 있다. DNA 용액에 cell을 넣고 전하를 걸면 DNA가 세포속으로 들어가 정착하게 되는데 이 electroporation에 의한 방법으로도 형질전환 물고기가 생산되었으나 아직 포유류에서 형질전환은 보고되지 않고 있다.

4. 형질전환의 응용

growth hormone(GH), growth hormone releasing factor(GRF), IGF-1등을 이용하여 형질전환돼지와 양이 생산되어 성장율의 개량이 시도되었다(16). GH를 여분으로 갖고 있는 형질전환돼지의 경우 증체량이 control에 비해 약 20% 정도 증가되었으며 사료효율도 향상되었고 등지방층 두께도 낮아졌다. 그러나 GH 형질전환돼지에서 GH의 과잉생산으로 인한 부적합한 형질이 나타났다. 전체적인 내분비 양상과 대사 활동에 변화가 생겨 여러 가지 질병을 동반하고 불임 또는 성욕저하를 일으키는 부작용을 나타내었다. 또한 6개월 이전에 60%의 형질전환돼지가 폐사했으며 GH 형질전환양에서는 당뇨병증세로 인한 체중의 감소도 보고되고 있다. GH 형질전환동물에서 보이는 비정상적인 형질의 발현은 과량의 GH의 분비와 장기적인 노출에 의한 negative feedback system의 파괴로 기인한 것으로 예측하는데 이 형질전환동물의 사료요구량이나 사양조건이 부적합하여 나타나는 것으로도 추정된다. GRF 형질전환돼지의 경우는 혈중 GH가 증가하지 않았는데 발현된 GHR이 정상적으로 세포질내에

서 processing되지 않아 비활성화되었기 때문인 것으로 나타났다. 증체와 관련하여 myogenic differentiation에 관여하는 ski gene을 사용하여 골격근을 증대시킬 목적으로 형질전환 생쥐와 돼지를 생산하였다(17). 이 ski 형질전환돼지에서도 3개월령과 7개월령 사이에 근육이 증대되는 형질(muscular hypertrophy)을 나타냈으나 GH 형질전환돼지에서와 마찬가지로 여러 가지 부작용을 함께 발현하였다.

유선단백질의 regulatory element를 이용하여 우유성분을 변형시키거나 유용 의약품과 같은 단백질을 형질전환동물의 유선에서 분비되도록 하는 형질전환동물의 생산이 시도되고 있다(18, 19). 이식유전자의 산물이 다량으로 비유동물의 젖으로 분비된다면 합성이 불가능한 의약품을 값싸게 생산하는 이상적인 system이 될 것이다. 실제 혈액의 응고에 관여하는 물질을 형질전환젖소나 산양의 젖으로 분비하여 활성이 있는 물질을 대량생산을 시도하는 노력은 곧 현실화 할 것으로 예상된다. 또한 유아들의 우유를 모유에 가깝도록 모유에 함유된 성분을 우유에서 분비되도록 하는 시도도 이루어지고 있다.

그외 조사료의 이용효율을 높이기 위한 소화효소의 조작, 지방성분을 줄이기 위한 생화학적인 효소의 활성증대나 지방세포의 기능파괴, 유용 식물유전자의 도입 등 여러분야에서 형질전환동물의 응용이 시도되고 있다.

5. 실용화를 위한 과제

앞에서 살펴본 바와 같이 형질전환가축을 생산할 수 있는 몇가지 방법이 있지만 DNA microinjection은 형질전환가축의 생산효율을 높이기 위한 최적 조건의 확립이 요구되고 retrovirus-mediate gene transfer는 가축에서 효율적으로 이용할 수 있는 vector system의 개발이 필요하다. ES cell을 이용하는 방법은 가장 유망하나 가축에서의 ES cell line의 확립이 이루어져야 한다. 새로운 방법의 유전자 이식 방법의 개발과 가축의 수정란이식, 체외배양, 체외수정과 같은 기술의 개량도 형질전환가축의 생산효율 증대에 기여할 것으로 기대된다.

