



닭 오브알부민 프로모터의 길이에 따른 유전자 발현 활성 및 에스트로겐 반응성 분석

양현¹ · 김경운² · 김점순³ · 우제석⁴ · 이휘철¹ · 최훈성⁵ · 정선근⁶ ·
 수레쉬 쿠마르⁵ · 이해선¹ · 오건봉¹ · 변승준^{1†}

¹농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오통학과 농업연구사, ²농촌진흥청 국립축산과학원 기획조정과 농업연구사,
³농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오통학과 주무관, ⁴농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오통학과 농업연구관,
⁵농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오통학과 박사후연구원, ⁶농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오통학과 연구원

Analysis of Transcriptional Activity and Estrogen Responsiveness of Regulatory Elements in Chicken Ovalbumin Promoter

Hyeon Yang¹, Kyung-Woon Kim², Jeom Sun Kim³, Jae-Seok Woo⁴, Hwi-Cheul Lee¹, Hoonsung Choi⁵,
 Sun Keun Jung⁶, Shanmugam Sureshkumar⁵, Haesun Lee¹, Keon Bong Oh¹ and Sung June Byun^{1†}

¹Researcher, Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Republic of Korea

²Researcher, Planning and Coordination Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Republic of Korea

³Action Officer, Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Republic of Korea

⁴Senior Researcher, Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration,
 Wanju 55365, Republic of Korea

⁵Postdoctoral Researcher, Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration,
 Wanju 55365, Republic of Korea

⁶Technician, Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Republic of Korea

ABSTRACT Chickens have been considered as well-defined animal bioreactor. The optimized ovalbumin promoter is essential for recombinant protein production in transgenic chicken. Here we try to compare the activity and identify the effect of estrogen on ovalbumin promoter according to each promoter length with estrogen response element (ERE) existence. We cloned two (2.8 and 5.5 kb) ovalbumin promoters that the 5.5 kb contained the ERE but the 2.8 kb did not, and these two promoters were cloned to pGL4.11 vector. Additionally, we constructed another pGL4.11 vector containing of the 4.4 kb (with ERE) ovalbumin promoter deleted with 1 kb between ERE region and the 2.8 kb promoter. For reporter assay, HeLa, MES-SA, LMH/2A, and cEF cells were transfected with all the pGL4.11 vectors. The comparative analysis showed that the mutated 4.4 kb promoter has more potent activity than the 2.8 and 5.5 kb promoters in HeLa, MES-SA, and LMH/2A cells. However, there is no significant difference in cEFs. Also, these cells transfected with the mutated 4.4 kb promoter were treated with the 17 β -estradiol (0~3,000 nM) and HeLa, MES-SA, and LMH/2A cells showed estrogen responsibilities, but cEFs did not. Besides, the mutated 4.4 kb promoter has still higher activity than the 2.8 and 5.5 kb promoter, and there is no transcriptional induction effect in 2.8 kb promoter at 500 nM estrogen that is blood concentration of laying hens. Hence our study strongly suggested that the mutated 4.4 kb promoter is considered as one of the most efficient length for generating transgenic chicken.

(Key words: transgenic chicken, bioreactor, ovalbumin, reporter assay)

서 론

동물생명공학기술의 발전은 동물에서 사람에게 유용한

재조합단백질 생산용 형질전환 동물 개발 연구가 활발히 수행되는 계기를 제공하였다(Houdebine, 2009). 이러한 재조합 단백질을 생산하기 위해 후보형질전환 동물들 중 하나로 닭

[†] To whom correspondence should be addressed : pcs1778@korea.kr

이 사용되고 있다(Harvey et al., 2002; Rapp et al., 2003; Kamihara et al., 2005; Zhu et al., 2005; Park et al., 2015; Kim et al., 2018; Oishi et al., 2018). 특히, 닭은 포유류와 다르게 짧은 세대간격, 적은 사양 비용, 그리고 재조합 산물의 안전성 등에 대한 이점들로 인하여 생물반응기 동물로 활용했을 때 다른 동물 종보다 유리한 것으로 알려져 있다(Lillico et al., 2006; Robert, 2006). 한편, Perry(1988)는 계란의 체외 부화 방법을 개발하여 닭의 수정란에 직접 유전자 변형을 시도할 수 있는 계기를 마련하였고, 1994년 Perry의 체외 부화 방법을 이용한 최초의 형질전환 닭이 생산되었다(Love et al., 1994).

