

복제동물 생산을 위한 핵이식기법의 응용

이효종

경상대학교 수의과대학

Application of Nuclear Transplantation to Production of Cloned Animals

H. J. Lee

*Department of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine
Gyeongsang National University*

Summary

Nuclear transplantation technique is known as the most potential and efficient method for producing a large number of genetically identical animals from a single embryo. The technical development of nuclear transplantation in mammals and its application to the production of cloned animals are described. For the efficient and successful production of cloned embryos by nuclear transplantation, the right selection and micromanipulation of recipient eggs or embryos as capacious recipient cytoplasm, the adequate and beneficial preparation of multiple totipotent embryonic cells as donor nuclei, and also the fusion technique are very critical. Recent studies approaching to these critical points are introduced and discussed.

Up to date, the overall efficiency of production of cloned embryos and offspring in livestock is estimated to be low. Further technical development of nuclear transplantation will enable large-scale production of cloned livestock and in near future the commercial cloning of animals will become a reality.

서 론

핵이식기술은 전능한(totipotent) 시기에 있는 수정란의 할기세포로부터 다수의 핵을 얻어서 이를 탈핵된 다른 난자 또는 초기 수정란에 이식시키는 기술로서, 이 기술을 응용하면 하나의 수정란으로부터 수십 내지 수백개의 동일한 성과 유전형질을 가진 복제수정란을 작출할 수가 있으며 나아가서 이들 복제수정란을 수란축에 이식하여 복제동물을 생산할 수 있다. 이 복제동물 생산 기법은 첫째로, 경제적으로 유익한 가축을 위시한 각종 동물의 우량 유전자를 복제하고 선발하는데 매우 유리하여 수컷과 암컷 종축의 선발강도를 동시에 극대화 할 수 있어서 수정란 이식기술과 핵이식기법을 병용하여 유전적 소질이 극히 우수한 수정란을 다량 확대 보급할 수 있으므로써 가축의 번식에 있어서 종래에 사용되어 오던 교배법이나 인공수정법에서 탈피하여 번식효율을 증진시

키는데 새로운 전기를 마련할 수 있을 것이다. 특히 우리나라와 같이 우량 종축의 자원이 부족한 실정에서는 외국에서 값비싼 종축을 다량 수입하지 않고서도 짧은 기간에 종축을 증식 및 확보하는데 매우 효과적인 방법이다. 둘째로, 한개의 수정란에서 만든 많은 복제수정란 중에서 1~2개 수정란을 골라 이들의 성을 판별한 다음 원하는 성의 복제수정란만을 수태 생산함으로써 오랜 숙원의 하나인 가축산자의 성을 인위적으로 지배할 수 있게 하고, 암컷만을 생산케 하면 가축의 증식율과 생산성을 획기적으로 향상시킬 것이다. 셋째로, 복제동물은 정교한 동물실험에서 개체간의 차이를 줄일 수 있어서 정확한 결과를 얻는데 매우 유익하게 사용될 수 있을 뿐만 아니라 실험에 사용될 동물의 수도 줄일 수 있어서 적은 반복수로 정확한 정보를 얻는 데 유익하다. 예를 들면, 젖소의 우유생산량에 관한 비교시험을 수행할 경우 복제동물 한쌍은 무작위로 선발된 젖소 20마리

를 사용하여 얻은 data와 맞먹는 정보를 얻을 수 있다. 네째로, 외래유전자주입법과 핵이식기법을 병용하여 transgenic 수정란의 복제가 가능하게 될 뿐만 아니라 주입된 외래유전자의 발현을 조기에 확인하고 선별할 수 있으므로 transgenic animal의 자출효율을 개선시킬 수 있게 될 것이다. 이 외에도 복제동물은 서로 간에 거부반응이 적으므로 장기이식 연구 등에도 이용될 수 있는 등 이용가치가 매우 높다.

유전적으로 동일한 동물을 생산하기 위한 하나의 수단으로서 수정란의 양분에 의한 일란성 쌍태 생산 기법이 연구되어 왔으나, 이러한 기법으로서는 하나의 수정란으로부터 최대한 복제 생산할 수 있는 산자의 수는 2 내지 4마리 밖에 되지 않는 한계점이 있다.

핵이식 기술에 의한 수정란의 cloning의 가능성은 1952년 Briggs와 King에 의하여 양서류에서 처음으로 시사되었다. 포유류에서는 Illmensee와 Hoppe(1981)가 처음으로 생쥐 수정란에 핵이식을 시도하여 성공함으로써 핵이식기법에 관심이 집중되기 시작하였다. 그러므로 포유동물에서 핵이식기법은 10년 내외의 비교적 짧은 역사를 가지고 있다. 처음에 이들이 사용한 기법은 채취된 핵을 미세한 피펫을 사용하여 수정란의 세포질 내에 직접 주입하는 microsurgical method를 활용하였으나 그 성공률이 낮았고 또한 수정란에 많은 손상을 입혔다. 1983년 McGrath와 Solter는 불활화된 Sendai virus를 이용한 핵-세포질 융합법을 개발하여 핵이식기법의 개선 및 융합을 향상을 이룩하였다. 한편, Kubiak와 Tarkowski (1985)는 Zimmermann의 전기융합법을 응용하여 종래의 핵이식기법을 더욱 개선시키고 가축에서의 응용성을 높혀 핵이식기법의 산업적 실용화에 더욱 이바지하게 되었다.

