

복제 한우 생산을 위한 Bovine Fetal Fibroblasts의 이용에 관한 연구: 공여핵원의 배양기간 및 세포 크기가 핵이식의 효율에 미치는 영향

황우석 · 박종임 · 조종기 · 김기연 · 신수정 · 용환울 · 이병천⁺

서울대학교 수의과대학

Establishment of Bovine Fetal Fibroblasts Line for Production of Cloned Calves in Korean Native Cattle: The Effects of Culture Period and Various Cell Size on the Efficiency of Nuclear Transfer

Woo-Suk Hwang, Jong-Im Park, Jong-Ki Cho, Kiyon Kim,

Soojung Shin, Hwan-Yul Yong and Byeong-Chun Lee

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-744, Korea

SUMMARY

The developmental potential of bovine somatic cells was evaluated using nuclear transfer. A single donor cell derived from fetus of HanWoo (Korean Native Cattle) was selected and deposited into perivitelline space of each enucleated oocyte before electrical fusion and activation. Nuclei of donor cells starved for 7 days(37%) tended to support the development of reconstitute embryos the blastocyst stage better than those of donor cells starved 3, 14 and 30 days. The cleavage rate was significantly lower($P < 0.05$) in reconstitute embryos derived from large size donor cells(51.2%), than those from small medium size donor cells(76.7 and 73.5, respectively). The developmental rate to blastocyst of reconstructed embryos from medium size donor cells was higher than those from small and medium size donor cells. This study demonstrates that an appropriate culture period for induction into quiescent stage and the size of donor cells effect on the efficiency of nuclear transfer using cultured bovine cells.

(Key words : bovine fetal fibroblast, nuclear transfer, quiescent stage, cell size)

서 론

최초의 체세포 복제 동물의 탄생이 보고된 이래, 체세포를 이용한 핵이식은 기초 생물학과 의학적 연구 및 형질전환 동물의 생산에까지 폭넓게 응용되고 있다(Campbell, 1999b; Ward와 Brown, 1998; Wilmut 등, 1998; Campbell 등, 1996). 현재

소를 비롯한 가축과 실험동물 등 각종 동물의 다양한 조직의 세포로부터 유래한 핵이식 복제 산자가 보고되고 있다 (Baguisi 등, 1999; Campbell, 1999a; Dominko 등, 1999; Cibelli 등, 1998; Wakayama 등, 1998; Schnieke 등, 1997). 그러나 체세포 핵이식에는 공여핵으로 사용되는 세포의 선발 조건은 채취된 동물과 신체 부위 및 실험 조건에 따라 일정하지 않으며, 이에 따른 결과도 일정하지

본 연구는 1998년도 한국학술진흥재단 유전공학 연구(과제번호1998-019-G00021)에 의해 수행되었음.

⁺ 교신저자

않은 실정이다(Wells 등, 1999; Zakhartchenko 등, 1999a; Kato 등, 1998; Vignon 등, 1998) 공여 핵의 준비와 선발에는 세포주기를 휴지기로 유도하기 위한 혈청기아 배양기간, 세포의 크기와 종류 등의 여러 요인이 관계하는 것으로 알려지고 있다(Campbell, 1999a; Prather 등, 1999; Tao 등, 1999). 본 연구는 혈청기아배양 기간 및 세포 크기에 따른 공여핵 선발 방법이 체세포 핵이식의 효율 향상에 미치는 영향을 보기 위해 실시되었다.

재료 및 방법

1. 공여핵의 준비

공여핵원용 세포주 수립은 Zakhartchenko 등(1999b)의 방법에 준하여 실시하였다. 임신 50일령의 태아를 준비하여, 두부와 연골조직 등을 제거한 후, 사지와 동체의 피부 조직을 일부 채취하였다. 절제한 조직을 PBS(phosphate buffered saline, Gibco-BRL)로 세정한 후, 약 1~2 mm²의 크기로 세절하여 0.25% trypsin-EDTA(Gibco-BRL)를 첨가하고, 5% CO₂, 39℃의 배양기 내에 1~2 시간 정치한 후, 1,500 rpm에서 2분간 원심 세정하였다. 최종 원심세정 후 세포 펠렛을 10% FCS(fetal calf serum, Gibco-BRL) 첨가 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco-BRL)에 부유하여 배양접시에 옮긴 후, 온도 및 습도가 포화된 37℃의 배양기에서 배양하였으며, 세포의 증식상을 관찰하여 confluent 상태의 세포를 초대배양세포로 하였다. 8대 이내로 계대배양된 세포는 Zakhartchenko 등(1999b)의 방법에 준하여 세포주기를 휴지기로 유도하기 위하여 0.5% FCS첨가 DMEM에서 실험목적에 따라 3~30일간 배양하였다.

