

미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*)의 응성발생성 처녀생식: I. 형질전환 유전자 표지를 이용한 응성발생성 반수체 유도 최적화

남윤권*, 노충환¹, 김동수

부경대학교 양식학과/해양수산형질전환생물연구소
¹한국해양연구원 생물자원본부

Intraspecies Androgenesis in Mud Loach (*Misgurnus mizolepis*): I. Optimization of the Egg Inactivation and Haploid Androgenesis Using Transgene Marker

Yoon Kwon Nam*, Choong Hwan Noh¹ and Dong Soo Kim

Department of Aquaculture & Institute of Marine Living Modified Organisms (iMLMO),
Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

¹Marine Resources and Research Department, Korea Ocean Research and Development Institute, Ansan 426-744, Korea

Induced androgenesis, a form of artificial parthenogenesis is an important tool for the generation and use of genetically isogenic or clonal fish strain. An optimized protocol for the genetic inactivation of mud loach (*Misgurnus mizolepis*) oocytes (i.e. production of androgenetic haploid) was developed using UV-irradiation. Various dose levels of UV significantly affected the fertilizing capacity of the eggs, hatchability of embryos and incidence of haploidy. Based on the extensive examinations of treatment conditions on embryo viability and haploid incidence, the optimum dose level of UV irradiation was turned out to be 10,800 ergs/mm² with 56.9% of hatching success and 94.6% of haploidy. The overall yield of putative androgen under optimized treatment condition was more than 50% out of total eggs inseminated. The success of androgenetic reproduction of haploid genome was verified by flow cytometry and PCR amplification of transgene that is exclusive to either one of parental sexes. However, a small portion (8~11%) of presumed androgenetic haploid larvae was proven to contain residual DNA fragment(s) from maternal parent.

Keywords: Induced androgenesis, Mud loach, Haploidy induction, Transgene marker

서 론

응성발생성 유도(induced androgenesis)는 암컷 유전물질의 관여 없이 정자의 유전물질만으로 개체를 생산하는 기술로서 정자의 반수체 genome을 이배체로 복원할 경우 이론적으로 genome 내 모든 유전자 좌위(loci)를 동형접합(homozygous)화 할 수 있는 기술이다(Bercsenyi et al., 1998; Babiak et al., 2002a). 본 기법은 유전적으로 완벽한 순계, 나아가 유전적으로 동일한 복제 계통을 단기간 내 다량 확립할 수 있는 장점이 있으며, 이에 유전학을 위시한 많은 제반 생물학 분야에서 유용한 모델 시스템으로서 각광 받고 있다(Kirankumar and Pandian, 2004a). 또한 포유류와는 달리 어류의 경우 반수체 상태로 배 발생 및 부

화가 가능하기 때문에 응성발생성 반수체는 'genetic masking' 이 없는 유전적으로 순수한 척추동물 모델을 제공할 수 있으며 이에 genomic mutation assay를 위한 중요한 기법으로도 인정 받고 있다(Corley-Smith et al., 1996; Ungar et al., 1998).

그러나 응성발생성 어류 시스템을 널리 활용하기에는 아직 해결해야 할 많은 기술적 난제들이 있다. 특히 체외 수정을 하는 어류의 경우 수정 후 배 발생과 초기 분화에 필요한 단백질 및 핵산 물질들이 난에 포함되어 있기 때문에 난의 유전물질을 제거하기 위해 사용되는 물리, 화학적 처리들이 이들 전구체(precursors)들의 변성(denaturation)을 함께 유발하게 되고 결과적으로 응성발생성 유도 시 낮은 생존율을 야기시키게 된다(Bongers et al., 1994; Pandian and Koteeswaran, 1998). 또한 처녀 생식의 손쉬운 확인을 위해 서로 다른 두 종의 배우자간 인공 수정이 사용되고 있으나(interspecies androgenesis) 생식학적 격리가 되어

*Corresponding author: yoonknam@pknu.ac.kr

있는 종들의 배우자를 이용할 경우 수정 자체가 불가능하거나, 수정이 된다 할지라도 'nuclear-cytoplasmic incompatibility'로 알려져 있는 현상 때문에 처녀생식에 의해 생성된 접합자(zygote) 또는 부화 개체들에 있어 높은 기형률 및 발생·분화 능력 상실 등이 문제시되고 있다(Babiak et al., 2002b). 때문에 진화적으로 가까운 근연종간의 인공 수정일지라도 사용한 난의 종류 및 불활성화 방법에 따라 크게 상이한 연구결과들이 보고된 바 있으며 따라서 다른 종으로부터 효과적인 cytoplasmic donor를 확보하는 것은 쉽지 않다(Bercsenyi et al., 1998; Paschos et al., 2001). 이에 동일 종의 난을 이용한 웅성발생 처녀생식의 유도(intraspecific androgenesis)가 종종 불가피하며 이 경우 난자 유전물질을 완벽히 제거할 수 있는 genome 불활성화 조건의 확립은 필수적이다.

