

Tetracycline-Inducible Expression System을 이용한 Human Thrombopoietin (hTPO) 형질전환 닭의 생산

권모선 · 구본철 · 김도향 · 김민지 · 김태완[†]

대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실

Production of hTPO Transgenic Chickens using Tetracycline-Inducible Expression System

M. S. Kwon, B. C. Koo, D. H. Kim, M. J. Kim and T. Kim[†]

Department of Physiology, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu 705-718, Korea

ABSTRACT It is well-known that unregulated over-expression of foreign gene may have unwanted physiological or toxic effects in transgenic animals. To circumvent these problems, we constructed retrovirus vector designed to express the foreign gene under the control of the tetracycline-inducible promoter. However, gene expressions in the tetracycline-inducible expression system (Tet system) are not completely regulated but a little leaky due to the inherent defects in conventional Tet-based systems. A more tightly controllable regulatory system can be achieved when the advanced versions (rtTA2^SM2) of rtTA and a minimal promoter in responsive components (pTRE-tight) are used in combination therein. In this study, we tried to produce human thrombopoietin (hTPO) from various target cells and transgenic chickens using the retrovirus vector combined with Tet system. hTPO is the primary regulator of platelet production and has an important role in the survival and expansion of hematopoietic stem cells. In a preliminary experiment *in vitro*, higher hTPO expression and tighter expression control were observed in chicken embryonic fibroblast (CEF) cells. We also measured the biological activity of the hTPO using Mo7e cells whose proliferation is dependant on hTPO. The biological activity of the recombinant hTPO from CEF was higher than both its commercial counterpart and hTPO from other target cells. The recombinant retrovirus was injected beneath the blastoderm of non-incubated chicken embryos (stage X). Out of 138 injected eggs, 15 chicks hatched after 21 days of incubation. Among them, 8 hatched chicks were hTPO positive. When the Go transgenic chicken was fed doxycycline (0.5 mg per 1 gram of feed), a tetracycline derivative, hTPO concentration of the transgenic chicken blood was 200 ng/mL. Germline transmission of the transgene was confirmed in sperm of the Go transgenic roosters. These results are informative to establish transgenic chickens as bioreactors for the mass production of commercially valuable and biological active human cytokine proteins.

(Key words : tetracycline-inducible expression system, transgenic chickens, human thrombopoietin (hTPO), bioreactor)

서 론

재조합 단백질의 생산은 해당 유전자가 전이되어 발현되는 미생물, 동물세포, 식물, 동물 등 다양한 종에서 가능하다. 이 중 가장 경제적이고 여러 세대에 걸쳐서 지속적인 대량 생산이 가능하며, 단백질의 당화 과정이 인간과 가장 유사한 경우는 형질전환 동물을 생체반응기로 이용하는 방법이다 (Fontes 등, 1999; Houdebine, 2006). 현재까지 보고된 치료용 단백질을 생산하는 형질전환 동물로는 양, 염소, 소, 토끼, 그리고 닭 등이 있는데 (Dyck 등, 2003; Hunter 등, 2005; Zhu

등, 2005; Kodama 등, 2008), 특히 형질전환 닭은 기존의 세포배양이나 다른 대동물을 이용하는 방법에 비해서 매우 경제적이고 단시간 내에 대량 생산이 가능하고 실험에 사용할 다량의 난을 일시에 확보할 수 있는 장점을 가진다 (Ivarie, 2003; Lillico 등, 2005). 뿐만 아니라 다른 동물들에 비해서 치료용 단백질에 대한 당화 양상이 사람의 단백질과 매우 유사하게 일어나는 것으로 알려져 있는데 (Raju 등, 2000), 이러한 단백질의 번역 후 변형인 당화 과정은 단백질의 기능과 반감기 등을 결정하는 중요한 단계이다 (Houdebine, 2002).

형질전환 닭에서 외래 유전자의 발현에 의한 재조합 단백

[†] To whom correspondence should be addressed : takim@cu.ac.kr

질을 효율적으로 생산하기 위한 전제 조건으로는 외래 유전자의 숙주세포나 개체의 genome 내로의 도입을 위한 적절한 유전자 전이 방법이 확립되어야 하고, 외래 유전자의 발현에 관여하는 조직 특이적이거나 유도적인 조절 요소가 도입되어야 한다(Houdebine, 2000; Keefer, 2004). 먼저 형질전환 닭을 생산하기 위한 외래 유전자의 전이 방법으로는 배아에 lentivirus나 retrovirus를 주입하여 외래 유전자를 전이시키는 경우(McGrew 등, 2004; Koo 등, 2006; Kamihira 등, 2005)와 non-viral DNA를 ES 세포나 PGC에 transfection하여 이를 수정란에 다시 도입하는 방법이 있다(Zhu 등 2005; van de La-voir 등, 2006). 본 연구에서는 이 방법들 중 기술적으로 가장 용이하며, 외래 유전자의 전이 효율이 높은 것으로 알려져 있는 virus vector를 이용한 배아로의 유전자 전이 방법을 사용하고자 하였으며, 특히 생물학적인 안정성을 고려하여 lentivirus vector가 아닌 retrovirus vector를 이용하였다. 이 방법을 이용하여 형질전환 닭에서 생산하고자 하는 생리활성물질은 혈소판 생산의 일차 조절자이며(Kaushansky, 1998), 조혈모세포의 생존과 증식에 중요한 역할을 하는 hTPO로(Sitnicka 등, 1996), 이 물질은 혈소판 감소증, 재생불량성 빈혈이나 골수 부전증 등의 치료제로 사용되고 있다. 생리활성물질의 대량생산을 위한 형질전환 동물의 개발에 있어서 가장 큰 문제점은 외래 유전자의 지속적인 발현에 의한 개체의 생리적인 부작용이 유발되는 것이다. 이러한 현상을 최소화하기 위하여 외래 유전자의 발현을 유도적으로 조절할 수 있는 유전자 전이 system의 구축이 요구된다. 본 연구에서는 현재 가장 많이 사용되고 있는 외래 유전자의 발현 조절을 위한 유전자 전이 system인 Tet system(Gossen과 Bujard, 1992)을 도입하였는데, 이 Tet system은 tetracycline 계열의 유도물질인 doxycycline의 공급 여부에 따라 외래 유전자의 발현이 조절되는 system으로서 본 연구에서는 doxycycline이 존재하는 경우에 외래 유전자의 발현이 유도되는 Tet-On system을 사용하였다. Tet-On system은 reverse tetracycline-controlled transactivator(rtTA)가 발현되어 발현 유도물질인 doxycycline과 결합한 후 이 결합체가 tetracycline response element(TRE) 부위에 부착됨으로써 TRE의 조절 하에 있는 외래 유전자의 발현이 유도되며(Gossen 등, 1995), doxycycline이 제거되면 외래 유전자의 발현 또한 억제된다. Tet system은 기존의 중금속이나 steroid hormone, heat shock 등을 이용하는 발현 조절 system에 비해 유도물질이나 구성 요소에 의한 세포 독성이 적고 유전자의 발현 유도율이 다른 system에 비하여 탁월한 것으로 알려져 있으나(Bohl 등, 1997; Mayford 등, 1996), 비유도 조건에서 아직 완벽한 발현 제어가 이루어지지 않은

