

|                                                                                                                                               |                                    |                                                                                                                                      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                              | (19) 대한민국특허청(KR)<br>(12) 공개특허공보(A) | (11) 공개번호 10-2016-0057880<br>(43) 공개일자 2016년05월24일                                                                                   |
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br>C12N 5/074 (2010.01) C12N 5/02 (2006.01)<br>(21) 출원번호 10-2014-0159065<br>(22) 출원일자 2014년11월14일<br>심사청구일자 2014년11월17일 |                                    | (71) 출원인<br>경상대학교산학협력단<br>경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)<br>(72) 발명자<br>이준희<br>경상남도 진주시 석갑로53번길 10 들말대경아파트<br>102동 1402호<br>(74) 대리인<br>김순용 |

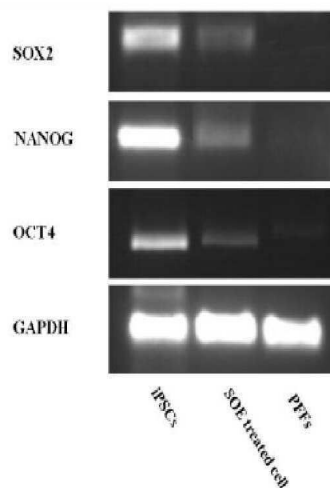
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **철갑상어 난자 추출물을 포함하는 세포 리프로그래밍 유도용 조성물**

### (57) 요약

본 발명은 철갑상어 난자 추출물을 포함하는 세포 리프로그래밍 유도용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 철갑상어 난자 추출물은 어류 중에서도 가장 원시적이고, 포유동물과 계통학적으로 가까운 철갑상어로부터 유래한 것으로, 이미 분화된 세포를 분화 이전의 상태로 되돌리는 리프로그래밍을 효과적으로 유도하며, 이 세포를 체세포 복제의 공여세포로 사용하여 복제 수정란을 재구축함으로써 복제 동물의 생산성을 향상시킬 수 있다.

**대 표 도** - 도8



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ009418022014

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 농업과학기술개발사업

연구과제명 희소한우의 체세포 복제수정란 생산 효율 향상 연구

기 여 율 1/1

주관기관 경상대학교

연구기간 2014.01.01 ~ 2014.12.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

철갑상어 난자 추출물을 포함하는 분화된 세포의 리프로그래밍 유도용 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 분화된 세포는 체세포 또는 체세포 줄기세포(somatic stem cell)인 것을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 Oct-4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog, Lin28, E-cadherin, ERAS 및 STAT3으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 리프로그래밍 유도 인자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 4

철갑상어 난자 추출물을 포함하는 분화된 세포의 역분화 증진용 조성물.

#### 청구항 5

철갑상어 난자 추출물을 분화된 세포에 처리하는 단계;를 포함하는, 분화된 세포의 리프로그래밍된 전능성 줄기세포를 제조하는 방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 철갑상어 난자 추출물을 포함하는 세포 리프로그래밍 유도용 조성물에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] 최근 국내, 외적으로 동물생명공학 분야에 관심이 높아지는 가운데 분자생물학과 유전학의 접목을 통하여 동물 복제기술은 한층 더 발전되고 있다. 체세포 핵이식(Somatic Cell Nuclear Transfer: SCNT) 기술을 이용한 형질 전환 기술은 인체 유용 단백질의 대량생산, 우유 영양성분의 조성변화, 인공장기, 질병모델동물, 세포 치료, 노화, 암, 유전자 적중 등 광범위하게 연구가 진행되고 있다. 그러나 종래 체세포 복제 동물의 제조 과정에서 많은 문제점이 나타나고 있으며, 최근에는 공여세포의 분화 상태에 따라 체세포 핵이식 유래 복제동물 산자의 생산성은 반비례인 것으로 보고되고 있어서(Wakayama 등., 2005), 미분화 상태의 세포 형태인 줄기세포를 공여세포로 사용하는 체세포 복제 연구가 건강한 정상 복제동물을 생산하기 위한 것에 관심이 집중되고 있다. 따라서 분화된 체세포를 이용하여 성공적인 복제동물을 생산하고자 할 때 분화된 체세포를 미분화 상태로 역분화시킨 전능성 줄기세포 (Inducible pluripotent stem cells: iPS, Yamanaka 등., 2006)로 전환한 하는 기술을 적용할 수 있을 것이다.

[0003] 줄기세포는 생식세포인 정자와 난자의 수정 후 배반포기 단계에 있는 수정란의 내부세포괴 (Inner Cell Mass: ICM)를 분리하여 줄기세포를 구축하는 배아줄기세포 (Embryonic Stem Cells: ESCs)와 신체의 여러 장기(골수, 혈액, 간, 피부, 췌장, 뇌, 소장 상피세포 등) 조직에서 분리가 가능한 성체줄기세포 (adult stem cell)가 있다. 이러한 줄기세포에 대한 연구는 초기에 배아줄기세포에 대한 많은 연구가 이루어져 왔으나, 최근에는 샘

플체취가 용이하고 장기이식 등 환자 맞춤형 치료에 적용이 가능하며 생명윤리적 문제에서 자유로운 성체줄기세포에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 특히 성체줄기세포는 앞에서 설명한 바와 같이 여러 장기에서 분리에서 분리할 수 있으며 배아줄기세포에 비하여 대량생산이 가능하다. 하지만 단점으로는 성체줄기세포의 기능을 배아줄기세포와 비교하였을 때 체외에서 줄기세포 증식이 원활하지 않아 충분한 줄기세포를 확보가 어렵고, 배아줄기세포보다 분화 능력이 현격하게 떨어지는 것으로 보고되고 있다(Watt와 Hogan, 2000; Zaehres와 Scholer, 2007).

