



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

멸종조류 복원을 위한  
평 (*Phasianus colchicus*) 정원줄기세포주  
확립 연구

濟州大學校 大學院

生命工學科

金正賢

2013年 12月

멸종조류 복원을 위한  
꿩 (*Phasianus colchicus*) 정원줄기세포주  
확립 연구

指導教授 鄭棟基

金正賢

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2013년 12월

金正賢의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長\_\_\_\_\_ (인)

委 員\_\_\_\_\_ (인)

委 員\_\_\_\_\_ (인)

濟州大學校 大學院

2013年 12月

Establishment of spermatogonial stem cell line  
in pheasant (*Phasianus colchicus*) for restoration  
of endangered birds

Jeong Hyun Kim

(Supervised by professor Dong Kee Jeong)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL  
FULLFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE  
DEGREE OF MASTER OF NATURAL SCIENCES

2013. 12.

THIS THESIS HAS BEEN EXAMINED AND APPROVED

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

# 목 차

I. 서 론.....	1
II. 연구사.....	3
1. 꿩 ( <i>Phasianus colchicus</i> )의 분류학 및 특징.....	3
2. 조류의 생식세포를 이용한 이종간 키메라 생산.....	4
1) 메추리와 닭의 이종간 생식선 키메라.....	4
2) 오리 và 닭의 이종간 생식선 키메라.....	5
3) 칠면조와 닭의 이종간 생식선 키메라.....	5
4) 꿩과 닭의 이종간 생식선 키메라.....	5
3. 정원줄기세포의 이식 기법.....	7
1) 포유동물에서 정원줄기세포의 이식.....	7
2) 조류에서 정원줄기세포의 이식.....	9
4. 멸종 위기 조류와 동물의 복원.....	10
III. 재료 및 방법.....	12
1. 실험동물.....	12
2. 정원줄기세포의 회수.....	12
3. 정원줄기세포의 공배양.....	14
4. 정원줄기세포의 형광면역항체법.....	14
5. Busulfan 가운법.....	15
6. 정원줄기세포의 3D 배양절편 이식.....	15
7. 정원줄기세포의 PKH-26 labeling과 분리.....	16
8. Periodic Acid-Schiff's (PAS) 분석.....	16

9. 핑 정원줄기세포로부터 c-kit+ 세포의 분리.....	17
10. 핑 정원줄기세포 닭 배자내 주입.....	17
11. 통계분석.....	18
<b>IV. 결 과</b> .....	<b>19</b>
1. 정원줄기세포의 배양 안정화.....	19
2. 공배양을 통한 정원줄기세포 증식 효과.....	22
3. 정원줄기세포의 증식배양액에서 핑 특이적 증식 효과.....	23
4. 계대배양을 통한 정원줄기세포주 확립.....	27
5. 정원줄기세포의 발현 특이 마커를 이용한 형광면역항체 분석.....	29
6. 3D 방법을 이용한 정원줄기세포 및 성세포의 분화 유도.....	31
7. Busulfan 가온법을 이용한 수용체 닭 불임 유도.....	32
8. 3D 체내 이식 후 세포 발달.....	37
9. 정원줄기세포의 대량 배양을 위한 분리 마커의 검증.....	42
10. 배자내 주입을 통한 키메라 생산.....	44
11. 유세포 분석을 통한 핑 정원줄기세포의 분화능 검증.....	48
<b>V. 고 찰</b> .....	<b>50</b>
<b>VI. 요 약</b> .....	<b>54</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>57</b>
<b>참고문헌</b> .....	<b>60</b>

## LIST OF FIGURES

<b>Figure 1.</b> Schematic diagram of the production of pheasants ( <i>Phasianus chochicus</i> ) by interspecies germ cell transfer into chicken embryos.....	6
<b>Figure 2.</b> A Jeju cock pheasant supplied from cooperative farm for experiment.....	13
<b>Figure 3.</b> Comparative size of testis of Jeju pheasant between non-breeding and breeding season.....	20
<b>Figure 4.</b> Colony forming cells in the isolated pheasant testicular cells at day 7, day 12 and day 20 after incubation.....	24
<b>Figure 5.</b> Establishment of growth conditions for pheasant spermatogonial stem cells with co-culture system.....	25
<b>Figure 6.</b> Effect of growth factors on pheasant spermatogonial stem cells.....	26
<b>Figure 7.</b> Colony formation of pheasant spermatogonial stem cells.....	28
<b>Figure 8.</b> Immunofluorescence antibody assay for the characterization of pheasant spermatogonial stem cells.....	29
<b>Figure 9.</b> Methodological approach for 3D culture.....	33
<b>Figure 10.</b> Infertility efficiency with morphological changes in testis by surgical method and heat activated busulfan injection after busulfan treatment.....	34
<b>Figure 11.</b> Effect of busulfan on chicken infertility efficiency with the increase of sexual age.....	35
<b>Figure 12.</b> Recovery percentage of sex cells after busulfan treatment through culture.....	36

<b>Figure 13.</b> Collection of cell culture of the testes after testis transplantation.....	38
<b>Figure 14.</b> Colony formation of isolated pheasant testicular cells in 3D culture.....	39
<b>Figure 15.</b> The distribution of pheasant sex cells in the gonads of chick embryo.....	40
<b>Figure 16.</b> The distribution of sex cells derived from donor in the recipient testis after injection of pheasant spermatogonial stem cells.....	41
<b>Figure 17.</b> Ratio and growth features of c-kit <sup>+</sup> cells in pheasant spermatogonial stem cells.....	43
<b>Figure 18.</b> The proportion of stem cells distributed in the donor PKH-26 cells.....	47
<b>Figure 19.</b> The verification of differentiation potency after culture of pheasant spermatogonial stem cells.....	49

## LIST OF TABLES

<b>Table 1.</b> The properties of the testicular cells using cell analyzer after degradation of enzyme with single cell.....	21
<b>Table 2.</b> The incidence of the chick embryos according to pheasant sex cells.....	45
<b>Table 3.</b> Relative share of donor sex cells in the chick embryos according to injection of pheasant sex cells.....	46

## I. 서 론

생식세포란 한 세대의 유전적 정보를 다음 세대로 전달하는 중요한 매개체로서 감수 분열과 체세포 분열을 통하여 최종적으로 웅성에서는 정자를 자성에서는 난자를 생성한다. 생식적 분화 전 생식줄기세포 즉 발생 초기의 성세포인 웅성의 정세포와 자성의 난세포를 일컬어서 원시생식세포 (primordial germ cells; 이하 PGCs)라고 하며 (McLaren, 2003) 성성숙 이후에 기능을 갖는 생식세포의 근원이 되는 세포로서, 다능성을 갖고 있는 것으로 알려져 있다. 그리고 웅성생식세포는 생식모세포 (gonocyte)와 미분화된 정원세포로 분화되어 신생아와 성성숙 이전 정소의 세정관에 초기생식세포로 위치하고 있다가 출생 후 세정관의 기저막으로 이동하고 정원줄기세포로 분화된다 (Brinster, 2002).

정자형성과정 (spermatogenesis)은 웅성의 정소에서 정자를 생산해내는 일련의 복합적인 과정으로 생식세포의 연속적인 세포 분열 및 분화를 통하여 이루어진다 (Russell 등, 1990). 웅성생식세포인 정원줄기세포 (spermatogonial stem cells; 이하 SSCs)는 정소 내에서 지속적으로 이루어지는 정자형성과정에 중요한 기능을 하는 생식선 줄기세포 (germ-line stem cell)로서 다음 세대에 웅성의 유전정보를 전달할 수 있는 줄기세포이다 (Meistrich와 van Beek, 1993). 정원줄기세포는 여러 성체 줄기세포들이 지닌 특성과 같이 자기 재생 (self-renewal) 능력과 분화 (differentiation) 능력을 동시에 가지고 있어 (Meistrich와 van Beek, 1993) 출생 후 일생동안 웅성의 생식 능력을 유지할 수 있다. 일반적으로 정원줄기세포는 niche라 불리는 특별한 미세환경에서 존재하고 주변 인자들과의 상호 작용에 의하여 자기 재생 또는 분화가 조절되어 정원세포, 정모세포, 정세포 그리고 최종적으로 정자를 생성하는 정자형성과정을 일으킨다 (Schofield R, 1978). 정원줄기세포는 정소 내에 아주 극소수만 존재하기 때문에 분리와 임상적 이용이 어려웠고, 체외에서 증식, 배양하는 기술의 확립이 순조롭지 않았으나 지속적인 노력의 결과 현재 실험동물을 이용한 정원줄기세포에서는 체외배양을 통한 증식, 분화 그리고 유전자 도입이나 유전자 적중과 같은 다양한 연구가 이루어지고 있다 (류, 2010).

조류는 기초 생명공학 연구에서 다양한 실험의 목적을 수행하기 위한 우수한 모델동물로서 (Park 등, 2010) 조류에 대한 연구는 생명공학 분야에서의 무한한 가능성을 보여주고 있으며, 최근에 매우 활발하게 연구가 진행되고 있다. 조류의 정원줄기세포는 수용체 배자로의 주입을 통해서 생식선 키메라의 생산을 가능하게 하기 때문에 유전자 도입에 매우 효율적인 도구이다 (Tajima 등, 1993). 또한 조류는 포유류나 다른 동물들과는 달리 상대적으로 세대기간이 짧고 생산성이 높아서 보다 더 빠르게 증식하여 형질전환 계통을 확보할 수 있다 (Sang, 1994). 특히, 닭과 꿩은 생리적, 발생학적으로 유사하여 (Johnsgard, 1986) 닭에서 개발된 생명공학 기법을 꿩에 적용한다면 형질전환 꿩 및 이종간 생식선 키메라 생산 기법을 적용할 수 있다. 조류를 대상으로 한 정원줄기세포에 관한 연구는 국제적으로도 태동 단계에 있는 분야이지만 정원줄기세포는 멸종동물의 복원을 위한 새로운 대안으로서 주목 받고 있으며 멸종 조류 복원을 위해 정원줄기세포 이식을 이용한 꿩과 닭 사이에 이종간 생식선 키메라 (inter-species germ-line chimera)를 생산하게 되면, 이를 멸종 위기 조류를 복원하는데 실제로 이용할 수 있다.

따라서, 본 연구는 꿩 정원줄기세포주를 확립하고 꿩과 닭 사이의 이종간 생식선 키메라를 생산하여 최종적으로 멸종 조류 복원을 위한 기술을 개발하고자 하는데 연구 목적이 있으며, 멸종 조류 연구의 동물모델로서 유용성이 기대되는 꿩을 대상으로 정원줄기세포의 배양 조건을 구명하고 이를 통한 꿩 정원줄기세포의 특성 연구와 활용법 개발을 위한 기반 기술을 확립하기 위해 실시하였다.

## II. 연구사

### 1. 꿩 (*Phasianus colchicus*)의 분류학 및 특징

꿩은 분류학에서 순계목 (Galliformes), 치계과 (Phasianidae), 치속 (Phasianus)에 속하며, 치속 (Phasianus)은 2종 common pheasant (*P. colchicus*)와 green pheasant (*P. versicolor*)으로 구분되고 있고, 그 중 *colchicus*에는 30종류의 아종이 있는 것으로 소개되고 있다 (Crawford, 1990). 꿩과에는 세계적으로 190종이 있으며, 우리나라의 꿩은 *phasianus colchicus*로 아시아 동남부에서 중국 동북지방에 걸쳐 서식하고 있고 green pheasant (초록꿩)은 일본에 분포하며 크기는 우리나라 꿩과 같으나 색이 다른 특징을 가지고 있다. 꿩은 우리나라 전역에 분포되고 있으며 울릉도 및 원격 도서지방을 제외하고 우리나라에서 본토와 제주도를 비롯하여 육지와 4km 이상 떨어지지 않은 큰 섬에는 두루 분포되어 있다. 특히, 우리나라의 꿩은 다른 나라의 꿩보다 색체가 아름답고 목에 흰 띠가 있는 것이 특징이다 (김, 1969). 또한, 제주 수꿩은 야생 꿩을 포획하여 증식시킨 개체로 타 지역의 사육 꿩과 비교하여 몇 가지 다른 특색을 보이며 체구는 작지만 빛깔이나 광택이 뛰어나 산업용으로도 각광을 받고 있다. 닭은 계절적으로 알을 많이 낳고 적게 낳는 예는 있어도 연중 계속 산란하지만 꿩을 비롯한 야생조류는 번식기가 대개 3월부터 8월까지이며 특히 꿩은 5월 중순부터 8월 초순까지 알을 낳는다 (김, 1969). 꿩은 소리에 민감하고 경계심이 무척 높으며 병해에 강해 웬만한 조류독감에도 끄떡없다. 특히, 꿩은 닭과 생리적, 발생학적으로 유사할 뿐만 아니라 (Johnsgard, 1986) 닭이나 오리와는 비교할 수 없을 정도로 야성이 강하고 계절번식을 하지만 개체가 풍부하며 현재 사육이 가능한 조류 품종으로 향후 멸종조류 복원을 위한 연구의 가장 좋은 실험동물이 될 것으로 생각된다.

## 2. 조류의 생식세포를 이용한 이종간 키메라 생산

조류에서 생식세포를 이용한 이종간 생식선 키메라 방법은 형질전환 가금류의 생산 및 멸종 위기 조류 종의 보전을 위한 아주 중요한 기술로 발달해왔다 (Kang 등, 2008). 생식세포를 이용한 조류 사이의 이종간 생식선 키메라를 생산하게 되면 연중 번식하는 가금을 이용하여 생산된 생식선 키메라는 연중 번식하지 않는 준가금류 또는 멸종 위기 조류의 생식세포를 생산할 수 있으므로, 야생 또는 멸종 위기의 조류를 보존하는데 크게 기여할 수 있다. Furuta 등 (2001)은 아히메 닭 (멸종 위기의 일본 토종닭)의 보존을 위한 원시생식세포 이용 연구에 대해 보고하였다. 멸종 조류의 경우에도 만일 닭의 정소 내 생성이 가능하다면 이 방법도 하나의 방법이 될 수 있을 것이다. 그러나 원시생식세포의 경우 암컷과 수컷을 모두 생성시킬 수 있는 장점이 있는 반면 100 % 불임닭을 통한 완전한 키메라 닭의 생산은 어려운 실정이다. 현재 조류에서 생식세포를 이용한 메추리와 닭, 오리와 닭, 칠면조와 닭, 꿩과 닭 사이의 이종간 키메라를 생산하고자 하는 연구가 이어지고 있다.

### 1) 메추리와 닭의 이종간 생식선 키메라

배반엽 세포 (blastodermal cells)와 원시생식세포를 이용하여 이종간 메추리와 닭의 배아 키메라 (embryonic chimera)를 생성하였다. 메추리 공여 세포는 다른 조직뿐만 아니라 6일 된 배아 생식선 (embryonic gonad)에 관여하고 닭의 배아 생식선 60 % 이상이 메추리 생식 세포를 포함하고 있다 (Watanabe 등, 1992). 혈액 원시생식세포를 이식함으로써 이종간 생식선 키메라를 확인하기 위하여 이식하기 전에 혈액 2~5  $\mu$ l를 제거한 혈류로 약 100~250개의 메추리 원시생식세포를 이식하였다. 25개의 수용체 배자 중에 5개 (20 %)에서 메추리 원시생식세포를 관찰할 수 있었다. 메추리에서 닭 또는 닭에서 메추리로 이식된 원시생식세포가 관찰되고 있지만 메추리-닭 이종간 키메라로부터 공여체 유래의 새끼는 생산되지 않았다 (Watanabe 등, 1992; Nakamura 등, 1992; Yasuda 등, 1992; Ono 등, 1996; Ono와 Machida, 1999).

## 2) 오리와 닭의 이종간 생식선 키메라

Li 등 (2002)은 초기 배반엽 세포를 이식함으로써 오리와 닭 사이의 이종간 생식선 키메라를 성공적으로 생성하였다. 감마선 조사 (gamma-irradiation) 처리 여부에 상관없이 이식된 오리의 배반엽 세포가 수용체 닭에서 체세포 키메라 현상을 유도하였다. 그 결과, 부화율과 체세포 키메라는 감마선 조사 처리하지 않은 control 그룹보다 감마선 그룹에서 효율적으로 나타났고, 생식선 전이율은 1 %로 관찰되었다.

## 3) 칠면조와 닭의 이종간 생식선 키메라

또 다른 하나의 조류 생식선 키메라 연구로서, 생식선 반월 (germinal crescent)로부터 분리된 칠면조 원시생식세포를 이식함으로써 칠면조와 닭의 이종간 생식선 키메라를 생성하였다. 이식된 칠면조 원시생식세포는 닭 생식선에서 기능적 생식세포를 생산하였다 (Reynaud, 1969). 키메라 암컷이 칠면조 정자에 의해 수정되었는데, 배자는 배양 15일까지 성장하였다. 그러나 칠면조-닭 생식선 키메라로부터 공여체 유래의 칠면조 새끼는 관찰되지 않았다 (Reynaud, 1969).