2. 수핵난자의 준비

도축우의 난소에서 채취한 미성숙 난자는 10% 0.005AU/ml FSH과 1μg/ml estradiol이 첨가된 TCM-199(Gibco-BRL)으로 5% CO₂, 39℃의 배양기 내에서 배양하였다. 성숙 배양실시 18~20 시간 후, 난구세포층을 제거하여 제1극체가 확인된 성숙 난자를 선별하여 수핵난자로 이용하였다. 성숙 난자를 cytochalasin B가 포함된 배지로 옮겨, 미세조

작기를 이용하여 투명대를 절개하고 제1극체와 난자의 핵을 포함한 세포질을 제거하였다. 탈핵된 난자는 5% CO₂, 39℃의 배양기 내에서 핵이식 실시 전까지 정치하였다.

3. 핵이식 및 배양

공여핵원용 세포는 0.25% trypsin-EDTA으로 처리하여 single cell로 분리한 후, 0.5% FCS 첨가 PBS에 부유하고 실험 목적에 맞추어 각 피펫의 구경으로 크기를 측정된 후(diameters of under 20 μm, from 20 to 40 μm and over 40 μm), 핵이식용에 사용하였다. 핵이식은 미세조작기로 수핵난자를 고정하고 절개된 투명대를 통하여 공여핵원용 세포를 투명대와 perivitelline space 사이에 주입한 후, 전기적 자극에 의한 융합을 실시하였다. 핵이식 배는 5μg/mL ionomycin으로 처리 후, 1.9mM 6-DMAP으로 4시간 처리하는 방법으로 활성화하였다. 핵이식 배는 3mg/ml BSA(bovine serum albumin, Sigma)가 포함된 CR2aa 배지에서 배반포기까지 배양하였다.

4. 통계학적 분석

각 실험 군간의 융합률 및 분할율의 유의성 검정은 chi-squared analysis를 이용하였다. 각 군의 배반포까지의 발육율은 logistic regression analysis를 이용하여 검정하였다.

결론

1. 공여핵원용 체세포의 혈청기아 배양기간이 핵이식 배의 발육율에 미치는 영향

각 실험 군간의 융합률, 분할율 및 배반포까지의 발육율에 있어서의 유의성 있는 차이는 나타나지 않았다(Table 1). 융합률과 분할율에 있어서는 30일간 혈청기아 배양한 공여핵 군에서 다른 군에 비하여 높은 경향을 나타내었다. 그러나, 배반포까지의 발육에 있어서는 7일간 혈청기아 배양한 공여핵 군이 다른 군에 비해 높은 발육율을 나타내었다.

2. 공여핵원용 체세포의 크기가 핵이식 배의 발육에 미치는 영향

Table 1. Development of reconstructed embryos derived from donor cells cultured for different quiescent period

Culture days*	No. of oocytes	No. of fused(%)	No. of cleaved(%)	No. of BL** (%)
3	108	68(63.0)	56(82.4)	15(26.8)
7	162	106(65.4)	92(86.8)	34(37.0)
14	145	101(69.7)	92(91.0)	24(26.0)
30	92	67(72.8)	65(97.0)	20(30.8)

*culture period of cells in serum starved media

**blastocyst

Table 2. Development of reconstructed embryos derived from donor cells in different size***

Cell size*	No. of oocytes	No. of fused(%)	No. of cleaved(%)	No. of BL(%)**
Small	60	30(50.0)	23(76.7) ^a	5(21.7)
Medium	65	34(52.3)	25(73.5) ^a	10(40.0)
Large	64	43(67.2)	22(51.2) ^b	3(13.6)

* classified by cell diameter (small; under 20 μ m / medium; from 20 μ m to 40 μ m / large; over 40 μ m)

** blastocyst

*** serum-starved for 7 days

^{ab}; Values within columns with different superscripts differ (P<0.05)

공여핵원용 체세포의 크기에 따른 각 군 간의 융합률에 있어서의 유의적인 차이는 나타나지 않았다 (Table 2). 그러나 세포 직경 40 μ m 이상 크기의 체세포를 공여핵원으로 이용한 군이 분할율에 있어 다른 군에 비해 유의성 있게 낮은 것으로 나타났다. 배반포까지의 발육율에 있어 직경이 20~40 μ m인 체세포를 공여핵으로한 군이 가장 높은 것으로 나타났다으나 다른 군과의 유의차는 인정되지 않았다.

