

외래 유전자의 효율적인 발현 조절을 위한 개선된 Tetracycline-Inducible Expression System의 구축

구본철 · 권모선 · 김태완[†]

대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실

Construction of Improved Tetracycline-Inducible Expression System for the Effective Regulation of Transgene Expression

Bon Chul Koo, Mo Sun Kwon and Teoan Kim[†]

Department of Physiology, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu 705-718, Korea

ABSTRACT

In this study we tried to construct a more efficient tetracycline-inducible gene expression system by replacing previous key elements with more advance ones. At the beginning, we substituted PGK (phosphoglycerate kinase) promoter for CMV (cytomegalovirus) promoter to control "rtTA2^SM2" which has been known for high induction efficiency in response to tetracycline. With this modification, expression of the EGFP marker gene under the induction condition was significantly increased. Next, we replaced "TRE" fragment with a modified version named "TRE-tight" which has been reported to have higher affinity and specificity to the transactivator by minor base change of the "TRE" DNA fragment sequence. Use of "TRE-tight" instead of "TRE" resulted in more than 10 fold increment in terms of induction efficiency and significant decrement of background expression in non-inducible condition. By combining PGK promoter and "TRE-tight" fragment, we could upgrade previous tetracycline-inducible system to show more stringent turn on/off gene switch ability and stronger expression of the gene of our interest. Use of this newly developed system must be very helpful to the studies of gene expression, especially to the transgenic animal study in which non-controllable constitutive expression of the transgene has been one of the urgent problems to be solved.

(Key words : rtTA2^SM2, PGK promoter, TRE-tight, EGFP, Induction efficiency)

서 론

외래 유전자의 도입을 이용한 유전자 치료나 형질전환 동물의 생산 등에 있어서의 해결해야 할 문제점 중의 하나는 외래 유전자의 발현이 조절되지 않고 지속적으로 일어남으로써 유발될 수 있는 세포나 개체에 대한 생리적인 부작용이다. 이를 해결하기 위한 수단으로 세포나 개체 내에서 외래 유전자의 발현을 유도적으로 조절할 수 있는 system이 필요한데, 현재 사용하고 있는 방법으로는 heat shock이나 중금속, steroid hormone 등을 이용하는 system이 있다. 이러한 발현 조절 system은 유도 조건에서 외래 유전자의 발현이 약하거나 비유도 조건에서의 비교적 높은 background 활성이 나타나기도 하며, 유도물질에 의한 다면적 영향(pleiotropic effect)이나 유도체 자체의 세포독성

등이 문제시되기도 한다(Watsuji 등, 1997; Yarranton, 1992). 이러한 문제점을 최소화하는 system으로는 현재 널리 이용되고 있는 tetracycline을 이용한 유전자 조절 system이 있는데, 이 system은 유도물질로 사용되는 tetracycline 계열의 물질의 양이 매우 소량이어서 다른 유도체에 비해 매우 미미한 세포독성을 나타내며, 유전자의 발현 유도율은 다른 system에 비하여 탁월한 것으로 알려져 있다(Bohl 등, 1997; Mayford 등, 1996). Tet system은 세포나 조직, 그리고 개체 내에서 목적 유전자의 발현을 인위적으로 조절할 수 있는 유도 발현 system으로서 대장균의 tetracycline-resistance operon에서 유래한 Tet repressor protein (TetR) 또는 reverse TetR (rTetR)과 Tet operator DNA sequence (tetO) 인자가 기본 요소이다. Tet-On system의 기본 원리는 rTetR과 VP16 activation domain으로 구성된 reverse tetracycline-controlled transactivator (rtTA)가 발현되면

* 이 논문은 2005년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원(KRF-2007-359-F00006)과 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 것임.

[†] Corresponding author : Phone: +82-53-650-4470, E-mail: takim@cu.ac.kr

tetracycline 유도체인 doxycycline과 결합하여 tetO 서열이 포함되어 있는 tetracycline response element (TRE) 부위에 결합하여 유전자의 발현을 유도한다(Gossen 등, 1995). Tet system은 tetracycline계의 유도물질이 존재할 경우 외래 유전자의 발현이 저해되는 Tet-Off system과 발현을 유발하는 Tet-On system으로 나누어지며, 외래 유전자의 발현을 필요시에만 유발해야 할 경우에는 후자가 더 적절하다. Tet-Off system은 tTA가 고발현되도록 조절할 경우 tTA의 transcription activation domain인 VP16이 전사 기전의 필수 요소를 희석시킴으로써 세포내의 다른 유전자의 발현을 억제하여 세포 독성을 유발하는 것으로 알려져 있으며(Sadowski 등, 1988; Strathdee 등, 1999), 비유도 조건에서 외래 유전자의 발현(background activity)이 비교적 높게 나타나는 것으로 보고되어 있다(Ackland-Berglund와 Leib, 1995). 또한, 외래 유전자의 발현을 억제하기 위해서는 doxycycline의 지속적인 처리가 필요하며, 발현이 시작 혹은 종료(turn on/off)되는 데 소요되는 시간이 긴 것으로 알려져 있다(Mansuy와 Bujard, 2000). 이에 비하여 Tet-On system은 원하는 유전자의 발현이 시작 혹은 종료에 소요되는 시간이 짧으며 doxycycline의 체내에 축적되는 속도에 비해 배출되는 속도가 더 빠른 것으로 나타났다(Urlinger 등, 2000).

