

## 형질전환생쥐의 제조 수단으로서 유전자 적중법 및 함정법의 개발 현황

강 해 목<sup>†</sup>

청주대학교 자연과학부 유전공학전공

### A Current Advance of Gene Targeting and Gene Trapping Methods As Tools of Making Transgenic Mice

Hae-Mook Kang<sup>†</sup>

Dept. of Genetic Engineering, College of Science and Engineering, Cheongju University, Chungbuk 360-764, Korea

**ABSTRACT** : The construction of transgenic mouse using embryonic stem (ES) cells has been crucial in the functional studies of gene on mouse genome. Gene knockout mice have been powerful for elucidating the function of genes as well as a research model for human diseases. Gene targeting and gene trapping methods have been the representative technologies for making the knockout mice by using ES cells. Since the gene targeting and the gene trapping methods were independently developed about 20 years ago, it's efficiency and productivity has been improved with a advance of molecular biology. Conventional gene targeting method has been changes to high throughput conditional gene targeting. The combination of the advantage of gene targeting and gene tapping elements allows to extend a spectrum of gene trapping and to improve the efficiency of gene targeting. These advance should be able to produce the mutant with various phenotype to target a certain gene, and in postgenome era they have served as crucial research tools in understanding the functional study of whole genome in mouse.

**Key words** : Transgenic mouse, Gene targeting, Gene trapping, Insertional mutagenesis, Embryonic stem (ES) cells.

**요 약** : 배아줄기세포를 이용한 형질전환동물의 제조는 유전자의 기능 연구에 필수적이다. 특히 유전자 파괴 생쥐는 유전자의 기능 연구뿐만 아니라 사람 질병 연구에 중요한 모델이 되어 왔다. 유전자 적중법(*gene targeting*)과 유전자 함정법(*gene trapping*)은 ES 세포에서 녹아웃(*knockout*) 생쥐를 제조하는 대표적인 방법이다. 20여 년 전 유전자 적중법과 함정법이 최초로 개발된 이후에 이 기술은 많은 변화를 거쳤다. 특히 상동재조합에 기초한 전통적 유전자 적중법은 대량 제조 기반의 조건부 유전자 적중법의 개발로 이어졌고, 유전자 적중법 및 유전자 함정법의 장점 요소의 조합은 유전자를 파괴하는 범위를 넓혔고, 유전자 적중을 더욱 효율적으로 만들었다. 이런 기술은 특정 유전자를 표적으로 하는 다양한 종류의 돌연변이 형질전환동물을 제조할 수 있게 하여 포스트게놈 시대에 요구되는 전체 유전체의 기능 연구를 더욱 효과적으로 진행시켜 줄 것이다.

## 서 론

최초의 유전자 적중법이 작용된 실험이 1987년에 행해진 이후에(Thomas & Capecchi, 1987), 이 방법은 지난 20여 년 동안 유전자 기능 연구를 가속화시켰고, 생물학 연구에 필요한 많은 종류의 재료를 공급하였다(Capecchi, 2001; Niwa, 2010). 유전자 적중법은 ES 세포 배양과 상동염색체 재조합

에 기반을 두고 있으며, 생쥐 유전체에 기능 상실(*loss-of-function*) 돌연변이를 도입하기 좋은 방법이다. 유전자 기능에 관한 연구의 가장 효율적인 방법은 해당 유전자를 파괴하고 전체 개체에서 표현형을 관찰하는 것이다. 유전자 적중법의 대체 기술로 개발된 유전자 함정법은 매우 효율적이면서도 무작위적인 돌연변이 유발 기법이다(Gossler et al., 1987; Kothary et al., 1988). 유전자 함정법은 유전자 적중법처럼 특정 유전자가 아니라 단시간 내에 많은 유전자를 파괴할 수 있다(Zambrowicz & Friedrich, 1988).

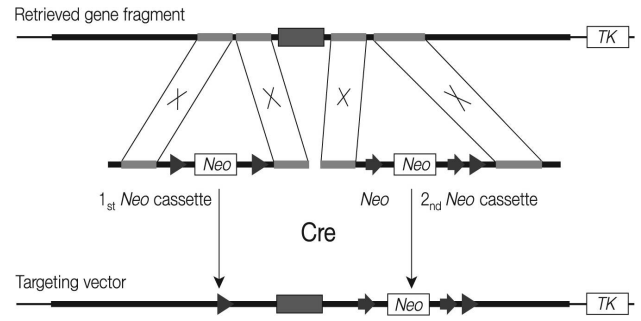
<sup>†</sup> 교신저자: 충청북도 청주시 상당구 대성로 568(내덕동), 청주대학교 이공대학 자연과학부 유전공학전공. (우) 360-764, (전) 043-229-8565, (팩) 043-229-8432, E-mail: hmkang@cju.ac.kr

이처럼 유전자 파괴(녹아웃) 생쥐를 제조하는 두 가지 주된 방법은 유전자 적중법과 유전자 함정법을 사용하는 것이다. 이런 면에서 생쥐 유전자의 연구는 사람 유전체 연구의 가장 완벽한 모델로서, 유전자가 파괴된 생쥐는 사람 질병의 좋은 모델이 되어 왔다(Austin et al., 1984; Brown & Hancock 2006; Niwa, 2010). 유전자 적중법과 유전자 함정법 기술의 조합은 생쥐의 모든 유전자를 파괴할 수 있도록 하였다. 그 동안 분자생물학적 기술의 향상은 이들 두 기술의 단점을 극복하여 보다 효율적으로 만들었다. 따라서 본 논문은 최근에 생쥐 유전자 파괴에 사용되는 유전자 함정과 유전자 적중의 기술이 어디까지 개발되어 왔는지를 살펴보고자 한다. 덧붙여 삽입돌연변이 유발 전략(insertional mutagenesis stratage)으로서 트랜스포존(transposon)의 사용과 같은 새로 개발된 기술이 기존의 방법에 어떻게 적용되는지를 살펴보고자 한다.

