

생쥐 복제수정란 발달에 있어서 난자공여 생쥐 연령과 미세조작 배양액의 영향

김동훈^{1,*} · 이윤수² · 오건봉¹ · 황성수¹ · 임기순¹ · 박진기¹

¹국립축산과학원 동물바이오공학과, ²동경대학교 의과학연구소

The Effect of Oocyte Donor Age and Micromanipulation Medium on the Development of Mouse Cloned Embryos

Dong-Hoon Kim^{1,*}, Youn-Su Lee², Keon-Bong Oh¹, Seongsoo Hwang¹, Gi-Sun Im¹ and Jin-Ki Park¹

¹Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

²Laboratory of Stem Cell Therapy, Center for Experimental Medicine, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan

ABSTRACT

This study was conducted to examine the effect of oocyte donor age and micromanipulation medium on the development of mouse cloned embryos receiving cumulus cells. Mouse oocytes were obtained from 6 to 11 week-old mice BDF1 female mice(experiment 1) and cumulus cells were used as donor cells. Micromanipulation procedures for nuclear transfer(NT) were performed in FHM, M2 or Hepes-buffered TCM199(TCM199) medium(experiment 2). After nuclear transfer, the reconstructed oocytes were activated by 10 mM SrCl₂ in Ca-free CZB medium in the presence of 5 μg/ml cytochalasin B for 5 h and cultured in KSOM medium for 4 days. In experiment 1, the survival rate of oocytes after injection of cumulus cells were significantly($p<0.05$) lower in oocytes from 6~7 week-old mice(53.3%) than in oocytes from 8~9(80.9%) and 10~11 week-old mice(77.1%). In experiment 2, the survival rate of oocytes after cell injection were significantly($p<0.05$) higher in FHM and M2 medium(71.7% and 76.9%) than in TCM199 medium (51.2%). The activation rates of cloned embryos were not different among the micromanipulation media. However, the embryos developed to blastocyst stage were significantly($p<0.05$) higher in FHM medium(13.9%) than in M2 and TCM199 medium(0.0% and 0.0%). In conclusion, the present study suggest that oocytes from above 8 week-old mice are superior to oocytes from 6~7 week-old mice as a source of recipient cytoplasm and FHM is superior to M2 and TCM199 as a micromanipulation medium for mouse somatic cell cloning.

(Key words : Mouse cloning, Micromanipulation medium, Oocyte donor age)

서 론

체세포 복제를 이용하여 최초의 동물인 복제양 돌리가 태어난 이후(Wilmot *et al.*, 1997), 체세포 복제기법은 줄기세포 치료, 멸종위기 동물의 보존 그리고 가축 및 반려동물의 복제에 활용되고 있다(Wells *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 1998; Polejaeva *et al.*, 2000; Wakayama *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2007).

체세포 복제수정란을 생산 방법은 세포융합법과 세포주입법으로 대별된다. 세포융합법은 난자와 공여세포를 전기 세포융합장치를 이용하여 융합하는 방법으로 대부분의 동물에서 사용되는 방법이다. 세포주입법은 난자의 세포질 내에 공여세포를 직접 주입하는 방법으로 세포융합법보다는 그 절차가 간편하지만 기술적인 어려움이 있

으며, 특히 생쥐의 경우 세포 주입에 대한 난자 세포질의 저항력이 약해 복제수정란의 생존율이 저조하다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 Piezo-actuated 미세 조작 장치를 이용한 세포 주입 방법이 생쥐에서 주로 활용하고 있다. Piezo-actuated 미세 조작 장치를 이용한 세포주입 복제 방법은 최초에 난자 세포질 내 정자미세주입(ICSI; intracytoplasmic sperm injection)을 위하여 개발되었으며(Kimura and Yanagimachi, 1995), 이후 최초 체세포 복제생쥐인 "Cumulina" 생산에 이 방법을 이용하였다(Wakayama *et al.*, 1998).

