

## Phosphoprotein Enriched in Astrocytes 15 (PEA15)가 과발현하는 형질전환 돼지의 생산

이휘철<sup>†</sup> · 김현미 · 이승훈 · 오건봉 · 정학재 · 양병철 · 김경운 · 이풍연 · 박진기 · 장원경  
농촌진흥청 국립축산과학원

## Production of a Transgenic Pig Overexpressing Phosphoprotein Enriched in Astrocytes 15 (PEA 15)

Hwi-Cheul Lee<sup>†</sup>, Hyun-Mi Kim, Seunghoon Lee, Keon-Bong Oh, Hak-Jae Chung,  
Byong-Chul Yang, Kyung-Woon Kim, Poongyeon Lee, Jin-Ki Park and Won-Kyong Chang  
National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

### ABSTRACT

The overexpression of Phosphoprotein Enriched in Astrocytes (PEA15) gene is commonly found in human diabetic patients. The overexpression of this gene in skeletal muscle and fat tissues have been reported to cause insulin resistance, thereby impairing insulin stimulated glucose uptake. We introduced a gene of mouse PEA15 (mPEA15) and enhanced green fluorescent protein (EGFP) into fertilized one cell pig zygotes using microinjection, and produced a piglet that showed overexpression of mPEA15 in the muscle tissues and expression of EGFP in the ear tissues and hooves. RT-PCR RFLP, southern blot and FISH analysis showed that the tissues carried the transgene. Real-time RT-PCR and western blots demonstrated that PEA15 gene was overexpressed in the various tissues and muscle tissues, respectively. These facts suggest that expression vector system is normally expressed in the transgenic (TG) pigs. To use as animal diseases model for type 2 diabetes, further study is necessary to confirm whether diabetes occur in these TG pigs, especially insulin resistance.

(Key words : PEA15, Transgenic pig, Diabetes, Gene expression)

### 서 론

Phosphoprotein enriched in astrocytes 15 (PEA15) 또는 phosphoprotein enriched in diabetes (PED)는 다양한 조직에서 광범위하게 발현되고 포유류 사이에서 고도로 잘 보존되어져 있는 15 kDa의 세포질 단백질이다 (Danziger 등, 1995; Estelles 등, 1996; Ramos 등, 2000). PEA15 단백질은 N-말단에 단백질-단백질 상호 작용 영역인 death effector domain (DED) 및 nuclear export sequence (NES) 영역과 C-말단에 Ser104 및 Ser116의 인산화 부위를 가지며, 각각 Protein kinase C (PKC) 및 Calcium-calmodulin Kinase II (CaMK II)에 의해 인산화된다 (Kubes 등, 1998; Trecia 등, 2003). 또한, 이 단백질은 다양한 메카니즘을 통하여 몇몇의 세포사멸 경로를 저해하고, 종양 발달 및 antineoplastic제에 대한 감수성에 있어 중요한 역할을 한다(Condorelli 등, 1999; Condorelli 등, 2002; Trecia 등, 2003; Xiao 등, 2002). 한편, Condorelli 등 (1998)

은 differential display법을 이용하여 PEA15 유전자가 제 2형 당뇨병 환자에서 과발현되는 사실을 발견했고, 이 단백질의 과발현은 insulin-stimulated glucose transport와 당 수송체인 GLUT4의 막으로의 이동에 손상을 끼쳐 세포내 당 유입을 감소시킴으로써 인슐린 저항성이 발생한다는 것을 밝혔다. 게다가 Vigliotta 등 (2004)은 PEA15 유전자가 과발현되는 형질전환 마우스를 제작하여 전형적인 제2형 당뇨병 환자에서 볼 수 있는 인슐린 저항성을 관찰하였고, 최종적으로 PEA15 단백질의 과발현이 PKC  $\zeta/\lambda$ 의 활성을 억제시켜 GLUT4가 세포막으로의 이동을 저해한다고 제안했다.

제1형 당뇨병은 모든 당뇨병의 경우 10%에 해당하는 반면, 제2형 당뇨병은 90%에 해당하는 가장 일반적인 형태의 당뇨병이다. 주로 소아기 또는 사춘기의 정상체중 혹은 야윈 사람에게서 발병하는 제1형 당뇨병에 반해, 제2형 당뇨병은 약 40세 이후 과체중인 사람에게서 두드러지게 발병되며, 최근에는 젊은 환자들도 증가하는 추세이다(Expert Committee on the Diagnosis and Classifica-

\* 본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업 (과제번호: PJ007181)의 지원에 의한 것임.