## 유전자 적중법

상동재조합에 기초한 유전자 적중법은 ES 세포에서 성공적으로 작동하였고(Thomas & Capecchi, 1987), 1989년에 이를 이용한 최초의 형질전환생쥐가 태어났다(Zijlstra et al., 1989). 유전자 적중법은 주로 특정 유전자의 파괴에 사용되어 왔고, 그리고 다른 종류의 변이, 즉 점돌연변이, Cre 재조합효소, 다른 외부 유전자의 도입 등에도 이용된다. 흔히 첫 번째의 녹아웃(knockout)에 대응하여 이 두 번째 방법은 녹인(knock-in)이라 부른다.

전통적 녹아웃(적중)백터는 양성선택표지(positive selection marker)로서 *Neo*(neomycin) 유전자와 음성선택표지(negative selection marker)로서 *TK*(thymidine kinase) 유전자를 사용한다(Manosour et al., 1988). 전기천공법(electroporation)으로 이 백터를 ES 세포에 삽입하면 표적백터와 ES 세포 유전체에 있는 동일한 서열 사이에 상동재조합이 일어나 표적유전자의 서열 일부는 *Neo*로 교체된다. 상동재조합으로 생성된 *Neo* 저항성 ES 세포만이 살아남고, 그리고 *TK*는 GANC(gancyclovir) 존재하에 무작위 삽입된 클론을 제거한다(Capecchi, 1989). 또 다른 음성선택표지로는 *DTA*(diphtheria toxin A)가 사용되었고, 이는 표적화된 클론을 효율적으로 농축시켜준다. 하지만 *DTA*는 ES 세포를 죽이고 추가적인 약물의 사용을 필요로 하지 않는 장점은 있지만, 이 약물의 사



**Fig. 1. A conditional gene targeting vector.** After retrieving the interest gene from BAC into a retrieval vector by homologous recombination in *E. coli*, a *Neo* cassette containing two *loxP* site is introduced into the retrieved DNA fragment. Next, the second cassette containing *Frt-Neo-Frt-loxP* is targeted to the DNA fragment by homologous recombination. Finally, the gene targeting vector is electroporated into ES cells, and clones with floxed exons produced with homologous recombination are selected. (Black arrow head: *loxP* site; Arrow: *Frt* site; Large Box: exon)

용은 백터 삽입에 앞서서 일시적인 발현에 의해 최소한 독성을 유발할 수 있다(McCarrick et al., 1993; Yagi et al., 1993). 양성-음성 선택 후에 ES 세포는 생쥐의 포배에 주입되어 키메라로 태어난다. 생식 계보가 ES 세포에서 유래된 경우에 이 키메라 생쥐가 정상 생쥐와 교배하면 표적유전자의 한 벌이 파괴된 이형접합생쥐가 태어난다.

파괴된 유전자가 배아 발생에 필수적이라면 전통적 적중법은 종종 배아의 죽음을 유발할 것이다. 이러한 문제점을 해결하기 위한 방법으로 *Cre-loxP* 또는 *FLP-Frt*와 같은 장소 특이적 재조합 체계에 의존하는 조건부 적중법(conditional targeting)이 개발되었다(Michael et al., 1999; Fig. 1). 조건부 녹아웃 생쥐의 제조는 두 계보의 생쥐, 즉 *loxP*와 인접한 필수 엑손을 가진 floxed 생쥐와 Cre(또는 FLP) 발현 생쥐를 필요로 한다. Cre 재조합효소는 특정한 세포 종류 또는 유도 시 특정 발생 시기에 발현된다. Cre 생쥐와 floxed 생쥐의 교배는 특정 시기의 특정 조직에서 *loxP* 인접 엑손의 결손을 유발한다. 지금까지 조건부 적중법으로 제조된 Cre 생쥐는 약 500 여 종류에 달한다(Nagy et al., 2009).

PCR은 표적유전자 백터의 제조에 가장 광범위하게 이용된다. 유전체 DNA에서 상동 팔(homologous arm)은 PCR 기법으로 증폭된 다음에 *Neo*와 *TK* 유전자를 가진 플라스미

드의 적당한 장소에 삽입하여 클로닝된다. Fig. 1에서 보여 주듯이 BAC 변형에 기초한 보다 효율적인 방법이 BAC를 가진 대장균에서 조건부 표적 DNA를 추출하는데 이용되고 있다(Copland et al., 2001; Liu et al., 2003). 이 방법은 BAC에서 플라스미드로 DNA 조각을 추출하는데 짧은 상동부위(약 200~300 bp)와 재조합체계에 의존한다. 동일한 방식으로 짧은 상동부위를 가진 선택카세트(selection cassette)가 추출된 DNA 조각을 표적으로 삼는다. 이는 표적벡터 제작에 필요한 시간과 노력을 줄여준다. 이 방법은 조건부 녹아웃벡터 제작에도 이용된다.