[0004] 2006년 일본 교토대학교 Shinya Yamanaka 교수는 배아줄기세포와 성체줄기세포로 양분되어 있는 줄기세포 영역에 역분화 만능 줄기세포 (iPS, 전능성 줄기세포)이라는 새로운 영역을 추가시켰다. 그 방법으로는 분화가 완료된 체세포를 전능성을 가진 줄기세포로 역분화(de-differentiation)시키고자 배아줄기세포에서만 특이적으로 발현되는 유전자 24개의 재조합을 통하여 4개의 유전자 (Oct-4, Sox2, c-Myc, Klf4)를 체세포에 도입시켜서 전능성을 가진 줄기세포를 성공적으로 생산하였다 (Takahashi와 Yamanaka, 2006). 이 전능성 줄기세포는 인체를 구성하는 모든 세포로의 분화가 가능하여 알츠하이머 병 또는 뇌일혈과 같은 퇴행성 질환의 치료에 용이하게 사용될 수 있을 것으로 보인다. 또한 전능성 줄기세포는 분화된 체세포를 사용하기 때문에 생명윤리뿐만 아니라 법률적으로 아무런 장애가 없으므로, 성체줄기세포 보다는 자가 재생력 (self-renewal)이 뛰어나 다량의 줄기세포를 확보할 수 있다는 장점이 있다. 또한 전능성 줄기세포는 배아줄기세포와 유사한 분화능력을 보이고, 환자에서 적출된 세포에 이 역분화 기술을 환자 세포 치료(cell therapeutics)에 도입할 경우 면역 거부와 같은 문제점을 해결할 수 있다. 그러나 전능성 줄기세포를 생산하기 위해서 전능성 유도 유전자들을 체세포에 전이할 때 retrovirus나 lentivirus를 사용하는데 이러한 바이러스 전이 방법이 맞춤형 환자 세포치료에는 적용이 어려워 안전하고 새로운 전이 기술 개발이 시급한 실정이다(Jaenisch와 Young, 2008; Lewitzky와 Yamanaka, 2007).

[0005] 이에 본 발명자들은 신규한 세포 리프로그래밍 유도용 조성물을 개발하기 위하여 노력한 결과, 어류 중에서도 가장 원시적이고, 포유동물과 계통학적으로 가까운 철갑상어 난자 추출물이 이미 분화된 세포의 리프로그래밍을 유도할 수 있으며, 이 세포를 체세포 복제의 공여세포로 사용하여 복제 수정란을 재구축한 결과 복제 동물의 생산성을 향상시킬 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 철갑상어 난자 추출물을 포함하는 세포 리프로그래밍 유도용 조성물을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0007] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 철갑상어 난자 추출물을 포함하는 세포 리프로그래밍 유도용 조성물을 제공한다.

### 발명의 효과

[0008] 본 발명에 따른 철갑상어 난자 추출물은 어류 중에서도 가장 원시적이고, 포유동물과 계통학적으로 가까운 철갑상어로부터 유래한 것으로, 이미 분화된 세포를 분화 이전의 상태로 되돌리는 리프로그래밍을 효과적으로 유도하며, 이 세포를 체세포 복제의 공여세포로 사용하여 복제 수정란을 재구축함으로써 복제 동물의 생산성을 향상시킬 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0009] 도 1 및 도 2는 철갑상어 난자 추출물의 처리 시간에 따른 돼지 태아섬유아세포에서 H3K9ac에 의한 형광 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다(Green: Alexaflour 488-labeled H3K9ac, red: PI stained nuclei.)

도 3은 철갑상어 난자 추출물 처리 후, 돼지 태아섬유아세포에서 H3K9ac에 의한 형광 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다(Green: Alexaflour 488-labeled H3K9ac, Red: PI stained nuclei.)

도 4는 철갑상어 난자 추출물 처리 후, 돼지 태아섬유아세포에서 H3K9me3에 의한 형광 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다(Green: Alexaflour 488-labeled H3K9me3, Red: PI stained nuclei.)

도 5는 철갑상어 난자 추출물 처리 후, 돼지 태아섬유아세포에서 H3K9ac 발현을 FACS 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 철갑상어 난자 추출물 처리 후, 돼지 태아섬유아세포에서 H3K9me3 발현을 FACS 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 철갑상어 난자 추출물 처리 후, 돼지 태아섬유아세포에서 H3K9ac 및 H3K9me3 발현을 웨스턴 블랏을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 철갑상어 난자 추출물 처리 후, 돼지 태아섬유아세포에서 전능성 유전자(Oct4, Nanog 및 Sox2)의 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 철갑상어 난자 추출물(SOE)-처리 세포를 이용하여 재구성된 SCNT 배아의 수정란 단계에서의 H3K9ac에 의한 형광 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다(Green: Alexaflour 488-labeled H3K9ac, Red: PI stained nuclei.)

도 10은 철갑상어 난자 추출물(SOE)-처리 세포를 이용하여 재구성된 SCNT 배아의 배반포기 단계에서의 세포 생존을 TUNEL 어췌이를 통해 관찰한 결과를 나타낸 도이다(Blue: Hoechst 33342, Green: TUNEL).

도 11은 SCNT 전에 핵 공여자로 이용되는, 철갑상어 난자 추출물(SOE)로 전처리한 PFFs에 의해 재구성된 SCNT 배아의 배반포기 단계에서 전능성 유전자(Oct4, Nanog 및 Sox2)의 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0010] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0011] 본 발명은 철갑상어 난자 추출물을 포함하는 분화된 세포의 리프로그래밍 유도용 조성물을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 철갑상어 난자 추출물을 포함하는 분화된 세포의 역분화 증진용 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명에서 "리프로그래밍(Reprogramming)" 또는 "역분화(de-differentiation)"란 분화능이 없는 세포 또는 일정부분 분화능이 있는 세포 등 서로 다른 양태로 존재하는 분화된 세포로부터 최종적으로 새로운 유형의 분화 잠재력을 갖는 상태로 복원 또는 전환될 수 있는 프로세스를 의미한다. 이러한 세포의 리프로그래밍 기작은 핵 내의 후생유전학(뉴클레오타이드 서열에서의 변화 없이 기능에서의 유전적 변화를 일으키는 것과 관련된 DNA 상태)적 마크가 삭제된 후, 상이한 세트의 후생유전학적 마크를 수립하는 것을 의미하는데, 다세포 생물이 분화 및 성장하는 동안, 상이한 세포 및 조직은 상이한 유전자 발현 프로그램을 획득한다. 본 발명에서의 목적에 따라, 상기 '리프로그래밍'이란 0% 내지 100% 미만의 분화능을 가지는 분화된 세포들을 미분화 상태로 되돌리는 과정이라면 모두 이에 포함될 수 있고, 바람직하게는 0%의 분화능을 가지는 분화된 세포 또는 0% 초과 내지 100% 미만의 분화능을 가지는 일정부분 분화된 세포를 100% 분화능을 가지는 세포로 복원 또는 전환시키는 것이다.
- [0014] 본 발명에서 분화된 세포는 인간, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 개, 고양이, 생쥐 및 토끼 등의 다양한 동물로부터 유래한 세포일 수 있으며, 전능성 줄기세포로 역분화시킬 수 있는 한 분화된 세포의 종류가 제한되는 것은 아니다.
- [0015] 상기 분화된 세포는 체세포 또는 체세포 줄기세포일 수 있다.
- [0016] 상기 체세포란 성체를 구성하는 세포로서 분화능 및 자가생산능이 제한된 세포를 의미한다.
- [0017] 상기 체세포 줄기세포는 혈액줄기세포(Hematopoietic stem cells), 유방성체 줄기세포(Mammary stem cells), 장줄기세포(Intestinal stem cells), 중간엽줄기세포(Mesenchymal stem cells), 내피줄기세포(Endothelial stem cells), 신경줄기세포(neural stem cells), 후각성체줄기세포(Olfactory adult stem cells), 또는 신경능 줄기세포(Neural crest stem cells)일 수 있고, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 본 발명의 조성물은 Oct-4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog, Lin28, E-cadherin, ERAS 및 STAT3으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 리프로그래밍 유도 인자를 더 포함할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 본 발명에 따른 철갑상어 난자 추출물은 어류 중에서도 가장 원시적이고, 포유동물과 계통학적으로 가까운 철갑상어로부터 유래한 것으로, 이미 분화된 세포를 분화 이전의 상태로 되돌리는 리프로그래밍을 효과적으로 유도하며, 이 세포를 체세포 복제의 공여세포로 사용하여 복제 수정란을 재구축함으로써 복제 동물의 생산성을 향상시킬 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명은 철갑상어 난자 추출물을 분화된 세포에 처리하는 단계;를 포함하는, 분화된 세포로부터 리프로그래밍된 전능성 줄기세포를 제조하는 방법을 제공한다.

