

돼지 β -Casein 유전자의 3' 말단 부위의 *cis*-Acting Element가 유선 상피 세포내의 발현에 미치는 영향

이휘철¹ · 김병주¹ · 변승준¹ · 이승훈¹ · 김민지¹ · 정희경¹ · 이현기¹ · 조수진¹ · 장원경¹ · 박진기¹ · 이풍연^{2,*}

¹농촌진흥청 축산과학원 응용생명공학과, ²농촌진흥청 축산과학원 가축유전자원시험장

Effects of the *cis*-Acting Element in the 3' End of Porcine β -Casein Gene on the Expression in Mammary Epithelial Cells

Hwi-Cheul Lee¹, Byoung-Ju Kim¹, Sung-June Byun¹, Seunghoon Lee¹, Min-Ji Kim¹, Hee Kyoung Chung¹, Hyun-Gi Lee¹, Su-Jin Jo¹, Won-Kyong Chang¹, Jin-Ki Park¹ and Poongyeon Lee^{2,*}

¹Animal Biotechnology Division, National Livestock Research Institute, RDA, Suwon 441-706, Korea

²Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea

ABSTRACT

Tissue-specific and temporal regulation of milk protein gene expression is advantageous when creating transgenic animal that produces foreign protein into milk. Gene expression, i.e. protein production, is regulated not only by promoter strength but also mRNA stability. Especially, poly A tail length by polyadenylation affects *in vivo* and *in vitro* mRNA stability and translation efficiency of the target gene. In the present study, nucleotide sequence of 3'-UTR was analyzed to evaluate the effects of mRNA stability on the target gene expression. Based on the poly A signal of 3'-untranslated region (UTR), nucleotide sequences of putative cytoplasmic polyadenylation elements (CPEs) and downstream elements (DSEs: U-rich, G-rich, GU-rich) were analyzed and used to construct 15 luciferase reporter vectors. Each vector was transfected to HC11 and porcine mammary gland cell (PMGC) and measured for dual luciferase expression levels after 48 hours of incubation. Luciferase expression was significantly higher in construct #6 (with CPE 2, 3 and DSE 1 of exon 9) and #11 (with CPE 2, 3 and DSE 1, 2 and 3 of exon 9) than construct #1 in the PMGC. These results suggest that expression of target genes in PMGC may be effectively expressed by using the construct #6 and #11 on production of transgenic pig.

(Key words : mRNA stability, Porcine β -casein gene, Luciferase assay)

요 약

형질 전환 동물 생산에는 조직 및 시기 특이적 발현 조절이 가능하다는 장점 때문에 유증 내로 외부 유전자를 발현시키는 시스템이 널리 이용되고 있다. 유전자 발현 즉, 단백질 생산은 프로모터의 강도뿐만 아니라 mRNA의 안정성에 의해서도 조절된다. 특히, polyadenylation에 의한 poly A의 길이는 *in vivo*와 *in vitro*에서 mRNA 안정성 및 목적 유전자의 번역 효율에 영향을 준다. 본 연구에서는 이러한 mRNA 안정성이 목적 유전자의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 3'-UTR 염기 서열을 분석하였다. 이 3'-untranslated region(UTR) 내의 poly A signal을 기준으로 putative cytoplasmic polyadenylation element(CPE) 부위와 downstream elements(DSE: U-rich, G-rich, GU-rich)의 염기 서열을 분석하고, 각각의 element를 기준으로 15 종의 luciferase reporter vector를 제작하여, 생쥐 유선 세포주(HC11)와 돼지 유선 세포주(PMGC)에 각각 transfection시킨 후 48시간 동안 배양하고 luciferase 발현량을 분석하였다. PMGC의 경우, luciferase의 발현은 exon 9의 CPE 2, 3 및 DSE 1을 포함한 #6 construct에서 유의적으로 높은 발현량을 보였으며, exon 9의 CPE 2, 3과 DSE를 모두 포함하고 있는 #11 construct에서도 유의적으로 높은 발현량을 보였다. 이러한 결과는 형질 전환 돼지 생산에 있어 #6 및 11 construct의 사용은 목적의 유전자를 효과적으로 발현시키는데 기여할 것으로 사료된다.

* This work was supported in part by a Grant-in-Aid from the Rural Development Administration.