<sup>†</sup> Corresponding author : Phone: +82-31-290-1626, E-mail: hclee@korea.kr

tion of Diabetes Mellitus, 2003). 이러한 변화는 당뇨병에 대한 새로운 치료제의 개발에도 가속을 가했으며, 아울러 당뇨 질환의 병인 및 병리학적 연구를 위한 적절한 당뇨 질환 모델 동물의 개발도 지속적으로 이루어졌다(Larsen과 Rolin, 2004; Lunney, 2007; Prather 등, 2003). 특히 형질전환 기술의 발전은 사람과 질환의 진행 과정이 유사한 동물의 생산을 가능하게 하였다(Prather 등, 2003). 일반적으로 제1형 및 2형 당뇨병의 모델 동물로써는 랫트나 마우스를 주로 사용하고 있지만, 대부분 streptozotocin이나 alloxan 등에 의한 외과적 처리나 선택적인 육종에 의해 당뇨병의 표현형을 도출했다 (Junod 등, 1969; Lenzen과 Paten, 1988). 하지만, 종종 설치류와 같은 소동물의 질환모델 동물들은 적절하게 사람의 생리학적 조건을 충분히 반영하지 못하였다 (Lunney, 2007). 이에 반해, 돼지는 해부학적 및 생리학적으로 인간과 매우 유사하며 새로운 치료제 및 치료법의 개발에 유용하게 이용될 것이다 (Larsen과 Rolin, 2004; Lunney, 2007).

최근 Watanabe 등 (2007)과 Yamagata 등 (2002)은 hepatocyte nuclear factor (HNF)-1 $\alpha$  변이체의 형질전환 마우스를 이용하여 제3형 청년기 발병 당뇨병 (Type 3 form of Maturity-Onset Diabetes of the Young, MODY3)의 원인을 증명하였고, Umeyama 등 (2009)은 이를 이용한 형질전환 돼지를 생산하여 당뇨 질환 모델로써의 이용 가능성을 시사하였다.

한편, 외과적 처리에 의한 몇몇의 당뇨 질환 모델 돼지 (Larsen 등, 2002; Murakami 등 2007)는 보고되고 있으나, 특히 형질전환 기법을 이용한 제2형 당뇨 질환 모델 돼지의 생산에 대한 시도는 없는 실정이다. 본 연구의 목적은 제2형 당뇨 질환 모델 돼지를 생산하기 위해서 mPEA15 유전자가 과발현되는 벡터 시스템을 유전자 미세 주입법에 의해 도입시켜 목적의 유전자가 과발현되는 형질전환 돼지를 생산하는 것이다.

## 재료 및 방법

### 미세 주입용 유전자 준비

Chicken  $\beta$ -actin promoter에 의해 mouse PEA15 (m-PEA15)가 과발현되는 pCAGGS-mPEA15 (8,559 bp) 발현 벡터는 동경대학교 의과학연구소 Nakauchi 교수로부터 제공받았다. 발현벡터는 제한 효소 *Pvu* I으로 처리한 후 (Fig. 1) 0.9% 아가로스 겔에 전기영동하였고, 이들의 DNA 단편을 아가로스 겔로부터 회수하여 정제 후, 최종농도 2~4 ng/ $\mu$ l로 회석하였다.

### Micropipets 제작 및 유전자 미세 주입

외경이 1 mm이고, 길이가 13 cm인 유리관 (Garner glass, USA)으로 고정용과 주입용의 micropipets을 제작하였다. 외래유전자의 미세 주입은 미세조작기(micromanipulator: Nikon, Japan)를 이용하여 1세포기 수정란에 미세 주입하였다.

### 외과적 방법에 의한 수정란 채란 및 이식

유전자를 주입할 수 있는 1세포기 단계의 수정란을 생

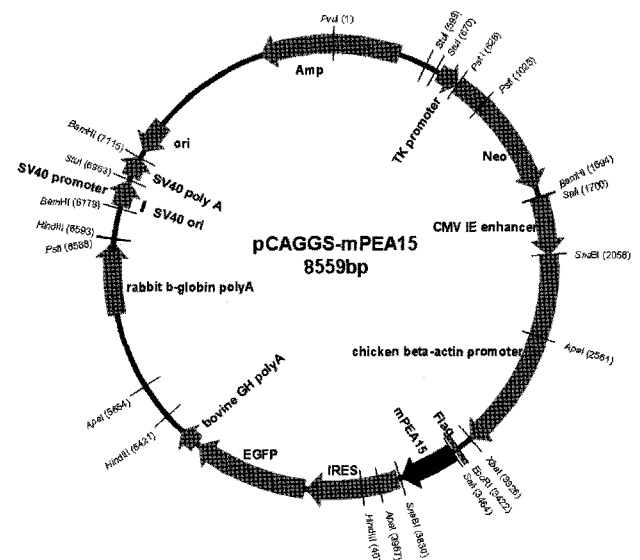


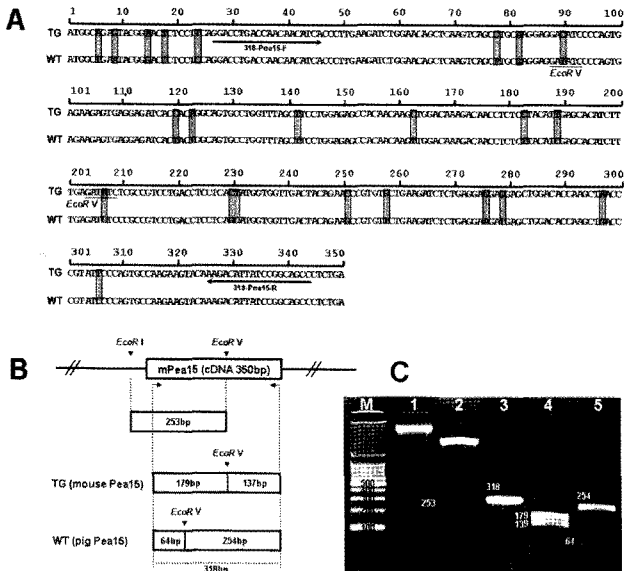
Fig. 1. Construction of pCAGGS-mPEA15.

