

Transgenic mouse embryo를 이용한 human HoxA 유전자의 조절부위 분석과 전후축 형태형성(anterior-posterior axial pattern formation)에 미치는 영향

장승익 · 민원기* · 박종훈* · 이철상* · 이경광* · 이영원* · 전무형 · 김명희*

충남대학교 수의과대학
한국과학기술연구원 유전공학연구소*
(1994년 11월 28일접수)

Analysis of human HoxA gene control region and its effects on anterior-posterior
axial pattern formation using transgenic mouse embryo

Seung-ik Jang, Won-gi Min*, Jong-hoon Park*, Chul-sang Lee*,
Kyung-kwang Lee*, Young-won Lee*, Moo-hyung Jun, Myoung-hee Kim*

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University
Genetic Engineering Research Institute, KIST*

(Received Nov 28, 1994)

Abstract : The human homolog of position specific element of mouse Hoxa-7 was studied using transgene. It contains a 1.1 kb human DNA (HCR)—a homolog to the intergenic region between Hoxa-7 and -9, which directs the position specific expression of Hoxa-7—, tk promoter, LacZ (β -galactosidase) gene as a reporter, and polyadenylation signal of SV40 large T antigen. It was injected into the mice embryos, and the resulting transgenic embryos were analysed through PCR as well as genomic Southern blotting with placenta DNA. Out of 20 embryos analysed, two were transgenic. Among them, one transgenic embryo expressed transgene when stained with X-gal. The expression pattern was in analogy to that of the mouse Hoxa-7, showing spatially restricted expression pattern. Since the expression of β -galactosidase is regulated by the upstream human HCR sequence, it implies that the HCR is the plausible position specific regulatory element of human.

Key words : human, HOXA, control region, X-gal staining, transgenic mouse embryo

서 론

초기 배발생 동안 한개의 수정란 세포가 다양한 발생 과정을 통하여 다형태의 기관 및 조직으로 분화되어 특징적인 개체로 성장한다. 이러한 일련의 과정에는 mat-

ernal effect genes, gap genes, pair-rule genes, segment polarity genes, homeotic genes 등의 여러가지 유전자가 관여하는 것으로 알려져 있으며^{1,2,3} 이러한 유전자들은 배발생동안 시공간적으로 특이하게 발현되는 것으로 알려져 있다^{4,5}.

Homeotic 유전자군에 속하는 Hox 유전자는 현재 사람과 마우스에서 각각 38개씩 발견되었으며 이들은 염색체상에서 cluster를 이루며 존재하고 있고 각각의 Hox 유전자들은 183 bp DNA 즉, 61개의 아미노산을 암호화하는 homeobox라고 불리는 영역을 포함하고 있으며 척추, 무척추 동물의 체형(body pattern)을 조절한다. Hox cluster는 *C elegans*와 *Drosophila* 등을 포함하는 곤충으로부터 마우스 및 사람에게 이르기까지 거의 모든 동물에서 발견되고 있다^{6,7,8}. 마우스와 사람은 4개의 Hox clusters를 갖고 있으며 각각 서로 다른 염색체에 위치하고 HoxA, HoxB, HoxC, HoxD로 명명되었다: HoxA는 사람 염색체 7번 (마우스 6), HoxB는 17번 (마우스 11), HoxC는 12번 (마우스 15), HoxD는 2번 (마우스 2)에 위치한다^{9,10,11,12}. 그리고 이들 각 cluster에는 약 10여개의 Hox 유전자들이 존재하는데 이들은 13개의 군으로 나뉘어지며^{13,14} 특이한 점은 cluster 내에서의 위치와 발현되는 부위 및 시기가 colinear한 점이다. 즉, 한 cluster 내에서 더 3' 쪽에 위치한 유전자는 머리(anterior)쪽부터 꼬리를 축으로 볼때 점점 더 전방 부위에서 발현이 되며, 유전자가 5' 쪽에 위치할수록 점점 더 후방 부위에서부터 발현이 시작된다. 또 발현시기 역시 증배엽이 형성되기 시작할 gastrulation 초기부터 발현이 시작되어 기관의 형성이 끝나는 후기 gastrulation 시기까지 발현이 지속되는데, 더 5' 쪽에 위치한 유전자가 3' 쪽에 위치한 유전자보다 점진적으로 더 늦게 발현이 된다¹⁵. 증배엽이 형성됨과 동시에 전방쪽부터 후방으로 생물의 positional identity가 결정이 된다고 알려져 있는데 동시기에 differential expression을 하는 Hox 유전자들이 이에 관여한다는 설이 Hox code (어떤 combination으로 Hox 유전자들이 발현되는가에 따라 몸의 각 부분들, 즉 pattern이 결정된다는 설)의 제창과 함께 강력히 제기되고 있으며 근래에 들어 homologous recombination을 이용한 Hox 유전자의 knocking out 실험에 의한 loss of function이나 transgenic mice를 이용한 gain of function 실험을 통하여 부분적으로 증명이 되고 있다^{16,17,18}.

그러면 Hox 유전자의 시공간적인 differential expression은 어떻게 조절이 되는 것인가? 여기에 관한 해답을 얻기 위하여 마우스의 경우는 transgenic system을 통하여 몇몇 Hox 유전자의 시공간 조절인자(i.e. position specific element)들이 밝혀졌으나¹⁹ 사람의 경우는 전혀 연구가 되어져 있지 않다. 본 연구에서는 마우스 Hoxa-7의 공간특이 조절인자(position specific control element)와 염기서열간의 상동성이 높은 human DNA(HCR) fragment를 이용하여 transgene을 구축하

고 이를 mouse embryo에 microinjection(미세주입)하여 transgene의 발현이 HCR에 의하여 어떻게 조절되는지를 관찰하고자 일련의 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

pHJ-1 플라스미드 제작 : 벡터는 pL680(Max-Planck-Institute의 Dr Peter Gruss로부터 분양받음)을 제한효소 *Hind*III와 *Bam*HI(Boehringer Mannheim, Germany)으로 절단하여 전기영동 한 후 6.9kb의 band를 추출하여 사용하였고²⁰ 삽입유전자는 human genomic library에서 분리한 HCR(mouse Hoxa-7의 control region과 염기서열간의 상동성이 높은 human DNA fragment)을 포함하고 있는 플라스미드 pHM을 한국과학기술연구원 유전공학연구소 Dr Kim et al.으로부터 분양받아 사용하였다. pHM을 제한효소 *Sma*I로 절단하여 이를 Southern blot analysis를 이용하여 mouse Hoxa-7 control region과 염기서열간의 상동성이 가장 높은 DNA fragment(HCR 1.1kb)를 확인한 후 추출하여 플라스미드 (Bluescript SK, Stratagene, USA)의 *Sma*I site에 ligation시켜 pHCR을 얻었다.