† Corresponding author : Phone: +82--31-290-1626, E-mail: pylee@rda.go.kr

서 론

목적으로 하는 단백질을 형질 전환 동물의 유즙을 통해서 생산하기 위한 재조합된 외래유전자는 형질 전환 동물체 내에서 전사, 전사 후 변형, 해독, 해독 후 변형 과정을 거쳐 유즙 내로 분비된다(Houdebine, 1995, 2000). 포유동물의 유단백질(milk protein) 유전자는 유선 조직과 수유기에 조직 특이적 및 시기 특이적으로 그 발현이 조절되며, 이를 이용하여 특정시기와 조직으로 유용물질을 생산하는데 유용한 대상이 된다(Malewski와 Zwierzchowski, 1995; Zhao 등, 2002).

한편, 전사 후 mRNA 생성 과정의 대부분은 mRNA 3'-untranslated region(UTR) 내의 염기 서열에 존재하는 cis-acting elements와 세포 내에 존재하는 trans-acting elements의 반응에 의해 조절되고(De Moor와 Richter, 1999) 그러한 3'-UTR 염기 서열은 poly A tail의 형성을 조절하는 역할을 한다. Poly A tail에 의한 전사체의 안정성은 해독 효율을 증가시키는 데 중요한 역할을 하며, 그 길이에 따라 일정기간 전사체의 안정성을 유지시켜 주기도 하며 감소시키기도 한다(Guyette 등, 1979). 또한, poly A tail은 polyadenylation 형성 신호로부터 대략 30 bp를 넘지 않는 범위의 poly A site에 생성된다(Van Helden 등, 2000). RNA polymerase II에 의한 pre-mRNA가 합성되기 시작하면서 mRNA 생산과정이 이루어지면 진행세포의 핵에서 precursor의 형태로 전사된 mRNA는 세포질로 전달되어 각각의 기능을 수행하게 된다(Alberts, 2002). 이때 cytoplasmic polyadenylation에 의해 poly A tail의 activation과 deadenylation을 조절한다(Alberts, 2002). Cytoplasmic polyadenylation 반응은 AAUAAA와 cytoplasmic polyadenylation element(CPE) 주변에 U-rich element, GU-rich element, G-rich element를 필요로 한다(De Moor와 Richter, 1999). CPE는 포유동물과 개구리의 mRNA에 존재하며, poly A tail 길이에 조절 인자로 해독의 효율 조절에 영향을 미친다(Verrotti 등, 1996). 3'-UTR 내에 cis-acting elements는 poly A tail 형성에 중요한 영향을 미치기 때문에 결국 mRNA의 세포질 내 해독 효율을 좌우한다(Gray와 Wickens, 1998). 이러한 downstream element(DSE)의 역할은 mRNA의 activation과 repression에 관련이 있으며, 크게 두 가지의 대표적인 U-rich element와 GU-rich element로 묘사된다(Nie 등, 2004; Zhao 등, 1999). 유전자 내의 여러 가지 다른 CPE의 위치에 따른 세포질의 poly A 형성은 좀 더 안정화된 3' 말단에 유전자 발현 조절의 메커니즘으로 mRNA를 생산할 수 있다(Ross, 1995).

본 연구의 목적은 돼지 β -casein mRNA의 안정성이 3'-UTR 상의 전사인자에 의해 조절되는지와 poly A tail 길이와 3'-UTR내 CPE와 DSEs에 상호작용이 mRNA 발현에 영향을 미치는지를 확인하고자 돼지 β -casein 유전자의 3'-UTR을 cloning하여 염기 서열을 분석하고, CPE로 추정되는 위치를 포함하는가의 여부에 따라 다른 3'-UTR 길이 변이체를 제작하여 luciferase gene이 발현하는 vector에 cloning하여 3'-UTR내 cis-acting elements의 영향을 알아보았다.