그러나 동일 종내 웅성발생성 최적화를 위해서는 웅성발생을 간편하게 검증할 수 있는 초기 분석 기법의 확보가 반드시 선행되어야 한다. 부계 특이적인 인공처녀생식의 성공여부를 확인하기 위해 현재까지 여러 가지 검증 방법들이 사용되고 있으며, 이는 외부 표현형 분석(color or phenotypic marker) (Kirankumar and Pandian, 2003), 세포유전학적 분석(David and Pandian, 2006), 자손검정(Kirankumar and Pandian, 2004b) 그리고 random amplified polymorphic DNA (Bercsenyi et al., 1998), multi-locus DNA fingerprinting (Young et al., 1996), amplified fragment length polymorphism (Brown and Thorgaard, 2002), 미토콘드리아 또는 핵 유전자의 검출(Kirankumar and Pandian, 2004c) 및 microsatellite loci 분석(Tanck et al., 2001)등의 다양한 분자생물학적 평가 방법들을 포함하고 있다. 그러나 상기 분자표지들을 동일 종내 인공처녀생식의 최적화 실험에 사용함에 있어 일부 방법들의 경우 (1) 많은 수의 자어를 대상으로 수행하기에는 매우 번거롭거나, (2) 분석시기까지 오랜 기간이 소요되며, (3) 작은 크기의 자어 한 마리로부터 분석에 충분한 핵산 시료 확보가 용이하지 못하며 (4) 방법론에 따라 marker 증폭의 재현성이 우수하지 못하고, 또한 (5) 여러 마리로부터 배우자를 한 실험조건에 이용할 경우(즉, pooled egg 또는 pooled sperm을 이용할 경우) 인공처녀생식 성공여부의 간편한 해석이 쉽지 않다는 단점이 있다.

이에 본 연구에서는 우리나라 주요 담수 어종인 미꾸라지 (*Misgurnus mizolepis*)를 어류 염색체 조작 모델로 개발하기 위한 연구의 일환으로 그간 다른 종(잉어, *Cyprinus carpio*)의 난자를 이용한 미꾸라지 웅성발생성 유도에서 관찰된 낮은 배 발생률과 수율(total output)을 극복하기 위해(see Nam et al., 2002) 동일종간 웅성발생성 처녀 생식 조건(intraspecific androgenesis)을 확립하고자 하였다. 그 첫번째 단계로서 미꾸라지 난의 유전물질을 효과적으로 제거할 수 있는 최적의 불활성화 조건을 확립하고자 하였으며 또한 동일 종내 인공처녀생식의 분자유전학적 표지로서 서로 다른 형질전환 유전자를 포함하는 배우자(gamete)들을 이용하여 효과적인 웅성발생성 생식의 검증 효과를 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

실험어 및 배우자 확보

실험에 사용된 미꾸라지는 부경대학교 양식학과에서 유지하던 5년산 실험어로서 평균 어체중(BW) 41 ± 5 g의 암컷들과 16 ± 2 g의 수컷 친어들이었다. 성숙된 친어들로부터 Kim et al. (1994)의 방법에 따라 태반성 성선자극 호르몬(HCG)를 이용하여 산란유도를 수행하였다. 암컷은 개체의 성숙도에 따라 6~10 IU HCG/g body weight (BW)로 그리고 수컷은 2 IU HCG/g BW의 농도로 1회 주사 하였으며, 25°C에서 12~13시간 경과 후부터 복부 압박법에 의해 난자와 정자를 얻었다. 암컷의 경우 산란 유도 실험별로 6~8마리의 개체로부터 인공산란을 유도한 후 상위 난질을 보이는 3마리 암컷의 난을 이용하였다.

웅성발생성 반수체 유도 조건 평가 및 생존율 분석

첫째, 복부압박법으로 채정한 정자는 예비 실험 결과를 바탕으로 생리식염수(0.85% NaCl)를 이용하여 1:30 비율로 희석한 후 실험에 사용하였다. 채란된 난 1 ml (=1,000 eggs) 당 0.5 ml의 4°C 생리식염수를 첨가하여 잘 섞어 준 후 난을 한 층으로 잘 펼치고 회전판이 장착된 자외선 조사 장치를 이용하여 초당 90 ergs/mm²의 농도로 0에서 285초까지 15초 간격으로 자외선 (ultraviolet ray; UV) 조사를 수행하였다. 결과적으로 0에서 25,650 ergs/mm²까지의 총 자외선 양이 처리되도록 하였다. 자외선 처리가 끝나면 준비된 정자와의 인공 수정을 통해 발생을 유도하였으며 이때 온도는 25±0.5°C로 유지하였다. 동일한 실험을 서로 다른 친어군의 알과 정자를 이용하여 4회 반복 조사하였으며 각 실험구당 수정률(수정 후 1시간) 및 부화율(대조군의 tail beating 시기; 수정 후 24시간)을 백분율로 조사하였으며 부화된 자어들을 대상으로 종래 알려진 haploid syndrome을 기준으로 반수체 유도율을 구하였다. 수정률 및 부화율은 반복구당 110개의 난을 대상으로 조사하였고 반수체율은 부화 자어 120마리를 대상으로 평가하였다.

둘째, 상기 1차 실험에서 얻어진 결과를 바탕으로 상대적으로 우수한 생존율과 반수체 유도율을 보이는 구간을 다시 선별하여 10초 간격으로 구분 지어 상기와 동일하게 자외선 처리를 수행하고 부화율과 반수체 유도율을 재조사하였다. 각 처리구당 3반복 실험을 수행하였다. 실험 결과를 바탕으로 각 처리구별 웅성발생성 이배체 유도 수율(yield)을 처리된 전체 난의 수에 대한 백분율로 환산하였으며 이때 각 처리군 평균간의 유의차를 검정하기 위해 분산분석(ANOVA)을 통해 P<0.05 수준에서 유의성을 분석하였다.