Piezo-actuated 미세 조작 장치를 이용한 생쥐 체세포 복제연구 결과는 연구팀에 따라 그 성적 차이가 큰 것으로 보고되고 있다. 연구 결과가 우수한 연구팀에서는 세포주입 후 난자생존율이 75~95% 그리고 배반포 발달율이 40~80%를 보고하고 있지만(Wakayama *et al.*, 1998; Waka-

* 본 과제는 농촌진흥청 차세대 바이오그린21사업(과제번호 : PJ008331012011) 연구비로 실시되었음.

* Corresponding author : Phone: +82-31-290-1632, E-mail: kimdhhj@korea.kr

yama and Yanagimachi, 2001; Kishigami *et al.*, 2006; Rybouchkin *et al.*, 2006), 반면 다른 연구팀에서는 6~44%의 난자 생존율과 4~8%의 배반포 발달율을 보고하고 있다(Munsie *et al.*, 2000; Zhuo *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2011). 따라서 생쥐 체세포 복제 효율을 증진시키기 위해서는 각 단계별 실험 방법을 이해 및 개선하고 최적조건을 찾는 것이 중요할 것으로 사료된다.

따라서 본 연구는 생쥐 체세포 복제과정 중에서 수핵란을 제공하는 생쥐의 나이 그리고 체세포 복제를 위해 미세조작과정 중에 사용되는 배양액의 종류에 따른 복제수정란 생산 효율을 평가하기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

공시동물 및 시약

본 연구에서는 생후 6~11주령의 B6D2F1 hybrid(C57-BL6 X DBA2) 암컷 생쥐를 수핵란 및 난구세포 채취를 위해 실험에 공시하였다. 실험에 사용된 시약은 특별한 언급이 없는 한 Sigma-Aldrich(St.Louis, MO, U.S.A.) 제품을 사용하였다.

수핵란 및 공여세포의 준비

과배란은 B6D2F1 암컷 생쥐에 PMSG(pregnant mare serum gonadotropin) 7.5 IU를 복강주사하고, 48시간 후에 hCG(human chorionic gonadotropin) 7.5 IU를 동일한 방법으로 주사하여 유도하였다. hCG 주사 후 14~15시간 췌 난관으로부터 난자-난구세포 복합체를 채취하였으며, 채취된 난자-난구세포 복합체는 0.1% hyaluronidase가 첨가된 Hepes-CZB 배양액에서 5분 간 처리 후, 제1극체가 방출된 정상적인 형태의 성숙난자만을 회수하여 실험에 공시하였다. 그리고 단일세포로 분리된 난구세포는 회수하여 Hepes-CZB 배양액으로 세척하여 10%(w/v) PVP(polyvinylpyrrolidone)가 첨가된 Hepes-CZB 배양액(PVP-CZB)과 혼합한 후 세포주입 전까지 실온에서 보관하였다.

핵이식

탈핵을 위하여 성숙난자는 5 μ g/ml cytochalasin B가 첨가된 미세조작 배양액 소적에 옮긴 다음 holding 피펫으로 난자를 고정시키고, Piezo-driven 미세 조작 장치(PMM-150FU, PrimeTech LTD., Ibaraki, Japan)가 장착된 탈핵 피펫(직경 10 μ m)을 이용하여 난자 내의 chromosome-spindle complex를 제거하였다. 탈핵된 난자는 CZB 배양액에서 5% CO₂, 37°C 배양기 조건에서 30분간 배양을 실시하였다.

세포주입을 위하여 PVP-CZB 배양액 소적 내의 난구세포를 세포주입 피펫(직경 6~8 μ m)으로 흡입 및 방출을 반복하여 세포막을 제거하였다. 세포막이 제거된 난구세포는 Piezo-driven 미세 조작 장치를 이용한 Piezo pulse에 의하여 탈핵난자에 주입하였다. 탈핵 과정은 37°C 그리고 체세포 미세주입과정은 실온에서 수행하였다.