[0021] 본 발명에서 "전능성 줄기세포", "유도만능줄기세포" 또는 "역분화 줄기세포"란 분화된 세포에 리프로그래밍 기술을 이용하여 배아줄기세포와 유사한 다분화능(pluripotency)을 가진 미분화 상태의 줄기세포를 확립하는 방식으로 만들어진 세포들을 의미한다. 전능성 줄기세포는 배아줄기세포와 거의 같은 특성을 가지고 있는데, 구체적으로는 비슷한 세포모양을 보여주고, 유전자 및 단백질 발현 패턴이 유사하며, 생체내외에서 다분화능을 가지며, 테라토마를 형성하고, 유전자의 생식선 전이(germline transmission)가 가능한 특성을 가지고 있다.

[0022] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예들은 본 발명을 더욱 쉽게 이해할 수 있도록 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

### [0023] 실시예 1. 철갑상어 난자 추출물의 준비

[0024] 성체 암컷 시베리아 철갑상어로부터 난모세포를 채집하여 30 분 동안 콜라게나제 용액( $\text{Ca}^{2+}$ -프리 링거액 내 8 mg/ml 유형 II 콜라게나제)으로 젤리 코트를 제거하였다. 이 후, 난모세포를 링거 완충액으로 3 회 세척하고, 피사된 난모세포를 제거하였다. 상태가 좋은 난모세포들만을 선별하여 튜브에 넣고, 아이스 콜드 추출 완충액(20 mM HEPES[pH 7.5], 100 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ )으로 3 회 린스한 후, 프로테아제 억제제들(2 mM  $\beta$ -머캅토에탄올, 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  류페틴, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  펩스타틴 A)을 첨가하였다. 난모세포들을 원심 분리기 튜브(벤크만, USA)로 옮겨서 초원심분리기(옵티마 XL-100K, 벤크만)를 사용하여 4℃에서 15 분 동안 10,000g로 원심분리하였으며, 상기 단계를 반복하였다. 중간층을 모아 다시 100,000g로 4℃에서 30 분 동안 원심분리하였으며, 상기 단계를 반복하였다. 상기 원심분리 과정을 통해 획득된 세포질, 즉 철갑상어 난자 추출물(이하, SOE로 표기함)에 5 % 글리세롤을 첨가하여, 사용 전까지 액체질소에 보관하였다.

### [0025] 실시예 2. 철갑상어 난자 추출물과의 적정 처리 시간 검증

[0026] 세포 리프로그래밍을 유도하기 위한, 철갑상어 난자 추출물의 적정 처리시간을 선택하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

#### [0027] 2-1. 돼지 태아섬유아세포의 준비

[0028] 30일령 돼지 태아로부터 돼지 태아섬유아세포(Porcine fetal fibroblasts, PFFs)를 분리하여, 1.25 % MEM-비필수 아미노산, 1.25 %  $\beta$ -머캅토에탄올, 1 % 페니실린/스트렙토마이신을 함유하고, 10 % FBS가 보충된 DMEM로 5%  $\text{CO}_2$ 의 습윤 대기, 39℃에서 4~5 계대까지 배양하였다. 초기 배양 세포는 사용 전까지 액체 질소에 보관하였다. 세포를 해동한 후, 80 % 컨플루언트가 될 때까지 배양 하였다. SCNT를 위하여, PFFs를 0.1 % FBS가 보충된 DMEM에 3-5일 배양하여 G0 단계로 동기화시켰다.

#### [0029] 2-2. 철갑상어 난자 추출물 및 돼지 태아섬유아세포의 공동배양

[0030] PFFs를 트립신 처리 후, 2 mM DTT, 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  류페틴, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  아프로티닌 및 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  펩스타틴 A(pH 7.25)가 보충된 PB 완충액(170 mM의 포타슘 글루코네이트, 5 mM KCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1mM EGTA, 20 mM HEPES)에 디기토닌 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 넣고 2 분 동안 4℃에서 배양하여 침투화를 유도하였다. 디기토닌 처리 후, PB 완충액 10 ml을 첨가하여 700×g로 4℃에서 10 분 동안 원심분리하였다. 디기토닌에 의한 침투화 세포를 SOE에 0, 1, 3, 5 또는 7 시간 동안 15℃ 내지 18℃에서 매시간 교반하면서 노출시켰다. 상기 세포를 제1항체 H3K9ac(histone H3 acetylation at lysines 9)를 이용한 면역염색을 통해 관찰하였다. 그 결과를 도 1 및 도 2에 나타내었다.

[0031] 도 1 및 도 2에 나타난 바와 같이, 철갑상어 난자 추출물의 처리 시간이 증가함에 따라 H3K9ac의 형광 농도가 증가됨을 확인하였다. 본 발명자는 SOE의 적정 시간을 7시간으로 선택하여, 이후 실험을 수행하였다.