가축에서는 Willadsen(1986)이 면양에서 핵이식에 의한 산자생산에 성공하였다는 보고가 있는 이래, Prather 등(1987)은 소에서 이에 의한 산자생산에 성공하였으며, 또한 최근 Willadsen 등(1991)은 소의 8- 내지 64- 세포기의 핵을 이식하여 33.1%의 복제산자를 생산함으로써 핵이식기법에 의한 복제산자 생산 효율이 향상되고 있다. 한편 Bondioli 등(1990)은 소의 미수정란에 16- 및 64- 세포기의 핵을 이식하여 체내 발달시킨 다음 이를 다시 recycling method로 핵이식을 실시하여 92마리의 신생자를 생산하였으며

이중 7마리가 유전적으로 동일한 산자였다고 하였다. 최근에 Stice 등(1991)도 소의 32에서 64- 세포기의 핵을 3세대까지 recycling method로 핵이식을 실시하는데 성공하였다는 보고가 있어 앞으로 이들 핵이식 수정란을 체내 또는 체외에서 배양하여 상실 배 혹은 포배로 발달시킨 다음 이를 핵의 공급원으로 재이용하는 recycling nuclear transplantation 기법을 응용하면 그 수를 기하급수적으로 증가시킬 수 있다. 이러한 recycling nuclear transplantation 기법은 가장 최근에 소개된 방법으로서 미개척 분야이다.

국내에서의 핵이식에 관한 연구는 극히 미진하고 대상동물도 생쥐와 같은 실험동물의 범주에서 벗어나지 못하여 왔다. 국내에서는 이철상 등(1989)이 처음으로 핵이식에 의한 생쥐 생산에 성공하였다는 보고가 있었고, 본 연구자도 1988년도 부터 생쥐 수정란의 핵이식에 관한 연구에 임하여 오고 있으며, 일차적 연구(1988-1989)에서는 인위적으로 모성전핵만으로 이루어진 gynogenetic embryo와 부성전핵만으로 이루어진 androgenetic embryo를 창출하여 모성 genome 과 부성 genome의 개체발생능력을 조사하였으며 아울러 핵이식 기법으로 28마리의 핵치환된 신생자를 창출한 바가 있다(Choe et al., 1989). 이차적 연구(1989-1990)에서는 핵이식에 적합한 donor nucleus와 recipient cytoplasm의 시기를 알아보기 위하여 2-, 4-, 및 8- 세포기의 수정란으로부터 채취된 핵을 탈핵된 2- 세포기의 수정란에 이식하여 핵융합효과, 체외발달 능력 및 수란생쥐 내에 이식하여 체내에서의 개체발생능력 등을 조사하였으며, 이들의 핵이식된 수정란으로 부터 113마리의 신생자를 얻었으며, 이중 3마리가 유전적으로 동일한 산자를 2조 생산한 바 있다(Park et al., 1990).

앞으로 핵이식 기법의 확립과 아울러 이의 산업적 실용화를 위하여는 donor핵의 다량 확보, recipient cytoplasm의 경제적 공급, 핵융합 효율의 개선, 핵이식 배의 체외배양법의 개선 등 많은 문제점이 해결되어야 한다.

본문에서는 위의 문제점들을 해결하기 위한 여러 연구자들의 핵이식에 관한 문헌적 고찰을 통하여 경제적으로 유익한 가축에서 복제동물을 생산하기 위한 보다 효율적이고 실용적인 방안들을 제시하고자 한다.

핵의 공급원 확보 (Preparation of donor nuclei)

일반적으로 세포분화가 일어나기 전의 분할기에 있는 포유동물 수정란의 할구세포들은 전능성(totipotency)을 가지고 있어서 하나의 할구세포만으로도 배반포를 형성하고 나아가서 한 개체를 이룰 수 있는 것으로 알려져 있다. 이론적으로 분할기에 있는 수정란의 핵 하나 하나는 서로 같은 유전자를 가지고 있으므로 하나의 수정란으로 부터 유래된 개체들은 같은 성, 표현형 및 유전형질을 가지고 태어난다. 이러한 개체들의 집단을 "cloned animal"이라고 부른다. 수정란의 양분법에 의하여 일란성 쌍태아를 생산할 수도 있으나 그 수는 2 내지 최대한 4마리를 벗어날 수 없다. 할구세포의 분리 배양법에 의하여는 2-세포기의 수정란에서 분리된 할구세포는 비록 세포수는 정상보다 적지만 배반포를 형성하고 이들을 이식하면 정상에 가까운 수태율(약 68%)을 나타낸다(Willadsen, 1981). 또한 4-세포기의 수정란에서 분리된 4개의 할구세포도 각각 배반포를 형성하지만 그 형성율은 낮아지고, 세포수도 정상 배반포에 비하여

약 1/4 밖에 되지 않으며 이들을 이식하면 수태율은 약 50%로 떨어진다.(Willdsen, 1981) 그러나 8-세포기의 수정란으로 분리된 8개의 할구세포는 극히 일부 분만 배반포를 형성하고 이들을 이식하면 수태율은 약 5% 밖에 되지 않는다(Willdsen, 1989). 그러므로 수정란의 양분법이나 할구세포의 분리배양법으로는 효과적으로 복제동물을 생산할 수 없다.

핵이식 기법을 활용하면 수정란의 양분법이나 할구세포의 분리배양법보다 더욱 효과적으로 복제동물을 생산할 수 있다.

핵이식 기법을 시행하기 위하여는 많은 핵을 공급할 수 있는 수정란의 확보가 중요하다. 이론적으로 분할 후기에 있는 수정란에서 핵을 채취할 경우 유전적으로 동일한 핵의 공급수는 많아지고 따라서 복제동물의 생산효율도 높아질 수 있다.

그러나 분할과정이 더욱 진행된 핵을 사용할 수록 핵융합 성공률 및 복제수정란의 발달능력은 줄어드는 것으로 알려져 있다. Table 1, 2, 및 3에서 보는 바와 같이 생쥐에서 2-세포기에서 8-세포기까지의 수정란에서 채취된 핵을 사용하여 핵이식을 실시하였을 때 그 융합율, 체외발달율 및 체내 이식 후 신생자

Table 1. Successful injection and fusion of nuclei from mouse embryos at different development stages

| Stage to nuclear donor | Recipient embryos | No. and(%) of recipient embryos enucleated / used | No. and(%) of embryos injected / enucleated | No. and(%) of embryos fused / injected | Overall success rate(%) |
|------------------------|-------------------|---|---|--|-------------------------|
| 2-cell | Enucleated 2-cell | 285 / 313(91.0) | 273 / 285(95.7) | 242 / 273(88.6) | 77.3 |
| 4-cell | Enucleated 2-cell | 281 / 305(92.1) | 263 / 281(93.6) | 229 / 263(87.1) | 75.1 |
| 8-cell | Enucleated 2-cell | 262 / 288(90.9) | 242 / 262(92.3) | 205 / 242(84.7) | 71.2 |

There are no significant ($P < 0.05$) differences between the cell stages(Park et al., 1990).

