

형질전환동물의 우유 및 뇨에서 human erythropoietin 생산에 관한 연구

김 진 회

경상대학교 축산과학부

서 론

J. Gordon에 의하여 형질전환동물이 처음 생산된 이래, 다양한 종류의 형질전환동물이 생산되었다. 그 생산법도 미세현미주입법에서 시작하여 핵치환을 이용한 방법, 정자주입에 의한 방법, 레트로바이러스에 의한 방법, ES세포주를 이용하는 방법 등이 개발되어, 다양한 종으로부터 다양한 목적을 가진 형질전환동물이 생산되었다. 국내에서도 이경광 박사가 처음으로 형질전환생쥐를 생산한 이래, 형질전환 젓소, 염소, 돼지 등이 보고되고 있어, post-genome시대에 있어 이 분야의 중추적인 역할이 기대된다 하겠다. 형질전환동물을 생산하는 주된 목적중 농업 특히 축산 분야에서 응용 가능한 분야로는 gain function을 목적으로 한 성장촉진, 사료효율 증진, 내병성과 관련된 부분과 유용생리활성물질의 생산 등으로 크게 대별될 수 있다.

본고에서는 본 연구실에서 수행하고 있는 적혈구 생산 촉진 인자인 EPO를 이용하여, 형질전환동물의 뇨를 이용하여, 저렴한 가격에 빈혈치료제인 EPO를 대량 생산하는 모델동물을 개발하는데 있다. 이를 위하여, 방광에서 특이적으로 발현하는 uroplakin 유전자를 크로닝하고, 이들 유전자의 promoter와 enhancer을 이용하여 빈혈치료제인 EPO를 재조합한후 모델동물인 생쥐와 돼지의 뇨에서 EPO의 분비능력과 분비된 생리활성물질의 생리적 활성을 검정하였다.

결 과

1. 방광특이발현 유전자의 크로닝

방광특이 발현 유전자는 평균 23kb의 돼지 genomic DNA 단편을 삽입하고 있는 library(Kist 한용만 박사의 gift)로 부터 스크린하였다. Library로 부터 colony hybridization에 의하여 UPII 유전자를 스크린한 결과는 다음과 같다.

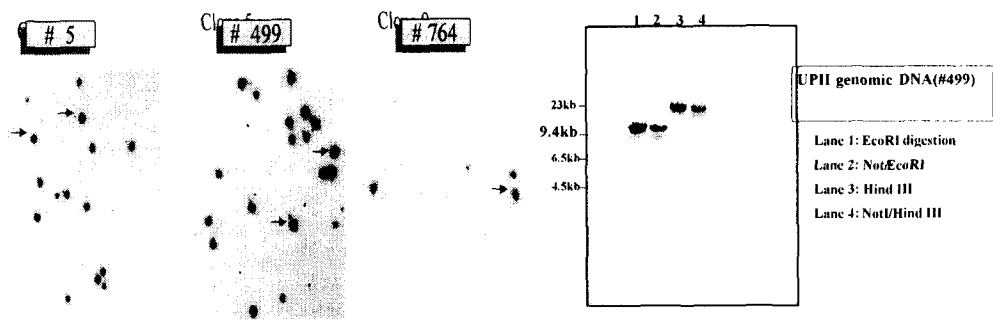


그림 1. Pig UPII genomic DNA의 Screening.

