

돼지 혈관 세포 특이 발현 프로모터 개발

- 혈관 질환 연구 및 의약품 개발에 필요한 모형(모델) 돼지 개발에 활용

2012년 돼지 유전체 지도*가 완성되면서, 돼지가 생리적으로 인간과 매우 비슷하다는 사실이 과학적으로 밝혀졌다. 이후 돼지는 인간 질환 연구에 최적화된 모형(모델) 동물로 주목받고 있다.

*생물의 게놈 내 모든 염색체에 대해 염색체를 구성하는 서열을 정확한 순서로 작표화하여 만든 게놈서열 데이터베이스(DB)

농촌진흥청(청장 조재호)은 혈관 질환 모형 동물 개발에 활용할 수 있는 돼지 혈관 세포 특이 발현 조절 유전자 프로모터*를 개발했다고 밝혔다.

*유전자의 전사를 조절하는 DNA의 특정 부위로 유전자 발현을 조절하는 염기서열. 유전자가 언제 어디서 얼마나 발현될지 결정하는 염기서열.

연구진은 돼지 혈관 세포에서 강하게 발현하는 유전자를 찾기 위해 돼지 대동맥에서 분리한 혈관 세포와 대조군인 돼지 섬유아세포, 신장 상피세포에 대해 전사체 염기서열 분석(RNA sequencing)*을 수행했다.

*RNA sequencing, 세포 또는 조직의 DNA로부터 전사되는 모든 RNA 전사체의 염기서열을 분석하는 기술로 차세대 유전체 분석 기술(Next generation sequencing, NGS)을 이용하여 유전자의 발현량 정보를 알 수 있음.

이를 통해 돼지 혈관 세포에서 차등 발현하는 유전자 243개를 일차적으로 추출해 인간 유전자 정보와 비교한 다음 34개 후보 유전자를 선별했다.

이 34개 유전자 가운데 발현량 차이가 많은 3개 유전자를 다시 선정해

돼지 체내 여타 조직에서의 발현 여부를 비교 분석한 결과, ESAM* 유전자가 혈관에서 보통 수준보다 훨씬 많이 발현하는 것을 확인했다.

* Endothelial cell-specific adhesion molecule, 혈관 내피 세포 특이 부착 분자

ESAM 유전자는 혈관 벽에서 면역세포를 이동시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 연구진은 ESAM 유전자의 상위 염기서열 구조를 분석해 ESAM1.0 프로모터를 만들었다. 아울러 ESAM1.0 프로모터가 돼지 혈관 세포에서 대조군보다 2.8배 높게 발현을 유도하는 것을 확인했다.

ESAM1.0 프로모터를 활용해 개발한 형질전환 돼지는 혈관 기능과 면역 상호 작용에 필수적인 세포들의 유전자 발현을 정밀하게 제어할 수 있을 것으로 전망된다. 즉, 혈관 질환 모형용 형질전환 돼지 개발이 가능하다는 의미다.

이번 연구 결과는 국제학술지 ‘유전자(Genes, IF:3.5)’에 게재돼 학술적으로 가치를 인정받았다. 국내 특허출원*도 완료해 산업적으로도 활용할 수 있다.

*혈관내피세포에서 특이적으로 과발현되는 돼지 ESAM 유전자 프로모터와 이의 용도 (출원번호: 10-2022-0160506)

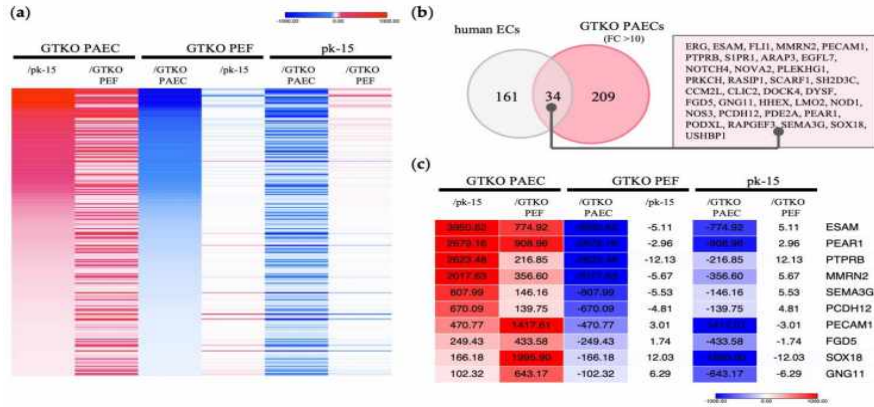
농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오공학과 류재규 과장은 “돼지는 심혈관 질환 모형 동물로 주목받고 있다.”라며 “이번에 개발한 돼지 혈관 세포 특이 발현 프로모터는 혈관 질환 연구나 의약품 개발에 필요한 혈관 질환 모형 돼지 개발에 유용하게 활용될 것이다.”라고 말했다.

