

성장관련 유전자를 이용한 형질전환토끼의 생산에 관한 연구*

김현주 · 강희성 · 최화식¹ · 임경순² · 진동일[†]

선문대학교 응용생물과학부

Studies on the Production of Transgenic Rabbits with Growth Hormone Receptor and IGF-1 Receptor Genes

Kim, H. J., H. S. Kang, W. S. Choi¹, K. S. Im² and D. I. Jin[†]

Department of Applied Biological Science, Sun Moon University

ABSTRACT

Transgenic rabbits were produced by DNA microinjection using growth hormone receptor (GHR) and IGF-1 receptor (IGF-1R) genes fused to metallothionein(MT) promoter. The overall efficiencies for production of transgenic rabbits were 3.2% and 3.1% for GHR and IGF-1R genes, respectively. Founder rabbits transmitted transgenes to their progenies through medelian fashion. Growth rate of GHR and IGF-1R transgenic rabbits was significantly faster than that of non-transgenic rabbits. Transgenic rabbits grew larger (25% and 15% increase in body weight of GHR and IGF-1R transgenic rabbits, respectively) than non-transgenic rabbits and organ weight of transgenic rabbits increased, suggesting that GHR and IGF-1R genes affects growth rates in transgenic rabbits.

(Key words : Transgenic rabbits, Growth hormone receptor gene, IGF-1 receptor gene, Growth rate)

I. 서 론

뇌하수체에서 분비되는 growth hormone(GH)은 체성장과 대사활동을 조절하는 역할을 하는 것으로 보고되고 있고, 최근에는 번식생리나 면역생리에도 관여하고 있다고 알려지고 있다. 사람에서 GH 기능의 결핍으로 인한 질병은 growth hormone deficiency(GHD), growth hormone receptor deficiency(GHRD, Laron syndrome) 등이 있고 현재 GH 치료 대상이 되는 질환으로는 소인증(short statue),

Turner syndrome 등이 있다. 또한 뇌하수체세포 이상으로 인한 GH 과잉분비는 거인증(giantism)이나 침단비대증(acromegaly)을 초래한다. 그러나 growth hormone의 작용에 대한 세포 내에서의 기작과 그와 관련된 세포와 세포 또는 조직과 조직 사이의 상호반응에 대한 기작은 정확히 이해되고 있지 않아 GH 치료에 대한 부작용 논란이 계속되고 있으며, 1980년대 GH를 overexpression 시킨 transgenic mouse를 이용한 연구(Palmiter et al., 1982, 1983)에서는 외래 GH의 과량발현으로 control mouse보

* 본 연구는 농림기술개발사업 연구지원(290689-5)에 의해 수행되었음.

† Corresponding author : Department of Applied Biological Science, Sun Moon University, Asan City, Chungnam, 336-708, Korea. E-mail : dij1@sunmoon.ac.kr

¹ 김천대학교 임상병리학과(Dept. of Clinical Pathology, Kim Chun College)

² 서울대학교 동물자원학과(Dept. of Animal Resources and Technology, Seoul National University).

다 2 배가량 큰 증체효과를 나타냈었지만 여러 병리증상 즉 과성장호르몬증, 암컷에서의 불임증 (infertility), 조숙증(early aging) 및 성욕(libido)의 결핍 등과 같은 비정상적인 표현형을 나타내어 GH에 의한 성장조절은 매우 복잡한 기작임을 실감케 하였다. 동물에서의 정상적인 성장과 그에 따른 생리활동을 이해하기 위해서는 growth hormone의 정교한 분자생물학적인 연구가 필수적인 것으로 나타났다.