이후 형질전환 닭을 생산하기 위한 많은 후속 연구들이 수행되어왔다. 현재는 원시생식세포(Van de Lavoie et al., 2006; Oishi et al., 2016) 혹은 재조합바이러스 벡터를 매개로 하는 외래유전자 도입 방법이 가장 널리 이용되고 있으며(Cao et al., 2015), 특히 재조합렌티바이러스가 닭에 외래 유전자를 도입하는데 매우 효율적인 것으로 보고되고 있다(McGrew et al., 2004). 그러나 재조합렌티바이러스 벡터는 전체 유전자 크기가 약 10 kb 내외로 제한적이라 유전자 크기가 큰 프로모터의 사용에는 한계가 있다. 따라서 조직 특이성 및 프로모터 활성 등을 종합적으로 고려한 효율적인 프로모터 영역을 사용하는 것이 무엇보다 중요하게 여겨지고 있다(Byun et al., 2011). 현재 닭의 오브알부민 유전자 프로모터가 생물반응기로서 형질전환 닭을 생산하기 위한 재조합바이러스 벡터의 프로모터 영역으로 가장 널리 사용되고 있으며, 이는 닭의 오브알부민 유전자가 닭에서 난관 특이적으로 발현되는 동시에 난 단백질 함유량의 50% 이상을 차지할 정도로 많이 발현되기 때문이다(Muramatsu and Sanders, 1995; Sugino et al., 1997). 오브알부민 유전자의 특징적인 발현 조절은 전사 개시 상류지역에 존재하는 다양한 조절 영역에 기인하며, 이러한 조절 영역 중 Steroid-dependent regulatory element(SDRE) 및 Negative regulatory element(NRE)는 조직 특이적인 조절에 관여하는 것으로 알려져 있으며(Dougherty and Sanders, 2005), Estrogen response element(ERE)는 전사 활성화에 관여하는 것으로 알려져 있다(Kato et al., 1992).

따라서 본 연구는 세포에서 프로모터의 길이와 ERE 영역의 존재 유무에 따라 오브알부민 프로모터의 활성을 비교하고 에스트로젠 호르몬 처리에 의한 효과를 분석하여 궁극적으로 형질전환 닭 생산을 위한 최적 크기의 오브알부민 프로모터 영역을 결정하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 세포 배양

본 실험은 농촌진흥청 국립축산과학원의 동물실험 계획서에 의거 동물 보호법 및 국립축산과학원 동물시험윤리위원회에서 승인된 동물실험 방법(승인번호: 2017-219)에 따라 수행되었다. 본 실험에서 사용된 사람 자궁경관 상피세포주(Human cervix epithelial cells, HeLa, ATCC[®] CRL-2[™]), 사람 자궁 상피세포주(Human uterus epithelial cells, MES-SA, ATCC[®] CRL-1976[™]), 에스트로젠 수용체 알파 발현벡터가 도입된 닭 간세포주(Chicken hepatocyte, LMH/2A, ATCC[®] CRL-2118[™])는 American Type Culture Collection(ATCC, VA)에서 구매하였고, 닭의 배아 섬유아세포(Chicken embryonic fibroblast cells; cEFs)는 10일차 수정란에서 트립신 처리 및 원심분리를 통해 확보하였다(Schmid et al., 1983). 세포 배지는 DMEM + Glutamax - I(Dulbecco's Modified Eagle's Medium + Glutamax - I; Invitrogen, CA) 배양액에 1% antibiotic/antimycotic(Invitrogen)과 10% Fetal bovine serum(FBS; Invitrogen)을 첨가하여 사용하였고, cEF 세포 배양을 위해서 배양액에 추가적으로 2% chicken serum(Sigma-Aldrich, MO)을 첨가 후 사용하였다. 모든 세포는 100 mm plates(Thermo Scientific, MA)에서 배양하였고, LMH/2A 세포의 배양을 위해서 모든 배양접시에 0.1% gelatin(Thermo Scientific)을 도말하여 사용하였다.

2. 재조합 리포터 벡터 구축

우선적으로 닭 오브알부민 프로모터(ovalbumin promoter, pOV) 영역은 Maxwell[®] 16 blood DNA purification kit (Promega, WA)를 사용하여 화이트 레그혼 닭의 혈액으로부터 genomic DNA를 추출한 후, PrimeSTAR[™] HS DNA polymerase(Takara, Shiga)를 사용하여 polymerase chain reaction(PCR) 방법으로 증폭하였다. 2.8 kb 프로모터 영역 증폭용(Forward: 5-GGTACCTTAAGTCCTCAGACTTGG-3, Backward: 5-CTCGAGGGTGAAGTCTGAGTTGTC-3)과 5.5 kb 프로모터 영역 증폭용 프라이머(Forward: 5-GGTACCTCTCTTCA GAATGGCACA-3, Backward: 5-CTCGAGGGTGAAGTCTG AGTTGTC-3)들은 번역 개시 위치(ATG) 기준으로 프로모터 영역을 증폭하도록 디자인하였고, 유전자 클로닝을 용이하게 위해 프라이머 양쪽 말단에 제한효소 *KpnI*과 *XhoI* 인식 염기서열을 각각 삽입하였다. 증폭된 두 가지 크기의 프로모터 영역은 pGL4.11(luc2p) 리포터 벡터의 *KpnI*과 *XhoI* 인식 염기서열에 연결하여 2.8 kb 오브알부민 프로모터

(2.8kb-pOV)가 포함된 pGL4.11 리포터 벡터(2.8kb-pOV/pGL4.11) 그리고 5.5 kb 오브알부민 프로모터(5.5kb-pOV)가 포함된 pGL4.11 리포터 벡터(5.5kb-pOV/pGL4.11)를 구축하였다. 한편, 2.8 kb 오브알부민 상류지역과 ERE 영역 사이의 대략 1 kb를 결실시킨 4.4 kb 오브알부민 프로모터(Mut-4.4kb-pOV)의 염기서열을 유전자 합성한 다음 pGL4.11 리포터 벡터에 연결시켜 변형된 4.4 kb 오브알부민 프로모터를 포함하는 pGL4.11 리포터 벡터(Mut-4.4kb-pOV/pGL4.11)를 구축하였다.