### 유전자 함정법

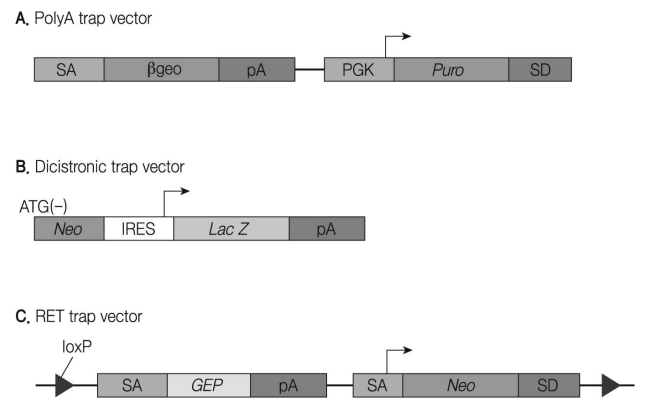
유전자 함정은 붙잡힌 유전자의 발현양상이 삽입장소의 근처에 있는 유전자의 전사조절요소에 의존하기 때문에 이 유전자의 발현양상을 탐지하기 위해 개발되었다(O'Kane & Gehring, 1987). 그 후에 이 벡터는 삽입이 된 다음 일부 변형이 일어나 해당 유전자의 돌연변이를 유발하는 것으로 알려졌다(Gossler et al., 1989; Friedrich & Soriano, 1991; Skannes et al., 1992). 함정벡터(trapping vector)는 보통 선택표지의 양쪽에 각각 SA(splice acceptor)와 polyA 신호를 가진 단위로 구성된다. 이 벡터를 생쥐 ES 세포에 주입하면 무작위로 유전체 속에 끼어 들어간다. 만일 벡터가 어떤 유전자의 인트론에 삽입되면 SA가 작용하여 해당 유전자의 엑손 상단부와 선택표지의 융합 전사체가 생성될 것이다. 그 결과, 해당 유전자는 절단된 단백질을 생성한다.

널리 사용되는 방법으로는 polyA 함정벡터가 있다(Fig. 2A). 선택표지로는 보통 *lacZ*( $\beta$ -galactosidase)와 *Neo*(neomycin-resistant) 유전자의 융합인  $\beta$  geo가 사용된다(Friedrich & Soriano, 1991). PolyA 함정벡터는 PGK 프로모터, *Puro*(puromycin-resistant gene) 및 SD(splice donor) 신호를 가진 제2의 카세트를 갖고 있다. 두 번째 선택카세트에 있는 polyA 서열이 SD로 교체되고, 전사는 내부적 polyA 신호에 의존한다. SD는 삽입된 유전자의 엑손 하단부와 *Puro*의 융합된 전사체를 형성하도록 작용한다. SD 신호의 앞쪽에는 삽입 장소의 엑손 하단부의 번역을 막기 위한 중지코돈이 위치한다. 이 서열은 3' RACE(3' rapid amplification cDNA ends PCR)에 의한 서열태그(sequence tag) 생성에도 이용된다. 삽입된 유전자의 정체는 서열태그를 생쥐 유전체의 알려진 유

전자와 비교검색함으로써 알 수 있다(Zambrowicz et al., 1998). 이 함정벡터는 PGK 프로모터가 ES 세포에서 활성이기 때문에 ES 세포에서는 발현되지 않은 유전자를 표적으로 한다(Niwa et al., 1993).

다른 방식의 벡터로는 내부적으로 번역 개시를 가능하게 해주는 IRES(internal ribosome entry site) 서열을 가진 encephalomyocarditis virus의 5' untranslated region(5'UTR)를 이용하여 만든 promoter-less *Neo*-5'NTR-*LacZ*-poly(A) 벡터이다(Fig. 2B; Kang et al., 1997). 이 dicistronic trap 벡터는 내재적 유전자의 엑손에 끼어 들어가면 해당 유전자의 단백질과 융합된 전사체가 만들어질 것이다. 올바른 번역틀로 끼어든 *Neo* 유전자는 선택 표지로 작동하고, 해당 유전자의 단백질은 절단되어 기능을 하지 못한다. 동시에 내부적 번역 개시장소를 가진  $\beta$ -galactosidase는 해당 유전자의 발현양상을 반영한다.

보다 효과적인 유전자 함정법은 polyA 함정벡터를 개선한 것이다(Fig. 2C). 표적이 되는 유전자를 완전히 파괴하기 위해 보다 강력한 SA와 polyA 신호가 사용되었다. 다른 변화로는 GFP 유전자의 도입으로 더 쉽게 발현을 추적할 수 있도록 하였다. 무엇보다도 가장 중요한 향상은 벡터 끝에 *loxP* 장소의 도입이다. 이 벡터로 만든 돌연변이에서 만일



**Fig. 2. Gene trap vectors for insertional mutagenesis. A: PolyA trap vector consists of two units.** The first unit has a splice acceptor (SA) sequence,  $\beta$  geo and polyA (pA) signal.  $\beta$  geo as a reporter and a selection marker is the fusion gene of *Neo* and *Lac Z* gene. The second unit contains a PGK promoter, *Puro* and a splice donor (SD) signal. B: Dicistronic trap vector consists of promoterless *Neo* without ATG codon, IRES, *Lac Z* and pA signal. C: RET trap vector contains *GFP* as a reporter and is flanked by 2 *loxP* site for Cre recombinase.

Cre 효소가 이 벡터를 제거한 후에 표현형이 회복되는 경우에 해당 유전자의 기능 확인이 가능하다. 이 방법은 RET(removable exon trap)라 부른다(Araki et al., 1999; Ishida & Leder 1999).

개선된 2세대 polyA 함정벡터는 ES 세포에서 발현되지 않은 유전자를 표적으로 하는 데 효과적이다. 하지만 최근에 이 벡터는 유전자의 마지막 인트론을 선호하는 것으로 밝혀졌다. 그래서 불잡힌 유전자는 종종 부분적인 기능을 갖고 있고, 이 현상은 NMD(nonsense-mediated mRNA decay)에 의해 유발되는 것으로 알려졌다. 이 문제를 해결하기 위해 SD 서열 앞쪽에 3개의 개시코돈과 IRES이 삽입되는 방식으로 변형되었고, 이는 UPATrap이라 부른다(Shigeoka et al., 2005).