Table 2. Preimplantation *in vitro* development of nuclear transplant mouse embryos by stages of nuclear donor

| Stage of nuclear donor | No. of nuclear transplant embryos | No. and(%) of embryos developed to | | |
|------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------|------------------------|
| | | 4-cell | Morula | Blastocyst |
| 2-cell | 230 | 204(88.7) ^b | 182(79.1) ^b | 176(76.5) ^b |
| 4-cell | 222 | 186(83.8) ^b | 161(72.5) ^b | 152(68.4) ^b |
| 8-cell | 203 | 132(65.0) ^a | 109(53.7) ^a | 98(48.3) ^a |

The numbers with the different superscript denote significant ($P < 0.05$) difference between the cell stages of nuclear donor(Park et al., 1990).

Table 3. Production of live young after transfer of nuclear transplanted embryos in recipient mice

| Stage of nuclear donor | No. of pregnant / No. of recipients used (%) | No. of young / No. of embryos transferred (%) |
|------------------------|--|---|
| Intact blastocyst | 22 / 35(62.8) ^b | 89 / 182(48.9) ^c |
| 2-cell | 19 / 32(59.4) ^b | 58 / 156(37.1) ^b |
| 4-cell | 16 / 30(53.3) ^b | 40 / 135(29.6) ^b |
| 8-cell | 6 / 25(24.0) ^a | 15 / 92(16.3) ^a |

The proportions with the different superscript denote significant ($P < 0.05$) difference between the cell stages of nuclear donor (Park et al., 1990).

생산율은 발달된 수정란의 핵일수록 낮아지는 경향을 나타낸다. 그 요인 중의 하나는 수정란의 발달이 진행될수록 세포들은 더욱 분화되어 전능성이 떨어지고 미세조작이 어렵기 때문이다. 그러나 발달된 수정란일 수록 핵융합 및 체내·외 발달율에서는 감소하지만 핵의 공급수가 많으므로 복제수정란의 생산효율은 높으며 대동물에서는 상실배 또는 배반포의 수정란을 비외과적으로 자궁에서 회수할 수 있으므로 수정란의 채취가 용이한 장점이 있어, 초기 수정란보다는 분할 후기의 수정란을 선택하는 것이 보다 실용적이며 효율적인 핵의 확보 방법이다.

포유동물 수정란의 형태학적 분화는 compaction 시기에 처음 나타나기 시작하는데 이때 외측에 있는 세포들은 분극(polarization)이 일어나서 영양세포(trophectoderm cell)로 되고 이 세포들은 태아의 조직을 형성하는데 제한적 능력을 가지고 있다. 그러므로 immunosurgical method를 이용하여 외측의 영양세포를 분리하여 제거하고 내세포괴의 세포들을 핵의 공급원으로 사용하는 것이 바람직하다. 나아가서 이 내세포괴로부터 pluripotential stem cell line

을 구축하고 이들 stem cell들을 feeder cell layer 위에서 배양 증식시켜 핵의 공급원으로 사용하는 방법도 앞으로 추구해 볼만 하다.

최근의 보문을 근거로 한 가축에서의 핵이식 수준을 조사하여 보면, Marek 등(1990)은 소에서 수정후 5 및 6일된 수정란의 핵을 사용하여 평균 71%의 핵융합율을 얻고 있으며 이들을 면양의 난관에 이식하여 평균 25%의 상실배 또는 배반포 형성율을 얻고 있다(Table 4). Westhusin 등(1991)에 의하면 수정후 5일(32-세포기) 및 6일(64-세포기)된 소 수정란의 핵을 이용한 실험에서 핵 융합율은 각각 57.3 및 62.2%을 나타내고 있고 이들의 체내 배양에 의한 상실배 또는 배반포 형성율은 각각 20.7 및 23.5%을 나타내고 있다(Table 5).

Embryonic genome의 transcriptional activation은 소에서는 8-세포기에, 면양에서는 8-에서 16-세포기에 일어나는 것으로 알려져 있으나 transcriptional activation이 일어난 후의 수정란으로부터 핵을 채취하여 핵이식을 시행하여도 그 발달 능력에는 차이가 없으므로 transcriptional activation 그

Table 4. The effect of age of donor embryos on the development of embryos produced by nuclear transfer

| Donor embryo age | Average cell number | No. attempted fusions | No.(%) successful fusions | No. transferred sheep | No. recovered sheep | No.(%) morula and blastocysts |
|------------------|---------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------|-------------------------------|
| 5.0 day | 28.2 | 882 | 636(72) ^a | 882 | 842(95) | 196(23) ^a |
| 5.5 day | 30.8 | 212 | 149(70) ^a | 212 | 197(93) | 55(28) ^{ab} |
| 6.0 day | 48.3 | 87 | 56(64) ^a | 87 | 84(97) | 29(35) ^a |
| Total | | 1181 | 841(71) | 1181 | 1123(95) | 280(25) |

Different superscripts within the same column denote a significant difference ($P < 0.05$) (Marek et al., 1990).

Table 5. Comparison of 5-day, 6-day, frozen-thawed 5-day, and nuclear transfer embryos on the efficiency of nuclear transfer

| Donor embryo type | No. attempted fusions | No.(%) successful fusions | No.(%) transferred to sheep | No.(%) recovered from sheep | No.(%) recovered viable ^a |
|---------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| 5-day | 513 | 294(57.3) ^b | 493(96.1) | 444(90.1) | 92(20.7) ^b |
| 6-day | 405 | 252(62.2) ^b | 375(92.5) | 357(95.2) | 84(23.5) ^b |
| Frozen-thawed 5-day | 144 | 111(77.1) ^b | 144(100) | 127(88.2) | 32(25.2) ^b |
| Nuclear transfer | 223 | 142(63.7) ^b | 223(100) | 199(89.2) | 31(15.6) ^b |

^aViable=compact morula or blastocyst when collected from sheep.