GH 형질전환동물에서와 같이 아직 유전인자들의 기능을 정확하게 규명해야 하고 이식유전자가 적당한 조직에서 필요량 만큼 적절한 시기에 발현되도록 유전자의 발현조절 system의 개발이 필요하다. 이를 위해서는 이식유전자의

발현을 인위적으로 필요한 시기에는 켜지게 하고 부작용이 나타나는 시기에는 차단할 수 있는 정교한 조절인자에 대한 연구가 이루어져야 한다. 또한 경제 형질에 관여하는 다양한 유전자들의 cloning이 필요하며 실질적으로 형질 전환가축의 생산에 이용될 수 있도록 이들 유전자들의 기능에 대한 충분한 기초 연구가 이루어져야 한다.

6. 참고문헌

1. Rexroad, C. R. Jr. 1992. Transgenic technology in animal agriculture. *Anim. Biotech.* 3:1-13.
2. Ebert, K. M. and J. E. S. Schindler. 1993. Transgenic farm animals: Progress report. *Theriogenology* 39:121-135.
3. Brinster, R. L., H. Y. Chen, M. E. Trumbauer, M. K. Yagle and R. D. Palmiter. 1985. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1736-1740.
4. Hammer, R. E., V. G. Pursel, C. E. Rexroad, Jr., R. J. Wall, D. J. Bolt, K. M. Ebert, R. D. Palmiter and R. L. Brinster. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 315:680-683.
5. Pursel, V. G. and C. E. Rexroad, Jr. 1993. Status of research with transgenic farm animals. *J. Anim Sci.* 71:10-19.
6. Bowen, R. A., M. Reed, A. Schnieke and G. E. Seidel, Jr. 1993. Production of transgenic cattle from PCR-screened embryos. *Theriogenology* 39:194
7. Stuhlmann, H., R. Jaenisch and R. C. Mulligan. 1989. Transfer of a mutant dehydrofolate reductase gene into pre- and post-implantation mouse embryos by a replication-competent retrovirus vector. *J. Virol.* 63:4857-4865.
8. Bosselman, R. A., R-Y. Hsu, T. Bogg, S. Hu, J. Bruszewski, S. Ou, L. Kozar, F. Martin, C. Green, F. Jacobsen, M. Nicolson, J. A. Schultz, K. M. Semon, W. Rissell and R. G. Stewart. 1989. Germline transmission of exogenous genes in the chicken. *Science* 234:533-535.

9. Jaenisch, R. 1988. Transgenic animals. *Science* 240:1468-1474.
10. Robertson, E. J. 1987. Embryo-derived stem cell line. *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach* (Robertson, E. J., ed.) IRL, Oxford, pp. 71-112.
11. Capecchi, R. M. 1989. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244:1288-1292.
12. Bronson, S. K. and O. Smithies. 1994. Altering mice by homologous recombination using embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 269:27155-27158.
13. Piedrahita, J. A., G. B. Anderson and R. H. Bondurant. 1990. On the isolation of embryonic stem cells: comparative behavior of murine, porcine and ovine embryos. *Theriogenology* 34:879-901.
14. Wheeler, M. B. 1994. Development and validation of swine embryonic stem cells. *J. Reprod. Fertil.* 6:1-6.
15. Stice, S. L., N. Strelchenko, J. Betthausen, B. Scott, G. Jugella, J. Jackson, V. David, C. Keefer and L. Matthews. 1994. Bovine pluripotent embryonic cells contribute to nuclear transfer and chimeric fetuses. *Theriogenology* 41:301 (Abstr).
16. Pursel, V. G., C. A. Pinkert, K. F. Miller, D. J. Bolt, R. G. Campbell, R. D. Palmiter, R. L. Brinster and R. E. Hammer. 1989. Genetic engineering of livestock. *Science* 244:1281-1287.
17. Pursel, V. G., P. Suttrave4, R. J. Wall, A. M. Kelly and S. H. Hughes. 1992. Transfer of c-Ski gene into swine to enhance muscle development. *Theriogenology* 37:278 (Abstr).
18. Hennighausen, L. 1992. The prospects for domesticating milk protein genes. *J. Cell Biochem.* 49:325-332.
19. Platenburg, G. J., E. P. A. Kootwijk, P. M. Kooiman, S. L. Woloshuk, J. H. Nuijens, P. J. A. Krimpenfort, F. R. Pieper, H. A. de Boer and R. Strijker. 1994. Expression of human lactoferrin in milk of transgenic mice. *Transgenic Res.* 3:99-108.