

‘유전자 가위(편집) 갖춘 돼지 폐 면역세포주’ 개발

- 돼지생식기호흡기증후군 감염 관여하는 유전자 연구에 활용
- 자를 위치 안내하는 물질(gRNA)만 넣어도 목표 유전자 편집 확인

농촌진흥청(청장 이승돈)은 돼지생식기호흡기증후군 감염에 관여하는 유전자 역할을 밝히는 데 활용할 돼지 폐 면역세포주를 개발했다고 밝혔다.

돼지생식기호흡기증후군은 어미돼지의 유산·사산과 새끼돼지의 호흡기 질환 및 폐사를 일으켜 양돈농가에 큰 피해를 주는 질병이다.

돼지생식기호흡기증후군 원인 바이러스는 돼지 폐의 면역세포를 감염시킨다. 이 과정에 어떤 유전자가 관여하는지 알아보려면, 특정 유전자가 작동하지 않도록 제어한 세포와 원래 세포에서 바이러스 감염 정도를 비교해야 한다.

만약 어떤 유전자가 작동하지 않을 때 감염이 줄어든다면, 그 유전자가 감염에 결정적인 영향을 끼친다는 것을 알 수 있는 근거가 된다.

이러한 연구를 하려면 목표 유전자가 작동할 수 없도록 편집할 수 있어야 한다. 기존에는 유전자를 편집할 때 유전자를 자르는 단백질 ‘카스나인(Cas9)’과 자를 위치를 안내하는 물질(gRNA)을 세포 안에 함께 넣어야 했다. 이번에 개발한 세포주는 카스나인을 스스로 만들어 위치를 안내하는 물질만 넣으면 유전자를 편집할 수 있도록 했다.

연구진은 이렇게 개발한 세포주가 실제로 유전자 편집에 활용될 수 있는지

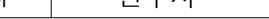
확인했다. 위치를 안내하는 물질을 넣은 결과, 목표 유전자 일부가 잘려 나간 것을 알 수 있었다. 또한, 기존 세포의 주요 특성도 유지되는 것으로 나타나 감염 관련 유전자 역할을 살펴보는 연구에 활용할 가능성을 확인했다.

연구진은 앞으로 세포주의 유전자를 하나씩 편집한 뒤 바이러스 감염에 어떤 변화가 나타나는지 살펴볼 계획이다. 이를 통해 감염에 관여하는 유전자 역할을 확인하고, 질병 저항성과 관련된 유전자 발굴 연구에 활용할 계획이다.

이번 연구 결과는 국내 학술지 「한국산학기술학회논문지」 제27권 제1호에 게재됐다.

농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오유전체과 이경태 과장은 “이번 연구는 유전자 역할을 확인하는 실험 과정을 줄일 수 있는 세포주를 마련했다는 데 의미가 있다.”라며, “앞으로 돼지생식기호흡기증후군 감염과 관련된 유전자 연구에 활용하겠다.”라고 밝혔다.

붙임. 카스나인(Cas9) 발현 불멸화 돼지폐포대식세포주 개발

담당 부서	국립축산과학원 동물바이오유전체과	책임자	과 장	이경태 (063-238-7250)
		담당자	연구사	김석호 (063-238-7271)
<div><div>농촌진흥청에서 연구·개발한</div><div>농업의 모든 것</div><div>농사로</div></div> 				

□ 연구 개요

- 돼지생식기호흡기증후군(PRRS) 저항성 연구에 활용할 수 있도록, 불멸화 돼지 폐포대식세포(iPAM)에 캐스나인(Cas9) 유전자를 도입한 세포주를 구축하고 그 유용성을 검증