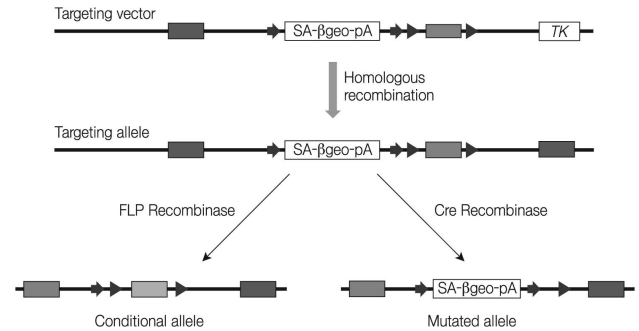
### 유전자 적중법과 함정법의 장단점

유전자 함정법은 대량으로 돌연변이를 유발하지만 모든 유전자를 파괴하는데 불충분하다. 최근의 자료에 따르면 유전자 함정법으로 개발된 ES 세포계보의 수는 알려진 생쥐 전체 유전자의 수보다 훨씬 많지만, 불잡힌 유전자의 수는 전체의 50~70%에 불과한 것으로 추정되고 있다. 일부 벡터는 하나의 유전자에 한 번 이상 끼어들어 갔고, 다른 벡터는 비암호화 부위에 삽입되었다(Abuin et al., 2007; Schnutgen et al., 2008). 많은 연구에서 함정벡터의 편향성과 염색체상의 일부 비삽입 유전체 부위가 불들리지 않는 것으로 밝혀졌다(Austin et al., 2004; Schnutgen et al., 2008). 가끔씩 대체 짜깁기가 일어나 적은 양의 정상 전사체, 즉 정상 하위대립 유전자(hypomorphic allele)가 만들어진다. 정상 하위대립 유전자는 단백질 또는 단백질 영역의 기능에 대한 정보 획득에 유용하다(Lee et al., 2007).

유전자 적중법은 특정 유전자를 파괴하고 거의 모든 생쥐 유전자에서 매우 효과적인 것으로 알려져 있다(Austin et al., 2004). 하지만 이 기술은 시간이 많이 걸리고 고도의 전문가적 숙련도를 요구한다. 현재 기술로는 유전자 적중법이나 유전자 함정법 단독으로는 생쥐의 모든 유전자를 파괴할 수 없다. 따라서 이러한 기술과 특징의 조합이 시도되어 왔다.

### 유전자 적중법 및 함정법 요소의 조합

전통적 녹아웃과 조건부 녹아웃은 조작방식에서 상당히 다



**Fig. 3. Conditional targeted trapping method.** Homologous recombination in ES cells leads to an insertional mutation similar to gene trapping. FLP recombinase induces the deletion of a selection cassette including the trapping elements to generate a conditional allele. Cre recombinase yields the deletion of critical exon like in a conventional knockout.

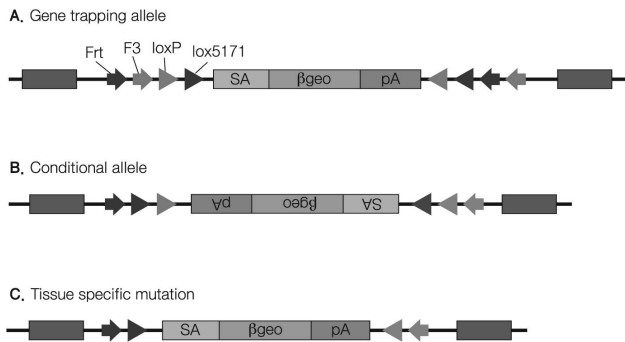
르다. 조건부 녹아웃은 ES 세포에서 유전자를 온전히 둔 채로 생쥐의 일부 조직에서 엑손을 삭제한다. 최근에 유전자 함정벡터의 일부 요소를 가진 새로운 종류의 적중벡터가 개발되었다(Fig. 3). 이 벡터를 사용하면 한 번의 적중 조작으로 유전자 함정, 전통적 적중 녹아웃 그리고 조건부 녹아웃 돌연변이를 만들 수 있다(Testa et al., 2004; Friedel et al., 2007). 이 방법은 적중함정법(targeted trapping)이라 부른다.

적중함정벡터는 선택표지인 *Neo*가 함정법 요소인 SA, β geo 및 polyA로 교체된 점만 제외하면 조건부 녹아웃벡터와 유사하다. 이 벡터를 ES 세포에 전달하면, 상동재조합이 유전자 적중법의 결과와 닮은 삽입돌연변이를 유도한다. 선택카세트의 양 옆에 두 *Frt* 장소가 있기 때문에 ES 세포의 FLP 재조합효소가 함정법의 선택카세트를 제거하고 조건부 대립 유전자를 생성한다. 그런 다음에 ES 세포의 Cre 재조합효소가 전통적 녹아웃처럼 중요 엑손의 제거를 유도한다. 그러면 다목적 돌연변이가 한 번의 적중 조작으로 생성되는 것이다. 적중함정법의 단점은 β geo 선택표지가 프로모터를 갖고 있지 않기 때문에 ES 세포에서 발현되는 유전자에만 적용이 가능하다. 이를 극복하기 위해 ES 세포에서 활성인 강력한 프로모터가 β geo 선택카세트의 하단부에 삽입되었다. 그 결과, 새로 만든 벡터는 ES 세포에 발현하지 않는 모든 유전자에도 적용할 수 있다(Friedel et al., 2007).