^bDifferent superscripts within the same column denote a significant difference $P < 0.05$ (ANOVA) (Westhusin et al., 1991).

자체는 핵이식의 승패에 큰 영향을 입하지 않는다는 의견이 지배적이다 (Table 6).

핵을 다량 확보할 수 있는 더욱 효과적인 방법은 반복핵이식기법 (recycling nuclear transplantation) 을 활용하는 것이다. 이 기법은 Willadsen (1989)에 의하여 소의 수정란을 사용하여 최초로 실험적 연구에 성공함으로써 실현 가능성이 입증되었다. 반복핵

이식기법은 핵이식으로 발달된 상실배 또는 배반포기의 수정란 (제1세대)을 핵의 공급원으로 재사용하고 이들의 일부는 배양하여 상실배 또는 배반포 (제2세대)로 발달시켜 또다시 핵의 공급원으로 사용하는 기법이다.

이러한 반복핵이식 기법을 활용하면 핵을 무한정 공급받을 수 있으므로 앞으로 이 기법이 발달하게

Table 6. Development to morula and blastocyst *in vivo* of nuclear transplanted embryos derived from the fusion of enucleated secondary oocytes to embryonic cells at different stages of transcriptional activity

| Transcriptional activity | Nuclear donor embryonic stage | Sheep (Robel & Stice) (1989) | Sheep (Smith & Wilmut) (1989) | Cattle (Prather et al.) (1987) |
|--------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| PRE- | Up to 8-cell | 42.1% | — | 11.7% |
| PERI- | 16-cell | 48.3% | 34.7% | 16.0% |
| POST- | Over 16-cell | — | 56.3% | 8.3% |

* Recipient cytoplasm derived from *in vivo* and *in vitro* matured oocytes.

Table 7. Fusion rate and *in vivo* developing rate of multiple generation bovine embryos

| Donor embryo | Fusion rate (%) | Morula-blastocyst (%) | Av. cell No. of resulting |
|----------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Original (G=0) | 584 / 887 ^a (66) | 84 / 417 ^a (20) | 27.5 |
| 1st Gen. NT | 576 / 961 ^b (60) | 63 / 610 ^b (10) | 27.5 |
| 2nd Gen. NT | 230 / 441 ^c (52) | 49 / 255 ^a (19) | 35.4 |
| 3rd Gen. NT | 67 / 124 ^{bc} (54) | 8 / 68 ^{ab} (12) | not counted |

^{abc} Numbers in columns with different letters are significantly different at the 0.01 level for fusion and at 0.001 for development to morula-blastocyst stage (Stice et al., 1991).

되면 핵이식 기법의 실용화가 용이하게 되리라 믿어진다.

Table 7에 나타난 바와 같이 핵이식을 반복하면 할수록 핵융합율 및 상실배-배반포발달율은 점차 저하되는 경향이 있으므로 이를 극복하기 위한 기술 개발이 필요하다.

수핵난자의 확보

(Preparation of recipient cytoplasm)

핵을 수여받을 난자 또는 수정란의 적절한 선택과 준비는 핵이식의 성패를 좌우하는 중요한 요건 중의 하나이다.

수핵난자로 사용할 수 있는 것은: (1) 성숙된 난자, (2) 수정직후의 전핵기에 있는 접합체(pro-nuclear zygote), (3) 2-세포기에 있는 수정란(2-cell stage embryo), 또는 (4) 인공적으로 활성화된 난자(parthenogenetically activated eggs) 등이다.

수핵난자는 먼저 hyaluronidase를 처리하여 난구세포를 제거하고 cytoskeletal inhibitor인 cytochalasin B(5-7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)가 함유된 배양액에 넣고 differential interference contrast lens가 부착된 도립현미경 아래에서 미세조작기법으로 탈핵시켜 사용한다.

생쥐에서는 전핵기의 접합체를 수핵난자로 선택되었을 때 2-세포기 이후의 수정란에서 채취된 핵을 주입하면 거의 발생이 일어나지 않는다. 그러나 2-세포기의 수정란을 수핵난자로 사용하였을 때는 분할후기의 수정란에서 채취된 핵을 주입하여도 높은 발생율을 보인다. 이러한 현상은 생쥐에서는 2-세포기에 모성유래 유전자의 수정란유래 유전자로의 전환이 시작되기 때문이라고 한다.

Bondioli 등(1990)은 소에서 hCG주사후 25시간

이내에 채란된 난자와 48시간 이후에 채란된 난자를 수핵난자로 사용하였던 바 핵이식 후 배반포로의 발달율에서는 유의할 만한 차이점은 발견하지 못하였다. 그러나 Prather 등(1987)은 소에서 발정개시 후 36시간에 채란된 난자는 48시간에 채란된 난자를 수핵난자로 사용하였을 때 핵융합율은 각각 67 및 68%로서 유의할 만한 차이가 없었으나 상실배-배반포 형성율은 20 및 6.7%로서 유의적인 차이가 있었다고 한다(Table 8). 그러나 소에서는 정확한 배란시기를 알아내기가 어려운 문제점이 있다. 그리고 난자의 성숙과 배란시기는 항상 일치한다고 보기가 어렵다. 배란 후 시간이 경과된 난자는 배란 직후의 난자에 비하여 활성화는 잘 일어나지만 생존력이 떨어지고, 이와는 반대로 배란 직후의 난자는 시간이 경과된 난자에 비하여 활성화는 잘 일어나지 않지만 생존력은 높은 것으로 알려지고 있다(Collas & Robl, 1990).