이 system에서 현재까지 완전히 해결되지 않은 문제점은 비유도 조건에서 아직 완벽한 발현 억제가 이루어지지 않은 관계로 미미한 background 활성을 나타내며, 유도 조건에서는 외래 유전자의 보다 강한 발현이 요구되는 것이다. 이를 해결하기 위하여 본 연구에서는 Tet system의 여러 요소들을 보다 진일보한 요소들로 보완하고자 하였다. 먼저 rtTA를 발현 유도율이 높고 doxycycline에 대한 감수성이 높은 rtTA^{2S}-M2 서열로 교체하였으며(Urlinger 등, 2000), rtTA^{2S}-M2에 대한 promoter로는 PGK promoter를 도입하였다. 또한, TRE 서열을 transactivator와의 결합친화성과 특이성이 강화된 TRE-tight 서열로 대체하였다. 본 연구에서 구축한 진일보한 형태의 Tet system은 외래 유전자 전이를 이용한 동물생명공학이나 분자생물학 및 의학 등의 연구 분야에 있어서 매우 유용한 유전자 발현 조절 system으로 제공될 수 있을 것으로 기대된다.

실험 방법

Tet System의 개선

본 연구에서 구축한 Tet vector는 본 연구실에서 보유하고 있는 Tet vector인 pRevTRE-EGFP-RSVp-rtTA^{2S}-M2 (pTGRT)와 pRevTRE-EGFP-WPRE-RSVp-rtTA^{2S}-M2 (pTGWRT), 그리고 pRevTRE-EGFP-RSVp-rtTA^{2S}-M2-WPRE (pTGRTW) (Koo 등, 2005)를 대조구로 하여 rtTA^{2S}-M2에 대한 promoter를 기존의 RSV promoter에서 PGK promoter로 대체한 pRevTRE-EGFP-PGKp-rtTA^{2S}-M2 (pTGPT)와 pRevTRE-EGFP-WPRE-PGKp-rtTA^{2S}-M2 (pTGWPT), 그리고 pRevTRE-EGFP-PGKp-rtTA^{2S}-M2-WPRE (pTGPTW)를 각각 구축하였다. 이외에 기존의 TRE 부분을 일부 서열이 변형된 TRE-tight (Clontech, USA) 서열로 대체한 pRevTREtight-EGFP-PGKp-rtTA^{2S}-M2 (pTtGPT)와 pRevTREtight-EGFP-WPRE-PGKp-rtTA^{2S}-M2 (pTtGWPT), 그리고 p-

RevTREtight-EGFP-PGKp-rtTA^{2S}-M2-WPRE (pTtGPTW)를 각각 구축하고자 하였다. 먼저 RSV promoter에서 PGK promoter로 대체하는 과정은 본 연구실에 보유하고 있는 세 종류의 vector들을 각각 Sal I 과 Klenow fragment, 그리고 HindIII를 순서대로 처리하여 CMV promoter 부분을 제거하고 pGEM-7Zf-PGKp vector를 Xba I, Klenow fragment, 그리고 HindIII를 순서대로 처리하여 분리한 PGK promoter를 재조합하였다. TRE 부분을 TRE-tight 서열로 대체하는 실험은 전 과정에서 구축한 PGK promoter가 도입된 각 vector를 Xho I 과 BamH I 으로 처리하여 TRE 부분을 제거하였으며, pTRE-Tight vector (Clontech, USA)를 Xho I 과 BamH I 으로 처리하여 분리한 TRE-Tight 절편을 도입하였다. 이상의 과정에 의해서 구축한 각 vector의 구조는 Fig. 1과 같다.

구축한 vector는 Gibbon ape leukemia virus의 피막 유전자가 발현되는 PT67 (Clontech, USA) 포장세포에 calcium phosphate 방법으로 transfection하였다. PT67에서 생산된 virus는 Moloney murine leukemia virus의 gag과 pol 유전자가 발현되는 GP2 293 (Clontech, USA) 세포에 염색시켜서 hygromycin B (150 μ g/ml)가 첨가된 배양액에서 2주간 배양하였다. 구축된 각 세포주에 vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G) 피막 유전자를 가진 pVSV-G (Clontech, USA) plasmid를 일시적으로 transfection하여 48시간 후에 virus 배양액을 수확하였다. 생산된 virus는 닭의 배아섬유아세포인 CEF에 감염시켜서 150 μ g/ml의 hygromycin B가 첨가된 배양액으로 2주간 선별하여 외래 유전자가 전이된 각각의 세포주를 확립하였다.