조건부 함정법(conditional gene trapping)은 배아의 치사돌연변이를 우회하지만 전 과정은 시간과 경비가 많이 들고 기

술적으로도 어렵다. 유전자 함정법은 돌연변이를 대량으로 만들지만 종종 배아의 치사를 유발한다. 이를 개선한 조건부 유전자 함정법이란 새로운 기술이 개발되었다(Fig. 4) 이 방법은 두 동형 표적 장소 사이의 DNA 조각을 뒤집기 위해 두 쌍의 서로 다른 재조합효소 표적장소를 사용한다(Schnutgen & Ghyselinck, 2007; Schnutgen et al., 2008).

조건부 함정벡터는 함정에 필요한 리포터 선택카세트를 갖고 있고, 이 카세트는 반대방향으로 네 쌍의 장소 특이적 재조합효소 장소가 인접해 있다. *Frt*와 *F3*은 FLP 재조합효소를 위한 두 표적장소이고, *loxP*와 *lox5171*은 각각 Cre 재조합효소의 표적장소이다. 이 벡터는 핵산전달 후 함정벡터와 유사하게 유전자의 인트론에 삽입된다. SA를 가진 내재 유전자의 상단부 엑손은 선택표지와 함께 융합 전사체를 형성하고 그리고 하단부 엑손의 전사는 종결된다. 이는 유전자 함정법과 닮은 삽입돌연변이이다. 여기서 유전자가 파괴된 ES 세포를 사용하여 녹아웃 생쥐를 만들거나 또는 ES 세포 수준에서 이 돌연변이 대립유전자를 조건부 대립유전자로 바꿀 수 있다. 조건부로 파괴된 대립유전자를 만들기 위해서는 ES 세포에서 FLP 재조합효소를 일시적으로 발현시킬 수 있다. 그러면 FLP가 *Frt* 또는 *F3* 장소를 통해 벡터의 리포터 카세트를 뒤집을 수 있다(Fig. 4B). 이 대립유전자는 SA가 전사방향의 먼 쪽에 위치하기 때문에 비돌연변이 유발성이다.



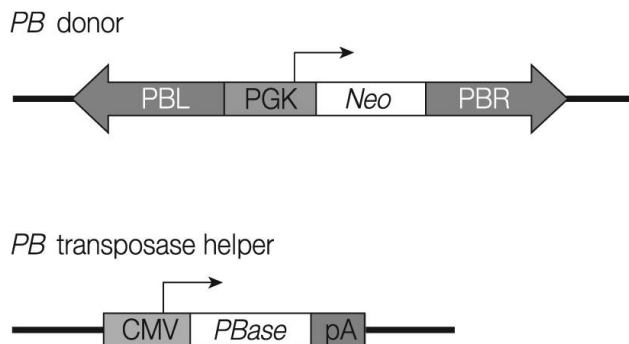
**Fig. 4. Conditional gene trapping method.** A: After insertion in ES cell, the trapped allele has a selection reporter cassette with four pairs of site-directed recombinase site. B: Conditional allele generated by FLP recombinase has a reversed selection cassette. This is non-mutagenic because the SA signal is ineffective in producing a fusion transcript. C: Tissue specific mutation induced by Cre recombinase. The trapping vector is reinverted and results in a conditional mutation.

이 조건부 대립유전자를 가진 생쥐 계보는 위의 ES 세포로부터 만들 수 있다. 이 생쥐를 다른 조직 특이적 Cre 재조합효소를 가진 생쥐와 교배함으로써 함정벡터는 *loxP* 또는 *lox5171* 장소를 통해 다시 뒤집어진다(Fig. 4C). 함정벡터를 가진 유전자는 SA가 전사와 같은 방향에 위치하기 때문에 Cre 재조합효소를 가진 일부 조직에서만 녹아오른다. 약간 변형된 방법으로 이 조건부 함정벡터의 상단부 *Frt*와 *F3* 사이에 OPE(osteoponin enhancer element)를 삽입하는 방식으로 잘 발현되지 않는 유전자에 적용할 수 있다. OPE는 삽입된 유전자의 발현을 활성화하기 위해 전사인자의 결합장소를 제공한다(Schnutgen et al., 2008).

### 녹아웃 생쥐에서 삽입 수단으로서 트랜스포존

트랜스포존(transposon; 전이요소)은 생쥐 유전자의 돌연변이 유발에 널리 사용되고 있다(Duppy et al., 2001; Ivics & Izsvak, 2004). 특히 *piggyBack(PB)* 트랜스포존은 전이효소(transposase)를 통해 원래 장소에서 절단된 후에 유전체 사이의 새로운 장소로 스스로 삽입된다(Bestor, 2005; Calson et al., 2005). *PB*는 원래 양배추 나방인 *Trichoplusia ni*의 유전체에서 유래하였고, *PB* 유래 벡터는 포유류 유전체의 돌연변이 유발에 효과적이다. *PB* 요소는 13 bp ITR(inverted terminal repeat)와 전이효소 유전자로 구성되어 있다. 안정된 돌연변이와 재전이를 막기 위해 ‘이중핵산전달체계(binary co-transfection system)’가 개발되었다(Ding et al., 2005). Fig. 5에서 보여주듯이, 이 체계는 공여와 도움 벡터로 구성된다. 공여벡터는 *PB* 요소를 갖고 있고, 이는 *PB* 전이효소가 돌연변이를 유발하고, 서열태그를 얻는데 필요한 요소로 바꾸어 준다. 도움벡터는 *PB* 전이효소를 갖고 있지만 전이에 필요한 두 말단 서열이 없다. ES 세포에 두 벡터를 동시에 핵산전달하면 트랜스포존은 공여벡터에서 절단되어 나와 도움벡터의 전이효소에 의해 유전체로 재삽입된다. 이런 방식으로 생쥐 유전체의 70%에 해당하는 10,000 돌연변이가 생쥐가 만들어졌다(Sun et al., 2008).