난자 활성화 및 체외배양

활성화 유도를 위하여 핵이식 난자는 5 μ g/ml cytochalasin B와 10 mM SrCl₂가 첨가된 Ca-free CZB 배양액에서 2.5시간 배양 후, 5 μ g/ml cytochalasin B가 첨가된 KS-OM 배양액(Millipore, Billerica, MA, U.S.A.)에서 추가적으로 3.5시간 배양하였다. 그리고 활성화 처리 후 전핵 형성이 관찰된 난자만을 정상적인 활성화 유도된 난자로 간주하였다.

활성화된 복제수정란은 mineral oil이 피복된 20 μ l의 KSOM 배양액 소적에서 5일간 배양을 실시하였으며, 배양 조건은 5% CO₂, 37°C의 조건이었다.

실험계획

실험 1. 수핵란을 제공하는 생쥐 연령에 따른 복제수정란의 생존율을 살펴보기 위하여 생후 6~7, 8~9 그리고 10~11주령 B6D2F1 hybrid 생쥐로부터 채취된 난자를 비교 실험하였다.

실험 2. 생쥐 체세포 복제수정란을 생산하는 미세조작과정 중 사용되는 미세조작 배양액에 따른 복제수정란의 생존율과 발달율을 알아보기 위하여 FHM(Millipore, Billerica, MA, U.S.A.), M2(Millipore, Billerica, MA, U.S.A.) 그리고 Hepes-buffered TCM 199(TCM199) 배양액을 비교 실험하였다.

통계처리

본 연구를 통하여 획득된 자료는 χ^2 검정을 이용하여 유의차를 검정하였으며, 유의성 검정은 $p < 0.05$ 일 때 통계적 차이가 있는 것으로 판단하였다.

결 과

수핵란 제공 생쥐 연령에 따른 복제수정란의 생존율

수핵란을 제공하는 생쥐 연령에 따른 복제수정란의 생존율을 살펴보기 위하여 생후 6~7, 8~9 그리고 10~11주령 B6D2F1 hybrid 생쥐의 난자에 난구세포를 주입한 후, 난자 생존율을 조사한 결과는 Fig. 1에 제시된 바와 같다. 세포주입 후 난자 생존율은 6~7주령(53.3%, 105/

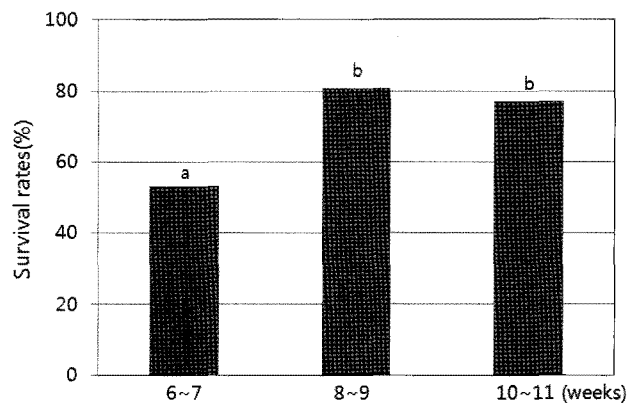


Fig. 1. Comparison of oocyte donor age on the survival of mouse cloned embryos. ^{ab} Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