관계로 약간의 background 활성을 나타내고, 또한 유도 조건에서의 외래 유전자의 비교적 약한 발현이 문제시된다. 이를 극복하기 위하여 본 연구에서는 기존의 Tet system의 여러 요소를 보완하여 보다 완벽하게 외래 유전자의 발현이 조절되는 진일보한 형태의 Tet system을 구축하고자 하였으며, 이 system을 이용하여 외래 유전자인 hTPO의 발현이 유도적으로 조절됨으로써 생리적인 부작용이 최소화된 형질전환 닭을 생산하고자 하였다.

실험 방법

1. Retrovirus Vector의 구축과 Virus 생산

실험에서 사용한 pTet2-hTPOWPT vector는 본 연구실에서 보유하고 있는 pRevTRE-hTPO-WPRE-RSVp-rtTA2^SM2 vector(Kwon 등, 2007)의 TRE 서열을 TRE-tight 서열로 대체하고 RSV promoter를 PGK promoter로 대체한 구조이다. 먼저 본 연구실에 보유하고 있는 pRevTRE-hTPO-WPRE-RSVp-rtTA2^SM2를 Sal I 과 Klenow fragment, 그리고 HindIII를 순서대로 처리하여 CMV promoter 부분을 제거하고 pGEM-7Zf-PGKp vector를 Xba I, Klenow fragment, 그리고 HindIII를 순서대로 처리하여 분리한 PGK promoter를 재조합하였다. TRE 부분을 TRE-tight 서열로 대체하는 과정은 전 과정에서 재조합한 vector를 Xho I 과 BamH I 으로 처리하여 TRE 부분을 제거한 후, pTRE-Tight vector (Clontech, USA)를 Xho I 과 BamH I 으로 처리하여 분리한 TRE-tight 절편을 도입하였다(Fig. 1).

구축한 pTet2-hTPOWPT vector는 Gibbon ape leukemia virus의 피막 유전자가 발현되는 PT67 (Clontech, USA) 포장세포에 calcium phosphate 방법으로 transfection하였다. PT67에서 생산된 virus는 Moloney murine leukemia virus의 gag과 pol

pTet2-hTPOWPT



Fig. 1. Structure of pTet2-hTPOWPT. LTR, LTR, long terminal repeat; Hyg^r, Hygromycin resistant gene; TRE-tight, which contains a modified TRE upstream of an altered minimal CMV promoter; hTPO, human thrombopoietin gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; PGK, phosphoglycerate kinase promoter; rtTA2^SM2, rtTA consist of the reverse tetracycline repressor (rtTetR) fused to a VP16 transactivation domain. Length of each sequence is not drawn to scale.

유전자가 발현되는 GP2 293 (Clontech, USA) 세포에 감염시켜서 Hygromycin(150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)이 첨가된 배양액에서 2주간 배양하여 GP2 293-Tet2-hTPOWPT 세포주를 구축하였다. 이 세포주에 *VSV-G* 유전자를 가진 pVSV-G(Clontech, USA) plasmid를 일시적으로 transfection하여 48시간 후에 virus 배양액을 수확하였다. 생산된 virus는 닭의 배아섬유아세포인 CEF, 사람의 자궁경부암세포인 HeLa, 생쥐의 배아섬유아세포인 NIH3T3 세포에 감염시켜서 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 Hygromycin이 첨가된 배양액으로 2주간 선별하여 외래 유전자가 전이된 각각의 세포주를 확립하였다.

실험에 사용한 모든 세포들은 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 조건에서 배양하였으며 4.5 g/L glucose(GibcoBRL, USA), 10% fetal calf serum(Hyclone, USA), 100 U/mL의 penicillin과 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 streptomycin(Hyclone, USA)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; Hyclone, USA) 배지에서 배양하였다.

2. In Vitro 상에서 Tet System에 의한 hTPO 유전자 발현 조절 양상 분석

1) 형질전환 세포주의 hTPO 유전자의 전이 확인

형질전환 세포주의 hTPO 유전자의 전이 여부 확인은 RT-PCR 방법을 이용하였다. 먼저 각 세포주를 tetracycline 유도체인 doxycycline이 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 첨가되거나 첨가되지 않은 조건에서 48시간 배양한 후 trizol 용액(Invitrogen, USA)을 이용하여 total RNA를 분리하였다. 각 세포주에서 1 μg 의 RNA로 ImProm-II reverse transcription system(Promega, USA)을 이용하여 cDNA를 제조하였다. 각각의 실험군에서 2 μL 의 cDNA를 주형으로 이용하여 hTPO와 *glyceraldehyde phosphate dehydrogenase(GAPDH)* 유전자에 대한 primer(Table 1)를 사용하여 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초, 54 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초, 68 $^{\circ}\text{C}$ 에서

30초간 반응하는 PCR cycle을 25회 반복 실시한 후 최종 신장을 위해 68 $^{\circ}\text{C}$ 에서 7분간 반응하였다. 반응이 종결된 후 1.5% agarose gel을 이용한 전기영동을 실시하여 각 유전자에 대한 PCR 증폭 단편을 확인하였다.