## 4) 꿩과 닭의 이종간 생식선 키메라

국내의 경우 현재까지 정원줄기세포를 이용한 연구가 미진한 상태로 기술적 취약 분야이다. Kang 등 (2008, 2009)은 꿩과 닭의 원시생식세포 (primordial germ cell)를 이용하여 꿩과 닭의 이종간 키메라 생산에 성공하였는데 일부 공여체 성세포가 공존하는 키메라 닭 생산의 성공을 보고하였다 (Figure 1). 종이 다른 조류간 임에도 멸종 위기 조류의 정자가 닭에서 생산이 가능함을 보여주었다. 그러나 완전한 복원 기술 및 종 보존에 응용하기 위해서는 100 % 공여체 정자를 생산하는 닭에 대한 연구가 필요하지만 아직까지 그러한 결과는 발표하지 않았다. 원시생식세포 배양 및 생식선 키메라 생산 등을 계속 시도하여 주로 germ cell을 타겟으로 유전자 전이 기술들을 개발하고 있다.

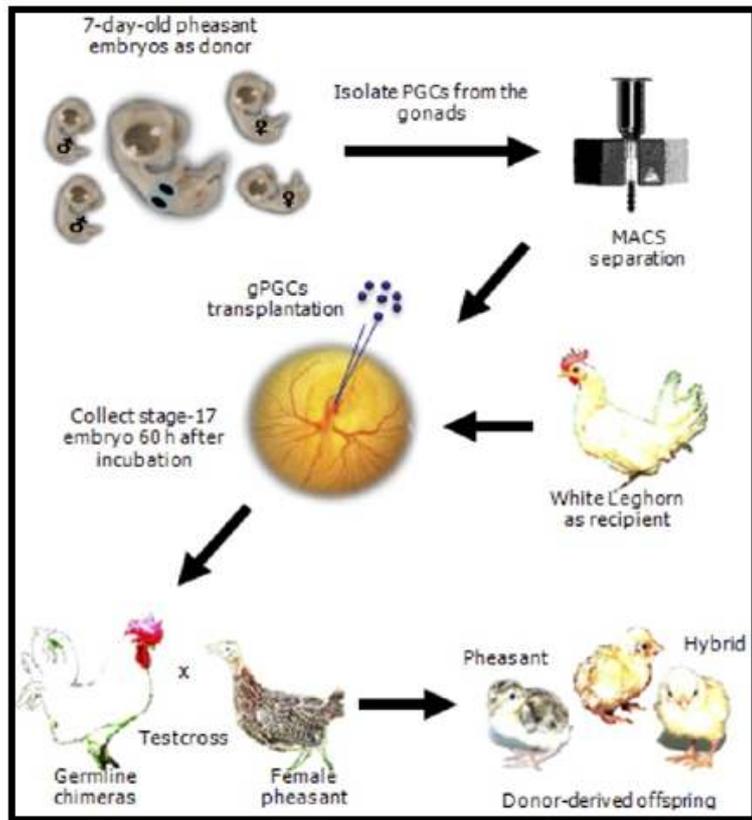


Figure 1. Schematic diagram of the production of pheasants (*Phasianus colchicus*) by interspecies germ cell transfer into chicken embryos (Kang et al., 2008).

### 3. 정원줄기세포의 이식 기법

정원줄기세포의 이식은 현재 Brinster와 Zimmerman (1994)에 의해 시도된 이식 방법을 사용하고 있다. 과거 여러 해 동안 정원줄기세포의 생물학적인 특성에 관한 연구들은 정원줄기세포를 구분하고 연구할 수 있는 분석기법이 개발되지 못한 관계로 형태학적인 관찰에 의지한 이론적인 지식에 의존되고 있었다. 정원줄기세포 이식은 정자형성과정과 줄기세포생물학을 연구하기 위한 강력한 기술이고 (Olive와 Cuzin, 2005), 공여 생식세포를 다른 정소 내로 이식하는 새로운 기술이다. 정원줄기세포는 이식된 정소에 군집을 이루며 정자형성을 다시 시작할 수 있으며, 수정을 할 수 있는 정자를 만들어 낼 수 있다. 이 기술은 근본적인 정자발생의 연구를 수행할 수 있는 틀을 제공할 수 있는데 불임환자의 정자를 재생시키기 위한 방법을 제공할 수 있으며, 형질전환 동물을 만들기 위해 유전자 조작 생식세포를 제공할 뿐만 아니라 멸종동물을 복원시키기 위한 기술을 개발하는데 도움을 줄 수 있다.

#### 1) 포유동물에서 정원줄기세포의 이식

Brinster 등 (1994)은 정소세포의 이식기법을 개발하여 포유동물의 정소에 정원줄기세포가 존재한다는 실증을 보임과 동시에 정원줄기세포의 기능적 특성을 직접적으로 연구할 수 있는 전기를 마련하였다 (류, 2012). 정원줄기세포는 생식세포를 가지지 않은 정소 세정관 내에 이식되었을 때 정자형성 과정을 재현할 수 있고, 오랫동안 정자형성과정을 유지할 수 있어서 정자형성과정의 이해, 멸종동물 보존 그리고 불임치료를 위한 모델 시스템으로 최근에 연구가 집중되고 있다.

정원줄기세포는 다른 줄기세포들보다 형질전환이 용이하며, 이식 후 형성된 정자의 수정을 통해 형질전환동물의 생산이 용이한 장점을 가지고 있다. 정원줄기세포는 성체줄기세포들 중 유일하게 다음 세대에 유전물질을 전달할 수 있는 생식세포로서의 특성을 지니고 있기 때문에 germ-line modification을 위한 완벽한 세포로서 세계적으로 신기술 개발에 대한 관심이 높아지고 있으며 (류, 2009), 이러한 사실은 국내에서의 독자적인 연구개발에 대한 필요성 및 중요성을 반증한다.

Dym (1994)은 마우스에서 정원줄기세포 이식을 통한 키메라 마우스를 최초 보고하였다. 정소 내 줄기세포의 존재 및 줄기세포를 통하여 정자 형성 유무와 이식실험을 최초로 제시한 연구로 이후 랫트, 소, 돼지, 개, 닭 등의 정원줄기세포를 이용한 이식 연구 보고가 급증하였다. Clouthier 등 (1996)은 랫트 정소세포를 면역 결핍된 쥐로의 이종간 이식은 쥐의 정세관에서 랫트의 정자형성을 보고하였다. 이 연구를 시작으로 개와 토끼 (Dobrinski 등, 1999), 멧돼지, 황소, 종마 (Dobrinski 등, 2000), 암소 (Oatley 등, 2002), 염소 (Hanaramooz 등, 2003), 개코 원숭이 (Nagano 등, 2001), 인간 (Nagano 등, 2002) 을 포함하여 공여동물로부터 생식세포를 이용한 이식이 이루어졌다.

또한 hematopoietic system (Harrison, 1980; Till과 McCulloch, 1980)과 spermatogenic system (Brinster와 Avarbock, 1994; Brinster와 Zimmermann, 1994)에서의 이식기술은 세포치료에도 활용할 수 있다 (Kanatsu-Shinohara, 2002).

정소 내 불임상태에서도 공여체 줄기세포에 의해 복원되는 기술이 현재 포유류는 일부 성공하고 있으나 조류의 경우는 정소의 위치가 달라서 정소 내 주입 기술이 확립되어 있지 않다. Brinster 등 (1994)은 정소로부터 정원줄기세포를 분리하여 내제적인 정원줄기세포가 제거된 생쥐 정소 내 정세관에 이식하여 이식된 정원줄기세포 유래 정자형성 및 산자를 생산하였다. 정원줄기세포의 정소 내 이식기법 개발로 정원줄기세포 연구의 획기적인 돌파구를 마련하였다. 정원줄기세포의 이식 기법은 현재까지 정원줄기세포의 기능적 활성도의 분석이나 정원줄기세포를 이용한 형질전환동물의 생산 등에 핵심적이고 필수적인 기법으로 사용되고 있다. 그리고 정원줄기세포와 이식기법을 이용한 유전자적중 생쥐를 생산하는데 성공하였다 (Kanatsu-Shinohara 등, 2006). 정원줄기세포는 성체줄기세포 중 유일하게 다음 세대에 유전 형질을 전달할 수 있는 특성을 지녔다. Nagano 등 (2000)은 레트로 바이러스를 이용하여 lac Z 유전자를 정원줄기세포의 도입한 후, 이를 recipient 생쥐의 정소 내에 이식하여 정원줄기세포 유래 유전자가 도입된 정자로부터 생쥐를 생산하는데 성공하였다. 이 연구는 정원줄기세포를 이용하여 직접적인 germ-line modification을 통한 형질전환동물을 생산한 성과로서 형질전환 동물 생산에 있어서 효율을 극대화 할 수 있는 정원줄기세포의 활용도를 제시하였다. Honaramooz 등 (2002a)은 돼지에 있어서 정원줄기세포의 이식 기법을 보고하였고, 이 연구는 유용가축인 돼지의 정원줄기세포 활용 기법에 대한 기초자료를 제공하였다.

## 2) 조류에서 정원줄기세포의 이식

최근 줄기세포 연구와 줄기세포 생물학의 진보는 멸종 위기 동물의 증식을 위한 새로운 방법을 제시해주고 있다. 정원줄기세포 이식은 생식선 키메라와 형질 전환동물을 생산하는 유용한 도구로 알려져 있고, 1994년 쥐에서 처음 보고되었으며 (Brinster와 Zimmerman, 1994) 이를 시작으로 포유동물에서 다양한 연구가 이루어지게 되었다. 이러한 포유동물에서의 기술들은 조류에게도 적용되어졌다 (Lee 등, 2006, Trefil 등, 2006). 현재까지 조류에서 정원줄기세포의 이식은 포유류에서와는 달리 확립되어 있지 않으므로 이 분야도 개발의 가능성이 있다. Lee 등 (2006)은 오골계의 정소세포를 백색 레그혼으로 이식함으로써 생식선 키메라 시스템을 확립하였고, 후대검정을 실시한 결과, 검은 깃털을 가진 후대의 비율이 7.8%인 것을 알게 되었다. 이 키메라 시스템은 키메라 효율은 증가하면서 단순한 조작과 결과의 신속한 추정이 가능하기 때문에 효율적인 방법이다. Busulfan 및 감마선 조사 처리는 이러한 시스템에서 생식선 키메라를 증진시키기 위해 제안되었다 (Trefil 등, 2006). 그러나 busulfan 처리는 배아에 유해한 것으로 알려져 있고, 최근에 Trefil 등 (2006)은 많은 양의 감마 방사선에 반복적으로 노출시켜서 정원줄기세포를 수용체에 이식하였다.

최근에 보고된 정원줄기세포 이식기법은 공여동물 (donor)의 정소에서 줄기세포를 회수하여 체외에서 조작한 후 수여동물 (recipient)의 정소에 이식하여 조작된 공여 줄기세포와 유전적 형질이 동일한 생식세포인 정자를 생산할 수 있는 획기적인 신기술이다. 정원줄기세포 수준에서의 유전자조작과 이식기법을 병행 사용한다면 정원 줄기세포의 높은 생산성과 germ-line transmission (Brinster와 Avarbock, 1994)된 founder animal을 직접 생산할 수 있어 형질전환 동물의 생산에 혁신적인 효율의 극대화뿐만 아니라 이종간 이식을 위한 정원줄기세포 배양 기술을 개발함으로써 멸종 동물의 복원을 기대할 수 있다.

#### 4. 멸종 위기 조류와 동물의 복원

오늘날, 우리의 지구에서 동물들의 서식지를 위협하는 인간의 활동과 기후 변화로 인해 수많은 동물들이 심각한 멸종 위기에 처해져 있다. 가장 먼저 멸종한 동물이라 추정되는 매머드를 시작으로 세계 각지의 수많은 거대 포유동물들이 사라지고, 신대륙 개척의 시대가 도래하며 섬에 서식하는 수많은 고유종과 조류들도 사라지거나 멸종 위기에 처해있다. 지구로부터 수많은 야생동물들도 그들의 생태계와 함께 사라지고 있는데 (Long, 1998), 이 추세가 지속된다면 약 100년 안에 지구상의 생물들 중 거의 절반이 멸종될 것이라고 한다. 특히 지난 50년 사이에 우리 인간의 삶에서 과도하게 사용되는 화학 물질로 인해 이 동물들은 멸종 위기에 처하게 되었다. 대부분의 동물들은 주로 농업 생산성과 동물 생산을 향상시키거나, 집을 지키고 그와 관련된 일들을 위해 사용되어졌다. 이를 위해 사용되는 모든 화학물질은 결국 지구 상에서 야생동물, 가축을 포함한 동물들에게 유해한 결과를 초래하였다 (Cadbury, 1997; Colborn 등, 1997). 우리는 이런 멸종 위기에 처한 동물들을 증식하고 복원할 필요가 있고, 세계의 몇 동물원에서는 다양한 생명공학기술을 이용하여 멸종 위기에 처한 동물들을 보존하기 위해 직접 나섰다 (kswabata, 1998).

세상에 현존하는 9,920 종의 조류는 약 12.5 %가 멸종 위기에 처해 있고, 자연 번식을 통한 보존 노력은 계속되고 있다. 정자의 냉동 보존 및 인공수정은 만족할 만한 결과를 제공하고 있으나 여전히 nondomestic 종에만 적용되고 있어 멸종 조류 복원은 어려운 실정이다 (pereira 등, 2013). 그러나 생식세포를 이용한 진보된 기술로 domestic 종에도 적용하여 멸종 위기에 처한 종의 보존이 가능하다 (Roe 등, 2013). 멸종 조류의 복원을 위해서는 형질전환 닭의 생산, 닭 배아에 외래 유전자의 도입, 원시생식세포 (PGCs) 및 정원줄기세포의 체외 배양 확립, 생식세포를 이용한 키메라 닭의 생산과 이종간 키메라의 생산에 관심을 가져야 한다 (Nakamura 등, 1988; Ono 등, 1996; Chang 등, 1997; Anderson, 1998; Han 등, 2002). 또 중요한 것은 이미 멸종 위기에 놓인 동물의 유래세포에서 핵 이식을 포함한 동물 복제가 가능하다는 것이다. 그러나 원시생식세포의 세포막의 hardness 때문에 조류 원시생식세포 (PGCs)의 핵이식은 현재 매우 어려워지고 있다 (Inada 등, 1999).

정원줄기세포는 정자형성과정의 토대가 되는 생식선 줄기세포로서 멸종동물의 복원을 위한 새로운 대안으로서 주목받고 있다. 정원줄기세포는 배아줄기세포와 유사하게 자가 증식 능력과 다음 세대로 유전형질을 전달할 수 있는 능력을 지니고 있다 (Meistrich와 van Beek, 1993). 기술적인 문제 등의 여러 가지 어려움을 보았을 때 멸종동물의 복원은 아직은 어렵다고 할 수 있다. 따라서 효율적인 조류의 이종간 생식선 키메라의 생산을 위하여 추가적인 연구가 필요하며 정원줄기세포를 이용한 멸종동물 복원을 진행하며 얻어질 새로운 지식들, 새로운 기술들은 분명 미래 생명공학의 발전에 이바지할 수 있을 것이다.

### III. 재료 및 방법

#### 1. 실험동물

본 연구에서는 꿩 사육농가들과의 협약에 의하여 안정적인 공급처를 확보하였다. 제주도 전역에 걸쳐 있는 꿩 사육농가 등은 이미 대량사육시설과 부화 설비 등을 완비하고 있으므로 제주도 제주시 한림, 교래, 덕천의 3개소 꿩 사육농가와 협의하여 공여동물 (donor)로서 45-50 주령의 수꿩 (*Phasianus colchicus*)을 안정적으로 공급 받을 수 있었고 (Figure 2), 수여동물 (recipient)로서 제주대학교 부속 동물사육장에서 사육중인 암탉 (*Gallus gallus*)을 이용하여 실험을 원활하게 진행할 수 있었다.

#### 2. 정원줄기세포의 회수

꿩의 정소를 외과적인 방법으로 회수한 후 4 °C PBS 용액에 담아 실험실로 운반하였다. 백막을 제거하고 정소조직을 가위로 잘게 자른 후 1 mg/ml collagenase IV (Sigma, St. Louis, MO, USA)와 1 mg/ml hyaluronidase (Sigma, St. Louis, MO, USA)가 첨가된 Dulbecco Phosphate Buffered Saline (DPBS; Gibco BRL, Bethesda, MD) 용액에 넣어 37 °C에서 10분간 배양하여 세정관을 분리하였다. 이후 분리된 세정관을 DPBS로 3회 세척하고 0.25 % trypsin-EDTA (Gibco BRL, Bethesda, MD)용액으로 옮겨 37 °C에서 5분간 처리하였다. Trypsin을 비활성화 시키기 위해서 세포가 담긴 배양액에 fetal bovine serum (FBS; HyClone, Logan, UT)을 첨가하였다. 이후 세포 부유액을 nylon mesh (pore size, 40  $\mu$ m; Falcon, USA)에 통과시켜 잔여조직을 제거하고 생식선줄기세포인 정소 세포를 회수하였다.



Figure 2. A Jeju cock pheasant supplied from the cooperative farm for experiment.