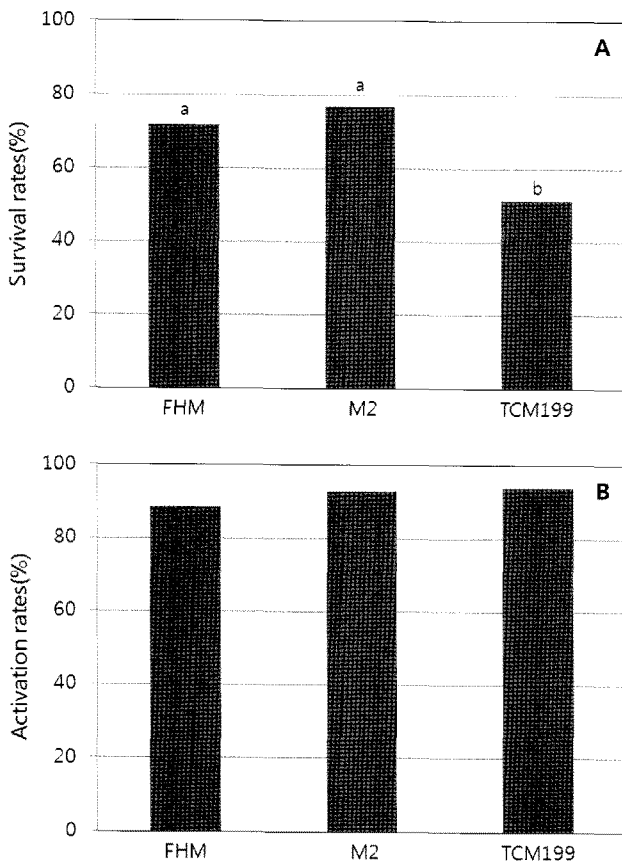


Fig. 2. Comparison of micromanipulation media on the survival and activation of mouse cloned embryos. (A) Survival rates. (B) Activation rates. ^{ab} Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

197) 생쥐의 수핵란이 8~9주령(80.9%, 195/241)과 10~11주령(77.1%, 112/166)의 것보다 유의하게 낮은 것으로 나타났다($p < 0.05$).

미세조작배양액에 따른 생쥐 복제이식란의 생존율과 발달율

생쥐 체세포 복제수정란 생산시 미세조작 배양액에 따른 영향을 알아보기 위하여 FHM, M2 그리고 TCM199 배양액을 비교하였다. 난구세포 주입 후 난자의 생존율은 Fig. 2A에 제시된 바와 같이, FHM(71.7%, 114/159)과 M2 배양액(76.9%, 266/346)이 TCM199 배양액(51.2%, 65/227)보다 유의하게 높은 결과를 나타냈다($p < 0.05$). 난자의 활

성화율은 Fig. 2B에 제시된 바와 같이, FHM(88.6%, 101/114), M2(92.9%, 247/266) 그리고 TCM199 배양액(93.8%, 61/65) 간에 차이가 없는 것으로 나타났다. 5일간의 체외 배양 후 배반포까지의 발달율은 Table 1에 제시된 바와 같이, FHM 배양액(13.9%, 14/101)이 M2(0.0%, 0/229)와 TCM199 배양액(0.0%, 0/63)보다 유의하게 높은 결과를 나타냈다($p < 0.05$).

고찰

본 연구는 Piezo-actuated 미세 조작 장치를 이용한 생쥐 체세포 복제수정란 생산시 적정 생산조건을 확인하기 위하여 다양한 연령의 생쥐로부터 채취된 수핵란의 세포 주입 후 생존율 그리고 미세조작 과정에서 사용되는 배양액 종류에 따른 복제수정란의 생존율 및 발달율을 비교 조사하였다.

일반적으로 생쥐에서 체외수정 및 수정란 배양 실험을 위해서는 생후 6주령 암컷 개체를 이용하고 있으며(Delle Piane *et al.*, 2010), 세포질 내 정자주입 및 체세포 복제수정란 연구를 위해서는 생후 8~12주령 개체를 활용하고 있다(Kimura and Yanagimachi, 1995; Kishigami *et al.*, 2006). 그러나 몇 주령의 개체가 체세포 복제수정란 생산에 효과적인지, 이에 대한 연구는 보고되지 않고 있다. 일반적으로 생쥐의 체세포 복제 성공률은 생쥐 계통에 의존하며, 잡종(hybrid) 계통이 근교(inbrid) 계통보다 효율적인 것으로 알려져 있다(Wakayama and Yanagimachi, 2001; Inoue *et al.*, 2003). 본 연구에서 생후 6~7, 8~9 그리고 10~11주령 B6D2F1 hybrid 생쥐의 난자에 난구세포를 주입한 후 핵이식란의 생존율을 비교 조사하였으며, 그 결과 6~7주령 생쥐로부터 채취된 난자의 생존율이 다른 주령의 것보다 유의하게 낮은 것으로 나타났다. 흰쥐(rat) 연구 결과에 의하면 4~5주령의 난자의 생존율이 65.7%로 10주령 이상의 83.0%보다 생존율이 유의하게 낮은 것으로 보고되고 있다(Hirabayashi *et al.*, 2003). 본 연구 결과에서 체외수정 및 수정란 배양 연구에 이용되는 6~7주령 생쥐에서 채취된 난자가 체세포 주입 후 낮은 생존율을 나타내는 것은 미세조작 과정 중 세포질 손상에 대한 회복능력이 8주령 이후 것에 비하여 부족하기 때문인 것으로 사료된다.