3. 유전자 도입 및 리포터 분석

본 연구의 프로모터 활성 검증을 위한 세포내 유전자 도입은 Lipofectamine® 3000(Invitrogen)을 사용하였다. 12-well 배양접시(Thermo Scientific)에 세포를 동일한 숫자로 분주한 후, 각 well의 세포 밀도가 70% 이상에서 유전자를 도입하였으며, 유전자 도입 직전에 항생제를 제거한 배양액으로 교체하였다. 벡터 사이즈에 따른 몰비(molar ratio)를 고려하여 각 well당 firefly DNA(pGL4.11/luc2p) 1 µg과 renilla DNA(pGL4.74/hRluc) 0.01 µg을 2 µL의 p3000과 함께 50 µL의 Opti-MEM(Thermo Scientific)에 희석하고, 1.5 µL의 Lipofectamine reagent가 희석된 50 µL의 Opti-MEM과 섞어 약 20분간 실온에서 정치 후, 각 well에 분주하였다. 유전자가 도입된 세포의 호르몬 처리는 FBS가 제거된 배양액에 에탄올에 녹인 17β-estradiol(Sigma-Aldrich)을 농도 별로 처리한 후, 세포를 24시간 동안 배양하였다. 24시간 동안 호르몬 처리한 세포는 Dual luciferase® reporter assay system

(Promega)을 이용하여 리포터 분석을 실시하였다. 리포터 분석을 위해 먼저 세포 배양접시에서 배양액을 제거하고, 각각의 well에 250 µL의 passive lysis buffer를 분주한 다음 약 20분간 shaking하면서 세포를 용해하였다. 각 well에서 용해된 샘플들은 1.5 mL Eppendorf tube로 옮겨 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층의 20 µL를 96-well 배양접시(Nunc)에 각각 분주하였고, Centro LB 960 Luminometer(Berthold, TN) 장비를 사용하여 각 샘플에서 리포터 유전자의 발현량을 측정하였다.

4. 통계 분석

통계 분석은 Graphpad Prism 5.03. software를 사용하여 수행하였다. 프로모터 간의 상대적인 활성 비교는 one-way ANOVA를 통해 수행하였으며, P<0.05에서 유의적인 차이가 있는 것으로 간주하였다.

결 과

본 연구는 일차적으로 재조합바이러스 벡터 구축을 위한 오브알부민 유전자 프로모터의 크기에 따른 프로모터 활성을 평가하고자 하였다. 이를 위해 2.8kb-pOV/pGL4.11, 5.5kb-pOV/pGL4.11, 그리고 Mut-4.4kb-pOV/pGL4.11 벡터를 구축하였고, 각 벡터의 크기는 7,141 bp, 9,822 bp, 그리고 8,806 bp이었다. 구축한 벡터들의 크기는 XhoI 제한효소 처리 결과, 예상했던 크기의 DNA 밴드들을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 상기의 벡터들은 HeLa, MES-SA, LMH/2A, 그리고 cEF 세포

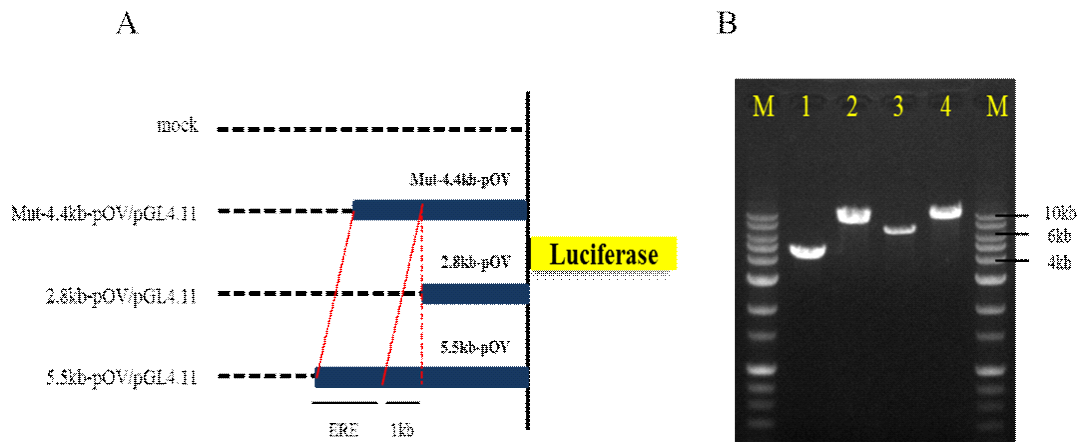


Fig. 1. The construction of reporter vectors.

(A): Reporter vectors containing 2.8, 5.5, and mutated 4.4 kb (Mut-4.4kb) ovalbumin promoters were constructed. (B) Each vector size was confirmed by restriction enzyme digestion using XhoI. M, Size marker; 1, pGL4.11 mock (4,370 bp); 2, Mut-4.4kb-pOV/pGL4.11 (8,806 bp); 3, 2.8kb-pOV/pGL4.11 (7,141 bp); 4, 5.5kb-pOV/pGL4.11 (9,822 bp).