돼지 UPII 유전자는 총 3회의 스크린에 의하여 5개의 subclone을 pick-up하여, 약 24kb정도의 유전자를 함유한 UPII pig genomic DNA을 크로닝하여 형질전환동물의 생산에 이용하였다. 이들 유전자는 방광특이적 발현을 보였으며, 보고된 타종과 비교시 아미노산에서 90% 이상, 유전자 수준에서 85% 정도의 상동성을 보였다. 이들 유전자의 아미노산 배열은 그림 2와 같다.

```

      *      2C      *      4C      *      6C      *
Ecvire upI : EWVWVSWMRRFAVM APVNIISGTSSEVWVSRVALEFRIICENITVSRVSRVAF : 73
Furar upII : ELRPIILVLAHILFAISG-PDNDGCSLSEISVHSRVALEFQIICGEMVMRFRVSRVAF : 72
Mause upII : TTPCIEVHILFAVIAE-TDNIISGTSSEVWVSRVALEFRIICENITVSRVSRVAF : 72
Fig upII : FAEVWVSWMRRFAVIGI---GNIIZPEGTSSEVWVSRVALEFRIICENITVSRVSRVAF : 70
Mps lF6 TlplILILLP I pg acFNIsslSGLISFaEteSII6ALFFcltGgratl vrrarc6skvv

      8C      *      10C      *      12C      *      14C
Ecvire upI : SVAVPSGSRNDSVNDGSRVAVLGSVGMNIPGKIAKTSIITKASVSSRRELSVFERKAK : 146
Furar upII : SVVZTOPRRELVSVMICAEFVIRLSAVGVINEVEERKETSIIKQIATLSSRPHNSVILP : 145
Mause upII : PVAVPCGRRELVSVDGSRVAVLGSVGMNIPGKIAKTSIITKASVSSRRELSVFERKAK : 145
Fig upII : AVVCHWICPAGTCS---GQVWVLSHRTSAVGVINEVEERKETSIIKQIATLSSRPHNSV : 137
ss5v6ppcrGrrElvsvvcsg g tvtrLSPYQVINI EGIK5y6sy v KC TESSrEiFNSTI1F4 es

      *      16C      *      18C
Ecvire upI : IGLAVRTGGWVITVLLSVAEFLVILVPICA : 185
Furar upII : IGLAVRTGGWVITVLLSVAEFLVILVPICA : 184
Mause upII : IGLAVRTGGWVITVLLSVAEFLVILVPICA : 184
Fig upII : SGLAVRTGGWVITVLLSVAEFLVILVPICA : 176
iCLqMPRIcG6VvITVLLSvarfillv g i6al rk
  
```

그림 2. Pig UPII 유전자의 아미노산 배열

2. 방광특이 발현벡터의 구축

크로닝된 UPII 유전자에서 최적의 발현벡터는 상류 약 8kb와 하류 5kb를 함유한 부분이었으며, 특이한 점은 하류 polyA에서 enhancer와 같은 활성이 검정되었다. 본 벡터에서의 in vivo 활성은 금후의 검토가 요하나, 생쥐와는 약간 상이한 활성을 보였다.

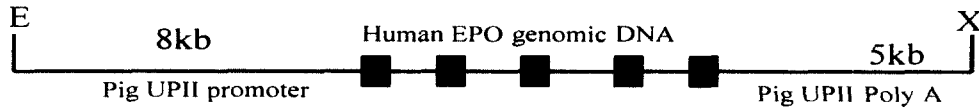


그림 3. 형질전환동물의 생산을 위하여 사용된 돼지 UPII promoter와 hEPO유전자의 대표적인 발현벡터. 형질전환생쥐 생산을 위해서 3.6kb의 UP promoter + hEPO와 3.6kb UP promoter + hEPO + 5kb UP poly A의 2종류가 더 이용되었다.

3. 형질전환생쥐의 생산과 돼지 수정란에의 응용

형질전환 생쥐의 생산은 주로 현미미세주입에 의하여 총 3라인 15마리가 생산되었고, 돼지의 경우는 수정능이 획득된 정상 돼지 정자에 유전자를 도입하여 직접 미세주입함으로써 수정란 수준에서 검정하였다. 생산된 형질전환 생쥐에서의 EPO의 발현을 사용한 발현벡터별 조사 결과는 그림 3과 같으며, 이들 형질전환 생쥐는 방광의 방광상피세포에서만 특이적으로 발현되었고(그림 4), 그림 3에서 나타난 발현벡터에서만 약 1 mg/ml의 농도로서 hEPO가 발현되었다(그림 5).

