



hEPO 유전자의 유선조직 특이적 발현에 대한 *In Vitro* 검증

구본철 · 권모선 · 김태완[†]

대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실

In Vitro Assay of Mammary Gland Tissue Specific hEPO Gene 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

Effectiveness of transgene transfer into genome is crucially concerned in mass production of the bio-pharmaceuticals using genetically modified transgenic animals as a bioreactor. Recently, the mammary gland has been considered as a potential bioreactor for the mass production of the bio-pharmaceuticals, which appears to be capable of appropriate post-translational modifications of recombinant proteins. The mammary gland tissue specific vector system may be helpful in solving serious physiological disturbance problems which have been a major obstacle in successful production of transgenic animals. In this study, to minimize physiological disturbance caused by constitutive over-expression of the exogenous gene, we constructed new retrovirus vector system designed for mammary gland-specific expression of the hEPO gene. Using piggyBac vector system, we designed to express hEPO gene under the control of mammary gland tissue specific and lactogenic hormonal inducible goat β -casein or mouse Whey Acidic Protein (mWAP) promoter. Inducible expression of the hEPO gene was confirmed using RT-PCR and ELISA in the mouse mammary gland cells treated with lactogenic hormone. We expect the vector system may optimize production efficiency of transgenic animal and reduce the risk of global expression of transgene.

(Key words : Human Erythropoietin (hEPO), Mammary Gland Tissue Specific Gene Expression, β -Casein Promoter, WAP Promoter)

서 론

사람의 erythropoietin (hEPO)은 165개의 아미노산으로 이루어진 약 30 kDa의 분자량을 가지는 당단백질로서 주로 신장에서 생산되어 혈장을 타고 이동하여 골수에서의 적혈구 생산을 촉진한다(Fisher, 2003). 재조합 hEPO는 암 치료 시 나타나는 빈혈 치료제로 사용될 뿐만 아니라, 류마티스성 관절염, 후천성 면역 결핍증, 궤양성 대장염 및 겸상 적혈구 빈혈증에도 효과적인 것으로 알려져 있다(Jacobs 등, 2000; Maxwell, 2002). 현재 재조합 hEPO는 동물세포 배양 방법을 통하여 주로 생산되고 있는데, 이 방법은 높은 생산 비용과 시설이 요구되며 mycoplasma 나 virus에 의한 오염의 위험성과 배지에 포함된 혈청의 여러 가지 단백질 및 peptide로 인한 세포배양 후의 복잡

한 분리 정제 과정 등의 문제점을 가진다. 이러한 문제점에 대한 해결 방안으로 형질전환 동물을 생체반응기로 사용하여 바이오의약품 단백질의 대량 생산을 가능하게 하려는 연구가 진행되고 있으며, 특히 재조합 단백질을 형질전환 동물의 유선을 통하여 생산함으로써 단백질의 수확 및 분리 정제 과정을 단순화하고 외래 유전자의 지속적인 발현으로 인한 형질전환 개체의 생리적인 부작용을 최소화하려는 연구가 시도되고 있다. 이와 같이 형질전환 동물의 유선을 통한 외래 재조합 단백질의 생산은 물질 정제의 경제성과 용이성 및 적절한 번역 후 변형 과정(post-translational modification), 그리고 지속적인 생산 가능성 측면에서 생체반응기로서의 타당성을 가지고 있다(Clark, 1998; Houdebine, 2009). 이러한 유선조직 특이적인 재조합 단백질의 생산에 대한 연구로는 human lactoferrin을 형질전환 소의 유선에서 생산한 보고가 있

* 본 연구는 농림축산식품부 생명산업기술개발사업과 농촌진흥청 차세대 바이오그린21사업(과제번호: PJ011178)의 지원에 의해 이루어진 것임.

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

였으며(van Berkel 등, 2002), hEPO나 human serum albumin이 형질전환 생쥐의 유즙을 통해 분비된 연구 결과가 발표되었다(Mikus 등, 2001; Wu 등, 2012). 이 외에도 hG-CSF와 human lysozyme이 유즙으로 분비되는 형질전환 염소의 개발과(Batista 등, 2014; Maga 등, 2006; Yu 등, 2013) human lysozyme이 형질전환 돼지와 소의 유즙을 통해서 분비된 연구 보고가 있었으며(Tong 등, 2011; Yang 등, 2011), hGH를 유선으로 분비하는 형질전환 돼지 생산에 관한 연구도 발표되었다(Lipinski 등, 2012). 이러한 연구에서 가장 중요한 것은 목적 유전자의 유선조직 특이적인 발현이 가능하도록 효율적인 유전자 전이 vector system을 구축하는 것이다. 이에 본 연구에서는 hEPO 유전자의 발현이 유선조직 특이적으로 이루어지도록 하기 위하여 lactogenic hormone에 의하여 유도적인 활성을 가지는 유선조직 특이적인 promoter인 β -casein promoter와 whey acidic protein (WAP) promoter (Ball 등, 1988; Doppler 등, 1989; Doppler 등, 1991; McKnight 등, 1992; Paleyanda 등, 1994)를 도입한 유전자 전이 vector system을 구축하고자 하였다. 구축한 각각의 vector system을 이용하여 hEPO 유전자를 쥐의 유방 상피세포인 HC11 (Doppler 등, 1989)에 전이시킨 후 insulin, hydrocortisone, 그리고 prolactin의 lactogenic hormone의 첨가 유무에 따른 hEPO 유전자의 발현 조절 양상을 확인하였다. 본 연구에서 구축한 유선조직 특이적인 발현을 위한 유전자 전이 vector system은 외래 유전자의 지속적인 발현에 의한 형질전환 개체의 생리적인 불균형에서 오는 부정적인 문제 해결을 위한 수단이 될 것이다.