산하고, 그 회수율을 높이기 위해 200~230일령의 암컷 Landrace에 Altrenogest를 발정주기 12일부터 14일 사이에 매일 두당 사료 2 kg에 20 mg을 혼합하여 9일간 급여하였다. 그 후 과배란은 PMSG (Intervet International BV, Netherlands)를 1,000IU 근육 주사한 후 72시간이 경과되었을 때 750IU의 hCG를 근육 주사하여 과배란을 유도하였다. hCG (Intervet International BV, Netherlands) 주입 후 약 24시간 발정관찰한 후 발정이 온 개체는 2회에 걸쳐 자연종무를 시키고, 약 53시간 경과 후 외과적 방법에 의해 난관을 D-PBS로 관류하여 수정란을 채란하였다. 관류된 액체는 멸균시험관에 수집하여 실온에서 난자를 회수하여 검란을 실시하며 1세포기 난자를 이용하였다.

호르몬 처리에 의해서 발정이 동기화된 수란돈 또는 자연적으로 발정주기가 동기화된 수란돈에 대하여 전신 마취를 한 후, 마취된 수란돈의 정중선을 중심으로 광범위하게 면도기를 이용하여 체모를 제거하고 소독을 실시한 다음 정중선을 약 10~15 cm를 절개하여 자궁 및 난소를 노출시켰다. 난소 표면의 황체의 존재를 확인한 후, 수정란 26개가 함유된 배양액의 채워진 polycatether (Cook, Australia)를 난관 팽대부에 넣고, 수정란이 함유된 배양액을 주입하여 이식을 실시하였다. 이식이 완료된 자궁 및 난소를 복강 내로 밀어 넣은 다음, sodium chondroitin sulfate 1%가 함유된 생리식염수로 생식기를 세척하여 장간흡착을 방지하였다. 마지막으로 절개부위를 봉합한 뒤 항생제를 투여한 후, 보온이 잘되는 둔방에서 마취가 풀릴 때까지 보호하였다.

### RT-PCR RFLP 및 Real-time RT-PCR

혈액 및 조직에서 total RNA는 ZR Whole-Blood Total RNA Kit (Zymo Research, USA) 및 TRIzol reagent (Invitrogen, USA)를 이용하여 제공된 방법에 의해 각각 추출하였다. cDNA는 1  $\mu$ g의 total RNA를 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, USA)의 사용법에 따라 최종 20  $\mu$ l에 반응시켜 합성했다. RT-PCR은 TaKaRa PCR Thermal Cycler (TaKaRa, Japan)을 사용하여, 최초 94 $^{\circ}$ C에서



**Fig. 2. Identification of mPEA15 integration in pigs by RT-PCR RFLP.** Comparison of PEA15 cDNA sequences of TG (mPEA15) and WT (pig PEA15) (A). Schematic representation of the RT-PCR RFLP for identification of mPEA15 gene (B) and RFLP fragments resolved on a 1.8% agarose gel (C). M: 100 bp size marker, 1: Vector, 2: Vector+EcoR I+EcoR V, 3: PCR product, 4: PCR product+EcoR V (TG), 5: PCR product+EcoR V (WT).

5분간 반응시킨 뒤 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초를 총 35회 반복하여 증폭하였으며, 최종 72°C에서 5분간 반응시켰다. PEA15 유전자 증폭에는 forward primer인 5'-GGACATCCCCAGTGAAGA-3'과 reverse primer인 5'-TACGGGTTAGCTTGGTGTCC-3'을 이용하여 최종 50 µl에 반응시켜 318 bp의 증폭산물을 생산했다. 증폭된 PCR 산물은 정제를 한 후, 제한 효소 *EcoR* V로 처리하여 1.8% 아가로스 겔에 전기영동하여 exogenous PEA15 (mouse PEA15)와 endogenous PEA15 (pig PEA15)를 DNA 단편의 크기에 따라 구별하였다 (Fig. 2).

mRNA 발현량은 LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche, USA)를 이용하여 LightCycler (Roche, USA)로 분석했다. 최초 94°C에서 5분간 반응시킨 뒤 94°C에서 15초, 60°C에서 15초, 72°C에서 15초를 총 30회 반복하여 증폭하였으며, 최종 72°C에서 5분간 더 반응시켰다. PCR 반응 종결 후 melting curve 작성을 통하여 유전자 증폭의 정확성을 재확인하였다. 유전자 발현량의 내부 보정을 위하여 house keeping 유전자인 돼지의 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 이용하였고, 유전자 발현량은  $2^{-\Delta Ct}$  방법을 통하여 분석하였다. 여기서 Ct값은 반응을 일으키는 최소 역가 (threshold)의 cycle 수를 의미하며,  $\Delta Ct$  값은 PEA15 유전자의 Ct 값에서 GAPDH 유전자의 Ct값을 뺀 값을 의미한다 (Livak와 Schmittgen, 2001). PEA15의 증폭 primer는 위와 동일하며, GAPDH는 forward primer인 5'-ATTGC-CCTCAACGACCACT-3'과 reverse primer인 5'-GGCCT-CTCTCCTCTCGC-3'을 이용하여 194 bp의 PCR 증폭산물을 증폭시켰다.