[0032] **실시예 3. 철갑상어 난자 추출물에 의한 히스톤 아세틸화 및 DNA 메틸화 확인**

[0033] 철갑상어 난자 추출물이 분화가 진행 중인 돼지 태아섬유아세포 핵의 리프로그래밍을 유도하여, 체세포의 염색체(핵)가 능능성을 지닌 줄기세포의 염색체와 유사하게 바뀌는지를 확인하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0034] **3-1. 히스톤 아세틸화 및 DNA 메틸화 확인을 위한 면역염색**

[0035] SOE의 처리 7시간 후, PFFs를 원심분리(Centurion Scientific Ltd, UK)로 커버 슬립 상에 배치시키고, 4% 파라포름알데히드 용액에 15 분 동안 고정시킨 후, PBS-T(PBS에 0.1 % 트윈 20 및 7.7 mM 소듐 아지드 첨가)로 5 분 동안 3 회 세척하였다. 세포들을 실온에서 1 시간 동안 블로킹 용액(PBS-T에 5 % BSA 첨가)에서 블로킹하고, 다음과 같은 1차 항체로 4℃에서 하룻밤 동안 인큐베이션하였다: 히스톤 H3 Lys-9- 메틸화(H3K9me3, 1:250, Abcam, UK) 또는 히스톤 H3 Lys-9 아세틸화 (H3K9ac, 1:250, Milipore, USA). 이때 H3K9ac는 후생학적 염색질 마커로 알려져있으며, H3K9me3는 억제 염색질 마커로 알려져있다. 상기 1차 항체로 인큐베이션한 후, 5 분 동안 PBS-T로 3 회 세척하였다. 2차 항체인 Alexafluor 488 고트-항-래빗 IgG(1:150, Invitrogen, USA)로 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 세포의 핵을 PI(propidium iodide)(PBS에 0.5  $\mu\text{l}/\text{ml}$ )로 실온에서 10 분 동안 염색하고, VECTASHIELD((Vector Laboratories, Inc, USA)로 마운팅하였다. 이미지는 형광 현미경 (LEICA DM 2500, 스위스)로 획득하였다. 그 결과를 도 3 및 도 4에 나타내었다.

[0036] 도 3 및 도 4에 나타낸 바와 같이, 철갑상어 난자 추출물 처리 후, 돼지 태아섬유아세포에서 대조군에 비해 H3K9ac에 의한 형광 정도는 현저하게 증가하며, H3K9ac에 의한 형광 정도는 현저하게 감소함을 확인하였다.

[0037] **3-2. 히스톤 아세틸화 확인을 위한 유세포 분류법(FACS)**

[0038] 상기 실험 결과를 검증하기 위하여, FACS 분석을 수행하였다.

[0039] SOE의 처리 7시간 후, PFFs를 4℃에서 15 분 동안 4 % 파라포름알데히드 용액으로 고정하였다. 고정된 세포를 Mg<sup>2+</sup>와 Ca<sup>2+</sup> 없는 DPBS(0.1 %PVA)로 린스하고, 블로킹 용액(Mg<sup>2+</sup>와 Ca<sup>2+</sup> 없는 DPBS, 0.1 % PVA, 1 % BSA)으로 4℃에서 30 분 동안 블로킹하였다. 이 후, 항체인 H3K9ac(1:100, Milipore) 또는 H3K9me3(1:100, Abcam, UK)를 첨가하여 4℃에서 45 분 동안 인큐베이션한 후, 2차 항체인 Alexafluor 488 고트-항-래빗 IgG(1:500, Invitrogen)로 인큐베이션하였다. FACSCalibur (Becton Dickinson, USA)를 이용하여 분석을 실시하였다. 그 결과를 도 5 및 도 6에 나타내었다.

[0040] 도 5 및 도 6에 나타낸 바와 같이, 철갑상어 난자 추출물 처리 후, 돼지 태아섬유아세포에서 대조군에 비해 H3K9ac에 의한 형광 정도는 현저하게 증가하며, H3K9ac에 의한 형광 정도는 현저하게 감소함을 재확인하였다.

[0041] **3-3. 히스톤 아세틸화 확인을 위한 웨스턴 블랏**

[0042] 상기 실험 결과를 검증하기 위하여, 웨스턴 블랏을 수행하였다.

[0043] SOE의 처리 7시간 후, PFFs를 -20℃에서 20 분 동안 PRO-PREP<sup>TM</sup> 용액(iNtRON Biotechnology)에 용해시켰다. 세포로부터 추출된 단백질을 12 % SDS-PAGE 겔 상에서 분리한 후, Mimi-PROTEAN Tetra Cell(BIO-RAD, USA)을 이용하여 단백질을 PVDF 멤브레인에 트랜스퍼하였다. 상기 멤브레인을 실온에서 1 시간 동안 블로킹 용액(0.1% Tween-20, 5% non-fat dry milk를 함유한 TBS)으로 처리한 후, 다음과 같은 1차 항체로 4℃에서 하룻밤 동안 인큐베이션하였다: H3K9ac(1:500, Milipore), H3K9me3 (1:1,000, Abcam) 또는 히스톤 3 (H3, 1:5,000, Abcam). 상기 멤브레인을 PBS-T(0.1 % 트윈-20을 함유하는 PBS)로 5 분 동안 3 회 린스하고, 2차 항체인 퍼옥시다제 콘쥬게이트드 고트 항 래빗(1:5,000, KPL, USA)로 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. WEST-one(InTRON Biotechnology)를 이용하여 화학발광을 검출하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0044] 도 7에 나타낸 바와 같이, 철갑상어 난자 추출물 처리 후, 돼지 태아섬유아세포에서 대조군에 비해 H3K9ac의 발현이 증가하며, H3K9ac의 발현이 감소함을 확인하였다.

[0045] 상기 결과를 통하여, 철갑상어 난자 추출물은 돼지 체세포의 핵 리모델링을 유도하는 효과가 있음을 확인하였다.

#### [0046] 실시예 4. 철갑상어 난자 추출물에 의한 전능성 유전자의 활성 분석

[0047] 철갑상어 난자 추출물에 의해 세포의 리프로그래밍이 유도되어 전능성 유전자가 재활성화되는지를 확인하기 위하여, RT-PCR을 통해 전능성 유전자(Oct4, Nanog 및 Sox2)의 발현을 확인하였다.