실험 방법

hEPO 유전자가 유선조직 특이적으로 발현되는 Vector의 구축

hEPO 유전자의 유선조직 특이적인 발현을 위하여 β -casein promoter와 WAP promoter를 도입한 piggyBac vector인 pPiggy- β Caseinp-hEPO-Puro와 pPiggy-mWAPp-hEPO-Puro vector는 다음과 같이 구축하였다. pPiggy- β Caseinp-hEPO-Puro vector는 pBC-1의 β -casein promoter 부분과 pLNC-hEPO의 hEPO 부분을 각각 분리하여 pPiggy-X-EF1-puro (System Biosciences, USA)와 재조합함으로써 구축하였다. pPiggy-mWAPp-hEPO-Puro vector는 본 연구실에서 보유하고 있는 pGEM-7Zf-mWAP vector에서 분리해낸 2.4 Kb의 WAP promoter와 pGEM-11Zf-hEPO vector에서 분리한 hEPO 단편을 재조합하여 확보하였다. 각각의 hEPO 유전자의 유선조직 특이적인 발현을 위한 piggyBac vector의 구조는 아래의 Fig. 1과 같다.

pPiggy- β Caseinp-hEPO-Puro가 도입된 세포주의 구축 및 유선조직 특이적인 hEPO 유전자 발현 유도

전 단계에서 구축한 piggyBac vector를 이용한 hEPO

pPiggy- β Caseinp-hEPO-EF1-Puro



pPiggy-mWAPp-hEPO-EF1-Puro



Fig. 1. Structures of pPiggy- β Caseinp-hEPO-Puro and pPiggy-mWAPp-hEPO-Puro vectors. ITR, inverted terminal repeat sequence; Ins, core insulator; β Caseinp, goat β -casein promoter; hEPO, human erythropoietin gene; EF1p, elongation factor-1 alpha promoter; Puro, puromycin resistance gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; pA, poly A signal; mWAPp, mouse whey acidic protein promoter.

유전자의 유선조직 특이적인 발현을 유도하기 위하여 pPiggy- β Caseinp-hEPO-EF1-Puro를 생쥐의 유선 세포인 HC11 세포에 transfection하였다. 하루 전에 HC11 세포를 60 mm 직경의 culture dish에 1×10^6 개로 준비한 후, 각각의 vector와 pPiggyBac-transposonase vector를 4 : 1 비율로 lipofectamine reagent (Invitrogen, USA)와 혼합하여 실온에 30분간 방치한 다음 transfection하였다. 이후 5 μ g/ml의 puromycin이 첨가된 배양액으로 2주간 선별하여 세포주를 확립하였다. 확립한 세포주의 lactogenic hormone에 의한 외래 유전자의 발현 유도 양상을 확인하기 위하여 Burdon 등(1994)의 연구에서 사용한 배양 조건을 도입하였다. HC11-pPiggy- β Caseinp-hEPO-EF1-Puro는 10%의 heat-inactivated FBS가 첨가된 RPMI 1640 배양액에 insulin (5 μ g/ml)과 mEGF (10 ng/ml)를 첨가하여 2일간 배양한 후, RPMI 1640 배지에 insulin (5 μ g/ml)만 첨가한 배지와 lactogenic hormone인 insulin (5 μ g/ml)과 mProlactin (5 μ g/ml), hydrocortisone (5 μ g/ml)이 모두 첨가된 RPMI 1640 배지에서 각각 4일 동안 배양하였다. hEPO 유전자의 발현 양상은 세포에서 분리한 RNA를 주형으로 한 RT-PCR과 세포 배양액에 포함된 hEPO를 정량 분석하기 위한 ELISA 실험 방법을 이용하여 확인하였다.