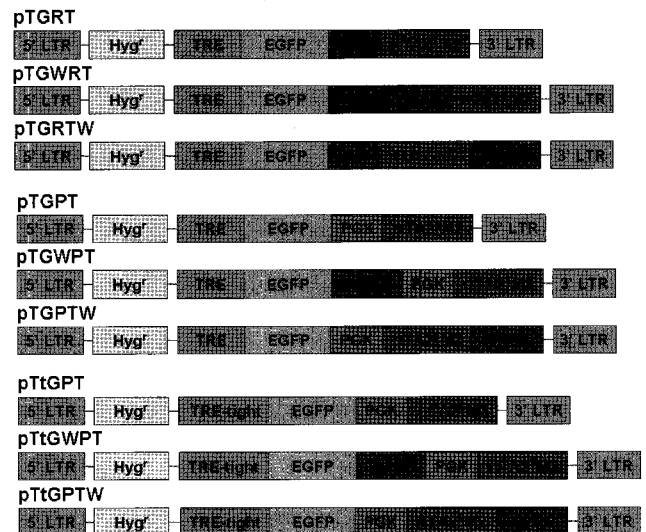


Fig. 1. Structure of tetracycline-inducible expression retrovirus vectors. LTR, long terminal repeat; Hygro^R, Hygromycin B resistant gene; TRE, Tet-response element; EGFP, enhanced Green Fluorescent Protein gene; RSV, Rous sarcoma virus promoter; rtTA^{2S}-M2, modified rTA consisting of the reverse tetracycline repressor (rtTet-R) fused to a VP16 transactivation domain; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; PGK, phosphoglycerate kinase promoter; TRE-tight, is a modified Tet response element, which consists of seven direct repeats of a 36-bp sequence and 19-bp tet operator sequence. Length of each sequence is not drawn to scale.

실험에 사용한 모든 세포들은 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였으며, 4.5 g/l glucose (GibcoBRL, USA), 10% fetal calf serum (Hyclone, USA), 100 U/ml의 penicillin과 100 µg/ml의 streptomycin (Hyclone, USA)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Hyclone, USA) 배지에서 배양하였다.

Tet System에 의한 EGFP 유전자 발현 조절 양상의 분자생물학적 분석

형광현미경을 이용한 EGFP 발현 관찰

구축한 vector system이 tetracycline 계열의 물질이 존재할 경우에 유전자 발현이 turn on되는 system임을 감안하여 선별된 각각의 세포를 tetracycline 유도체인 doxycycline을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우로 나누어 배양한 후 EGFP 유전자의 발현 양상을 관찰하였다. 전날 각 세포를 60 mm dish에 5×10⁵개로 준비한 후 그 다음날 doxycycline을 1 µg/ml의 농도로 첨가하였거나 첨가하지 않은 배지로 교환해 주었다. 48시간 배양한 후 형광현미경 하에서 FITC filter를 통해 EGFP 유전자의 발현을 관찰하였다.

RT-PCR

Doxycycline을 첨가하였거나 첨가하지 않은 배지에서 각각 48시간 배양한 각각의 세포에서 trizol (Invitrogen, USA)을 이용하여 RNA를 분리한 후 1 µg의 RNA로 ImProm-II reverse transcription system (Promega, USA)을 이용하여 cDNA를 제조하였다. 각각의 실험군에서 2 µl의 cDNA를 주형으로 이용하여 PCR을 실시하였으며 94°C에서 30초, 57°C에서 30초, 72°C에서 30초간 반응하는 cycle을 25회 반복 실시한 후 최종 신장을 위해 72°C에서 7분간 반응하였다. 본 실험에 사용한 primer는 + strand primer인 5'-AAGCTGTGTGCCACCTACAAGC-3'와 - strand primer인 5'-GCCATCCCAGTCTTCCATCT-3'를 사용하였으며, 1.5% agarose gel을 이용한 전기영동을 실시하여 EGFP 유전자에 해당하는 281 bp의 DNA 단편을 확인하고자 하였다. 정상적인 전사과정이 일어나고 있음을 확인하기 위하여 GAPDH 유전자에 대한 primer로 PCR을 수행하였는데, + strand primer인 5'-ACGCCATCACTATCTTCCAGGAG-3'와 - strand primer인 5'-CAGCAGCCTTCAC-TACCCTCTTG-3'를 사용하였으며, 증폭된 단편의 크기는 655 bp이다. PCR 반응은 94°C에서 30초, 54°C에서 30초, 68°C에서 30초간 반응하는 cycle을 25회 반복 실시하였다.