**Southern Blot Hybridization**

10 µg의 genomic DNA를 제한 효소 *Apa* I (Toyobo, Japan)으로 8시간 반응시킨 후, DNA Clean & Concentrator-25 (Zymo Research, USA)로 정제하였다. 그 다음 5 µg의 genomic DNA를 1% 아가로스 겔에 전기영동 (50 V, 50 mA)하였고, 10분간 Et-Br 염색 후, 순차적으로 탈염색 (15분), denaturation (15분 2회), neutralization (15분 2회)를 수행하였다. Gel transfer는 삼투압 방식을 이용하여 over night로 nylon membrane (Amersham, USA)에 흡착시켰다. 흡착시킨 membrane은 20X SSC 완충용액으로 세척한 후, UV crosslinker (Bio-RAD, USA)로 고정시킨 후 probe를 표지하여 hybridization을 수행하였다. Detection은 NBT/BCIP detection (Roche, USA)으로 발색시켜 필름에 현상하였다. PEA15 Probe DNA는 318 bp의 PEA15 PCR 증폭산물 정제한 것을 이용하여 DIG DNA labeling kit (Roche, USA)로 DIG-11-dUTP를 표지하여 50ng의 probe를 hybridization에 사용하였다.

**Western Blotting**

-80°C에서 보관 중인 조직을 protease inhibitor cocktail (Roche, USA)이 첨가된 M-PER 단백질 추출 용액 (Thermo Scientific, USA)에서 homogenizer를 이용 분쇄하였다. 얼음에서 1시간 동안 방치하여 추가로 조직을 용해하였다. 원심분리기를 이용 조직 단백질을 회수하여 분석 전까지 -80°C에서 보관하였다. 단백질의 농도는 Bradford assay 용액 (Bio-RAD, USA)을 이용하여 결정하였다. 40 µg의 단백질을 SDS-PAGE 겔에서 분리시킨 후 PVDF membrane으로 전이시켰다. Western blot 분석을 위해 blocking buffer는 5% non-fat dried milk와 0.05% Tween-20이 첨가된 PBS 용액을 사용하였다. 1차 항체는 anti-rabbit polyclonal PEA15 (Cell Signaling Technology, USA)를 사용하였고, 2차 항체는 anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz, USA)를 사용하였다.

**Fluorescence In situ Hybridization (FISH)**

Metaphase 상태의 백혈구는 헤파린 처리된 전혈에 10 ml의 배양액과 0.4 ml의 PHA-M를 넣고 38.5°C에서 pre-warm 시킨 후, CO<sub>2</sub> 배양기에서 48~72시간 배양시켰다. 이후, 세포분열을 중지시키기 위해 0.2 ml colcemid solution 처리를 하고 30분 더 배양시켰다. 500 g에서 5분간 원심분리 후 상청액을 제거하고 백혈구만 남을 때까지 0.075M KCl로 반복해서 적혈구를 용해시킨 후, 차가운 fixative (metanol : acetic acid=3 : 1)로 혈구를 고정시켜 도말될 때까지 -20°C에 보관하였다. Probe는 pCAGGS-mPEA15 벡터를 heat fragmentation법에 의해 100~600 bp로 분절시켜 Direct labeling kit (Kreatech Biotechnology, Netherlands)를 사용하여 547 orang dye (Kreatech Technology, Netherlands)로 labeling하여 24×40 커버글라스 당 20 µl의 probe mix (4 ng/µl)를 사용하였다.

백혈구 용액 30 µl를 슬라이드에 펼친 후 hot plate 위에서 10초간 가열하고 상온까지 온도를 내린 후, 펍신처리 과정과 post-fix 과정을 통해서 고정시키고 1X PBS로 세척과 70%, 85%, 100%의 에탄올로 순차적으로 탈수시킨 후 건조시켰다. 이후 denaturation시킨 probe mix를

커버글라스에 도입하고 슬라이드글라스에 겹친 후 rubber cement로 밀봉하였다. 이어서 80°C의 hot plate에서 5분간 동시에 denaturation 시키고 위쪽이 바다으로 향하게 slide holder에 끼워 moist chamber에 넣은 후 42°C에서 12시간 hybridization하였다. Hybridization이 끝난 후, 커버글라스를 제거하고 1X Post-wash buffer 1 (0.4X SSC/0.3% NP-40)와 1X Post-wash buffer 2 (2X SSC/0.1% NP-40)로 순차적으로 세척하였다. 마지막으로 DAPI/An-tifade Counterstain 용액 (Kreatech Biotechnology, Netherlands)을 첨가한 후 매니큐어로 커버글라스 주위를 밀봉하여 BX50 현미경 (OLYMPUS, Japan)으로 검경하였다.