### 3. 정원줄기세포의 공배양

정소로부터 분리된 총 세포액을 6 혹은 24 well plate를 이용하여 초기 배양을 실시하였다. 배양액의 조성은 10 % FBS (Hyclone, Logan, UT)가 포함된 Dulbecco modified Eagle medium (DMEM; Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA) 배양액에 비필수 아미노산 (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA), human basic fibroblast growth factor (hbFGF; Sigma, St. Louis, MO, USA), human insulin-like growth factor-1 (hIGF-1; Sigma, St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 초기 배양을 시작하였다. 초기 배양에서 사용된 기저세포는 mytomycin C를 처리한 STO (SIM mouse embryo-derived thioguanine and ouabain resistant) 세포이고 사용한 STO 세포는 신선한 상태를 유지하였으며 썩의 체세포와 STO 세포의 공배양 실험을 진행하였다. 공배양용 세포를 증식시킨 후 80 % 정도 증식되었을 때 mytomycin C를 처리한 다음 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 1일간 배양을 실시하였다. 1일 지난 후 PBS로 세척을 조심스럽게 2회 실시한 후 FBS 20 %의 DMEM 배양액에 썩의 성세포를 첨가하였다. 이 실험에서는 동일한 세포수를 첨가한 후 배양액은 1주일마다 2번씩 교환하였다.

### 4. 정원줄기세포의 형광면역항체법

배양과정 중 정원줄기세포의 증식 양상을 보다 신속히 분석하기 위하여 정원 줄기세포에서 특이 발현되는 것으로 예상되는 마커의 검증을 통하여 형광면역항체법을 이용한 분석을 실시하였다. 실험에 사용된 항체는 기존의 줄기세포 특성을 발현하는 Oct4, Nanog, Thy1, stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA-1), stage-specific embryonic antigen-4 (SSEA-4) 그리고 GDNF 계열의 단백질인 GFR $\alpha$ 1 (soluble GDNF family receptor alpha 1, R & D Systems, USA)을 이용하였다.

## 5. Busulfan 가온법

24시간 배양한 수정란 배자에 대한 busulfan 처리는 80 mg의 busulfan을 41 °C 정도로 미리 가온시킨 dimethylsulfoxide (DMSO) 4 ml에 녹인 다음 16 ml의 가온된 증류수를 첨가하여 완전하게 용해시켰다. 용해된 busulfan은 가온 상태에서 50  $\mu$ l microcapillary tube (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 배자 상단부 난백을 통과시켜 정확하게 10  $\mu$ l를 주입한 후 parafilm (Bemis, Neenah, WI, USA)으로 봉하고 부화기를 이용하여 배양하였다 (정, 2007). 4주령부터 시작하여 16주령까지 2주 간격으로 주입하여 성성숙 이후에 불임효율을 측정하였다.

## 6. 정원줄기세포의 3D 배양절편 이식

3D 배양절편 이식에 의한 분화유도 기술은 캐나다 켈거리대학에서 처음 시도했던 방법으로 돼지 정소를 이용하여 결과를 도출한 것을 핏 정소를 이용하여 응용하였다. 핏의 정소조각을 면도칼을 이용하여 3~4 mm 두께로 기술적으로 slice를 만든 다음에 agarose 조각 위에 올려놓은 후 배양액이 agarose 조각과 같은 수면 높이로 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 배양을 실시하였다.

## 7. 정원줄기세포의 PKH-26 labeling과 분리

공여체 유래의 줄기세포의 특성을 분석하기 위하여 PKH-26 형광염색 kit A (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 정원줄기세포를 labeling 한 후 특성을 분석하였다. 간단히 방법적으로 살펴보면, 줄기세포가 포함된 정원세포 수용액을 enzyme 처리하여 단일세포로 만든 후 1 ml의 diluent C 용액에 첨가하였다. 형광 염색된 정원줄기세포의 미세주입을 위하여 수용체 배자가 있는 달걀의 침단부에 직경 1 cm 되는 구멍을 만든 후 배자를 개방시키고 실체현미경하에서 각각 수용체 배자 내로 바늘 끝 내부 직경이 25  $\mu\text{m}$ 인 미세 바늘을 이용하여 미세주입하였다. 미세 주입이 끝난 수용체 배자는 parafilm (Bemis, Neenah, WI, USA)을 이용하여 두 겹으로 밀봉하였다 (정, 2007). 그런 다음 PKH26 fluorescent dye (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 5분간 labeling을 실시하였다. 반응이 끝난 다음 3번의 세척 과정을 거치고 fluorescence microscope (IX70; Olympus, Tokyo, Japan)를 이용하여 관찰하였다.

## 8. Periodic Acid-Schiff's (PAS) 분석

정소세포를 4 % paraformaldehyde로 10분간 고정처리한 후에 PBS로 2번 세척하였고 periodic acid solution (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Germany)으로 5분간 처리하였다. PBS로 세척한 후에 고정된 세포를 Schiff's solution (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Germany)으로 15분간 처리하였다. 모든 절차는 실온에서 수행하였고 염색한 세포는 fluorescence microscope (IX70; Olympus, Tokyo, Japan)를 이용하여 관찰하였다.

## 9. 꿩 정원줄기세포로부터 c-kit+ 세포의 분리

꿩 정원줄기세포는 mouse anti c-kit antibody (SouthernBiotech, Alabama, USA)를 이용하여 관찰하고, c-kit+ 정원줄기세포를 정제할 수 있었다. PBS로 2번 세척한 후에 PBS에 0.5 % BSA와 2.0 mmol/ℓ EDTA를 넣은 magnetic-activated cell sorting (MACS) buffer를 첨가하였다. 세포를 빛이 들어오지 않는 어두운 조건에 4 ℃에서 15분간 배양하였고 매뉴얼에 따라 VarioMACS separator (Miltenyi Biotec, Auburn, CA)를 이용하여 LS-column을 통해 c-kit+ 세포를 배양하고 증식하였다.

## 10. 꿩 정원줄기세포 닭 배자내 주입

공여세포로서 7일령 배자로부터 회수된 꿩 정원줄기세포를 2.5일령 닭 배자의 혈관에 주입하여 이종간 생식세포 키메라를 생산하고자 하였다. 먼저 2.5일령 수정란의 난각을 절개하고 50 μℓ microcapillary tube (Sigma, St. Louis, MO, USA) 미세바늘 내로 꿩의 성세포를 넣은 다음 실체 현미경을 이용하여 배자 혈관내로 주입하였다. 주입한 배자는 parafilm (Bemis, Neenah, WI, USA)으로 랩핑을 한 후 다시 부화기에 넣어서 일령별 생존율을 측정하였다.

## 11. 통계분석

실험결과의 통계분석은 SPSS v 12.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA)를 이용하여 실시하였고 P 값이 0.05 미만일 때 유의한 것으로 판정하였다.

## IV. 결 과

### 1. 정원줄기세포의 배양 안정화

평의 특성상 비번식기인 9월부터 그 다음해 2월까지의 번식은 중단하고 주로 살을 찌우는 계절적 특징을 가지고 있어서 본 연구에서는 수평을 월별로 희생시켜 비번식기와 번식기의 정소의 크기를 비교 분석하였다. 그 결과, 비번식기에는 정소 크기가  $0.3 \times 0.8$  cm 정도로 감소하고, 번식기인 3월부터  $3.0 \times 1.5$  cm 정도로 정소가 증가하는 특징을 보여주었다 (Figure 3).

초기 배양 상태와 세포군의 분포를 보기 위해서 세포성장분석기를 이용하여 평 정소 내 세포의 크기 및 그 밖의 분포 사항을 분석하였다. 세포를 배양하기 전에는 전체적인 평균 생존 세포의 크기가  $11.9 \mu\text{m}$ 를 나타내고 있다. 그러나 초기 배양을 진행한 후 1주일 경과한 다음 다시 효소 처리한 세포의 크기를 분석해 보니 크기가  $13.9 \mu\text{m}$ 로 매우 커져 있음을 확인하였다 (Table 1). 아직 정확한 원인을 파악하지는 못하였지만 여러 가지 면역항체방법으로 검토해 본 결과 배양이 진행되면서 체세포의 경우는 배양기 조건에서 급속도로 퇴화되는 것을 발견할 수 있었는데 이러한 현상은 이 세포를 3주 이상 배양할 경우에도 나타나고 있었다.

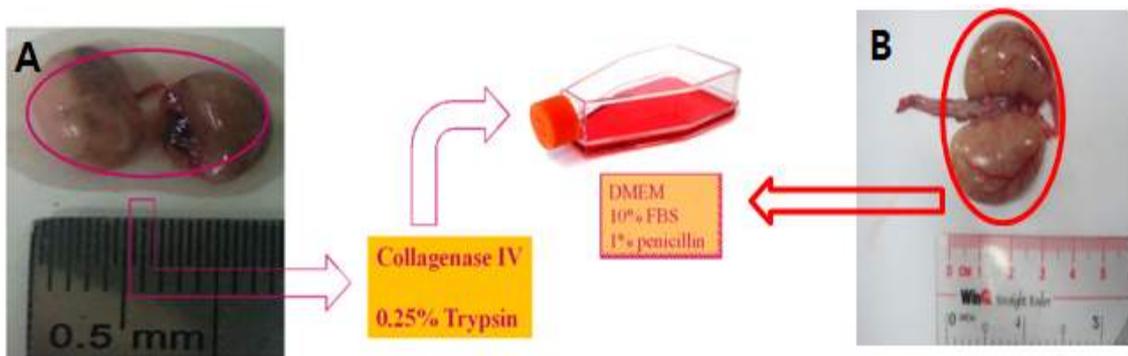


Figure 3. Comparative size of testis of Jeju pheasant between non-breeding and breeding season. (A) Non-breeding season (November–December), (B) Breeding season (May–June). Testicular organ size of breeding season ( $3.0 \times 1.5$  cm) is larger than non-breeding season ( $0.3 \times 0.8$  cm).

Table 1. The properties of the testicular cells using cell analyzer after degradation of enzyme with single cell.

	Cell concentration (cells/ml)			Vaibility	Cell size ( $\mu\text{m}$ )	
	Total cell <sup>a</sup>	Viable cell <sup>b</sup>	Dead cell <sup>c</sup>		Viable cell <sup>d</sup>	Dead cell <sup>e</sup>
Before culture	$1.0 \times 10^6$	$8.4 \times 10^5$	$2.0 \times 10^5$	81 %	11.9	7.1
After culture	$1.5 \times 10^6$	$1.4 \times 10^6$	$5.0 \times 10^4$	97 %	13.9	8.9

<sup>a</sup> Total cell concentration of pheasant testis.

<sup>b</sup> Viable cell concentration of pheasant testis.

<sup>c</sup> Dead cell concentration of pheasant testis.

<sup>d</sup> Average viable cell size of pheasant testis.

<sup>e</sup> Average dead cell size of pheasant testis.

## 2. 공배양을 통한 정원줄기세포 증식 효과

본 연구에서는 닭 연구에서 사용된 배양액 조성에서 확립한 배양액을 이용하여 배양한 결과 배양을 성공하지 못했기 때문에 기저세포를 사용하기로 하고 썩의 체세포와 STO 세포를 이용하여 초기에 실험을 진행하였다. Figure 4는 기존의 배양방법에 의하여 배양한 상태이며 세포가 증식되는 양상이 포도송이 같이 증식은 되지만, 바닥에 붙어서 콜로니 형태를 형성시키지는 못하고 있다. 약 10회 이상 시도를 했음에도 계속 동일한 형태를 유지한 상태로 증식속도가 매우 느린 것이 관찰되고 있으며 20일을 배양하였음에도 몇 개의 과립모양으로 증식한 상태에서 더 이상의 배양이 진행되지 않았다 (Figure 4-C).

그러나 몇 가지 기존 연구 방법을 변형하여 사용한 방법인 STO 기저세포와 썩의 체세포 공배양 방법에 의하여 조건을 확립할 수 있었으며, 결과적으로 공배양을 진행한 상태에서 세포가 증식됨을 관찰할 수 있었다. STO 기저세포와 배양했을 때 증식효율이 급격하게 변화하는 것을 확인할 수 있었으나 ( $P < 0.05$ ) 기저세포를 첨가하지 않은 세포군에서는 2주까지는 증식하였지만 이후 세포가 사멸되기 시작함을 관찰하였다 (Figure 5). 그리고 닭의 체세포를 이용하여 배양했을 때에도 증식효과를 볼 수 있었으며, 썩의 체세포를 이용했을 때에는 STO보다는 낮은 효율이었지만 증식효과는 높게 나타났다 (Figure 5). 또한 계대배양 없이 20일간 배양 후 관찰한 상태에서 증식효과를 볼 수 있었다. 그런데 흥미롭게도 1차 공배양을 마친 후 계대배양을 실시할 때 콜로니 일부를 기저세포와 공배양하지 않고 일반 줄기세포 배양액을 변형하여 실험을 진행하였더니 기저세포 없이 배양이 진행됨을 새롭게 관찰할 수 있었다.

### 3. 정원줄기세포의 증식배양액에서 썩 특이적 증식 효과

Figure 5에서 확립한 조건을 계대배양을 진행하면서 관찰한 결과 순수한 정원 줄기세포와 체세포가 혼재하는 현상이 관찰되었다. 이는 향후 이식실험을 할 경우 다시 순수 분리 실험을 해야 하는 문제점이 발생한다. 그래서 이 문제를 해결하기 위하여 순수 정원줄기세포 배양을 시도하였다. 그런데 2차 계대배양부터는 큰 문제 없이 일정 정도 증식곡선을 그리고 있음을 알 수 있었다. 증식인자 없이 기본 배양액에 10 % FBS를 첨가한 후 배양한 결과 답에서 수행했던 결과와 유사한 증식 곡선을 보여주었다 (Figure 6).

그러나 2차 계대배양에서부터는 여러 가지 조건의 배양액에 썩세포가 효과적으로 반응하는 것을 관찰할 수 있었다. 이 결과를 보면 많은 기존 연구에서 제시된 것처럼 줄기세포 증식배양액에서 매우 높은 증식효율을 나타내고 있었다. 그러나 본 연구에서는, 몇 가지 증식인자를 조정한 M1과 M2에서 썩 특이적 증식 효과가 증가함을 알 수 있었다. 특히, M2 용액에서는 가장 좋은 효과를 나타냈는데 ( $P < 0.05$ ), M2의 경우에 큰 변화를 보이는 조성비는 FBS를 10 %에서 5 %로 감소시킨 상태에서 배양을 실시한 것이 정원줄기세포가 좀 더 나은 증식효과를 보이고 있는 것으로 생각된다. 많은 연구 보고들에 의하면, FBS가 정원줄기세포의 증식에 긍정적인 효과를 끼치는 것은 분명하지만 이와 마찬가지로 공배양시 기저세포 또는 성세포에 존재하는 niche 세포들의 증식에도 매우 큰 영향을 끼치면서 체세포가 오히려 정원줄기세포의 증식을 방해하는 현상이 관찰된다고 한다. 이러한 결과를 토대로 하면 본 연구에서는 답에서 나타나는 경우보다 체세포 (정소 내)와 정원줄기세포간의 상호작용이 외부의 환경에 의해서 좀 더 많은 영향을 받는 것으로 생각된다.



Figure 4. Colony forming cells in the isolated pheasant testicular cells at day 7 (A), day 12 (B), and day 20 (C) after incubation.

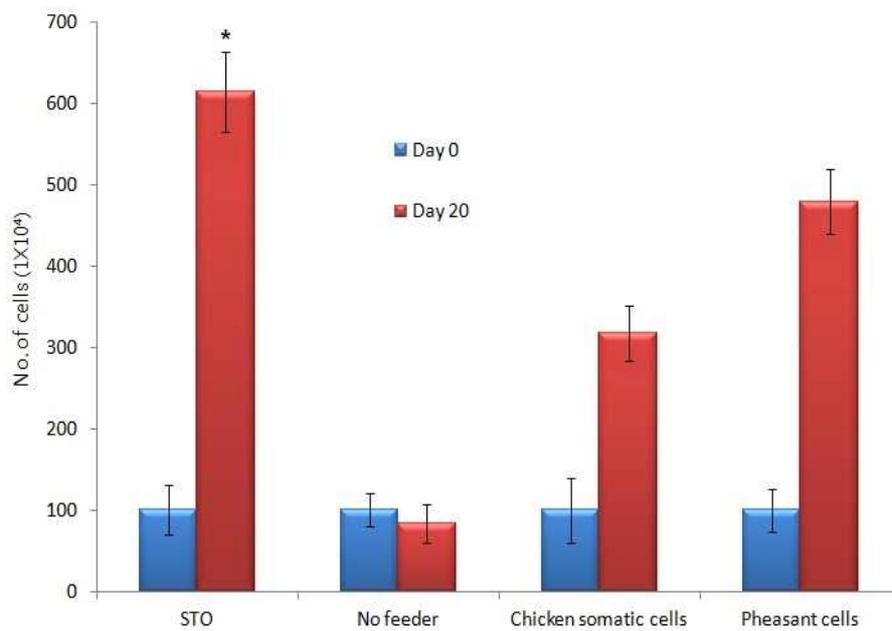


Figure 5. Establishment of growth conditions for pheasant spermatogonial stem cells with co-culture system. Data are reported as mean ± SD. \* Significance at  $P < 0.05$ .