생쥐 체세포 복제수정란 생산을 위한 미세조작용 배양액은 연구자에 따라 FHM(Rybouchkin *et al.*, 2006), M2(Kishigami *et al.*, 2006), Hepes-buffered CZB(Costa-

Table 1. Comparison of micromanipulation media on the development of mouse cloned embryos

Medium	No. of zygotes cultured	No.(%) of embryos developed to		
		2-cell	Morular	Blastocyst
FHM	101	54(53.5) ^a	17(16.8) ^a	14(13.9) ^a
M2	229	63(27.5) ^b	0 (0.0) ^b	0 (0.0) ^b
TCM199	63	8(12.7) ^b	0 (0.0) ^b	0 (0.0) ^b

^{ab} Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

Borges *et al.*, 2011) 그리고 HEPES-buffered KSOM(Inoue *et al.*, 2003) 배양액 등이 사용되고 있다. 본 연구에서 생쥐 복제수정란 생산에 가장 효율적인 미세조작용 배양액을 검토하고자 단순배양액(simple medium)인 FHM과 M2 배양액, 그리고 복합배양액(complex medium)인 HEPES-buffered TCM 199 배양액을 비교 실험하였으며, 그 결과 체세포 미세주입 후 생존율은 FHM과 M2 배양액이 HEPES-buffered TCM199 배양액보다 유의하게 높은 것으로 나타났으나, 배반포 발달은 FHM 배양액을 이용하였을 때만 관찰할 수 있었다. 특징적인 현상은 M2와 HEPES-buffered TCM 199 배양액에서 생산된 복제수정란의 경우 정상적인 난자 활성화는 되지만, 수정란의 난할율이 FHM 배양액에 비하여 절반 이하의 수준을 나타내는 것이었다. 타 연구자들의 결과에 따르면 배반포 발달율은 FHM 배양액에서 29~35%, M2 배양액에서 16~35%를 보고하였다(Rybouchkin *et al.*, 2002, 2006; Liu *et al.*, 2007; Tsuji *et al.*, 2009). 본 연구에서는 타 연구자들의 결과와 상이하게 미세조작 배양액으로 M2 배양액을 사용하였을 때 배반포로 발달되는 수정란을 확인할 수 없었는데, 이러한 결과 차이는 각 연구실의 실험 조건, 즉 실험실 환경, 미세조작 장치 및 기술적 숙련도, 수정란 배양 조건 등의 차이에 기인하는 것으로 사료된다. 또한 본 연구 결과를 통하여 생쥐 체세포 복제를 위한 미세조작 배양액으로 다양한 성분을 함유한 복합배양액보다는 비교적 단순한 성분으로 구성된 단순배양액을 이용하는 것이 복제수정란 생존과 발달에 유리함을 확인할 수 있었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 생쥐 체세포 복제수정란 생산을 위해서 수정란은 8주령 이상의 개체로부터 획득된 난자 활용하는 것이 난자의 생존율에 유리하며, 미세조작용 배양액은 단순배양액인 FHM 배양액을 사용하는 것이 효과적인 것으로 사료된다. 그러나 실험 조건은 연구 환경에 따라 차이를 나타낼 수 있으므로 연구 결과, 극대화를 위해서는 해당 연구실 환경에 적합한 조건을 확립하는 것이 중요하다고 판단된다.