고 찰

체세포 핵이식에 의한 최초의 산자 생산보고 이래, 혈청기아 배양에 의하여 세포 주기를 휴지기 (G0기)로 유도된 체세포가 공여핵으로서 보편적으로 이용되고 있다(Wells 등, 1999; Zakhartchenko 등, 1999a; Tao 등, 1999; Kato 등, 1998; Vignon 등, 1998). 휴지기 상태의 체세포는 세포주기를 진행 중인 세포에 비해 핵이식 후 reprogramming이 용이한 것으로 알려져 있다(Campbell, 1999b). 체외배양 중의 체세포를 휴지기로 유도하는 가장 간편한 방법은 혈청의 농도를 0.5~1%로 낮춘 배지에서 배양하는 방법(Campbell 등, 1996; Tao 등,

1999)인데, 이러한 혈청기아배지에서 세포를 배양한 기간은 핵이식 대상 동물과 세포 실험자마다 각기 다르며, 그 결과도 일정치 않다(Wells 등, 1999; Zakhartchenko 등, 1999a; Goto 등, 1999; Tao 등, 1999; Kato 등, 1998; Vignon 등, 1998). 본 실험에서는 공여핵의 혈청기아 배양기간이 핵이식 배의 발육에 영향을 미치지 않는 것으로 밝혀졌으나 7일간 배양한 군에 있어서 다른 실험군에 비해 발육율이 높은 경향을 나타내었다. 이는 소의 태아 섬유세포를 공여핵 세포로 하여 8일간 혈청기아 배양한 Zakhartchenko 등(1999b)과 산양의 체세포를 7일간 혈청기아 배양한 Baguisi 등(1999)의 보분과 일치하였다. 그러나, 혈청기아 배양을 실시하지 않은 세포를 공여핵으로 사용한 Schnieke 등(1997), Wakayama 등(1998) 및 Wakayama와 Yanagimachi(1999)의 보고 및 비교적 단기간에 혈청기아 배양하여 공여핵원으로 이용한 Kato 등(1998)과 Vignon 등(1998)의 보고 등, 혈청기아배양 기간이 핵이식 효율 및 산자 생산에 미치는 영향에 대해서는 불분명한 점이 많다고 사료된다. 공여핵원용 세포의 크기가 핵이식 배의 발육에 미치는 영향에 있어 직경이 큰(>40 μ m)세포의 융합률이 직경이 작은

세포에 비해 높은 것으로 나타났는데 이는 수핵난자의 세포막과 접촉하는 표면적의 차이에 기인한 것으로 사료된다(Tao 등, 1999). 분할율은 직경이 큰 세포를 공여핵으로 선별한 군에서 유의성 있게 낮았는데, 상대적으로 크기가 큰 세포는 대부분 세포주기상 G1기 이후에 돌입한 세포임을 관찰한 Tao 등(1999)의 보고와 이러한 세포를 공여핵원으로 사용하였을 경우 핵 구조의 remodeling과 염색체의 reprogramming에 있어 오류를 나타낼 가능성이 높음을 지적한 Campbell(1999b)의 보문에 의해 설명될 수 있을 것이다. 최근 핵이식 등 체외 조작 과정을 거친 소 및 양에서 거대태아가 출산됨이 보고되고 있는데 이와 같은 거대 산자증후군(Large offspring syndrome)에 영향을 미치는 한 요인으로서 공여핵원용 체세포의 선별이 문제시되고 있다(Young 등, 1998). 체세포 등 배양세포를 이용한 핵이식의 효율을 높이기 위해서는 공여핵세포의 종류, 휴지기로의 유도 여부, 배양 방법 등 여러가지 조건을 검토하여 적합한 공여핵선발 방법을 확립해야 할 것으로 사료된다.

적 요

혈청기아배양 기간 및 세포 크기에 따른 공여핵선발 방법이 소태아섬유아세포 핵이식의 효율 향상에 미치는 영향을 보기 위해 실시된 바 결과는 다음과 같다.