형질전환 배우자를 이용한 웅성발생성 반수체 유도 분석

상기 실험 결과들을 바탕으로 가장 우수한 반수체 유도율을 보이는 처리 구간을 대상으로 형질전환 개체들을 이용하여 웅성발생성 반수체 유도를 수행하였다. 실험에 사용한 형질전환

어류들은 chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter construct 들이 이식되어 있는 동형접합성(homozygous) 형질전환체로서 1~10 copies의 형질전환 유전자가 tandem concatemer 형태로 삽입되어 있는 계통들에서 선발된 개체들이었다. 본 계통의 자세한 유전학적 특성은 Nam et al. (1999, 2000)에 기술되어 있다. 또 다른 형질전환 계통은 성장호르몬 유전자가 이식되어 역시 stable germ line transmission을 보였던 선발 계통으로서 transgene 4~5 copies가 동형접합성 형태로 이식되어 있는 개체들을 이용하였다. 원 계통에 관한 유전학적 특성은 Nam et al. (2001a)에 기술되어 있다.

형질전환 표지를 이용한 음성발생성 반수체 유도를 위해서 첫째, CAT-transgene을 갖는 동형접합성 암컷의 난을 이용하여 앞서 조사된 최적 구간들을 대상으로 음성발생성 반수체 유도를 시도하였다. 수컷은 일반 미꾸라지 친어로부터 얻은 정자를 이용하였다. 음성발생성 치녀생식발생을 검증하기 위해서 UV를 조사하지 않는 난과의 수정을 통해 대조군(2N)을 설정하였다. Transgene-specific PCR을 이용하여 음성발생성 반수체군과 2배체 대조군(biparental)을 분석하였다. 각 반수체 자어로부터 분리한 핵산 시료가 PCR 반응에 적합한지를 확인하기 위해서(false negative 효과를 방지하기 위해) 미꾸라지 metallothionein (MT) 유전자 일부를 증폭할 수 있는 internal control PCR을 함께 수행하였다. 둘째, GH-transgene과 CAT-transgene을 중복 이용하여 음성발생성 발생을 검증하였다. 동형접합성 CAT-transgenic 암컷으로부터 얻은 난을 대상으로 상기와 동일하게 UV 처리를 수행한 후 GH-transgene을 포함하는 정자와의 인공수정을 실시하였다. 음성발생성 발생을 검증하기 위해서 두 형질전환 유전자에 각각 특이적인 PCR 반응을 통해 암컷 기원 형질전환 유전자의 미증폭과 수컷 기원 형질전환 유전자의 증폭을 확인하였다.

Flow cytometry 분석

음성발생성 개체들의 반수체 DNA content를 확인하기 위해서 전형적인 haploid syndrome을 보이는 개체들을 대상으로 20마리씩 pooling하여 flow cytometry를 수행하였다. Pooling된 20마리 자어를 homogenization한 후 20 µm mesh로 단일 세포들을 회수하였고 50 µg/ml의 propidium iodide를 포함하는 염색용액(10 mM Tris-Cl, 1mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.01% NP-40)에서 30분간 염색한 후 WinBryte HS flow cytometer (BioRad)를 이용하여 분석하였다. 이때 대조군으로서 미꾸라지 2배체 혈구 세포(2.8 pg/cell)와 정세포(1.4 pg/cell)를 이용하였다.

DNA 추출 및 PCR 분석

각각의 반수체 자어로부터 PCR 분석용 DNA를 확보하기 위해서 다음의 방법을 이용하여 DNA 추출을 수행하였다. 반수체 자어를 분해 용액(20 mM Tris-Cl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0; 2.5 mM MgCl₂, 0.01% SDS; 50 µg/ml proteinase K)

에 넣고 55°C에서 10분간 digestion을 수행한 후 바로 동일량의 증화용액(100 mM KCl; 2% NP40; 2% Tween 20)를 넣어 간단한 vortex를 수행하였다. Proteinase K를 불활성화하기 위해 95°C에서 10분간 반응시켰으며 반응이 완료되면 원심분리(14,000 rpm; 3 min)후 상등액 2 µl를 PCR template로 이용하였다. CAT specific 유전자 증폭을 위해서 562 bp의 CAT transgene 단편을 증폭할 수 있는 2종의 primers (FVC-1: 5'-CTATAACCAG-ACCGTTCAGC-3' 및 FVC-2: 5'-CGCCCCGCCCTGCCACTCATCGCAG-3')를 이용하였고, GH-transgene (822 bp)의 증폭을 위해서는 mβGH 2F 5'-CCACGCGCTGAATCGGCGGC-3' (specific for beta-actin promoter) 및 mβGH 4R 5'-CTGAGGTAACA-GGCTGTCCTC-3' (specific for GH gene)을 이용하였다. Internal control 유전자인 미꾸라지 metallothionein (MT) gene (305 bp)의 증폭을 위해서는 mIMT-1F 5'-ATGGATCCTTGTGATTGCTC-3' 및 mIMT-1R 5'-TGGGCAGCAAGAACAGCAAC-3'을 이용하였다. PCR 반응은 Takara ExTaq (Takara, Japan)를 이용하였고 제조사의 10X buffer 및 dNTP mix를 이용하여 manual대로 PCR 반응을 수행하였다. PCR 반응은 50 µl로 수행하였다. Multiplex PCR을 수행하기 위해서(CAT transgene/MT gene 또는 CAT transgene/GH transgene) 각 forward 및 reverse primer 별로 각 2 µM의 농도로 PCR 반응에 첨가하였고 PCR 반응은 94°C 2분간 최초 변성 후 94°C 45초, 58°C 45초 및 72°C 1분을 30회 순환 반응하였다. Automatic thermal cycler는 BioRad사의 iCycler™를 이용하였다. PCR 반응이 완료되면 PCR 산물 6 µl를 1% agarose gel에 전기영동 후 ethidium bromide (Et-Br) staining을 통해 증폭 여부를 확인하였다.

