

사람 성장호르몬 유전자를 발현하는 형질전환 생쥐의 번식성 및 형질유전

한용만 · 강만중 · 이철상 · 유대열 · 이경광

한국과학기술연구원 유전공학센터

Transmission and Reproduction of Transgenic Mice Expressing Human Growth Hormone Gene

Han, Y.M., M.J. Kang, C.S. Lee, D.Y. Yu and K.K. Lee

Genetic Engineering Center, KIST

SUMMARY

The transgenic mice were produced by microinjection of human growth hormone gene fused with mouse metallothionein I promoter. They were mated with normal mice by backcross or brother-sister mating. The reproduction efficiencies of female and male in the FO transgenic mice were 17.6% (3/17 mice) and 31.2% (5/16 mice), respectively, and were very lower than that in normal mice (85.7% and 100%, respectively).

Interestingly, a few of female transgenic mice were fertile which was different from the previous reports. Of 6 fertile transgenic mice, 2 mice were identified as mosaic type by the reduced frequency of genetic transmission to successive generation below Mendelian level and the enhanced copy numbers of transgene in progeny mice compared with the transgenic parent.

In the group of F1, F2, F3 transgenic mice the reproduction efficiencies of males were gradually improved, whereas females were absolutely infertile. It was consequently shown that the transgenic mice expressing human growth hormone gene were frequently infertile, but the genotypic and phenotypic characteristics of the fertile transgenic mice were normally passed on to the progeny through herm line. Therefore it must be considered whether or not the products of foreign DNA introduced into animals will detrimentally affect their physiological aspects.

I. 緒 論

Gordon과 Ruddle(1981)이 외래유전자가 염색체상에 도입된 형질전환(transgenic)생쥐는 번식성 및 형질유전능력을 가지고 있다고 보고한 이래, 많은 연구가들에 의해 이러한 사실이 입증되었다(Stewart 등, 1982; Hanahan 등, 1985; Rassoulzadegan 등, 1986; Small 등, 1986; Sapienza 등, 1987).

그리고 Pursel 등(1989)은 소의 성장호르몬 유전자가 삽입된 형질전환 돼지에서의 외래유전자 발현 및 형질유전능력을 보고함으로써 가축에 있어서 유용유전자 이용에 대한 보다 구체적인 가능성을 제시하였다. 그러나 사람의 성장호르몬 유전자가 삽입된 형질전환 생쥐의 경우에는 체내 태아사망율이 높고(Wagner 등, 1983; Covarrubias 등, 1986, 1987), 불임성이 있다는 단편적인 보고(Yun과 Wagner, 1987; Bar-

* 본 연구는 과기처에서 시행한 특정연구개발사업 연구결과와 일부임.

ike 등, 1988, 1989)는 있으나, 이들 형질전환 생쥐의 번식성에 관한 구체적인 결과를 제시한 보고는 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 사람 성장호르몬 유전자를 발현하는 형질전환 생쥐의 번식성 및 형질유전능력에 관하여 보다 구체적으로 조사, 검토할 목적으로 역교배(back cross) 및 형매교배(brother sister mating)를 통하여 일련의 실험을 실시하였다.

II. 材料 및 方法

1. 실험동물

형질전환 생쥐는 생쥐 MT-I promoter 가 함유된 사람 성장호르몬 유전자를 교잡종(C57BL×CBA)의 생쥐배에 미세주입하여 생산하였다(이 등, 1989). 교배실험에는 CBA 계통의 생쥐로서 암컷은 6주령, 수컷은 8주령 이상의 것을 사용하였다.

2. 교배방법

우선 암컷 형질전환 생쥐는 수컷 CBA 계통의 생쥐와, 그리고 수컷 형질전환 생쥐는 암컷 CBA 계통의 생쥐와 역교배를 실시하여 임신율 유도하였다. 이렇게 하여 태어난 산자들의 꼬리로부터 DNA 를 분리한 다음 외래유전자 분석을 통하여 형질전환 생쥐의 여부를 확인하였다.