1. 소태아섬유아세포를 3, 7, 14 및 30일간 혈청기아배양하여 공여핵원으로 사용한 결과 융합률, 분할율 및 배반포기로의 발육율에 있어 유의차는 인정할 수 없었으나, 7일간 혈청기아배양한 군에서 배반포로의 발육율이 높은 경향을 나타내었다.
2. 소태아섬유아세포를 직경을 20 μ m 이하, 20~40 μ m 및 40 μ m 이상으로 분류하여 공여핵으로 사용한 결과 융합률 및 배반포기로의 발육율에서는 유의차는 보이지 않았으나, 40 μ m 이상 크기의 공여핵을 사용한 군에서 분할율이 유의성 있게 낮은 것으로 나타났다. 또한 20~40 μ m의 크기를 나타내는 군에서는 배반포기로의 발육이 다른 군에 비해 높은 경향을 나타내었다.

참고문헌

- Baguisi A, Behboodi E, Melica DT, Pollock JS, Destrempe MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porer CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomda CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overstrom EW, and Echelard Y. et al. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotech.* 17:456-461.
- Campbell KH. 1999a. Nuclear equivalence, nuclear transfer and the cell cycle, *Cloning*, 1:3-15.
- Campbell KHS. 1999b. Nuclear transfer in farm animal species. *Seminars in Cell & Dev. Biol.* 10:245-252.
- Capbell KHS, McWhir J, Ritchie KA and Wilmut I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380: 64-66.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA, and Robl JM. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts, *Science*, 280:1256-1258.
- Dominko T, Mitalipova M, Haley B, Beyhan Z, Memili E, McKusick B, and First NL. 1999. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol. Reprod.*, 60:1496-1502.
- Goto Y, Kaneyama K, Kobayashi S, Imai K, Shin-noh M, Tsujino T, Nakano T, Matsuda S, Nakane S, and Kojima T. 1999. Birth of cloned calves derived from cultured oviductal epithelial cells of a dairy cow. *Anim. Sci. J.*, 70:243-245.
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, and Tsunoda Y. 1998. Eight calves cloned from somatic

- cells of a single adult. *Science*, 282:2095-2098.
- Prather RS, Boquest AC, and Day DN. 1999. Cell cycle analysis of cultured porcine mammary cells. *Cloning*, 1:17-24.
- Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, and Campbell KHS. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 1997. 278:2130-2133.
- Tao T, Boquest AC, Machaty Z, Petersen AL, Day BN and Prather RS. 1999. Development of pig embryos by nuclear transfer of cultured fibroblast cells. *Cloning*, 1:55-62.
- Vignon X, Chesne P, Le Bourhis D, Flechon JE, Heyman Y, and Renard JP. 1998. Developmental potential of bovine embryos reconstructed from enucleated matured oocytes fused with cultured somatic cells. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 321:735-745.
- Wakayama T and Yanagimachi R. 1999. Cloning of male mice from adult tail-tip cells. *Nature Genetics*, 22:127-128.
- Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR and Yanagimachi R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394:369-374.
- Ward KA, and Brown BW. 1998. The production of transgenic domestic livestock: successes, failures and the need for nuclear transfer. *Reprod. Fertil. Dev.*, 10:659-665.
- Wells DN, Misica PM, and Tervit HR. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol. Reprod.*, 60:996-1005.
- Wilmut I, Young L, and Campbell KHS. 1998. Embryonic and somatic cell cloning. *Reprod. Fertil. Dev.*, 10:639-643.
- Young LE, Sinclair KD and Wilmut I. 1998. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev. Reprod.*, 3:155-163.
- Zakhartchenko V, Alberio R, Stojkovic M, Prelle K, Scherenthner W, Stojkovic P, Wenigerkind H, Wanke R, Duchler M, Steinborn R, Mueller M, Brem G, and Wolf E. 1999a. Adult cloning in cattle: Potential of nuclei from a permanent cell line and from primary cultures. *Mol. Reprod. Dev.*, 54:264-272.
- Zakhartchenko V, Durcova-Hills G, Stojkovic M, Scherenthner W, Prelle K, Steinborn R, Muller M, Brem G, and Wolf E. 1999b. Effects of serum starvation and recloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts. *J. Reprod. Fert.* 115:325-331

(접수일: 1999. 5. 31 / 채택일자: 1999. 8. 20)