**결과 및 고찰**

**F0 수정란 이식자돈과 F1 후대의 생산 및 형질전환 검정**

pCAGGS-mPEA15 외래유전자를 수정란 전핵에 미세 주입하여 32두의 수란돈에 총 797개의 수정란 (1세포기 706개, 2세포기 73개, 4세포기 18개)을 이식하였다 (미체시). 그 결과 9두의 수란돈으로부터 51두의 수정란 이식자돈 (F0)을 생산하였으며, 생산된 자돈 중 수컷 1두에서 mPEA15 유전자가 삽입되었음을 확인하였다. 후대증식을 위해 이 수컷과 교배를 통해서 생산된 후대 (F1) 47두의 자돈 중에서 11두가 형질전환 개체임을 확인하였다 (Table 1). 한편, transgene의 전이율은 유전자 미세 주입법에 의해서 1.96%, 자연종부에 의한 F1 후대로의 전이는 23.4%로 나타났다. 본 연구의 유전자 미세 주입 전이율은 박 등(2006)에 의한 결과 (2.13%)와 유사한 경향을 보였지만, 이 등(2009)의 19.2%보다는 상당히 낮은 수치를 보였다. 이러한 큰 차이는 약 2배 정도 차이 나는 사용한 수란돈의 수에 기인할 수도 있지만, 근본적으로 유전자 미세 주입법에 의한 형질전환 동물의 생산이 아직은 효율적인 면에 있어 불안정함을 확인하였다.

TG 돼지의 exogenous PEA15 (mouse)와 WT 돼지의 endogenous PEA15 (pig)의 cDNA는 Fig. 2A에서 보여주는 것처럼 상동성이 높다. 318 bp의 RT-PCR 증폭산물 내 부에는 TG 및 WT에 있어 각각 서로 다른 위치에 EcoR V 제한 효소 부위가 존재하며, EcoR V 제한 효소 처리 시 TG의 경우 179 bp와 137 bp의 DNA 단편이 WT의 경우 64 bp와 254 bp의 단편들이 검출된다 (Fig. 2B, C). Fig. 3은 수정란 이식자돈의 RT-PCR RFLP 검정 결과이다. 17번 개체에서 exogenous PEA15 유전자가 삽입되었음을 확인하였다. 이러한 RT-PCR RFLP법은 혈청학적으로 구별이 힘든 아형 바이러스의 구별 (Tenllado 등, 1994) 및 point mutation의 검출 등, 바이러스 연구에 많이 이용되고 있다 (Saito 등, 2002; Sifakas 등, 2001). 또한, 17번 개체에 있어서 southern blot에 의한 게놈상의 삽입 여부를 확인한 결과, 약 1.4 kb의 위치에 밴드가 검출되었다 (Fig. 4B). 또한, Fig. 4C는 mPEA15 유전자가 F1 후대로 전이되는지를 FISH법에 의해 확인한 결과이며, TG의 염색체 휴지기(a) 및 염색체의 양이 두 배로 증가하는 중기(b)에서 목적 유전자의 시그널이 검출되었다. 이와 같이 본 연구에서는 형질전환 개체의 검정을 위해

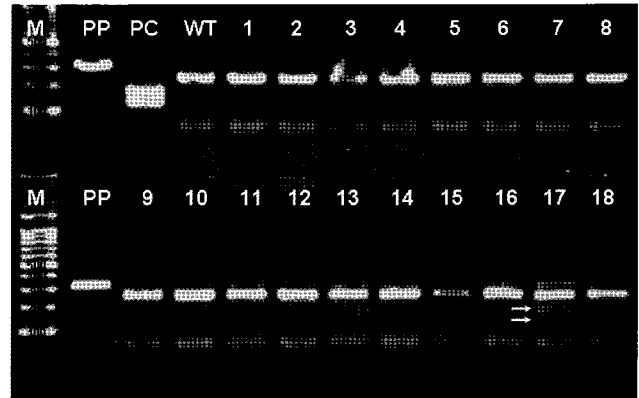


Fig. 3. Identification of transgenic piglets by RT-PCR RFLP. M: 100 bp size marker, PP: PCR product (318 bp), PC: positive control, WT: wild type.

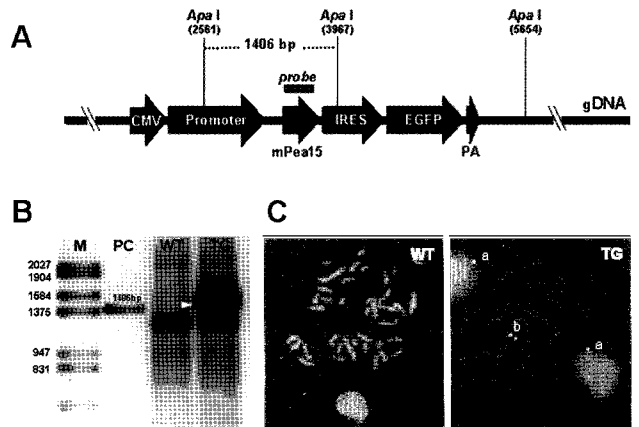


Fig. 4. Identification of expression vector for mPEA15 cDNA (A) integration in genomic DNA and chromosome by southern blot (B) and FISH analysis (C). M: size marker, PC: positive control, WT: wild type, TG: transgenic pig, a: probe signals in interphase, b: probe signal in metaphase.