2) 형질전환 세포주에서 발현되는 hTPO의 정량 분석
Virus를 감염시킨 각 세포주에서 hTPO의 발현을 유도 여부를 확인하기 위하여 세포 배양액에 doxycycline을 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 첨가하거나 첨가하지 않은 조건에서 48시간 배양한 후, 각 세포주의 배양액을 수확하여 0.22 μm 의 pore size를 가진 cellulose acetate filter로 여과한 후 100 μL 를 덜어내어 2배씩 단계적으로 희석하여 Human Tpo Quantikine ELISA kit(R&D systems, USA)을 사용해서 정량을 실시하였다. 먼저 여러 단계의 농도로 희석한 standard와 각 sample을 plate의 각 well에 200 μL 씩 넣어서 실온에서 3시간 방치한 후 wash buffer로 4회 수세하였다. 각 well에 200 μL 의 anti-hTPO-HRP conjugate를 더한 후 실온에서 1시간 방치한 후 wash buffer로 4회 수세하였으며, 200 μL 의 tetramethylbenzidine(TMB) substrate solution을 각 well에 더하여 빛을 차단시킨 상태로 실온에서 30분간 방치한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 본 실험은 3회 반복 실시하였다.

3) Mo7e 세포를 이용한 재조합 hTPO의 생물학적 활성 측정

Doxycycline이 첨가된 조건에서 배양한 각 세포의 배양액은 정량한 결과를 바탕으로 하여 100 ng/mL의 농도가 되도록 희석하여 준비해 두었다. hTPO의 생물학적 활성 측정에 주로 사용되는 거핵모구세포주(megakaryoblastic cell line)인 Mo7e(Avanzi 등, 1988) 세포를 96 well microplate의 각 well에 3×10^4 개씩 seeding한 후 대조구로 사용하기 위한 재조합

Table 1. Primers used for hTPO and GAPDH analyses

Gene	Species	Sequence	Product size (bp)
hTPO	Human	5'-TGCTGCCTGCTGTGGACTTTAG-3' (+) 5'-ACCTGGAGGTTTGGTTCAGCAG-3' (-)	558
	Chicken	5'-TGATGCCCCATGTTTGTGA-3' (+) 5'-CAAGAAGGGAACACGCAGGG-3' (-)	691
GAPDH	Human	5'-GGTGTGAACCATGAGAAGTATGACAA-3' (+) 5'-GTCTCTCTCTCTCTTGTGCTCTIG-3' (-)	658
	Mouse	5'-TGAGTATGTCGTTGAGTCTACTGGTG-3' (+) 5'-CTGTAGCCGATTTCATTGTCATACCA-3' (-)	686

hTPO 단백질(R&D system, USA)과 100 ng/mL의 hTPO가 포함된 각 세포의 배양액을 2배씩 단계적으로 희석하여 각 well에 50 μ L씩 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건에서 48시간 배양하였다. hTPO에 의한 Mo7e 세포의 증식 활성을 확인하기 위하여 Cell Proliferation Kit I (Roche, Germany)를 사용하여 MTT assay를 실시하였다. 각 well에 10 μ L의 MTT labelling reagent를 첨가하여 4시간동안 반응시킨 후 100 μ L의 solubilization solution을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건에서 16시간동안 방치하였다. 반응이 종결된 plate를 microplate reader를 이용하여 595 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며 본 실험은 3회 반복 실시하였다.

3. 고농축 virus의 생산과 닭의 배아로의 virus 감염

1) 고농축 virus의 생산

닭의 배아에 감염시키기 위한 고농축 virus는 GP2 293-Tet2-hTPOWPT 세포에 pVSV-G를 transfection하여 생산된 virus가 포함된 배양액을 4 $^{\circ}$ C, 50,000 \times g의 속도에서 90분간 fixed-angle rotor(Beckman 70Ti)를 이용한 초원심분리 방법으로 1,000배 이상 농축하여 준비하였다. 상층액을 완전히 제거한 후 침전물에 DMEM을 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 방치한 후 재부유하였다. 농축한 virus stock은 0.45 μ m pore-size의 cellulose acetate filter를 이용하여 여과한 후 다음 실험 직전까지 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

2) 닭의 배아로의 virus 감염

본 연구에서는 stage X(Eyal-Giladi와 Kochav, 1976) 시기의 배반엽층에 virus를 미세주입한 후 대리난각 방법(Petitte와 Mozdziak, 2002)을 이용하여 배아를 배양하고자 하였다. 먼저 대리난각으로 이용하기 위한 계란은 둔단부를 직경 3.4 cm로 절단하여 증류수로 수세한 후 건조시켜 두었다. 본 실험에 사용된 유정란은 하이브라운 산란계종으로, 60 \pm 3 g 무게의 종란을 선택하였다. 부화를 시작하지 않은 stage X 시기의 배아를 가진 종란을 파각하여 내용물을 대리난각으로 옮긴 후 본 연구실에서 개량한 manipulator와 특수가공한 microinjection pipette(SIGMA, pipette, microcapillary, 50 μ L, 100 mm length)을 이용하여 10 μ g/mL 농도로 polybrene이 첨가된 virus stock 3 μ L를 계란의 배반엽층에 미세주입하였다. Virus의 주입이 끝난 후 수양성 난백으로 대리난각을 완전히 채운 다음 vinyl wrap으로 밀봉하여 37.5 $^{\circ}$ C의 온도와 상대 습도 60% 조건의 부화기에 입란하여 15분 주기로 90 $^{\circ}$ 각도로 전란시키면서 3일간 배양하였다. 3일간 배양 후 종란

의 무게보다 약 25 g 정도 더 무거운 계란을 선별하여 둔단부를 4 cm 직경으로 절단한 대리난각으로 내용물을 모두 옮겼다. 다시 wrap으로 밀봉하여 37.5 $^{\circ}$ C의 온도와 상대 습도 60% 조건의 부화기에 입란하여 30분 주기로 30 $^{\circ}$ 각도로 전란시키면서 15일간 배양하였다. 19일째부터는 계란을 37 $^{\circ}$ C의 온도와 상대습도 75% 조건의 발생기로 옮긴 후 전란하지 않는 상태에서 부화할 때까지 배양하였다. 배양하는 동안 3일, 18일, 21일째에 계란의 발생 진행 여부와 부화율을 관찰하였다.

