

형질전환 생쥐에서 제10세대까지 TPO 유전자의 안정적 전이와 지속적인 발현*

정진우 · 오건봉 · 한용만 · 이경광[†]

한국생명공학연구원 발생/분화연구실

Stable Transmission and Expression of TPO Transgene up to 10 Generation in the Transgenic Mice

Zheng, Z. Y., K. B. Oh, Y. M. Han and K. K. Lee[†]

Laboratory of Development and Differentiation, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

ABSTRACT

The pBT-L transgenic mice carrying human TPO gene in conjunction with bovine β -casein promoter express human TPO in milk during lactation. In this study, stability of germ line transmission and expression of pBT-L transgene integrated into host chromosome were monitored up to generation F10 of transgenic pBT-L/15 line. When male mouse of generation F8 was crossbred with normal females, approximately half of offsprings ($51.3 \pm 18.98\%$) were identified as transgenic mice. Generation F9 and F 10 mice also showed similar transmission rates ($43.8 \pm 18.98\%$ and $71.4 \pm 26.98\%$, respectively), implying that pBT-L transgene can be transmitted stably up to long term generation in the transgenic mice. Expression levels of human TPO from milk of generation F9 and F10 mice were 1.1 ± 0.33 mg/ml and 1.1 ± 0.45 mg/ml, respectively, which are similar to expression level of generation F2 mice. In conclusion, our results suggest that transgenic animals once established will continuously pass their transgenes to the progeny through the breeding program with the same productivity of human protein in their milk.

I. 서 론

1974년에 최초로 외래의 유전자가 염색체로 도입된 동물이 생산된 이래(Jaenisch와 Mintz, 1974), 형질전환 동물은 유전자 발현의 조절 기전이나 세포의 발달과 분화의 기전을 밝히려는 연구를 위해 또는 사람의 질병에 대한 모델의 개발을 위한 도구로 사용되고 있다(Jaenisch, 1988). 또한 형질전환동물의 유전을 bioreactor로 활용하려는 연구가

Gordon 등(1987)에 의해 생쥐에서 처음으로 시도된 이후로 많은 연구자들에 의해 의약품으로 사용되는 유용단백질을 유전에서 대량으로 생산할 수 있는 시스템 개발이 진행되어 왔고, 그 결과로 매우 높은 수준에서 발현하는 형질전환 생쥐, 래트, 산양, 면양, 돼지, 소가 생산되었다(Wall, 1998; Rudolph, 1999). 이들의 연구에서 대부분은 형질전환 동물의 외래 유전자가 다음 세대로 전이되는 것이 확인되면 계통이 확립된 것으로 인정하였고,

* 본 연구는 과학기술부의 중점실용화연구개발사업(NBW0070233) 및 농촌진흥청 바이오그린21 사업 과제(ABM 0020211)의 일환으로 수행되었음.

[†] Corresponding author : Tel: 042-860-4420, E-mail: leek@kribb.re.kr

그 외래유전자에 대한 형질은 안정적으로 자손에게 유전될 것으로 예측하였다. 그렇지만, 일단 계통이 확립된 형질전환 동물에서 그 외래유전자의 발현 수준이 세대에 관계없이 지속적으로 유전되는지 또한 모든 자손에게 유전되는지에 대해서는 아직 실험적으로 명확하게 구명되지 않았다. 실제로, 일반적인 현상은 아니지만, 몇몇 연구자에 의하면 외래유전자가 삽입된 위치에 따라 비록 그 유전자가 다음 세대로 전이되더라도 발현 수준이 감소하거나(Dobie 등, 1996; Migliaccio 등, 2000; Opsahl 등, 2002), 유전자의 변형에 의한 외래유전자의 결손에 의해 야기된 발현의 중지(Sandgren 등, 1992; Aigner 등, 1999), 그리고 유전적 또는 후생적(epigenetic) 변형(Robertson 등, 1996; Dobie 등, 1997)에 의해 발현에 이상이 있음이 보고되고 있다.