RT-PCR 방법을 이용한 유선조직 특이적인 hEPO 유전자 발현의 In Vitro 검정

먼저 HC11과 HC11-pPiggy- β Caseinp-hEPO-EF1-Puro 세포에서의 RNA 분리는 TRI Reagent (Molecular Research Center, USA)를 이용하여 수행하였다. 분리한 RNA로부터 cDNA를 생산하기 위하여 ImProm-II Reverse Transcription System Kit (Promega, USA)을 사용하였다. 제조한 cDNA를 주형으로 PCR을 실시하였는데 각 실험군의 cDNA 1 μ l를 10 pmol의 각 primer와 10 μ l의 2X GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA)와 혼합하여 최종 반응 용액의 부피를 20 μ l로 맞추고 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 초기 반응을 실시한 후 본격적인 PCR 증폭을 35회 실시하였다. 증폭 반응은 94 $^{\circ}$ C에서 30초(변성), 56~60 $^{\circ}$ C에서 30초(primer 부착), 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 30초(신장)의 3단계로 이루어졌으며, 35회의 증폭 반응이 종결된 후 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 최종 신장 반응을 실시하였다. RT-PCR에 사용한 primer는 hEPO와 puromycin 저항성 유전자에 대한 서열이며 mouse GAPDH 유전자에 대한 pri-

Table 1. Primers used in RT-PCR analyses

Gene	Sequence	Product size (bp)
hEPO	5'-GCTGAACACTGCAGCTTGAATGAG-3' (+) 5'-GGAAGAGTTTGC GGAAAGTGCAG-3' (-)	340
PuroR	5'-TGATCAATGACCCGAGTACAAGCCAC-3' (+) 5'-TTCGAATCAGGCACCGGGCTTGC GGG-3' (-)	612
mouse GAPDH	5'-AATGCATCCTGCACCACCAACT-3' (+) 5'-TTCAGCTCTGGGATGACCTTGC-3' (-)	230

mer를 대조구로 사용하였다(Table 1).

ELISA 방법을 이용한 유선조직 특이적인 hEPO 유전자 발현의 In Vitro 검정

HC11과 HC11-pPiggy- β Caseinp-hEPO-EF1-Puro 세포를 각각 DMEM/FBS 배지에서 48시간 배양한 후 그 배양액을 수확하여 적절히 희석한 다음 Quantikine IVD Epo kit (R&D systems, USA)을 사용하여 ELISA를 수행하였다. 먼저 희석한 standard와 세포 배양액을 plate의 각 well에 200 μ l씩 넣어서 실온에서 3시간 방치한 후 wash buffer로 4회 수세하였다. 다음 단계로 각 well에 200 μ l의 anti-hEPO-HRP conjugate를 더하여 실온에서 1시간 방치한 후 wash buffer로 4회 수세하였으며 200 μ l의 tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution을 각 well에 더하여 빛을 차단시킨 상태로 실온에서 30분간 방치하였다. 이 후 stop solution을 더하여 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

pPiggy-mWAPP-hEPO-EF1-Puro가 도입된 세포주의 구축 및 유선조직 특이적인 hEPO 유전자 발현 검정

pPiggy-mWAPP-hEPO-EF1-Puro vector도 pPiggy- β Caseinp-hEPO-EF1-Puro vector와 동일한 과정으로 실험을 진행하였다. hEPO 유전자의 유선조직 특이적인 발현을 유도하기 위한 세포배양 과정도 전자와 동일하게 진행하였으며 발현 양상 확인을 위한 방법으로 RT-PCR과 ELISA를 실시하였다.

세포에서 생산된 재조합 hEPO의 생물학적 활성 검정

HC11-pPiggy-mWAPP-hEPO-EF1-Puro에서 생산된 재조합 hEPO의 생물학적 활성은 hEPO에 의해 증식이 유도되는 세포인 TF-1 세포(human erythroleukemia cell line)를 이용하여 측정하였다. TF-1 세포는 10% FBS와 2 ng/ml의 rhGM-CSF가 첨가된 RPMI-1640 배지에서 키운 후 2×10^5 /ml로 세포를 준비하여 96 well microplate에 50 μ l씩 첨가하였다. ELISA 방법으로 정량한 세포 배양액 sample과 standard hEPO를 동일한 농도로 보정하여 2배 수 단계 희석을 실시한 후 각 well에 50 μ l씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂에서 48시간 동안 반응시켰다. 각 well에 MTT labeling reagent를 10 μ l씩 첨가한 후 37°C, 5% CO₂에서 4시간 동안 반응시킨 다음 solubilization solution을 각 well에 100 μ l씩 첨가하여 16시간 동안 방치하였다. 반응이 종결된 plate는 microplate reader로 595

nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

결 과

pPiggy- β Caseinp-hEPO-EF1-Puro Vector를 이용한 유선조직 특이적인 hEPO 유전자 발현의 In Vitro 검정

유선조직 특이적인 발현을 위하여 β -casein promoter 혹은 WAP promoter 조절 하에 hEPO 유전자를 도입한 piggyBac vector인 pPiggy- β Caseinp-hEPO-EF1-Puro와 pPiggy-mWAPP-hEPO-EF1-Puro vector를 구축한 후 각 vector를 표적세포에 도입하였다. 먼저 pPiggy- β Caseinp-hEPO-EF1-Puro vector가 도입된 HC11 세포에서 lactogenic hormone의 첨가 유무에 따른 외래 유전자의 발현 양상이 효율적으로 이루어지는지의 여부를 확인하고자 하였다. 그 결과, RT-PCR 실험에서는 vector가 도입되지 않은 세포에서는 외래 유전자의 전이가 확인되지 않는데 비해서 vector가 도입된 세포에서는 hormone 존재 여부와 상관없이 hEPO 및 puromycin 저항성 유전자에 대한 PCR 증폭 단편이 나타났다(Fig. 2). 또한 모든 세포에서의 전사 과정이 정상적으로 일어나는가에 대한 대조구로서의 GAPDH 유전자에 대한 증폭은 모든 세포에서 확인되었다(Fig. 2).

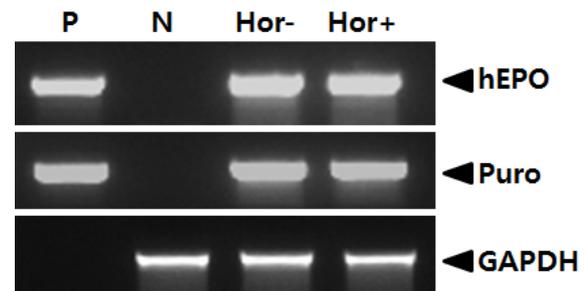


Fig. 2. Detection of the transgene in target cells. Total RNA isolated from the transfected cells and subjected to RT-PCR analysis. Lane P, positive control (pPiggy- β Caseinp-hEPO-EF1-Puro); lane N, untransfected cell; Hor-, HC11-Piggy- β Caseinp-hEPO-EF1-Puro was fed with the media supplemented with insulin only; Hor+, HC11-Piggy- β Caseinp-hEPO-EF1-Puro was fed with the media supplemented with insulin, prolactin and hydrocortisone for 4 days.

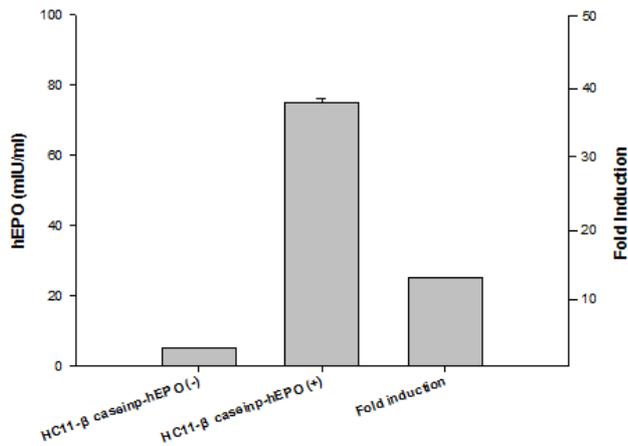


Fig. 3. Expression of the *hEPO* gene in HC11-Piggy-β Caseinp-hEPO-EF1-Puro. The levels of hEPO secreted into cell culture media were measured by ELISA. Lane HC11-β Caseinp-hEPO (-), HC11-Piggy-β Caseinp-hEPO-EF1-Puro was fed with the media supplemented with insulin only; HC11-β Caseinp-hEPO (+), HC11-Piggy-β Caseinp-hEPO-EF1-Puro was fed with the media supplemented with insulin, prolactin and hydrocortisone for 4 days.

HC11-Piggy-β Caseinp-hEPO-EF1-Puro의 lactogenic hormone의 공급 여부에 따른 hEPO 발현 양상을 확인하기 위하여 실험을 진행하였다. Lactogenic hormone을 첨가하지 않은 배지와 첨가한 배지에서 각각 배양한 세포의 hEPO 정량 분석을 실시한 결과, hormone을 첨가하지 않은 조건에서는 5.1 mIU/ml의 농도를 나타내었고 lactogenic hormone이 첨가된 조건에서는 75.2 mIU/ml의 농도를 나타내었다(Fig. 3). 이에 lactogenic hormone에 의한 HC11-Piggy-β Caseinp-hEPO-EF1-Puro 세포에 있어서의 *hEPO* 유전자 발현 유도율은 약 14.7배인 것으로 확인되었다.

pPiggy-mWAPP-hEPO-EF1-Puro Vector를 이용한 유선조직 특이적인 *hEPO* 유전자 발현의 *In Vitro* 검정

또 다른 유선조직 특이적인 promoter인 mWAP promoter가 도입된 vector인 pPiggy-mWAPP-hEPO-EF1-Puro를 transfection한 HC11-Piggy-mWAPP-hEPO-EF1-Puro 세포에서도 HC11-Piggy-β Caseinp-hEPO-EF1-Puro와 동일한 과정으로 실험을 실시하였다. RT-PCR 결과에서는 HC11-Piggy-β Caseinp-hEPO-EF1-Puro와 마찬가지로 외래 유전자의 전이는 vector를 transfection한 세포에서만 확인되었으며 대조구로서의 GAPDH에 대한 증폭은 모든 세포에서 이루어졌다(Fig. 4).