GH receptor의 생체내 발현은 간, 지방조직, 소장, 심장, 근육조직, 뇌 및 정소 등의 다양한 조직에서 감지되는 것으로 밝혀져 있고, 출생후 GH binding 수준은 점차 증가하는 것으로 보고되고 있다(Methew et al., 1989; Frick et al., 1990). 동물의 성장과 식이 및 당뇨병과 GH receptor 수와 관련이 있는 것으로 나타나 있다(Postel-Vinay et al., 1982). 또한 Estrogen과 같은 Hormone도 GH receptor의 조절에 관여하는 것으로 나타났는데 쥐에서 사춘기 후와 임신 중에 receptor의 수가 증가하는 것으로 알려져 있다(Hughes et al., 1985). Growth Hormone의 주요 기능인 골격의 성장 (skeletal growth), 증체(body weight gain), 질소축척(nitrogen retention) 등은 각 조직세포에서 insulin-like growth factor-1(IGF-1)에 의해서 매개되는 것으로 알려져 있으나(Daughaday et al., 1972), GH receptor는 많이 함유하고 있으나 IGF-1 receptor는 거의 없는 지방세포에서와 같이 IGF-1과는 상관이 없는 GH 단독의 작용도 보고되고 있다(Tollet et al., 1990). GH는 지방세포에서 glucose의 이동과 대사에 직접적으로 작용하여 지방조직에서 지질의 이동을 증진시켜 지방축적을 감소시키고 근육조직에서는 질소축적을 증가시켜 신체의 근육/지방의 비율을 증진시키는 것으로 보고되고 있다(Flinton, 1994). 한편 GH receptor의 매개 없이 GH의 작용중 유선조직에서의 우유생산 증가인데 GH receptor는 없고 IGF-1 receptor가 존재하는 유선상피세포에서는 GH에 의해 주위조직에서 합성된 IGF-1에 의해 유생산이 증가하는 것으로 나타났다(Bauman and Vernon, 1993). 이러한 다양한 생리작용에 관여하는 GH의 역할에 대한 GH

receptor, IGF-1 receptor 및 기타 다른 매개체들과의 관계 등에 대한 정보는 아직 잘 정립되어 있지 않고 있다.

본 연구에서는 토끼를 이용하여 DNA 미세주입법에 의해 Growth Hormone Receptor와 Insulin-like Growth Factor Receptor를 과잉발현하는 형질전환 토끼를 생산하였다. 토끼에서 DNA 미세주입법의 적합한 조건 등을 확립하여 전반적인 형질전환 토끼의 생산효율을 높이고 특히 Hormone이나 Growth Factor를 이용한 형질전환동물의 경우 심각한 부작용을 나타내어 실용화 할 수 없는 것으로 보고되고 있으므로 본 연구에서는 실제 체내에서는 Hormone이나 Growth Factor 등은 이들의 세포내 Receptor보다 molar ratio면에서 훨씬 많이 분비되고 있는 점을 착안하여 이들의 Receptor를 세포내에 과잉 발현시킴으로써 부작용을 최소로 줄이고 Receptor를 통한 신호전달체계(Signal Transduction)를 증폭시켜 성장의 효과를 얻고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 과잉배란유도 및 수정란 회수

사용된 토끼는 뉴질랜드화이트 종으로 연암축산대학에서 구입하였다. 사양관리는 14:10 시간의 light : dark cycle하에서 관리했고 사료는 Purina의 토끼전용사료가 공급되었다. 성숙 (5 개월령 이상)에 도달한 암토끼에 약 0.3 mg의 FSH(Sigma)를 12시간 간격으로 6번 피하주사한 후 75 U의 HCG (Sigma)를 혈관주사한 직후 수토끼와 두번씩 교미시켜 과배란을 유도하였다. 교미후 18시간 후에 Ketamine-Xylazine을 이용하여 마취시켜 배 정중선을 절개하여 자궁과 난관을 드러내고 난관체 부위로 catheter를 삽입시켜 자궁-난관협부로 부터 20 gauge needle을 사용하여 20%의 fetal calf serum을 함유하는 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)용액으로 난관을 세류하여 1-cell stage의 난자를 회수하였다. 회수된 토끼 1-cell 수정란은 RDH+BSA+taurine medium에서 DNA 미세주입시 까지 배양하고 DNA 미세주입시에는 RDH medium에 Herpes medium을 첨가한 것을 이용하

였다.

2. Recipient의 발정동기화 및 수정란 이식

Recipient 토끼는 체중이 3.5kg 이상인 것만을 골라 Donor 토끼와 발정주기를 맞추어 주는데 75 U의 HCG를 주사하고 유리봉으로 질 자극을 하여 동기화를 유도하였다. 수정란이식을 위해서 마취 시킨 후 배 정중선을 절개하여 난관만을 드러내어 난관채 부위로 micropipette을 이용하여 소량의 medium과 함께 수정란을 주입 이식하였다. 본 연구에서는 이식시 각 난관으로 10개의 수정란을 이식하였다. 이식 후 정중선을 잘 봉합하고 회복실로 옮겨 회복시킨 다음 분만시로 옮겨 관리하였다.