붙임. 돼지 혈관 세포 특이 프로모터 개발

담당 부서	국립축산과학원 동물바이오공학과	책임자	과 장	류재규 (063-238-7250)
		담당자	연구관	오건봉 (063-238-7254)

□ 돼지 혈관 세포 특이 유전자 선별 및 기능 분석

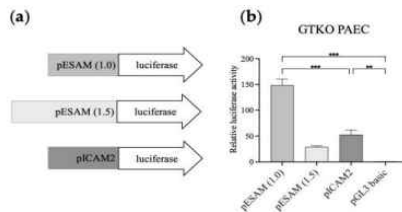
- 전사체 염기서열 분석을 통한 돼지 혈관 세포 특이 발현 유전자 추출 및 인간 유전자와 비교 분석



- (a)- 돼지 혈관 내피세포, 섬유아세포, 신장세포에서 다르게 발현하는 수준에 따라 유전자를 분류함. 234개의 유전자가 돼지 혈관 내피세포에서 특이적으로 많이 발현하는 것을 확인함.
- (b)- 돼지 혈관 내피세포에서 특이적 발현하는 유전자 234개 중에서 인간 유전자 정보와 비교하여 일치하는 34개 유전자를 확인.
- (c)- 34개 유전자 중에서 돼지 혈관 내피세포에서 발현 수준이 높은 유전자 10개를 발현량 차이 순서대로 제시함, 가장 높은 유전자는 *ESAM*으로 나타남.

□ 돼지 혈관 세포 특이 발현 유도 *ESAM1.0* 프로모터

- *ESAM* 유전자의 상위 염기서열의 구조를 분석해 제작한 *ESAM1.0* 프로모터의 유전자 발현 수준 확인



- (a)- *ESAM1.0* 및 *ESAM1.5* 프로모터와 기존 프로모터인 *ICAM*을 대조군으로 하여, 돼지 혈관 내피세포(PAEC), 섬유아세포(PEF), 신장세포(pk-16)에서 분석함.
- (b)- *ESAM1.0* 프로모터는 돼지 혈관 내피세포(PAEC)에서 *ESAM1.5* 프로모터와 대조군 *ICAM* 보다 대략 5.1배와 2.8배 높게 발현함.

□ 게재 논문



Article
Identification of the Porcine Vascular Endothelial Cell-Specific Promoter *ESAM1.0* Using Transcriptome Analysis

Sang Eun Kim¹, Wu-Sheng Sun^{1,2}, Miae Oh¹, Seunghoon Lee¹, Jin-Gu No¹, Haesun Lee¹, Poongyeon Lee¹ and Keon Bong Oh^{1,*}

¹ Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Jeonju-si 55365, Jeollabuk-do, Republic of Korea; seesese@korea.kr (S.E.K.); sunwsh@iau.edu.cn (W-S.S.); miae9590@gmail.com (M.O.); darkcherub@korea.kr (S.L.); shikfm@korea.kr (J.-G.N.); keoh1498@korea.kr (H.L.); py.lee@korea.kr (P.L.)
² College of Veterinary Medicine, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China
* Correspondence: keonb@korea.kr; Tel: +82-63-238-7254

Abstract: The vascular endothelium of xenografted pig organs represents the initial site of rejection after exposure to recipient immune cells. In this study, we aimed to develop a promoter specific to porcine vascular endothelial cells as a step toward overcoming xenograft rejection. Transcriptome analysis was performed on porcine aortic endothelial cells (PAECs), ear skin fibroblasts isolated from *GGTA* knockout (GTKO) pigs, and the porcine renal epithelial cell line pk-15. RNA sequencing confirmed 243 differentially expressed genes with expression changes of more than 10-fold among the three cell types. Employing the Human Protein Atlas database as a reference, we identified 34 genes exclusive to GTKO PAECs. The endothelial cell-specific adhesion molecule (*ESAM*) was selected via qPCR validation and showed high endothelial cell specificity and stable expression across tissues. We selected 1.0 kb upstream sequences of the translation start site of the gene as the promoter *ESAM1.0*. A luciferase assay revealed that *ESAM1.0* promoter transcriptional activity was significant in PAECs, leading to a 2.8-fold higher level of expression than that of the porcine intercellular adhesion molecule 2 (*ICAM2*) promoter, which is frequently used to target endothelial cells in transgenic pigs. Consequently, *ESAM1.0* will enable the generation of genetically modified pigs with endothelium-specific target genes to reduce xenograft rejection.

Keywords: *ESAM*; porcine promoter; porcine vascular endothelial cells; xenotransplantation

1. Introduction

Xenotransplantation, the transplantation of organs or cells from one species to a different species, can potentially address organ shortage challenges [1–3]. Owing to their anatomical and physiological analogy to humans, pigs have been deemed the most suitable species for this purpose [4]. However, immunological incompatibilities between humans and pigs pose significant obstacles that must be surmounted for successful xenotransplantation. Unlike humans and primates, pigs express the galactose- α -1,3-galactose (α -Gal) antigen, which induces hyperacute rejection [5,6]. This major xenoantigen was eliminated in pigs by knocking out the α -1,3-galactosyltransferase (*GGTA*) gene, demonstrating that genetic modification provides clues to overcoming xenotransplantation obstacles [7–9]. Considerable research has been conducted to generate transgenic pigs using gene editing technology, allowing precise and specific endogenous gene ablation as well as foreign gene integration [4,10–12].

Endothelial cells, which line the blood vessels of transplanted organs, express multiple xenoantigens [13]. These are the initial cells to communicate with the immune system of the recipient [14]. In the early phases of xenorejection, porcine endothelial cells are activated and damaged. By driving transgene expression, specifically in endothelial cells, it is possible to incorporate genetic modifications that reduce the rejection processes and