결과 및 고찰

UV 처리에 의한 수정율 및 배(embryo) 생존율

UV 처리 농도가 증가할수록 수정률의 감소가 비례적으로 관찰되었다. UV 조사(irradiation)를 받지 않은 난을 이용해 만들어진 대조군의 수정률은 평균 98% 이상으로 나타나 실험에 사용한 암, 수 양친 배우자(난자 및 정자) 모두 우수한 양질의 상태를 나타내었다. 반면 UV 처리군의 경우 자외선 조사가 1,350 ergs/mm²부터 25,650 ergs/mm²까지 증가되면서 수정률의 급격한 감소가 관찰되어 최소 농도의 UV가 조사된 군의 경우 91.5%의 수정률을 보였으나 UV 농도가 증가될수록 2,700 ergs (30초 처리)에서는 82%를, 8,100 ergs (90초 처리)에서 69%, 13,500 ergs (150초 처리)에서 62%, 그리고 18,900 ergs (210초 처리)에서는 35%를 나타내었으며 이후 최고 농도인 25,650 ergs가 처리된 그룹의 경우에는 전체 처리된 1%의 수정만 인공수정 후 발생을 개시하였다. 부화율 역시 수정률과 유사한 경향을 나타내었다. 무처리 대조군의 평균 부화율은 90% 이상을 나타내었으나 난에 처리된 자외선의 농도가 증가할수록 부화율은 감소하여 1,350 ergs/mm² (15초 처리군)부터 10,800 ergs/mm²

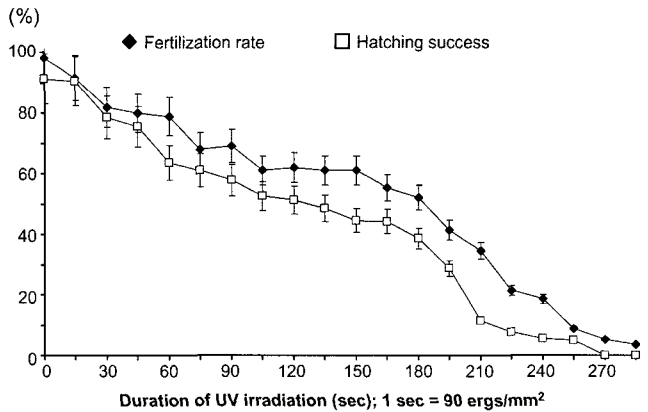


Fig. 1. Effects of UV irradiation on fertilizing capacity (◆) of mud loach eggs and hatchability of resultant embryos (□). Mean±SDs based on 4 replicated examinations are presented.

(120초 처리군)까지 90.5%에서 51.2% 범위로 감소하였다. 이후 더 높은 UV 농도가 처리될 경우 지속적인 부화율의 감소가 관찰되었으며 특히 18,900 ergs/mm² (210초) 이후에는 부화개체의 빈도가 극히 낮아 졌고 24,300 ergs/mm² 이후에서는 모든 반복군에서 부화 개체가 관찰되지 않았다(Fig. 1).

UV 조사군의 발생 및 응성발생성 반수체 유도

수정에 성공하여 발생을 개시한 자외선 처리군은 수정 24시간째 형태적인 구분에 의해 크게 다음의 4종류의 발생 그룹으로 나눌 수 있었다. 첫째, 무처리 대조군과 동일한 발생 양상을 나타내며 부화한 개체 역시 정상 2배체 자어의 형태와 동일한 그룹(group-I); 둘째, 기존에 알려져 있는 전형적인 haploid syndrome을 보이는 반수체 그룹(group-II); 셋째, 정상적인 배 발생을 보이지 못하고 blastula 이후에 마치 세포 덩어리처럼 보이는 ‘underdeveloped cell mass’ 그룹(group-III); 그리고 넷째, 정확한 2배체 또는 전형적인 반수체 형태를 띄지 못하는 abnormal 형태의 그룹(group-IV)으로 대별되었다(photograph not shown).

Group-I (typical 2N)은 UV 처리 농도가 소폭 증가하여도 급격히 감소하기 시작하여 제일 낮은 UV 농도에서도 57%로 감소하였으며, 2,700 ergs 및 5,400 ergs에서는 14~29%로 나타났고, 그 이상의 농도에서는 1~3%로 나타났다. 특히 10,000 erg 이상에서는 거의 관찰되지 않았다(Fig. 2). Group-II (typical haploid)는 일반적으로 UV 농도의 증가에 따라 그 빈도가 증가하는 경향을 나타내어 최초 농도에서 5.2%를 보였으나 차상위 농도인 2,700 ergs부터(30초 처리군) 29%로 크게 증가하였다. 이후 농도에서부터 지속적인 증가 양상을 보임으로써 10,800 ergs에서(120초 처리군) 최대치인 89%를 기록하였고 이러한 고 빈도의 출현은 13,500 ergs까지 지속되었다. 그러나 더 이상의 UV 농도에서는 점차 그 출현율이 감소하기 시작하였고 18,900 ergs 보다 높은 UV 농도에서는 10% 내외의 빈도를, 그리고 23,400 ergs 이상에서는 전형적인 haploid syndrome을 보이는 개체들

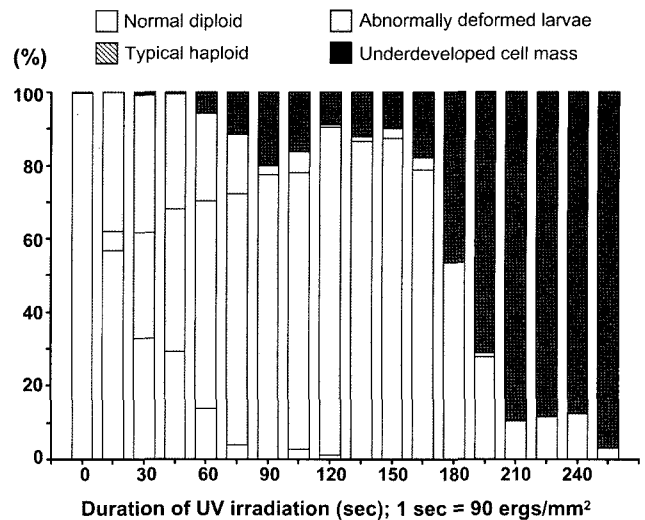


Fig. 2. Frequency distribution of four distinct embryo groups developed from the eggs irradiated with varying dose levels of UV.

