

사람 성장호르몬 유전자를 발현하는 형질전환생쥐의 불임성

한용만 · 강만종 · 이철상 · 유대열 · 이경광

한국과학기술연구원

유전공학연구소

Infertility 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 Research Institute, KIST

SUMMARY

Many transgenic mice expressing human growth hormone gene were infertile. To investigate the infertility of these transgenic mice, it was looked into the estrus cycle and sexual behaviour and also tested through *in vitro* fertilization whether the germ cells of these mice were normal or not. The infertile female transgenic mice were mated to the fertile males of ICR strain, but in almost all of them the vaginal plugs were not detected and their estrus cycles by vaginal smear were almost irregular which kept up estrus or diestrus stage. Many male transgenic mice did not have the ability of sexual behaviour. Therefore the viability of germ cells in infertile male transgenic mice was investigated by *in vitro* fertilization, but the sperm were normally fertilized with the eggs and the transgene of parent was passed on to the progeny. These results consequently suggest that the infertility of transgenic mice expressing human growth hormone gene may be due to the physiological activity of human growth hormone, not germ cells.

I. 서론

생쥐 metallothionein I(mMT) promoter에 사람, 흰쥐, 돼지 및 소의 성장호르몬 유전자를 연결시켜 만든 재조합유전자가 도입된 형질전환생쥐는 여러 번 위장소(ectopic sites)에서 외인성 성장호르몬을 합성하게 됨으로써 성장속도가 빠르고, 이들의 체중은 정상생쥐보다 약 1.5배 이상이었다(Palmiter 등, 1982, 1983; Vize 등, 1988; 이 등, 1989). 이러한 외래의 성장호르몬 유전자는 이들 생쥐의 염색체상에 안정하게 삽입되어 있으므로 그들의 표현형적 특징(phenotypic characteristics)이 자손에 유전될 수

있다. 그러나 사람 성장호르몬 유전자가 발현되는 형질전환생쥐, 특히 암컷에 있어서는 많은 불임성이 관찰되었다(Yun과 Wagner, 1987; Bartke 등, 1988, 1989). 한편, Yun과 Wagners 1987)에 의하면 대부분의 수컷 형질전환생쥐가 번식능력을 가지고 있다고 보고하고 있으나, 본 실험의 결과에서는 수컷 생쥐에 있어서도 많은 불임성을 나타내었다.

본 연구에서는 사람 성장호르몬 유전자가 발현되는 형질전환생쥐에 있어서 불임의 원인을 임상적인 측면에서 보다 구체적으로 밝힐 목적으로 이들 생쥐의 발정주기, 성행위 능력, 체외수정을 통한 생식세포의 수정 및 발생능등을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

형질전환생쥐는 생쥐 MT-I promoter가 함유된 사람 성장호르몬 유전자를 교잡종(C57BL×CBA) 생쥐의 1세포기의 수정란 응성전핵내에 미세주입한 다음, 생존한 수정란들을 가친의 난관에 이식하여 얻은 산자들 중 DNA분석을 통하여 선별하였다(한동, 1990). 교배실험에는 CBA계통의 생쥐로서 암컷은 6주령, 수컷은 8주령 이상의 것을 사용하였으며, 체외 수정 실험에도 상기 교잡종의 생쥐를 사용하였다.

2. 형질전환생쥐의 번식성

미세주입방법에 의해 태어난 형질전환생쥐들(F0)은 CBA계통의 생쥐와 역교배(backcross)를 실시하였으며, 제1세대(F1) 이후의 형질전환생쥐들은 암수 형질전환생쥐간, 또는 한배새끼 중 비형질전환(non-transgenic) 생쥐와의 형매교배(brother-sister mating)를 통하여 이들 생쥐의 번식성을 검토하였다.