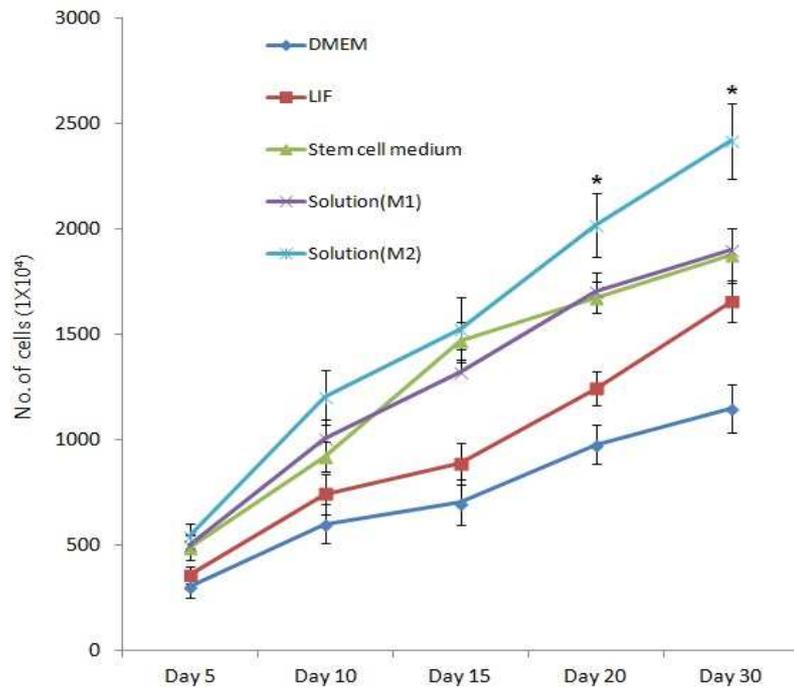


Figure 6. Effect of growth factors on pheasant spermatogonial stem cells. Data are reported as mean  $\pm$  SD. \* Significance at  $P < 0.05$ .

#### 4. 계대배양을 통한 정원줄기세포주 확립

본 연구에서는 정원줄기세포주 확립을 위한 계대배양을 지속적으로 진행하였으며 이를 통하여 일정한 배양곡선과 정원줄기세포의 콜로니가 안정적으로 형성되는 세포주를 형성하고자 하였다. 본 연구에서 정원줄기세포주를 확립하였지만 아직 많은 계대배양을 진행하지는 못했으며 완전한 세포주의 형태는 아직도 진행되고 있는 상태이다. 초기 평의 배양형태가 기저세포 위에 살짝 붙어서 증식되고 형태 또한 닭의 콜로니와 거의 동일한 형태를 띠고 있음을 알 수 있었다 (Figure 7). 그런데 이후 세포군 내에서 체세포와 같은 기저세포들이 증식하는 것을 관찰하였으며, 지속적인 계대배양을 거치면서 콜로니는 안정적으로 분열과 증식이 진행하여 세포주 형성에는 긍정적인 방향으로 배양이 진행됨을 확인하였다.

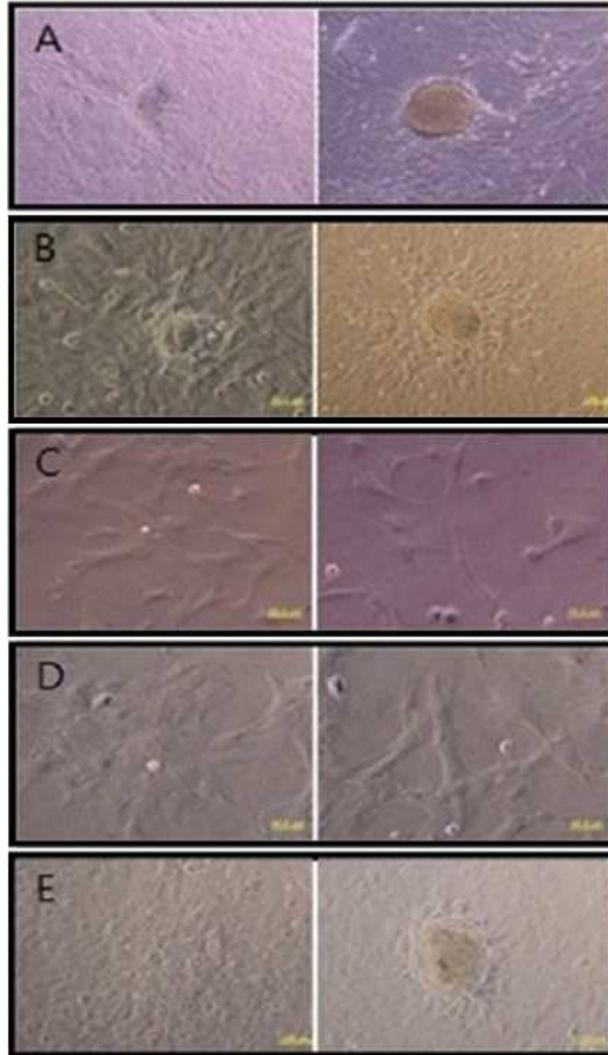


Figure 7. Colony formation of pheasant spermatogonial stem cells. chicken spermatogonial stem cells (A), pheasant spermatogonial stem cells after 8 days (B), 12 days (C), 13 days, passage 3 (D), and 15 days, passage 6 (E).

## 5. 정원줄기세포의 발현 특이 마커를 이용한 형광면역항체 분석

배양과정 중 정원줄기세포의 증식 양상을 보다 신속히 분석하기 위하여 정원 줄기세포 발현 특이 마커를 이용한 형광면역항체분석을 실시함으로써 줄기세포임을 검증하고자 하였다. 정원줄기세포 배양을 진행하면서 계속되는 계대배양에도 안정적으로 반응하는 세포군을 따로 떼어서 줄기세포 특이 마커를 이용하여 분석하였고, 형태학적이거나 계대배양에서 나타나는 모든 배양형태가 줄기세포의 조건을 충족하고 있었지만 일반적 검증실험을 위하여 본 실험을 진행하였다. 평 정원 줄기세포에서 특이적인 발현이 예상되는 다양한 마커들을 검증한 결과 닭에서는 문제없이 발현되었던 Oct4, Nanog, Thy1, SSEA-1, SSEA-4 등은 사용된 마커에 반응하는 강도가 매우 낮거나 반응하지 않았으나 GFRa1의 마커에는 반응하는 것이 관찰되었다 (Figure 8). GFRa1 유전자는 GDNF 계열의 단백질로 신경계통에 많이 관여하는 것으로 알려져 있지만 정원줄기세포의 증식인자와도 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있으며, 평의 경우 닭과는 몇 가지 다른 특성이 있는 것을 알 수 있었다.



Figure 8. Immunofluorescence antibody assay for the characterization of pheasant spermatogonial stem cells. (A) Phase contrast microphotograph of spermatogonial stem cells colony, (B) Green fluorescence of GFRA1 antibody in the colony, and (C) The merge state of figure (A) and (B).

## 6. 3D 방법을 이용한 정원줄기세포 및 성세포의 분화 유도

본 연구에서는 3D 방법을 이용하여 췌의 정소 내에서 일어나는 현상에 대하여 규명하고 이를 토대로 적절한 분화 및 증식을 유도하고자 하였다. 기존의 정소 3D 방법을 변형하여 췌의 정원줄기세포가 향후 닭의 정소 내 또는 췌의 수용체 정소 내에서의 현상을 관찰하고 이에 맞는 적절한 분화 및 증식인자를 첨가 또는 배제하기 위하여 실시하였으며 결과는 Figure 9와 같다. 먼저 본 실험을 위하여 디자인한 것은 1차로 증식여부와 정소세관내의 정원줄기세포가 배양액과 어떻게 *in vitro*내에서 반응하는지를 관찰하고, 이종의 정원줄기세포를 현미경하에서 정소세관과 정소 내 공간에 주입하여 증식 또는 분화에 어떤 영향을 미치는지를 알아보고자 실험을 수행하였다.

결과적으로 보면 정소절편이 모양을 유지하지 못하고 그 안에 있는 세포들이 정소세관 밖으로 이동하여 콜로니 형태를 유지하며 증식하는 것을 관찰하였다 (Figure 9-A, B). 이상하게도 빠져나온 세포들은 정원줄기세포의 형태와 세르톨리 (sertoli), 레이딕 (leydig) 세포가 혼재되어 증식되고 있었으며 서로가 뚜렷하게 구분되었다. 그리고 정소세관의 형태를 유지하고 있는 배양군에서는 세포가 증식되는 것을 현미경을 통하여 실시간으로 관찰할 수 있었다. 성세포 특이마커와 체세포 특이마커를 이용하여 형광면역항체법을 실시한 결과 성세포 특이마커의 발현 비율이 배양을 진행하면 할수록 증가하는 것을 알 수 있었으며, 성세포의 외부 쪽으로 체세포 특이마커가 진하게 반응하는 것을 알 수 있었다 (Figure 9-D). 그런데 외부로 싸고 있는 모양을 보니 꼭 신경세포처럼 성세포의 주위를 둘러있는 것을 볼 때 이러한 세포들이 niche의 역할을 담당하기 위하여 모양이 변화하고 있고, 이러한 형태적 변화는 성세포 또는 줄기세포에 증식인자나 분화유도 인자를 공급하는 역할을 하는 것으로 생각된다. 녹색형광은 성세포 특이 마커이고 붉은색은 체세포 특이 마커의 색인데 서로 감싸고 있는 형태를 보여주고 있으며 일부는 공유하면서 형광빛 파란색을 띠고 있는 것으로 볼 때 체세포와 성세포 또는 줄기세포가 서로 밀접하게 관련성을 맺으면서 특정 인자를 공유 또는 서로에게 제공하는 것을 알 수 있었다 (Figure 9-F).

## 7. Busulfan 가온법을 이용한 수용체 닭 불임 유도

수용체 닭의 불임을 유도하기 위하여 busulfan 가온법을 이용하였다. 먼저 기존의 방법을 본 연구에 맞게 변형하여 성성숙이 되기 2개월 전, 닭의 경우에는 4개월령 닭의 근육 내에 주입하였다. 배발달 단계에서의 busulfan의 성세포의 효과에서 중요한 포인트는 가온방법으로 적절한 온도로 주입직전까지 온도를 유지시키는 방법이다. 본 연구에서도 여러 조건에 따라 가온 방법을 사용하여 각 온도별 효과를 검증하였는데 정소 내 성세포를 주입하기 위하여 busulfan 처리한 후 외과적 방법에 의한 정소 변화 및 busulfan 가온 주입 형태에 따른 불임효율을 나타냈다. Busulfan 처리 후에 정소의 모양이 축소된 것을 확인할 수 있었고, busulfan 처리시 가온 정도에 따른 불임효율을 측정한 결과, busulfan 41 °C에서 가장 이상적인 불임을 유도하는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 10).

본 연구에서는 주입직전까지 온도를 유지하도록 waterbath와 온도가 고정된 hotplate를 준비하여 1-2초 이내에 각 닭의 근육에 주입하도록 하여 일정한 농도가 주입되도록 한 결과 통계적으로 유의한 결과를 얻을 수 있었다 ( $P < 0.05$ ).

실험구를 정하고 앞 연구 결과에 따라 41 °C에서 가온한 busulfan을 4주령부터 시작하여 16주령까지 2주 간격으로 주입하여 성성숙 이후에 불임효율을 측정하여 가장 이상적인 불임효율을 얻을 수 있는 닭의 주령을 알아보려고 하였다. 너무 어린 주령의 경우에는 4주, 6주까지는 약 40 % 정도에서 불임을 유도하는 것을 알 수 있었다. 그러나 8주부터는 10주의 경우만 빼고 평균 70 % 이상 불임율을 보이는 것으로 보아 결과가 유의적으로 나오는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 11). 그러므로 향후 평을 이용한 세포 주입은 8주령의 수용체 닭을 사용할 경우 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다 ( $P < 0.05$ ). 이 연구 결과를 좀 더 확인하기 위하여 실험이 끝난 닭의 성세포의 회복을 측정을 통하여 앞으로 주입될 평의 성세포와의 상호작용을 미리 확인할 수 있었는데, 결과적으로 8주 이후의 성세포의 경우는 5 % 이내로 회복하는 것을 관찰하였다 (Figure 12). 만일 평 세포가 보다 정상적으로 안착한다면 매우 높은 효율의 키메라 만드는 데에는 문제가 없을 것으로 생각된다.

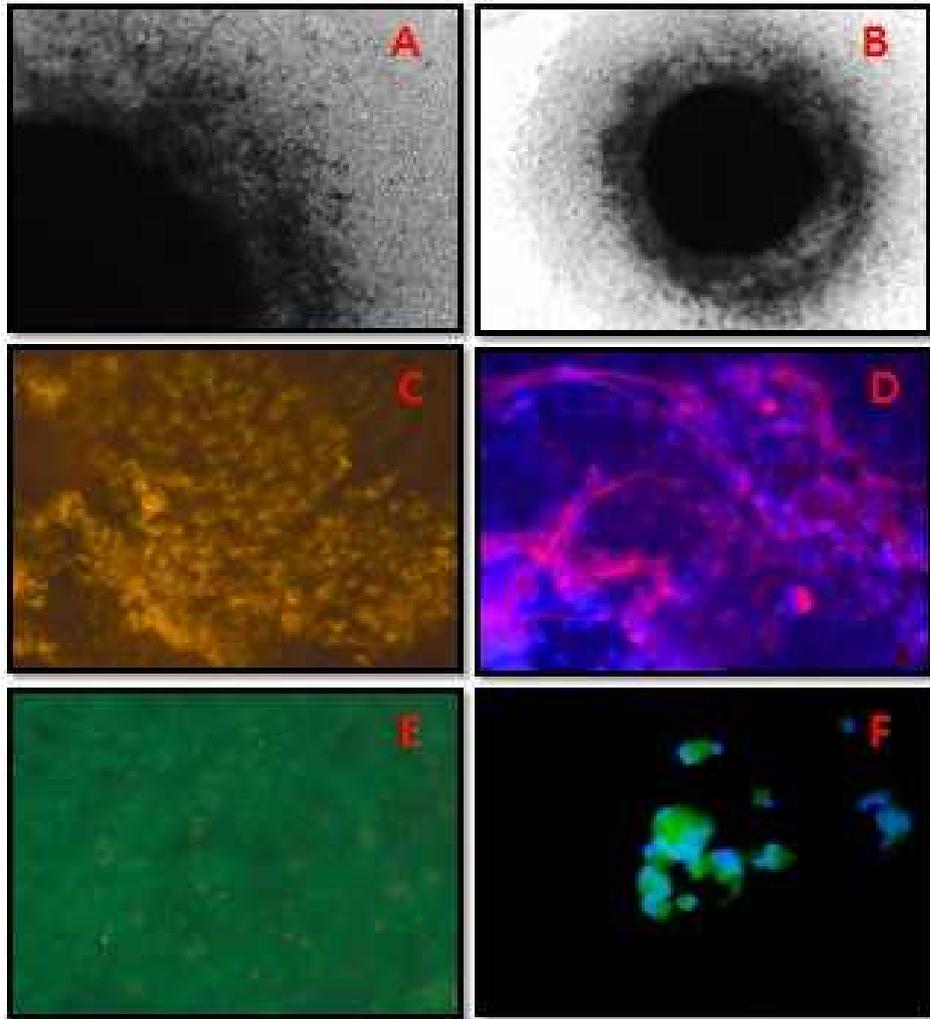


Figure 9. Methodological approach for 3D culture. (A) The cultured cells of the testes, (B) Spermatogonial stem cells colony, (C, D) Real-time observation of the interaction between sex cells and somatic cells in microtubule, (E, F) Fluorescence staining indicating the interaction between spermatogonium and somatic cell.

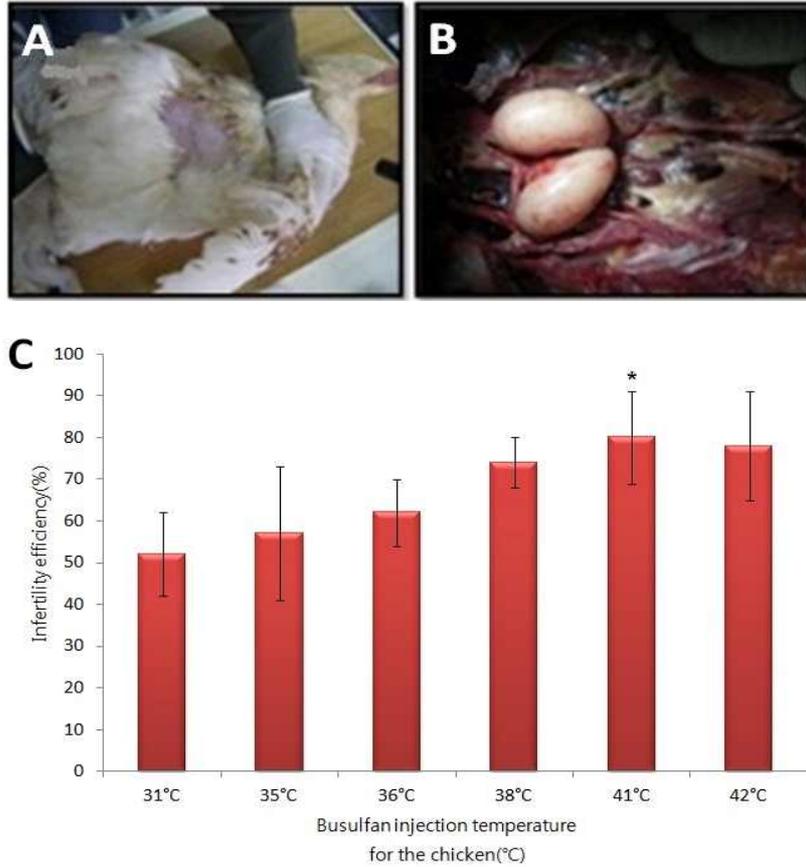


Figure 10. Infertility efficiency with morphological changes in testis by surgical method and heat activated busulfan injection after busulfan treatment. (A) Surgical technique that applies a surgical testicular injection method, (B) Small size of testis after busulfan treatment, and (C) Infertility efficiency in accordance with degree of heat activated busulfan injection. Data are reported as mean  $\pm$  SD. \* Significance at  $P < 0.05$ .