Thrombopoietin(TPO)는 myeloid stem cell이 분화하기 시작하여, colony forming cell-megakaryocyte와 megakaryocyte를 거쳐 최종적으로 혈소판이 생성되는 세포성장 및 분화과정에 관여하는 세포 성장인자이다. 이러한 기능을 가진 TPO는 골수 이식을 받았거나, 혈 종양과 악성 종양에 대한 약물 치료를 받은 환자에게서 나타나는 호중구 감소증과 혈소판 감소증이나 virus 감염이나 면역적 원인에 의한 혈소판 감소증 치료에 이용될 수 있다(Lok와 Foster, 1994; Alastair와 Wood, 1998; Kaushansky, 1997). 본 연구팀에서는 TPO를 대량 생산할 수 있는 형질전환 동물의 체계를 확립하고자 소의 β -casein promoter에 TPO cDNA를 연결한 벡터를 제작하여 pBT-L이라 명명한 형질전환 생쥐를 개발한 바 있다(Sohn 등, 1999). 이 중에서 pBT-L #15 형질전환 생쥐는 최고 1.5 mg/ml 수준으로 유즙에서 TPO를 분비하며, 이로부터 생산된 TPO는 그 생리 활성이 매우 높은 것으로 검증되었다. 그러나 이러한 형질전환 동물이 10세대 이상 여러 세대에 걸쳐서 그 형질을 계속 유지할 수 있는지에 관해서는 아직 실험적으로 명확히 밝혀진 것이 없다. 따라서 본 실험에서는 이러한 형질유전성을 알아보고자 제 2세대에서 높은 수준으로 인간 TPO를 발현하는 형질전환 생쥐를 제 8세대까

지 계대번식을 통해 유지시킨 후 제 9세대와 제 10세대에서 외래유전자 전이율과 TPO 발현 수준을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물

본 실험을 위해 유즙으로 인간 TPO를 제 1세대에서 1.5 mg/ml 수준으로 생산하는 pBT-L 형질전환 생쥐의 8 세대를 공시하였고, 다음과 같은 방법으로 10 세대까지 계대 번식을 실시하였다.

- (1) 각 세대의 형질전환 생쥐 ♂ × 교잡종 생쥐 (C57BL/6XDBA) ♀
- (2) 교잡종 생쥐(C57BL/6XDBA)♂ × 각 세대의 형질전환 생쥐 ♀

2. 인간 TPO 유전자의 전이 확인

교배를 통하여 태어난 산자들의 TPO 유전자 전이 여부를 PCR 방법으로 분석하였다. 이를 위해 자손의 꼬리를 일부 절취한 후, 이를 300 μ g/ml의 proteinase K(Promega, USA)가 첨가된 0.3 ml의 조직 용해 용액[100 mM Tris-HCl(pH 8.5), 5 mM EDTA, 0.2% SDS]에서 용해시켰다. 55°C에서 16~18 시간 동안 용해된 조직용액에 이와 동일한 양의 Tris-saturated Phenol (Sigma, USA)을 첨가하여 완전히 섞은 후 5,000 \times g에서 15분간 원심분리를 수행하였다. 이러한 과정을 2 회 더 실시한 후 상층액을 회수하여 이와 동일한 양의 순수 ethanol과 서서히 섞어 genomic DNA의 침전을 유도하였다. 침전된 genomic DNA를 멸균 증류수로 녹여 다음 실험에 사용하였다 (Sambrook 등, 1989).

PCR은 primer를 제외한 *Taq* polymerase, PCR buffer, dATP, dCTP, dGTP, dTTP가 한 튜브에 미리 준비된 pre-mix kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 수행하였다. 약 100 ng의 genomic DNA와 20 pmol의 정방향과 역방향 primer를 최종 20 μ l가 되도록 멸균증류수로 조정된 후 pre-mix kit에 첨가하였다. 외래유전자 pBT-L에 대한 primers를 이용하여 thermocycler (Perkin Elmer Co., Rockville, MD, Model 480)에서 PCR을 수행하였는데, PCR 조건

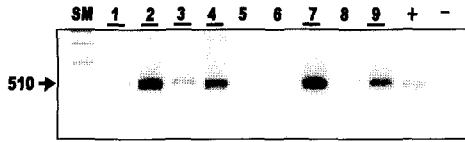


Fig. 1. Identification of TPO transgene from the tail genomic DNA of offsprings. PCR analysis was carried out as described in materials and methods. TPO-specific band of 510 bp only was showed in offsprings carrying the transgene, which was indicated as an underlined number.

은 아래와 같다.

pBT-L : 94 °C 45초, 65 °C 60초, 72 °C 30초 / 30회

PCR을 수행한 후 그 반응 산물의 10 μ 를 1.5 % agarose gel에서 전기 영동을 실시하였다. Ethidium bromide 염색에 의해 pBT-L은 510 bp에서 PCR 증폭 단편이 확인되는 생쥐를 형질전환 생쥐로 판명하였다(Fig. 1).