에 각각 도입하고, 프로모터의 활성을 분석하였다(Fig. 2). Mut-4.4kb-pOV는 HeLa 세포에서 2.8kb-pOV에 비해 1.7배 ($P<0.001$) 발현량이 높았고(Fig. 2A), MES-SA 세포에서는 2.8 그리고 5.5kb-pOV에 대하여 각각 2.7($P<0.01$)와 2.2배 ($P<0.05$) 높았으며(Fig. 2B), LMH/2A 세포에서는 각각 3.1 ($P<0.001$)와 2.1배($P<0.001$) 높게 발현하는 것을 확인하였다 (Fig. 2C). 반면, cEF 세포에서 프로모터 활성은 mock 벡터를 포함한 모든 벡터들간에서 유의적인 차이가 없었다(Fig. 2D). 이러한 결과를 바탕으로 Mut-4.4kb-pOV는 HeLa, MES-SA, 그리고 LMH/2A 세포에서 2.8 그리고 5.5kb-pOV에 비해서 활성이 높은 것을 알 수 있었고, cEF 세포에서 모든 프로모터의 활성에 차이가 없는 결과를 통해서 오브알부민 프로모터가 세포 특이적으로 유전자 발현을 조절함을 확인하였다. 다음으로 오브알부민 프로모터가 클로닝된 벡터가 도입된 HeLa, MES-SA, LMH/2A, 그리고 cEF 세포에서 에스트로겐 처리에 따른 호르몬 반응성을 확인하고자, Mut-4.4kbpOV/pGL4.11 벡터를 HeLa, MES-SA, LMH/2A, 그리고 cEF 세포

에 유전자 도입하여 24시간 후, 0 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1,000 nM, 그리고 3,000 nM까지 에스트로겐을 처리하고, 호르몬 농도에 따른 리포터 유전자의 발현량을 분석하였다(Fig. 3). HeLa 세포에서 1,000 nM과 3,000 nM의 에스트로겐 처리 시 무처리 그룹(0 nM)에 비해 프로모터 활성이 각각 1.7($P<0.05$)와 1.9배($P<0.001$) 높았고(Fig. 3A), MES-SA 세포에서도 각각 1.5($P<0.05$)와 1.7배($P<0.001$) 높게 나타났다 (Fig. 3B). 특히 LMH/2A 세포는 1,000 nM과 3,000 nM 처리 결과, 2.5($P<0.001$)와 3.3배($P<0.001$) 높아, HeLa 및 MES-SA 세포에 비해 에스트로겐 처리에 의한 반응성이 더 큰 것으로 확인되었다(Fig. 3C). 반면, cEF 세포는 호르몬 처리에 의한 리포터 유전자의 발현량에 유의적인 변화가 없었다(Fig. 3D). 이러한 결과를 통해, Mut-4.4kb-pOV/pGL4.11 벡터가 도입된 HeLa, MES-SA, 그리고 LMH/2A 세포에서 에스트로겐 처리 후 호르몬에 반응성이 있는 결과를 확인하였다. 추가적으로, 에스트로겐에 반응성이 높은 LMH/2A 세포에서 Mock, 2.8kb-pOV/pGL4.11, 5.5kb-pOV/pGL4.11, 그리고 Mut-4.4kb-

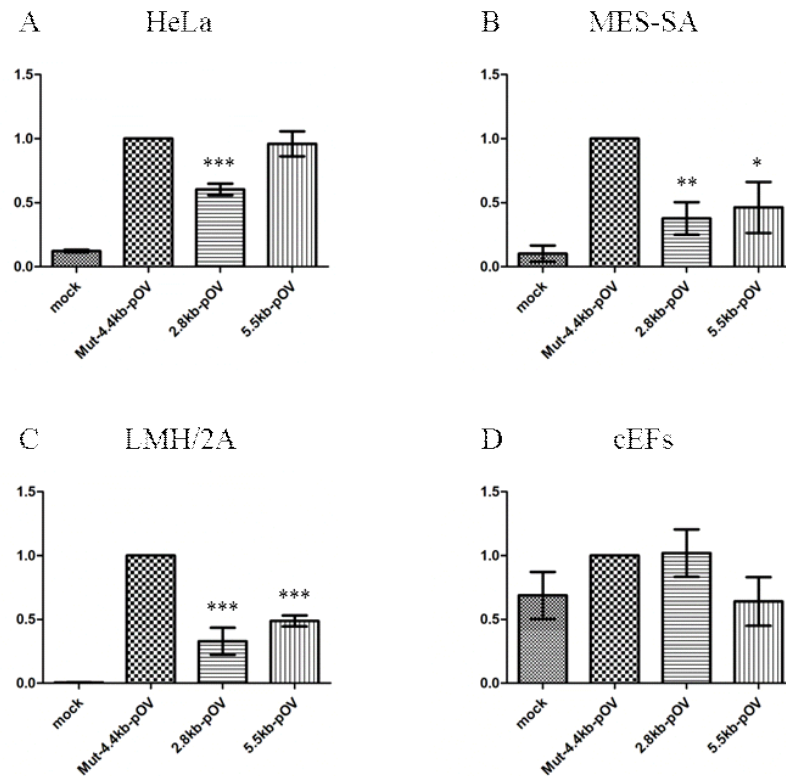


Fig. 2. The relative activity of 2.8, 5.5, and Mut-4.4kb ovalbumin promoters in several cells.