소, 면양, 돼지 등 중대가축에서는 체내 또는 체외에서 성숙된 미수정 난자를 수핵난자로서 많이 이용하고 있다. Table 9에 나타난 바와 같이 면양에서 체내에서 성숙된 난자를 수핵난자로 사용하였을 경우에는 핵융합율은 88%이고 상실배로의 발달율은 66%인데 비하여 체외에서 성숙된 난자를 사용하였을 경우에는 핵융합율은 79%로 낮으며 상실배로의 발달율은 45%로 낮아지는 경향이 있다. 이러한 문제는 앞으로 기술개발을 통하여 극복되리라 믿어진다.

근래에는 난자의 체외성숙 배양에 관한 연구가 국내·외에서 활발히 이루어지고 있고, 이 기술이 확립되면 도축장에서 채취해온 가축의 난소로부터 미성숙 난자를 채란하여 이들을 체외성숙시켜 수핵난자로 사용하게 되면 값싸고 용이하게 그리고 한번에 많은 수의 난자를 얻을 수 있을 뿐만 아니라 핵이식

Table 8. *In vivo* development(ovine oviduct) of bovine embryos after nuclear transfer to oocytes matured *in vitro* OR *in vivo*

| Type of oocyte | No. attempted fusions | No.(%) successful fusions | No. transferred sheep | No. recovered sheep | No.(%) morula and blastocysts |
|-----------------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------|-------------------------------|
| <i>In vitro</i> -matured | 243 | 153(63) ^a | 151 | 64(95) | 5(7.8) ^a |
| 36h <i>in vivo</i> -matured | 201 | 135(67) ^a | 133 | 76(57) | 15(20) ^{ab} |
| 48h <i>in vivo</i> -matured | 114 | 77(68) ^a | 73 | 45(63) | 3(6.7) |

(Revised from Prather et al., 1987)

Table 9. Assessment of oocyte source for ovine nuclear transfer

| Oocyte source | Donor embryos | Pre-fusion embryos | Fused (%) | Cleaved by 24h(% fused) | 8 / 16-cell by 72h(% fused) |
|-----------------|---------------|--------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------------|
| <i>In vitro</i> | 8 | 190 | 150(79) ^a | 37(25) ^c | 68(45) ^c |
| <i>In vivo</i> | 7 | 116 | 102(88) ^b | 44(43) ^d | 67(66) ^d |

^{a,b} Values differ (P<0.05); ^{c,d} Values differ (P<0.02) (McLaughlin et al., 1991).

에 적합한 난자의 성숙시기를 판정하여 균일한 결과를 얻을 수 있는 장점이 있다. 이 기법이 확립되면 핵이식 기술의 실용화가 훨씬 용이하게 될 것이다.

핵-세포질 융합 기술 (Nuclear-cytoplasm fusion techniques)

핵이식 기법에서 핵-세포질 융합 기술은 수정란의 미세조작기술과 아울러 매우 중요한 요건이며 융합율의 개선은 특히 대가축의 핵이식 기법 발달 및 상업적 실용화에 필수적 관건이 된다. 핵-세포질 융합 기술은 다음 3가지 방법이 고안되어 활용되어져 오고 있다.

1. 미세외과적 방법(Microsurgical method)

이 방법은 제일 먼저 고안된 방법으로서 1955년 Danielli 등이 Amoeba의 핵이식에 사용되어 오던 것을 1981년 Illmensee와 Hoppe가 생쥐 수정란의 핵이식에 응용하였다. 공핵수정란(nuclear donor embryo)의 투명대를 제거하고 내세포괴 할구세포를 분리한 다음, 이를 micro transfer pipette에 흡인하여 탈핵된 수핵수정란(nuclear recipient embryo)의 투명대와 형질막을 관통하여 세포질내에 직접 핵을 주입하는 방법이다. 이 방법은 수정란에 손상을 많이 입히는 단점이 있어서 융합성공율은 30-40%로 낮다.

2. 센다이 바이러스 매개에 의한 방법(Sendai virus-mediated fusion method)

이 방법은 McGrath와 Solter(1983)가 고안한 방법으로서 미세외과적 방법에 비하여 비파괴적이며 핵융합율도 90% 이상으로 높다. 직경 15 μm 진후의 micropipette을 투명대에 통과하여 삽입하고 형질막은 관통하지 않은 상태에서 핵 부근으로 micropipette

을 이동시킨 다음 약한 음압으로 형질막에 쌓인채로 핵을 채취한다.

채취된 핵은 미량의 1,000 HAU 이상의 역가를 가진 불화화된 Sendai virus와 같이 탈핵된 수핵수정란의 투명대와 형질막 사이에 주입하면 1시간 이내에 핵-세포질 융합이 일어난다. 물론 이러한 과정을 거치는 동안 수정란은 5-7.5 Unit의 Cytochalasin B처리를 받게 된다. Sendai virus에 의한 핵융합법은 virus의 준비에 시간과 노력이 많이 들고, Parainfluenza virus이기 때문에 사람에게 감염의 우려가 있으며, 효능이 균일하지 않고, 한번 핵이식에 사용된 수정란을 재사용하였을 때에는 세포표면 receptor의 손실로 인하여 핵융합율이 급격히 떨어지는 단점들이 있다. 그러므로 이 방법은 생쥐에서는 많이 이용되어 왔으나 가축에서는 잘 이용되지 않고 있다.

3. 전기적 방법(Electrofusion method)

이 방법은 Zimmermann과 Vienker(1982)가 분화된 동물세포 및 식물의 원형질체(protoplast)의 융합에 쓰이던 것을 Kubiak와 Tarkowski(1985)가 생쥐 수정란의 핵이식에 응용하여 성공함으로써 널리 보급되어 오고 있다. 이 방법은 Sendai virus-mediated fusion method에 비하여 훨씬 조작이 간편하고 융합율도 70-90%를 보이고 있으므로 가축에 있어서는 이 방법이 보다 실용적이며 효과적이다.