이 pHCR을 제한효소 *Hind*III와 *Bam*HI으로 절단하여 HCR 1.1kb를 추출하여 벡터 pL과 Sambrook et al²⁰의 방법으로 ligation 시킨 후 Hanahan²²의 방법으로 DH5a(*E coli* strain)에 transformation 하여 pHJ-1을 얻었다.

Transgenic mouse embryo 제작 : pHJ-1 플라스미드를 제한효소 *Hind*III와 *Sna*BI으로 절단하여 LacZ 유전자와 사람 유래의 1.1kb fragment를 포함하는 4.9kb band를 추출해 내었다. 이때 DNA의 농도는 2ng/ μ l이 되도록 미세주입용 용액(10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA)으로 조정하였다. Transgenic mouse embryo는 Hogan et al²³의 방법을 이용하여 만들었다. 6주령의 F1 hybrid(C57BL/6 X DBA) 암컷 마우스에 5IU씩 pregnant mare serum gonadotropin (PMSG, Sigma, USA)을 복강내 투여하고 48시간후 5IU의 human chorionic gonadotropin(HCG, Sigma, USA)을 복강내 투여해서 과배란을 유도하였다. 다음 암컷 마우스를 F1 수컷 마우스(C57BL/6 X DBA)와 교배를 시켰고 다음날 1 세포기 수정란을 M2 medium³¹에 부유시켰다. 미세주입을 위한 1세포기 마우스 수정란을 얻기 위해서 HCG 투여후 약 20시간째에 마우스의 난관 팽대부를 터뜨려 난구세포 덩어리를 회수하였다. 이들로 부터 난구세포를 제거하기 위하여 hyaluronidase 용액

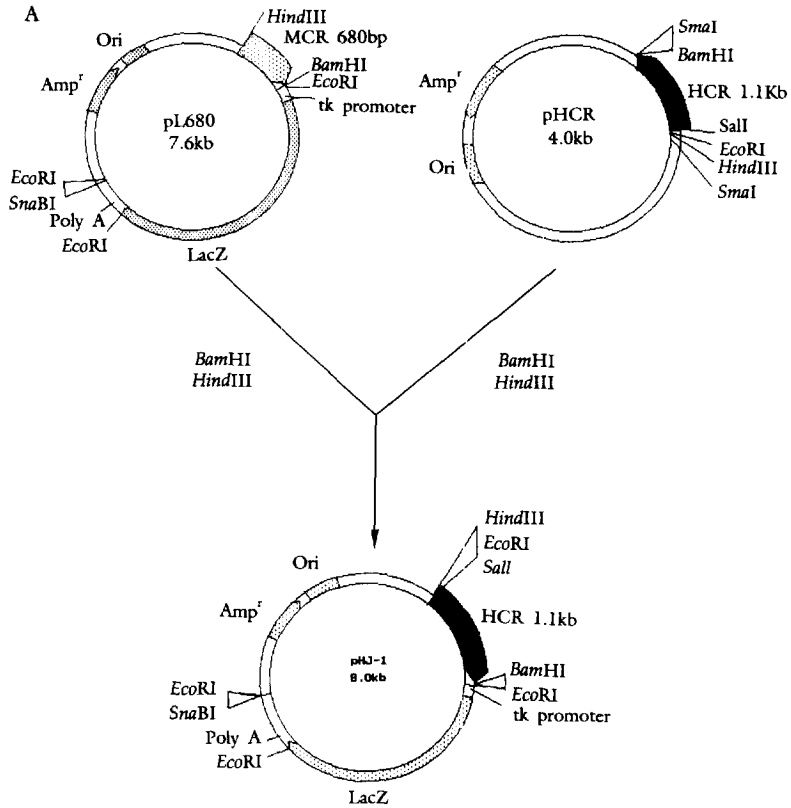


Fig 1. A: Construction scheme of the plasmid, pHJ-1, containing HCR 1.1kb DNA fragment originated from pHCR. B: Agarose gel electrophoresis showing restriction enzyme digested pHJ-1 DNA. M, 1kb ladder marker, lane 1, *HindIII/BamHI*; lane 2, *EcoRI*; lane 3, *HindIII/SnaBI*. Arrowhead indicates the 4.9kb transgene, HJ-1.

(300µg/ml)에서 3분간 처리 후 12,000rpm에서 5분간 원심분리하여 두개의 전핵이 보이는 수정란에 미세주입 하였다.

X-gal 염색 : 임신된 마우스의 중정부를 잘라 자궁으로부터 분리된 embryo를 phosphate buffered saline (PBS: NaCl 8g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄ 1.44g, KH₂PO₄ 0.24g/liter)이 담겨있는 24 well plate에 넣어 세척한 후 PBS를 제거하여 2ml의 고정액(37% formaldehyde 1.35ml, 25% glutaraldehyde 0.4ml, 10% Nonidet P-40 0.1ml, 20X PBS 2.5ml, D.W 46.65ml/50ml)을 넣어 4℃에서 30분동안 고정 시켰다. 다음에 PBS로 20분씩 2회 세척하고 2ml의 X-gal 염색액 [X-gal (in DMSO, 40mg/ml) 0.25ml, 500mM K₃Fe(CN)₆ 0.1ml, 500mM K₄Fe(CN)₆ 0.1ml, 100mM MgCl₂ 0.2ml, PBS 9.35ml/10ml]을 첨가하여 1-2일동안 30℃에서 염색하였고 염색이 끝난 후 PBS에 넣어 4℃에서 보관하였다. 그리고 embryos를 30, 50, 60, 75, 80, 90% glycerol로 clearing 하여 Kodak film(USA)으로 각 부위 별로 사진촬영을 실시하였다.