3. 이식 유전자

MT promoter plasmid를 vector로 이용하였고 growth hormone receptor(GHR)와 IGF-1 receptor (IGF-1R) 유전자를 inserts로 이용하였다. MT_{promoter}-GHR gene construction은 MT vector를 Nru I으로 digestion시켜 blunt end를 만들고 GH-R은 E Co R1으로 digestion시켜 DNA polymerase로 filling-in reaction을 한 다음 blunt ligation을 시도하여 완성하였다. MT_{promoter}-IGF-1R gene construction은 MT vector를 Nru I으로 digestion시켜 blunt end를 만들고 IGF-1R을 Sal I과 BamH1으로 Digestion시킨 후 DNA polymerase로 filling-in reaction을 한 다음 blunt ligation시켜 완성하였다. MT_{promoter}-GHR과 MT_{promoter}-IGF-1R vector는 SalI digestion에 의해 linearization을 하였다. Digestion시킨 DNA는 agarose gel에 전기영동을 하여 DNA band를 자른 다음 Gene Clean Kit(Bio 101)으로 purification하고 T₁₀E_{0.1}(10mM Tris, 0.1mM EDTA)용액으로 12시간마다 용액을 바꾸면서 48시간 동안 4°C에서 dialysis를 하였다. Dialysis 후 다시 agarose gel에 전기영동을 하여 DNA band와 농도를 추정하였으며 마지막 DNA농도를 2500 copy/pl와 5000 copy/pl로 희석하여 주입되는 DNA copy 수를 조절하였다.

4. DNA 미세주입

Micromanipulator와 differential interference contrast(DIC) microscope(Nikon)을 이용하여 DNA를 토끼 1-cell 수정란의 전핵에 주입하였다. 준비된 DNA는 모세관현상을 이용하여 injection pipette에 loading하였다. 전핵이 약간 부푸는 것에 의해 injection을 완료하였다.

5. 형질전환토끼의 식별

태어난 새끼는 약 3주령 후에 귀 조직 일부를 잘라 genomic DNA를 추출한 다음 이식유전자 specific primer를 이용하여 Polymerase Chain Reaction(PCR)방법으로 이식 유전자의 sequence를 가지고 있는가를 검사하였다. 본 연구에서 이용된 transgene의 primer sequence는 다음과 같다.

GH-R : 5'-GAC GTC GAA TCA CGT GTC GA-3'
(GH-R의 3' end)
5'-TTA TTA GGA CAA GGC TGG T-3'
(hGH Poly A의 5' end)
IGF-1R : 5'-ATC AAA GAG GAG ATG GAG CC-3'(IGF-R의 3' end)
5'-TTA TTA GGA CAA GGC TGG T-3'(hGH Poly A의 5' end)
GH : 5'-GTG CAC ACT GGC GCT CCA GG-3'(MT 3'end)
5'-TGT AGG TGT CAG CAG CCA GC-3'(GH 5'end)

PCR cycle의 조건은 denaturation: 94°C, 1분 30초, annealing: 55°C, 2분, extension: 72°C, 2분으로 총 35 cycle을 실시하였다. PCR 후 band size는 GH-R인 경우 약 550 bp, IGF-1R인 경우 약 380 bp, GH 안 경우 약 450 bp가 증폭된다.