다른 트랜스포존 체계와 비교할 때 *PB*는 생쥐 유전체에서 고효율의 전이를 보여준다. 덧붙여 *PB*는 일부 서열에 편향을 보이지 않고 그리고 *PB* 트랜스포존은 생쥐 유전체를 균일하게 파괴하는 것으로 보인다(Sun et al., 2008). 최근에 *PB* 기반의 또 다른 벡터가 개발되어 14,000 종류의 유전자



**Fig. 5. Insertional mutagenesis vector using PiggyBac transposon.** This vector consists of two vectors. *PB* donor has two repeated termini, PBL and PBR for transposition. *PB* helper provides *PB* transposase. PGK and CMV represent the promoter of respective gene.

합점 클론을 만들었다. 이 벡터는 공여벡터의 프로모터를 SA로 교체하고 *Cre-loxP* 재조합체계를 추가하였다(Wang et al., 2009).

*PB* 벡터는 유도 조건하에서 *PB* 전이효소에 의해 유전체에서 재이동할 수 있다. *PB* 전이효소를 일시적으로 발현시키면 *PB* 벡터는 삽입된 장소에서 정확하게 빠져나와 다른 장소에 다시 삽입된다. 이러한 특징은 유전형/표현형 상관관계를 결정하게 해주고 그리고 재삽입은 새로운 돌연변이 대립유전자를 생성시킨다. *Cre-loxP*와 결합된 *PB* 트랜스포존은 *loxP* 장소를 생쥐 유전체에 삽입시키기 때문에 대규모의 염색체 결손과 재배열의 유발에 사용된다(Wu et al., 2007). 따라서 *PB* 트랜스포존은 어떤 서열에도 편향성을 갖지 않고 생쥐 유전체에서 고효율로 전이를 일으키기 때문에 *PB* 기반의 합점벡터는 전통적 합점법 기반의 돌연변이 유발에 매우 유용한 것 같다.

### 유전자 적응을 용이하게 하는 삽입돌연변이 라이브러리

생거연구소(Sanger Institute)의 MICER(Mutagenic Insertion and Chromosome Engineering Resource)는 삽입돌연변이, 대규모 결손, 역위 그리고 중복을 빠르고 쉽게 만들 수 있게 해 주었다. 여러 유전체 조각을 두 종류의 파지벡터에 연결하는 방식으로 두 종류의 라이브러리를 제조하였다. 이들 벡터는 생쥐 ES 세포에서 양성 삽입 선택에 이용되는 서

로 다른 항생제를 갖고 있다. 벡터는 직선이 된 후에 상동재조합으로 또는 유전체 DNA 조각에 틸을 만드는 방식으로 생쥐 유전체에 삽입된다. 이러한 삽입은 보통 상동부위의 중복을 유발하기 때문에 그 결과 틀이동 돌연변이를 유발한다(Zheng et al., 1999).

대규모의 결손 또는 역전을 유발하기 위해 두 종류의 라이브러리(library)가 제조된다. 한 라이브러리는 3' *hprt*(hypoxanthine phosphoribosyl transferase) 라이브러리이고, 다른 것은 5' *hprt* 라이브러리이다. 각각에서 유전체에 도입된 두 *loxP* 장소가 같은 방향인 경우에 대규모의 결손을, 그리고 다른 방향인 경우에 역위 유발에 사용된다(Yu & Bradly, 2001). 완전한 *hprt* 내성유전자는 두 *hprt* 조각에서 생성되고, 그리고 이는 ES 세포를 골라내는데 이용된다. *Hprt* 양성 클론은 HAT(hypoxanthine, aminopterin and thymidine) 배양액에서 선택된다(Szybalski, 1992).

### 유전자의 기능 연구를 위한 다른 방법

유전자 적응법과 유전자 합점법의 보완으로 다른 유전학적 방법이 유전자의 기능 연구에 사용된다. ENU(N-ethyl-N-nitrosourea)는 화학적 돌연변이 유발원이다. ES 세포에 ENU의 처리는 유전체 점돌연변이를 무작위로 유발한다(Vivian et al., 2002). ENU로 돌연변이시킨 ES 세포 클론으로 구성된 ENU 라이브러리를 만들 수 있다. ENU 라이브러리는 일련의 침묵, 미스센스, 넌센스 대립유전자 및 짜깁기장소 돌연변이를 제공하여 유전자의 다양한 돌연변이 효과를 조사할 수 있다.

TILLING(Targeting Induced Local Lesion in Genomics)는 특정 유전자의 돌연변이를 확인하기 위한 heteroduplex 분석을 사용하는 방법이다(Henikoff et al., 2004). 유전체에서 특정 유전자의 프라이머를 사용하여 PCR로 해당 유전자를 증폭하여 화학적 돌연변이된 클론을 수집한다. 증폭된 정상형과 돌연변이 서열은 적절한 조건하에서 heteroduplex(미스매치장소, 점돌연변이)를 형성한다. Heteroduplex의 존재는 핵산내부 가수분해효소 처리 후 서열결정 겔에서 전기영동으로 확인된다. 표적유전자의 돌연변이를 찾기 위해 ENU 돌연변이 유발과 TILLING 검색을 조합한 보고가 있다. 이러한 접근은 유전자에서 다양한 돌연변이 효과를 조사하는 일련의 돌연변이 대립유전자 검색에 유용하다(Glaser et al., 2005).