[0048] 먼저, RNeasy 플러스 미니 키트(QuiaGen, USA)를 사용하여 세포의 총 RNA를 추출하였다. 이후, Maxime RT Premix(iNtRON Biotechnology, Korea)를 이용하여 4℃에서 60분 동안 DNA 합성 및 95℃에서 5 분 동안 RTase 불활성화를 실시하였다. 18  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ l 프라이머(10  $\mu$ M) 및 시료 2  $\mu$ l가 첨가된 Maxime PCR Premix (iNtRON Biotechnology)를 이용하여 PCR을 실시하였다. RT-PCR의 조건은 다음과 같다: 95℃에서 10 분 동안 전변성, 94℃에서 10 분 동안 변성, 53.5℃, 57.1℃ 및 60℃에서 30초 동안 어닐링, 72℃에서 45초 동안 신장, 72℃에서 10 분 동안 최종 신장 단계를 34 회 반복하였다(Pro s6325, Eppendorf). 수득된 RT-PCR 산물을 2 % 아가로즈 겔에 로딩하였다. 실험에 이용된 프라이머의 서열을 표 1에 나타내었으며, 그 결과를 도 8에 나타내었다.

표 1

| Gene  | Sequence of primer (5'-3') | bp  | Tm (°C) cell | Tm (°C) embryo | References |
|-------|----------------------------|-----|--------------|----------------|------------|
| SOX2  | F-GCCTGGGCGCCGAGAGGA       | 443 | 64           | 64             | NM003106   |
|       | R-GGCGAGCCGTTTCATGTAGGTCTG |     |              |                |            |
| NANOG | F-ATCCAGCTTGTCCTCCAAAG     | 438 | 60           | 57.6           | DQ447201   |
|       | R-ATTTCATTGCTGGTTCCTGG     |     |              |                |            |
| OCT4  | F-AGGTGTTTCAGCCAAACGACC    | 335 | 60           | 53.3           | NM00111306 |
|       | R-TGATCGTTTGCCCTTCTGGC     |     |              |                |            |
| GAPDH | F-GGGCATGAACCATGAGAAGT     | 230 | 60           | 57.6           | AF017079   |
|       | R-AAGCAGGGATGATGTTCTGG     |     |              |                |            |

[0049]

[0050] 도 8에 나타낸 바와 같이, 철갑상어 난자 추출물 처리에 의해 돼지 태아섬유아세포에서 전능성 마커 유전자(pluripotent marker genes)인 Oct4, Nanog 및 Sox2의 발현이 증가함을 확인하였다.

[0051] 상기 결과를 통하여, 철갑상어 난자 추출물은 돼지 체세포의 핵 리모델링을 유도하여, 전능성 유전자의 재활성을 유도하는 효과가 있음을 확인하였다.

#### [0052] 실시예 5. 철갑상어 난자 추출물이 수정란 단계에서의 SCNT 배아의 히스톤 아세틸화에 미치는 영향 분석

[0053] 철갑상어 난자 추출물이 수정란 단계에서의 SCNT 배아의 히스톤 아세틸화에 미치는 영향을 확인하기 위하여, SCNT 전에 핵 공여자로 이용되는, SOE로 전처리한 PFFs에 의해 재구성된 SCNT 배아의 염색질의 변화를 확인하였으며, 이를 위해 돼지 SCNT 배아에서의 H3K9ac 염색 정도를 측정하였다. 보다 구체적인 실험 과정을 하기에 기술하였다.

#### [0054] 5-1. 돼지 난모세포(oocyte) 채취 및 배양

[0055] 돼지 난소를 지역 도살장에서 채취하여 39℃의 PBS에 담아서 실험실로 수송하였다. COCs(Cumulus-oocyte complexes)를 18 게이지 바늘을 사용하여 직경 2-5mm의 강소형성 난포(antral follicles)로부터 흡입하였다. 최소 3 개의 층들에 싸인 상태가 좋은 난모세포들만을 선택하여 TL-HEPES 완충액에 넣었다. 난모세포를 10 % PVA, 3.05 mM D-글루코오스, 0.91 mM Na-피루베이트, 0.57 mM 시스테인, 75  $\mu$ g/ml의 페니실린, 50  $\mu$ g/ml 스트렙토마이신, 10 ng/ml EGF, 1  $\mu$ g/ml FSH, 5  $\mu$ g/ml LH가 보충된 바이카보네이트-완충 TCM(199)(Gibco)로 3 회 세척하였다. 처음에 돼지 COCs를 4 mg/ml BSA가 보충된 13 mM BCB(Brilliant Cresyl Blue) 배지로 2 회 세척한 후, 5% CO<sub>2</sub>의 습윤 대기, 39℃에서 90 분 동안 인큐베이션하였다. BCB에 노출시킨 후, 난모세포의 성숙을 위해 실체 현미경 하에서 파란 색으로 염색된 COCs를 선별하였다. 감수 성숙(meiotic maturation)을 동기화하기

위해, COCs를 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CHXM가 보충된 성숙 배지에서 16 시간 동안 전-인큐베이션하였다. CHXM 처리 후, COCs를 완전히 성숙 배지로 세척하고, 추가적으로 CHXM 없이 배양하였다. 난모세포를 함유하는 모든 점적 배양(drop culture)은 배지로 전-평형화된 미네랄 오일의 얇은 층으로 덮었고, 5% CO<sub>2</sub>의 습윤 대기, 39°C에서 인큐베이션하였다.

## 5-2. 체세포 핵 이식 (Somatic cell nuclear transfer, SCNT)

상기와 같이, 돼지 COCs를 16 시간 동안 CHXM 처리 배양 후, 추가적으로 17-18 시간 동안 인 비트로 성숙시켰다. 난모세포를 0.1 % 히알루로니다아제가 포함된 TL-HEPES 완충액에 노출시키고 4-5 분 동안 불텍싱하여 난구세포(Cumulus cells)를 제거하였다. 난구세포가 제거된 난모세포를 25 mM HEPES 및 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Hoechst 33342를 함유한 TCM-199로 10 분간 염색한 후, 25 mM HEPES 및 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CB (cytochalsin B)를 함유한 TCM-199로 제 1 감수 분열 후/말기(first meiotic anaphase/telophase I, AI/TI)의 방추사를 제거하였다. 난모세포의 탈핵을 확인하기 위하여, 피펫에 흡입된 탈핵된 세포질(karyoplast)을 형광 라이트하에서 가시화하였다. 탈핵된 난모세포를 10 ng/ml EGF, 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  FSH 및 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LH, 5 mM의 카페인이 보충된 TCM-199에 12 시간 동안 배양하였다. 공여 세포를 핵이 제거된 난모세포에 이식한 후, 0.1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 3 mg/ml BSA를 함유한 0.3 M 만니톨에서 multiporator(Eppendorf, Germany)를 이용하여, 재융합된 난모세포를 1.25 KV/cm의 전기 펄스에 30  $\mu\text{s}$  동안 노출시켰다. 융합된 난모세포를 PZM5 배지로 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 5% O<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였다. 2 일째에, 난할 배아(cleaved embryos)를 신선한 PZM5 배지로 옮기고 배반포 단계까지 배양하였다.