재료 및 방법

벡터의 구축

돼지 β -casein 유전자의 5' 말단 부위는 Landrace 돼지의 혈액으로부터 genomic DNA를 추출하여 돼지 β -casein promoter(3,098 bp)/exon 1(48 bp)/intron 1(2,398 bp) 부위를 luciferase 유전자의 활성도를 측정하기 위한 pGL3-Basic luciferase reporter vector(Promega, Madison, WI, USA)에 제한 효소인 Mlu I과 Xho I로 절단하여 cloning 하였다. 3' 말단 부위는 BAC library로부터 3'-UTR 부위의 1,077 bp와 785 bp의 말단 부위 일부를 cloning하였다. Cloning된 돼지 β -casein 유전자의 3' 말단에 대한 15종류의 deletion mutants를 제작하였다. 제작된 15종류의 construct를 porcine β -casein 5' 말단으로 cloning된 pGL3 basic vector에 Sal I과 Fse I 부위를 절단하여 15종류의 deletion mutants luciferase reporter vector를 구축하였다(Fig. 1).

생쥐의 유선세포 배양

생쥐 유선상피세포(HC11)는 RPMI 1640(GIBCO, Grand Island, NY, USA)에 10% fetal bovine serum(FBS: GIBCO, Grand island, NY, USA)과 5 μ g/ml insulin(Sigma, St. Louis, Missouri, USA), 10 μ g/ml epidermal growth factor(EGF: Sigma St. Louis, Missouri, USA)과 50 μ g/ml streptomycin(GIBCO, Grand Island, NY, USA)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

돼지 유선세포 초기 배양

돼지 유선세포(Porcine Mammary Gland Cell, PMGC)는 임신 중인 Landrace 돼지의 유선 조직에서 분리하여 primary culture하였다. 유선 조직의 시료는 외과적 수술

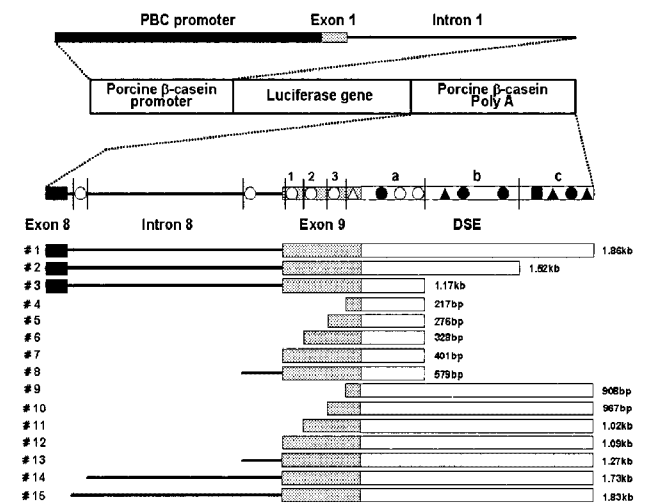


Fig. 1. Schematic representation of the luciferase / PBC poly A 3'-deleted series vectors used to transfect into HC11 and PMGC cells. Porcine β -casein promoter (5,543 bp) and all deleted series were introduced into pGL3-Basic vector using Mlu I/Xho I and Sal I/Fse I, respectively. PBC, porcine β -casein; DSE, downstream element; ○, CPE (cytoplasmic polyadenylation element); △, poly A signal; ●, U-rich; ▲, G-rich; ■, GU-rich.

용 가위를 이용하여 잘게 잘라 Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS; GIBCO, Grand Island, NY, USA)로 1.5~2시간 동안 37°C에서 교반하여 분리하였다. 그 후 stainless steel meshes(80-와 100-mesh)를 이용하여 여과한 후 해리되지 않은 조직과 잔해를 제거하고 원심분리기를 이용하여 800×g에서 20분간 1×DPBS로 3번 세척 후 세포를 회수하였다. PMGC는 DMEM/F-12(GIBCO, Grand Island, NY, USA)에 10% FBS, 5 μ g/ml insulin, 10 μ g/ml EGF와 50 μ g/ml streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