HC11-Piggy-mWAPP-hEPO-EF1-Puro의 lactogenic hormone의 처리 유무에 따른 hEPO 발현 양상의 변화를 확인하기 위하여 lactogenic hormone을 첨가하지 않거나 첨가한 배지에서 각각 4일간 배양한 후 ELISA 방법으로 hEPO 정량 분석을 실시하였다. 그 결과, HC11-Piggy-

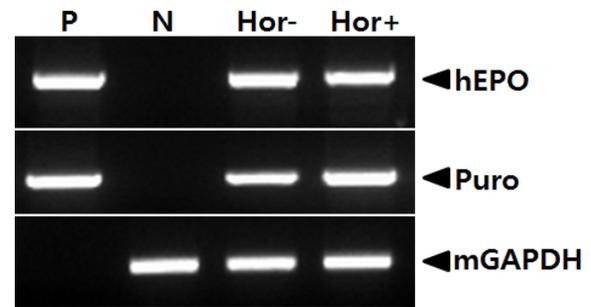


Fig. 4. Detection of the transgene in target cells. Total RNA isolated from the transfected cells and subjected to RT-PCR analysis. Lane P, positive control (pPiggy-mWAPP-hEPO-EF1-Puro); lane N, untransfected cell; Hor-, HC11-Piggy-mWAPP-hEPO-EF1-Puro was fed with the media supplemented with insulin only; Hor+, HC11-Piggy-mWAPP-hEPO-EF1-Puro was fed with the media supplemented with insulin, prolactin and hydrocortisone for 4 days.

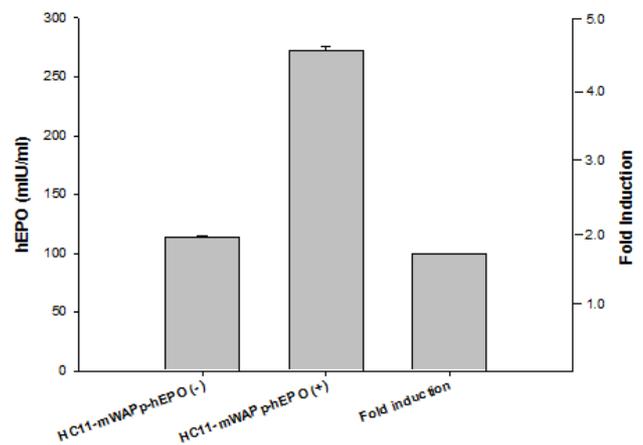


Fig. 5. Expression of the *hEPO* gene in HC11-Piggy-mWAPP-hEPO-EF1-Puro. The level of hEPO secreted into cell culture media was measured by ELISA. Lane HC11-mWAPP-hEPO (-), HC11-Piggy-mWAPP-hEPO-EF1-Puro was fed with the media supplemented with insulin only; HC11-mWAPP-hEPO (+), HC11-Piggy-mWAPP-hEPO-EF1-Puro was fed with the media supplemented with insulin, prolactin and hydrocortisone for 4 days.

mWAPP-hEPO-EF1-Puro는 lactogenic hormone이 첨가되지 않은 조건과 첨가된 조건에서 각각 113.5 mIU/ml와 272.5 mIU/ml의 측정값을 나타내었으며 발현 유도율은 1.95배로 나타났다(Fig. 5). 이상의 결과에서 mWAP promoter의 조절 하에서 *hEPO* 유전자의 유선조직 특이적인 발현이 유도되는 것을 확인할 수 있었다.

HC11-Piggy-mWAPP-hEPO-EF1-Puro에서 생산한 재조합 hEPO의 생물학적 활성은 TF1 세포의 증식 유도 양상을 이용하여 확인하였다. 현재 시판되고 있는 CHO 세포에서 생산된 재조합 hEPO를 대조구로 하여 실험한 결과, 본 연구에서 생산한 hEPO가 대조구 hEPO에 비해 비교적 높은 활성을 가지는 것으로 확인되었다(Fig. 6).