이 관찰되지 않았다. Group-III (underdeveloped cell mass)은 최소 농도에서는 관찰되지 않았으며 역시 UV 농도가 증가할수록 증가되는 경향을 보였다. UV 조사 농도 5,400 ergs 이상에서 유의적으로 관찰되기 시작하였고 14,850 ergs (165초)까지 6~19% 나타났다. 본 구간에서는 UV 농도와 명확한 상관 관계는 관찰되지 않았다. 그러나 UV 농도가 증가하여 16,200 ergs 이상의 농도에서는 group-III의 빈도가 급격히 증가되어 46%, 71% 및 89%까지 증가하였고 22,950 ergs (255초)에서는 24시간째 생존한 대부분의 embryo들이 본 group-III에 해당하였다. Group-IV (abnormally deformed)는 저 농도의 UV 조사 조건에서 특이적으로 관찰되는 그룹이었다. 최소 농도인 1,350 ergs부터 6,750 ergs의 농도까지 14.7~38.0%의 빈도로 가장 높게 관찰되었으며 이후 고농도에서는 유의적으로 그 출현율이 감소하였고(1~6%), 18,900 ergs 이상에서는 더 이상 관찰되지 않았다(Fig. 2).

이상의 UV 처리된 난 발생 특징을 분석한 결과 작은 크기의 난경과 투명한(transparent) 난을 갖는 미꾸라지의 경우 투과도가 높지 않는 UV 만을 이용하여도 손쉽게 난 유전물질의 불활성화(genetic inactivation)가 가능한 것으로 나타났다. Group-I의 출현율에서 보듯이 비교적 저 농도의 UV 처리 농도에서도 정상 2배체 빈도는 급감하는 것으로 나타났으며 미꾸라지 난이 UV 처리에 매우 민감함을 잘 시사하고 있고 이전의 UV를 이용한 응성발생성 개체 유도과 유사한 결과를 나타내었다(Maremgpmo and Onoue, 1998; Ungar et al., 1998; David and Pandian, 2006). 반면 반수체(group-II)의 경우 UV 처리 농도가 증가할수록 꾸준한 증가를 보여 최대 90%에 가까운 유도율을 나타내었으나 특정 농도 이상의 UV 처리에서는 다시 급격히 감소함이 관찰되어 이전의 연구 결과와 유사하였다(Lin and Dabrowski, 1998; Ungar et al., 1998). Group II에서 부화한 반

수체 자어들은 종래 많은 어종에서 보고된 바 있는 전형적인 haploid syndrome, 즉 short tail, abnormal yolk sac 및 malformed vertebrae의 형질을 나타내었고(see Kirankumar and Pandian, 2004c) 본 어종에서도 이미 선행 연구를 통해 밝혀진 바 있는 자성발생성 반수체와 잉어 난을 이용한 양성발생성 반수체들과 형태학적으로 큰 차이를 나타내지 않았다(Nam et al., 2001b; Nam et al., 2002). 반면 반수체 빈도의 유의적인 감소가 관찰되는 구간에서는 group-III (cell mass-like)가 상대적으로 매우 많이 증가하는 것으로 나타났는데 이는 과도한 UV 농도의 조사에 의해 난 내 유전물질뿐만 아니라 정상적인 발생에 요구되는 RNA precursors, ribosome 및 기타 발생에 필수적인 단백질들의 변성 또는 파괴에 기인하는 것으로 판단된다. 이미 고 농도의 UV 조사 시 여타 다른 어류에서도 본 연구와 같은 cell mass의 출현이 보고된 바 있어 본 연구결과와 유사하였다(Corley-Smith et al., 1996; Lin and Dabrowski, 1998).

이와 대조적으로 저 농도의 UV 처리 구간에서는 group-IV (abnormally deformed)의 출현이 유의적으로 관찰되었는데 본 그룹에 속한 개체들은 외견상 반수체와 유사하였으나 전형적인 haploid syndrome의 특징을 나타내지는 않았고 그 기형의 정도는 개체 별로 매우 다양하게 나타났다. 본 개체들은 tail beating을 원활히 수행하지 못하였으며 부화 후에도 더 이상 초기 분화(즉, 착색, 턱 발달 및 난황 흡수 등)가 잘 일어나지 못하며 대부분 최초 먹이 공급시기를 넘지 못하였다(data not shown). 본 결과는 처리된 UV의 양이 난의 유전물질 제거가 가능한 임계 농도까지 도달하지 못하였고 이러한 유전물질의 부분적인 불활성화로 인해 부화까지는 부분적으로 성공하였지만 이후 보다 복잡한 발달 및 생리 작용에 요구되는 유전자 발현이 제대로 이루어지지 못하였을 가능성을 시사하고 있다(see Lin and Dabrowski, 1998; David and Pandian, 2006).