6. 형질전환토끼의 번식

수정란 이식에 의해 첫번째의 형질전환토끼인 토끼를 정상 토끼와 교미시켜 F₁ 새끼를 생산한 다음 PCR과 Southern Blot 방법으로 이식유전자를 가진 형질전환토끼를 식별하였다. 이렇게 계속 번식시켜 각 founder 토끼의 혈통표(Pedigree)를 구축하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 형질전환토끼의 생산과 번식

형질전환토끼의 생산을 위해서 MT-GHR 유전자를 총 567개의 수정란에 미세주입하여 105 마리의 토끼새끼를 얻었으며 DNA 분석한 결과 18 마리(17.1%)가 MT-GHR 유전자를 가진 형질전환토끼인 것으로 확인되었고 이중 12 마리가 생존하였다. MT-IGF-1R은 총 327개의 수정란에 미세주입하여 15 마리의 recipient에 이식한 후 총 54마리의 새끼를 얻었는데 이중 10 마리(18.5%)가 MT-IGF-1R 형질전환토끼인 것으로 DNA 분석 결과 확인되었다(Table 1, Fig. 1). 이러한 효율은 이미 보고된 형질전환생쥐의 생산효율보다는 낮으나 형질전환토끼의 생산효율(Hammer et al., 1985; Wall, 1996)보다는 높은 것으로 DNA 미세주입기술의 숙달 및 배양액(RDH) 등의 차이로 기인되었다고 추정된다.

이들 MT-GH, MT-GHR, MT-IGF-1R 세 형질전환토끼들 중 성성숙에 도달한 토끼를 outbreeding 시켜 F₁으로의 전달율을 확인하였는데(Table 2) MT-GHR founder 형질토끼에서는 24마리 새끼 중 11마리가 형질전환토끼인 것으로 확인되었고 MT-IGF-1R founder 형질전환토끼에서도 16마리 새끼 중 9마리가 형질전환 F₁인 것으로 분석되어 약 50%의 전달율을 나타내고 있어 MT-GHR과 MT-

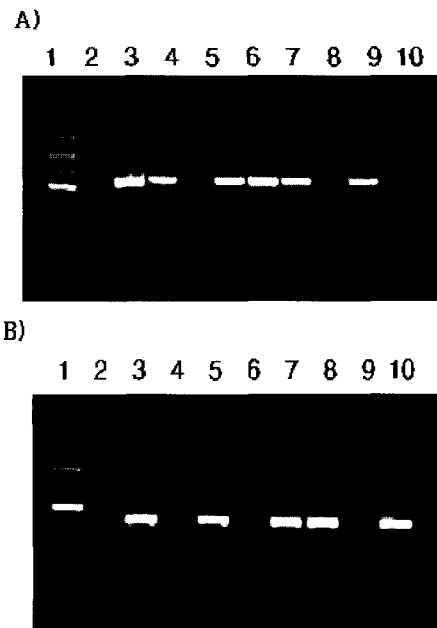


Fig. 1. Screening of MT-GHR (A) and MT-IGF1R (B) transgenic F0 rabbits by PCR. lane 1: 100bp marker, lane 2: negative control, lane 3: positive control, lane 4~10: Rabbit DNAs.

IGF-1R 형질전환토끼는 Mendelian 법칙에 의해 후대에 이식유전자를 전달하는 것으로 확인되었고 이식유전자가 chromosome상에 정착되어 chromosome과 함께 후대에 전달되는 것을 확인할 수 있었다.

Table 1. The efficiency of transgenic rabbit production by microinjection of MT-GH gene into rabbit embryos

Transgenic construct	No. of injected	No. of transferred	No. of recipient	New born		
				No.	No. of transgenic(%)	Efficiency (%)
MT-GHR	578	567	22	105	18 (17.1)	3.2
MT-IGF1R	382	327	15	54	10 (18.5)	3.1

Table 2. Transmission of transgenes into progeny in founder rabbits

Transgenic line	Sex	No. of progeny	No. of transgenic pups	Transmission rate(%)
MT-GHR	M	24	11	45.8
MTIGF-1R	M	16	9	56.3

2. 성장률 및 구성비율

본 연구에 이용되고 있는 이식 유전자는 성장(growth)과 관련이 있는 유전자로 체중이나 증체율에 효과를 나타낼 것으로 추정되어 먼저 연령에 따른 체중증가 효과를 측정하였다. GHR 또는 IGF-1R 형질전환토끼의 F₁을 이용하여 non-transgenic littermate와 함께 몸무게를 측정하였다(Fig. 2). 초기성장율에 있어서는 GHR 형질전환토끼의 증체율이 급격히 증가하고 IGF-1R 형질전환토끼의 증체율은 완만히 진행되었다. 그 이후 150일령까지의 증체율을 조사하였는데 GHR 형질전환토끼의 성장률은 non-transgenic litter mate에 비해 약 25% 정도 증가하는 경향을 나타내고 있고, IGF-1R 형질전환토끼는 약 15% 정도 증체효과가 있는 것으로 나타나고 있다(Fig. 2, 3). 형질전환토끼 암컷과 수컷의 증체율에서는 차이가 거의 없었고 증체