3. 체외수정, 배양 및 이식

불임성을 나타내는 형질전환생쥐에 있어서 생식세포의 수정능력을 알아보기 위하여 일반적인 방법(Hogan등, 1986)으로 체외수정을 실시하였다. 먼저 과배란 유기를 위하여 교잡종 암컷 생쥐에 각각 5IU의 PMSG와 hCG를 복강내에 투여하였으며, 정자는 암컷생쥐를 도살하기 30분전에 수컷 형질전환생쥐의 정소상체(epididymis) 미부로부터 정자를 채취한 다음, 이들 정자를 5% CO₂ 배양기에서 2시간 이상 평형시킨 Whittingham 배양액(30mg/ml BSA 함유)에 넣어 약 1.5시간 동안 배양시킴으로써 수정능 획득(capacitation)을 유도하였다. 그리고 hCG투여 후 12.5시간째에 암컷 생쥐들을 도살하여 난자가 들어있는 난구세포괴(cumulus masses)를 M16 배양액에서 약 1시간 동안 배양한 후 여기에 정자의 최종농도를 ml당 1~2백만마리 정도 주입한 다음 37°C에서 약 4시간 동안 수정을 실시하였다. 수정의 확인은 제2극체의 방출여부로 판정하였으며 수정된 난자들을 신선

한 M16배양액으로 세척하여 정자를 제거한 다음 같은 배양액 소적에 옮겨 약 24시간동안 배양한 후, 다음날 건강한 2세포기 수정란만을 골라 가임신 1일째의 가친의 난관에 이식하였다.

4. 성행위 관찰

불임성의 수컷 형질전환생쥐의 성행위(sexual behaviour)능력을 알아보기 위하여 수컷 형질전환생쥐와, PMSG와 hCG를 투여한 ICR계통의 암컷생쥐를 1:1의 비율로 합사시킨 후 다음날 아침 9:00~10:00 시경에 질전의 유무를 확인하였으며, 이러한 실험은 4~7일 간격으로 3~5주간 반복하여 실시하였다. 불임성의 암컷 형질전환생쥐는 번식력이 인정된 40g이상의 수컷 ICR생쥐와 1:1로 합사시킨 후 상기와 같이 질전의 유무를 확인하였다.

5. 발정주기의 관찰

불임성을 나타내는 암컷 형질전환생쥐의 질액(vaginal fluid)을 증류수가 들어있는 spoid로 3~5회 반복세척하여 채취한 후, 이를 깨끗한 유리 slide에 떨어뜨리고 공기중에서 완전히 건조시킨 다음 30배로 희석된 Gimsa 염색액으로 30분 동안 염색하였다. 그 후 slides를 증류수로 살짝 씻어내어 공기중에서 완전히 건조시킨 다음 100배의 현미경하에서 세포의 상태를 관찰하였다. 질액의 채취는 매일 오전 9:00~10:00 시 사이에 3주간 실시하였다. 생쥐의 발정주기는 질액의 세포상태에 따라 발정전기, 발정기, 발정후기, 발정간기로 구분하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 형질전환생쥐의 번식성

사람 성장호르몬 유전자가 발현되는 형질전환생쥐의 번식능력은 table 1에 나타난 바와 같다. 여기서 불임(infertile)과 가임(fertile)은 자연교배(natural mating)에 의한 임신의 여부로 구분하였다. 그리고 F0는 founder mouse로서 미세주입에 의해 태어난 형질전환생쥐를 나타내고, F1, F2, F3, F4는 각각 제1세대, 2세대, 3세대, 4세대의 형질전환생쥐를 나타내고 있다. F0의 형질전환생쥐에 있어서 번식효율은 암

Table 1. Reproductive efficiency of transgenic mice expressing MThGH gene

Group	Sex	No. mice	Infertile	Fertile	Reproductive efficiency(%) ^a
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	12	8	4	4/12(33.3)
F2	Female	7	7	0	0/7
	Male	8	3	5	5/8(62.5)
F3	Female	3	3	0	0/3
	Male	6	1	5	5/6(83.3)
F4	Female	3	3	0	0/3
	Male	3	1	2	2/3(66.7)