The reporter vectors were transiently transfected into HeLa (A), MES-SA (B), LMH/2A (C), and cEFs (D). Data are represented relative to the values obtained with the Mut-4.4kb-pOV group (Luciferase ratio: firefly luminescence / renilla luminescence, in each vector and relative ratios: Mut-4.4kb-pOV luciferase ratio / other vectors luciferase ratio). Error bars indicate the mean±SEM (n=3). * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ compared with Mut-4.4kb-pOV.

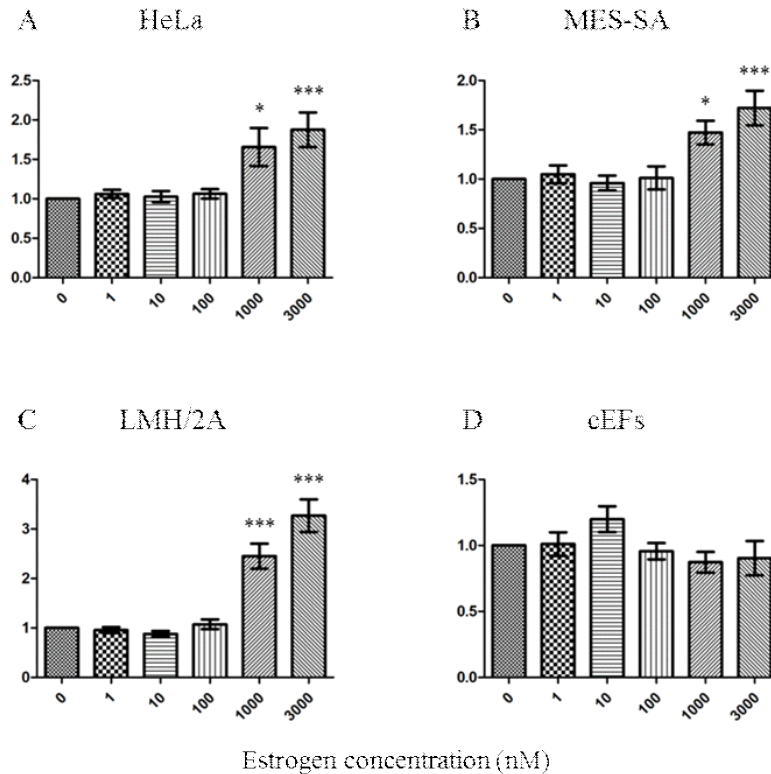


Fig. 3. Activation of Mut-4.4kb ovalbumin promoter by estrogen treatment in several cells. The reporter vector was transiently transfected into HeLa (A), MES-SA (B), LMH/2A (C), and cEFs (D), and then treated with 0 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1,000 nM, and 3,000 nM estrogen. Luciferase assays were performed 24 h after estrogen treatment. Data are represented relative to the values obtained with the 0 nM group (Relative ratios: 0 nM treatment luciferase ratio / other treatments luciferase ratio). Error bars indicate the mean±SEM (n=3). * $P<0.05$; *** $P<0.001$ compared with 0 nM treatment.

pOV/pGL4.11 벡터를 도입하고, 500 nM의 에스트로젠을 처리한 후에 각 프로모터의 활성을 비교한 결과, Mut-4.4kb-pOV는 2.8 그리고 5.5kb-pOV에 비해 7.1($P<0.001$)와 2.6배 ($P<0.001$) 발현이 높은 것을 확인하였다(Fig. 4A). 또한, LMH/2A 세포에서 에스트로젠 처리 전과 비교하여 500 nM 에스트로젠 처리 후의 효과를 분석한 결과, ERE 영역을 포함하는 Mut-4.4 그리고 5.5kb-pOV는 에스트로젠 처리에 의한 프로모터의 활성이 증가하는 반면, ERE 영역이 존재하지 않는 2.8kb-pOV는 그러한 효과가 없었다(Fig. 4B). 이상의 결과들은 에스트로젠에 반응성이 있는 세포에서 ERE 영역을 포함하는 Mut-4.4와 5.5kb-pOV가 ERE 영역을 포함하지 않는 2.8kb-pOV와 비교하여 에스트로젠 처리시 유전자 발현을 상향 조절할 수 있을 것으로 기대되는 결과이며, 궁극적으로는 실험에 사용된 상피세포주들에서 Mut-4.4kb-pOV가 2.8 그리고 5.5kb-pOV에 비해 프로모터의 활성이 높아 보다 더 효율적으로 유전자 발현을 조절할 수 있는 오브알부민 프로모터

의 크기인 것으로 생각되는 결과이다.