Transient Transfection

PMGC와 HC11에 lipofectamine reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 제작된 15종류의 transgenes을 제시한 실험 과정에 따라 transfection시켰다. 세포는 0.05% trypsin/EDTA(GIBCO, Grand Island, NY, USA)에 처리 후 분리된 세포를 hemocytometer로 세포 수를 확인한 후, 0.5×10⁵ cell/well의 밀도로 24-well culture flask에 첨가하여 배양액에서 16시간 동안 배양하였다. 약 90% 정도의 세포 밀도를 확인한 후 남아 있는 배양액을 제거하고 무혈청 배양액 Opti-MEM(GIBCO, Grand Island, NY, USA)로 교체하였다. Transfection에 대한 표준 효율점을 확인하기 위해 renilla report gene으로 pRL-TK(Promega, Madison, WI, USA) vector를 이용하였다. 각각의 construct는 1×10¹¹ copies/well로, firefly report construct에 대한 renilla report construct를 1:200의 비율로 transfection 하였다. 각 well의 세포에 대한 DNA는 3차 증류수로 희석하였으며, 70 μ l의 Opti-MEM 배양액과 3 μ l의 lipofectamine reagent을 실온에서 5분간 배양 후 희석된 DNA와 lipofectamine reagent을 교합하여 다시 20분 동안 배양하였다. 혼합물을 well 내의 세포에 추가하여 조심스럽게 흔들어 준 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 HC11은 4시간, PMGC는 2시간 동안 배양한 후 혈청이 포함된 growth medium으로 교체해 주었다. Transfection된 세포는 48시간 동안 배양하여 실험에 사용하였다.

유증분비호르몬 조합에 따른 Luciferase 활성의 최적 조건 설정

HC11과 PMGC에 native full sequence인 #1 construct를 이용하여 transfection시킨 후, HC11는 5 μ g/ml insulin, 3 μ g/ml ovine prolactin(Sigma St. Louis, Missouri, USA), 1 μ g/ml hydrocortisone(Sigma St. Louis, Missouri, USA), PMGC는 1 μ g/ml insulin, 1 μ g/ml ovine prolactin, 1 μ g/ml hydrocortisone로 배양하였다.

돼지 β -Casein 3'-말단 영역의 염기 서열 분석

β -Casein 유전자3'-말단의 비교 분석은 bovine(GeneBank accession No. X14711), goat(AF409096), human(AF027807)와 본 연구실에서 염기 서열을 분석한 돼지 유전자를 가지고 수행하였다. 또한, CPE 및 DSE 위치분석은 Vector NTI(InforMax) software program을 이용하였다.

통계 분석

모든 실험 결과는 SAS Enterprise Guide 3.0.0.369 software(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)의 Generalized Linear Model procedure(PROC-GLM)를 사용하여 분석하였다. 평균값과의 오차는 Duncan's multiple range-test와 t-test를 사용하여 검정하였다. 각 처리간의 유의차는 $p < 0.05$ 이하의 차이에 대해서만 유의성을 인정하였다.

결 과

돼지 β -Casein 유전자의 5'-UTR과 변형된 3'-UTR을 이용한 Luciferase 발현 Vector 구축

Transgene을 이용한 발현 vector는 돼지 β -casein 5'-UTR/luciferase/3'-deletion UTR로 Fig. 1에서와 같이 구축하였다. 그리고 pGL3-Basic vector에 SV40 poly A 부분을 제한 효소 Sal I과 Fse I으로 제거한 후, 제거된 부위에 CPE, CPE 및 DSE의 위치를 기준으로 15 종류의 단편들을 cloning하였다. Cloning된 15 종류의 단편(#1 (1.86 kb), #2(1.52 kb), #3(1.17 kb), #4(217 bp), #5(276 kb), #6(328bp), #7(401bp), #8(579 bp), #9(908 bp), #10 (967 bp), #11(1.02 bp), #12(1.09 kb), #13(1.27 kb), #14 (1.73 bp), #15 (1.83 bp))들을 제한효소 Sal I과 Fse I으로 절단하여 전기영동을 통하여 크기를 확인하였다(Fig. 2).

유증 분비 호르몬이 유선 상피 세포의 발현량에 미치는 영향

HC11과 PMGC에 #1 construct를 이용함으로써 원래 상태의 β -casein 유전자가 유증분비호르몬(insulin, I; prolactin, P; hydrocortisone, H)들에 의해 발현에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과, 양쪽 세포주에 있어 I만을 처리했을 때 가장 적은 양의 발현을 보였으며, I+P, I+H, I+P+H의 순으로 발현량이 높게 나타났다(Fig. 3). 이후의 모든 실험은 I+P+H 조건으로 수행하였다.