Fluorometry와 Western Blotting

전날 각 세포를 60 mm dish에 5×10⁵개로 준비한 후 그 다음날 doxycycline을 1 µg/ml 농도로 첨가하였거나 첨가하지 않은 배지로 교환해 주었다. 48시간 배양한 후 각 세포를 split하여 세포만 수확한 후 초음파 분쇄하였으며, 원심분리를 이용하여 전단백질을 분리하였다. Fluorometry는 다음과 같은 과정으로 실시하였다. 먼저, 분리한 전단백질을 Bradford 방법으로 정량하여 100 µg을 취한 후, excitation filter F485와 emission filter F535가 장착된 Twinkle™ LB 970T fluorometer (Berthold technologies, Ger-

many)를 이용하여 EGFP 발현 정도를 측정하였다.

Western blotting을 실시하기 위하여 분리한 전단백질 중 10 µg을 취하여 SDS-PAGE를 실시한 후 nitrocellulose membrane에 transfer시켰다. 5% skim milk가 포함된 0.03% tween-20 blocking buffer에 1시간 방치한 후 1:5,000으로 희석한 anti-GFP 항체와 1:8,000으로 희석한 anti-β-actin 항체를 16시간 반응시켰다. TBS buffer로 수세한 다음 이차항체인 HRP conjugated Goat anti-mouse IgG 1:1,000으로 희석하여 반응시켰다. 반응시킨 membrane을 수세한 후 기질 용액인 West Dura Extended Duration substrate (Pierce, USA) 용액을 첨가하여 X-ray film에 60초간 노출시켜서 현상하였다.

결 과

형광현미경 하에서의 각 Vector에 따른 EGFP 발현 조절 양상 관찰

각각의 Tet system에 의해서 구축된 CEF 세포는 발현 유도물질인 doxycycline이 첨가되는 조건에서 강한 녹색 형광을 나타내었다(Fig. 2). 세 종류의 vector system 모두 WPRE (Zufferey 등, 1999)가 도입된 virus vector에 의해 구축된 세포주에서 강한 발현을 보였으며, 그 중 WPRE 서열이 EGFP 유전자의 3' 위치에 도입된 경우에 가장 강한 발현을 나타내었다(Fig. 2). 전반적으로 TGRT vector system 군보다는 PGK promoter가 도입된 TGPT나 TtGPT vector system에 의해서 구축된 세포주에서 강한 발현을 나타내었다(Fig. 2). TGPT와 TtGPT vector system을 비교해 보면 TtGPT가 비유도 조건, 즉 doxycycline이 첨가되지 않은 조건에서 EGFP 발현의 억제강하게 나타나서 형광이 관찰되지 않는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 따라서 발현 유도에 대한 조절이 효율적으로 일어나며 유도 조건에서 비교적 강한 발현을 보이는 TtGWPT vector system이 형질전환 동물을 생산하거나 유전자 치료에 있어서 가

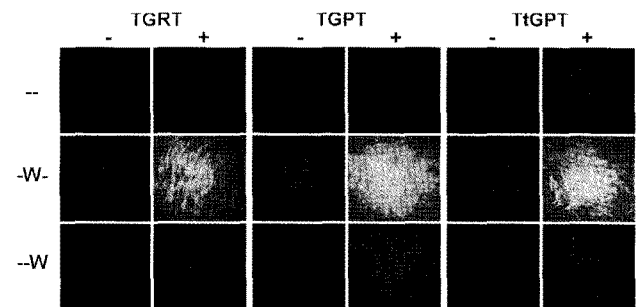


Fig. 2. Expression of the EGFP gene in CEF cell. The cells were divided into three groups of cells according to the virus (TGRT, TGPT, or TtGPT) used for infection. Each group of the cells were further divided by modification of the virus and presence of doxycycline in the media: The symbols at the left side indicate the difference of the virus in the same group. For example, '--' means 'no modification', while '-W-' or '-W-' indicate insertion of WPRE sequence at downstream of 'EGFP' or 'rTA2^{M2}' sequence, respectively. Other symbols of '-' or '+' at the top of each column indicate culture of cells 'in the absence' or 'in the presence' of doxycycline (1 µg/ml).

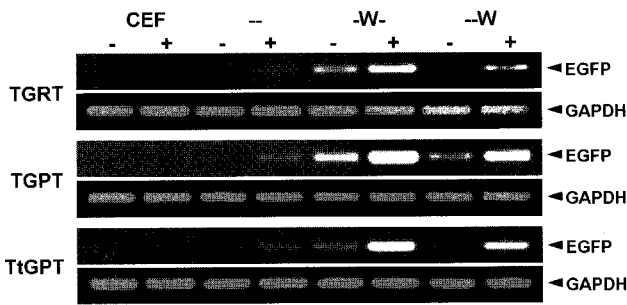


Fig. 3. RT-PCR analysis of the EGFP gene in CEF cell. The symbols at the top row, such as '-', '-W-' and '-W+' indicate insertion of WPRE sequence in the TGRT, TGPT, and TtGPT vector at the site explained in the Fig. 2 legend. The symbols at the second row from the top, such as '-' or '+' indicate culture media supplemented with or without doxycycline, respectively.