## 5-3. H3K9ac 발현 분석

H3K9ac에 대한 항체를 이용하여, IVF(In vitro fertilized), SCNT 및 SOE-처리 세포를 이용하여 재구성된 SCNT 수정란을 조사 하였다. 그 결과를 9에 나타내었다.

도 9에 나타난 바와 같이, 철갑상어 난자 추출물(SOE)-처리 세포를 이용하여 재구성된 수정란 단계 SCNT 배아에서의 히스톤 아세틸화 정도는 IVF 배아와 유사하였으며, H3K9ac 염색 정도는 SCNT 배아에 비해 크게 증가함을 확인하였다.

## 실시예 6. SCNT 전에 핵 공여자로 이용되는, 철갑상어 난자 추출물(SOE)로 전처리한 PFFs에 의해 재구성된 SCNT 배아의 발생능 분석

SOE-처리 세포를 이용하여 재구성된 돼지 SCNT 배아의 체외 발생능을 조사하였다. 그 결과를 표 2에 나타내었다.

표 2

| Group       | No. Oocytes | No. Fused (%) | No. Cleaved (%) | No. Blastocysts (%)    |
|-------------|-------------|---------------|-----------------|------------------------|
| Control     | 245         | 239 (97.6)    | 191 (79.9)      | 33 (13.8) <sup>a</sup> |
| SOE-treated | 313         | 290 (92.7)    | 248 (85.5)      | 61 (21.0) <sup>b</sup> |

<sup>a,b</sup> Values in same columns with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

상기 표 2에 나타난 바와 같이, 대조군과 SOE-처리군간에 융합이 이루어진 배아의 수에는 큰 차이가 없었으나, SOE-처리군에서 배반포 단계로 발생된 배아의 수가 현저하게 증가함을 확인하였다(13.8 % vs 21.0 %) ( $P < 0.05$ ).

## 실시예 7. SCNT 전에 핵 공여자로 이용되는, 철갑상어 난자 추출물(SOE)로 전처리한 PFFs에 의해 재구성된 SCNT 배아의 배반포기 단계(blastocyst stage)에서의 세포 생존 분석

[0066] SOE-처리 세포를 이용하여 재구성된 돼지 SCNT 배아의 배반포기 단계(blastocyst stage)에서의 세포 생존능을 분석하기 위하여, In Situ Cell Death Detection Kit(Hoffmann-La Roche Ltd, Switzerland)를 이용하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0067] 7 일째에, 돼지 SCNT 배아를 4 % 파라포름알데히드 용액으로 1 시간 동안 4℃에서 고정시킨 후, PBS 용액으로 3 회 세척하였다. 시료들을 침투화 버퍼(PBS에 0.1 % 트리톤 X-100, 0.1 %의 소듐 시트레이트 첨가)로 얼음 상에서 2 분 동안 처리 하였다. 상기 배아들을 PBS에 3 회 세척한 후, TUNEL 반응 혼합물에 37℃, 60 분 동안 암실에서 인큐베이션하였다. TUNEL 염색 후, 배아들을 3 회 세척하고, Hoechst 33342(50 pg/ml)로 39℃, 10 분 동안 염색하였다. 배아들을 VECTASHIELD(Vector Laboratories, Inc)로 마운팅하였다. 이미지는 형광 현미경(LEICA DM 2500, 스위스)로 획득하였다. 그 결과를 도 10 및 표 3에 나타내었다.

표 3

| Group       | No. Cells of blastocysts | No. Apoptotic cells of blastocysts | Rate of apoptosis (%) |
|-------------|--------------------------|------------------------------------|-----------------------|
| Control     | 15.5±4.3 <sup>a</sup>    | 8.0±2.8                            | 51.6 <sup>a</sup>     |
| SOE-treated | 23.5±2.5 <sup>b</sup>    | 5.5±3.1                            | 24.4 <sup>b</sup>     |

<sup>a,b</sup> Values in same columns with different superscripts are significantly different ( $p<0.05$ ).

[0068]

[0069] 도 10 및 표 3에 나타난 바와 같이, 철갑상어 난자 추출물 처리된 세포를 이용하여 재구성된 SCNT 배아는 대조군에 비해 배반포기로 진행된 배아의 수가 현저하게 증가하였으며, 배반포기 단계에서의 세포 사멸 정도는 현저하게 감소함을 확인하였다.

[0070] 실시예 8. SCNT 전에 핵 공여자로 이용되는, 철갑상어 난자 추출물(SOE)로 전처리한 PFFs에 의해 재구성된 SCNT 배아의 배반포기 단계에서 전능성 유전자의 활성 분석

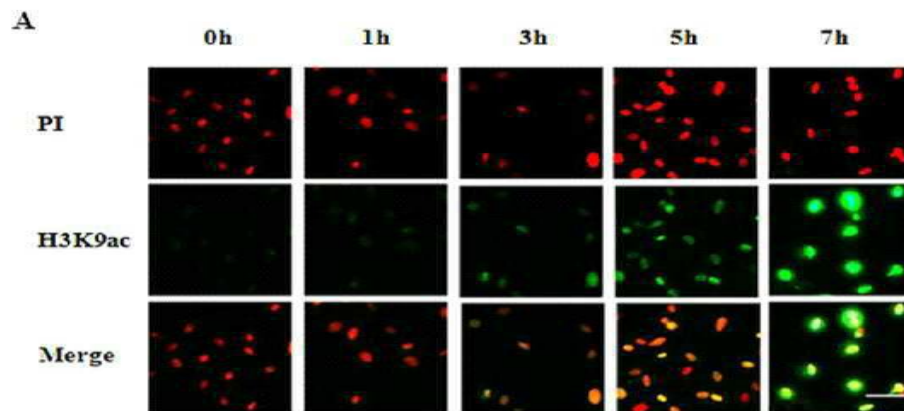
[0071] SOE-처리 세포를 이용하여 재구성된 돼지 SCNT 배아의 배반포기 단계(blastocyst stage)에서의 전능성 유전자의 발현을 RT-PCR을 통해 확인하였다. 그 결과를 도 11에 나타내었다.