3. 유즙의 분석

암컷 형질전환 생쥐의 유즙을 채취하기 위하여 임신과 분만을 유도하였다. 분만 후 10일째에 유즙 분비를 촉진시키기 위해 10 I.U.의 oxytocin(Sigma, USA)을 복강내에 주사하였고, 그 즉시 5 ml 주사기를 이용하여 유즙을 흡입하였다. 채취된 유즙은 분석 전까지 -20°C에서 보관하였다.

형질전환 생쥐의 유즙에 함유된 인간 TPO의 농도는 ELISA kit(R & D systems사, USA)를 이용하여 측정하였다. 분석은 구입한 kit에서 제공하는 방법에 따라 실시하였고, 이 kit에서 제공되는 standard와 sample 반응액을 micro-plate reader(BIO-RAD, USA)를 이용 450 nm에서 O.D 값을 측정하였다. Standard에 대한 O.D값을 microcal origin 6.0 software를 사용하여 standard curve를 완성하였고 유즙 sample O.D 값의 평균을 대입하여 유즙내 TPO 농도를 결정하였다.

4. 통계처리

시험결과에 대한 각 군간의 통계학적 유의성은 SAS package의 General Linears Model(GLM) procedure(SAS Institute, 1996)를 이용하여 Duncan's multiple range test에 의하여 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. pBT-L 유전자의 안정적 전이

제 2 세대에서 유즙으로 인간 TPO를 생산하는 것으로 확인된 형질전환 생쥐에서 그 외래유전자가 장기 세대까지 안정적으로 전이되는지를 알아보고자 제 9세대와 제 10세대의 형질전환 자손의 생산 비율을 조사하였다. 이를 위해 8 세대의 수컷 형질전환 생쥐를 실험에 공시하여 제 9세대와 제 10세대의 수컷 또는 암컷 형질전환 생쥐를 정상 생쥐와 교배시켜 그 자손의 형질전환 여부를 PCR 방법으로 분석하였고, 그 결과는 Table 1과 2에 나타나고 있다.

제 8세대의 형질전환 수컷으로부터 생산된 자손 중 51.4%가 형질전환 생쥐로 판명되었다. 이것은 pBT-L 유전자는 형질전환 생쥐의 생식선(germline)으로 완전히 전이되었다는 것을 의미한다. 이로부터 제 9세대에서 암컷이 형질전환 생쥐일 경우 57.9±8.38%, 수컷의 경우 29.6±15.05%가 형질전환 생쥐로 판명되었다(Table 1과 2). 제 9세대 형질전환 생쥐의 계대 번식에 의해 생산된 형질전환 생쥐는 암컷으로부터 79.2±19.09%, 수컷으로부터 68.5±29.01%가 형질전환 생쥐로 판명되었다(Table 1과 2). 제 9세대와 10 세대에서 수컷이 형질전환 생쥐일 경우 그의 자손에게 전이되는 외래 유전자를 보유할 비율이 약간 높은 경향이 관찰되었으나, 각 세대간 전이율에서 유의차가 인정되지 않았다. 종합적으로 제 9세대와 제 10세대의 외래 유전자 전이율은 각각 43.8±18.98%와 71.4±26.98%로서 제 8세대의 것과 유사하였으며, 통계적인 유의차가 인정되지 않았다.

위와 같은 PCR 분석에 의한 전이율 조사만으로도 그 외래유전자가 유전적으로 손상되어 다음 세대로 전이되었는지를 판단할 수 없다. 그렇지만, 손(1998)에 의하면 본 실험에 공시된 형질전환 생쥐

계통은 2 copy의 외래유전자가 삽입되었다고 보고 하였기 때문에, 멘델의 법칙에 거의 유사하게 나타난 전이율로 볼 때, pBT-L 형질전환 생쥐는 그 외래유전자의 유전적 손상이 없이 10세 이상 장기 세대에 걸쳐서 안정적으로 전이되는 것으로 판단 된다.

2. 형질전환생쥐의 유선에서 인간 TPO의 지속적인 발현

위의 결과로부터 일단 염색체에 삽입된 외래의 유전자는 장기 세대까지 안정적으로 유전된다는 것을 확인하였다. 인간 TPO의 발현 수준도 제 2세대에서 1.5 mg/ml의 수준에서 인간 TPO를 발현했던 형질전환 생쥐가 장기 세대까지 그 발현 능력이 유지되는지를 알아보기 위하여 제 8 세대의 형질전환 수컷으로부터 다수의 형질전환 생쥐의 자손을 확보하였다 (Table 1과 2). 그 중에서 암컷 형질전환 생쥐 3 마리를 성성숙 후 임신과 분만을 유도하였다. 비유 10일 쯤에 유즙내에 함유된 인간