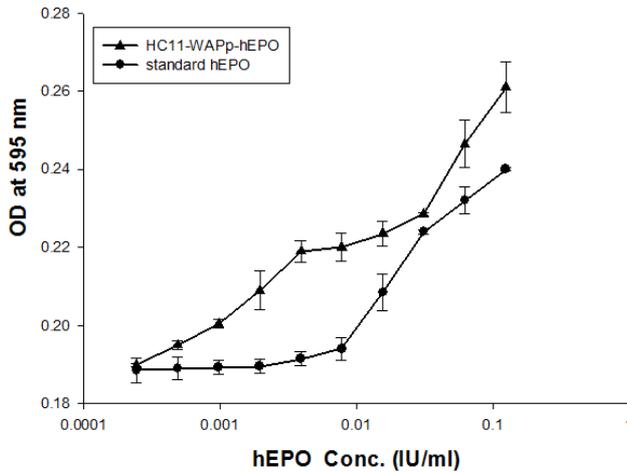


Fig. 6. Bioassay of hEPO in HC11-Piggy-mWAPp-hEPO-EF1-Puro on the proliferation of TF-1 cells. Various concentration of hEPOs were added to each well, and the incubation was continued for a further 2 day.

고 찰

대장균이나 효모, 또는 사상균, 조류 등의 단세포 진핵 생물을 이용해서 생산하는 재조합 단백질의 경우 glycosylation 등의 번역 후 변형 과정이 없거나 적절하게 일어나지 않아서 단백질의 생물학적 활성이 매우 저조하거나 번역원성이 높게 나타나는 경우가 많다(Dyck 등, 2003). 이에 반해 동물세포 배양이나 형질전환 동물을 재조합 단백질 생산 수단으로 사용하는 경우에는 비교적 번역 후 단백질의 변형이 매우 적절하게 일어나는 것으로 보고되어 있다(Clark, 1998). 본 연구에서 생산하고자 하는 재조합 hEPO 또한 생체 내에서의 조절 촉진 작용을 위한 생물학적 활성이 높고 반감기가 길기 위해서는 glycosylation 등의 적절한 번역 후 변형 과정이 필수적이다. 현재 시판되고 있는 재조합 hEPO는 주로 동물세포 배양 방법으로 생산되고 있는데(Krantz, 1991; Kim 등, 2005), 이 방법은 생산 시설 및 소모성 비용이 많이 들고 고도의 숙련된 기술이 요구된다. 이에 비해 형질전환 동물을 재조합 단백질의 대량 생산을 위한 생체반응기로 이용할 경우 생산 비용의 경제적 절감 및 glycosylation이나 gammacarboxylation과 같은 복잡한 번역 후 변형이 가능하며, 그리고 인간의 혈액에서 유래되는 human immunodeficiency virus와 hepatitis virus 등의 병원체 감염의 우려로부터 자유로울 수 있다(Meade 등, 1998). 특히 사람과 계통발생학적으로 근접한 포유류들은 glycosylation 양상이 매우 비슷하여 형질전환 포유류의 유즙을 통해 발현되는 사람의 단백질은 사람의 혈청에 포함된 단백질과 매우 유사한 형태를 가지는 것으로 알려져 있다(Meade 등, 1998). Glycosylation은 치료용 단백질 생산에 있어서 매우 중요한 번역 후 변형 과정으로 단백질의 안정화, 반감기, 면역반응, 세포내 signaling, 그리고

세포와 세포 사이 또는 세포와 세포의 기질 간의 신호 전달에도 큰 역할을 한다(Fussenegger 등, 1999; Varki 등, 1999). 이러한 장점에도 불구하고 형질전환 동물에서의 재조합 hEPO를 생산하는 연구가 성공적인 경우는 매우 드문 실정으로, 생산량이 매우 미미하여 상업적인 가치가 없는 수준이거나 적혈구증가증의 발생으로 인한 형질전환 개체의 치사 또는 치명적인 생리적 부작용을 나타내는 것으로 보고되었다(Massoud 등, 1996; Mikus 등, 2004). 실제적으로 유선조직에 특이적으로 발현되는 조절 system을 구축하더라도 개체 내의 타 조직에 일부 hEPO 유전자의 발현이 나타나서 배아 발달 단계에서 배아가 치사되거나 매우 낮은 수준의 hEPO 발현을 나타내는 개체만이 태어난 연구 보고도 있었다(Massoud 등, 1996). 따라서 보다 완벽한 조직 특이적 발현 system을 구축하여 외래 유전자의 비특이적 발현에 의한 형질전환 개체의 생리적인 손실을 최소화함으로써 유즙을 통한 재조합 치료용 단백질의 생산이 성공적으로 이루어질 수 있도록 하여야 하며 이의 일환으로 본 연구에서는 유선조직 특이적인 hEPO 유전자 발현 system을 구축하고자 하였다. 유즙을 구성하는 단백질 중 70% 이상을 차지하는 casein 단백질의 특성을 고려하여 형질전환 동물을 생체반응기로 사용하여 유즙으로의 생리활성 단백질 생산을 위한 연구에 있어서 β -casein promoter가 주로 사용되고 있으며(Ko 등, 2000; Brophy 등, 2003; Yekta 등, 2013), 또 다른 유선조직 특이적인 promoter인 WAP promoter를 사용한 연구도 이루어지고 있다(Paleyanda 등, 1994; Lipinski 등, 2012). 이러한 유선조직 특이적인 vector system을 이용하여 소나 염소, 생쥐 등에서 human lactoferrin, hG-CSF, 그리고 hEPO 등의 재조합 단백질 생산이 보고되었다(van Berkel 등, 2002; Batista 등, 2014; Mikus 등, 2001). 유선조직 특이적인 promoter에 의한 외래 단백질 생산 양상을 *in vitro*에서 검정하기 위한 실험에서는 주로 생쥐의 유선상피세포인 HC11을 사용하는데, 이 HC11 세포는 생쥐의 주요 유단백질인 β -casein을 생산하는 능력을 가지고 있다(Danielson 등, 1984). 또한 이 세포는 β -casein 단백질의 합성을 효율적으로 유도하기 위해 세포의 기질의 공급이나 다른 섬유아세포나 지방세포와의 공배양 등을 필요로 하지 않고 단지 lactogenic hormone인 prolactin과 hydrocortisone, 그리고 insulin에 의해 유단백질의 발현이 조절되는 것으로 알려져 있다(Topper와 Freeman, 1980). 특히 prolactin은 HC11 세포의 β -casein 단백질 전사 효율을 증가시키는 것으로 알려져 있으며(Ball 등, 1988), 다른 lactogenic hormone과 상호존속적인 발현 조절 양상을 나타낸다고 보고되어 있다(Doppler 등, 1989). 이러한 호르몬에 의한 효율적인 단백질의 합성 유도 현상은 분화가 종결된 유선 상피 조직에 국한되어 일어난다(Topper와 Freeman, 1980; Levine와 Stockdale, 1985). 본 연구에서는 유선조직 특이적인 유전자 전이 system을 이용하여 hEPO 유전자의 발현이 유선 상피 세포인 HC11에서 lactogenic hormone에 의하여 유도적으로 이루어지도록 하였다. 그 결과 β -casein promoter가 도입된 vector system을 이용한 실험에서는 lactogenic hormone에 의한 hEPO의 발현 유도율이 14.7 배로 나타났으며, WAP promoter를 도입한 실험에서는