장 적절한 유전자 전이 system인 것으로 생각된다.

각 세포주에서 EGFP 발현 조절 양상에 대한 RT-PCR 분석

Doxycycline이 첨가되거나 첨가되지 않은 배지에서 배양한 각 세포주의 RNA를 분리하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과, virus에 감염되지 않은 정상 세포주에서는 EGFP에 대한 증폭 단편이 나타나지 않았으며, virus에 감염된 세포주에서는 증폭 단편이 확인되었다(Fig. 3). 증폭 단편은 vector system의 종류에 상관없이 WPRE가 EGFP 유전자의 3'에 도입된 경우 가장 강하게 나타났다(Fig. 3). 이 중에서도 유도 조건에서는 TGWRT에 비해 TGWPT와 TtGWPT에서 강한 단편이 나타났으며, 비유도 조건에서는 TtGWPT가 가장 약한 증폭 단편을 나타내었다(Fig. 3). 이러한 결과는 다른 vector system에 비해 TtGWPT가 외래 유전자의 발현 조절이 가장 효율적으로 이루어지는 것임을 의미한다.

각 세포주에서 EGFP 발현에 대한 단백질 수준의 정량 분석

RT-PCR 실험과 동일한 조건에서 배양한 세포로부터 전 단백질들을 분리하여 Western blotting과 fluorometry를 실시하였다. Western blotting의 경우, 동일한 세포의 전단 단백질을 SDS-PAGE한 후 EGFP에 특이적으로 결합하는 항체를 반응시킨 결과, RSV promoter가 도입된 TGRT 실험군보다 PGK promoter가 도입된 TGPT나 TtGPT 실험군에서 강한 발현을 나타내었다(Fig. 4). 유도 조건에서 가장 강한 발현은 TGPT 실험군 중 WPRE 서열이 EGFP 유전자 다음에 위치한 TGWPT 실험군인데, 이 실험군에서는 비유도 조건에서도 비교적 강한 발현을 나타내어 background activity가 높은 것으로 확인되었다. 이에 비해 TtGWPT는 TGWPT 실험군보다는 유도 조건에서의 EGFP 발현은 조금 약하게 나타났으나, 비유도 조건에서의 EGFP 발현이 강하게 억제되는 것으로 확인되어 전자에 비해 유전자 발현 조절 측면에서 보다 효율적인 것으로 확인되었다(Fig. 4). 세포주에서의 전반적인 발현이 정상적으로 진행되고 있음을 확인하기 위해 대조군으로 사용한 β -actin 항체에 대한 반응은 모든 세포들에서 거의 동일한 양상을 보였다(Fig. 4).

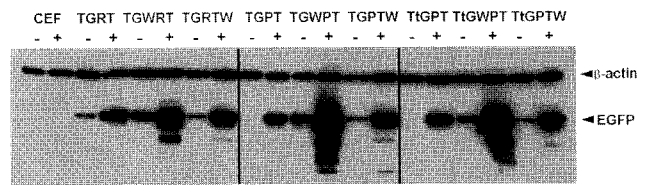


Fig. 4. Determination of doxycycline induction of the EGFP gene in CEF cell using Western blot analyses. CEF, uninfected cell; Each other cells are designated with the virus name used to infect. -: cell was grown in the doxycycline free media. +: cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 μ g/ml).

각 세포에서 분리한 단백질 중 100 μ g을 이용하여 fluorometry를 실시하였다. Western blotting 실험 결과와 마찬가지로 모든 vector 실험군에서 WPRE 서열이 EGFP 유전자의 3'에 위치한 경우에 가장 강한 발현을 나타내었으며, doxycycline이 첨가된 조건에서 TGWRT는 0.5×10^6 rlu/100 μ g 전단단백질 발현 정도를 나타낸 데 비해 TGWPT는 약 2.3×10^6 rlu/100 μ g, 그리고 TtGWPT는 약 2.0×10^6 rlu/100 μ g 값으로 측정되었다(Fig. 5). 또한, 외래 단백질인 EGFP의 비유도 조건에서의 발현량에 대한 유도 조건에서의 EGFP 발현량을 계산한 유도율에서는 TGWRT가 약 15배의 유도율을 나타낸 데 비해 TGWPT는 약 60배, 그리고 TtGWPT는 약 150배의 유도율을 나타내었다(Fig. 5). 이상의 결과를 종합하여 볼 때 TtGWPT가 형질전환 개체 내에서의 생리적인 부작용을 최소화하기 위한 외래 유전자의 발현 조절에 있어서 가장 적절한 vector system임을 알 수 있다.