Genomic DNA의 추출 : Ausubel et al²⁴의 방법을 변형하여 추출하였다. 임신된 마우스의 10.5-12.5일령 embryo로부터 분리된 태반에 700µl의 proteinase K buffer(10mM Tris-HCl pH 7.8, 5mM EDTA, 0.5% SDS)와 36µl의 proteinase K(20mg/ml)를 첨가해 55℃에서 16시간 반응시킨 후 20µl의 DNase-free RNase A (10 mg/ml)를 첨가하여 37℃에서 1-2시간 반응시키고 phenol/chloroform/isoamylalcohol(25/24/1)을 넣어 10분간 잘 혼합한 다음 12,000rpm 4℃에서 10분 원심분리하여 상층액에 다시 phenol/chloroform/isoamylalcohol을 첨가하여 혼합해서 상층액을 회수하였다. 다음에 chloroform/isoamylalcohol을 첨가하여 상층액을 회수하여 600µl의 isopropanol을 가하여 DNA를 침전시키고 90% ethanol로 1회, 99.9% ethanol로 2회 세척 후 500µl의 TE buffer를 넣어 녹여 사용하였다.

Polymerase chain reaction(PCR) : Placenta genomic DNA 200ng, oligonucleotide A(5'-CTCCCTCCTCCCGGACG-3')와 oligo B(5'-GGCAATTCATTGTGAGG-3') 각각 50pmole, Taq polymerase(Boehringer Mannheim, Germany) 1U/µl를 사용하여 아래와 같이 PCR을 수행하였다²⁵. 10X PCR buffer(100mM Tris-HCl, 15mM MgCl₂, 500mM KCl, pH 8.3) 2µl에 200ng의 genomic DNA를 첨가하고 oligonucleotides A와 B를 각각 1µl씩 가한 후 1U/µl의 Taq polymerase 1µl와 5mM dNTP 1µl를

첨가하고 DW로 20µl를 맞추었다. 그리고 20µl의 mineral oil을 첨가한 후 94℃에서 5분간 denature하였고, DNA Thermal cycle(Perkin Elmer Cetus, USA)에서 94℃, 58℃, 72℃에서 각 1분간씩 denaturation, annealing, polymerization을 30회 반복하여 수행하였다. PCR 생성물의 Southern blot analysis는 PCR 생성물을 Hybond-N⁺ Nylon filter paper(Amersham, USA)에 전이시키고, Dig-11-dUTP가 표지된 HCR probe를 가지고 16시간 53℃에서 hybridization 하였다.

Placenta genomic DNA의 Southern blot analysis : 마우스 genomic DNA를 제한효소 EcoRI으로 완전히 절단하여 전기영동한 후 0.25M HCl에 5분간 반응시키고 denaturation solution(0.5N NaOH, 1.5M NaCl)에 15분씩 2회 처리하고 neutralization solution(0.5M Tris-HCl, pH 7.5, 3M NaCl)에 15분씩 2회 반응 시킨다음 Hybond-N⁺ nylon membrane으로 capillary transfer 방법²⁶에 의해 전이 시켰다. 전이된 genomic DNA는 314nm UV(Fluo-Link, USA) irradiation(0.7J/cm² of energy)으로 고정하고 prehybridization 시킨다음 이미 준비된 probe를 첨가해 16시간 53℃에서 hybridization 시켰다. 그리고 X-ray film(Kodak, USA)에 노출하여 -70℃에서 5일간 보관한 후 develop 시켰다.

Hybridization probe는 Feinberg et al²⁶등의 random oligonucleotide primer method를 변형한 Megaprime DNA labeling system(Amersham, USA) 방법으로 준비하였다. Template DNA(LacZ, 100ng)와 primer (random nonamer) 혼합물을 100℃에서 5분간 끓여 denature 시킨 후 labeling buffer(dATP, dGTP, dTTP in Tris-HCl pH 7.5, 2-mercaptoethanol and MgCl₂) 10µl와 radiolabeled [³²P]dCTP(3,000 Ci/mmole) 5µl, Klenow fragment를 잘 혼합해 37℃에서 10분간 반응시킨 후 0.2M EDTA 5µl를 첨가해 반응을 정지시켰다.

결 과

pHJ-1 플라스미드의 구축 : pL680 벡터를 제한효소 HindIII와 BamHI으로 절단한 후 P_α(tk promoter), LacZ, poly A signal, β-lactamase(ampicillin^r) 유전자, bacteria 복제 개시점(replication origin) 등을 포함하는 6.9kb fragment를 얻고 pHCR도 제한효소 HindIII와 BamHI으로 절단하여 1.1kb(HCR) fragment를 분리한 후 두 fragment를 ligation하여 pHJ-1 플라스미드를 얻

었다(Fig 1A). 그림 1B는 pHJ-1을 제한효소로 처리하여 삽입유전자의 크기 및 방향을 확인한 것으로 M은 marker(1kb ladder), lane 1은 제한효소 *Hind*III와 *Bam*HI으로 처리한 것으로 6.9kb 인 벡터와 1.1kb의 삽입유전자를 볼 수 있었고 또 이것이 정방향으로 들어갔는지를 확인하기위하여 제한효소 *Eco*RI으로 절단(Lane 2)하여 본 결과 1.1kb fragment가 보이는 것으로 미루어 정방향임을 확인하였다. Lane 3은 제한효소 *Hind*III와 *Sna*BI으로 절단한 것으로 transgenic mouse embryo 제조시 zygote에 주입 할 4.9kb transgene(HCR- P_{α} -LacZ-poly A), HJ-1 band를 확인하였다.

Transgenic mouse embryo의 제작 : Transgenic mouse embryo를 얻기 위하여 transgene HJ-1(4.9kb)을 2ng/ μ l로 정량하여 미세주입 방법으로 96개의 mice zygotes 융성전핵에 미세주입하여 4마리의 대리모 마우스(A, B, C, D)에 이식하였다. A, B, C 마우스는 좌우 난관팽대부에 각각 15, 14, 14개씩의 zygotes를 이식하였고 D 마우스는 한쪽의 난관팽대부에만 10개의 zygotes를 이식하였다. 이식 후 10.5-12.5일령의 embryo를 채취 하였고, 총 20 마리의 embryo(A는 9마리, B는 7마리, C는 4 마리, D는 0마리)를 얻어 zygotes의 20.8 %가 embryo로 유도되었다.