1.95배의 발현 유도율을 나타내었다. 이상의 결과로 본 연구에서 구축한 유전자 전이 system은 형질전환 동물의 생리적인 부작용을 최소화하면서 유즙을 통한 재조합 단백질의 대량 생산 연구에 활용할 수 있으리라 예상된다.

REFERENCES

- Ball RK, Friis RR, Schoenenberger CA, Doppler W, Groner B (1988): Prolactin regulation of beta-casein gene expression and of a cytosolic 120-kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. *EMBO J* 7:2089-2095.
- Batista RI, Melo CH, Souza-Fabjan JM, Teixeira DI, Melo LM, Freitas VJ (2014): Phenotypic features of first-generation transgenic goats for human granulocyte-colony stimulation factor production in milk. *Biotechnol Lett* 36:2155-2162.
- Brophy B, Smolenski G, Wheeler T, Wells D, L'Huillier P, Laible G (2003): Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. *Nat Biotechnol* 21:157-162.
- Burdon, TG, Maitland KA, Clark AJ, Wallace R, Watson CJ (1994): Regulation of the sheep beta-lactoglobulin gene by lactogenic hormones is mediated by a transcription factor that binds an interferon-gamma activation site-related element. *Mol Endocrinol* 8:1528-1536.
- Clark AJ (1998): The mammary gland as a bioreactor: expression, processing, and production of recombinant proteins. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3:337-350.
- Danielson KG, Oborn CJ, Durban EM, Butel JS, Medina D (1984): Epithelial mouse mammary cell line exhibiting normal morphogenesis *in vivo* and functional differentiation *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:3756-3760.
- Doppler W, Groner B, Ball RK (1989): Prolactin and glucocorticoid hormones synergistically induce expression of transfected rat beta-casein gene promoter constructs in a mammary epithelial cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:104-108.
- Doppler W, Villunger A, Jennewein P, Brduscha K, Groner B, Ball RK (1991): Lactogenic hormone and cell-type specific control of the whey acidic protein gene promoter in transfected mouse cells. *Mol Endocrinol* 5:1624-1632.
- Dyck MK, Lacroix D, Pothier F, Sirard MA (2003): Making recombinant proteins in animals - different systems, different applications. *Trends Biotechnol* 21:394-399.
- Fisher JW (2003): Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med* 228:1-14.
- Fussenegger M, Bailey JE, Hauser H, Mueller PP (1999): Genetic optimization of recombinant glycoprotein production by mammalian cells. *Trends Biotech* 17:35-42.
- Houdebine LM (2009): Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 32:107-121.
- Jacobs C, Horl WH, Macdougallm IC (2000): European best practice guidelines 9-13: anaemia management. *Nephrol Dial Transpl* 15:33-42.
- Kim NY, Kim JH, Kim HJ (2005): Effect of low adapted temperature and medium composition on growth and erythropoietin (EPO) production by Chinese hamster ovary cells. *Arch Pharm Res* 28:220-226.
- Ko JH, Lee CS, Kim KH, Pang MG, Koo JS, Fang N, Koo DB, Oh KB, Youn WS, Zheng GD, Park JS, Kim SJ, Han YM, Choi IY, Lim J, Shin ST, Jin SW, Lee KK, Yoo OJ (2000): Production of biologically active human granulocyte colony stimulating factor in the milk of transgenic goat. *Transgenic Res* 9:215-222.
- Krantz SB (1991): Erythropoietin. *Blood* 77:419-434.
- Levine JF, Stockdale FE (1985): Cell-cell interactions promote mammary epithelial cell differentiation. *J Cell Biol* 100:1415-1422.
- Lipinski D, Zeyland J, Szalata M, Plawski A, Jarmuz M, Jura J, Korcz A, Smorag Z, Pienkowski M, Slomski R (2012): Expression of human growth hormone in the milk of transgenic rabbits with transgene mapped to the telomere region of chromosome 7q. *J Appl Genet* 53:435-442.
- Maga EA, Shoemaker CF, Rowe JD, Bondurant RH, Anderson GB, Murray JD (2006): Production and processing of milk from transgenic goats expressing human lysozyme in the mammary gland. *J Dairy Sci* 89:518-524.
- Massoud M, Atta J, Thepot D, Pointu H, Stinnakre MG, Theron MC, Lopez C, Houdebine LM (1996): The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits. *Reprod Nutr Dev* 36:555-563.
- Maxwell AP (2002): Novel erythropoiesis stimulating protein in the management of the anemia of chronic renal failure. *Kidney Int* 62:720-729.
- Meade HM, Echelard Y, Ziomek CA, Young MW, Harvey M, Cole ES, Groet S, Smith TE, Curling JM (1998): Expression of recombinant proteins in the milk of transgenic animals. In: Gene expression systems: using nature for the art of expression. Fernandez JM, Hoeffler JP (eds). Academic Press, San Diego, pp 399-427.
- McKnight RA, Shamay A, Sankaran L, Wall RJ, He-