(%)^a: Fertile / No. mice × 100

수가 각각 17.6%(3/17마리)와 31.2%(5/16마리)로서 대조구의 85.7%와 100%보다 훨씬 저조한 성적을 보여주었다. 한편 제1세대 이후의 형질전환생쥐에 있어서 수컷의 경우는 세대를 거듭할수록 번식성이 향상되는 경향이 있으나, 암컷의 경우 제1세대 이후로는 전혀 임신을 하지 않았다. 그리고 16쌍의 암수 형질전환생쥐간의 교배를 실시하였지만 전혀임신을 하지 않았다(자료미제출). 한편 사람 성장호르몬 유전자를 발현하는 형질전환생쥐(F0)에 있어서 암컷은 절대적인 불임을 나타내고 수컷의 경우는 대개 정상적인 번식성을 나타낸다는 보고가 있으나(Yun과 Wagner, 1987; Batke등, 1988), 본 실험의 결과에서는 일부 암컷 형질전환생쥐에서 번식성이 확인되었으며 수컷의 형질전환생쥐에서도 많은 불임성을 보여주었다.

2. 암컷 형질전환생쥐의 불임성

암컷 형질전환생쥐의 불임성에 대한 원인을 밝히고자 성행위, 발정주기 및 난소기능의 이상유무등 임상적인 실험을 수행하였다. 먼저 불임성의 암컷 형질전환생쥐는 번식력이 인정된 ICR계통의 수컷 생쥐와의 자연교배를 실시하여 이들의 성행위 능력을 조사하였던 바, 총 10마리의 암컷 형질전환생쥐 중 오직 1마리에서 질전이 확인되었으나 이 개체 역시 임신이 성립되지는 않았다(Table 2).

Table 2의 결과에서 이들 불임성의 생쥐들은 성선호르몬의 비정상적인 조절에 기인한 것으로 추정되어 마리당 7.5IU의 PMSG와 hCG를 통상의 방법으로 주사한 다음, 번식력이 왕성한 ICR계통의 수컷생쥐와

Table 2. Sexual behavior of infertile female transgenic mice by mating with fertile male mice(ICR)

Exp.	No. of mice	Plug check		Remarks
		plus	minus	
1	6	1	5	no pregnant
2	4	0	4	

Table 3. Clinical aspects of infertile female transgenic mice after PMSG & hCG injection by mating with fertile male mice(ICR)

Exp.	Plug check	No. of corpus luteum	No. of eggs	No. of eggs		
				fertilized	non-fertilized	deg.*
1	-	5	3	0	2	1
2	-	17	12	0	5	7
3	-	19	9	0	7	2
4	-	19	13	0	12	1
Total		60(15.0)	37(9.25)	0	26(6.5)	11(2.8)
Control	+	217(72.3)	156(52.0)	87(29.0)	51(17.0)	18(6.0)

A parenthesis designates the mean number

deg.*: degenerated eggs

control : 3 hybrid(C57BL × CBA) female mice

교배를 실시하였지만 이들 또한 질전을 확인할 수 없었다(Table 3). 또한 평균 황체수와 난자수에 있어서도 각각 15.0개와 9.25개로서 대조구의 72.3개와 52.0개 보다는 훨씬 적은 수를 나타내었다. 이러한 결과는 이들 형질전환생쥐의 난소 기능이 비정상적임을 시사한다. 그러나 Yun과 Wagner(1987)는 암컷 형질전환생쥐를 정상적인 수컷과 교배하였을 때 질전을 보이는 암컷으로부터 적은 수의 비정상적인 수정란을 회수할 수 있었으며, 과배란을 유기하였을 때는 정상적으로 보이는 수정란을 얻을 수 있었다고 보고하고 있다. 또한 그들은 과배란 유기 후 얻은 수정란 중 정상적인 수정란은 50~70%로서 대조구(정상 생쥐의 수정란)의 80~90%보다 약간 저조 하였지만, 이들 수정란들은 체외배양에서 포배기까지 정상적으로 발달한다고 하였다. 이와같이 난자의 수가 약간 적고 난소의 기능이 다소 비정상적이기는 하지만 이 수정란들을 정상적인