RT-PCR RFLP, southern blot 및 FISH 법을 이용하여 다양하게 확인하였다. RT-PCR RFLP 법은 게놈상에 도입된 유전자가 endogenous 유전자와 높은 상동성을 가질 경우, 간편하고 신속하게 구별할 수 있는 방법이며 목적유전자의 확인은 물론 mRNA 발현까지 동시에 확인할 수 있는 방법으로 사료된다.

**mPEA15의 과발현 및 EGFP 발현의 확인**

본 벡터 시스템에 의해 mPEA15 유전자가 F1 후대 개체의 전 조직에서 과발현되는 것을 Real-time PCR을 통하여 확인하였다 (Fig. 5A). 그 발현의 차이는 조직에 따라 혹은 개체에 따라 차이는 보였지만, 정상군에 비해 최대  $4 \times 10^6$ 배까지 차이가 났다. 또한, 근육조직에서의 endogenous pig PEA15 단백질은 예상대로 양쪽 모두에서 15 kDa 부위에서 발현되었지만, TG 돼지에서 약 7배 정도 높게 발현되었고 (Fig. 6), transgene인 mouse PEA15 단백질의 발현은 TG 돼지에서만 15 kDa 위쪽에서 강하게 발현되었다. 이것은 Fig. 1의 벡터 구조에서 알 수 있듯이 PEA15 cDNA 앞쪽에 Flag tagging에 의한 단백질이 용

Table 1. Analyses of transgenic gene transfer in pigs

Class	No. of recipients/ sows	No. of piglets		Transgenic pigs		Transfer rate of transgene (%)	Method of production
		Male	Female	Male	Female		
F0	9	22	29	1	0	1.96	Embryo transfer after microinjection
F1	6	14	33	1	10	23.4	Natural mating between F0 and wild type

A total of 797 microinjected embryos were transferred into 32 recipients.

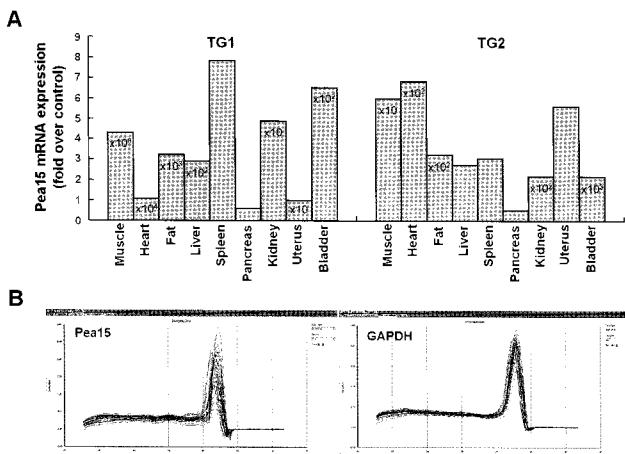


Fig. 5. Expression of PEA15 mRNA in the various tissues. The graphs represent the relative mRNA of total PEA15 with respect to GAPDH in the TG and WT groups (A). Dissociation curve of PEA15 and GAPDH in this analysis (B).

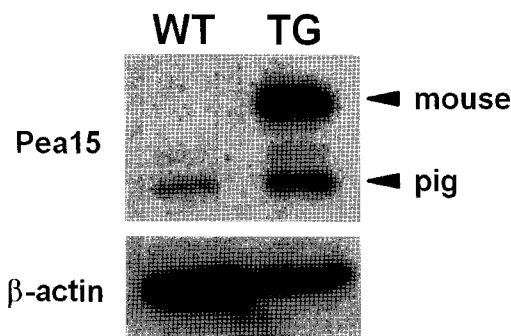


Fig. 6. Western blot analysis of muscle tissues from transgenic and wild pigs.

합되어 있기 때문이다. 이러한 이유가 Real-time PCR에 의한 mRNA 발현 차이가 극단적으로 나타날 수 있음을 뒷받침한다. 또한, 수술용 칼을 이용하여 약간의 귀 조직을 자른 후, crude한 상태의 조직을 형광현미경으로 관찰하였다. 그 결과, 귀 조직에서 강하게 GFP의 발현이 관찰되었을 뿐만 아니라 (Fig. 7D), 발굽에서도 강하게 발현됨을 확인하였다 (Fig. 7F). 비록 본 연구에서는 이외의 조직에서 GFP의 발현을 관찰하지 않았지만, Naruse 등 (2005)은 돼지의 발굽에서 선명한 EGFP의 발현과 검시하