구축된 Vector의 Luciferase 유전자의 발현 양상

15 종류의 변형된 vectors를 HC11과 PMGC에 transfection시켜 48시간 동안 배양 후, 각각의 luciferase 활성도를 측정하였다(Fig. 4). HC11의 경우, DSE b 및 c 부위가 제거되고 exon 9 내에 CPE 1이 포함되지 않은 #4, 5 및 6 construct에서 유의적으로 높은 발현량을 보였다. 하지만, DSE b 및 c 부위가 제거되고 exon 9의 CPE1을

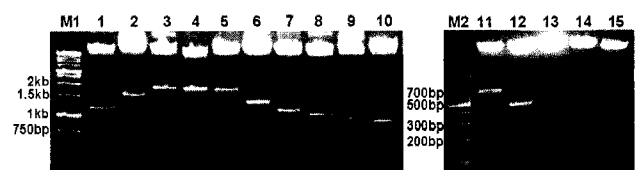


Fig. 2. Identification of porcine β -casein 3' serial deleted mutants digested with Sal I/Fse I. lane 1, #3 (1.17 kb); lane 2, #2 (1.52 kb); lane 3, #1 (1.86 kb); lane 4, #15 (1.83 kb); lane 5, #14 (1.73 kb); lane 6, #13 (1.27kb); lane 7, #12 (1.09 kb); lane 8, #11 (1.02 kb); lane 9, #10 (967 bp), lane 10, #9 (908 bp); lane 11, #8 (579 bp), lane 12, #7 (401 bp); lane 13, #6 (328 bp); lane 14, #5 (276 bp); lane 15, #4 (217 bp); M1, 1kb ladder; M2, 100 bp ladder.

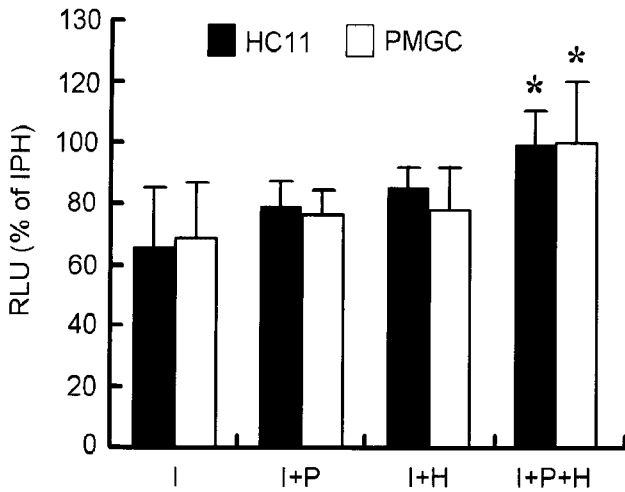


Fig. 3. Effects of lactogenic hormone on luciferase activity in HC11 and PMGC cells. I, insulin; P, prolactin; H, hydrocortisone; RLU, relative luciferase unit; *, $p < 0.05$ vs. insulin of corresponding cell line.

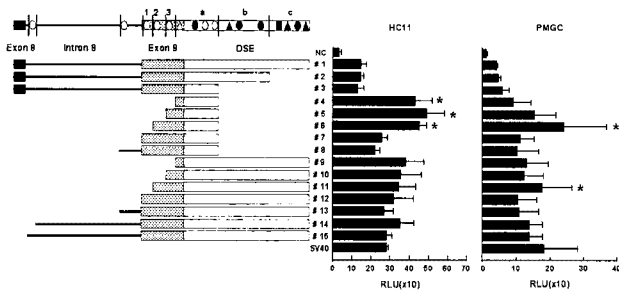


Fig. 4. Luciferase activity in HC11 and PMGC cells transfected with different luciferase/PBC poly A 3'-deleted series construct. The experiment was standardized with Renilla activity by pRL-TK. NC, negative control; SV40, positive control; PBC, porcine β -casein; DSE, downstream element; RLU, relative luciferase unit; ○, CPE (cytoplasmic polyadenylation element); △, poly A signal; ●, U-rich; ▲, G-rich; ■, GU-rich; *, $p < 0.05$ vs. #1 construct (native full sequence 3'-UTR).