가친의 난관에 이식하거나 혹은 형질전환생쥐의 난소를 정상생쥐의 난소와 치환함으로써 후대에서 형질전환생쥐를 얻을 수 있었다고 보고하였다. 그러나 본 실험에서는 불임성의 암컷 형질전환생쥐로부터 수정란 및 산자를 전혀 얻을 수 없었다.

한편 이들 암컷 형질전환생쥐의 발정주기를 관찰하기 위하여 질액의 세포상태 검사방법을 실시하였던 바, 총 10마리 중 7마리는 정상적인 발정주기가 관찰되지 않았고 지속적으로 발정기나 발정간기에서 머무르고 있었으며, 미약하게 발정주기를 나타내는 3마리의 개체에 있어서도 발정주기에 따른 세포의 상태가 불규칙적이었고 명확하지 않았다(Table 4).

3. 수컷 형질전환생쥐의 불임성

Table 1에서 보는 바와 같이 수컷의 형질전환생쥐에 있어서도 많은 불임성을 나타내고 있는데, 이러한

Table 4. Estrus cycle of infertile female transgenic mice by smear check

Group	No. of mice	Estrus cycle (days)	No. of mice	Remarks
Transgenic	10	no cycle	7	estrus or diestrus
		irregular	3	
Control (hybrid)	3	4~6	2	
		irregular	1	

불임의 원인을 밝히고자 먼저 이들 형질전환생쥐의 성행위 능력에 대한 조사를 실시하였다. 총 9마리의 불임성 수컷 형질전환생쥐를 35마리의 정상적인 ICR 암컷과 교배실험을 실시하였던 바, 4마리의 암컷에서 질전이 확인되었으며 이 중 3마리에서만 수정란을 확인할 수 있었다(Table 5). 즉 9마리의 수컷 생쥐 중 3마리가 교미 능력을 가지고 있었지만 이들도 성욕에 있어서 다소 떨어지는 경향이 있었다.

그리고 불임성의 수컷 형질전환생쥐에 있어서 이들의 생식세포 자체의 이상유무를 확인하기 위하여 체외수정을 실시하였다. 총 4마리의 수컷 형질전환생쥐에서 체외수정을 실시하였던 바, 1마리에서 얻은 산자로 부터 형질전환생쥐의 자손을 얻을 수 있었다(Table 6). 이러한 결과는 수컷 형질전환생쥐의 불임성은 생식세포 자체에 이상이 있는 것이 아님을 제시하고 있

다. 그러므로 사람성장호르몬 유전자가 발현되는 형질전환생쥐의 불임성은 생식세포 그 자체에 기인하는 것이 아니라 사람성장호르몬의 생리적 활성으로 인한 생쥐의 내분비 생리에 영향을 미치어 불임을 일으키는 것으로 생각된다.

IV. 적 요

사람 성장호르몬 유전자가 발현하는 형질전환생쥐에 있어서 많은 불임성이 관찰되었다. 이들의 불임원인을 알아보기 위하여 형질전환생쥐의 성행위 능력 및 발정주기등 임상적인 측면을 관찰하였으며, 또한 체외수정 실험을 통하여 생식세포의 이상유무를 판별하였다. 먼저 불임성의 암컷 형질전환생쥐에 있어서 성행위 및 발정주기를 조사하였던 바, 이들의 교미능력 자

Table 5. Sexual behavior of infertile male transgenic mice by mating with normal female mice(ICR)