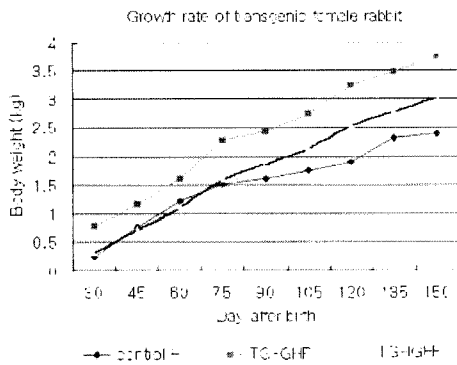


Fig. 2. Growth of female transgenic rabbits.

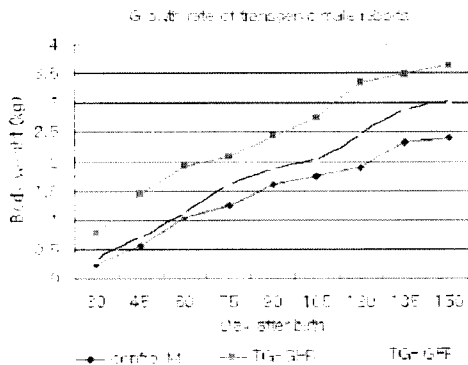


Fig. 3. Growth of male transgenic rabbits.

pattern도 같은 경향을 나타냈다. GHR과 IGF-1R의 증체 경향에는 약간의 차이가 나타나고있는데 GHR 형질전환토끼에서는 초기부터 증체에 차이가 나타나기 시작한 반면 IGF-1R 형질전환토끼에서는 약 90일령부터 증체에 차이를 나타내고 있다 (Fig. 2, 3). 이는 growth hormone receptor의 경우 growth hormone과 함께 발육 초기부터 증체에 관여하기 때문인 것으로 추정되고 IGF-1 receptor의 경우 IGF-1과 함께 성숙이 시작되는 사춘기 이후부터 증체 효과에 관여하기 때문인 것으로 추정되고 있다. 형질전환토끼에서의 증체율은 GH 또는 IGF-1 형질전환생쥐의 경우(Palmiter et al., 1983; Mathews et al., 1989)와 비교하여 다소 낮은 것으로 이는 receptor를 과잉발현하였기 때문인 것으로 사료된다.

분만 후 약 75일령의 형질전환토끼를 대조구로 littermate 비형질전환토끼와 함께 신체 장기의 무게를 분석하였는데 형질전환토끼에서 간 및 신장 등의 무게가 증가한 것으로 분석되었다(Table 3). 특히 GHR 형질전환토끼에서는 체중과 함께 모든 장기에서 대조구 토끼에 비해 25%~30% 증가되었다. IGF-1R 형질전환토끼는 장기의 비율이 10~15% 증가한 것으로 나타나고 있다. 특히 형질전환토끼에서 간과 신장의 무게가 뚜렷하게 증가된 것을 확인할 수 있었다. 이러한 형질전환토끼의 장기 무게 증가는 형질전환생쥐에서 보고된 것과 같은 경향을 나타내고 있다(Quaife et al., 1989).

IV. 요약

MT-GHR(Growth hormone receptor)와 MT-IGF-1R(IGF-1 receptor)유전자를 구축하고 micromanipulator를 이용하여 토끼 수정란에 유전자를 주입하여 형질전환토끼를 생산하였다. 본 연구에서의 형질전환토끼의 생산효율은 약 3%를 나타내었고 Growth Hormone receptor(GHR)를 가진 형질전환토끼와 IGF-1 receptor(IGF-1R)를 가진 형질전환토끼를 10마리 이상씩 생산하였다. 또한 정상 토끼와 교배시켜 F₁ 새끼를 얻어 유전자가 다음세대에 전달되는 것을 확인하였다. GHR 이나 IGF-