PCR 법을 이용한 transgenic mouse embryo의 판별 : 얻어진 embryo 들이 transgenic 인지 확인하기 위하여 HCR을 인식하는 primer쌍(oligo A와 oligo B)을 합성하였고 이를 이용하여 PCR을 실시하였다. pHCR(0.3pg)과 human genomic DNA(Fig 2, lane C와 H)는 positive control로 그리고 마우스 genomic DNA(lane M)는 negative control로 사용한 template들이며 4, 5, 8, 10, 12, 13번 embryonic template들(Fig 2A, lane 4, 5, 8, 10, 12, 13)에서 positive control에서와 같은 크기(613bp)의 band 가 나타났다. 이 band들이 transgene-specific한 것인지를 확인하기 위하여 Digoxigenin(Dig)-11-dUTP로 표지된 HCR을 probe로 사용하여 재료및 방법에서와 같이 Southern blot analysis를 수행하였다(Fig 2B). 5번과 8번 embryonic sample에서만 positive control에서와 같은 크기의 band가 hybridization 되었고 negative control로 사용한 마우스 background인 lane M에서는 나타나지않는 것으로 미루어 5번과 8번 embryo가 transgene-specific, 즉 human HCR sequence를 포함하고 있는 transgenic embryo들임을 알 수 있었다.

Genomic Southern blot analysis를 이용한 transgenic mouse embryo의 판별 : PCR에 의한

transgenic 판별 방법은 적은 양의 template를 사용하고 단시간에 분석이 가능하다는 장점은 있으나 위의 결과와 같이 non-specific한 false positive band(Fig 2A, lanes 4, 10, 12, 13)가 많이 나타나므로 이를 극복하기 위하여 genomic Southern blot analysis를 수행하였다. Placenta로부터 추출한 embryo의 genomic DNA 10 μ g을 제한효소 *Eco*RI으로 완전히 절단하고 이를 0.6% agarose gel에서 전기영동한 후 capillary transfer 방법²⁰에 의해 nylon membrane으로 전이시키고 [a -³²P] dCTP로 표지된 probe를 이용하여 재료 및 방법에서와 같이 hybridization 하였다(Fig 3). 여기에서는 3.3 kb LacZ fragment를 probe로 사용하였으며 Lane M은 negative control인 normal mouse genomic DNA이고 lane C는 positive control로서 pHJ-1을 *Eco*RI으로 절단한 것으로 3.3kb LacZ fragment가 hybridization이 됨을 보여주었다. Transgenic embryo sample DNA인 경우엔 0.5(Poly A) + α kb, 1.1kb(HCR), 3.3kb(LacZ)의 transgenic *Eco*RI band들(Fig 1A 참조) 중 LacZ를 포함하는 3.3kb band가 radiolabeling이 되는 5번과 8번 embryo가 transgenic임을 알 수 있었다. 이 결과는

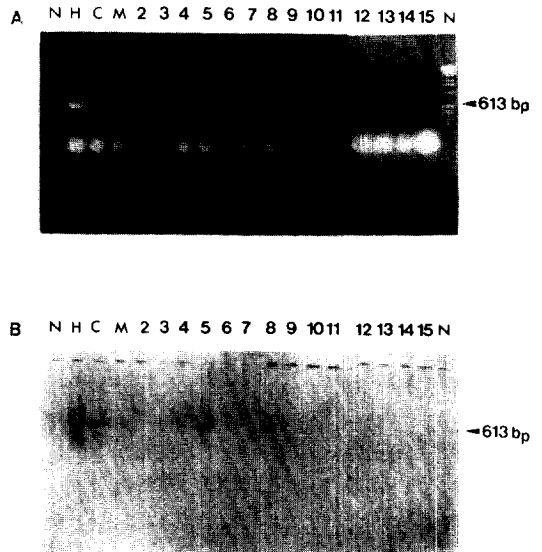


Fig 2. A: PCR amplification of DNA fragment using placenta genomic DNA as templates. N, 1kb ladder marker; H, human genomic DNA; C, HCR 1.1 kb; M, mouse genomic DNA; lane 2-15, placenta genomic DNA isolated from embryos. B: Southern blot analysis of PCR-amplified DNA fragment shown above (A) using 1.1 kb of Dig-labeled HCR DNA fragment as a probe.