Transgenic No.	Normal females	Plug check		No. of eggs	Remarks
		plus	minus		
1	3	1	2	5	non-fertilized
2	3		3	ND	
3	3		3	ND	
4	5	2	3	26	fertilized
5	5		5	ND	
6	5		5	ND	
7	5	1	4	12	fertilized
8	5		5	ND	
9	5		5	ND	

ND : not detected

Table 6. *In vitro* fertilization in infertile male transgenic mice

Exp.	No. of eggs	No. of eggs fertilized(%)	No. of eggs transferred	Offspring(%) ^a	Transgenic mice(%) ^b
1	102	81(79.4)	66	24(36.3)	9(37.5)
2	165	36(21.8)	36	0	0
3	304	49(16.1)	35	12(34.3)	0
4	413	104(25.2)	90	0	0

(%)^a : offspring / No. of eggs transferred × 100

(%)^b : transgenic mice / offspring × 100

체가 인정되지 않았으며, 또한 발정주기가 제대로 진행되고 있지 않았다. 즉 10마리의 불임성 암컷 생쥐들을 번식력이 왕성한 ICR계통의 수컷 생쥐와 교배를 실시하였지만, 오직 1마리에서만 질전이 확인되었다. 그러나 이 개체 역시 임신을 유지하지는 않았다. 그리고 질액의 세포상태에 따른 발정주기를 조사하였던 바, 총 10마리 중 7마리는 정상적인 발정주기가 관찰되지 않았으며, 미약하게 발정주기를 나타내는 나머지 개체에 있어서도 세포의 상태는 매우 불규칙적이고 명확하지 않았다. 한편 불임성의 수컷 형질전환생쥐에 있어서도 상기와 같은 방법으로 성행위 능력을 조사하였지만, 이들 또한 많은 개체에서 교미능력을 상실하고 있었다. 그리고 생식세포의 이상유무를 확인하기 위하여 교잡종 생쥐의 난자와 체외수정을 실시하였던 결과, 수정이 이루어지고 형질이 자손에 유전되는 것으로 보아 생식세포에는 이상이 없는 것으로 유추할 수 있었다. 결론적으로 사람성장호르몬 유전자를 발현하는 형질전환생쥐에 있어서 불임성은 생식세포 그 자체의 이상에 기인하는 것이 아니라 사람 성장호르몬의 생리적 활성으로 인하여 생쥐 내분비 생리에 영향을 미침으로써 불임을 일으키는 것으로 생각된다.

V. 引用文獻

1. 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.)* 38:135
2. 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
3. Hogan, B., F. Constantini and E. Lacy. 1986. *Manipulating the mouse embryo*. pp. 107-108. Cold Spring Harbor Laboratory.
4. Palmiter, R.D, R.L. Brinster, R.E. Hammer, M.E. Trumbaur, M.G. Rosenfeld, N.C. Brinberg and R.M. Evans. 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature.* 300:611-615
5. Palmiter, R.D., G. Norstedt, R.E. Gelin, R. E. Hammer and R.L. Brinster. 1983. Metallothionein-human growth hormone fusion genes stimulate growth of mice. *Science* 222:809-814
6. Vize, P.D., A.E. Michalska, R. Ashman, B. Lloyd, B.A. Stone, P. Quinn, J. R.E. Wells and R.F. Seamark. 1988. Introduction of a porcine growth hormone fusion gene into transgenic pigs promotes growth. *J. Cell. Sci.* 90:295-300
7. 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
8. 이경광 · 한용만 · 남궁옥 · 이철상 · 김용주 · 김재만 · 김지영 · 한문희. 1989. 생쥐에 있어서 사람 성장호르몬 유전자의 발현. *한축지* 31(3):139-147
9. 한용만 · 이철상 · 강만중 · 유대열 · 이경광. 1990. Transgenic 생쥐 생산에 있어서 미세주입시기 및 외래유전자의 농도가 삽입빈도에 미치는 영향. *한축지* 32(6):309-314