고찰

재조합단백질 생산용 형질전환 닭을 생산하기 위하여 다양한 크기의 오브알부민 유전자 프로모터가 재조합바이러스 벡터의 프로모터 영역으로서 이용되고 있다. 본 연구에서는 HeLa, MES-SA, LMH/2A 그리고 cEF 세포에서 2.8, 5.5, 그리고 Mut-4.4 kb의 오브알부민 프로모터를 검증하여 Mut-4.4 kb의 오브알부민 프로모터가 2.8 kb와 5.5 kb의 오브알부민 프로모터에 비해 효율적으로 유전자 발현을 조절할 수 있음을 나타내었다. Byun et al.(2011)은 전사 시작 위치(Transcription start sites; TSS)를 기준으로 2 kb의 오브알부민 프로모터가 포함된 재조합바이러스 벡터를 사용하여 형질전환 닭을 생산하였고, 2세대 닭 자손에서 형질전환 유전자인 녹색형광단백질(Green fluorescence protein; GFP)이

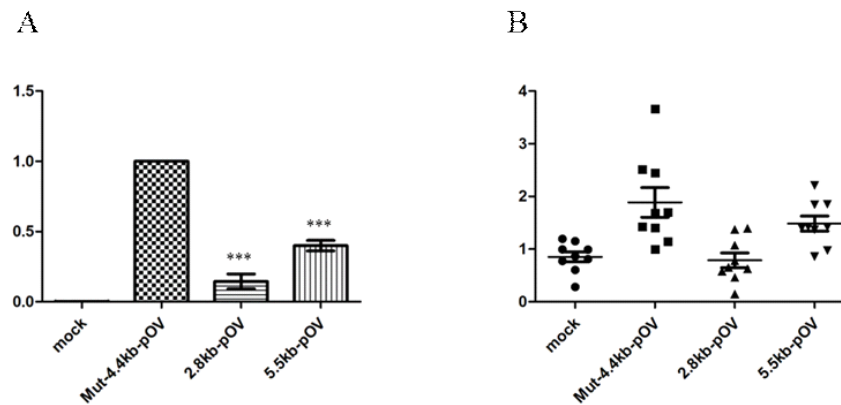


Fig. 4. The relative activity and effect of estrogen treatment on 2.8, 5.5, and Mut-4.4kb ovalbumin promoter in LMH/2A cells. (A): The reporter vectors were transiently transfected into LMH/2A cells, and then treated with 500 nM estrogen. Luciferase assays were performed 24 h after estrogen treatment. Data was represented relative to the values obtained with the Mut-4.4kb-pOV group (Relative ratios: after 500 nM treatment Mut-4.4kb-pOV luciferase ratio / after 500 nM treatment other vectors luciferase ratio). Error bars indicate the mean \pm SEM (n=3). *** P <0.001 compared with Mut-4.4kb-pOV. (B): Effect of estrogen treatment on each ovalbumin promoter was confirmed at 24 h after estrogen treatment. Data was represented relative to the values obtained with each vector group (Ratios: after 500 nM treatment luciferase ratio / after 0 nM treatment luciferase ratio, in each vector).

난관 특이적으로 발현되는 것을 보고하였다. 한편, Dougherty and Sanders(2005)는 TSS를 기준으로 -892 bp와 -780 bp에 위치하는 Steroid-dependent regulatory element(SDRE) 영역과 -308 bp와 -88 bp에 위치하는 Negative regulatory element(NRE) 영역이 조직 특이적인 발현 조절에 관여한다고 보고하였다. Liu et al.(2015)은 SDRE 영역과 NRE 영역을 포함하는 2.8kb-pOV를 사용하여 사람 neutrophil defensin-4 (HNP4)를 발현하는 닭을 생산하였으나, 단백질 생산량은 높지 않은 것으로 보고하였다. Lillico et al.(2006) 그리고 Cao et al.(2015)은 SDRE 영역과 NRE 영역을 포함하고 번역 개시 위치(Translation initiation sites, ATG) 기준으로 2.8 kb 크기인 오브알부민 프로모터에 약 700 bp의 ERE 영역을 연결한 재조합 프로모터(약 3.5 kb)를 재조합바이러스 벡터의 프로모터로서 사용한 형질전환 닭을 생산하였고, 생산된 닭의 단백질 생산량이 높은 것으로 보고하고 있다. 본 연구에서의 Mut-4.4kb-pOV는 ATG를 기준으로 2.8 kb의 오브알부민 프로모터에 1.6 kb 크기의 ERE 영역을 연결하여 사용하였다는 점에서 Lillico et al.(2006) 그리고 Cao et al.(2015)이 보고한 700 bp 크기의 ERE 영역과는 차이가 있으나, ERE 영역이 포함된 오브알부민 프로모터가 ERE 영역이 포함되지 않은 프로모터에 비해 활성이 높게 나타난 결과는 유사하다. 한편, 체외에서 오브알부민 프로모터의 활성을 분석하기 위해 닭 난관 상피세포에서의 검증은 필수적인 것으