고 찰

효율적인 유전자 발현 조절 system이 갖추어야 할 조건으로는 외부에서 유도물질이 공급되었을 경우에 신속하게 최대한의 발현이 나타나고 유도물질이 공급되지 않는 조건에서는 단시간 내에 발현이 억제되어야 한다(Watsuji 등, 1997; Rossi와 Blau, 1998). 이 때 사용되는 유도물질은 세포나 개체의 구조나 기능에 어떠한 영향도 미치지 않고 흡수와 배출이 용이해야 한다(Zhu 등, 2002). 또한, system의 구성 요소가 세포 본래의 유전자나 요소에 대해서는 활성을 나타내지 않아야 하고 세포의 조절 기전을 방해하지 않아야 한다(Rossi와 Blau, 1998). 본 연구에서 사용한 Tet-On system의 chimeric transactivator는 원핵세포, 진핵세포, 그리고 virus성 단백질 등으로 구성되어 있어서 표적세포 본래의 유전자와 상호 작용을 거의 유발시키지 않는다. 뿐만 아니라, 유도체로 사용되는 doxycycline의 양은 매우 소량이어서 세포에 미치는 독성이 거의 나타나지 않으며, 유전자의 발현 조절 정도가 다른 system에 비하여 탁월한 것으로 보고되어 있다(Bohl 등, 1997; Mayford 등, 1996). 이러한 장점을 가진 Tet-On system은 동물의 유전자 치료 모델에 적용하여 외래 유전자의 발현을 관찰한 연구가 많이 보고되었으며(Bohl 등, 1998), 형질전환 동물 모델의 다양한 조직과 기관에서 여러 외래 유전자의 유도적 발현을 목적으로 사용되고 있다. Kistner 등(1996)은 doxycycline을 응용시킨 형질전환 생쥐의 체장 조직에서 reporter 유전자

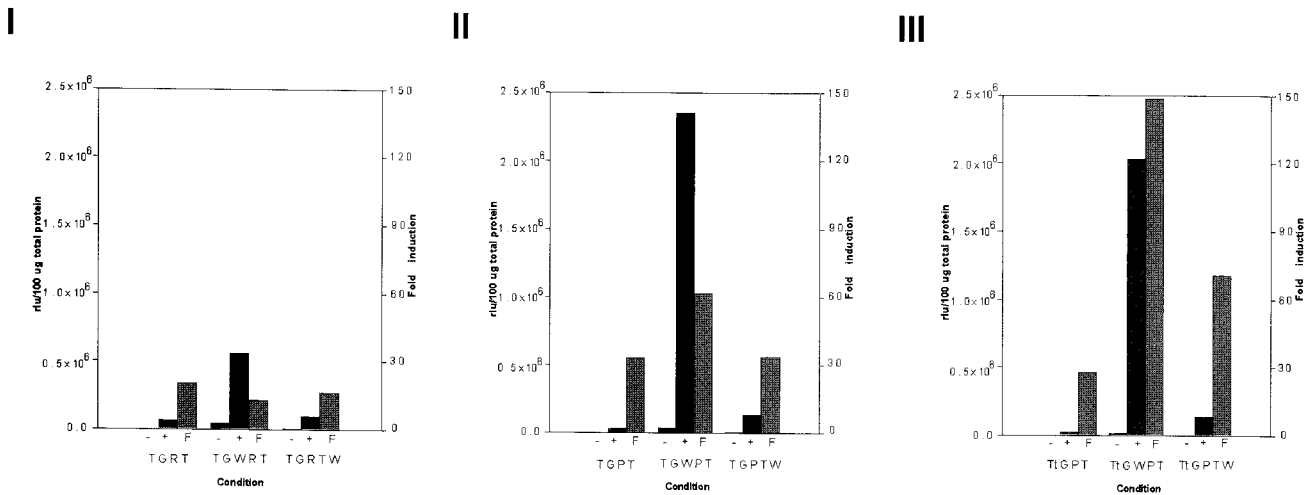


Fig. 5. Fluorometry analysis of EGFP. Cells are designated with the virus name used to infect. ‘-’ or ‘+’ indicate culture media supplemented with or without doxycycline, respectively.

의 발현 활성이 대조군보다 10^4 배 이상 유도되는 것을 보고하였고, Lamartina 등 (2003)은 Internal Ribosome Entry Site (IRES) 서열이 첨가된 Tet-On system을 이용하여 생쥐와 원숭이에서 erythropoietin (EPO)와 serum alkaline phosphatase (SEAP) 유전자의 유도적 활성을 확인하였다.