4. 생산된 형질전환 닭의 분자생물학적 검정

1) Genomic DNA PCR

부화한 병아리로부터 채취한 혈액으로부터의 genomic DNA의 분리는 G-DEX II genomic DNA extraction kit(Intron Biotechnology, Korea)을 이용하여 실시하였다. 분리한 genomic DNA 1 μ g은 50 pmol의 각 primer, 5 μ L의 10X PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM의 각 dNTP, 그리고 2.5 U Taq polymerase(Promega, USA)와 혼합한 후 최종적으로 50 μ L의 PCR 반응액으로 준비되었다. PCR 반응은 초기 변성을 위하여 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 방치한 다음, 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 56 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초간 반응하는 cycle을 35회 반복 실시한 후 최종 신장을 위해 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 반응하였다. PCR 반응에 사용한 primer는 hTPO와 Hygromycin 저항성 유전자, 그리고 GAPDH 유전자에 대한 서열을 사용하였는데, hTPO와 GAPDH 유전자에 대한 primer는 형질전환 세포주에서의 RT-PCR 실험에 사용한 것과 동일한 것을 사용하였으며, Hygromycin 저항성 유전자에 대한 primer는 5'-GCTC TCGAT GAGCTGATGCTTTG-3'와 5'-TCTGCTGCTCCATA CAAGCC AAC-3'를 사용하였으며, 증폭한 단편의 크기는 208 bp이다.

2) ELISA 분석

2월령의 형질전환 닭을 대상으로 doxycycline을 사료 100 g 당 50 mg의 농도로 첨가한 식이를 2주간 실시하기 전과 후의 각 개체에서 채취한 혈액의 혈장만을 분리하여 원액에서부터 2배수로 단계적으로 희석한 후 Human Tpo Quantikine ELISA kit(R&D systems, USA)을 사용하여 ELISA 분석을 실시하였다. 분석 과정은 세포에서 발현된 hTPO의 측정과 동일한 방법으로 진행하였으며, 식이 전의 혈액에서 hTPO의 농도 측정은 대조군으로서 유전자 발현 유도 전의 상태에서의 hEPO 발현량을 측정하기 위함이다.

결 과

1. *In Vitro*에서 Tet system에 의한 *hTPO* 유전자의 발현 양상 확인

Tet2-hTPOWPT virus에 감염된 각 표적세포와 정상세포를 각각 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 doxycycline이 첨가되거나 첨가되지 않은 배지에서 48시간 동안 배양한 후 각 세포의 RNA를 분리하여 RT-PCR을 실시한 결과, virus에 감염되지 않은 각각의 정상 세포주에서는 *hTPO* 유전자의 전이가 확인되지 않는데 반해 virus에 감염된 세포주에서는 모두 *hTPO* 유전자의 전이가 확인되었으며 doxycycline의 존재 여부에 따른 PCR 증폭 단편의 크기는 큰 차이를 나타내지 않았다(Fig. 2).

세포의 배양액을 수확하여 ELISA를 이용하여 hTPO 농도를 측정된 결과, doxycycline이 존재하는 조건에서 배양한 CEF에서 13.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 가장 높은 농도를 나타내었으며, 다른 표적세포인 HeLa와 NIH3T3에서는 각각 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 상대적으로 저조한 농도를 보였다(Fig. 3). 비유도 조건에서의 hTPO 농도 역시 CEF에서 상대적으로 높게 나타났으나, 절대적인 발현량이 다른 세포에 비해 월등히 높게 나타나서 비유도 조건에서의 발현량에 대한 유도 조건에서의 발현량을 나타내는 발현 유도율 역시 CEF에서 가장 높은 것으로 확인되었다.

ELISA 결과를 기준으로 대조구인 재조합 hTPO와 각 세포 배양액의 hTPO를 동량으로 희석하여 Mo7e 세포 배양에 공급한 후 세포의 증식 속도를 측정하여 생물학적 활

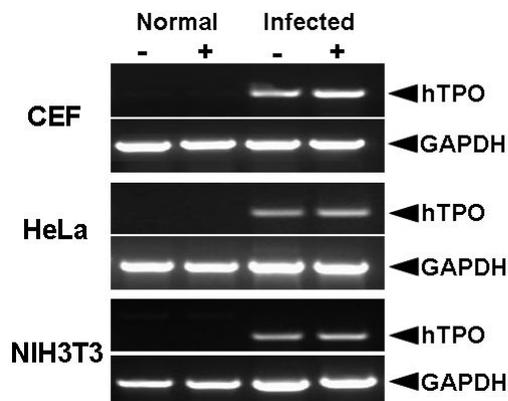


Fig. 2. Determination of doxycycline induction of the *hTPO* gene in various target cells using RT-PCR analysis. Normal, virus uninfected cell; Infected, cells infected with Tet2-hTPOWPT virus. -: cell was grown in the doxycycline-free media. +: cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

성을 조사하였다. 그 결과, CEF 세포 유래의 hTPO는 0.02 ng/mL 이상의 농도에서 Mo7e 세포의 증식을 촉진하기 시작하는 것으로 확인되었으며, HeLa와 NIH3T3 세포 유래의 hTPO와 재조합 hTPO는 1 ng/mL 이상의 농도에서 Mo7e 세포의 증식을 촉진하기 시작하는 것으로 확인되었다. CEF 세포에서 생산된 hTPO는 대조구로 사용한 재조합 hTPO나 HeLa와 NIH3T3 세포 유래의 hTPO보다 생물학적 활성이 우월한 것으로 확인되었다(Fig. 4). 이는 동일한 정도의 Mo7e 세포 증식 촉진을 유도할 경우 CEF 세포에서 발현된 hTPO가 대조구 hTPO에 비해 훨씬 적은 양이 요구됨을 의미한다. *hTPO* 유전자가 전이되지 않은 정상 세포의 배양액에서는 hTPO의 생물학적 활성이 전혀 나타나지 않았다(data not shown).