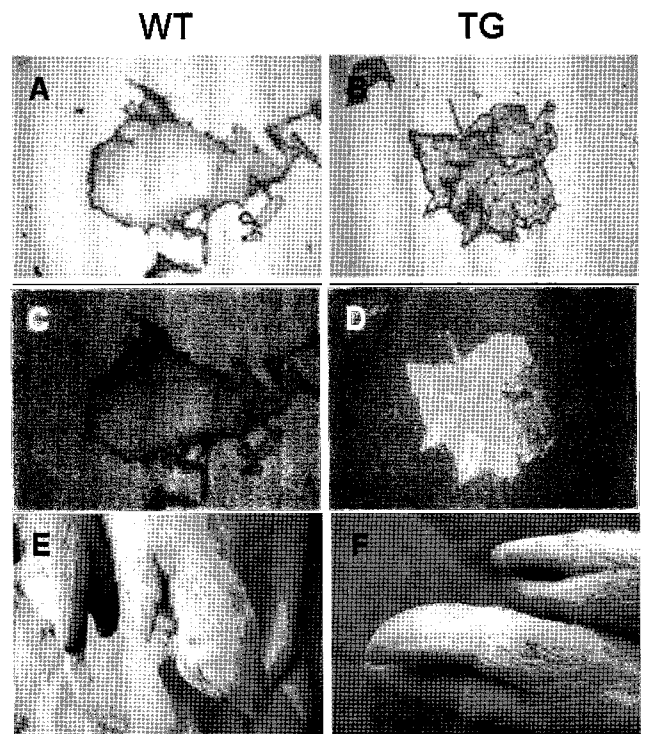


Fig. 7. Expression of GFP in the crude ear tissues and hooves of transgenic pig. A, B: Image under bright field, C, D: Image under fluorescent, E, F: Image of photograph.

는 동안 혈액과 간 등의 다른 기관에서도 희미한 발현을 관찰하였다.

위 사실을 바탕으로 본 연구에 사용된 벡터 시스템 즉, chicken  $\beta$ -actin promoter와 CMV-IE enhancer로 구성된 CAG promoter는 mPEA15를 형질전환 돼지의 전 조직에서 과발현시킴을 확인하였다. 이러한 사실은 PEA15 유전자의 과발현에 의해 유도되는 인슐린 저항성(Vigliotta 등, 2004)이 특히, 당의 분해를 담당하는 근육조직에서 발생할 경우, 제2형 당뇨병을 유발시킬 수 있다는 사실을 시사한다. 비록 본 연구에서는 형질전환 돼지에 있어 당뇨에 대한 생리학적 연구에 대한 결과는 제시하지 않았지만, 향후 당 부하 검사 (glucose tolerance test)등을 포함한 다양한 측면에서 분석한 결과를 바탕으로 당뇨 질환 모델 돼지로서의 가능성을 검토해야 할 것이다.