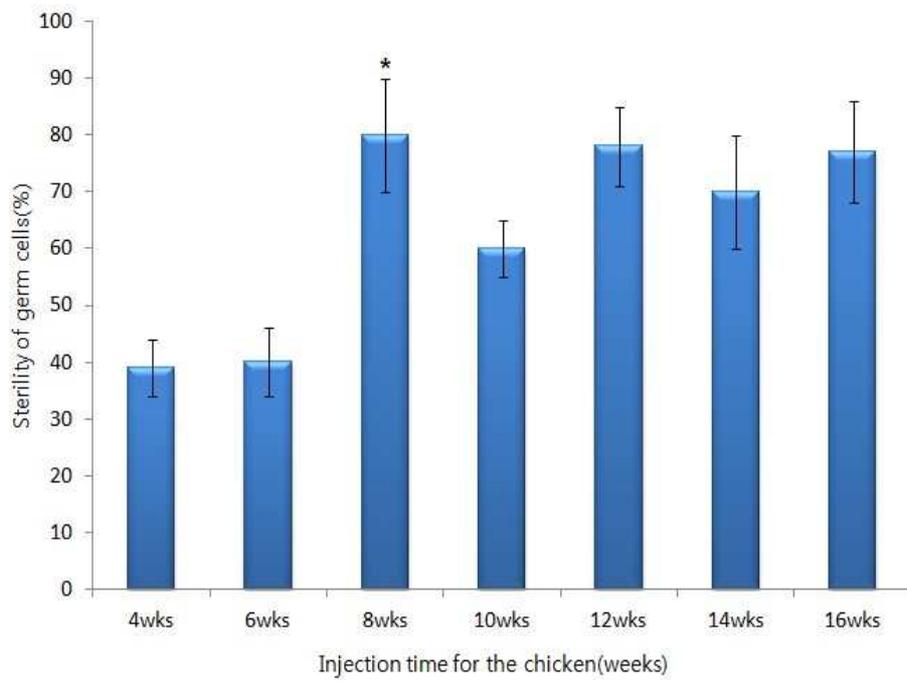


Figure 11. Effect of busulfan on chicken infertility efficiency with the increase of sexual age. Data are reported as mean  $\pm$  SD. \* Significance at  $P < 0.05$ .

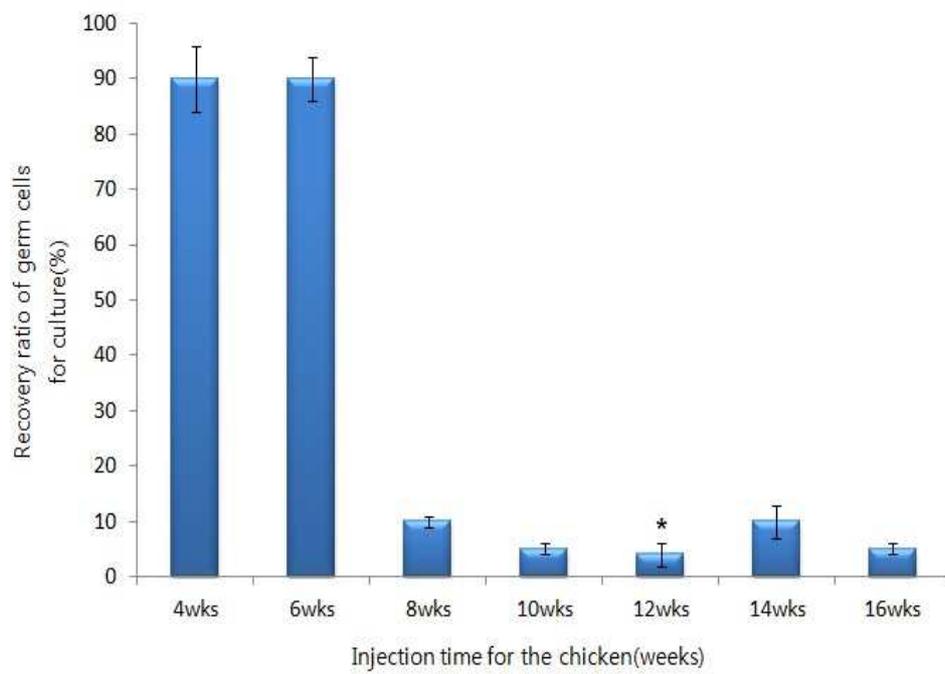


Figure 12. Recovery percentage of sex cells after busulfan treatment through culture. Data are reported as mean  $\pm$  SD. \* Significance at  $P < 0.05$ .

## 8. 3D 체내 이식 후 세포 발달

Honaramooz 등 (2002b)이 성세포가 포함된 정소 조각을 nude 마우스에 이식하여 정소 발달 여부를 측정하는 방법을 이용하여 썩 정소세포의 3D 배양을 실시하였다. 정소 조각을 이식하여 2개월 후 측정하는 결과 정원줄기세포가 생존하여 세포 배양과 증식이 가능한 상태임을 확인할 수 있었다 (Figure 13).

3D 배양절편 이식에 의한 분화유도 기술은 지난 결과 (Figure 9-B)를 토대로 썩 정소 내 성세포의 변화 양상을 확인하고자 하였다. 썩의 정소조각 3D 배양 후 빠져나온 세포로부터 형성된 콜로니를 관찰할 수 있었으며 결과적으로 초기 1주일간은 유사한 증식 형태를 보이다가 콜로니가 형성되는 일부 세포가 정소 조각으로부터 빠져 나와 배양됨을 확인하였다 (Figure 14). 그리고 이 콜로니를 Oct4 antibody를 이용하여 검색해 본 결과 줄기세포 특징이 나타나고 있음을 확인하였다 (data not shown).

또한 썩의 정원줄기세포를 직접 배자에 이식하여 닭의 초기배자 내에서의 절편 발달 유무를 측정하였다. 배자에 주입하기 전에 PKH-26 염색한 후 닭의 배자내에 미세 바늘을 이용하여 실제 현미경하에서 주입한 후 배발달 단계에서의 썩 정원 줄기세포의 분포 및 발달 양상을 관찰하였다. 공여체인 썩의 성세포의 주입량에 따라 전체 세포군에서 공여체 세포의 비율이 증가함을 확인할 수 있었으며 생각했던 것보다 전체 세포 중 썩 세포의 분포가 높다는 것을 알 수 있었다 (Figure 15). Figure 16은 Figure 15에서 도출된 결과를 토대로 전체 100 세포당 PKH-26 세포를 정량한 결과이며 현재 매우 높은 불임율과 함께 이식한 공여체 세포의 증식 가능성이 높아지고 있는 것을 확인할 수 있었다 ( $P < 0.05$ ). 그러나 주입한 세포가 수용체 정소에 비하여 적을 경우 면적당 차지하는 분화와 분열의 기능적 차이가 날 수도 있을 것으로 생각된다.

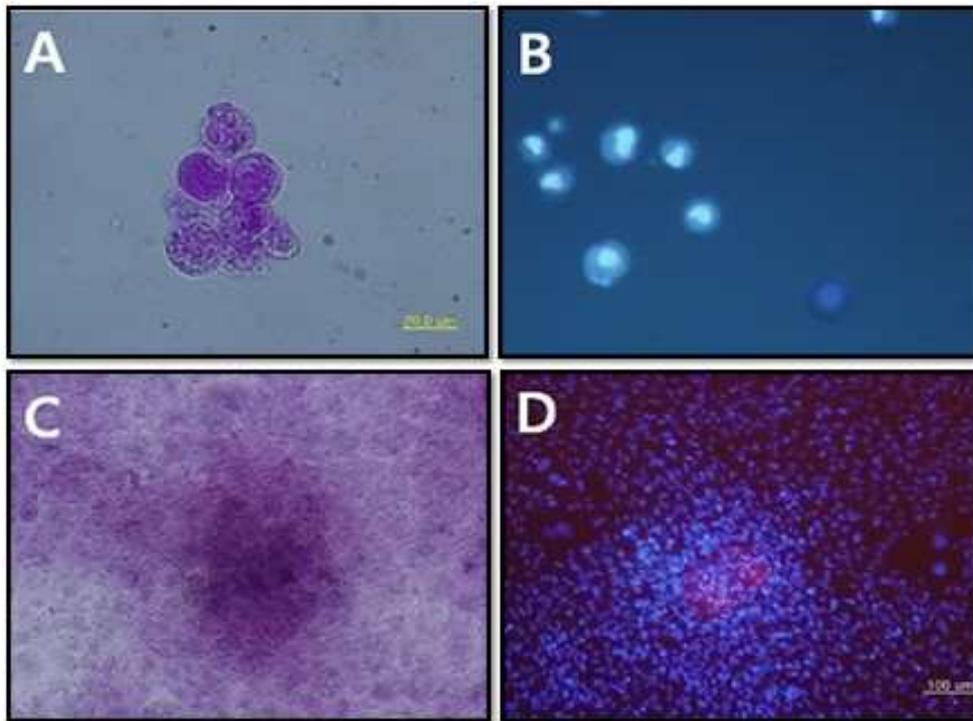


Figure 13. Collection of cell culture of the testes after testis transplantation. (A) PAS staining patterns by using separated sex cells, (B) Confirmation of cell division is progressing with PI staining (day 4 after culture), (C) Colony forming cells stained with PAS staining, and (D) Confirmation of colony forming sex cells around the center of the colony.

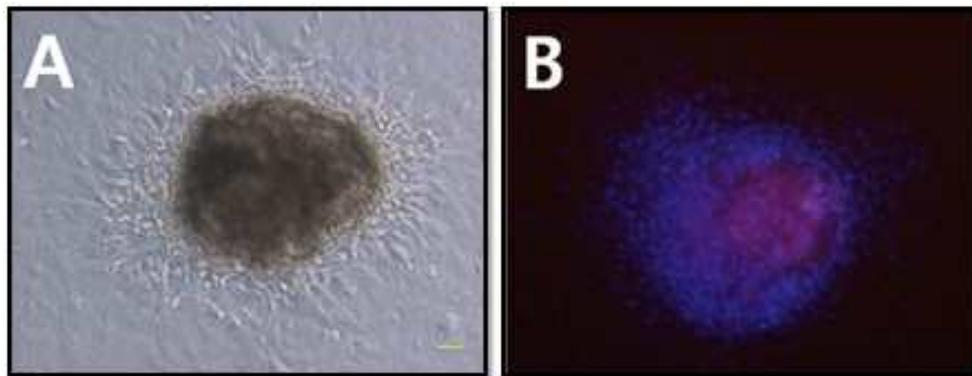


Figure 14. Colony formation of isolated pheasant testicular cells in 3D culture.

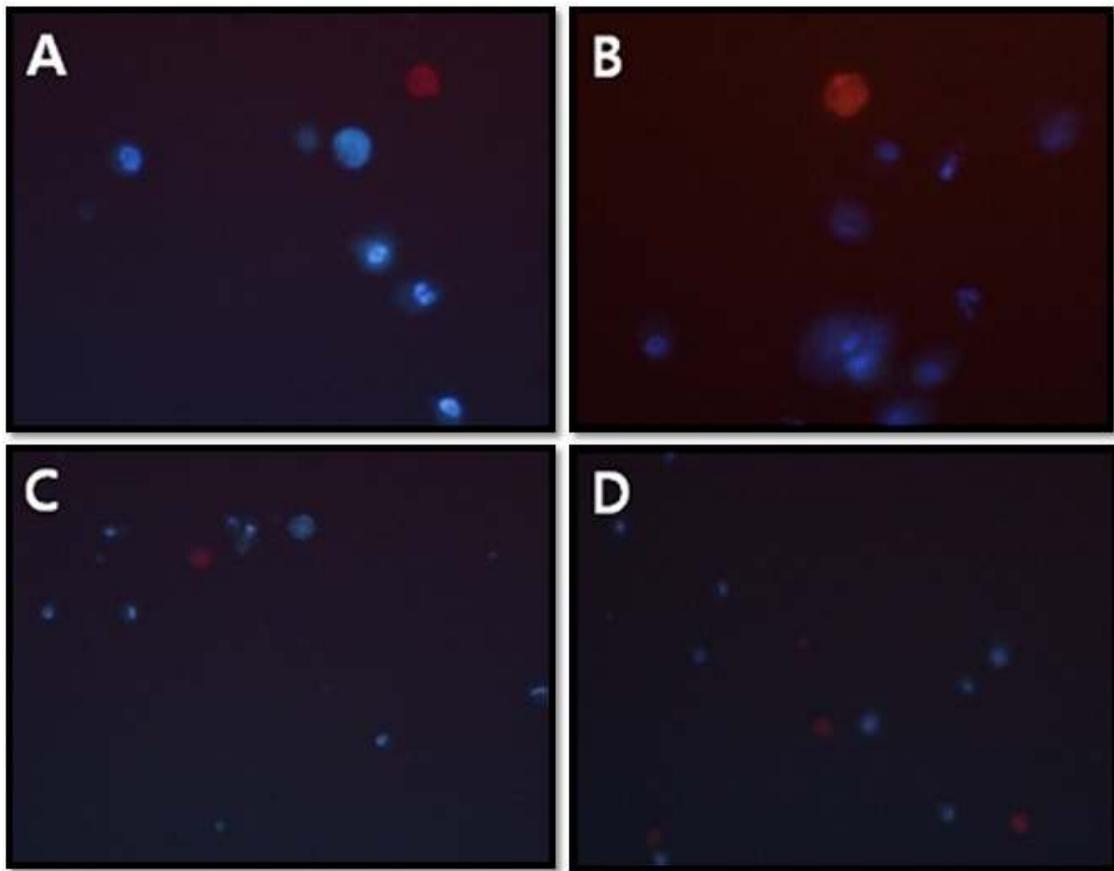


Figure 15. The distribution of pheasant sex cells in the gonads of chick embryo. Injection of 10,000 (A), 20,000 (B), 30,000 (C), and 50,000 (D) pheasant sex cells.

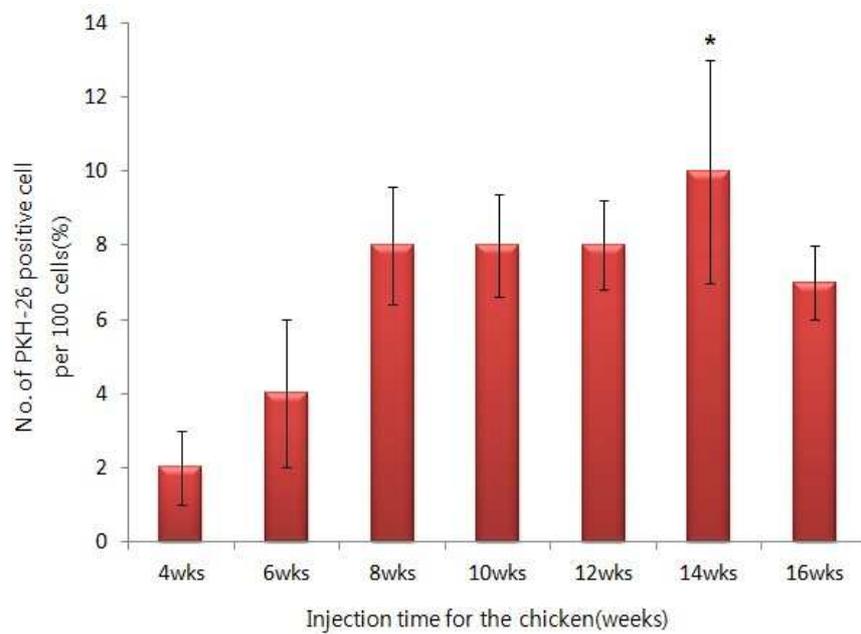
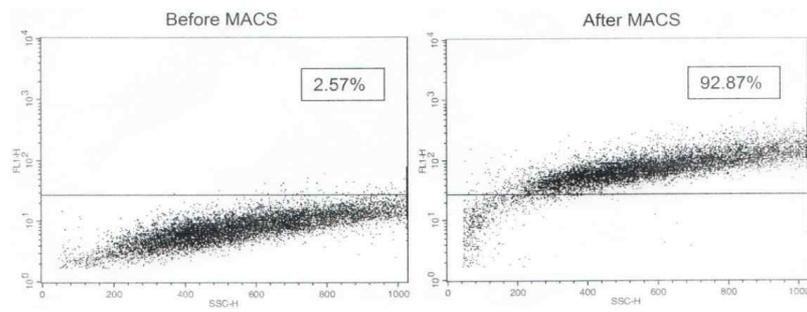


Figure 16. The distribution of sex cells derived from donor in the recipient testis after injection of pheasant spermatogonial stem cells. Data are reported as mean  $\pm$  SD. \* Significance at  $P < 0.05$ .

