

효율적인 생식선 카이메라 생산을 위한 최적 조건 확립에 관한 비교 연구

김진남* · 박태섭 · 송권화 · 이영목 · 권혁모 · 한계용
서울대학교 농생명공학부

Abstract

In this study, we could improve transmission efficiency of germline chimeras by transfer of gonadal PGCs (gPGCs) cultured *in vitro*. Of hatched recipient chicks, 301 chickens (141 males and 160 females) were brought up to sexual maturity and these WLs (KOC) were mated with KOCs for testcross, resulting in 27 germline chimeras (15 males and 12 females) identified by black feather color of their progenies. The production efficiency of germline chimeras was 9.0% on average and no significant difference between efficiencies of germline chimera production of experimental groups was observed ($p=0.6831$). The average transmission efficiency of proven germline chimeras was 0.6~56.5% (15.0% on average). The transmission efficiency of experimental group which were transferred 10-days cultured gPGCs without Ficoll treatment was highest (49.7%) and that of experimental stock which transferred non-cultured gPGCs with Ficoll treatment was lowest (0.6%). The duration of *in vitro* culture before transferring was significantly important for the high efficiency of germline transmission. Transferring 10-days cultured gPGCs made the transmission efficiency higher rather than transferring non-cultured and 5-days cultured gPGCs, 50 times and 10 times, respectively ($p<0.0001$). However, Ficoll treatment for increasing the population ratio of gPGCs negatively affected the transmission efficiency and the effects of sexuality and the reciprocal interaction between treatments showed no significant differences. These findings demonstrated that the crucial factors for improving the germline transmission were the duration of *in vitro* culture prior to transfer. Thus, we developed the complete system for production of germline chimera using cultured gPGCs with highly improved efficiency and this system would be useful for genetic manipulation and obtaining the transgenic aves.

(key words : chicken, primordial germ cells, germline chimera, in vitro culture)

서 론

현재까지 조류에서 다양한 목적으로 생식선 카이메라(germline chimera)를 생산하고자 하는 연구가 많이 이루어져 왔다. 그러나 낮은 생식선 전이 효율과 조류의 배간세포의 체외배양 시스템의 미확립으로 인해 실질적인 응용은 적용하지 못하는 상황이다. 최근에 이르러 형질전환 가금 생산에 있어 원시생식세포 (primordial germ cell; PGCs)가 새로운 방법으로 대두되고 있

다. 원시생식세포는 성세포의 전구세포로서 성성숙이후 정자나 난자로 발달한다. 조류의 원시생식세포의 이동 경로는 포유류와는 매우 다른 양상을 나타내는데, 외배엽 (hypoblast)을 통하여 배양 1일째가 되면 원시생식세포의 형태로 발달한 세포가 생식 반월 (germinal crescent)로 모인다. 이렇게 모인 원시생식세포는 배자가 발달함에 따라 조류만의 특징인 배자의혈관계가 형성되기 시작하는 혈관계로 유입된다. 유입된 원시생식세포는 이동을 시작하여 원시생식기에 정착하게 된다. 조류에 있어서 이러한 원시생식세포의 발생학적 특성 때문에 여러 가지의 배발달 단계로부터 분리한 원시생식세포 이식을 통해 생식선 카이메라 생산을 가능하게 하였다. 최근까지 생식 반월, 혈관내, 배자의 원시생식기의 원시생식세포를 이용해 생식선 카이메라 생산에 성공하였다. 그러나 혈액내의 원시생식세포를 이용할 때는 회수되는 원시생식세포 수가 너무 적고, 원시생식기 유래의 원시생식세포를 이용할 때에 낮은 생식선 전이 효율은 형질전환 조류 생산에 있어 극복하여야 할 과제이다. 따라서, 본 연구는 원시생식기 유래의 원시생식세포를 단기간 배양, 피콜 처리 등의 비교를 통하여 효율적인 생식선 카이메라 생산 조건을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

원시생식기로부터 원시생식세포 분리 및 단기배양

원시생식세포는 Stage 28 (5.5일령)의 오골계 배자의 원시생식기로부터 적출한 후 0.05 % (v/v) trypsin-0.53 mM EDTA 처리로 단일 세포를 회수하였다. 회수한 원시생식세포는 Park 과 Han (2000)의 방법에 따라 96-well 배양용기에서 성장인자가 첨가된 배지를 이용하여 5일 또는 10일간 배양하였으며, 배지는 5일마다 교환하였다.

생식선 카이메라 생산

원시생식기 유래 원시생식세포를 무배양, 5일 배양, 10일 배양 및 피콜 처리 유무를 실험구로 하여 Stage 17 (2.5일령)의 화이트레그혼 배자의 혈관에 각각 주입하였다. 주입후에 파각하였던 난각을 파라필름으로 2회 밀봉한 후, 발생할때까지 침단부를 아래로 정지한 상태로 두었다. 오골계의 깃털색은 색소 억제 유전자가 열성이기 때문에 검정색이며, 화이트 레그혼은 색소 억제에 대한 유전자가 우성이기 때문에 흰색이다. 따라서, 화이트 레그혼의 자손중의 검정색 깃털을 가진 개체는 주입한 오골계 원시생식세포로부터 정상적으로 분열·분화하여 생산된 자손임을 나타낸다.