## 전 망

유전자 적중법 및 유전자 함정법을 이용한 형질전환생쥐의 제조는 개체 수준에서 유전자의 기능을 연구할 수 있는 수단을 제공해 준다(Capecchi, 2001). 포스트게놈 시대에 다양한 표현형을 가진 돌연변이 생쥐는 포유류 유전자의 기능을 밝히는 중요한 연구 도구로 이용되고 있다(Zambrowicz & Friedrich 1998; Austin et al., 2004). 특정 유전자를 파괴함으로써 발생, 물질대사, 신경계, 세포 자살 및 암에서 이 유전자의 다양한 기능이 규명될 것이다. 유전자 파괴의 대량제조 전략으로써 유전자 함정법은 새로운 암호화 서열과 삽입장소에 인접한 유전자 발현 정도와 같은 독특한 목적에 응용될 것이다.

특히 녹아웃 생쥐 유전자는 의학 연구에서 새로운 장을 열었다. 이 생쥐는 인간 질병에 대한 우수한 모델로서 질병의 기작을 규명하고 새로운 치료 표적의 개발에 이용되고 있다(Hacking, 2008). 덧붙여 생쥐를 사용한 유전자 기능의 해독은 약학 산업에 엄청난 기회를 제공하고 있다.

새로운 기술의 진보와 시약의 사용은 분자유전학과 발생유전학 분야에 큰 발전을 이루어왔다. 이는 엄청난 비용과 많은 시간을 절약시켜 줄 것이다. 유전자 함정법과 결부된 트랜스포존 및 OPE의 사용은 표적화된 생쥐 돌연변이 제조를 더욱 가속화시켜 주고 있다. 표적화된 함정과 조건부 함정은 한 가지 접근 방법의 단점을 극복하는 유전자 적중법과 함정법의 이점을 제공할 것이다. 하지만 함정 녹아웃에 의존하는 유전체의 연구는 만족스럽지 못하고 동시에 표적화된 생쥐의 대량 제조는 여전히 어렵다. 그럼에도 불구하고 표적화시킨 형질전환생쥐를 만드는 효율적인 기술의 개발은 상당한 진보를 이루었지만, 돌연변이 생쥐의 기능 해독은 여전히 많은 연구를 필요로 하고 있다.

## 감사의 글

이 논문은 2010학년도에 청주대학교 산업과학연구소가 지원한 학술연구조성비(특별연구과제)에 의해 연구되었습니다.

## 인용문헌

Abuin A, Hansen GM, Zambrowicz B (2007) Gene trap

mutagenesis. *Handb Exp Pharmacol* 178:129-147.

Araki K, Imaizumi T, Sekimoto T, Yoshinobu K, Yoshimuta J, Akizuki M, Miura K, Araki M, Yamamura K (1999) Exchangeable gene trap using the Cre/mutated lox system. *Cell Mol Biol* 45:737-750.

Austin CP, Battey JF, Bradley A, Bucan M, Capecchi M, Collins FS, Dove WF, Duyk G, Dymecki S, Eppig JT, Grieder FB, Heintz N, Hicks G, Insel TR, Joyner A, Koller BH, Lloyd KC, Magnuson T, Moore MW, Nagy A, Pollock JD, Roses AD, Sands AT, Seed B, Skarnes WC, Snoddy J, Soriano P, Stewart DJ, Stewart F, Stillman B, Varmus H, Varticovski L, Verma IM, Vogt TF, von Melchner H, Witkowski J, Woychik RP, Wurst W, Yancopoulos GD, Young SG, Zambrowicz B (2004) The knockout mouse project. *Nat Genet* 36: 921-924.

Bestor TH (2005) Transposons reanimated in mice. *Cell* 122:322-325.

Brown SD, Hancock JM (2006) The mouse genome. *Genome Dyn* 2:33-45.

Capecchi MR (1989) Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244:1288-1292.

Capecchi MR (2001) Generating mice with targeted mutations. *Nat Med* 7:1086-1090.

Carlson CM, Frandsen JL, Kirchhof N, McIvor RS, Largaespada DA (2005) Somatic integration of an oncogene-harboring sleeping beauty transposon models liver tumor development in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:17059-17064.

Copeland NG, Jenkins NA, Court DL (2001) Recombinering: A powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat Rev Genet* 2:769-779.

Ding S, Wu X, Li G, Han M, Zhuang Y, Xu T (2005) Efficient transposition of the *piggyBac* (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell* 122:473-483.

Dupuy AJ, Fritz S, Largaespada DA (2001) Transposition and gene disruption in the male germline of the mouse. *Genesis* 30:82-88.