## 9. 정원줄기세포의 대량 배양을 위한 분리 마커의 검증

대량 배양을 위하여 기존의 닭 정원줄기세포 배양 방식을 이용하여 여러 가지 성장인자를 이용하여 배양을 실시하였으며 이에 대한 결과를 도출하였다. 효율적인 정원줄기세포의 대량 배양을 위하여 사용된 1st antibody (c-kit)를 이용하여 분리한 후 이를 이용하여 세포 배양을 실시하였다. 현재 조류에 적절한 줄기세포 마커가 없는 상태에서 적절한 마커를 이용하여 분리한 후 순수하게 줄기세포 분리는 쉬운 일은 아니다. 그래서 본 연구에서는 일반적인 마커인 c-kit 항체를 이용하여 92.87 %로 분리한 후 이를 이용하여 배양을 실시하여 비분리된 세포와 함께 서로 배양능력을 검증해 본 결과 매우 유의적인 차이를 볼 수 있었다 (Figure 17). 이 결과를 통하여 c-kit 마커가 평의 정원줄기세포 분리 마커로 사용할 수 있는 가능성을 확인하였다.

A



B

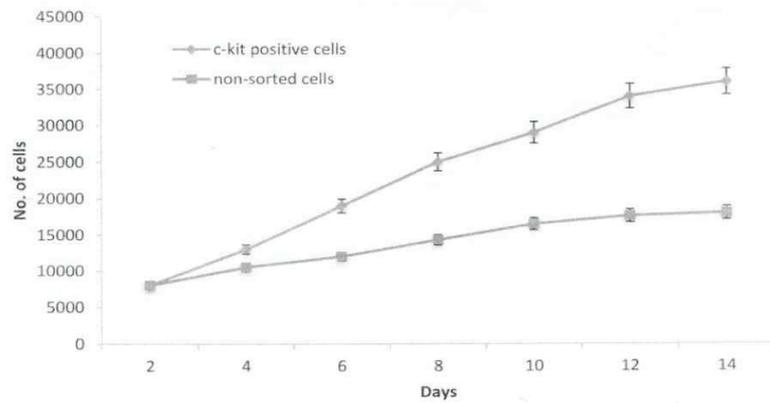


Figure 17. Ratio and growth features of c-kit<sup>+</sup> cells in pheasant spermatogonial stem cells. (A) The ratio of c-kit marker through flow cytometric analysis, and (B) Growth curve after MACS separation.

## 10. 배자내 주입을 통한 키메라 생산

본 연구에서는 배자내 주입을 통한 키메라의 생산을 시도하였고, 성체 핑의 정원줄기세포를 2.5일령 닭 배자에 주입하여 일령별 생존율을 측정하였다. 처음 총 354개를 주입했는데 초기에 높은 생존율을 보여주었지만 19일령 배자에서는 24개가 약하게 (혈관 생성으로 판단) 생존해 있다가 결국에는 6마의 병아리만 생성되었다 (Table 2).

배 발생률은 낮았지만 초기 생존율이 그리 낮지 않아서 공여세포인 핑의 성세포에 PKH-26으로 염색을 하여 미세주입 한 후 원시생식기로 이동하는 공여체 성세포의 비율을 측정하였다. 핑으로부터 성세포를 분리한 후 PKH-26으로 염색하여 닭의 배자에 주입한 후 공여 성세포의 분포를 분석하였다. 그 결과, 30 %의 수용체 닭의 gonad에서 공여체 세포를 관찰할 수 있었고, 이 결과로 안정적인 이식기술이 확립되었음을 확인할 수 있었으나 전체 gonad 세포내 차지하는 비율은 5.3 %로 낮은 것을 확인하였다 (Table 3).

실제 공여체 성세포 중 정원줄기세포를 분리 배양한 결과를 토대로 효율 높은 키메라 생산 및 멸종 위기 조류의 보존을 위하여 진행된 실험으로 공여체 세포 비율은 낮았지만 줄기세포 비율이 높으면 효율적인 키메라를 생산할 수 있다고 판단하여 미분화 줄기세포의 분포를 분석하였다. 이식한 성세포 중에서 PKH-26 세포를 분리하였으며 이 세포 중에서 줄기세포 분포를 확인하기 위해 FACS 방법을 통하여 줄기세포능을 지니고 있는 핑세포의 분포를 분석하였다 (Figure 18). 그 결과, 약 9.48 %의 비율로 c-kit/CD117 양성 세포가 분석되었고, 높은 비율로 안정적으로 수용체 닭의 gonad에 정착되어 있음을 확인할 수 있었다.

Table 2. The incidence of the chick embryos according to injection of pheasant sex cells.

No. of germ cell injection <sup>a</sup>	No. of viable embryo <sup>b</sup>				No. of hatched chick <sup>c</sup>
	Day 0	Day 5	Day 10	Day 19	
354	312	145	66	24	6

<sup>a</sup> Number of germ cell injections given in the chick embryo.

<sup>b</sup> Number of viable embryos at different days from the day of injection.

<sup>c</sup> Total number of hatched chick at the end of experiment.

Table 3. Relative share of donor sex cells in the chick embryos with reference to the injection of pheasant sex cells.

No. of recipient gonad <sup>a</sup>	No. of PKH26 positive gonad <sup>b</sup>	PKH26 positive gonad (%) <sup>c</sup>	PKH26 positive cells (%) <sup>d</sup>
20	6	30	5.3

<sup>a</sup> Number of recipient gonad.

<sup>b</sup> Number of PKH26 positive gonad.

<sup>c</sup> Percentage of PKH26 positive gonad.

<sup>d</sup> Percentage of PKH26 positive cells in the total gonadal cells.

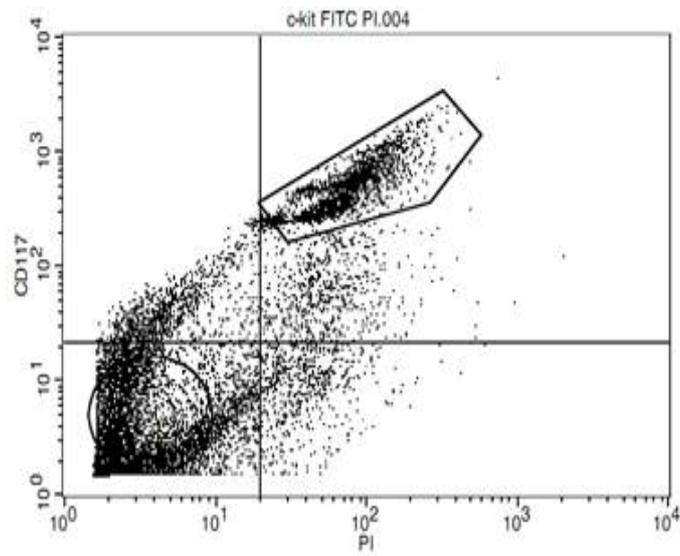
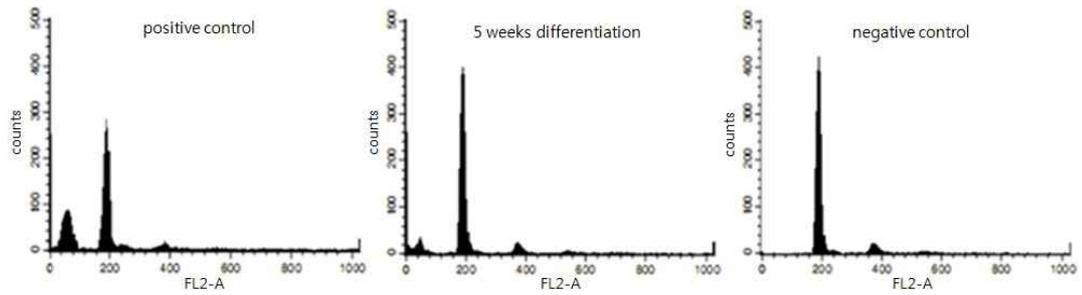


Figure 18. The proportion of stem cells distributed in the donor PKH-26 cells.

## 11. 유세포 분석을 통한 썩 정원줄기세포의 분화능 검정

유세포 분석은 핵 DNA 함량에 따른 생식세포 집단을 분화하기 위해 실시하였다. 배양을 통하여 썩 정원줄기세포의 분화능을 측정한 결과 분화된 상태의 정모세포를 관찰할 수 있었다 (Figure 19). DNA 함량의 분석에서 5주 후의 결과가 DNA 양에 변화가 있음을 알 수 있고 항체를 통하여 분석한 결과 콜로니의 일부 세포는 분화가 진행되었음을 보여주고 있다.

A



B

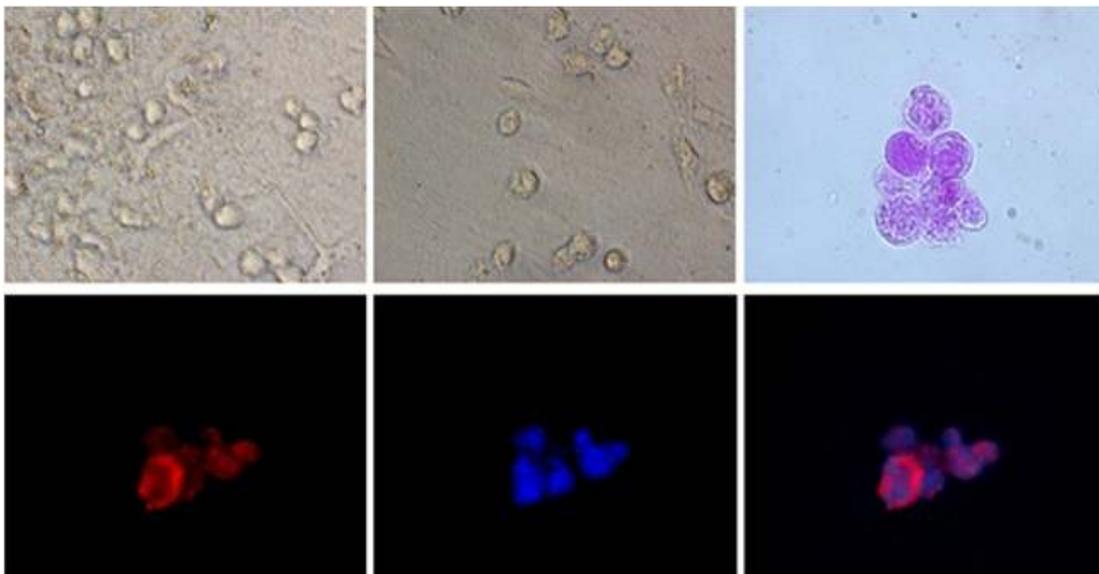


Figure 19. The verification of differentiation potency after culturing pheasant spermatogonial stem cells. (A) FACS analysis-DNA contents analysis, and (B) The immune response with spermatogonia specific marker.

## V. 고 찰

본 연구에서는 멸종조류 연구의 동물모델로서 유용성이 기대되는 꿩을 대상으로 실험을 진행하였다. 포유류에 비해 조류의 장점은 첫째, 성숙속 기간과 시대간격이 짧고, 둘째, 보다 더 빠르게 증식하여 형질전환 계통을 확보할 수 있으며, 셋째, 포유류보다 적은 노력과 적은 비용으로 많은 개체를 동시에 실험할 수 있다는 장점이 있다 (Naito 등, 1994a; Vick 등, 1993). 그러나 꿩은 야생성이 높아서 계절 번식하는 개체로서 정소의 크기가 계절에 따라 변하는 특징을 가지고 있어 성공적인 실험을 위해 이를 보정하고 효과적으로 응용하는 기술이 필요하며 계절적 변화에 따른 정소의 크기 변화가 배양 중에 변화하는 세포의 평균크기와 연관성이 있는지에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

정원줄기세포의 체외배양을 위해서는 채취해 온 정소로부터 순수도 높은 정원줄기세포를 회수하는 것이 중요하다. 본 연구에서는 꿩 정원줄기세포를 회수하기 위해 collagenase, hyaluronidase와 trypsin을 복합 처리하였고 효율적으로 꿩 정소로부터 정원줄기세포를 포함하는 단일세포군을 회수하였다.

정원줄기세포의 순수도 증진을 위한 연구는 세포 표면에서 발현되는 특이적 단백질에 대한 항체를 이용한 분리법 (Kubota 등, 2003; Ryu 등, 2004; Ryu 등, 2005), 세포외 기질물질 (extracellular matrix)을 이용한 분리법 (Shinohara 등, 1999; Orwig 등, 2002) 등이 사용되어지고 있고, 이들 분리법을 통해 순수도가 증진된 정원줄기세포는 체외 배양조건 확립을 위한 연구에 폭넓게 이용되고 있다. 최근 몇 년 동안 정원줄기세포의 체외적 분리 및 배양 연구는 생물학 분야에서 큰 주목을 받고 있다 (Nagano 등, 1998; Nagano 등, 2000, 2003; Moore 등, 2002; Orwig 등, 2002; Kubota 등, 2004a,b; Kanatsu-shinohara 등, 2005; Hamra 등, 2005; Guan 등, 2006). 이들 세포는 수여동물의 정소로 이식되어 유전적 형질전환이 이뤄진 동물을 계속적으로 생산할 수 있다 (Nagano 등, 2001; Kanatsu-shinogara 등, 2004, 2005, 2006). 정원줄기세포는 웅성에 존재하는 모든 성체줄기세포 중 유일하게 다음 세대까지 유전적 정보를 전달할 수 있는 매우 중요한 줄기세포로서

상당한 기간 동안 배양을 유지할 수 있으며 오늘날 많은 종의 정원세포에 대한 배양 체계가 보고 되어있다. 정원줄기세포의 체외 배양연구는 줄기세포의 기작 연구, 유전자 적중/적중 삽입 및 클론 생성 연구에 기반이 될 수 있는 매우 가치 있는 연구이며 성공적인 체외 배양을 위해서는 배양환경 (배양액, 공배양세포, 성장인자 그리고 대기조건 등)의 적절한 선택이 필요하다.

Nagano 등 (2003)은 성숙, 미성숙 쥐 정원줄기세포의 *in vitro* 환경 효과를 검증하기 위해 7일 배양 연구를 실시하였고 공배양 세포, 배양액, 성장인자가 정원줄기세포의 성장 및 분화에 주는 영향을 보여주었고, 최근 보고된 생쥐 정원줄기세포의 장기간 배양 성공연구 역시 배양 환경의 중요성을 잘 보여주고 있다 (Kanatsu-shinohara 등, 2003). 한층 효과적인 분화를 위해서 정원줄기세포를 세르톨리 (sertoli) 세포와 공동 배양하기도 하였는데 이러한 공동 배양은 체세포 지지세포가 생식줄기세포의 자가 재생산을 억제하고 분화를 촉진한다는 것을 보여주고 있다. 정원줄기세포의 증식과 분화 억제를 위해 STO 기저 세포와 함께 공동 배양하는 것도 효과적이는데 본 연구에서도 STO 기저세포와 썩의 체세포 공배양 방법에 의하여 세포가 증식됨을 확인하였다 (Figure 5).

그러나 현재 정원줄기세포를 효과적으로 체외에서 분리하여 증식시킬 수 있는 방법이 명확하게 제시되어 있지 않은 상황인데, 그 가장 큰 원인은 생식선줄기세포의 특정 마커와 체외배양 조건들에 대한 정보 부족 때문이라고 생각된다. 특히, 정원줄기세포는 성체 쥐의 경우 정소 내 3,333개 세포당 1개 (Tegelenbosch 와 de Rooij, 1993), 성체 랫트에서는 정소 내 500개 세포당 1개로써 매우 소수로 존재하는 것으로 알려져 있다 (Huckins, 1971; Orwig 등, 2002). 따라서 정소 내 수많은 타입의 세포로부터 순수도가 높은 정원줄기세포군을 확보하고 성공적인 배양시스템을 확립하기 위한 이들 줄기세포의 생물학적, 분자적 연구 진행이 시급하다.

일반적인 세포주 확립은 안정적으로 100회 정도의 계대배양에도 세포 사멸이나 괴사 없이 세포가 증식되고 염색체 변형이 없으며, 분화실험을 진행할 경우 안정적으로 분화되는 상태를 말한다. 멸종조류 복원을 위해서는 정원줄기세포주를 확립할 필요가 있고, 본 연구에서는 정원줄기세포주를 확립하기 위한 계대배양을 진행하였으며 세포주 형성에는 긍정적인 방향으로 배양이 진행됨을 확인하였다 (Figure 7).

멸종조류 복원을 위해서 현재 멸종위험이 적은 근연관계가 가까운 조류 또는 닭을 이용하여 수용체 시스템을 완비하여야 한다. 꿩의 경우에는 계절번식을 하는 조류이기 때문에 연중 응용 가능한 시스템을 만들기 위해서 먼저 수용체 닭의 정소를 불임으로 유도하는 시스템을 구축해야 한다. Tagirov와 Golovan (2012)은 정소 내의 성세포를 불임닭으로 만들기 위하여 busulfan을 이용하였다. 그런데 대부분의 busulfan 연구 결과에서 보듯이 busulfan 응고가 너무 쉽게 일어나서 이를 해결하기 위해서는 여러 가지 조건 중 DMSO와 온도가 매우 중요하고, 또한 불임을 유도하기 위한 수용체 동물의 주령 또한 매우 중요한 포인트이다.