2. 형질전환 닭의 부화율 및 형질전환 여부 검정

고농도로 농축한 Tet2-hTPOWPT virus를 주입하여 부화한 각 병아리들의 부화율을 확인한 결과, 대리난각만 실시한 대조군에서는 90%의 부화율을 보인데 비해 virus를 주입한 실험군에서는 약 10.9%의 상대적으로 매우 저조한 부화율을 나타내었다(Table 2). 부화 후 1개월이 지난 시점에서 생존한 개체 중 대조군은 모두 생존한 데 비해서 virus를 주입한 군

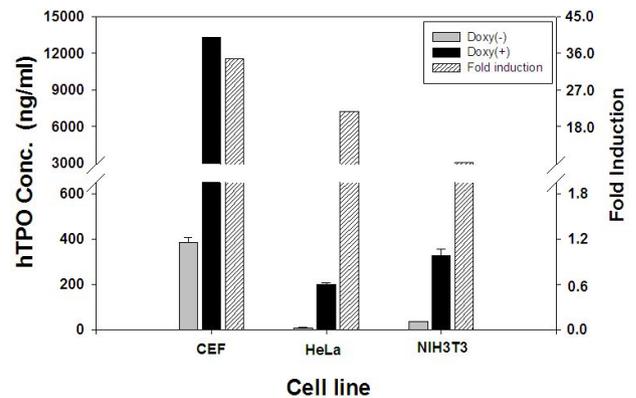


Fig. 3. Quantification of hTPO levels secreted from Tet2-hTPOWPT virus infected chicken fetal fibroblasts (CFEs), human cervical carcinoma cells (HeLa), and mouse embryonic fibroblasts (NIH3T3). The concentration of the hTPO released into the medium was determined by ELISA as described in the Materials and Methods. Doxy(-), cell was grown in the doxycycline-free media for 48 hrs; Doxy(+), cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 48 hrs. The data were obtained from experiments performed in triplicate and are presented as the mean \pm SD.

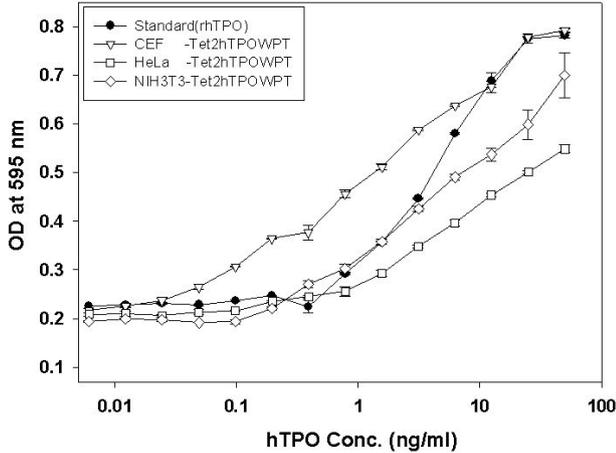


Fig. 4. Bioassay of hTPO in various target cells on the proliferation of Mo7e cells. Various concentration of hTPOs were added to each well, and the incubation was continued for a further 2 day. The superiority of hTPO in terms of biological activity was determined by Analysis of Variance by using General Linear Model (GLM) procedure in Statistical Analysis System (SAS).

은 부화한 15마리 중 암컷과 수컷 각각 4마리씩 모두 8마리만이 생존하였으며, 이 개체에서 혈장을 채취하여 genomic DNA를 분리한 후 *hTPO*와 Hygromycin 저항성 유전자, 그리고 *GAPDH* 유전자에 대한 PCR 분석을 실시한 결과 8마리 모두에서 유전자의 전이가 확인되었다(Fig. 5).

형질전환 개체로 확인된 8마리 중 수컷 1마리(006번)가 생후 2개월령에 폐사하였으며, 나머지 7마리를 대상으로 하여 *hTPO* 유전자의 발현이 doxycycline의 첨가 여부에 따라서 유도적으로 일어나는 지를 확인하고자 하였다. 이에 doxycycline이 첨가된 식이를 하기 전의 각 개체에서 혈액을 채취하였으며, 식이 2주 후에 다시 혈액을 채취하고, 식이에서 doxycycline을 제거한 2주 후에 혈액도 채취하였다. 각 혈액에서 혈장을 분리하여 혈장 내의 hTPO 농도를 측정된 결과, doxycycline 식이 시작 전보다 2주간 식이한 후의 모든

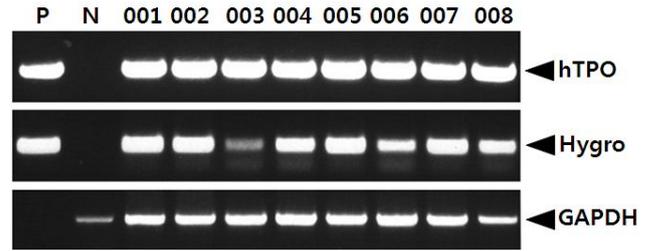


Fig. 5. Detection of the *hTPO* gene in the Go transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the 8 transgenic chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTet2-hTPOWPT) and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken were used, respectively.