초창기의 Tet system (Gossen과 Bujard, 1992)은 Tet operator 조절 하에 외래 유전자가 도입된 vector와 rtTA 유전자가 포함된 vector로 이루어진 two vector system이었다. 따라서 형질전환 동물의 개발에 있어서 각각의 vector를 도입한 형질전환 동물을 구축한 후 이 동물간의 교미를 통하여 system이 완벽히 도입된 개체를 선별해야 하므로 시간적 경제적인 소모가 매우 컸다(Ryding 등, 2001). 이를 해결하기 위하여 각각의 vector에 독립적으로 도입된 각 요소들을 단일 vector 상에 cloning함으로써 보다 단순한 과정을 거치며 단시간 내에 형질전환 개체의 확립이 가능한 one vector system을 구축하고자 하였다. 이에 본 연구실에서 구축한 기존의 one vector system은 상업적으로 판매되는 two vector system에 비해서 외래 유전자의 발현량과 유도율이 비교적 높게 보고되었다(Koo 등, 2005). 그러나 TRE와 transactivator를 발현시키기 위한 promoter의 유사성에 의한 간섭 현상으로 인해 모든 요소들을 한 개의 cassette으로 조합한 경우, 외래 유전자의 강한 발현 조절이 어려운 경우가 많았다(Fitzsimons 등, 2001; Smith-Arica 등, 2000). 이러한 간섭 현상을 최소화하기 위하여 rtTA-2^SM2에 대한 promoter로 RSV promoter와 PGK promoter를 각각 도입하였다. 그 결과, PGK promoter를 도입한 경우에서 외래 유전자의 발현이 매우 강하게 나타났으며, 발현 유도율 역시 RSV promoter를 사용한 경우에 비해 4 배 이상 증가하는 것으로 나타났다. 본 연구에서 사용한 rtTA-2^SM2는 기존의 rtTA 서열에 비해서 안정성이 높고 doxycycline에 대한 감수성이 높아서 외래 유전자의 발현 유도가 보다 효율적으로 일어날 수 있도록 하는 것으로 알려져 있다(Lamartina 등, 2002; Salucci 등, 2002). 또한 doxycycline이 없는 비유도 조건에서는 tetO 요소에 대한 낮은 잔기 친화성을 나타냄으로써 background 활성이 낮은 것으로 보고되어 있다(Urlinger 등, 2000). rtTA와 do-

xycycline의 결합 형태가 외래 유전자의 발현을 turn on하기 위하여 부착하는 부위인 TRE 서열은 TRE-tight 서열로 대체하였다. TRE-tight promoter는 짧아진 형태의 minimal hCMV promoter 서열과 tetO 요소가 최적화된 형태로 포함되어 있으며(Agha-Mohammadi 등, 2004; Sipo 등, 2006), Tet system의 leakiness를 감소시키는 것으로 알려져 있다(Klopotowska 등, 2008). 실험 결과, PGK promoter만을 변경한 조건에서 약 60배의 발현 유도율을 나타내던 것과는 달리 약 150배의 유도율을 나타내어서 기존의 TRE 서열을 포함한 system에 비해 TRE-tight를 포함한 vector system에 의해 구축된 세포주에서 외래 유전자의 발현 유도율이 더욱 높은 것으로 확인되었다. 하지만 유도 조건에서의 절대적인 발현율은 TRE 서열이 포함된 경우에 더 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Bäckman 등(2004)에 의한 연구에서도 동일하게 나타났는데, 포유류의 세포주에서 가장 강한 발현은 TRE 서열이 포함된 system이 도입된 경우이며, 유도율은 TRE-tight 서열이 포함된 경우이다. 단지 Bäckman 등에 의한 연구에서는 50배의 발현 유도율을 나타낸 데 비해 본 연구에서는 약 150배 정도의 유도율을 나타냄으로써 본 연구의 vector system이 보다 효율적인 유전자 발현 조절을 가능하게 하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 유도율의 증가는 비유도 조건에서 보다 확실한 발현 억제가 이루어지는 것을 의미한다.

본 연구에서는 외래유전자의 발현을 효율적으로 조절할 수 있는 개선된 형태의 Tet system을 구축하였으며, 이 Tet system은 외래 유전자의 지속적인 발현에서 유발될 수 있는 여러 생리적인 부작용을 최소화하는 매우 적절한 유전자 전이 system으로써 바이오의약품을 생산하기 위한 형질전환 동물의 개발, 유도적인 발현이 요구되는 유전자 치료 등의 여러 연구 분야에 효율적으로 적용될 수 있을 것이다.