인용문헌

- Costa-Borges N, Gonzalez S, Santaló J, Ibáñez E (2011): Effect of the enucleation procedure on the reprogramming potential and developmental capacity of mouse cloned embryos treated with valproic acid. *Reproduction* 141:789-800.
- Delle Piane L, Lin W, Liu X, Donjacour A, Minasi P, Revelli A, Maltepe E, Rinaudo PF (2010): Effect of the method of conception and embryo transfer procedure on mid-gestation placenta and fetal development in an IVF mouse model. *Hum Reprod* 25: 2039-2046.
- Hirabayashi M, Kato M, Takeuchi A, Ishikawa A, Hochi S (2003): Factors affecting premature chromosome condensation of cumulus cell nuclei injected into rat oocytes. *J Reprod Dev* 49:121-126.
- Inoue K, Ogonuki N, Mochida K, Yamamoto Y, Takano K, Kohda T, Ishino F, Ogura A. *Biol Reprod* 69:1394-1400.
- Kang H, Sung J, Roh S (2011): Development of reversing the usual order of somatic cell nuclear transfer in mice. *J Emb Trans* 26:85-89.
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y (1998): Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282:2095-2098.
- Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Hwang WS, Hossein MS, Kim JJ, Shin NS, Kang SK, Lee BC (2007): Endangered wolves cloned from adult somatic cells. *Cloning Stem Cells* 9:130-137.
- Kimura Y, Yanagimachi R (1995): Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol Reprod* 52:709-720.
- Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, Hikichi T, Thuan NV, Wakayama S, Bui T, Wakayama T (2006): Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem Biophys Res Commun* 340:183-189.
- Kishigami S, Wakayama S, Thuan NV, Ohta H, Mizutani E, Hikichi T, Bui H-T, Ballbach S, Ogura A, Boiani M, Wakayama T (2006): Production of cloned mice by somatic cell nuclear transfer. *Nat Protoc* 1:125-138.
- Liu G, Kato Y, Tsunoda Y (2007): Aging of recipient oocytes reduces the development of cloned embryos receiving cumulus cells. *J Reprod Dev* 53: 785-790.
- Munsie MJ, Michalska AE, O'Brien CM, Trounson AO, Pera MF, Mountford PS (2000): Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei. *Curr Biol* 10:989-992.
- Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KH (2000): Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407:86-90.
- Rybouchkin A, Heindryckx B, Van der Elst J, Dhont M (2002): Developmental potential of cloned mouse embryos reconstructed by a conventional technique of nuclear injection. *Reproduction* 124:197-207.
- Rybouchkin A, Kato Y, Tsunoda Y (2006): Role of histone acetylation in reprogramming of somatic nuclei following nuclear transfer. *Biol Reprod* 74: 1083-1089.
- Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L, Westhusin (2002): A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 415: 859.
- Tsuji Y, Kato Y, Tsunoda Y (2009): The developmental potential of mouse somatic cell nuclear-transferred oocytes treated with trichostatin A and 5-aza-2-deoxycytidine. *Zygote* 17:109-115.
- Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR,

- Yanagimachi R (1998): Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394:369-374.
19. Wakayama T, Tabar V, Rodriguez I, Perry AC, Studer L, Mombaerts P (2001): Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* 292:740-743.
 20. Wakayama T, Yanagimachi R (2001): Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. *Mol Reprod Dev* 58:376-383.
 21. Wells DN, Misica PM, Tervit HR, Vivanco WH (1998): Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby island cattle breed. *Reprod Fertil Dev* 10:369-378.
 22. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH(1997): Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813.
 23. Zhou Q, Boulanger L, Renadr JP (2000): A simplified method for the reconstruction of fully competent mouse zygotes from adult somatic donor nuclei. *Cloning* 2:35-44.
- (접수일자: 2011. 9. 2 / 채택일자: 2011. 9. 9)