본 연구에서는 생식선 키메라 생산효율을 높이기 위한 방법으로 busulfan 가온법을 이용하였고, 여러 조건에 따라 가온 방법을 사용하여 각 온도별 효과를 검증하였다. 가장 이상적인 불임 효율을 위해 최적의 조건을 확립할 필요가 있다고 생각했으며 만족스러운 결과를 얻을 수 있었다. 먼저 41 °C에서 가온한 busulfan을 4주령부터 16주령까지 2주 간격으로 주입한 다음 성성숙 이후에 불임 효율을 측정할 결과 어린 주령의 경우 4주, 6주까지는 약 40 % 정도에서 불임을 유도하였고, 8주부터는 10주의 경우만 빼고 평균 70 % 이상 불임율을 보이는 것으로 보아 높은 효율의 키메라의 생산이 가능할 것으로 생각된다 (Figure 11). 그러나 지금까지 일부 연구를 제외하고 대부분의 경우 키메라 닭의 효율은 매우 낮다. 최근 Naito 등 (1994b)은 일부 개체에서 98 %의 효율을 보인 것을 제외하면 Park 등 (2003)은 가장 좋은 효율일 경우가 50 % 이상을 얻지 못하였고, 이 결과도 또한 일부 개체에서만 나타나고 있다.

따라서 본 연구에서 꿩 세포가 보다 정상적으로 안착한다면 매우 높은 효율의 키메라 만드는 데에는 문제가 없을 것으로 생각된다. 꿩의 정원줄기세포가 불임 닭에 주입될 경우에 전제조건이 내재되어있는 닭의 정원줄기세포와의 상호작용이 매우 중요한 요인이다. 만일, 닭의 정원줄기세포가 이미 정소 내에서 우점하고 있을 경우에는 꿩의 정원줄기세포의 경우에는 기능적으로 활성을 보이지 않고 단순 키메라로 정자 생성 메커니즘이 작동하지 않을 것으로 생각된다. 이전 많은 이중간 키메라 닭 연구에서 보듯이 제어가 안 되는 키메라의 경우 실패한 판정으로 보고 있는데, 본 연구 결과를 토대로 개선된 방법을 이용하면 효율적인 키메라 생산이 가능할 것으로 사료된다.

또한 평 성세포의 닭 배자내의 안정적 정착을 위한 실험을 수행한 결과, 예상과는 달리 안정적으로 정착할 수 있는 가능성을 보여 주었다. 타 연구 결과와 큰 차이는 없지만 유사하게 정착하는 것으로 보아 기술적인 문제는 해결되었으며 만일 안정적인 공급 체계만 갖추어 진다면 이종간 생식세포 이식은 야생조류생산을 위해 사용가능하며 앞으로 멸종 위기 조류의 보존을 위해 적용 가능할 것이다.

## VI. 요약

동물은 종마다 특이적인 생리적 또는 유전적 특징을 가지고 있다. 이러한 특징들은 이종간 키메라(chimera)를 활용한 생명과학분야에서 체세포 및 생식세포 분화, 성특이적인 유전자의 발현 분석, 유전자원 보존 등에 폭넓게 활용될 수 있다.

또한 이종간 생식선 키메라의 매우 중요한 가치 중의 하나는 멸종 위기 동물의 복원을 가능하게 한다는 것이다. 포유류에서도 이미 멸종된 동물을 복원하기 위한 연구가 진행되고 있으나 긴 세대기간 때문에 연구에 많은 어려움을 겪고 있다. 조류는 포유류와는 달리 독특한 생식·생리적 특징을 가지고 있으며 포유류에 비해 상대적으로 세대기간이 짧다는 장점이 있다. 꿩은 야생조류로서 야생성이 높고 계절번식을 하지만 개체가 풍부하고 사육이 가능한 조류품종으로 향후 멸종조류 연구의 가장 좋은 실험동물이 될 것으로 사료된다.

본 연구에서는 정원줄기세포를 이용하여 멸종 조류 복원을 위한 기술을 개발하는데 연구 목적이 있으며 멸종 조류 연구의 동물모델로서 유용성이 기대되는 꿩을 대상으로 꿩 정원줄기세포주 확립에 관한 연구를 수행하였다.

먼저 꿩의 정소를 외과적인 방법으로 회수한 후 정원줄기세포를 추출하였고 닭의 정원줄기세포 배양 조건을 이용하여 STO 기저세포와 꿩의 체세포 공배양 조건에 의한 꿩의 정원줄기세포 증식 조건을 확립하였으며, 결과적으로 공배양을 진행한 상태에서 세포가 증식됨을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 세포주 확립을 위한 계대배양을 진행하였으며 지속적인 계대배양을 거치면서 콜로니는 안정적으로 분열과 증식이 진행하여 세포주 형성에는 긍정적인 방향으로 배양이 진행됨을 확인하였다.

다음으로, 꿩 정원줄기세포에서 특이적인 발현이 예상되는 마커들을 검증한 결과 Oct4, Nanog, Thy1, SSEA-1, SSEA-4 등은 사용된 마커에 반응하는 강도가 매우 낮거나 반응하지 않았지만 GFRa1의 마커에는 반응하는 것이 관찰되었다. GFRa1은 GDNF 계열의 단백질로 정원줄기세포의 증식인자와도 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다.

또한 수용체 닭의 정소를 불임으로 유도하기 위하여 실험구를 정하고 41 °C에서 가온한 busulfan을 4주령부터 시작하여 16주령까지 2주 간격으로 주입하여 성성숙 이후에 불임효율을 측정하여 가장 이상적인 불임 효율을 얻을 수 있는 수용체 닭의 조건을 확립하였다. 너무 어린 주령의 경우에는 4주, 6주까지는 약 40 % 정도에서 불임을 유도하였으나 8주부터는 10주의 경우만 빼고 평균 70 % 이상 불임율을 보이는 것으로 보아 결과가 유의적으로 나타났다 ( $P < 0.05$ ). 꺾을 이용한 세포 주입은 8주령의 수용체 닭을 사용할 경우 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다. 이 연구 결과를 좀 더 확인하기 위해 실험이 끝난 닭의 성세포 회복율을 측정하였다. 결과적으로 8주 이후의 성세포의 경우 5 % 이내로 회복하는 것으로 만일 꺾세포가 보다 정상적으로 안착한다면 매우 높은 효율의 키메라를 생산하는 데에는 큰 문제가 없을 것으로 생각된다.

효율적인 정원줄기세포의 대량배양을 위하여 c-kit을 이용하여 92.87 % 분리한 후 세포 배양을 실시하였다. 비분리된 세포와 함께 서로 배양능력을 검증해 본 결과 매우 유의적인 차이를 나타냈고 c-kit 마커가 꺾의 정원줄기세포 분리마커로 사용할 수 있는 가능성을 보여 준 결과라 생각된다.

꺾의 정원줄기세포를 직접 배자에 이식하여 닭의 초기배자 내에서의 절편 발달 유무를 측정하였다. 공여체인 꺾의 성세포의 주입량에 따라 전체 세포군에서 공여체 세포의 비율이 증가함을 확인할 수 있었으며, 전체 세포 중 꺾세포의 분포가 높다는 것을 알 수 있었다.

마지막으로, 꺾의 정원줄기세포를 배자내 이식을 통하여 키메라 생성을 시도하였다. 배 발생율은 낮았지만 초기 생존율이 그리 낮지 않아서 공여세포인 꺾의 성세포에 PKH-26으로 염색을 하여 미세주입한 후 원시생식기로 이동하는 공여체 성세포의 비율을 측정한 결과 30 %의 수용체 닭의 gonad에서 공여체 세포를 관찰할 수 있었다. 그리고 공여체 세포비율은 낮았지만 줄기세포 비율이 높다면 효율적인 키메라를 생산할 수 있다고 생각했다. 이식한 성세포 중에서 줄기세포 분포를 확인하기 위하여 FACS 방법을 통한 줄기세포능을 지니고 있는 꺾 세포의 분포를 분석한 결과 약 9.48 %의 비율로 c-kit/CD117 양성 세포가 분석되었는데 예상했던 것보다 높은 비율로 안정적으로 수용체의 gonad에 정착되어 있음을 확인할 수 있었다.

지금까지의 연구결과를 볼 때 썩과 멸종 위기 조류 정원줄기세포주 및 이를 이용한 증식 기술과 불임유도와 같은 수용체 시스템 구축 및 이식세포의 증식, 생존 능력 향상 기술을 개발한다면 효율적인 조류의 이종간 키메라의 생산 기술 개발이 가능할 것이며 이를 정원줄기세포 응용 멸종 위기 조류를 복원하는데 이용할 수 있을 것이다.

결론적으로 정원줄기세포는 멸종조류의 보존 및 생식선 키메라 생산에 유용한 도구임을 확인하였고 효율적인 조류의 이종간 생식선 키메라의 생산을 위하여 추가적인 연구가 필요하며 안정적인 공급 체계와 시스템이 갖추어 진다면 멸종 조류 복원에도 적용해 볼 수 있다고 생각된다.

## ABSTRACT

Establishment of spermatogonial stem cell line  
in pheasant (*Phasianus colchicus*) for restoration  
of endangered birds

Jeong Hyun Kim

Department of Animal Biotechnology, Graduate School  
Jeju National University, Jeju, Korea

Animals have a genetic physiological characterization which is specific for each species. These features can be widely used for differentiation of germ and somatic cells, expression analysis of genes which are specific for a particular sex, and for the conservation of genetic resources in the life sciences that utilize cross-species chimeras.

In addition, to this inter-species germline chimeras are important as they allow the restoration of endangered species. Studies for restoring mammalian animals is underway, and the major difficulties are because of long generation interval. Birds, unlike mammals, have reproductive and physiological characterization, and have the advantage that the generation interval is relatively shorter as compared to the mammals. Pheasants belong to the group of wild birds which are seasonal breeders. Their population is large and can be breed easily. Therefore it is believed that pheasants will be the best experimental animals for study of endangered birds.

This study was conducted to develop techniques for the restoration of endangered birds using spermatogonial stem cells by interspecies germline chimeras between pheasant (*Phasianus colchicus*) and chicken (*Gallus gallus*). In the current study emphasis has been given on the establishment of spermatogonial stem cell line as an animal model for research.

Isolation of spermatogonial stem cells was performed from the surgically removed testis from pheasant. Growth conditions for pheasant spermatogonial stem cells by co-culturing pheasant STO basal cells and somatic cells using spermatogonial stem cells of chickens were established.

In this study, subculturing was performed for the establishment of cell line. Colony forming cells divided and proliferated stably to the cell lines in the positive direction.

Further, no expression of Oct4, Nanog, Thy1, SSEA-1 and SSEA-4 was observed as of specific expression markers in pheasant spermatogonial stem cells, but GFRa1 expressed significantly. GFRa1 is known to promote proliferation factors of spermatogonial stem cells.

Testis of the recipient were made infertile and 4-16 weeks old chickens were injected busulfan (heated at 41 °C) at 2 weeks intervals. Infertility efficiency of chickens after sexual maturation was measured by generating and establishing most idealized mechanism for infertile chickens. An infertility was induced in 40 % young chickens of 4 or 6 weeks age. Significantly, more than 70 % of sterilizing percentage except only among 8 and 10 weeks of age has been observed ( $P < 0.05$ ). It has been observed that if we use 8 weeks old recipient chickens, we can get good results of cell injection using pheasants.

Similarly, sex cells recovery percentage from the chickens was measured at the end of experiment and 5 % sex cells were recovered after 8 weeks. When pheasant cells are seated correctly, we can generate highly efficient chimeras.

92.87 % of cells using the c-kit, cultured cells for the efficient mass culture of spermatogonial stem cells. The results of culture capability were

significantly different as compared to non-isolated cells and demonstrated the potential of c-kit which marker which can be used as a separation marker of spermatogonial stem cells in pheasants.

Finally, Generation of chimeras has been tried through the transplantation of pheasant spermatogonial stem cells into recipient embryos. Even though embryo survival incidence was low, but initial survival rate was enough. To measure the percentage of donor sex cell moved to gonad after microinjection, staining of sex cells of pheasant with PKH-26 was performed and 30 % donor cells in the gonad of recipient chicken were observed. The distribution of stem cells in the transplanted sex cells were confirmed by FACs analysis. The c-kit/CD117 positive cells were analyzed at a rate of about 9.48 %, and it has been engrafted stably in the gonad of the recipient.

These results suggest that induction of infertility and growth of the transplanted cells are developed when technologies of proliferation using spermatogonial stem cell line of pheasants or endangered birds are adopted. It is possible to develop production technologies of efficient interspecies germline chimeras in avians and also, it could be used to restore the endangered birds.

Therefore, from the current study it is concluded that avian spermatogonial stem cells are highly useful for the conservation of endangered birds and the production of germline chimeras. It is believed that further research is needed for the production of efficient interspecies germline chimeras and if it has stable supplies and systems, we can try to apply for restoring the endangered birds.

## 참고문헌

- Anderson, G. B. 1998. Embryonic stem cells in agricultural species. In: Transgenic Animals in Agriculture (Ed. Murray, J. D., Anderson, G. B., Oberbauer, A. M., McGloughlin, M. M.). CAB Intl, London. pp. 57-66.
- Brinster, R. L. 2002. Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science*. 296(5576), 2174-2176.
- Brinster, R. L., Avarbock, M. R. 1994. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *PNAS*. 91(24), 11303-11307.
- Brinster, R. L., Zimmermann, J. W. 1994. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *PNAS*. 91(24), 11298-11302.
- Cadbury, D. 1997. The feminization of nature: our future at risk. Hamish Hamilton Led, London.
- Chang, I. K., Jeong, D. K., Hong, Y. H., Park, T. S., Moon, Y. K., Ohno, T., Han, J. Y. 1997. Production of germline chimeric chickens by transfer of cultured primordial germ cells. *Cell Biol. Int.* 21(8), 496-499.
- Clouthier, D. E., Avarbock, M. R., Maika, S. D., Hammer, R. E., Brinster, R. L. 1996. Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature*. 381(6581), 418-421.
- Colborn, T., Dumanoski, D., Myers, J. P. 1997. Our stolen future. A Plume/Penguin Book, New York.
- Crawford. 1990. Poultry Breeding and Genetics. Elsevier Pub. Comp. pp. 28-30.

Dobrinski, I., Avarbock, M. R., Brinster, R. L. 1999. Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. *Biol. Reprod.* 61(5), 1331-1339.

Dobrinski, I., Avarbock, M. R., Brinster, R. L. 2000. Germ cell transplantation from large domestic animals into mouse testes. *Mol. Reprod. Dev.* 57(3), 270-279.

Dym, M. 1994. Spermatogonial stem cells of the testis. *PNAS.* 91, 11287-11289.

Furuta, H., Kinoshita, K., Maeda, Y., Fujihara, N. 2001. Restoration of Genetic Resources from Ehime Native Chicken via Transferred Primordial Germ Cells (PGCs). *The Journal of Poultry Science.* 38, 302-307.

Guan, K., Nayernia, K., Maier, L. S., Wagner, S., Dressel, R., Lee, J. H., Nolte, J., Wolf, F., Li, M., Engel, W., Hasenfuss, G. 2006. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature.* 440(7088), 1199-1203.

Hamra, F. K., Chapman, K. M., Nguyen, D. M., Williams-Stephens, A. A., Hammer, R. E., Garbers, D. L. 2005. Self renewal, expansion, and transfection of rat spermatogonial stem cells in culture. *PNAS.* 102(48), 17430-17435.

Han, J. Y., Park, T. S., Hong, Y. H., Jeong, D. K., Kim, J. N., Kim, K. D., Lim, J. M. 2002. Production of germline chimeras by transfer of chicken gonadal primordial germ cells maintained in vitro for an extended period. *Theriogenology.* 58(8), 1531-1539.

Harrison, D. E. 1980. Lifespans of immunohemopoietic stem cell lines. *Pathobiology.* 7, 187-199.

Honaramooz, A., Behboodi, E., Blash, S., Megee, S. O., Dobrinski, I. 2003. Germ cell transplantation in goats. *Mol. Reprod. Dev.* 64(4), 422-428.

Honaramooz, A., Megee, S. O., Dobrinski, I. 2002a. Germ cell transplantation in pigs. *Biol. Reprod.* 66(1), 21-28.

Honaramooz, A., Snedaker, A., Boiani, M., Schöler, H., Dobrinski, I., Schlatt, S. 2002b. Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice. *Nature.* 418(6899), 778-781.

Huckins, C. 1971. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *Anat. Rec.* 169(3), 533-557.

Inada, S., Hattori, M., Fujihara, N. 1999. In vivo gene transfer to chicken via blastodermal cells of early developmental embryos. In: *Animal Cell Technology: Challenge for the 21st century.* Kluwer Academic Pub. pp. 208-213.

Johnsgard, P. A. 1986. *The pheasants of the World.* Oxford: Oxford University Press.

Kanatsu-Shinohara, M., Ikawa, M., Takehashi, M., Ogonuki, N., Miki, H., Inoue, K., Kazuki, Y., Lee, J., Toyokuni, S., Oshimura, M., Ogura, A., Shinohara, T. 2006. Production of knockout mice by random or targeted mutagenesis in spermatogonial stem cells. *PNAS.* 103(21), 8018-8023.