전기적 방법을 사용하기 위하여서는 우선 Zimmermann Cell Fusion Unit(GCA Corp. Chicago, U.S.A.) 또는 BTX Electro Cell Manipulator(BTX Co. San Diego, U.S.A.) 같은 전기 핵융합장치가 필요하다. 미세조작에 의하여 핵이 주입된 수정란을 Zimmermann Cell Fusion medium이나 0.35M mannitol 용액에 넣어 fusion chamber에 담아서 교류전류(600-1,000 kHz, 5-6V)를 주어서 수정란을 일렬로 정렬시킨 다음 직류전류(15-160V, 30-150 μSec)

를 주어서 핵-세포질 융합을 유도한다.

전류의 전압과 통전시간은 동물의 종류, 수정란의 발달 상태 및 보고자에 따라 차이가 있다. 면양에서는 20 Volts, 100 μ Sec의 전류로 90%의 핵융합율을 보이고 있고, 돼지에서는 120 Volts, 30 μ Sec의 전류로 69%의 핵융합율을, 그리고 소에서는 100 Volts, 20 μ Sec의 전류로 80%의 핵융합율을 보이고 있다 (Table 10).

Long 등(1991)에 의하면 소 수정란의 전기적 자극에 의한 핵이식에 있어서 직류전압을 200 Volts 보다는 300 Volts로 하였을 때 핵융합율이 80%로 유의적으로 높았으나 와해된 수정란의 수가 증가되는 단점이 나타났다(Table 11). 또한 통전시간을 25 μ Sec로 설정하였을 때 보다는 50 내지 75 μ Sec로 설정하였을 때 유의성은 없으나 핵융합율은 상승하였지만

와해된 수정란의 수가 증가되는 단점이 역시 나타났다(Table 12).

앞으로 동물의 품종 및 수정란의 발달 상태에 따른 직류 전압과 통전 시간 및 횟수의 정확한 설정에 관한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 사려되며 나아가서 이들 핵융합 수정란의 체내·외 배양 효율 개선 및 수란축에 이식 후 산자 생산율의 향상이 이루어져야만 핵이식의 실용화가 가능하리라 본다.

핵이식 수정란의 체내·외 배양과 발달 (*In vivo* and *In vitro* development of nuclear transplant embryos)

핵이식된 수정란의 체내배양은 면양과 토끼의 난관이 많이 이용된다. Willadsen(1986)은 8- 또는 16-

Table 10. Efficiency of electrofusion in various species of animals

| Species | DC voltage | Duration of pulse(usec) | Fusion rate(%) | No. of embryos developed to | | Reference |
|---------|-------------|-------------------------|----------------|-----------------------------|---------------|--------------------------|
| | | | | Blastocysts(%) | Offspring(%) | |
| Mouse | 15 | 150 | 82 | 15 / 18(83) | | Tsunoda et al. (1988) |
| | 10 | 200 | 92 | 18 / 22(82) | 15 / 65(23) | Tsunoda et al. (1989) |
| Rabbit | 160 | 60 | 84 | 16 / 98(16) | 20 / 74(27) | Stice and Robl (1988) |
| | 3.6 KV / Cm | 60×3 times | 94 | 34 / 71(48) | 12 / 19(63) | Collas and Robl (1990) |
| Sheep | 15 | 100×3 times | 90 | 14 / 29(48) | 2 / 31(10) | Willadsen (1985) |
| | 20 | 100 | 90 | 9 / 16(56) | 4 / 22(18) | Smith and Wilmut(1989) |
| | 80 | 100 | 88 | 67 / 102(66) | | McLaughlin et al. (1991) |
| Pig | 120 | 30 | 69 | 6 / 16(38) | 7 / 56(13) | Prather et al. (1989) |
| Cattle | 15 | 50×3 times | 72 | 29 / 84(35) | 104 / 463(23) | Bondioli et al. (1990) |
| | 15 | 50×3 times | 77 | 32 / 127(25) | | Westhusin et al. (1991) |
| | 100 | 20 | 80 | 5 / 38(17) | | Robl et al. (1987) |

Table 11. Effect of DC volts on the fusion percentage and cell lysis in nuclear transplant bovine embryos

| DC volts* | No. pulsed | No. fused (%) | No. lysed (%) |
|-----------|------------|---------------------|--------------------|
| 200 | 62 | 29(47) ^b | 4(6) ^a |
| 250 | 61 | 43(70) ^a | 4(7) ^a |
| 300 | 61 | 49(80) ^a | 9(15) ^a |

^{a,b} Different superscripts denote a significant difference, analysis of variance(P<0.05).

* Pulse Duration=25, 50 and 75 μ Sec combined(Long et al., 1991).

Table 12. Effect of pulse duration on fusion percentage and cell lysis in nuclear transplant bovine embryos

| Pulse duration** (μ Sec) | No. pulsed | No. fused (%) | No. lysed (%) |
|----------------------------------|------------|---------------------|---------------------|
| 25 | 61 | 38(62) ^c | 0(0) ^c |
| 50 | 61 | 42(69) ^c | 1(2) ^c |
| 75 | 62 | 41(66) ^c | 16(26) ^d |

^{c,d} Different superscripts denote a significant difference, analysis of variance($P < 0.05$).

** DC Volts=200, 250 and 300 combined(Long et al., 1991).

세포기의 수정란유래 할구세포를 핵이 있는 미수정란 또는 탈핵된 미수정란에 주입하고 Sendai virus 또는 전기융합방법으로 핵-세포질 융합을 유도한 다음 한천에 포매하여 면양의 난관내에 주입하여 체내배양을 시행하였던 바, 8-세포기의 수정란유래 할구세포의 핵과 탈핵된 미수정란의 세포질로서 이루어진 핵이식 수정란은 Sendai virus로 핵융합을 유도한 경우 33.3%가, 전기융합을 유도한 경우 42.1%가 배반포로 발달하였고, 16-세포기 수정란유래 할구세포의 핵과 탈핵된 미수정란의 세포질로서 이루어진 핵이식 수정란은 48.3%가 배반포로 발달하였다고 한다(Table 13).