인용문헌

1. Ackland-Berglund CE, Leib DA (1995): Efficacy of

- tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type. *Biotechniques* 18:196-200.
2. Agha-Mohammadi S, O'Malley M, Etemad A, Wang Z, Xiao X, Lotze MT (2004): Second-generation tetracycline-regulatable promoter: repositioned tet operator elements optimize transactivator synergy while shorter minimal promoter offers tight basal leakiness. *J Gene Med* 6:817-828.
 3. Bäckman CM, Zhang Y, Hoffer BJ, Tomac AC (2004): Tetracycline-inducible expression systems for the generation of transgenic animals: a comparison of various inducible systems carried in a single vector. *J Neurosci Methods* 139:257-262.
 4. Bohl D, Naffakh N, Heard JM (1997): Long-term control of erythropoietin secretion by doxycycline in mice with engineered primary myoblast. *Nature Med* 3:299-305.
 5. Bohl D, Salvetti A, Moullier P, Heard JM (1998): Control of erythropoietin delivery by doxycycline in mice after intramuscular injection of adeno-associated vector. *Blood* 92: 1512-1517.
 6. Fitzsimons HL, McKenzie JM, During MJ (2001): Insulators coupled to a minimal bidirectional tet cassette for tight regulation of rAAV-mediated gene transfer in the mammalian brain. *Gene Ther* 8:1675-1681.
 7. Gossen M, Bujard H (1992): Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5547-5551.
 8. Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Müller G, Hillen W, Bujard H (1995): Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268:1766-1769.
 9. Kistner A, Gossen M, Zimmermann F, Jerecic J, Ullmer C, Lübbert H, Bujard H (1996): Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10933-10938.
 10. Klopotoska D, Strzadala L, Matuszyk J (2008): Inducibility of doxycycline-regulated gene in neural and neuroendocrine cells strongly depends on the appropriate choice of a tetracycline-responsive promoter. *Neurochemistry International* 52:221-229.
 11. Koo BC, Kwon MS, Kim T (2005): Regulation of GFP expression using the tetracycline inducible retroviral vector system. *Reprod Dev Biol* 29:57-62.
 12. Lamartina S, Roscilli G, Rinaudo CD, Sporeno E, Silvi L, Hillen W, Bujard H, Cortese R, Ciliberto G, Toniatti C (2002): Stringent control of gene expression *in vivo* by using novel doxycycline-dependent trans-activators. *Hum Gene Ther* 13:199-210.
 13. Lamartina S, Silvi L, Roscilli G, Casimiro D, Simon AJ, Davis M-E, Shiver JW, Rinaudo CD, Zampaglione I, Fattori E, Colloca S, Paz OG, Laufer R, Bujard H, Cortese R, Ciliberto G, Toniatti C (2003): Construction of an rtTA2^s-M2/tTS^{kid}-based transcription regulatory switch that displays no basal activity, good inducibility and high responsiveness to doxycycline in mice and non-human primates. *Mol Ther* 7:271-280.
 14. Mansuy IM, Bujard H (2000): Tetracycline-regulated gene expression in the brain. *Curr Opin Neurobiol* 10: 593-596.
 15. Mayford M, Bach ME, Huang Y.-Y, Wang L, Hawkins RD, Kandel ER (1996): Control of mammary formation through regulated-expression of a CaMK transgene. *Science* 274:1678-1683.
 16. Rossi FMV, Blau HM (1998): Recent advances in inducible gene expression systems. *Curr Opin Neurobiol* 9:451-456.
 17. Ryding ADS, Sharp MGF, Mullins JJ (2001): Conditional transgenic technologies. *J Endocrinol* 171:1-14.
 18. Sadowski I, Ma J, Triezenberg S, Ptashne M (1988): GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* 335:563-564.
 19. Salucci V, Scarito A, Aurisicchio L, Lamartina S, Nicolaus G, Giampaoli S, Gonzalez-Paz O, Toniatti C, Bujard H, Hillen W, Ciliberto G, Palombo F (2002): Tight control of gene expression by a helper-dependent adenovirus vector carrying the rtTA2(s)-M2 tetracycline transactivator and repressor system. *Gene Ther* 9:1415-21.
 20. Sipo I, Picó AH, Wang X, Eberle J, Petersen I, Weger S, Poller W, Fechner H (2006): An improved Tet-On regulatable FasL-adenovirus vector system for lung cancer therapy. *J Mol Med* 84:215-225.
 21. Smith-Arica JR, Morelli AE, Larregina AT, Smith J, Lowenstein PR, Castro MG (2000): Cell-type-specific and regulatable transgenesis in the adult brain: adenovirus-encode combined transcriptional targeting and inducible transgene expression. *Mol Ther* 2:579-587.
 22. Strathdee CA, McLeod MR, Hall JR (1999): Efficient control of tetracycline-responsive gene expression from an autoregulated bi-directional expression vector. *Gene* 229:21-29.
 23. Urlinger S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H, Hillen W (2000): Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7963-7968.
 24. Watsuji T, Okamoto Y, Emi N, Katsuoka Y, Hagiwara M (1997): Controlled gene expression with a reverse tetracycline-regulated retrovirus vector (RTRV) system. *Biochem Biophys Res Commun* 234:769-773.
 25. Yarranton GT (1992): Inducible vectors for expression in mammalian cells. *Curr Opin Biotechnol* 3:506-511.
 26. Zhu Z, Zheng T, Lee CG, Homer RJ, Elias JA (2002): Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal

- modeling. Cell Develop Biol 13:121-128.
27. Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ (1999):
Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. J Virol 73:2886-2892.
(접수일자: 2009. 3. 23 / 채택일자: 2009. 3. 26)