Friedel RH, Plump A, Lu X, Spilker K, Jolicoeur C, Wong

- K, Venkatesh TR, Yaron A, Hynes M, Chen B, Okada A, McConnell SK, Rayburn H, Tessier-Lavigne M (2005) Gene targeting using a promoterless gene trap vector ("targeted trapping") is an efficient method to mutate a large fraction of genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:13188-13193.
- Friedrich G, Soriano P (1991) Promoter traps in embryonic stem cells: A genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes & Development* 5: 1513-1523.
- Gossler A, Joyner AL, Rossant J, Skarnes WC (1989) Mouse embryonic stem cells and reporter constructs to detect developmentally regulated genes. *Science* 244: 463-465.
- Glaser S, Anastassiadis K, Stewart AF (2005). Current issues in mouse genome engineering. *Nat Genet* 37: 1187-1193.
- Hacking DF (2008) "Knock, and it shall be opened": Knocking out and knocking in to reveal mechanisms of disease and novel therapies. *Early Hum Dev* 84: 821-827.
- Henikoff S, Till BJ, Comai L (2004) TILLING. Traditional mutagenesis meets functional genomics. *Plant Physiol* 135:630-636.
- Ishida Y, Leder P (1999) RET: A poly A-trap retrovirus vector for reversible disruption and expression monitoring of genes in living cells. *Nucleic Acids Res* 27:e35.
- Ivics Z, Izsvak Z (2004) Transposable elements for transgenesis and insertional mutagenesis in vertebrates: A contemporary review of experimental strategies. *Methods Mol Biol* 260:255-276.
- Kang HM, Kang NK, Kim DG, Shin HS (1997) Dicistronic tagging of genes active in embryonic stem cells of mice. *Mol Cells* 7: 502-508.
- Kothary R, Clapoff S, Brown A, Campbell R, Peterson A, Rossant J (1988) A transgene containing *lacZ* inserted into the dystonia locus is expressed in neural tube. *Nature* 335:435-437.
- Lee T, Shah C, Xu EY (2007) Gene trap mutagenesis: A functional genomics approach towards reproductive research. *Mol Hum Reprod* 13:771-779.
- Liu P, Jenkins NA, Copeland NG (2003) A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Res* 13:476-484.
- Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR (1988) Disruption of the protooncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: A general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336:348-352.
- McCarrick JW III, Parnes JR, Seong RH, Solter D, Knowles BB (1993) Positive-negative selection gene targeting with the diphtheria toxin A-chain gene in mouse embryonic stem cells. *Transgenic Res* 2:183-190.
- Michael SK, Brennan J, Robertson EJ (1999) Efficient gene-specific expression of cre recombinase in the mouse embryo by targeted insertion of a novel IRES-Cre cassette into endogenous loci. *Mech Dev* 85:35-37.
- Nagy A, Mar L, Watts G (2009) Creation and use of a cre recombinase transgenic database. *Methods Mol Biol* 530:1-4.
- Niwa H (2010) Mouse ES cell culture system as a model of development. *Develop Growth Differ* 52:275-283.
- Niwa H, Araki K, Kimura S, Taniguchi S, Wakasugi S, Yamamura K (1993) An efficient gene-trap method using poly A trap vectors and characterization of gene-trap events. *J Biochem* 113:343-349.
- O'Kane CJ, Gehring WJ (1987) Detection *in situ* of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9123-9127.
- Schnutgen F, Ghyselinck NB (2007) Adopting the good reFLEXes when generating conditional alterations in the mouse genome. *Transgenic Res* 16:405-413.
- Schnutgen F, Hansen J, De-Zolt S, Horn C, Lutz M, Floss T, Wurst W, Noppinger PR, von Melchner H (2008) Enhanced gene trapping in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 36:e133.
- Shigeoka T, Kawaichi M, Ishida Y (2005) Suppression of nonsense-mediated mRNA decay permits unbiased gene trapping in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids*



Res 33:e20.

- Skarnes WC, Auerbach A, Joiner AL (1992) A gene trap approach in mouse embryonic stem cells: The *lacZ* reporter is activated by splicing, reflects endogenous gene expression, and is mutagenic in mice. *Genes & Development* 6:903-918.
- Sun LV, Jin K, Liu Y, Yang W, Xie X, Ye L, Wang L, Zhu L, Ding S, Su Y, Zhou J, Han M, Zhuang Y, Xu T, Wu X, Gu N, Zhong Y (2008) PBmice: An integrated database system of *piggyBac* (*PB*) insertional mutations and their characterizations in mice. *Nucleic Acids Res* 36:D729-734.
- Szybalski W (1992) Use of the HPRT gene and the HAT selection technique in DNA-mediated transformation of mammalian cells: First steps toward developing hybridoma techniques and gene therapy. *Bioessays* 14: 495-500.
- Testa G, Schaft J, van der Hoeven F, Glaser S, Anastasiadis K, Zhang Y, Hermann T, Stremmel W, Stewart AF (2004) A reliable *lacZ* expression reporter cassette for multipurpose, knockout-first alleles. *Genesis* 38:151-158.
- Thomas KR, Capecchi MR (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51:503-512.
- Vivian JL, Chen Y, Yee D, Schneider E, Magnuson T (2002) An allelic series of mutations in *Smad2* and *Smad4* identified in a genotype-based screen of N-ethyl-N-nitrosourea-mutagenized mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15542-15547.
- Wang W, Bradley A, Huang Y (2009) A piggyBac transposon-based genome-wide library of insertionally mutated *Blm*-deficient murine ES cells. *Genome Res* 19:667-673.
- Wu S, Ying G, Wu Q, Capecchi MR (2007) Toward simpler and faster genome-wide mutagenesis in mice. *Nat Genet* 39:922-930.
- Yagi T, Nada S, Watanabe N, Tamemoto H, Kohmura N, Ikawa Y, Aizawa S (1993) A novel negative selection for homologous recombinants using diphtheria toxin A fragment gene. *Anal Biochem* 214:77-86.
- Zambrowicz BP, Friedrich GA (1998) Comprehensive mammalian genetics: History and future prospects of gene trapping in the mouse. *Int J Dev Biol* 42:1025-1036.
- Zambrowicz BP, Friedrich GA, Buxton EC, Lilleberg SL, Person C, Sands AT (1998) Disruption and sequence identification of 2,000 genes in mouse embryonic stem cells. *Nature* 392:608-611.
- Zheng B, Mills AA, Bradley A (1999) A system for rapid generation of coat color-tagged knockouts and defined chromosomal rearrangements in mice. *Nucleic Acids Res* 27:2354-2360.
- Zijlstra M, Bix M, Simister NE, Loring JM, Raulet DH, Jaenisch R (1990)  $\beta 2$ -microglobulin deficient mice lack CD4<sup>-</sup>8<sup>+</sup> cytotoxic T cells. *Nature* 344: 742-746.

---

(received 19 November 2010, received in revised form 30 November 2010, accepted 1 December 2010)