TPO의 농도를 ELISA 방법으로 측정하였다 (Table 3). 인간 TPO의 농도는 최소 0.745 mg/ml에서 최고 1.405 mg/ml까지 약 0.7 mg/ml의 변이를 나타내었다. 이러한 차이는 유선을 표적으로 하는 형질전환 생쥐에서 흔히 보이는 현상이며(최 등, 1998), 개체간의 건강이나 유즙 생산 능력의 차이에 의한 결과로 생각된다. 평균적으로 제 9 세대 형질전환 생쥐의 인간 TPO 발현 수준은 약 1.1 mg/ml 이었다. 제 9세대의 형질전환 생쥐로부터 제 10대의 형

Table 3. TPO expression in the milk of generation F9 and F10 mice

Generation	n	Range (mg/ml)	Expression level
			(mg/ml) (Mean±SD)
F2	1	-	1.5 ^a
F9	3	0.745~1.405	1.1±0.33
F10	3	0.603~1.505	1.1±0.45

^a Sohn 등, 1999.

Table 1. Transgenic rate of offsprings after crossbreeding of transgenic male mice

Generation	No. of offsprings born			No. of transgenic mice			Transgenic rate (%)		
	M	F	T	M	F	T	M	F	T
	F1 (1)*			8			3		
F8 (3)	21	17	38	9	11	20	37.1±26.04 ^{ab}	57.5±27.94 ^a	51.3±18.98 ^a
F9 (3)	14	12	26	4	4	8	30.6±17.33 ^b	30.0±26.45 ^a	29.6±15.05 ^a
F10(3)	8	12	20	5	8	13	80.0±34.64 ^a	66.7±28.86 ^a	68.5±29.01 ^a

*Sohn 등, 1998.

(): Number of non-transgenic female mice bred with transgenic male.

M: male, F: female, T: total.

^{a,b}: Means with different superscript are different in the same column at p<0.05.

Table 2. Transgenic rate of offsprings after crossbreeding of transgenic female mice

Generation	No. of offsprings born			No. of transgenic mice			Transgenic rate (%)		
	M	F	T	M	F	T	M	F	T
	F9 (3)	15	9	24	6	8	14	39.4±18.28 ^b	91.7±14.43 ^a
F10 (3)	12	11	23	9	9	18	75.6±21.42 ^a	82.3±16.76 ^a	79.2±19.09 ^a

(): Number of transgenic female mice bred with non-transgenic male.

M: male, F: female, T: total.

^{a,b}: Means with different superscript are different in the same column at p<0.05.

질 전환 생쥐를 생산하였고, 이로부터 제 9대와 같은 방법으로 제 10세대의 3마리 암컷 형질전환 생쥐의 인간 TPO 발현 능력을 조사하였다. 제 10세대에서도 9세대의 경우와 마찬가지로 인간 TPO의 발현 수준은 0.603 mg/ml부터 1.505 mg/ml 까지 다양하였다. 평균 농도도 1.1 mg/ml 로서 제 9세대의 것과 같았다. 이러한 발현 수준은 제 2세대의 1.5 mg/ml의 수준과 유사한 결과로(Sohn 등, 1999) pBT-L 형질전환 생쥐에서 인간 TPO 유전자의 발현은 최소한 10세대까지 지속적으로 유지된다는 것을 알 수 있었고, 더 긴 장기 세대까지도 발현 수준이 유지될 것으로 생각된다.

이상의 결과는 일단 형질전환 동물이 한 계통으로 확립되면, 그 동물에 부여된 새로운 유전형질은 장기 세대까지 유전될 수 있음을 보여주고 있다.

IV. 요약

형질전환 동물의 유선에서 특이적으로 인간 TPO가 발현되도록 고안된 pBT-L 외래유전자가 삽입되어 한 계통으로 확립된 형질전환 생쥐에서 이 유전자가 장기 세대까지 안정적으로 전이되고, 또한 발현 수준도 지속적으로 유지되는지를 조사하였다. 이를 위해 제 8세대의 수컷 pBT-L 형질전환 생쥐를 실험에 공시하였고, 제 10세대까지의 전이율과 인간 TPO의 발현수준을 분석하였다. 제 8세대 생쥐의 계대 번식에 의한 자손 중 51.3±18.98%가 형질전환 생쥐로 판명되었다. 또한 제 9세대에서 외래 유전자의 전이율은 43.8±18.98%이었고, 제 10세대에서는 71.4±26.98%의 전이율을 나타내었다. 이러한 결과로 pBT-L 형질전환 생쥐는 그 외래유전자의 유전적 손상이 없이 장기 세대까지 안정적으로 전이되는 것으로 판단된다. 제 9세대와 10세대의 3마리의 암컷 형질전환 생쥐로부터 유즙내 인간 TPO의 발현 수준을 분석하였을 때, 그 농도는 모두 평균 1.1 mg/ml의 수준에서 측정되었다. 이러한 수준은 제 2세대의 것과 유사한 결과로 pBT-L 형질전환 생쥐에서 인간 TPO 유전자의 발현은 최소한 10세대까지 지속적으로 유지된다는 것을 알 수 있었고, 더 긴 장기 세대까지도