□ 주요 연구 결과

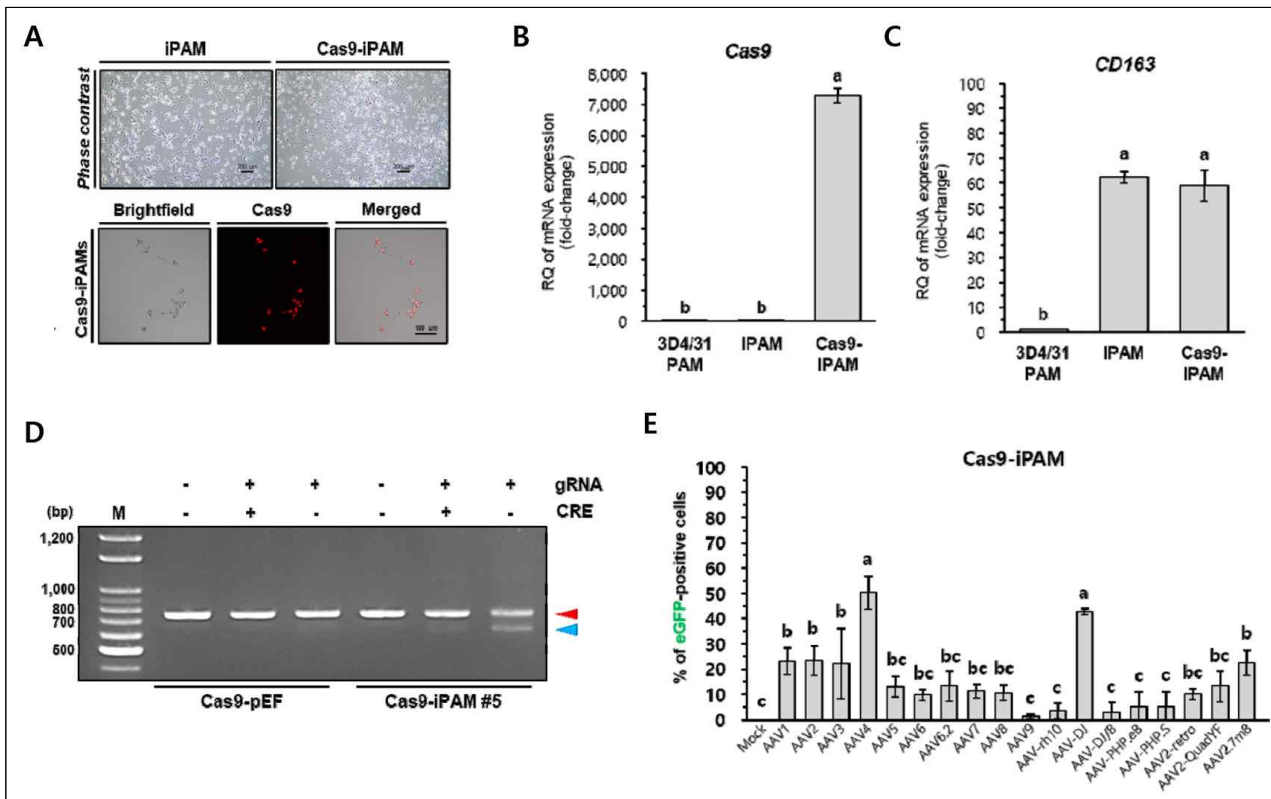


그림. Cas9 발현 돼지 폐포대식세포주 개발 및 검증 (A) 세포 형태 비교(위, 눈금 200 μ m)와 Cas9 단백질의 적색형광 관찰(아래, 눈금 100 μ m) (B) 세포주별 Cas9 유전자 발현량 (C) 세포주별 CD163 유전자 발현량 (D) 가이드 리보핵산(RNA) 단독 도입 시 CD163 유전자 편집 확인 (붉은 화살표: 원래 크기의 산물, 파란 화살표: 잘려 나간 산물) (E) AAV 18종 처리 후 운반유전자(eGFP)가 발현된 세포 비율 *서로 다른 알파벳은 통계적으로 유의한 차이가 있음을 나타냄(p<0.05)

- 삽입하고, 단일세포 유래 클론을 선발(그림A)

* 모세포인 iPAM과 세포 형태에 차이가 없으며, 적색형광으로 Cas9 단백질이 세포 안에 있음을 확인

- (Cas9 발현) Cas9 유전자 발현이 대조 세포주(3D4/31 PAM, iPAM)에서는 검출되지 않은 반면, 구축한 세포주에서는 약 7,300배 수준으로 특이적으로 발현(그림 B)
- (세포 특성 유지) PRRSV 수용체인 CD163 유전자 발현이 모세포인 iPAM과 통계적으로 유의한 차이 없이 유지돼, Cas9 도입이 세포 고유 특성을 훼손하지 않음을 확인(그림 C)
- (유전자 편집 기능) CD163 표적 가이드 리보핵산(gRNA) 단독 도입만으로 해당 유전자의 결실(deletion) 유도 확(그림 D)
 - * 별도의 Cas9 단백질 도입 없이 편집이 가능해, 후보 유전자를 순차적으로 검증하는 데 활용
- (유전자 전달체 비교) 아데노관련바이러스(AAV) 18종을 동일 조건으로 처리한 뒤 운반유전자(eGFP) 발현으로 전달 효율 평가(그림 E)
 - * 운반유전자 발현 세포 비율 기준 AAV4 약 50%, AAV-DJ 약 43%로 상대적으로 높음

□ 기대 효과 및 활용

- 동물 실험 이전 단계에서 PRRS 저항성 후보 유전자의 기능을 신속하게 검증하는 세포 수준 연구 플랫폼으로 활용
- 본 세포주를 이용한 유전자 기능 연구에서 전달체 선택의 기초 자료로 활용