로 생각되나, 상기 세포는 상업적으로 판매되지 않으며, 초대 배양의 어려움으로 인해 신뢰할만한 수준의 닭 난관 상피세포를 확보하는 것은 현실적으로 어려운 일로 생각된다(Dougherty and Sanders, 2005; Kasperczyk et al., 2012). 이런 이유로 닭 난관 상피세포의 대체를 위해 사람 자궁경관 상피세포주(Kim et al., 2006) 그리고 마우스 배아 종양 세포(McBurney et al., 1982) 등이 사용된 바 있다. 본 연구는 HeLa, MES-SA, LMH/2A, 그리고 cEF 세포를 프로모터 검증에 이용하였으며 특히, 닭의 LMH/2A와 cEF 세포에서의 연구결과는 Dierich et al.(1987)이 보고한 오브알부민 프로모터가 닭의 배아 섬유아세포에서는 기능하지 않으나, 간세포에서는 기능을 한다는 결과와 일치하고 있다. 추가적으로, 본 연구는 오브알부민 프로모터의 에스트로겐 처리에 의한 효과를 분석하여 Mut-4.4kb-pOV/pGL4.11 벡터가 도입된 HeLa, MES-SA, 그리고 LMH/2A 세포는 농도 별 에스트로겐 처리 결과 1,000 nM 수준의 에스트로겐 처리에서 반응성을 나타내는 것을 확인하였다. 반면, Tsang et al.(1981)은 40 주령 암탉에서 배란 24시간 전부터 배란 후 3시간까지의 혈중 에스트로겐 농도가 대략 350~500 nM 수준인 것으로 보고한 바 있다. 이에, 2.8, 5.5, 그리고 Mut-4.4kb-pOV/pGL4.11 벡터가 도입된 LMH/2A 세포에 500 nM의 에스트로겐을 24시간 처리 후 리포터 분석을 실시한 결과, Mut-4.4kb-pOV는 500 nM의 에스트로겐 처리시에도 2.8와 5.5kb-pOV에 비해 활성

이 높은 결과를 확인할 수 있었다. 게다가, ERE 영역이 없는 2.8kbpOV는 에스트로겐 처리에 의한 효과가 거의 없었으나, ERE 영역이 존재하는 5.5 그리고 Mut-4.4kb-pOV는 에스트로겐 처리시 리포터 유전자의 발현이 증가하는 효과를 나타내었다.

종합적으로, 재조합바이러스 벡터에 사용될 오브알부민 프로모터는 그 크기와 ERE 영역의 존재 유무에 따라 프로모터의 활성 및 에스트로겐 반응성에 차이를 보였다. 본 연구에서는 Mut-4.4kb-pOV가 2.8와 5.5kb-pOV에 비해 더욱 효율적으로 형질전환 유전자의 발현을 조절할 수 있을 것으로 예측되었다. 이상의 연구결과는 실제 형질전환 닭 생산을 통해 *in vivo*에서 검증 될 필요가 있으나, Mut-4.4kb-pOV가 2.8와 5.5kb-pOV에 비해 보다 더 효율적임을 *in vitro*에서 검증하였다는 것에 의의가 있다.

적 요

본 연구는 오브알부민 프로모터의 최적 크기를 결정하기 위해 수행하였고, 이를 위해 2.8, 5.5, 그리고 Mut-4.4 kb의 오브알부민 프로모터를 리포터 벡터에 클로닝하여 다양한 세포들에서 프로모터의 활성을 검증하였다. Mut-4.4kb-pOV는 2.8와 5.5kb-pOV에 비해 HeLa, MES-SA, 그리고 LMH/2A에서 높은 수준의 프로모터 활성을 유도하였으나, cEF 세포에서는 낮은 활성을 보였다. 한편, Mut-4.4kb-pOV/pGL4.11 벡터가 도입된 HeLa, MES-SA, LMH/2A, 그리고 cEF 세포에서 에스트로겐 처리에 의한 반응성을 검증한 결과, cEF 세포를 제외한 나머지 세포들은 에스트로겐을 처리했을 때 리포터 유전자의 발현량이 증가하였다. 또한 LMH/2A 세포에 500 nM 에스트로겐 처리 결과, Mut-4.4kb-pOV는 에스트로겐 처리 후에도 2.8와 5.5kb-pOV에 비해 높은 수준의 프로모터 활성을 유도하였다. 더불어 ERE 영역이 없는 2.8kbpOV는 LMH/2A 세포에서 500 nM 에스트로겐 처리 후 프로모터의 활성에 효과가 없었으나, ERE 영역을 포함하는 5.5 그리고 Mut-4.4kb-pOV는 에스트로겐 처리에 의해 프로모터의 활성이 증가한 결과를 보였다. 이상의 결과는 Mut-4.4kb-pOV가 형질전환 암탉을 생산하기 위한 재조합바이러스 벡터의 프로모터 영역으로 2.8와 5.5kb-pOV에 비해 보다 효율적인 크기임을 보여주는 결과이다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(과제번호: PJ01260301)