개체의 혈장에서 hTPO 농도가 증가한 것으로 확인되었으며, 특히 001, 002, 004, 그리고 005 개체에서 100 ng/mL 이상의 매우 높은 농도를 나타내었다(Fig. 6). 다시 doxycycline이 첨가되지 않은 식이를 2주간 실시한 후 채취한 혈장에서는 doxycycline 식이 전의 혈장 내 농도와 거의 유사한 정도로 hTPO의 농도가 저하된 것을 확인할 수 있었는데(Fig. 6), 이

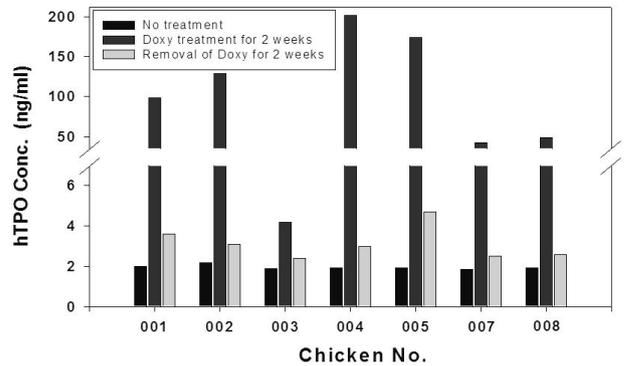


Fig. 6. Expression of the *hTPO* gene in Go transgenic chickens. The levels of hTPO secreted into the blood taken from 16-18 week-old chicks were measured by ELISA as described in the Materials and Methods.

Table 2. Hatchability and transgenic efficiency of manipulated chicken embryos

Treatment	Number of eggs	Number of embryos 3 days post-injection (%)	Number of hatched chicks (%)	Number of 1 month old chicks (%)	Number of transgenic chicks (%) ^a
No injection	50	47 (94.0)	45 (90.0)	45 (90.0)	
Virus injection	138	61 (44.2)	15 (10.9)	8 (5.8)	8 (100)

^aThe only chicks with detectable hTPO by PCR were counted as transgenics.

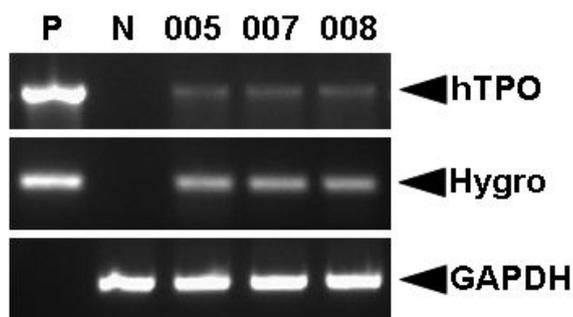


Fig. 7. Detection of the *hTPO* gene in the germlines of Go male transgenic chickens. Genomic DNA was isolated from the sperm of three Go male transgenic chickens and was subjected to PCR analysis. For positive (Lane P) and negative (Lane N) controls, plasmid DNA (pTet2-hTPOWPT) and genomic DNA isolated from non-transgenic chicken sperm were used, respectively.

는 doxycycline에 의한 외래 유전자의 발현 조절, 즉 유전자 발현의 turn on/off가 매우 신속하게 일어나는 것을 의미한다. 뿐만 아니라 비유도 조건에서는 외래 유전자의 발현이 완벽하게 저해됨으로써 background 발현이 거의 존재하지 않는 것을 확인할 수 있었다.

7마리의 형질전환 닭 중에서 수컷인 005, 007, 008 개체로부터 정자를 채취하여 genomic DNA를 분리한 후 *hTPO*와 Hygromycin 저항성 유전자, 그리고 *GAPDH* 유전자에 대한 PCR을 실시하였다. 그 결과 3마리 모두에서 외래 유전자의 존재를 확인할 수 있었으며(Fig. 7) 이 개체로부터 G_1 을 생산하여 외래 유전자의 다음 세대로의 전이를 확인할 예정이다.

고 찰

형질전환 동물을 이용한 생리활성물질의 대량 생산은 주로 가축의 뇨와 우유, 또는 혈액을 통해서 시도되었다(Houdebine, 2009). 그러나 이러한 방법은 가축의 긴 세대 간격과 비경제성, 낮은 성공률, 그리고 여러 종류의 단백질이 이미 존재함으로써 외래 유전자의 발현에 의해서 생산된 물질의 분리 정제에 매우 큰 어려움이 유발되는 등의 여러 가지 단점을 가지고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 본 연구에서는 가축이 아닌 가금을 대상으로 생리활성물질을 발현 시키고자 하였으며, 특히 닭의 계란을 통해서 재조합 단백질을 생산하여 물질의 분리 정제가 보다 수월하게 이루어질 수 있도록 계획하였다. 형질전환 닭의 생산은 기술적인 용이