포함한 #7 construct는 그렇지 않은 #6 construct에 비해 발현량이 유의적으로 감소되었다. 반면, DSE를 모두 포함하고 exon 9의 CPE 1의 유무에 따라 비교한 #11 및 #12에서는 발현량의 차이를 보이지 않았다. PMGC의 경우, exon 9의 CPE 2, 3 및 DSE a만 포함한 #6 construct에서 유의적으로 높은 발현량을 보였으며, exon 9의 CPE 2, 3과 DSE를 모두 포함하고 있는 #11 construct에서도 유의적으로 높은 발현량을 보였다.

고찰

전사 인자에 의한 유전자 발현 조절은 mRNA의 합성 속도를 조절하는 방식으로 진행되지만, 전사 후 조절 (posttranscriptional controls)은 생산된 mRNA가 단백질로 생성되는 양, 즉 해독 과정을 조절한다(Spicher 등, 1998). Kuraishi 등은 생쥐의 유선 조직에서 casein mRNA

의 poly A 길이를 조절함으로써 *in vitro* 내 mRNA의 안정성과 해독 효율을 조절한다고 보고한 바 있다(Kuraishi 등, 2002). 또한, 전사 후 전사물의 해독 메커니즘의 조절로 인해 유전자의 발현량과 안정화가 조절된다는 보고도 있다(Ross, 1995). 이러한 연구 결과들은 유전자 발현 메커니즘에서 mRNA의 안정성과 해독 효율이 전사 후 조절에 의해 영향을 받는다는 것을 보여주고 있다(Izquierdo와 Cuezva, 1997; Yang 등, 1997).

유전자의 발현이 지속된다는 것은 mRNA의 축적과 안정성으로 인해 전사물의 해독이 안정적으로 지속된다는 것을 의미하는 반면, 유전자 발현의 감소는 mRNA의 불안정성으로 인해 전사물의 해독 과정이 정상적으로 이루어지지 않아 유전자의 발현이 감소되는 상태를 의미한다(Gray와 Wickens, 1998). 이와 같이 세포내의 mRNA의 안정성 변화가 단백질 생산에 미치는 영향을 알아보고, mRNA의 안정성에 영향을 주는 전사조절인자를 탐색하기 위하여, luciferase 유전자 발현 분석을 측정하였다. 한편, 각 construct에 대한 분석을 하기 전에 *trans-acting elements*인 유즙 분비 호르몬이 유선 상피 세포 내에서 각각의 호르몬들이 luciferase 발현에 미치는 영향을 확인하였다. 이는 유즙 분비 호르몬이 조합되었을 때 발현량에 미치는 차이를 확인(Fig. 3)함으로써 수유기 상태의 유선 세포와 근접한 상태의 발현 조건을 찾기 위함이다.

또한, 돼지 β -casein 유전자의 전사 조절인자의 효과를 생쥐 유래의 HC11 세포주와 돼지 유선세포(PMGC)에서 reporter 유전자 발현량을 통해 중간 비교하였다. Pfarr 등(1986)은 돼지 β -casein 유전자의 3' 말단 염기 서열 분석을 통하여 전사인자인 *trans-acting element*와 *cis-acting element*에 의해 poly A가 생성되고 생성된 poly A에 의해 안정화된 mRNA 형태가 지속적인 단백질을 생성하기 위한 결정적인 역할을 한다고 보고하였다. 이러한 보고는 세포질 poly A 생성이 3'-UTR 내에 *cis-acting element*인 CPEs의 위치에 따라 일시적으로 조절된다는 것을 제안한다. 잠재적인 CPE는 $U_{(4-7)}A_{(1-2)}U_{(1-2)}$ 의 형태를 가지고 있으며, 그로부터 poly A signal의 하단에 약 50~250 nucleotides를 형성하며 결합한다(Garibay 등, 2000).