의 지원에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

- Byun SJ, Kim SW, Kim KW, Kim JS, Hwang IS, Chung HK, Kan IS, Jeon IS, Chang WK, Park SB, Yoo JG 2011 Oviduct-specific enhanced green fluorescence protein expression in transgenic chickens. *Biosci Biotechnol Biochem* 75(4):646-649.
- Cao D, Wu H, Li Q, Sun Y, Liu T, Fei J, Zhao Y, Wu S, Hu X, Li N 2015 Expression of recombinant human lysozyme in egg whites of transgenic hens. *PLoS ONE* 10(2):e0118626.
- Dierich A, Gaub MP, LePennec JP, Astinotti D, Chambon P 1987 Cell-specificity of the chicken ovalbumin and conalbumin promoters. *EMBO J* 6(8):2305-2312.
- Dougherty DC, Sanders MM 2005 Estrogen action: Revitalization of the chick oviduct model. *Trends Endocrinol Metab* 16(9):414-419.
- Harvey AJ, Speksnijder G, Baugh LR, Morris JA, Ivarie R 2002 Expression of exogenous protein in the egg white of transgenic chickens. *Nature Biotechnol* 20(4):396-399.
- Houdebine LM 2009 Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Rev Sci Tech* 37(1):107-121.
- Kamihara M, Ono K, Esaka K, Nishijima K, 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(17):10864-10874.
- Kasperczyk K, Bajek A, Joachimiak R, Walasik K, Marszalek A, Drewa T, Bednarczyk M 2012 *In vitro* optimization of the *Gallus domesticus* oviduct epithelial cells culture. *Theriogenology* 77(9):1834-1845.
- Kato S, Tora L, Yamaguchi J, Masushige S, Bellard M, Chambon P 1992 A far upstream estrogen response element of the ovalbumin gene contains several half-palindromic 5'-TGACC-3' motifs acting synergistically. *Cell* 68(4):731-742.
- Kim NS, Shen YN, Kim TY, Byun SJ, Jeon IK, Kim SH 2006 Expression of AGR-2 in chicken oviduct during laying period. *J Biochem Mol Biol* 40(2):212-217.

- Kim YM, Park JS, Kim SK, Jung KM, Hwang YS, Han M, Lee HJ, Seo HW, Suh JY, Han BK, Han JY 2018 The transgenic chicken derived anti-CD20 monoclonal antibodies exhibits greater anti-cancer therapeutic potential with enhanced Fc effector functions. *Biomaterials* 167:58-68.
- Lillico SG, Sherman A, McGrew MJ, Robertson CD, Smith J, Haslam C, Bernard P, Radcliffe PA, Mitrophanous KA, Elliot EA, Sang M 2006 Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *Proc Natl Acad Sci* 104(6):1771-1776.
- Liu T, Wu H, Cao D, Li Q, Zhang Y, Li N, Hu X 2015 Oviduct-specific expression of human neutrophil defensin 4 in lentivirally generated transgenic chickens. *PLoS ONE* 10(5):e0127922.
- Love J, Gribibin C, Mather C, Sang H 1994 Transgenic birds by DNA microinjection. *Nature Biotechnol* 12(1):60-63.
- McBurney MW, Jones-Villeneuve EM, Edwards MK, Anderson PJ 1982 Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line. *Nature*. 299 (5879):165-167.
- 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(7):728-733.
- Muramatsu T, Sanders MM 1995 Regulation of ovalbumin gene expression. *Poult Avian Biol Rev* 6:107-123.
- Oishi I, Yoshii K, Miyahara D, Kagami H, Tagami T 2016 Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep* 6:23980.
- Oishi I, Yoshii K, Miyahara D, Tagami T 2018 Efficient production of human interferon beta in the white of eggs from ovalbumin gene-targeted hens. *Sci Rep* 8(1):10203.
- Park TS, Lee HG, Moon JK, Lee HJ, Yoon JW, Yun BN, Kang SC, Kim J, Kim H, Han JY, Han BK 2015 Deposition of bioactive human epidermal growth factor in the egg white of transgenic hens using an oviduct-specific minisynthetic promoter. *FASEB J* 29(6):2386-2396.
- Perry M 1988 A complete culture system for the chick embryo. *Nature* 331(6151):70-72.
- Rapp JC, Harvey AJ, Speksnijder GL, Hu W, Ivarie R 2003 Biologically active human interferon α -2b production in the egg white of transgenic hens. *Transgenic Research* 12(5):569-575.
- Robert I 2006 Competitive bioreactor hens on the horizon. *Trends Biotechnol* 24(3):99-101.
- Schmid C, Steiner T, Froesch ER 1983 Preferential enhancement of myoblast differentiation by insulin-like growth factors (IGF I and IGF II) in primary cultures of chicken embryonic cells. *FEBS Letters* 161(1):117-121.
- Sugino H, Nitoda T, Juneja LR 1997 General chemical composition of hen eggs. pages 13-24. In: *Hen Eggs, Their Basic and Applied Science*. Yamamoto T, Juneja LR, Hatta H, Kim M (eds) CRC press, New York.
- Tsang CPW, Grunder AA, Hollands KG 1981 Estrogen sulfates in the plasma of white leghorn laying hens. *Poult Sci* 60(11):2548-2550.
- van de Lavoie MC, Diamond JH, Leighton PA, Mather-Love C, 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(7094):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 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. *Nature Biotechnol* 23(9):1159-1169.

Received Oct. 31, 2018, Revised Jan. 22, 2019, Accepted Jan. 30, 2019