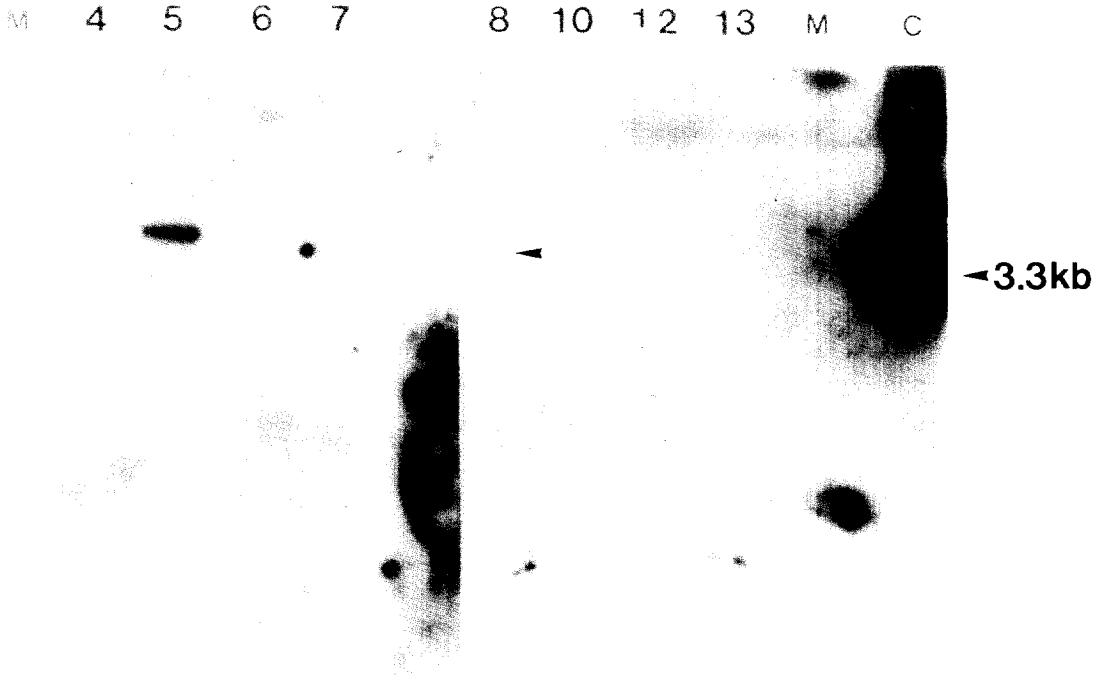


Fig 3. Southern blot analysis of genomic DNA from embryos. Genomic DNA was digested with *EcoRI* restriction enzyme and hybridized to the 3.3 kb *LacZ* fragment labeled with [*a*-³²P]dCTP. M, Mouse genomic DNA; C, *EcoRI* digested pHJ-1; lane 4-13, placenta genomic DNA.

위의 PCR-Southern 결과와 일치하며 마찬가지로 4번, 10번, 12번 그리고 13번 embryo들은 아무런 band도 나타나지 않았으므로 transgenic이 아님이 판명되었다.

X-gal 염색을 통한 transgenic mouse embryo의 발현 양상 분석 : PCR과 genomic Southern blot analysis를 통하여 transgenic인 것이 확인된 5번과 8번 embryo들이 함유하고 있는 transgene들의 발현 여부를, 또 더 나아가 발현이 된다면 embryo의 어느 부위에서 되는지를 알아보기 위하여 재료 및 방법에서와 같이 X-gal 염색을 실시하였고 glycerol로 clearing 한 후 사진촬영을 하였다(Fig 4). A와 B는 5번과 8번 transgenic embryo들이고 C는 control인 nontransgenic embryo이며 1, 2, 3은 각각 dorsal, lateral, ventral position의 부위가 잘 보이도록 위치가 다르게 사진촬영한 것이다. 5번 embryo(Fig 4A)는 transgenic임에도 불구하고 β -galactosidase(*LacZ*)가 발현되지 않았다. 머리부

위에 약간 보이는 *LacZ*의 발현은 nontransgenic negative control인 C embryo에서도 관찰되는 것으로 마우스의 internal *LacZ*에 의한 발현이거나 ectopic expression으로 간주된다. 반면에 8번 transgenic embryo(Fig. 4B)는 특정한 부위에서 *LacZ*의 발현이 뚜렷이 일어났음을 관찰할 수 있는데, 특히 neural tube와 dorsal spinal ganglia에서 발현이 현저히 일어났고 cervical 근처에서부터 posterior부위로 axis를 따라 발현이 되었음을 알 수 있다. 또 hindlimb의 proximodorsal 부위와 brain의 telencephalon 근처를 포함하여 머리부위에서도 약간의 발현이 관찰되는데 이것들이 human HCR DNA에 의하여 유도된 특징적인 *LacZ*의 발현인지는 expressing transgenic embryo를 더 많이 확보한 후에나 가능하리라고 본다.