이 후 세대의 형질전환 생쥐들은 한 배 새끼중 비형

질전환(non transgenic) 생쥐들과의 형매교배를 실시하였으며, 또한 암수 형질전환 생쥐간의 교배를 통하여 번식성 및 형질유전능력을 검토하였다. 마찬가지로 이러한 교배에 의해 태어난 산자들 중 형질전환생쥐의 여부는 DNA 분석을 통하여 판별하였다.

3. DNA 분석

교배후 태어난 산자들의 꼬리로 부터 DNA 를 분리한 다음(Hogan 등, 1986), 외래유전자 분석은 Tsao 등(1983)의 방법을 변형한 것으로 상세한 것은 이미 보고(한 등, 1990)한 바 있으므로 생략한다.

III. 結果 및 考察

1. 형질전환 생쥐의 번식성

사람 성장호르몬 유전자를 발현하는 형질전환 생쥐의 번식능력은 Table 1에서 나타난 바와 같다. 여기서 불임(Infertile)과 가임(Fertile)은 전체적인 임신실험에 의한 결과가 아니고 단지 자연교배에 의한 임신의 여부로 구분하였다.

한편 F0는 founder mouse로서 미세주입에 의해 태어난 형질전환 생쥐를 나타내며, F1, F2, F3는 각각 제1세대, 2세대, 3세대의 형질전환 생쥐를 나타내고 있다. 그리고 대조구는 교잡종(C57BL×CBA)의 암수 생쥐를 1 : 1의 비율로 합사시켜 교배실험을 실시한 결과이다.

Table 1. Reproduction efficiency of transgenic mice expressing MT-hGH gene

Group	Sex	No. mice	Infertile	Fertile	Reproduction efficiency (%)*
F0	Female	17	14	3	3/17 (17.6)
	Control	7	1	6	6/ 7(85.7)
	Male	16	11	5	5/16(31.2)
	Control	7	0	7	7/ 7(100.0)
F1	Female	9	9	0	0/ 9
	Male	14	8	6	6/14(42.9)
F2	Female	7	7	0	0/ 7
	Male	7	3	4	4/ 7(57.1)
F3	Female	2	2	0	0/ 2
	Male	3	1	2	2/ 3(66.7)

(%)* : Fertile/No. mice × 100

F0의 형질전환 생쥐에 있어서 번식효율은 암수가 각각 17.6%(3/17마리)와 31.2%(5/16마리)로서 대조구의 85.7%와 100% 보다 훨씬 저조한 성적을 보여주었다. 그리고 제1세대 이후의 형질전환 생쥐에 있어서 수컷의 경우는 세대를 거듭할수록 번식효율이 향상되고 있으나, 암컷의 경우는 세대를 거듭해도 전혀 임신율 하지 않는 경향을 나타내었다.

또한 암수 형질전환 생쥐간의 교배에 있어서도 전혀 임신율을 하지 않았다(자료 미제출). 이러한 형질전환 생쥐의 불임성은 사람 성장호르몬에 의한 추가의 lactogenic 환경에 기인하는 것으로 추정되고 있다(Bartke 등, 1989). 즉 Bartke 등(1989)은 불임성의 암컷 형질전환 생쥐의 난소에는 퇴화성의 간질세포괴(clusters of interstitial cells)가 존재하고 난포강(antral follicles)의 수가 증가하였으며 황체의 수는 정상적인 생쥐의 것보다 적었다고 보고하였다.

또한 Yun과 Wagner(1987)는 사람 성장호르몬 유전자를 발현하는 불임성 형질전환 생쥐의 수정란을 정상적인 가천에 이식하거나, 또는 난소를 정상의 생쥐에 이식함으로써 산자를 얻을 수 있었다고 하였다. 그러므로 이들 불임은 생식세포 그 자체에 기인하는 것이 아니라 성장 호르몬에 의한 생리적 불균형이 원인인 것으로 유추할 수 있다. 이와 관련된 구체적인 실험에서 Bartke 등(1989)은 의 형질전환 생쥐의 호르몬 수준을 측정하였던 바, 혈중 prolactin 수준은 정상 생쥐의 것보다 감소하였는데 이로 인한 황체 형성의 실패가 불임의 원인이라고 주장하였다.