웅성발생성 이배체의 수율(yield) 및 flow cytometry 분석

수정률/부화율 및 반수체 출현률을 고려할 경우 상대적으로 우수한 유독 효율을 보이는 구간은 8,000~14,000 ergs 범위에 해당하는 UV 처리 구간으로 나타났다. 본 구간에 해당되는 처리 시간 조건인 90초~160초 처리 조건을 대상으로 다시 10초 간격으로 세분화하여 양성발생성 반수체 유도를 위한 최적 구간을 조사하였으며 3반복 실험에 의해 얻어진 평균 수율(yield)을 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3에서 보듯이 각 구간별 부화율 및 반수체 유도율은 상기 실험과 유사한 경향을 보였으며 최초 처리된 난의 수를 기준으로 계산된 수율을 고려 시 미꾸라지 난 불활성화의 최적 UV 처리 구간은 120초(10,800 ergs)로 나타났다고 통계적 유의차를 고려할 경우 100~130초(9,000~11,700 ergs) 처리 구간 역시 우수한 성적을 나타내었다. 최적 조건에서 얻어진 양성발생성 반수체의 최대 수율은 50% 이상으로 관찰되었다. 본 연구의 수율은 종래의 여타 어종에서 보고된 동일 종내 양성발생성 반수체 유도 수율은 물론 잉어난을 이용한

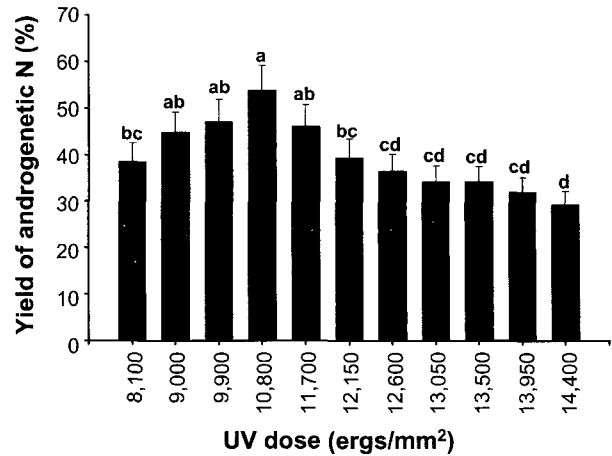


Fig. 3. Effects of UV doses on the yield for typical androgenetic haploidy as presented by percentage out of total eggs inseminated. Histogram bars with same letters are not statistically different based on ANOVA at P=0.05.

본 어종의 양성발생성 반수체 유도와 비교시에도 우수한 성적으로 나타났다(Bongers et al., 1994; 1995; Corley-Smith et al., 1996; Lin and Dabrowski, 1998; Nam et al., 2002). Flow cytometry를 이용하여 전형적인 haploid syndrome 형태의 개체들을 분석한 결과 분석한 시료들의 95% 이상이 미꾸라지 정세포의 DNA 함량(1.4 pg/cell)과 정확히 일치하는 haploid genome size를 나타냄으로써 이전의 미꾸라지 처녀 생식 결과와도 잘 일치하였다(Nam et al., 2001b) (Fig. 4).

형질전환 표지를 이용한 양성발생의 검정

최적화된 상기 조건을 대상으로 형질전환 표지를 이용한 양성발생성 반수체를 검증하였다. CAT-transgene을 포함한 난을 이용할 경우 대조군(2N)에서는 internal control로 이용한 MT 유전자 및 CAT-transgene 모두 multiplex PCR 증폭이 일어났으나 반면 UV 처리된 양성발생성 반수체 군의 경우 대부분 internal control 유전자의 증폭만 일어났을 뿐 모계 기원의 CAT

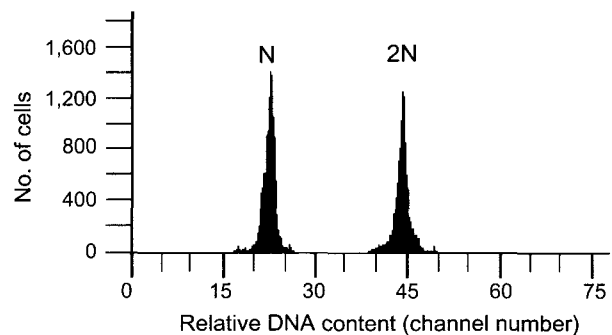


Fig. 4. Representative histogram showing the DNA content of androgenetic haploid fish (1.4 pg/cell) based on flow cytometry analysis. Peak for diploid mud loach blood cells (2.8 pg/cell) is also shown as an internal control.