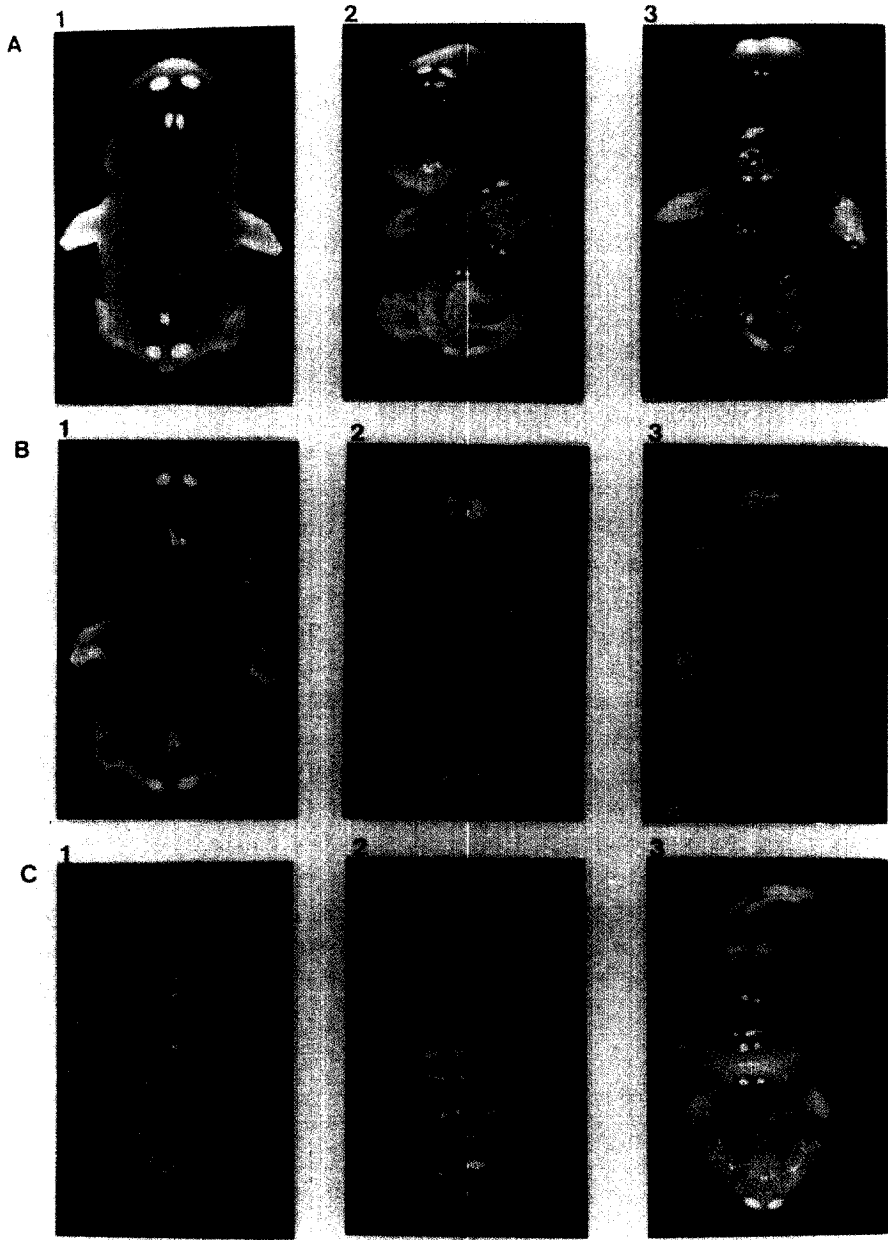


Fig 4. Transgenic embryos expressing the β -galactosidase (LacZ) after staining with X-gal. 1. Dorsal view; 2, Lateral view; 3, Ventral view; A, A5 transgenic embryo showing no expression of Lac Z gene; B, A8 transgenic embryo showing LacZ expression; C, Negative control embryo which does not contain transgene. The arrow indicated prevertebrate region.

고 찰

Hox 유전자들은 여러가지 cis- 혹은 trans-acting 조절인자들에 의하여 발생과정 중 서로 중첩은 되나 조금씩 다른 시간 및 특정 공간에서 발현이 됨으로서 동물의 형태형성에 관여하는 것으로 알려져 있는데²⁷ 마우스에서는 transgenic mice를 이용하여 Hox 유전자의 발현 조절에 대한 연구가 체계적으로 되어져 왔으나 인체를 이용한 실험은 거의 불가능하다. 그러나 진화과정 동안 Hox 유전자 자체의 보존성이나 유전자의 cluster 구조 및 발현양상의 보존 등은 Hox 유전자 발현 조절인자의 보존역시 강력히 시사하고 있으므로 여기에서는 마우스 Hoxa-7의 공간특이 조절인자(position specific control element)와 염기서열간의 상동성이 높은 human DNA(HCR) fragment를 이용하여 tk promoter, LacZ(β -galactosidase) gene 그리고 SV40 large T antigen의 polyadenylation signal등을 함유한 transgene (HJ-1)을 구축하였고 이를 mice embryo에 미세주입하여 transgene의 발현이 HCR에 의하여 어떻게 조절되는지를 관찰하여 본 결과, 사람 유전자가 마우스에서 공간특이 조절인자로서 작용하는 것을 알 수 있었다. HCR fragment는 마우스의 공간 특이 조절인자와 염기서열간의 높은 상동성뿐만 아니라 사람 전 염색체 중, 한 곳에서만 존재하는 것으로(민 등, personal communication) 발현양상 결과와 함께 추정해보면 HCR이 DNA염기 서열 뿐만 아니라 기능까지도 마우스의 Hox 조절인자와 유사한 것으로 생각되어진다. 그러나 궁극적으로 HCR이 정말로 인체의 Hox 유전자 조절인자 인가에 대한 증명은 사람의 transgenic embryo 즉 transgenic human embryo의 제작하에서만 가

능할 것이다.

Transgenic embryo 제작시 조작과정에서 살아남아 출산할 수 있는 zygotes는 평균적으로 약 10-30%로 알려져 있는데²⁸ 여기서도 약 20%의 zygote가 embryo로 유도됨으로서 본 실험에서는 마우스 strain 이나 transgene 의 차이 등이 embryo의 생존률에는 큰 영향을 미치지 않는 것처럼 보인다. 그러나 종들간의 차이, 기술의 차이 transgene 그리고 주위환경 등이 위의 보고된 범위내에서 약간의 차이를 나타내고 있는 것으로 보고되었고²⁹ 일반적으로 zygotes에 주입되는 DNA 농도가 증가함에 따라 유입되는 DNA의 copy number는 증가하는 반면 embryo가 살아남는 비율은 점진적으로 감소한다고 알려져 있으나³⁰ 본 실험에서는 line을 만들지 않고 embryo 상태에서 분석하였으므로 copy number와 생존율과의 직접적인 비교는 불가능하였다. 얻어진 embryo들이 transgenic 인지를 확인하는 방법에는 PCR, dot blot 그리고 genomic Southern blot analysis가 있는데²³, PCR에 의한 방법은 적은 양의 template를 사용하고 단시간에 analysis가 가능하다는 장점이 있으므로 많이 이용되고있다^{31,32,33}. Pinkert et al³¹은 transgenic mice 여부를 PCR과 genomic Southern blot analysis를 통해 비교 분석한 결과 PCR 방법에는 false positive가 나타나고 있음을 보고하였으므로, 본 실험에서도 정확성을 기하기 위하여 두가지 방법을 병행하여 실시하였다. 여기에서도 역시 transgene(HCR)을 probe로 Southern blot analysis를 실시하여 본 결과 PCR 방법에서는 non-specific한 false positive band (Fig 2A, lane 4, 10, 12, 13)가 많이 나타나는 것(Fig 2B)이 관찰되었다. Template 내에 특이적인 CA와 GT의 반복적 구조가 secondary structure를 형성함으로써

Table 1. Summary of characterization of transgenic mouse embryo

Embryos Methods	A									B							C				D
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	0
PCR	nt	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	nt	nt	nt	nt	nt	
Southern blot of PCR product	nt	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	nt	nt	nt	nt	nt	
Southern blot of genomic DNA	nt	nt	nt	-	+	-	-	+	nt	-	nt	-	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	
X-gal staining	-	-	-	-	-	-	-	+	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

A : Postcoitum 12.5(12.5 PC), B : Postcoitum 11.5(11.5 PC)