- nnighausen L (1992): Matrix attachment regions can impart position independent regulation of a tissue-specific gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:6943-6947.
24. Mikus T, Malý P, Poplstein M, Landa V, Trefil P, Lidický J (2001): Expression of human erythropoietin gene in the mammary gland of a transgenic mouse. *Folia Biol (Praha)* 47:187-195.
25. Mikus T, Poplstein M, Sedlakova J, Landa V, Jenikova G, Trefil P, Lidický J, Maly P (2004): Generation and phenotypic analysis of a transgenic line of rabbits secreting active recombinant human erythropoietin in the milk. *Transgenic Res* 13:487-498.
26. Paleyanda RK1, Zhang DW, Hennighausen L, McKnight RA, Lubon H (1994): Regulation of human protein C gene expression by the mouse WAP promoter. *Transgenic Res* 3:335-343.
27. Tong J, Wei H, Liu X, Hu W, Bi M, Wang Y, Li Q, Li N (2011): Production of recombinant human lysozyme in the milk of transgenic pigs. *Transgenic Res* 20:417-419.
28. Topper YJ, Freeman CS (1980): Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol Rev* 60:1049-1106.
29. van Berkel PH, Welling MM, Geerts M, van Veen HA, Ravensbergen B, Salaheddine M, Pauwels EK, Pieper F, Nuijens JH, Nibbering PH (2002): Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. *Nat Biotechnol* 20:484-487.
30. Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J (1999): *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
31. Wu X, Lin Y, Xiong F, Zhou Y, Yu F, Deng J, Huang P, Chen H (2012): The extremely high level expression of human serum albumin in the milk of transgenic mice. *Transgenic Res* 21:1359-1366.
32. Yang B, Wang J, Tang B, Liu Y, Guo C, Yang P, Yu T, Li R, Zhao J, Zhang L, Dai Y, Li N (2011): Characterization of bioactive recombinant human lysozyme expressed in milk of cloned transgenic cattle. *PLoS One* 16;6:e17593.
33. Yekta AA, Dalman A, Eftekhari-Yazdi P, Sanati MH, Shahverdi AH, Fakheri R, Vazirinasab H, Daneshzadeh MT, Vojgani M, Zomorodipour A, Fatemi N, Vahabi Z, Mirshahvaladi S, Ataei F, Bahraminejad E, Masoudi N, Rezazadeh Valojerdi M, Gourabi H (2013): Production of transgenic goats expressing human coagulation factor IX in the mammary glands after nuclear transfer using transfected fetal fibroblast cells. *Transgenic Res* 22:131-142.
34. Yu H, Chen J, Liu S, Zhang A, Xu X, Wang X, Lu P, Cheng G (2013): Large-scale production of functional human lysozyme in transgenic cloned goats. *J Biotechnol* 168:676-83.

(Received: March 2 2016/ Accepted: March 7 2016)