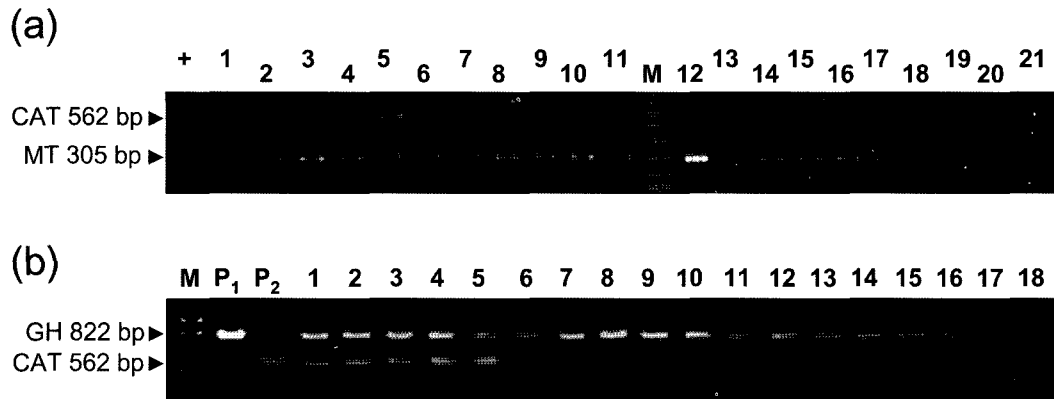


Fig. 5. Transgene-assisted PCR verification of androgenetic constitution of haploid genome. (a) PCR analysis of presumed androgenetic haploids derived from the cross between non-transgenic male and CAT-transgenic female. +, positive genomic DNA sample containing pooled genomic DNAs from both parental sexes; 1~5, biparental diploid controls; 6~21, putative androgenetic haploid fish (a total of 36 presumed androgens tested but 15 cases shown only). M, 100 bp ladder molecular weight size marker. Segment of mud loach metallothionein (MT) gene was also amplified as an internal control in the multiplex PCRs. (b) PCR analysis of androgenetic haploids developed from UV-irradiated eggs (CAT-transgenic) inseminated with the GH-transgene containing sperm. M, 1 Kb plus molecular weight size marker; P1, GH-transgenic father; P2, CAT-transgenic mother, 1~5, biparental controls; 6~18, presumed androgenetic haploid fish. Details for PCR analysis can be referred to Materials and methods.

transgene은 증폭되지 않음으로써 부계 특이적인(paternal exclusive) 처녀생식을 잘 입증하고 있다. 그러나 분석한 총 36 마리 중 4마리(11.1%)에서 haploid syndrome의 형질을 표현하고 있음에도 불구하고 모계의 transgene이 PCR로 검출되어 예상과 다른 결과가 관찰되었다(Fig. 5a). 두 번째 검증 실험에서도 역시 대부분 모계 transgene인 CAT 유전자의 증폭 없이 부계 transgene (GH-transgene) 만이 효과적으로 증폭되었으나 그 빈도가 100%를 충족시키지는 못하였고 분석한 36마리 중 3마리(8.3%)의 개체에서 모계 형질전환 표지가 검출되었다(Fig. 5b). 이는 모계 genome내 tandem array로 존재하던 transgene unit 중 일부 소량의 transgene fragment가 UV 조사에 의해 완전히 inactivation되지 못하고 웅성발생성 반수체 genome에 잔류하였을 가능성 또는 group-IV에 속한 개체를 잘못 선발하였을 가능성 등이 추정된다. 그러나 차후 보다 자세한 분석이 필요한 상태로서 아직 본 개체들의 genome내 모계 잔여 유전물질의 오염 정도 및 정량화는 정확히 평가할 수 없다. 웅성발생성 무지개 송어를 대상으로 한 microsatellite 분석 시 일부 개체들(약 8%)에서 이형접합성(heterozygosity)의 잔존 상태가 보고된 바 있고, 이 역시 UV inactivation 과정 중 모계 유전물질의 불완전한 불활성화에 기인하는 것으로 추정되어 본 연구결과와 유사하였다(Tanck et al., 2001).

이상의 연구 결과 미꾸라지 난 유전물질의 불활성화 및 웅성발생성 처녀 생식은 X-ray 및 Cobalt등 방사능의 사용 없이 비교적 간단한 UV 처리만으로도 성공적으로 얻어질 수 있으며 flow cytometry 및 인위적으로 도입된 형질전환 유전자 표지를 이용하여 효과적이고 신속한 웅성발생성 반수체 genome을 동정할 수 있었다. 본 연구를 바탕으로 genetic masking이 없는 반수체 모델의 이용, 그리고 genome restoration을 통한 생존력

있는 동일 종내 diploid androgenesis가 용이하게 실현될 수 있으리라 판단되며, 종래 미꾸라지 웅성발생성 이배체 유도 시 문제시 되던 nuclear cytoplasmic barrier의 취약점 극복에 기여할 수 있으리라 기대된다. 그러나 비록 낮은 빈도이기는 하나 전형적인 haploid syndrome을 보이는 개체들에서도 일부 partial gene transfer가 일어날 수 있다는 점등은 향후 해결해야 될 기술적 과제들로 남아 있으며 flow cytometry를 통해 차후 웅성발생성 이배체가 확인되더라도 다양한 genome 영역에 대한 homozygosity 분석의 필요성을 시사하고 있다. 본 연구를 바탕으로 동일 종내 이배체 복원 기술의 정밀 조작 연구가 뒤따라야 할 것이다.

요 약

동일 종내 미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*) 웅성발생성 인공 처녀생식(intraspecific androgenesis) 기술을 개발하기 위해 미꾸라지 난 유전물질의 불활성화와 이에 따른 웅성발생성 반수체 유도 조건을 최적화하였다. 다양한 자외선(UV) 농도(0~25,650 ergs/mm²)를 이용하여 미꾸라지 난의 유전학적 불활성화를 시도하였으며 수정률, 부화율 및 반수체 출현율을 평가한 결과 10,800 ergs의 농도에서 가장 우수한 반수체 유도 효율을 보였으며 최초 처리 난 중 50% 이상의 웅성발생성 반수체 수율을 확보할 수 있었다. 웅성발생성 개체는 전형적인 haploid syndrome의 특징을 나타내었고 flow cytometry 분석 결과 정확히 미꾸라지 반수체(1.4 pg/cell)의 DNA 함량을 보유하는 것으로 나타났다. 인위적으로 삽입된 형질전환 유전자 표지를 이용하여 부계 특이적인 인공처녀생식 여부를 확인하였으나 일부 반수체 자어들에서(8~11%) 모계 유전물질의 잔류가 검출되었다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 한국학술진흥재단의 지역대학우수과학자 지원 사업에 의하여 연구되었음(KRF-2005-202-F00041).