C : Postcoitum 10.5(10.5 PC), D : No offspring

+ : Transgenic, +* : Expressed, nt : not tested

non-specific amplification이 된다³²는 보고는 있으나, 본 실험의 경우엔 negative control로 사용한 마우스 genomic DNA에서는 non-specific band가 나타나지 않았으므로 아마도 반응용액 내에서 annealing 시 template의 순간적인 이차구조에 기인한 것이 아닌가 생각되어진다. Fig 2A에서 5번이 8번보다 10배이상이나 많은 양의 DNA가 존재하는 것으로 추정 되었으나 Fig 2B에서의 specific band의 intensity에는 별 차이가 없는 것으로 미루어 이것의 많은 부분은 false-positive DNA 일 것으로 사료된다. 이 방법은 유사한 sequence가 증폭될 가능성 및 기하급수적인 유전자의 증폭등으로 copy number의 정량이나 삽입된 유전자의 intactness등의 여부를 확인하는데는 어려움이 따르므로 이를 극복하기 위하여서는 Southern blot analysis가 필요하다³¹. 또 Southern blot analysis는 dot blot analysis³³에서 확인하기 어려운 적은 copy number의 detection, hybridization 작성시 포함될수 있는 플라스미드 DNA에 의한 false positive, 그리고 삽입된 DNA의 구조와 integrity에 대한 정보를 얻을수 있는 장점도 있다^{23,31}. Fig 3의 경우 PCR 결과(Fig 2B)와는 전혀 다른 band intensity를 보여주는데 5번이 8번 embryo보다 10배 이상 많은 copy number를 함유하고 둘 다 모두 완전한 형태로 HJ-1이 마우스 genomic DNA에 삽입 되었음을 알 수 있다.

Hox가 가장 활발히 발현된다고 알려진 수정 후 12.5일 되는 날 5번과 8번 embryo를 꺼내어 X-gal 염색을 실시하였고 transgene, 즉 LacZ의 발현양상을 관찰하였다. Table 1과 Fig 4에서 보여주듯이 더 많은 copy number를 함유하고있는 5번 embryo는 transgene이 발현되지 않은 반면에 8번 embryo는 LacZ가 발현되어 X-gal과 반응하여 푸른색을 나타내었다. 삽입된 transgene의 copy number에 비례하여 발현이 증가한다는 보고도 있으나³⁴, 일반적으로 copy number가 많은 경우 transgene의 발현이 억제되는 것으로 알려져 있다³⁵. 대부분의 transgene들은 head-to-tail 방향으로 tandem repeat 형태로 삽입이 되고 이 구조는 copy number가 많은 경우 intra-chromosomal rearrangement, deletion, breakage, translocation등을 더 잘 유발시켜 발현이 잘 일어나지 않는것으로 보고되고 있고³² 또 많은 copy number의 경우 heterochromatin이 인위적으로 형성되어 발현이 억제된다는 보고도 있다³⁵. 또 한편 transgene들은 염색체 안에 무작위로 삽입되므로 이것들이 염색체의 heterochromatin내로 삽입이 될 경우 copy number와는 무관하게 발현이 되지 않을 수도 있는 것으로 알려져 있다. 5번 embryo (Fig 4A)의 머리부위에 약간 보이는 LacZ의 발현은 nontransgenic negative control인 C embryo에서

도 관찰되는 것으로 마우스의 internal LacZ에 의한 발현이거나 ectopic expression으로 간주된다. 반면에 transgene이 발현 된 8번 embryo의 경우 LacZ의 발현양상을 분석한 결과(Fig 4B) 특정한 부위에서 LacZ의 발현이 뚜렷이 일어 났음을 관찰할 수 있는데, 특히 neural tube와 dorsal spinal ganglia에서 발현이 현저히 일어났고 cervical 근처에서부터 posterior부위로 axis를 따라 발현이 되었음을 알 수 있었다. 또 hindlimb의 proximodorsal 부위와 brain의 telencephalon 근처를 포함하여 머리부위에서도 약간의 발현이 관찰되는데 이것들이 human HCR DNA에 의하여 유도된 특징적인 LacZ의 발현 인지는 확실치 않고 expressing transgenic embryo를 더 많이 확보하여 비교 분석 하여 본 후어나 가능하리라고 본다. 흥미 있는 점은 neural tube와 dorsal spinal ganglia에서 전방경계(anterior boundaries)가 뚜렷하게 나타났으며 전방에서부터 후방으로 발현이 일어났다. 이는 Puschel et al^{19,36}, Falling et al³⁷, Mahon et al¹⁵의 결과와 유사하게 발현 양상이 나타났음을 보여주는 것이다. 즉 마우스 Hoxa-7의 조절인자와 염기서열간의 상동성이 높은 human DNA fragment(HCR 1.1kb)가 마우스의 유전자에 삽입되어 마우스 Hoxa-7의 조절인자와 유사하게 downstream LacZ을 조절하여 발현에 관여한다고 사료된다.

결론적으로 human specific DNA fragment는 transgenic mouse embryo에서 전후축 형태형성(anterior-posterior axial pattern formation)을 조절하는데 관여하는 것으로 보인다. 또한 transgenic mouse를 이용한 유전자 조절 기전의 이해는 유전자 발현 연구 뿐만 아니라 수의 병원미생물 유전자의 기능과 역할을 구명하는데 유용한 모델이 되며 gene therapy와 intracellular immunization의 기초가 된다고 사료된다.

결 론

Homeobox(Hox) gene은 척추 동물과 무척추 동물에서 초기 배발생단계에 전후축 형태형성(anterior-posterior axial pattern formation)을 결정하는데 관여하는 것으로 알려져 있고 이는 시공간적으로 조절되어 발현되는것에 기인한다. Mouse와 초파리의 몇몇 Hox 유전자들의 발현 조절에 관한 연구는 transgenic system을 이용하여 연구가 되어왔으며 mouse Hoxa-7 유전자의 위치특이 조절인자와 염기서열간의 상동성이 높은 human DNA fragment(HCR)의 기능을 알아보기위하여 일련의 실험을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Mouse Hoxa-7과 9사이에서 Hoxa-7의 발현을

position specific하게 조절하는 intergenic region 에 homologous한 human의 1.1kb(HCR 1.1kb)-tk promoter-reporter gene으로서의 LacZ gene-SV40 large T antigen의 polyadenylation signal을 포함하는 transgene을 함유하는 플라스미드(pHJ-1)를 구축하였다.