일반적으로 정상의 암컷 생쥐에 있어서 임신 8일째 까지 하루 2회의 prolactin surges가 일어나야만 임신을 유지할 수 있는데(Murr 등, 1974; Barkley, 1982), 형질전환 생쥐에서 감소된 혈중 prolactin 수준으로는 난자가 수정이 되어도 정상적인 임신을 유지할 수 없기 때문에 불임성을 나타내는 것으로 추정된다.

한편 Yun과 Wagner(1987)에 의하면 사람 성장호르몬 유전자를 발현하는 형질전환 생쥐 중 암컷만이 절대적인 불임이고, 수컷은 정상적인 번식성을 유지한다고 보고하였다. 그러나, 본 실험의 결과에서는 일부의 암컷 형질전환 생쥐(F0)에서도 번식성이 확인되었으며, 수컷의 형질전환 생쥐에서도 많은 불임성을 나타내었다(Table 1).

이러한 차이에 대해 구체적인 실험을 수행하지 않았으므로 현 단계에서는 확실한 결론을 내릴 수 없으나,

아마도 번식력이 인정한 일부의 암컷 형질전환 생쥐에 있어서는 사람 성장호르몬의 생리활성이 번식성에 영향을 미치지 않은 정도로 약하게 작용하였던 것으로 추측된다. 그리고 이들 수컷 형질전환 생쥐의 불임 원인에 대한 연구결과는 아직 보고된 바 없지만, 아마 수컷의 불임성도 사람 성장호르몬의 과량분비로 인한 생리적 불균형에 기인하는 것으로 생각된다.

또한 본 실험의 결과로 우리는 외인성의 사람 성장호르몬이 생쥐의 번식성에 영향을 미치는 것으로 유추할 수 있으며, 따라서 미세주입 방법에 의한 형질전환 동물 생산에 있어서는 주입되는 외래유전자의 산물이 동물의 생리적인 측면에 미치는 영향 등을 고려하여 실험을 수행하여야만 될 것으로 생각된다.

2. 형질 유전성 검토

Table 2는 역교배에 의해 번식능력이 있는 형질전환 생쥐(F0)에서 태어난 산자들의 평균 산자수, 성비 및 형질 유전성을 나타내고 있다. 총 8마리의 형질전환 생쥐에서 번식능력이 확인되었는데(Table 1 참조), 이중 2마리는 육식습관(carnivalism)으로 본 실험결과에서 제외시켰다.

전체적으로 평균 산자수는 6.4마리로서 대조구(정상 생쥐)의 8.4마리보다 약간 저조하였으며, 성비에 있어서는 수컷이 다소 많이 태어나는 경향이 있었다. 여기서 group I은 멘델의 유전법칙에 준하여 유전되는 정상적인 형질전환 생쥐군 이고, group II는 낮은 형질 유전을 보이는 mosaic 형태의 형질전환 생쥐군이다.

Group I에 있어서 형질유전율은 50%(28/56마리)로, 이는 이형접합성(heterozygosity) 형질전환 생쥐의 형질유전율이 약 50%라고 보고한 Wagner 등(1983)의 결과와 일치하고 있다. 그리고 group II에 있어서 No.5는 5.4%(2/37마리)의 낮은 형질유전율을 보여주고 있으며, No.6은 형질이 전혀 유전되지 않았음을 나타내었다.