본 연구에서는 CPEs의 위치와 DSE들의 부위에 따라 각각 다른 15종류의 construct를 제작하여 luciferase의 발현량을 분석한 결과, 3'-UTR의 exon 내에 존재하는 CPE 염기 서열의 위치와 DSE의 유무에 따라 각각의 발현량에 차이가 있음을 확인하였다(Fig. 4). 주목할 점은, Fig. 4에 있어 #6과 #7 construct의 발현 차이를 보면 #7 construct는 exon 9에 존재하는 잠재적인 CPE를 모두 가지고 있지만 CPE 1를 가지고 있지 않은 #6 construct 보다 낮은 발현 양상을 보이고 있다는 점이다. 이러한 결과로부터 CPE 1을 포함하는 몇몇의 CPE는 해독 과정에서 adenylation이 결합하는 것을 오히려 억제한다(Gebauer와 Richter, 1996; Minshall 등, 1999)는 것을 의미한다. 이러한 결과로부터 CPE가 poly A를 생성함에 있어 mRNA의 안정성을 유지시켜주는 데 중요한 인자임을 간접적으로 시사한다. 한편, Mendez 등(2001)은 CPEs에 결합한 CPEB(CPE-binding protein)이 maskin 단백질과 결합하여 mRNA 5'-cap에 결합되어 있는 eIF4E와 결합하여 해독을 억제하고, maskin 단백질이 분리되었을 때

세포질 내에서 polyadenylation이 시작된다고 제안했다. 여기서 본 연구에서 언급된 CPE 이들이 maskin 단백질과 어떻게 상호관계를 하는지 대해서는 향후 검토되어야 할 사항으로 사료된다.

해독과정 내에 adenylation이 결합하는 것을 억제하는 CPE들이 존재하더라도 3' 말단 내의 특정 DSE들의 존재여부에 따라 발현량이 증가되기도 한다는 결과는 Fig. 4의 #6과 #11 construct는 비교적 높은 luciferase 발현을 보였다. 하지만, mRNA의 안정성에 미치는 영향을 알아보기 위해 전사 억제제(actinomycin D)를 처리하였을 때의 결과(미제시)는 PMGC의 #6 construct에서 낮은 발현량을 보였다. 즉, 세포주에 따라 차이는 있었지만 mRNA의 안정성은 3'-UTR내의 CPE 위치에 의한 발현 변화뿐만 아니라 DSE들(G-rich, U-rich, GU-rich)의 영향에 의해서도 mRNA의 안정성이 변화된다는 것을 알 수 있었다(Nie 등, 2004; Zhao 등, 1999).

본 연구에서 돼지 β -casein 유전자의 5'-UTR 및 변형된 15종류의 3'-UTR을 cloning하여 CPE의 위치와 DSE의 포함 여부에 따른 발현량에 미치는 영향을 확인한 바, 변형된 3'-UTR의 분석으로부터 poly A signal에서 전해진 신호에 의해 CPE들과 DSE들의 상보적인 관계로 mRNA에 안정성을 유지시켜준다는 것을 유추할 수 있었다. 위 사실들로부터 돼지 β -casein의 native full sequence 3'-UTR를 이용하여 활용하는 것보다 돼지 β -casein 3'-UTR 내의 exon 9내의 CPE 2 및 3과 DSE a만이 결합된 짧은 형태의 #6 construct가 돼지의 유선세포 내에서 조직특이적인 유용 유전자의 생산과 안정화된 발현에 보다 효율적으로 기여할 수 있을 것으로 사료된다. 한편, Park 등(2006)에 의해 생산된 mouse WAP promoter로부터 재조합 human erythropoietin (hEPO)를 발현시키는 형질 전환 돼지에서 유선 이외의 조직 비특이적 발현을 관찰하였지만(Lee 등, 2008), 유즙 내 활성을 가지는 hEPO를 생산하는데 큰 문제점은 없었다. 비록 본 연구에서 조직특이적 발현 여부에 대한 검토는 하지 않았지만, 목적으로 하는 유용 단백질을 생산하는 형질 전환 돼지의 제작에는 문제점이 없을 것으로 사료되나, 향후 보다 조직 특이적인 promote를 이용한 목적의 유용 단백질을 효율적으로 생산하는 방법도 시도되어야 할 것이다.