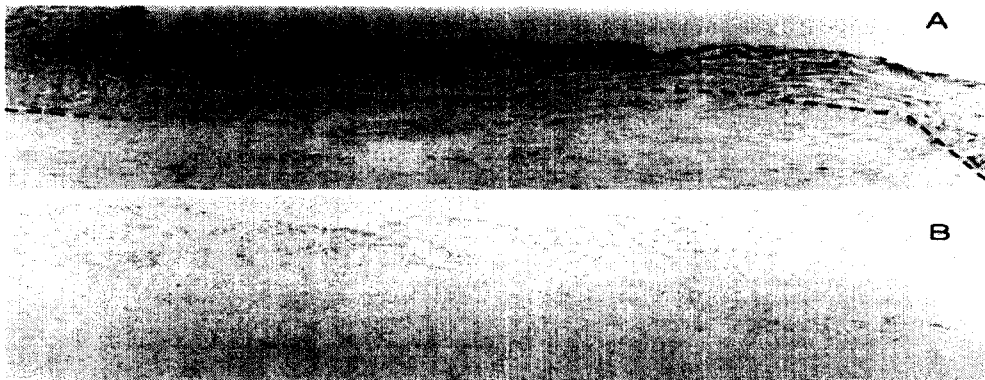
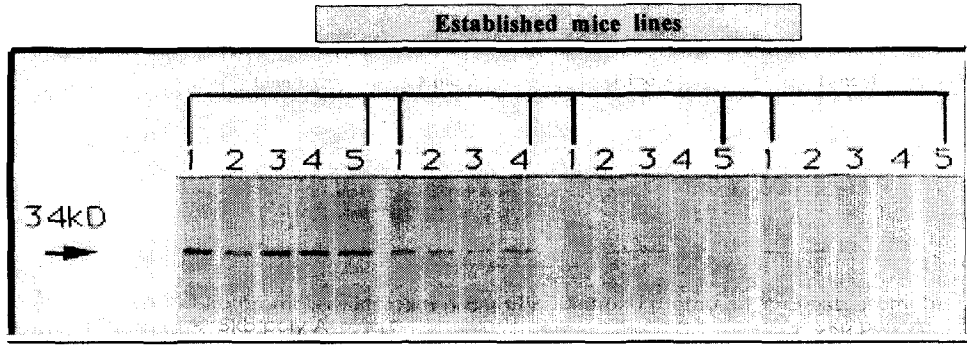


그림 4. hEPO의 방광상피세포 특이적 발현(A는 HEPO 발현, B는 대조구)



각 line은 상이한 발현벡터에 의하여 생산됨

그림 5. 상이한 발현벡터에 의하여 생산된 형질전환생쥐에서의 hEPO 발현

유전자도입과 발현을 검정하기 위한 예비실험으로서 돼지의 정자에 liposome/DNA의 복합체를 결합시킨후 이들 유전자가 정자에 결합된 모습을 ^{32}P hEPO probe을 사용하여 유전자의 결합을 위치시킨 결과 약 60%정도가 이들 유전자를 결합하는 것으로 밝혀졌으나, 실제 IVF 또는 ISCI에 의하여 정자와 난자를 수정(우)시킨 결과 1%미만의 유전자 전이율과 발현율을 보였다. 한가지 흥미로운 사실은 정자의 S-S 결합을 절단한 후 ISCI에 의하여 고효율로 형질전환동물을 생산할 수 있다는 보고와는 달리 본 연구실의 결과는 매우 저조한 성적을 보였으며 또한 정자매개의 특성중 하나인 도입유전자의 모자이시즘적 발현을 극복할수 있다는 보고와는 달리 대부분의 유전자는 부분적인 발현양상을 보였다.

ISCI후 정자매개에 의하여 외래 유전자가 전이된 수정란은 β -galactosidase의 분열에 의하여 X-gal 염색한 결과 일부의 할구에서만 β -galactosidase의 활성을 보이고 있다. 이들 결과는 정자매개의 가장 큰 장점인 조기 삼입보다는 분열후 유전자 삼입을 나타낸 것으로 정자매개 유전자 전이법 또한 개량되어야 한다는 결과를 제시하였다.

결 론

노에서 고가의 의료단백질의 생산 가능성이 실험동물을 통하여 입증되었으나, 형질전환가축 특히 돼지의 생산을 위해서는 고효율로 유전자 전이를 위한 기술의 개발이 선행되어야 할 것이다. 끝으로, 유전자의 크로닝을 위해 김재화 박사님(Kist), 돼지 genomic library의 구입을 위해서는 한용만 박사님께 진심으로 감사드립니다. 본 연구는 주) 조아제약과 농진청 연구과제로 수행되었음.