Table 3. Body and organ weight in transgenic rabbit

Transgenic rabbits ^a	Sex	BT(kg)	Tissue wt (g)				
			Liver	Kidney	Spleen	Lung	Heart
Control	F	1.61	30.3	10.8	0.69	7.5	3.7
	M	1.65	32.2	10.3	0.65	8.1	3.5
MT-GHR	F	1.93	40.5	17.6	0.87	9.1	4.3
	M	2.04	39.6	18.8	0.93	9.7	4.8
MT-IGF-1R	F	1.76	33.4	12.5	0.73	7.8	3.9
	M	1.86	35.2	13.2	0.82	7.9	4.2

^a Animals were killed at 75 days.

1R 형질전환토끼의 성장률은 정상토끼보다는 약 15~25% 정도 빠른 경향을 나타냈고 특히 GHR 형질전환토끼의 성장률이 더 높은 것으로 드러나 GHR 및 IGF-1R 유전자가 형질전환토끼에서 성장에 영향을 주었다는 것을 확인할 수 있었다.

V. 인용문헌

- Bauman, D. E. and Vernon, R. G. 1993. Effects of exogenous bovine somatotrophin on lactation. *Ann. Rev. Nutri.* 13:437-445.
- Daughaday, W. H., Hall, K., Raben, M. S., Salmon, W. D., van den Breda, J. L. and VanWyk J. J. 1972. Somatidin: proposed designation for sulfation factor. *Nature* 235:107-107.
- Flinton, D. J. 1994. Immunomodulatory approaches for regulation of growth and body composition. *Anim. Product.* 58:301.
- Frick, G. P., Leoard, J. L. and Goodman, H. M. 1990. Effect of hypophysectomy on growth hormone receptor gene expression in rat tissues. *Endocrinology* 126:3076-3085.
- Hammer, R. E., Pursel, V. G., Rexroar, Jr., C. E., Wall, R. J., Bolt, D. J., Palmiter, R. D. and Brinster, R. L. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature(London)* 315:680-683.
- Hughes, J. P., Elsholtz, H. P. and Friesen, H. G. 1985. Growth hormone and prolactin receptors. In *Polypeptide Hormone receptors* (Posner B. I., ed.) Marcel Dekker, New York, p 157.
- Mathews, L. S., Hammer, R. E., Brinster, R. L. and Palmiter, R. D. 1988. Expression of Insulin-like Growth Factor I in transgenic mice with elevated levels of growth hormone is correlated with growth. *Endocrinology* 13:433-437.
- Mathews, L. S., Enberg, B. and Norstedt, G. 1989. Regulation of rat growth hormone receptor gene expression. *J. Biol. Chem.* 264: 9905-9911.
- Palmiter, R. D., Brinster, R. L., Hammer, R. E., Trumbauer, M. E., Rosenfeld, G. M., Birnberg, N. C. and Evan, R. M. S. 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300:611-613.
- Palmiter, R. D., Norstedt, G., Galinas, R. E., Hammer, R. E. and Brinster, R. L. 1983. Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science* 222:809-814.
- Postel-Vinay, M. C., Cohen-Tanugi, E. and Charrier, J. 1982. Growth hormone receptors in rat liver membranes: effects of fasting and refeeding and correlation with plasma somato-

- medin activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 28:667-675.
12. Quaife, C. J., Mathews, L. S., Pinkert, C. A., Hammer, R. E., Brinster, R. L. and Palmiter, R. D. 1989. Histology associated with elevated levels of growth hormone and Insulin-like Growth Factor I in transgenic mice. *Endocrinology* 124:40-48.
 13. Tollet, P., Enberg, B. and Mode, A. 1990. Growth hormone(GH) regulation of cytochrome P-450IIC12, insulin-like growth factor-1 (IGF-1), and GH receptor messenger RNA expression in primary rat hepatocytes: a hormonal interplay with insulin, IGF-1, and thyroid hormone. *Mol. Endocrinol.* 4:1934-1942.
 14. Wall, R. J. 1996. Transgenic livestock: Progress and prospects for the future. *Theriogenology* 45:57-68.
- (접수일자: 2002. 12.18. / 채택일자: 2003. 2. 7.)