인용문헌

- Alberts B (2002): From the national academies. Cell Biol Educ 1:109-110.
- De Moor CH, Richter JD (1999): Cytoplasmic polyadenylation elements mediate masking and unmasking of cyclin B1 mRNA. Embo J 18:2294-2303.
- Garibay-Tupas JL, Bao S, Kim MT, Tashima LS, Bryant-Greenwood GD (2000): Isolation and analysis of the 3'-untranslated regions of the human relaxin H1 and H2 genes. J Mol Endocrinol 24:241-252.
- Gebauer F, Richter JD (1996): Mouse cytoplasmic polyadenylation element binding protein: an evolutionarily conserved protein that interacts with the cytoplasmic polyadenylation elements of *c-mos* mRNA. Proc Natl Acad Sci USA 93:14602-14607.
- Gray NK, Wickens M (1998): Control of translation initiation in animals. Annu Rev Cell Dev Biol 14: 399-458.
- Guyette WA, Matusik RJ, Rosen JM (1979): Prolactin-mediated transcriptional and post-transcriptional control of casein gene expression. Cell 17:1013-1023.
- Houdebine LM (1995): The production of pharmaceutical proteins from the milk of transgenic animals. Reprod Nutr 35:609-617.
- Houdebine LM (2000): Transgenic animal bioreactors. Transgenic Res 9:305-320.
- Izquierdo JM, Cuezva JM (1997): Control of the translational efficiency of beta-F1-ATPase mRNA depends on the regulation of a protein that binds the 3' untranslated region of the mRNA. Mol Cell Biol 17:5255-5268.
- Kuraishi T, Mizoguchi Y, Sun Y, Aoki F, Imakawa K, Sakai S (2002): The casein mRNA decay changes in parallel with the poly (A) tail length in the mouse mammary gland. Mol Cell Endocrinol 190: 101-107.
- Lee HG, Lee HC, Chung HJ, Hwang IS, Choi MS, Byun SJ, Lee S, Kim MJ, Woo JS, Chang WK, Lee HT, Park JK (2008): Study on the reproductive function in transgenic pig harboring human erythropoietin (hEPO) gene. Reprod Dev Biol 32:117-121.
- Malewski T, Zwierzchowski L (1995): Computer-aided analysis of potential transcription-factor binding sites in the rabbit beta-casein gene promoter. Biosystems 36:109-119.
- Mendez R, Richter JD (2001): Translational control by CPEB: a means to the end. Nat Rev Mol Cell Biol 2:521-529.
- Minshall N, Walker J, Dale M, Standart N (1999): Dual roles of p82, the clam CPEB homolog, in cytoplasmic polyadenylation and translational masking. RNA 5:27-38.
- Nie L, Khan I, Misquitta CM, Grover AK (2004): Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump mRNA stability in cardiac and smooth muscle: role of poly A+ tail length. Cell Calcium 35:479-484.
- Park JK, Lee YK, Lee P, Chung HJ, Kim S, Lee HG, Seo MK, Han JH, Park CG, Kim HT, Kim YK, Min KS, Kim JH, Lee HT, Chang WK (2006): Recombinant human erythropoietin produced in milk of transgenic pigs. J Biotechnol 122:362-371.
- Pfarr DS, Rieser LA, Woychik RP, Rottman FM, Rosenberg M, Reff ME (1986): Differential effects of polyadenylation regions on gene expression in mammalian cells. DNA 5:115-122.
- Ross J (1995): mRNA stability in mammalian cells. Microbiol Rev 59:423-450.
- Spicher A, Guicherit OM, Duret L, Aslanian A, Sanjines EM, Denko NC, Giaccia AJ, Blau HM

- (1998): Highly conserved RNA sequences that are sensors of environmental stress. *Mol Cell Biol* 18: 7371-7382.
20. Van Helden J, del Olmo M, Perez-Ortin JE (2000): Statistical analysis of yeast genomic downstream sequences reveals putative polyadenylation signals. *Nucleic Acids Res* 28:1000-1010.
21. Verrotti AC, Thompson SR, Wreden C, Strickland S, Wickens M (1996): Evolutionary conservation of sequence elements controlling cytoplasmic polyadenylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9027-9032.
22. Yang Q, McDermott PJ, Duzic E, Pleij CW, Sherlock JD, Lanier SM (1997): The 3'-untranslated region of the alpha2C-adrenergic receptor mRNA impedes translation of the receptor message. *J Biol Chem* 272:15466-15473.
23. Zhao FQ, Adachi K, Oka T (2002): Involvement of Oct-1 in transcriptional regulation of beta-casein gene expression in mouse mammary gland. *Biochim Biophys Acta* 1577:27-37.
24. Zhao J, Hyman L, Moore C (1999): Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:405-445.
(접수일자: 2008. 8. 12 / 채택일자: 2008. 9. 7)