[0072] 도 11에 나타난 바와 같이, 철갑상어 철갑상어 난자 추출물(SOE)-처리 세포를 이용하여 재구성된 배아에서 전능성 유전자의 발현이 IVF 배아와 유사하게 나타남을 확인하였다.

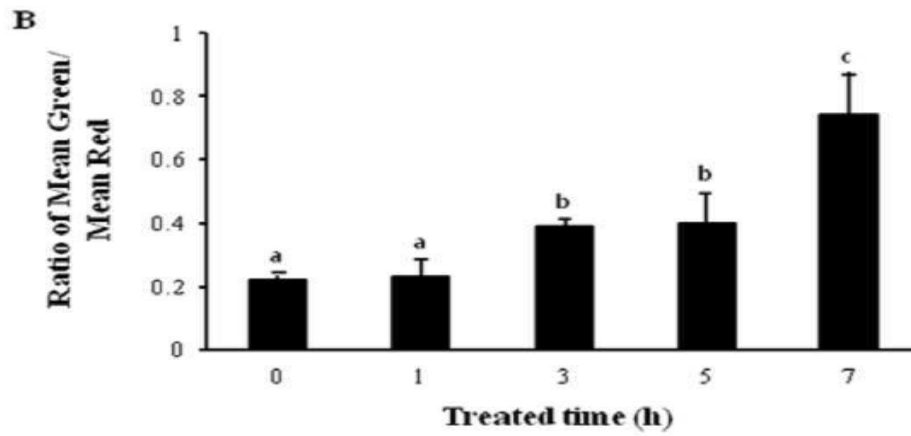
[0073] 이상의 실험 결과를 통하여, 본 발명에 따른 철갑상어 난자 추출물은 어류 중에서도 가장 원시적이고, 포유동물과 계통학적으로 가까운 철갑상어로부터 유래한 것으로, 이미 분화된 세포를 분화 이전의 상태로 되돌리는 리프로그래밍을 효과적으로 유도하며, 이 세포를 체세포 복제의 공여세포로 사용하여 복제 수정란을 재구축함으로써 복제 동물의 생산성을 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