발현 수준이 유지될 것으로 추정된다. 이러한 연구 결과는 계통으로 확립된 형질전환동물에 부여된 새로운 유전형질은 장기 세대까지 유전될 수 있음을 보여주는 것이다.

V. 인용문헌

1. Aigner, B, Fleischmann, M, Muller, M. and Brem, G. 1999. Stable long-term germ-line transmission of transgene integration sites in mice. *Transgenic Res.*, 8:1-8.
2. Alastair J. J. and Wood, M. D. 1998. Drug therapy. *New England J. of Medicine*, 339: 746-754.
3. Dobie, K. W., Lee, M., Fantes, J. A., Graham, E., Clark, A. J., Springbett, A., Lathe, R. and McClenaghan, M. 1996. Variegated transgene expression in mouse mammary gland is determined by the transgene integration locus. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* 93:6659-6664.
4. Dobie, K., Mehtali, M., McClenaghan, M. and Lathe, R. 1997. Variegated gene expression in mice. *Trends Genet.*, 13:127-130.
5. Gordon, K., Lee, E., Vitale, J. A., Smith, A. E., Westphal, H. and Henninghausen, L. 1987. Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. *Bio/Tech.*, 5:1183-1187.
6. Jaenisch, R. 1988. Transgenic animals. *Science*, 240:1468-1474.
7. Jaenisch, R. and Mintz, B. 1974. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* 7:1250-1254.
8. Kaushansky, K. 1997. Thrombopoietin: Understanding and manipulating platelet production. *Annu. Rev. Med.*, 48:1-11.
9. Lok, S. and Foster, D. C. 1994. The structure, biology and potential therapeutic applications of

- recombinant thrombopoietin. *Stem Cells*, 12: 586-598.
10. Migliaccio, A. R., Bengra, C., Ling, J., Pi, W., Li, C., Zeng, S., Keskinetepe, M., Whitney, B., Sanchez, M., Migliaccio, G. and Tuan, D. 2000. Stable and unstable transgene integration sites in the human genome: extinction of the Green Fluorescent Protein transgene in K562 cells. *Gene*, 256:197-214.
 11. Opsahl, M. L., McClenaghan, M., Springbett, A., Reid, S., Lathe, R., Colman, A. and Whitelaw, C. B. A. 2002. Multiple effects of genetic background on variegated transgene expression in mice. *Genetics*, 160:1107-1112.
 12. Robertson, G., Garrick, D., Wilson, M., Martin, D. I. and Whitelaw, E. 1996. Age-dependent silencing of globin transgenes in the mouse. *Nucleic Acids Res.*, 15:1465-1471.
 13. Rudolph, N. 1999. Biopharmaceutical production in transgenic livestock. *Trends in Biotech.*, 17:367-374.
 14. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
 15. Sandgren, E. P., Palmiter, R. D., Heckel, J. L., Brinster, R. L. and Degen, J. L. 1992. DNA rearrangement causes hepatocarcinogenesis in albumin-plasminogen activator transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* 89:11523-11527.
 16. Sohn, B. H., Kim, S. J., Park, H., Park, S. K., Lee, S. C., Hong, H. J., Park, Y. S. and Lee, K. K. 1999. Expression and characterization of bioactive human thrombopoietin in the milk of transgenic mice. *DNA Cell Biol.*, 18:845-52.
 17. Wall, R. J. 1998. Biotechnology for the production of modified and innovative animal products : Transgenic livestock bioreactors. In *Proceedings special symposium and plenary sessions, The 8th world conference animal production*. pp. 364-378.
 18. 손보화. 1998. 인간의 Thrombopoietin을 유즙에서 발현하는 형질전환 생쥐의 개발. 경북대학교 대학원.
 19. 최영희, 오건봉, 강용국, 방남수, 서길웅, 이경광, 이철상. 1998. 형질전환 생쥐에서 bovine β -casein/bovine growth hormone 재조합 유전자의 유전적 안정성에 관한 연구. *한국가축번식학회지*, 22:237-244.
- (접수일자: 2003. 1. 10. / 채택일자: 2003. 2. 7.)