이러한 mosaic 형태의 형질전환 생쥐는 외래유전자의 삽입이 1세포기 이후에 일어나기 때문에 생기는 것으로 알려져 있고, 또한 이것은 미세주입에 의해 태어난 형질전환 생쥐 중 약 15%를 차지하며, Table 2(group II)의 결과와 같이 멘델의 유전법칙보다 낮게 형질유전되는 것으로 알려져 있다(Gordon과 Ruddle, 1981; Stewart 등, 1982; Hanahan, 1985). 이와 같이 정상적인 형질전환 생쥐와 mosaic 형질전환

Table 2. Germ line transmission of F₀ transgenic mice by backcross

Group	Founder number	Sex	No. progeny (litter size)	Sex ratio ^a (F/M)	No. positive ^a (F/M)	Transmission ^b (%)
I	1	Male	38 (6.3)	16/22	17 (8/9)	17 (44.7)
	2	"	6 (6.0)	2/ 4	4 (1/3)	4 (66.7)
	3	"	5 (5.0)	1/ 4	3 (1/2)	4 (60.0)
	4	Female	7 (7.0)	2/ 5	4 (2/2)	4 (57.1)
Sub-total			56 (6.2)	21/35	28 (12/16)	28 (50.0)
II	5	Male	37 (6.2)	16/21	2 (0/2)	2 (5.4)
	6	Female	10 (10.0)	4/ 6	0	0
Sub-total			47 (6.7)	20/27	2 (0/2)	2 (4.3)
Total			103 (6.4)	41/62	30 (12/18)	30 (29.1)
Control			50 (8.3)	24/26	0	0

^a(F/M) : female/male

^b(%) : No. positive/No. progeny × 100

생쥐는 형질유전에서 차이를 나타내고 있으며, 또한 DNA 형태별로도 구별할 수가 있다. 즉 정상적인 형질 전환 생쥐의 DNA 형태는 자손의 DNA 형태와 유사한 반면에 mosaic 형질전환 생쥐는 자손에 있어서 외래유전자의 copy 수가 증가하는 것으로 알려져 있다 (Constantini와 Lacy, 1981; Palmiter 등, 1984; Swift 등, 1984; Hanahan, 1985).

본 실험에서도 외래유전자 분석을 실시한 결과, 정상적인 형질전환 생쥐와 mosaic 형질전환 생쥐를 쉽게 구별할 수 있었다(Fig. I 과 II). 그림의 I은 어미(F₀)와 자손(A와 B)이 유사한 DNA 형태를 보임으로써 어미가 정상적인 형질전환 생쥐임을 알 수 있었으며, 그림의 II는 자손(F₁)의 외래유전자 copy 수가 증가된 것으로 보아 어미(F₀)가 mosaic 형태라는 것을 확인할 수 있었다.

그리고 제1세대 이후의 형질전환 생쥐에 있어서는 외래유전자의 형질이 멘델의 유전법칙에 준하여 유전되고 있었으며 이들의 체중을 이유 후 2주 간격으로 측정 한 결과, 어미와 마찬가지로 정상 생쥐보다 빠른 성장 속도를 보여 주었고, 약 1.5배 이상의 증체를 나타냄으로써 표현형적으로도 형질이 유전됨을 확인할 수 있었다(자료 미제출).

결론적으로 사람 성장호르몬 유전자가 삽입된 형질전환 생쥐에 있어서 많은 불임성을 나타내고는 있지만, 일단 번식능력이 확인된 개체에서는 유전자형(geno-

type) 및 표현형(phenotype)적 형질이 정상적으로 유전되고 있음을 알 수 있었다.

IV. 摘 要

형질전환 생쥐는 생쥐 MT-I promoter 가 융합된 사람 성장호르몬 유전자를 생쥐배에 주입하여 생산하였다. 이렇게 하여 생산된 형질전환 생쥐들은 역교배 및 형매교배를 통하여 그들의 형질유전성을 검토하였다. 미세주입에 의해 태어난 형질전환 생쥐(F₀)에 있어서 암수의 번식효율은 각각 17.6% (3/17마리)와 31.2% (5/16마리)로서 정상적인 생쥐의 번식효율보다 훨씬 저조한 성적이었다.