도면

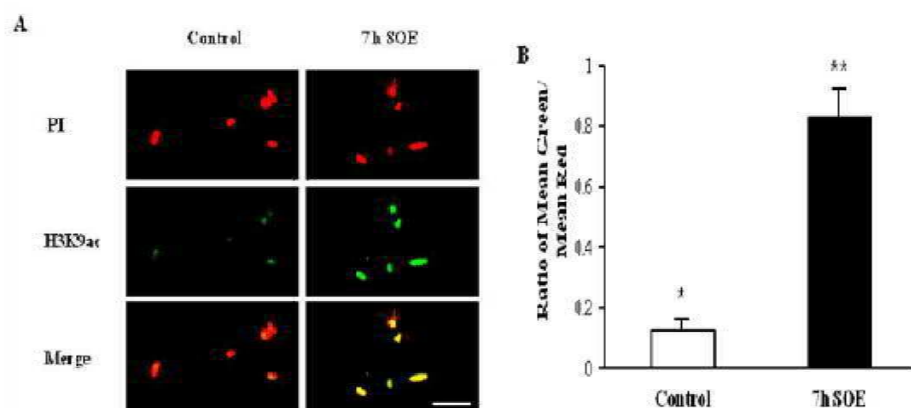
도면1



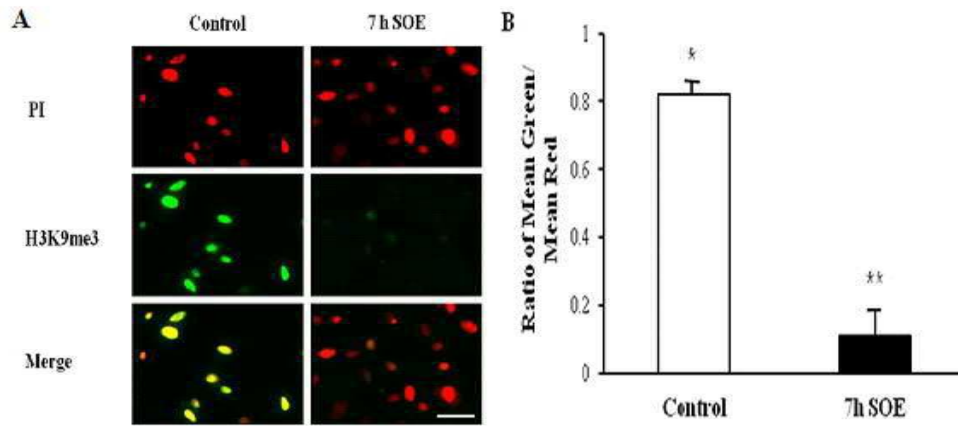
도면2



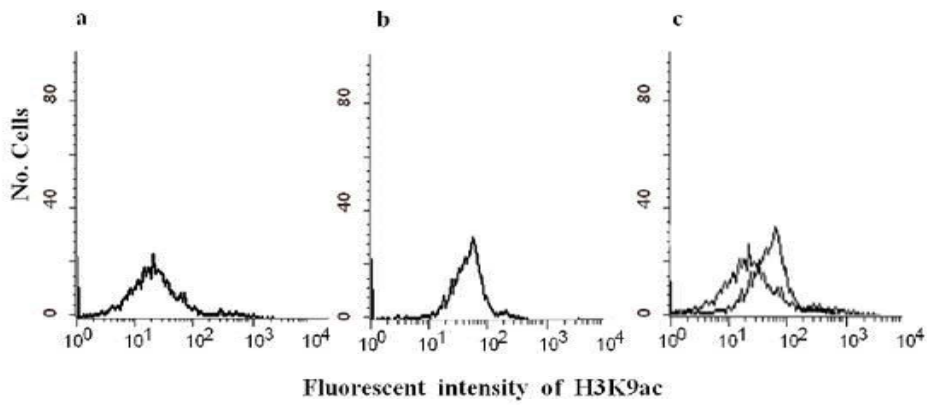
도면3



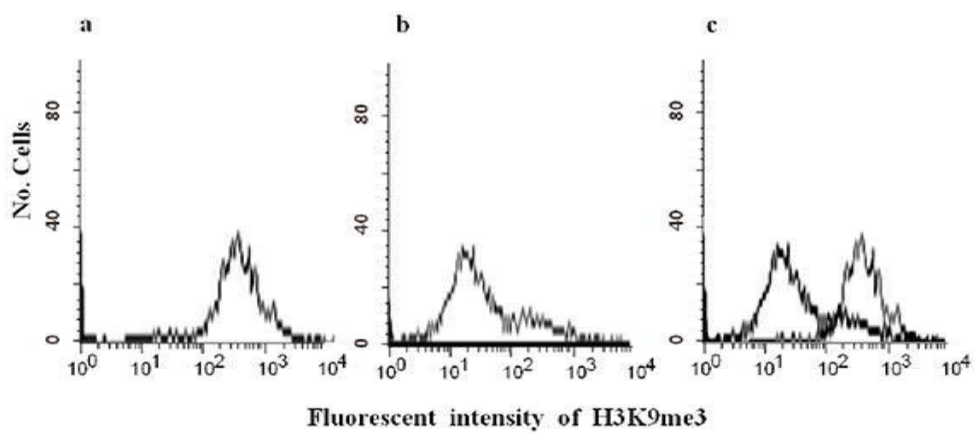
도면4



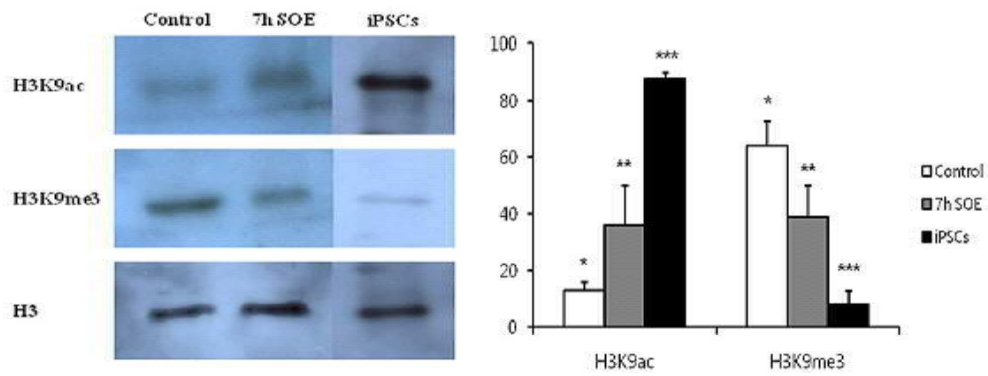
도면5



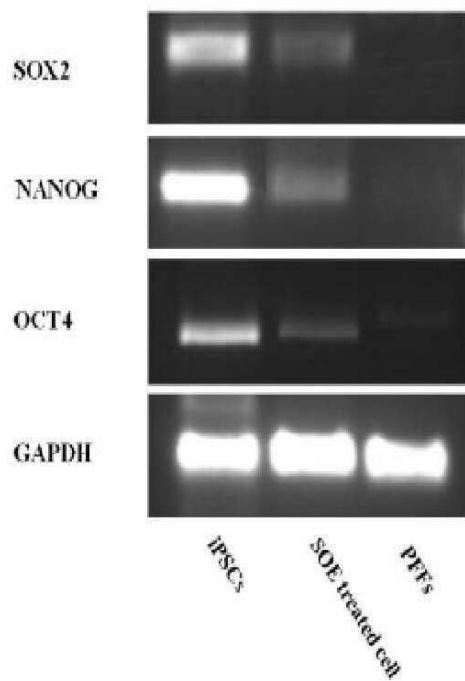
도면6



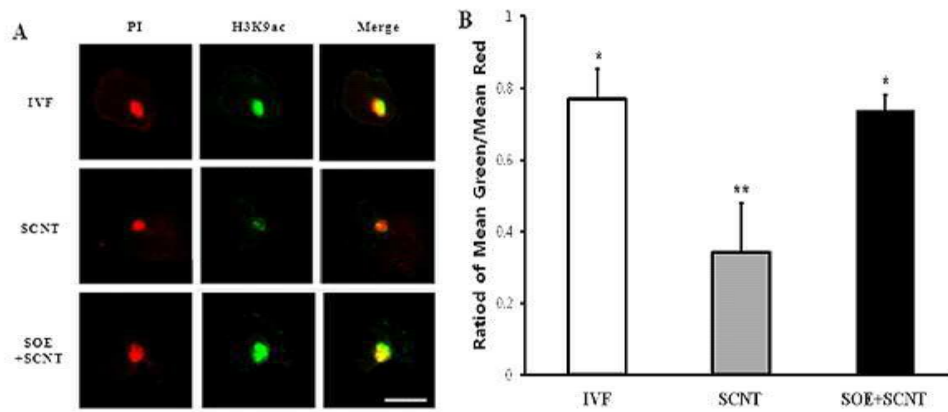
도면7



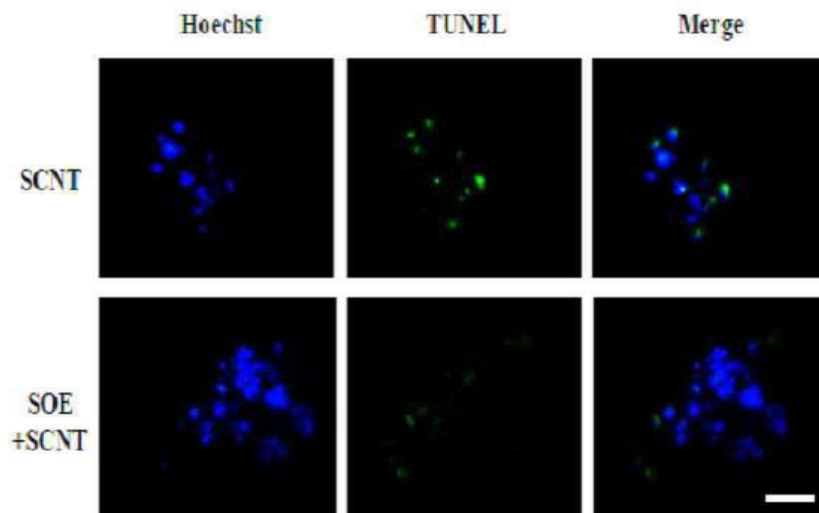
도면8



도면9



도면10



도면11