## 인용문헌

1. Condorelli G, Vigliotta G, Iavarone C, Caruso M, Tocchetti CG, Andreozzi F, Cafieri A, Tecce MF, Formisano P, Beguinot L, Beguinot F (1998): PED/PEA-15 gene controls glucose transport and is overexpressed in type 2 diabetes mellitus. *EMBO J* 17:3858-3866.
2. Condorelli G, Vigliotta G, Cafieri A, Trencia A, Andalò P, Oriente F, Miele C, Caruso M, Formisano P, Beguinot F (1999): PED/PEA-15: an anti-apoptotic molecule that regulates FAS/TNFR1-induced apoptosis. *Oncogene* 18:4409-4415.
3. Condorelli G, Trencia A, Vigliotta G, Perfetti A, Goglia U, Cassese A, Musti AM, Miele C, Santopietro S, Formisano P, Beguinot F (2002): Multiple members of the mitogen-activated protein kinase family are necessary for PED/PEA-15 anti-apoptotic function. *J Biol Chem* 277:11013-11018.
4. Danziger N, Yokoyama M, Jay T, Cordier J, Glowinski J, Chneiweiss H (1995): Cellular expression, developmental regulation, and phylogenetic conservation of PEA-15, the astrocytic major phosphoprotein and protein kinase C substrate. *J Neurochem* 64:1016-1025.
5. Estellés A, Yokoyama M, Nothias F, Vincent JD, Glowinski J, Vernier P, Chneiweiss H (1996): The major astrocytic phosphoprotein PEA-15 is encoded by two mRNAs conserved on their full length in mouse and human. *J Biol Chem* 271:14800-14806.
6. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (2003): Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26 Suppl 1:S5-S20.
7. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE (1969): Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 48:2129-2139.
8. Kaufman FR (2005): Type 2 diabetes in children and youth. *Endocrinol Metab Clin North Am* 34:659-76.
9. Kubes M, Cordier J, Glowinski J, Girault JA, Chneiweiss H (1998): Endothelin induces a calcium-dependent phosphorylation of PEA-15 in intact astrocytes: identification of Ser104 and Ser116 phosphorylated, respectively, by protein kinase C and calcium/calmodulin kinase II *in vitro*. *J Neurochem* 71:307-1314.
10. Larsen MO, Wilken M, Gottfredsen CF, Carr RD, Svendsen O, Rolin B (2002): Mild streptozotocin diabetes in the Göttingen minipig. A novel model of moderate insulin deficiency and diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E1342-E1351.
11. Larsen MO, Rolin B (2004): Use of the Götting minipig as a model of diabetes, with special focus on type 1 diabetes research. *ILAR J* 45:303-313.
12. Lee HG, Lee HC, Kim SW, Lee P, Chung HJ, Lee YK, Han JH, Hwang IS, Yoo JI, Kim YK, Kim HT, Lee HT, Chang WK, Park JK (2009): Production of recombinant human von Willebrand factor in the milk of transgenic pigs. *J Reprod Dev* 55:484-490.
13. Lenzen S, Panten U (1988): Alloxan: history and mechanism of action. *Diabetologia* 31:337-342.
14. Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
15. Lunney JK (2007): Advances in swine biomedical model genomics. *Int J Biol Sci* 3:179-184.
16. Murakami H, Matsumoto M, Inoue H, Kaji Y (2007): Digestive enzyme activities of pancreas and intestinal digesta in streptozotocin-induced diabetic piglets. *Anim Sci J* 78:55-60.
17. Naruse K, Ishikawa H, Kawano HO, Ueda H, Kurome M, Miyazaki K, Endo M, Sawasaki T, Nagashima H, Makuuchi M (2005): Production of a transgenic pig expressing human albumin and enhanced green fluorescent protein. *J Reprod Dev* 51:539-46.
18. 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.
19. Prather RS, Hawley RJ, Carter DB, Lai L, Greenstein JL (2003): Transgenic swine for biomedicine and agriculture. *Theriogenology* 59:115-123.
20. Ramos JW, Hughes PE, Renshaw MW, Schwartz MA, Formstecher E, Chneiweiss H, Ginsberg MH (2000): Death effector domain protein PEA-15 potentiates Ras activation of extracellular signal receptor-activated kinase by an adhesion-independent mechanism. *Mol Biol Cell* 11:2863-2872.
21. Saito R, Oshitani H, Masuda H, Suzuki H (2002): Detection of amantadine-resistant influenza A virus strains in nursing homes by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis with nasopharyngeal swabs. *J Clin Microbiol* 40:84-88.
22. Siafakas N, Georgopoulou A, Markoulatos P, Spyrou N, Stanway G (2001): Molecular detection and identification of an enterovirus during an outbreak of aseptic meningitis. *J Clin Lab Anal* 15:87-95.
23. Tenllado F, García-Luque I, Serra MT, Díaz-Ruiz JR (1994): Rapid detection and differentiation of tobamoviruses infecting L-resistant genotypes of pepper by RT-PCR and restriction analysis. *J Virol Methods* 47:165-173.
24. Trencia A, Perfetti A, Cassese A, Vigliotta G, Miele C, Oriente F, Santopietro S, Giacco F, Condorelli G, Formisano P, Beguinot F (2003): Protein kinase B/

- Akt binds and phosphorylates PED/PEA-15, stabilizing its antiapoptotic action. *Mol Cell Biol* 23:4511-4521.
25. Trencia A, Fiory F, Maitan MA, Vito P, Barbagallo AP, Perfetti A, Miele C, Ungaro P, Oriente F, Cilenti L, Zervos AS, Formisano P, Beguinot F (2004): Omi/HtrA2 promotes cell death by binding and degrading the anti-apoptotic protein ped/pea-15. *J Biol Chem* 279:46566-46572.
  26. Umeyama K, Watanabe M, Saito H, Kurome M, Tohi S, Matsunari H, Miki K, Nagashima H (2009): Dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1alpha induces diabetes in transgenic-cloned pigs. *Transgenic Res* 18:697-706.
  27. Vigliotta G, Miele C, Santopietro S, Portella G, Perfetti A, Maitan MA, Cassese A, Oriente F, Trencia A, Fiory F, Romano C, Tiveron C, Tatangelo L, Troncone G, Formisano P, Beguinot F (2004): Overexpression of the ped/pea-15 gene causes diabetes by impairing glucose-stimulated insulin secretion in addition to insulin action. *Mol Cell Biol* 24:5005-5015.
  28. Watanabe M, Umeyama K, Kawano HO, Izuno N, Nagashima H, Miki K (2007): The production of a diabetic mouse using constructs encoding porcine insulin promoter-driven mutant human hepatocyte nuclear factor-1alpha. *J Reprod Dev* 53:189-200.
  29. Xiao C, Yang BF, Asadi N, Beguinot F, Hao C (2002): Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced death-inducing signaling complex and its modulation by c-FLIP and PED/PEA-15 in glioma cells. *J Biol Chem* 277:25020-25025.
  30. Yamagata K, Nammo T, Moriwaki M, Ihara A, Iizuka K, Yang Q, Satoh T, Li M, Uenaka R, Okita K, Iwahashi H, Zhu Q, Cao Y, Imagawa A, Tochino Y, Hanafusa T, Miyagawa J, Matsuzawa Y (2002): Overexpression of dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor-1 alpha in pancreatic beta-cells causes abnormal islet architecture with decreased expression of E-cadherin, reduced beta-cell proliferation, and diabetes. *Diabetes* 51:114-123.  
(접수일자: 2011. 9. 2 / 채택일자: 2011. 9. 9)