성과 높은 유전자 전이율을 나타내는 방법인 고농도의 retrovirus를 X기의 계란의 배반엽층에 미세주입하는 방법을 이용하였다. 이 방법은 ES 세포에 DNA를 transfection하는 방법(Zhu 등, 2005)이나 PGC 세포를 분리한 후 virus를 이용한 유전자 전이를 실시하여 다시 배아로 주입하는 방법(Park 등, 2003; van de Lavoie 등, 2006) 등에 비해 과정이 간단하고 유전자의 전이 효율이 높다. 또한, virus만 충분히 준비되면 여러 개의 계란을 동시에 실험하여 단시간 내에 많은 수의 형질전환 닭을 생산하는 것이 가능하다. 현재까지 형질전환 닭으로부터 발현을 시도한 재조합 단백질로는 단일클론항체(Zhu 등, 2005), single chain Fv-Fc fusion protein(Kamihira 등, 2005), 사람의 EPO(Kodama 등, 2008), 사람의 G-CSF(Kwon 등, 2008) 등이 있으나, 경제적 가치가 입증된 성공적인 사례는 거의 없다. 이는 형질전환 닭의 체내에서 외래 유전자의 발현이 특정 부위나 시기에 국한되어 일어나지 못하며, 또한 발현 유도 조건하에서의 발현이 최대화되지 못하였기 때문인 것으로 추정된다. 이러한 형질전환 가금을 비롯한 외래 유전자가 전이된 동물의 가장 큰 문제는 무작위적인 발현에 의한 개체의 생리적인 부작용이 발생한다는 점이다. 이를 해결하기 위하여 본 연구에서는 외래 유전자의 발현을 유도적으로 조절할 수 있는 유전자 전이 체계인 Tet system을 도입하였으며, 발현 유도 조건 하에서 발현율을 높이기 위하여 woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element(WPRE)(Zufferey 등, 1999) 서열을 도입하였다. 생체반응기로 사용하기 위한 형질전환 닭의 생산에 있어서 특정 유전자의 발현이 대부분의 시간 동안은 불활성화되어 있다가 필요한 경우에만 활성화되어야 하므로 Tet-Off system보다는 Tet-On system이 더 적절한 것으로 판단하였으며, 또한 이 system은 유전자 발현의 유도가 전자에 비해 더욱 신속하게 진행되는 것으로 알려져 있다(Urlinger 등, 2000). 그러나 기존의 Tet system은 비유도 조건, 즉 유도체가 없는 조건에서도 외래 유전자의 발현이 완전히 억제되지 못해서 미미한 background 활성을 나타낸다. 이러한 현상을 최소화하기 위하여 본 연구에서는 TRE 서열을 transactivator와의 결합 친화성과 특이성이 강화된 TRE-tight 서열로 교체하였다.

형질전환 닭의 혈액에 포함된 hTPO의 농도는 doxycycline을 식이한 발현 유도 조건에서 50에서 200 ng/mL로 확인되었는데, 이 농도는 LNChTPOW virus vector system을 이용하여 생산한 형질전환 닭의 혈액 내 농도인 1.62 μ g/mL보다 낮은 수치이나(Kwon 등, 2008), 후자의 경우 모든 개체가 생존 기간이 매우 짧았으며 이는 외래 유전자의 지속적인 발현에 의한 개체의 생리적인 부작용이 큰 요인으로 작용한

것으로 추정되었다. 이러한 현상은 2008년에 본 연구실에서 생산한 hG-CSF 형질전환 닭의 실험에서도 확인되었는데, 생산된 G₁ 중 70% 이상이 부화한 지 한 달 이내에 모두 폐사하였다(Kwon 등, 2008). 이에 반해 본 연구에서 생산된 형질전환 닭은 혈액 내 농도가 낮으나 현재까지 생리적인 부작용이 확인된 개체는 없으며, 또한 chimera 상태의 Go 개체로부터 생산된 G₁에서는 hTPO의 농도가 증가할 뿐만 아니라 hTPO의 발현이 유도적으로 조절될 수 있으므로 생리적인 부작용에 의한 폐사를 최소화할 수 있으리라 생각된다. 실제로 Tet2-hTPOWPT 형질전환 닭의 doxycycline의 식이에 의한 혈액 내 hTPO 농도의 변화를 살펴보면 doxycycline의 존재 여부에 따라서 hTPO의 농도 변화가 확연하게 차이가 나는 것을 알 수 있었으며, 발현 유도체가 제거된 조건에서는 hTPO의 발현 억제가 신속히 일어나서 단시간 내에 농도가 저하되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6). 본 연구에서 구축한 Tet system은 형질전환 동물이나 유전자 치료 등에 있어서 효율적인 외래 유전자의 발현 조절 수단으로 이용될 수 있을 것이다.

적 요

형질전환 동물에 있어서 외래 유전자의 조절되지 않은 과다 발현은 생리적인 부작용이나 독성을 나타내게 된다. 본 연구에서는 이러한 문제를 해결하기 위하여 외래 유전자 발현 조절 system인 tetracycline-inducible expression system(Tet system)을 도입하였다. 그러나 종래의 Tet system을 이용한 유전자 발현 조절은 system 자체의 구성 요소로 인한 미미한 leaky 현상 때문에 완벽하게 이루어지지 않는다. 본 연구에서는 보다 완벽한 외래 유전자의 발현 조절 system을 구축하기 위하여 rTA 대신 진일보한 형태의 rTA2^SM2를 도입하고 TRE 부분을 TRE-tight로 대체하였다. 확립된 retrovirus vector system을 이용하여 다양한 표적세포와 형질전환 닭으로부터 혈소판 생산의 일차적인 조절자이며, 조혈간세포의 생존과 증식에 있어서 매우 중요한 역할을 하는 human thrombopoietin(hTPO)를 생산하고자 하였다. *In vitro* 상의 연구에서, CEF 세포에서 발현되는 hTPO가 가장 높은 발현량과 발현 유도를 나타내었으며, 상업적으로 판매되고 있는 hTPO나 다른 표적세포에서 생산된 hTPO에 비해 생물학적 활성이 가장 높은 것으로 확인되었다. 고농도로 농축한 재조합 retrovirus를 stage X 단계의 계란의 배반엽 층에 미세주입하여 대리난각 방법으로 배양한 결과, 미세주입한 138개의 계란 중 21

일 후에 15개의 계란에서 병아리가 부화하였으며, 그 중 8마리가 형질전환 개체로 확인되었다. 이 형질전환 닭은 사료 1 g 당 0.5 mg의 doxycycline을 첨가하여 2주간 식이하였으며, 그 후 혈액을 채취하여 hTPO 농도를 측정된 결과 200 ng/mL로 확인되었다. 또한 형질전환 개체 중 수컷의 정자에서 hTPO 유전자의 존재를 확인함으로써 germLine transmission의 가능성을 입증하였다. 이상의 연구 결과는 사람의 cytokine 단백질의 대량생산을 위한 생체반응기로서의 형질전환 닭의 생산 가능성을 제시한 데 의의가 있다.

사 사

이 논문은 2005년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구 조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2005-050-C00004).