2. Transgene HJ-1(HCR 1.1kb-tk promoter-LacZ gene-polyA)을 마우스 수정란에 미세주입하여 20마리의 embryos를 얻었다.

3. 얻어진 embryos의 태반으로부터 genomic DNA를 추출하였고 PCR 방법으로 transgenecity를 검출한 결과 6마리의 embryos에서 positive band가 나타났고 이 PCR 생성물을 Southern blot analysis 및 태반 genomic Southern blot analysis를 실시한 결과 2마리가 transgenic embryos임을 확인하였다.

4. Embryos에 X-gal 염색을 실시하여 2마리의 transgenic embryo중 1마리에서 발현이 일어났다. Expression pattern은 위치에 특이적으로 제한적인 발현양상을 보였으며 mouse Hoxa-7 control region의 전방경계와 유사한 발현양상을 보였다. 이상에서와 같이 LacZ의 발현이 upstream에 위치한 human HCR sequence에 의하여 조절되었기 때문에 HCR은 human의 position specific 조절인자일 것이라고 사료된다.

참 고 문 헌

- Kessel M, Gruss P. Murine developmental control genes. *Science* 1990; 249: 374-379.
- Dressler GR, Gruss P. Do multigene families regulate vertebrate development?. *Trends in Gen* 1988; 4: 214-219.
- Gehring WJ. Homeo boxes in the study of development. *Science* 1987; 236: 1245-1252.
- McGinnis W, Krumlauf R. Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 1992; 68: 283-302.
- Gurdon JB. The generation of diversity and pattern in animal development. *Cell* 1992; 68: 185-199.
- Wood WB, Edgar LG. Patterning in the C. elegans embryo. *Trends in Gen* 1994; 10: 49-54.
- Gehring WJ, Qian YQ. Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 1994; 78: 211-223.
- Pankratz MJ, Jackle H. Making stripes in the Drosophila embryo. *Trends in Gen* 1990; 6: 287-292.
- Holand PWH, Hogan BLM. Spatially restricted patterns of expression of the homeobox - containing gene Hox 2.1 during embryogenesis. *Development* 1988; 102: 159-174.
- Bucan M, Yang-Feng T, Colberg-Poley AM, et al. Genetic and cytogenetic localization of the homeobox containing genes on mouse chromosome 6 and human chromosome 7. *EMBO J* 1986; 5: 2899-2905.
- Hart CP, Awgulewitsch A, McGinnis W, et al. Homeobox gene complex on mouse chromosome 11:molecular cloning, expression in embryogenesis, and homology to a human homeobox locus. *Cell* 1985; 43: 9-18.
- Featherstone MS, Baron A, Gaunt SJ, et al. Hox-5.1 defines a homeobox-containing gene locus on mouse chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85: 4706-4764.
- Gehring WJ, Affolter M, Burglin T, et al. Homeodomain proteins. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 487-526.
- Krumlauf R. Hox genes in vertebrate development. *Cell* 1994; 78: 191-201.
- Mahon KA, Westphal H, Gruss P. Expression of homeobox gene Hox 1.1 during mouse embryogenesis. *Development* 1988; 104: 187-195.
- Kessel M, Balling R, Gruss P. Variation of cervical vertebrae after expression of a Hox-1.1 transgenic in mice. *Cell* 1990; 61: 301-308.
- Kim MH, Kessel M. Homeobox genes as regulators of vertebrate development. *AgBiotech News Information* 1993; 5: 189-194.
- Zimmer A, Gruss P. Production of chimaeric mice containing embryonic stem(ES) cells carrying a homeobox Hox1.1 allele mutated by homologous recombination. *Nature* 1989; 338: 150-153.
- Puschel AW, Balling R, Gruss P. Position-specific activity of the Hox 1.1 promoter in transgenic mice. *Development* 1990; 108: 435-442.
- Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T. *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- Old RW, Primrose SB. *Principles of gene manipulation an introduction to genetic engineering*.

- 4th Ed. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1989.
22. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 1983; 166: 557-580.
 23. Hogan B, Constantiti F, Lacy E. *Manipulating the mouse embryo*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1986.
 24. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. *Current protocols in molecular biology*. New York: Greene Publ. Assoc. Wiley-Intersci, 1989.
 25. Chen S, Evans GA. A Simple screening method for transgenic mice using the polymerase chain reaction. *BioTechniques* 1990; 8: 32-33.
 26. Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983; 132: 6.
 27. Vogles R, Charite J, Graff W, et al. Proximal cis-acting elements cooperate to set Hoxb(Hox-2.3) expression boundaries in transgenic mice. *Development* 1993; 118: 71-82.
 28. Watson JD, Gilman M, Witkowski J, et al. *Recombinant DNA*. 2nd ed. Scientific American Books 1992; 255-257.
 29. Furth PA, Hennighausen L, Baker C, et al. The variability in activity of the universally expressed human cytomegalovirus immediate early gene 1 enhancer/promoter in transgenic mice. *Nucl Acids Res* 1991; 22: 6205-6208.
 30. Brinster RL, Chen HY, Trumbauer ME, et al. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc Natl Acad Sci* 1985; 82: 4438-442.
 31. Pinkert CA. *Transgenic animal technology*. California: Academic Press. Inc,1993; 23-24, 221-234.
 32. Zhang Z., Huang K, Zhang Y, et al. Interference by complex structures of target DNA with specific PCR amplification. *Appl Biochem Biotech* 1994; 44: 15-20.
 33. Kafatos FC, Jones WC, Efstratiadis A. Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentration by a dot hybridization procedure. *Nucl Acids Res* 1979; 7: 1541-1552.
 34. Mahon KA, Overbeek PA, Westphal H. Prenatal lethality in a transgenic mouse line is the result of a chromosomal translocation. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85: 1165-1168.
 35. Dorer DR, Henikoff S. Expansion of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in *Drosophila*. *Cell* 1994; 77: 993-1002.
 36. Puschel AW, Balling R, Gruss P. Separate elements cause restriction and specify boundaries of Hox-1.1 expression. *Development* 1991; 112: 279-287.
 37. Balling R, Mutter G, Gruss P, et al. Craniofacial abnormalities induced by ectopic expression of the homeobox gene Hox-1.1 in transgenic mice. *Cell* 1989; 58: 337-347.