연구결과

각각의 처리구에 대한 오골계의 원시생식세포가 주입된 화이트레그혼은 전체 301마리가 부화하였다. 부화된 병아리 중 수컷 141마리, 암컷 160마리가 성성숙에 도달하였으며, 그 중 수컷 15마리와 암컷 12마리가 검정교배를 통하여 검은 깃털의 자손을 생산함으로써 생식선 카이메라로 밝혀졌다. 생식선 카이메라 생산 효율은 평균 9.0%였으며, 실험처리구간 생식선 카이메라 생산 효율간에 유의적인 차이는 없었다 ($p=0.6831$). 그러나 생식선 카이메라의 공여체 유래 자손 생산 효율은 유의적인 차이를 나타냈으며, 0.6~56.5% (평균 15.0%)를 보였다. 실험 처리구간 생식선 카이메라의 공여체 유래 자손 생산 효율은 피콜처리 없이 10일간 배양한 원시생식

세포를 이식하였을 때 가장 높았고 (49.7%), 피콜처리후 배양하지 않은 원시생식세포를 이식하였을 때 가장 낮았다 (0.6%). 이는 수용체 배자에 이식하기전에 실시한 체외배양 기간은 효율적인 생식선 카이메라 생산에 있어서 매우 중요한 요인으로 사료된다. 즉, 피콜 처리에 상관없이 10일간 배양한 원시생식세포를 이식한 실험구가 배양하지 않은 실험구와 5일간 배양한 실험구보다 각각 50배와 10배 더 높은 전이효율을 나타내었다 ($p < 0.0001$). 그러나 원시생식세포의 순수 분리를 위하여 사용한 피콜 처리구는 생식선 카이메라의 공여체 유래 자손 생산 효율을 저하시키는 상관 관계를 나타내었다.

적 요

본 연구는 원시생식기 유래 원시생식세포를 이용하여 효율적인 생식선 카이메라 생산 조건을 확립하고자 하였다. 전체 실험구에서 301마리가 부화하였으며, 이중 수컷 141마리, 암컷 160마리가 성성숙에 도달하였다. 후대 검정을 통하여 수컷 15마리와 암컷 12마리가 생식선 카이메라로 밝혀졌으며, 생식선 카이메라 생산 효율은 평균 9.0%였다. 실험처리구간 생식선 카이메라 생산효율간에 유의적인 차이는 없었으나 ($p=0.6831$), 생식선 카이메라의 공여체 유래 자손 생산 효율은 유의적인 차이를 나타냈다. 실험처리구간 생식선 카이메라의 공여체 유래 자손 생산 효율은 피콜처리 없이 10일간 배양한 원시생식세포를 이식하였을 때 가장 높았고 (49.7%), 피콜처리후 배양하지 않은 원시생식세포를 이식하였을 때 가장 낮았다 (0.6%). 또한, 피콜 처리에 상관없이 10일간 배양한 원시생식세포를 이식한 실험구가 배양하지 않은 실험구와 5일간 배양한 실험구보다 각각 50배와 10배 더 높은 전이효율을 나타내었다 ($p < 0.0001$). 따라서, 수용체 배자에 이식하기전에 실시한 체외배양 기간은 효율적인 생식선 카이메라 생산에 있어서 매우 중요한 요인으로 사료된다. 이와 같이, 본 연구에서는 배양 기간, 피콜 처리 유무 등에 대한 비교 분석을 통하여 생식선 카이메라 생산을 위한 최적 조건을 확립하였다.

참고 문헌

- Chang IK, Jeong DK, Hong YH, Park ES, KimMoon YH, Ohno A, Han JY. 1997. Production of Germline Chimeric Chickens by Transfer of Cultured Primordial Germ Cells. *Cell Biol. Intl.* Vol. 21. No. 8. 495-499.
- Chang IK, Yoshiki A, Kusakabe M, Tajima A, Chikamune T, Naito M, Ohno T, 1995. Germline chimer produced by transfer of cultured chick primordial germ cells. *Cell Biol. Int.* 19:567-576.
- Park TS, Han JY. 2000. Derivation and characterization of pluripotent embryonic germ cells in chicken. *Mol. Rep. Dev.* 56:475-482.
- Tajima A, Naito M, Yasuda Y, Kuwana T, 1993. Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken(*Gallus domesticus*). *Theriogenology* 40: 509-519.
- Tajima A, Hayashi H, Kamizumi A(1999) *Journal of Exptl. Zoo.* 284:759-764