생쥐에서는 핵이식된 수정란을 체외배양하면 배반포로의 발달이 용이하게 일어나고 비교적 다른 동물에 비하여 발달율도 높다. Robl 등(1986)은 2-세포기의 핵을 탈핵된 수정란에 이식하였을 때 8-세포기의 핵을 이식하였을 때보다 체외에서 배반포 형성이 높다고 하며(93% vs 48%), 발달된 수정란으로부터 공급받은 핵일수록 체외발달 능력이 떨어지는 현상을 Tsunoda 등(1987) Kono와 Tsunoda(19

89) 및 Park 등(1990)에 의하여 재확인 되었다.

발달된 수정란의 핵일수록 일정한 기간 배양 후 분열된 핵의 수는 정상수정란에서의 핵의 수보다 적은 경향이 있다(박 등, 1990; Robl et al., 1986). 그리고 핵이식된 배반포는 정상 배반포에 비하여 유의적으로 적은 수의 할구세포를 가지고 있으므로써 발달의 저조성을 나타내고 있으며 따라서 이들 핵이식 수정란을 체내이식하면 수태율 및 산자생산율도 낮아진다.

Prather 등(1987)은 핵이식된 소 수정란을 면양의 난관내에서 발달시켰던 바 20%가 상실배 또는 배반포로 발달하였다고 한다. Bondioli 등(1990)은 35%의 상실배 또는 배반포 발달율을 얻고 있다. 그러나 Yang 등(1991)은 핵이식된 소 수정란을 2일간 체외 배양하여 24%만이 2- 내지 8-세포기로 성장하였다고 한다. 소에서는 8-세포기에 "Cell block" 현상이 있으므로 이들의 배반포 형성율은 더욱 낮아질 것이다. 근래에 소, 돼지, 면양 등 가축 수정란의 체외배양기법이 눈부시게 발달되고 있으므로 앞으로 핵이식 수정란의 체외배양기법도 향상되어질 것이며 따라서

Table 13. *In vivo* development of nuclear transplant ovine embryos in ovine oviducts

| Stage of nuclear donor embryos | Recipient eggs (unfertilized) | Fusion method | No. of embryos cultured | No. of embryos developed to blastocyst(%) |
|--------------------------------|----------------------------------|---------------|-------------------------|---|
| 8-cell | Enucleated | Sendai virus | 24 | 8(33.3) |
| 8-cell | Enucleated | Electrofusion | 76 | 32(42.1) |
| 16-cell | Enucleated | Electrofusion | 29 | 14(48.3) |
| 8-cell | Nucleated | Electrofusion | 35 | 4(11.4) |
| 16-cell | Nucleated | Electrofusion | 19 | 1(5.3) |

(Revised from Willadsen, 1986)

Table 14. Diameter of embryos and nuclei and number of blastomeres in nuclear transplant embryos at blastocyst stage

| Stage of nuclear donor | Recipient embryos | No. of embryos | Diameter of blastocyst (μm) | No. of blastomeres | Diameter of nuclei (μm) |
|------------------------|------------------------|----------------|--|------------------------------|--------------------------------------|
| 2-cell | Enucleated 2-cell | 40 | 100.7 \pm 1.1 ^b | 33.1 \pm 1.2 ^c | 15.0 \pm 0.4 ^a |
| 4-cell | Enucleated 4-cell | 40 | 97.9 \pm 1.9 ^b | 27.5 \pm 1.8 ^b | 14.3 \pm 0.5 ^{ac} |
| 8-cell | Enucleated 8-cell | 40 | 102.5 \pm 2.1 ^{ab} | 24.0 \pm 1.3 ^a | 13.3 \pm 0.5 ^{bc} |
| None | Nonenucleated fresh | 40 | 99.4 \pm 2.7 ^b | 49.2 \pm 1.8 ^a | 13.8 \pm 0.5 ^{ac} |
| None | Nonenucleated cultured | 40 | 107.5 \pm 2.2 ^a | 51.5 \pm 1.8 ^{ab} | 14.9 \pm 0.4 ^a |

¹⁾ Mean \pm S.E.M.

²⁾ The values with the different superscript denote significant ($P < 0.05$) difference between the cell stages of nuclear donor (Park et al., 1990).

복제수정란 및 복제산자 생산효율도 높아질 것이다.

결 론

현 시점에서 가축을 대상으로 핵이식기법의 응용에 의한 복제수정란의 작출효율은 소에서는 18%, 돼지에서는 21%, 면양에서는 58% 및 토끼에서는 36%에 이르는 수준이다. 또한 핵이식기법에 의한 복제산자의 생산효율은 소에서는 14%, 돼지에서는 4%, 면양에서는 9%, 산양에서는 19%에 이르는 수준이다. 최근 Willadsen 등(1991)은 소의 핵이식된 수정란을 대리모에 이식하여 33%의 신생자 생산율을 얻고 있다.

현재의 수준으로 핵이식에 의한 복제수정란 작출효율이 20%일 경우, 32-세포기의 수정란 핵을 이용하면 하나의 수정란으로부터 6개의 복제수정란을 작출할 수 있고 이들을 다시 핵의 공급원으로 재사용한다면 하나의 수정란으로부터 2회 반복핵이식을 통하여 36개의 복제수정란을 작출할 수 있다. 이들 복제수정란을 대리모에 이식하여 33%의 이식성공율을 얻는다면 2회 반복핵이식을 실시함으로써 12마리의 복제동물을 생산할 수 있다. 만약 반복핵이식을 수회 실시한다면 비록 그 효율이 낮다고 하더라도 복제수정란을 무한정 작출할 수 있을 것이다. 전능성을 가진 핵을 무한정 공급받을 수 있는 또다른 방법은 stem cell의 배양·증식에 의한 방법도 연구해 볼 만하다. 또한 복제수정란을 동결보존함으로써 그 활용이 더욱 증대될 것이다.