그러나 매우 흥미로운 사실은 다른 보고자들의 결과와는 다르게 일부 암컷의 형질전환 생쥐에서 번식능력이 확인되었다. 번식력이 인정된 6마리의 형질전환 생쥐 중 2마리는 mosaic 형태의 생쥐로 판명되었는데, 이들은 형질이 멘델의 유전법칙 수준보다 낮은 비율로 유전되고 있었고 DNA 분석을 실시하였던 바 외래유전자의 copy 수가 자손에 있어서 증가하였음을 알 수 있었다.

한편 제1세대 이후, 즉 F₁, F₂, F₃의 형질전환 생쥐군에 있어서 수컷의 번식성은 세대를 거듭함에 따라 점차적으로 증가하는 현상을 보이고 있으나, 암컷은 모

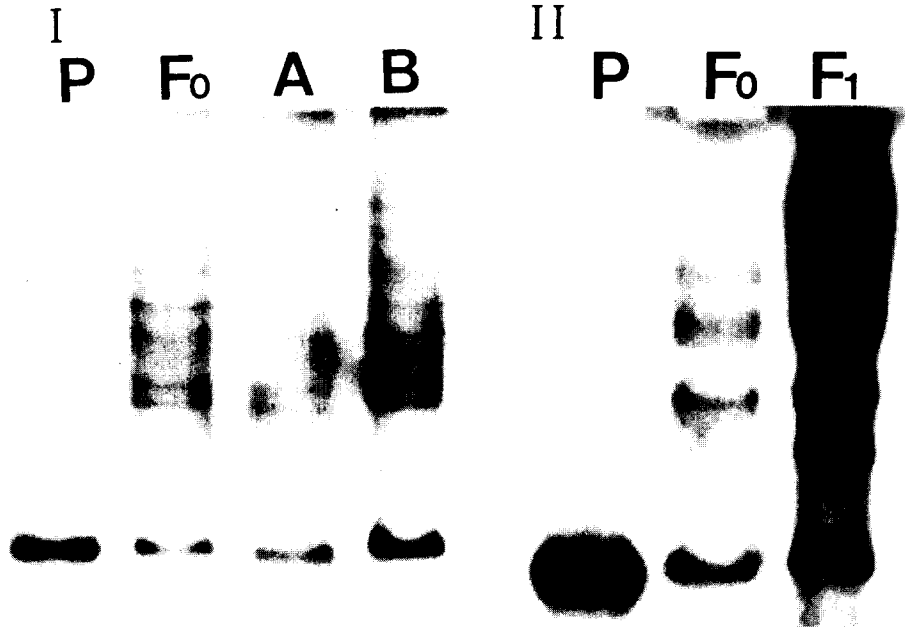


Fig. 1. Germ-Line Transmission of MThGH gene

I. DNA pattern in founder mouse(F₀) is very similar to that in progeny mice(A & B)

II. Mosaicism shows the enhanced copy numbers of transgene in progeny mouse(F₁) compared with the transgenic parent(F₀)

(P: MThGH DNA as a positive control(50 pg),

F₀: founder mouse,

F₁: successive progeny of mosaic transgenic mouse,

A: male of F₁ transgenic mouse,

B: female of F₁ transgenic mouse,

Each lane: EcoRI digest of 10 μg of mouse genomic DNA)

The probe used was the 1.1 kb PvuII fragment of MThGH gene

두 불임인 것으로 판명되었다. 결론적으로 사람 성장호르몬 유전자를 발현하는 형질전환 생쥐에 있어서 많은 불임성을 나타내고는 있지만, 번식력이 있는 개체에 있어서는 계대번식을 통하여 정상적으로 형질이 유전되고 있음을 알 수 있었다. 그리고 본 실험의 결과로서, 외인성의 사람 성장호르몬이 생쥐의 번식성에 영향을 미치는 것으로 유추할 수 있으며, 따라서 형질전환동물 생산에 있어서는 외래유전자 산물이 동물의 생리적인 측면에 미치는 영향 등을 고려하여 수행하여야 할 것으로 생각된다.