Kanatsu-Shinohara, M., Miki, H., Inoue, K., Ogonuki, N., Toyokuni, S., Ogura, A., Shinohara, T. 2005. Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum- or feeder-free conditions. *Biol. Reprod.* 72(4), 985-991.

Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Miki, H., Ogura, A., Toyokuni, S., Shinohara, T. 2003. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol. Reprod.* 69(2), 612-616.

Kanatsu-Shinohara, M., Ogura, A., Ikegawa, M., Inoue, K., Ogonuki, N., Tashiro, K., Toyokuni, S., Honjo, T., Shinohara, T. 2002. Adenovirus-mediated gene delivery and in vitro microinsemination produce offspring from infertile male mice. *PNAS.* 99(3), 1383-1388.

Kanatsu-Shinohara, M., Toyokuni, S., Shinohara, T. 2004. CD9 is a surface marker on mouse and rat male germline stem cells. *Biol. Reprod.* 70(1), 70-75.

Kang, S. J., Choi, J. W., Kim, S. Y., Park, K. J., Kim, T. M., Lee, Y. M., Kim, H., Lim, J. M., Han, J. Y. 2008. Reproduction of Wild Birds via Interspecies Germ Cell Transplantation. *Biol. Reprod.* 79(5), 931-937.

Kang, S. J., Choi, J. W., Park, K. J., Lee, Y. M., Kim, T. M., Sohn, S. H., Lim, J. M., Han, J. Y. 2009. Development of a pheasant interspecies primordial germ cell transfer to chicken embryo: Effect of donor cell sex on chimeric semen production. *Theriogenology.* 72, 519-527.

Kswabata, H. 1998. Challenging zoo in America. *Scias.* 46, 36-41.

Kubota, H., Avarbock, M. R., Brinster, R. L. 2003. Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotype and functional characteristics with other stem cell. *PNAS.* 100(11), 6487-6492.

Kubota, H., Avarbock, M. R., Brinster, R. L. 2004a. Culture conditions and

single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.* 71(3), 722-731.

Kubota, H., Avarbock, M. R., Brinster, R. L. 2004b. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *PNAS.* 101(47), 16489-16494.

Lee, Y. M., Jung, J. G., Kim, J. N., Park, T. S., Kim, T. M., Shin, S. S., Kang, D. K., Lim, J. M., Han, J. Y. 2006. A testis-mediated germline chimera production based on transfer of chicken testicular cells directly into heterologous testes. *Biol. Reprod.* 75(3), 380-386.

Li, Z. D., Deng, H., Liu, C. H., Song, Y. H., Sha, J., Wang, N., Wei, H. 2002. Production of duck-chicken chimeras by transferring early blastodermal cells. *Poult. Sci.* 81(9), 1360-1364.

Long, M. E. 1998. The vanishing prairie dog. *National Geographic magazine.* 193(4), 116-130.

McLaren, A. 2003. Primordial germ cells in the mouse. *Dev. Biol.* 262(1), 1-15.

Meistrich, M., van Beek, E. A. B. 1993. Cell and molecular biology of the testis. Oxford Univ Press. pp. 266-295.

Moore, T. J., de Boer-Brouwer, M., van Dissel-Emiliani, F. M. F. 2002. Purified gonocytes from the neonatal rat form foci of proliferating germ cells in vitro. *Endocrinology.* 143(8), 3171-3174.

- Nagano, M., Avarbock, M. R., Leonida, E. B., Brinster, C. J., Brinster, R. L. 1998. Culture of mouse spermatogonial stem cells. *Tissue Cell*. 30(4), 389-397.
- Nagano, M., McCarrey, J. R., Brinster, R. L. 2001. Primate spermatogonial stem cells colonize mouse testes. 64(5), 1409-1416.
- Nagano, M., Patrizio, P., Brinster, R. L. 2002. Long-term survival of human spermatogonial stem cells in mouse testes. *Fertil. Steril*. 78(6), 1225-1233.
- Nagano, M., Ryu, B. Y., Brinster, C. J., Avarbock, M. R., Brinster, R. L. 2003. Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. *Biol. Reprod*. 68(6), 2207-2214.
- Nagano, M., Shinohara, T., Avarbock, M. R., Brinster, R. L. 2000. Retrovirus-mediated gene delivery into male germ line stem cells. *FEBS Letters*. 475(1), 7-10.
- Naito, M., Sasaki, E., Ohtaki, M., Sakurai, M. 1994a. Introduction of exogenous DNA into somatic and germ cells of chickens by microinjection into the germinal disc of fertilized ova. *Mol. Reprod. Dev*. 37(2), 167-171.
- Naito, M., Tajima, A., Yasuda, Y., Kuwana, T. 1994b. Production of germline chimeric chickens, with high transmission rate of donor-derived gametes, produced by transfer of primordial germ cells. *Mol. Reprod. Dev*. 39(2), 153-161.
- Nakamura, M., Kuwana, Y., Miyamama, Y., Fujimoto, T. 1988. Extragonadal distribution of primordial germ cells in the early chick embryo. *Anat. Rec*. 222(1), 90-94.

Nakamura, M., Yoshinaga, K., Fujimoto, T. 1992. Histochemical identification and behavior of quail primordial germ cells injected into chick embryos by the intravascular route. *J. Exp. Zool.* 261(4), 479-483.

Oatley, J. M., de Avila, D. M., McLean, D. J., Griswold, M. D., Reeves, J. J. 2002. Transplantation of bovine germinal cells into mouse testes. *J. Anim. Sci.* 80(7), 1925-1931.

Olive, V., Cuzin, F. 2005. The spermatogonial stem cell: from basic knowledge to transgenic technology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37(2), 246-250.

Ono, T., Machida, Y. 1999. Immunomagnetic purification of viable primordial germ cells of Japanese quail (*Coturnixjaponica*). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 122(2), 255-259.

Ono, T., Yokoi, R., Aoyama, H. 1996. Transfer of male or female primordial germ cells of quail into chick embryonic gonads. *Exp. Anim.* 45(4), 347-352.

Orwig, K. E., Avarbock, M. R., Brinster, R. L. 2002a. Retrovirus-mediated modification of male germline stem cells in rats. *Biol. Reprod.* 67(3), 874-879.

Orwig, K. E., Shinohara, T., Avarbock, M. R., Brinster, R. L. 2002b. Functional analysis of stem cells in the adult rat testis. *Biol. Reprod.* 66(4), 944-949.

Park, J. K., Kim, T. M., Lee, H. C., Jang, H. J., Song, G. H., Han, J. Y. 2010. Effects of Gamma-Irradiation on the Sterilization of Primordial Germ Cells in Quail. *Korean J. Poult. Sci.* 37(2), 139-143.

Park, T. S., Jeong, D. K., Kim, J. N., Song, G. H., Hong, Y. H., Lim, J. M., Han, J. Y. 2003. Improved germline transmission in chicken chimeras produced by transplantation of gonadal primordial germ cells into recipient embryos. *Biol. Reprod.* 68(5), 1657-1662.

Pereira, R. J., Napolitano, A., Garcia-Pereira, F. L., Baldo, C. F., Suhr, S. T., King, L. E., Cibelli, J. B., Karcher, D. M., McNeil, E. A., Perez, G. I. 2013. Conservation of avian germplasm by xenogeneic transplantation of spermatogonia from sexually mature donors. *Stem Cells Dev.* 22(5), 735-749.

Reynaud, G. 1969. The transfer of turkey primordial germ cells to chick embryos by intravascular injection. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 21(3), 485-507.

Roe, M., McDonald, N., Durrant, B., Jensen, T. 2013. Xenogeneic transfer of adult quail (*Coturnix coturnix*) spermatogonial stem cells to embryonic chicken (*Gallus gallus*) hosts: a model for avian conservation. *Biol. Reprod.* 88(5), 129.

Russell, L. D., Ettlin, R. A., Hikim, A. P., Clegg, E. D. 1990. Mammalian spermatogenesis: Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. Cache River Press. pp. 1-40.

Ryu, B. Y., Kubota, H., Avarbock, M. R., Brinster, R. L. 2005. Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat. *PNAS.* 102(40), 14302-14307.

Ryu, B. Y., Orwig, K. E., Kubota, H., Avarbock, M. R., Brinster, R. L. 2004. Phenotypic and functional characteristics of spermatogonial stem cells in rats. *Dev. Biol.* 274(1), 158-170.

Sang, H. 1994. Transgenic chickens—methods and potential applications. *Trends Biotechnol.* 12(10), 415–420.

Schofield, R. 1978. The relationship between the spleen colony-forming cell and the hemopoietic stem cells. *Blood Cells.* 4(1-2), 7–25.

Shinohara, T., Avarbock, M. R., Brinster, R. L. 1999. beta1-and alpha6-integrin are surface marker on mouse spermatogonial stem cells. *PNAS.* 96(10), 5504–5509.

Tagirov, M., Golovan, S. 2012. The effect of busulfan treatment on endogenous spermatogonial stem cells in immature roosters. *Poult. Sci.* 91(7), 1680–1685.

Tajima, A., Naito, M., Yasuda, Y., Kuwana, T. 1993. Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). *Theriogenology.* 40(3), 509–519.

Tegelenbosch, R. A., de Rooij, D. G. 1993. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat. Res.* 290(2), 193–200.

Till, J. E., McCulloch, E. A. 1980. Hemopoietic stem cell differentiation. *Biochim. Biophys. Acta.* 605(4), 431–459.

Trefil, P., Micáková, A., Mucksová, J., Hejnar, J., Poplstein, M., Bakst, M. R., Kalina, J., Brillard, J. P. 2006. Restoration of spermatogenesis and male fertility by transplantation of dispersed testicular cells in the chicken. *Biol. Reprod.* 75(4), 575–581.

Vick, L., Li, Y., Simkiss, K. 1993. Transgenic birds from transformed primordial germ cells. *Proc. Biol. Sci.* 251(1332), 179-182.

Watanabe, M., Kinutani, M., Naito, M., Ochi, O., Tahashima, Y. 1992. Distribution analysis of transferred donor cells in avian blastodermal chimeras. *Development.* 114(2), 331-338.

Yasuda, Y., Tajima, A., Fujimoto, T., Kuwana, T. 1992. A method to obtain avian germ-line chimaeras using isolated primordial germ cells. *J. Reprod. Fertil.* 96(2), 521-528.

김상욱. 1969. *평의 인공사육*. 산림.

류범용. 2009. 돼지 정원줄기세포를 이용한 형질전환 가축의 생산 효율 증진을 위한 신기술 개발. 농촌진흥청.

류범용. 2010. 돼지 정원줄기세포주 확립을 위한 체외배양 기법 개발. 농촌진흥청.

류범용. 2012. 정원줄기세포를 이용한 세포치료 기반 기술 확립. 중앙대학교.

정동기. 2007. 닭 생식반월의 Busulfan 가온 주입방법에 의한 원시생식세포 제거 효과. *발생과 생식.* 11(3), 219-226.

## 감사의 글

배움이 좋아서 시작한 여정이 어느덧 2년의 시간이 흘러 2013년 12월 지금 저는 감사의 글을 쓰고 있습니다. 아무것도 놓이지 않은 연구실 책상에서 어려운 영어 논문 한편과 형광펜을 들고 시작한 대학원 석사 과정이 어느덧 종점을 향하고 있습니다. 학위논문을 마무리하는 이 글을 쓰며 돌아보니, 지나온 시간이 가슴 벅차게 다가옵니다. 그리 평탄치 않은 많은 시간이었지만 최선을 다해 보낸 지난 2년여의 노력이 이렇게 소중한 결실을 맺게 되어 매우 기쁘고 설렙니다. 그동안 연구실 안에서 웃고 울고 힘들어 하며 공부한 세월이 쌓이고 쌓여 지금은 너무나도 값진 추억이 되었습니다. 부족한 저에게 너무나 많은 분들이 관심어린 사랑과 도움을 주셨습니다. 모두 돌아보며 감사 인사를 올려야 하는데 그러하지 못함에 용서를 구합니다.

먼저 저를 존재하게 하고 매순간 이끌어주신 하나님 아버지께 모든 영광을 돌려드립니다. 그리고 부족한 저를 제자로 받아들여, 하나에서 열까지 가르침을 주시고, 미래와 희망을 선물하여 주신 정동기 지도교수님께 깊은 감사드립니다. 평생 가슴에 새기며 제자로서 부끄럽지 않게 노력하며 살겠습니다. 또한 바쁘신 학사일정 가운데에도 제자사랑에 본 논문의 심사를 맡아 세심하게 열정을 다해 지도해 주시고 조언해 주신 오성종 교수님, 류연철 교수님께 감사드립니다. 석사과정을 통해 학문의 길을 열어 주시고 훌륭한 가르침으로 저를 깨어있게 해 주신 양영훈 교수님, 진심으로 감사드립니다. 학부생 시절부터 대학원에 이르기까지 많은 가르침을 주셨던 강태숙 교수님, 이현중 교수님, 김문철 교수님, 김규일 교수님, 강민수 교수님, 이왕식 교수님, 김인중 교수님께도 깊이 감사드립니다.

본 과정에서 힘이 되어 주시고 학문의 견해를 넓히도록 힘써주신 동기 친구들, 선·후배님들, 여러 선생님들, 특히 언제나 학과를 위해 갖가지 궂은일을 도맡아 하고 있는 임도훈, 한경은 조교선생님과 김광훈 선생님께도 이 자리를 빌려 감사하다는 말을 전하고 싶습니다.

실험실에서 동거동락하며 함께 고생했던 동물유전공학 및 줄기세포학 실험실 식구들, 실험실 적응과 연구에 정말 많은 도움을 주셨던 김진남 박사님과 박영숙

선생님, 대학원 생활 내내 항상 누구보다도 더 챙겨주고 신경써주신 강현주 선생님과 김남은 선생님, 지금은 졸업하고 학교에 없지만 멀리 베트남에서 유학 와서 정말 고생 많이 한 도 (Do)와 앤 (Anh), 열심히 실험실 생활하고 떠난 민정이, 실험실의 든든한 기둥 역할로 언제나 큰 힘이 되는 샤르마 (Sharma)와 소디 (Sodhi), 어색한 사이였다가 급친해진 고스 (Ghosh), 그리고 이제 실험실 생활을 막 시작하는 아디카리 (Adhikari)와 몽그리 (Mongre), 우리 실험실 식구 모두 진심으로 감사하고 모두 멋진 실험실 생활을 이어나가길 기원합니다.

내 고향과 같은 동물유전육종학 실험실에서 대학원 생활의 첫발을 잘 데 수 있도록 항상 조언해주고 큰 용기를 주었던 김남영 선배님과 훈이형, 쿨한 지아엄마 미경이누나, 품절녀에 합류한 성미누나와 미나누나, 부지런한 승호형, 일하는 지선이, 엄청 바쁜 수연이, 착한 막내 예술이에게도 감사하다는 말을 전하고 싶습니다.

그리고 이 논문이 완성되기까지 대학원 생활을 함께하면서 격려를 아끼지 않았던 맏형 태준이형부터 경보형, 동근이형, 용준이형, 재호형, 준형이형, 대수형, 영화, 익동, 미정이까지 많은 힘이 되었습니다.

지금의 제가 있기까지 가장 큰 힘이 되어준 가족들이 있습니다. 먼저 제가 하고 싶은 공부를 맘껏 할 수 있도록 배려해주시고 끊임없는 지원을 해주신 부모님 (아버지 김인철님, 어머니 윤성애님)께 석사학위를 받음으로써 조금이나마 보답할 수 있으면 좋겠습니다. 그동안 부모님께 효도도 잘하지 못하고, 아직도 어색해 사랑한다는 말을 잘하지 못하는데 이 자리를 빌려 부모님께 사랑한다는 말을 전하고 싶습니다. 그리고 내가 사랑하는 동생들, 이제 막 전역한 둘째 정호, 하나밖에 없는 딸이라서 아버지의 사랑을 독차지하는 예지, 이제 컸다고 형에게 대드는 귀여운 막내 정건이까지 저에게는 없어서는 안 될 고마운 존재들입니다.

또한 저를 위해 항상 기도와 격려를 보내주신 제주신광교회 고창진 목사님과 청년부, 교회 모든 관계자분들께 모두 고개 숙여 감사의 인사를 드립니다.

끝으로, 늘 내 옆에서 격려해준 사랑하는 나의 친구들 재혁, 기범, 재효, 고담, 창희, 준형, 수범에게도 고맙다는 말을 전하며, 논문을 준비하는 동안 힘들어 포기하고 싶을 때 ‘너니까 할 수 있어!’ 라며 용기를 주고 큰 힘이 되어준 인연에게 진심으로 감사의 마음을 전합니다. 그밖에도 이름을 일일이 거론하지 못한 소중한 모든 분들께 진심으로 감사드립니다.

길의 끝은 언제나 또 다른 길의 시작을 의미합니다. 석사를 마치고 어떠한 길이 제 앞에 나타나더라도 저를 믿어주고 힘을 주는 분들이 있기에 이제는 그 길을 헤쳐 나갈 수 있는 용기가 생겼습니다. 대학원에서 보고 배우고 느낀 것들을 디딤돌 삼아 이 세상에 소금과 같은 존재가 되고 싶습니다. 내가 사랑하는 모든 이들에게 이 논문을 바치며, 건강과 행복이 함께하기를 진심으로 기원합니다.

2013년 12월

김정현