복제수정란의 작출효율을 개선하고 대량생산 체제

로 들어가기 위하여는 핵의 다량공급과 수반하여 수정란자의 다량 확보도 이루어져야 한다. 이를 해결하기 위하여서는 도축장에서 채집해온 난소로부터 미성숙 난모세포를 얻어서 이들을 체외배양기법으로 체외성숙시키고 활성화를 시켜서 수정란자로 사용하는 방안이 연구되어야 할 것으로 사려된다. 이와 아울러 핵-세포질 융합기술의 효율 개선, 핵이식된 수정란의 체외배양기법의 확립 및 핵이식된 수정란을 수란축에 이식하여 산자 생산율의 향상 등이 이루어지면 핵이식에 의한 복제동물 생산의 실용화 내지 산업화가 곧 현실화 될 것이다.

참 고 문 헌

- Bondioli KR, Westhusin ME and Looney CR. 1990. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology*, 33(1):165-174.
- Briggs R and King TJ. 1952. Transplantation of living cell nuclei from blastula cells into enucleated frog eggs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 38:455-463.
- Choe SY, Park CS, Lee HJ and Park HS. 1989. Studies on nuclear transplantation in mouse embryos. I. Functional differences between maternal and paternal genomes. *Proc. Mol. Biol. Genet.*, 4:497-502.
- Collas P and Robl JM. 1990. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. *Biol Reprod.*, 43:877-884.
- Illmensee K and Hoppe PC. 1981. Nuclear transplantation in *Musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell*, 23:9-18.

- Kono T and Tsunoda Y. 1989. Development of single blastomeres from four- and eight-cell mouse embryos fused into the enucleated half of a two-cell embryo. *Gamete Res.*, 22:427-434.
- Kubiak J and Tarkowski AK. 1985. Electrofusion of mouse blastomeres. *Exp. Cell Res.*, 157:561-565.
- Long C, Levanduski M, Duplantis S and Westhusin M. 1991. Nuclear transfer in the bovine embryo: The effect of DC voltage and duration on electrofusion and cell lysis. *Theriogenology*, 35:232.
- Marek DE, Pryor JH, Whitesell TH and Looney CR. 1990. Nuclear transplantation in the bovine: Effect of donor embryo age on subsequent embryo production. *Theriogenology*, 33:283.
- McGrath J and Solter D. 1983. Nuclear transplantation in mouse embryos by microsurgery and cell fusion. *Science*, 220:1300-1302.
- McLaughlin KJ, Pugh Ap, Logank, et al. 1991. Assessment of oocyte source for ovine nuclear transfer. *Theriogenology*, 35:240.
- Park CS, Choe SY, Lee HJ and et al. 1990. Studies on nuclear transplantation in mouse embryos. II. Developmental potential of nuclei from embryos of different developmental stages. *Proc. Mol. Biol. Genet.*, 5:325-330.
- Prather RS, Barners FL, Sims MM, Robl JM, Eyestone WH and First NL. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo. Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.*, 37:859-866.
- Prather RS, Sims MM and First NL. 1989. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol. Reprod.*, 41:414-418.
- Robl JM, Gilligan B, Crister ES and First NL. 1986. Nuclear transplantation in mouse embryos: Assessment of recipient cell stage. *Biol. Reprod.*, 34: 733-739.
- Robl JM, Prather R, Eyestone W, Barners F, Northey D, Gilligan B and First NL. 1987. Nuclear transplantation in bovine embryos. *Theriogenology*, 25: 189.
- Smith LC and Wilmut I. 1989. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development *in vivo* of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.*, 40:1027-1035.
- Stice SL, Keefer CL, Maki-Laurila M and Phillips PE. 1991. Producing multiple generations of bovine nuclear transplant embryos. *Theriogenology*, 35: 273.
- Stice SL and Robl JM. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 39:657-664.
- Tsunoda Y, Yasui T, Shioda Y, Nakamura K, Uchida T and Sugie T. 1987. Full-term development of mouse blastomere nuclei transplanted into enucleated two-cell embryos. *J. Exp. Zool.*, 242:147-151.
- Westhusin ME, Pryor JH and Bondioli KR. 1991. Nuclear transfer in the bovine embryo: A comparison of 5-day, 6-day, frozen-thawed, and nuclear transfer donor embryos. *Mol. Reprod. Develop.*, 28:119-123.
- Willadsen SM. 1986. The developmental capacity of blastomeres from four- and eight-cell sheep embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 65:165-172.
- Willadsen SM. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 320:63-65.
- Willadsen SM. 1989. Cloning of sheep and cow embryos. *Genome*, 31:956-962.
- Willadsen SM, Janzen RE, McAlister RJ, Shea BF, Hamilton G and McDermand D. 1991. The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. *Theriogenology*, 35:161.
- Yang X, Zhang L, Kovacs A, Tobback C and Foote RH. 1990. Potential of hypertonic medium treatment for embryo micromanipulation: II. Assessment of nuclear transplantation methodology, isolation, sub-zona insertion, and electrofusion of blastomeres to intact or functionally enucleated oocytes in rabbits. *Mol. Reprod. Develop.*, 27:118-129.
- Yong Z, Jianchen W, Jufen Q and Zhiming H. 1991. Nuclear transplantation in goats. *Theriogenology*, 35:299.
- Zimmermann U and Vienker J. 1982. Electric field-induced cell-to cell fusion. *J. Membr. Biol.*, 67:165-182.

박충생, 최상용, 이효종, 박희성. 1990. 생쥐수정란의 핵이식에 관한 연구. II. 발달단계별 수정란 핵의 이식후 생존성. 대한수의학회지, 30(4):355-360.

박희성, 이효종, 최상용, 박충생. 1990. 생쥐수정란 핵이식 후 체외발달에 관한 연구. 한국가축번식학회지, 14(3):205-211.

이철상, 박흥대, 정길생, 이경광. 1989. 핵치환 생쥐의 생산. 한축지, 31(2):69-74.

최상용, 박충생, 이효종, 박희성. 1990. 생쥐수정란의 핵이식에 관한 연구. I. 모성 및 부성 genome의 기능차이에 관한 연구. 대한수의학회지, 30(2):123-127.