참고문헌

- Babiak, I., S. Dobosz, H. Kuzminski, K. Goryczko, S. Ciesielski, P. Brzuzan, B. Urbanyi, A. Horvath, F. Lahnsteiner and J. Piironen, 2002b. Failure of interspecies androgenesis in salmonids. *J. Fish. Biol.*, 61, 432–447.
- Babiak, I., S. Dobosz, K. Goryczko, H. Kuzminski, P. Brzuzan and S. Ciesielski, 2002a. Androgenesis in rainbow trout using cryopreserved spermatozoa: the effect of processing and biological factors. *Theriogenology*, 57, 1229–1249.
- Bercsenyi, M., I. Magyary, B. Urbanyi, L. Orban and L. Horvath, 1998. Hatching out goldfish from common carp eggs: interspecific androgenesis between two cyprinid species. *Genome*, 41, 573–579.
- Bongers, A. B. J., E. P. C. in't Veld, K. Avo-Hashema, I. M. Bremmer, E. H. Eding, J. Komen and C. J. J. Richter, 1994. Androgenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.) using UV irradiation in a synthetic ovarian fluid and heat shocks. *Aquaculture*, 122, 119–132.
- Bongers, A. B. J., J. B. Abraca, Z. Doulabi, E. H. Eding, J. Komen and C. J. J. Richter, 1995. Maternal influence on development of androgenetic clones of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture*, 137, 139–147.
- Brown, K. H. and G. H. Thorgaard, 2002. Mitochondrial and nuclear inheritance in an androgenetic line of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 204, 323–335.
- Corley-Smith, G. E., C. J. Lim and B. P. Brandhorst, 1996. Production of androgenetic zebrafish (*Danio rerio*). *Genetics*, 142, 1265–1276.
- David, C. J. and T. J. Pandian, 2006. Cadaveric sperm induces intergeneric androgenesis in the fish, *Hemigrammus caudovittatus*. *Theriogenology*, 65, 1048–1070.
- Kim, D. S., J.-Y. Jo, and T.-Y. Lee, 1994. Induction of triploidy in mud loach (*Misgurnus mizolepis*) and its effect on gonad development and growth. *Aquaculture*, 120, 263–270.
- Kirankumar S and T. J. Pandian, 2004b. Production and progeny testing of androgenetic rosy barb, *Puntius conchoni*. *J. Exp. Zool.*, 301, 938–951.
- Kirankumar S. and T. J. Pandian, 2004a. Interspecific androgenetic restoration of rosy barb using cadaveric sperm. *Genome*, 47, 66–73.
- Kirankumar, S. and T. J. Pandian, 2003. Production of androgenetic tiger barb *Puntius tetrazona*. *Aquaculture*, 228, 37–51.
- Kirankumar, S. and T. J. Pandian, 2004c. Use of heterologous sperm for the dispermic induction of androgenesis in barbs. *J. Fish. Biol.*, 64, 1485–1497.
- Lin, F. and K. Dabrowski, 1998. Androgenesis and homozygous gynogenesis in muskellunge (*Esox masquinongy*): evaluation using flow cytometry. *Mol. Reprod. Dev.*, 49, 10–18.
- Marengpmo, M. G. and Y. Onoue, 1998. Ultraviolet-induced androgenesis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and hybrid Nile x blue tilapia, *O. aureus* (Steindachner). *Aquaculture Res.*, 29, 359–366.
- Nam, Y. K., C. H. Noh and D. S. Kim, 1999. Transmission and expression of an integrated reporter construct in three generations of transgenic mud loach (*Misgurnus mizolepis*). *Aquaculture*, 172, 229–245.
- Nam, Y. K., J. K. Noh and D. S. Kim, 2001b. Effect of transgenic genotype on transgene expression in mud loach (*Misgurnus mizolepis*): I. Copy number dependent expression in gynogenetically derived homozygous transgenics. *J. Fish. Sci. Tech.*, 4, 39–46.
- Nam, Y. K., J. K. Noh, Y. S. Cho, H. J. Cho, K. N. Cho, C. G. Kim, and D. S. Kim, 2001a. Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Transgenic Res.*, 10, 353–362.
- Nam, Y. K., Y. S. Cho, H. J. Cho and D. S. Kim, 2002. Accelerated growth performance and stable germ-line transmission in androgenetically derived homozygous transgenic mud loach, *Misgurnus mizolepis*. *Aquaculture*, 209, 257–270.
- Nam, Y. K., Y. S. Cho, Y. J. Chang, J.-Y. Jo and D. S. Kim, 2000. Generation of transgenic homozygous line carrying the CAT gene in mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Fish. Sci.*, 66, 58–62.
- Pandian, T. J. and R. Koteeswaran, 1998. Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia*, 384, 167–243.
- Paschos, I., L. Natsis, C. Nathanailides, I. Kagalou and E. Kolettas, 2001. Induction of gynogenesis and androgenesis in goldfish *Carassius auratus* (var. oranda). *Reprod. Dom. Anim.*, 36, 195–198.
- Tanck M. W. A. P. Palstra, M. van der Weerd, C. P. Leffering, J. J. van der Poel, H. Bovenhuis and J. Komen, 2001. Segregation of microsatellite alleles and residual heterozygosity at single loci in homozygous androgenetic common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Genome*, 44, 743–751.
- Ungar, A. R., K. A. Helde and R. T. Moon, 1998. Production of androgenetic haploids in zebrafish with ultraviolet light. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 7, 320–326.
- Young, W. P., P. A. Wheeler, R. D. Fields and G. H. Thorgaard, 1996. DNA fingerprinting confirms isogenicity of androgenetically derived rainbow trout lines. *J. Hered.*, 87, 77–81.

원고접수 : 2006년 5월 7일

수정본 수리 : 2006년 8월 6일