V. 引用文獻

1. Barkley, M.S. 1982. The temporal relationship between implantation, termination of prolaction surges, and increased testosterone secretion in the pregnant mouse. *Endo.* 110: 1592-1534.
2. Bartke, A., M. Doran and T.E. Wagner. 1989. Ovarian morphology in transgenic mice expressing the genes for human and bovine growth hormone. *Biol. Reprod.* (Suppl.) 38:

3. Bartke, A., R.W. Steger, S.L. Hodges, T.A. Parkening, T.J. Collins, J.S. Yun and T.E. Wagner. 1988. Infertility in transgenic mice with human growth hormone expression: Evidence for luteal failure. *J. Exp. Zool.* 248: 121-124.
4. Constatini, F. and E. Lacy. 1981. Introduction of a rabbit β globin gene into the mouse germ line. *Nature* 294: 92-94.
5. Covarrubias, L., Y. Nishida and B. Mintz. 1986. Early postimplantation embryo lethality due to DNA rearrangements in a transgenic mouse strain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6020-6024.
6. Covarrubias, L., Y. Nishida, M. Terao, P. Deustachio and B. Mintz. 1987. Cellular DNA rearrangements and early developmental arrest caused by DNA insertion in transgenic mouse embryos. *Mol. Cell. Biol.* 7: 2243-2247.
7. Gordon, J.W. and F. H. Ruddle. 1981. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* 214: 1244-1266.
8. Hanahan, D. 1985. Heritable formation of pancreatic β cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature* 315: 115-122.
9. Hogan, B., F. Constantini and E. Lacy. 1986. Manipulating the mouse embryo. pp. 174-176. Cold Spring Harbor Laboratory.
10. Murr, S.M., G.E. Bradford and I.I. Geschwind. 1974. Plasma luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin during pregnancy in the mouse. *Endo.* 94: 112-116.
11. Palmiter, R.D., T.M. Wilkie, H.Y. Chen and R.L. Brinster. 1984. Transmission distortion and mosaicism in an unusual transgenic mouse pedigree. *Cell* 36: 869-877.
12. Rassoulzadegan, M., P. Leopold, J. Vailly and F. Cuzin. 1986. Germ line transmission of autonomous genetic elements in transgenic mouse strains. *Cell* 46: 513-519.
13. Sapienza, C., A. Peterson, J. Rossant and R. Balling. 1987. Degree of methylation of transgenes is dependent on gamete of origin. *Nature* 328: 251-254.
14. Small, J.A., G.A. Scangos, L. Cork, G. Jay and G. Khoury. 1986. The early region of human papovavirus JC induces dysmyelination in transgenic mice. *Cell* 46: 13-18.
15. Stewart, T.A., E.F. Wagner and B. Mintz. 1982. Human β globin gene sequences injected into mouse eggs, retained in adults, and transmitted to progeny. *Science* 217: 1046-1048.
16. Swift, G.H., R.E. Hammer, R.J. MacDonald and R.L. Brinster. 1984. Tissue-specific expression of the rat pancreatic elastase 1 gene in transgenic mice. *Cell* 38: 363-366.
17. Tsao, S.G.S., F. Brunk and R.E. Pearlman. 1983. Hybridization of nucleic acids directly in agarose gels. *Analytical Biochemistry* 131: 365-372.
18. Wagner, E.F., L. Covarrubias, T.A. Stewart and B. Minz. 1983. Prenatal lethality in mice homozygous for human growth hormone gene sequences integrated in the germ line. *Cell* 35: 647-655.
19. Yun, J.S. and T.E. Wagner. 1987. Study of human growth hormone transgenic mice: Female reproductive system. The 10th Korea Symposium on Science and Technology 3-1: 279-282.
20. 이경광, 한용만, 남궁옥, 이철상, 김용주, 김재만, 김지영, 한문희. 1989. 생쥐에 있어서 사람 성장호르몬 유전자의 발현. *한축지* 31(3):

139-147.
21. 한용만, 이철상, 강만중, 유대열, 이경광. 1990.
Transgenic 생쥐생산에 있어서 미세주입시기 및

외래유전자의 농도가 삼입빈도에 미치는 영향. 한
축지 32(6) : 309-314.