인용문헌

- Avanzi GC, Lista P, Giovanazzo B, Moniero R, Saglio G, Benetton G, Codd R, Cattoretti G, Pegoraro L 1988 Selective growth response to IL-3 of a human leukaemic cell line with megakaryoblastic features. *Br J Haematol* 69:359.
- Bohl D, Naffakh N, Heard JM 1997 Long-term control of erythropoietin secretion by doxycycline in mice with engineered primary myoblast. *Nature Med* 3:299-305.
- Dyck MK, Lacroix D, Pothier F, Sirard MA 2003 Making recombinant proteins in animals: different systems different applications. *Trends Biotechnol* 21:394-399.
- Eyal-Giladi H, Kochav S 1976 From cleavage to primitive streak formation: A complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. *Dev Biol* 49:321-337.
- Fontes CM, Ali S, Gilbert HJ, Hazlewood GP, Hirst BH, Hall J 1999 Bacterial xylanase expression in mammalian cells and transgenic mice. *J Biotechnol* 72:95-101.
- Gossen M, Bujard H 1992 Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5547 - 5551.
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Müller G, Hillen W, Bujard H 1995 Transcriptional activation by tetracyclines in mam-

- malian cells. *Science* 268:1766-1769.
- Houdebine LM 2002 Antibody manufacture in transgenic animals and comparisons with other systems. *Curr Opin Biotechnol* 13:625-629.
- Houdebine LM 2006 Transgenic animal models and target validation. *Methods Mol Biol* 360:163-202.
- Houdebine LM 2009 Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 32:107-121.
- Houdebine, LM 2000 Transgenic animal bioreactors. *Transgenic Res* 9:305-320.
- Hunter CV, Tiley LS, Sang HM 2005 Developments in transgenic technology: applications for medicine. *Trends Mol Med* 11:293-298.
- Ivarie R 2003 Avian transgenesis: progress towards the promise. *Trends Biotechnol* 21:14-19.
- Kamihira M, Ono KI, Esaka K, Nishijima KI, Kigaku R, Komatsu H, Yamashita T, Kyogoku K, Iijima S 2005 High-level expression of single-chain Fv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens by using a retroviral vector. *J Virol* 79:10864-10874.
- Kaushansky K 1998 Thrombopoietin. *N Engl J Med* 339:746-754.
- Keefer CL 2004 Production of bioproducts through the use of transgenic animal models. *Anim Reprod Sci* 82-83:5-12.
- Kodama D, Nishimiya D, Iwata K, Yamaguchi K, Yoshida K, Kawabe Y, Motonon M, Watanabe H, Yamashita T, Nishijima K, Kamihira M, Iijima S 2008 Production of human erythropoietin by chimeric chickens. *Biochem Biophys Res Commun* 367:834-839.
- Koo BC, Kwon MS, Choi BR, Kim JH, Cho SK, Sohn SH, Cho EJ, Lee HT, Chang W, Jeon I, Park JK, Park JB, Kim T 2006 Production of germline transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein using a MoMLV-based retrovirus vector. *FASEB J* 20:2251-2260.
- Kwon MS, Koo BC, Choi BR, Kim JH, Park Y-Y, Lee YM, Suh HS, Park YS, Lee HT, Kim J-H, Roh JY, Kim N-H, Kim T 2008 Generation of transgenic chickens that produce bioactive human granulocyte-colony stimulating factor. *Mol Reprod Dev* 75:1120-1126.
- Kwon MS, Koo BC, Kim DH, Kim T 2007 Construction of retrovirus vector system for the regulation of recombinant *hTPO* Gene expression. *Reprod Dev Biol* 31:161-167.
- Lillico SG, McGrew MJ, Sherman A, Sang HM 2005 Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs. *Drug Discov Today* 10:191-196.
- Mayford M, Bach ME, Huang Y-Y, Wang L, Hawkins RD, Kandel ER 1996 Control of mammary formation through regulated-expression of a CaMK transgene. *Science* 274:1678-1683.
- McGrew MJ, Sherman A, Ellard FM, Lillico SG, Gilhooley HJ, Kingsman AJ, Mitrophanous KA, Sang H 2004 Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep* 5:728-733.
- Park TS, Jeong DK, Kim JN, Song GH, Hong YH, Lim JM, Han JY 2003 Improved germline transmission in chicken chimeras produced by transplantation of gonadal primordial germ cells into recipient embryos. *Biol Reprod* 68:1657-1662.
- Petite JN, Mozdziak PE 2002 Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs. In Pinkert CA, editor. *Transgenic Animal Technology*, 2nd edn. San Diego: Academic Press. p279-306.
- Raju TS, Briggs JB, Borge SM, Jones AJ 2000 Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology* 10:477-486.
- Sitnicka E, Lin N, Priestley GV, Fox N, Broudy VC, Wolf NS, Kaushansky K 1996 The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells. *Blood* 87:4998-5005.
- Urlinger S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H, Hillen W 2000 Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7963-7968.
- van de Lavoie MC, Diamond JH, Leighton PA, Mather-Love CM, Heyer BS, Bradshaw R, Kerchner A, Hooi LT, Gessaro TM, Swanberg SE, Delany ME, Etches RJ 2006 Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature* 441:766-769.
- Zhu L, van de Lavoie MC, Albanese J, Beenhouwer DO, Cardarelli PM, Cuisson S, Deng DF, Deshpande S, Diamond JH,

Green L, Halk EL, Heyer BS, Kay RM, Kerchner A, Leighton PA, Mather-Love CM, Morrison SL, Nikolov ZL, Passmore DB, Pradas-Monne A, Preston BT, Rangan VS, Shi M, Srinivasan M, White SG, Winters-Digiacinto P, Wong S, Zhou W, Etches RJ 2005 Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. *Nat Biotech-*

nol 23:1159-1169.

Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ 1999 Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 73:2886-2892.

(접수: 2009. 6. 23, 수정: 2009. 6. 26, 채택: 2009. 6. 26)