



조류 원시생식세포 매개의 유전자 편집 및 활용

최희정* · 한재용**

Avian Primordial Germ Cell Mediated Genome Editing and Its Application

Hee Jung Choi* and Jae Yong Han**

ABSTRACT

Avian species are invaluable models for studying biotechnological applications, including bioreactors, disease resistance models, and various aspects of reproduction and developmental genetics. Due to the unique physiological characteristics of birds compared to mammalian species, the genome editing process is based on a germline transmission system using primordial germ cells (PGCs). PGCs, the precursor of germ cells responsible for generating sperm and egg cells, play a pivotal role in reproduction by transmitting genetic information to the next generation. Since the discovery of avian PGCs, extensive research has been actively conducted for unraveling their origin, specification mechanism, and unique migration patterns. Notably, recent breakthroughs have enabled the efficient isolation and long-term *in vitro* cultivation of PGCs in chickens, paving the way for the creation of avian models through genome editing technology. At present, the rapid advancements in genome editing

* 서울대학교 농업생명과학연구원

** 대한민국학술원 자연과학부 제5분과 회원, 서울대학교 농생명공학부

technology facilitate the production of functional proteins within avian eggs, Avian species are now widely utilized as models for disease resistance and developmental research. In conclusion, rapidly advancing genome editing technologies will accelerate the field of avian biotechnology and open up new opportunities for poultry to make significant contributions to both industry and academic research.

Key words: avian, CRISPR/Cas9, genome editing, germline chimera, primordial germ cell

초 록

조류 모델은 전통적인 발생학에서부터 최신 분자유전학까지 다양한 분야에서 중요한 모델로 활용되고 있다. 조류와 포유류는 형태학적 및 생리학적으로 차이가 있기 때문에 유전자 편집 기술을 직접적으로 초기 배아에 도입하기 어려워, 원시생식세포를 이용한 유전자 편집 기술이 활발하게 사용되고 있다. 원시생식세포는 유전정보를 다음 세대로 전달할 수 있는 생식세포 전구체로, 조류의 원시생식세포가 발견된 이후 그 기원, 발달, 분자기작 및 독특한 이동 패턴에 대한 연구가 활발히 이루어졌으며, 생식계열로의 유전정보 전달 효율을 향상시키기 위한 노력도 계속되고 있다. 특히, 닭의 생식세포를 효과적으로 분리하고 체외 배양이 가능해짐에 따라 유전자 편집 기술을 활용한 조류 모델의 개발이 가능해졌다. 현재, 유전자 편집 기술의 급속한 발전으로 조류는 난을 통해 기능성 물질을 생산할 수 있고, 질병 저항성 연구 모델로서 널리 활용되고 있다. 결론적으로, 빠르게 진화하는 유전자 편집 기술은 조류 생명공학 분야의 발전을 가속화하여 조류가 다양한 학문분야에 폭넓게 기여할 수 있도록 새로운 기회를 열어줄 것이다.

주제어: 조류, 크리스퍼/카스9, 유전자 편집, 생식선 키메라, 원시생식세포

목 차

I. 서론	V. 가금의 유전자 편집기술의 활용
II. 원시생식세포 분리와 이식	1. 질병저항성 품종개발
1. 원시생식세포의 분리	2. 달걀생체반응기에 의한 재조합 단백질 생산
2. 미세주입에 의한 원시생식세포 이식	3. 조류 유전체 편집 기술을 활용한 수정란의 성 감별
III. 생식선 키메라 생산	4. 동물모델 개발연구
1. 생식선 키메라 생산과 효율증진	VI. 결론
2. 이종간 키메라의 생산 및 멸종조류 복원	VII. 감사의 글
IV. 조류 유전자 편집 기술의 발달	참고문헌

I. 서론

조류는 일찍이 가축화되어 인류에게 육류, 달걀의 형태로 단백질 공급을 위해 사육되어 왔으며, 최근에는 상대적으로 짧은 번식주기와 높은 산란율의 장점을 앞세워 기능성 단백질을 생산할 수 있는 생체 반응기로도 활용되고 있다. 또한, 달걀 내에서 배자가 발달하기 때문에 배자의 발달 연구를 수행하기 용이하여 생식세포 연구 모델로 적극적으로 활용되며, 바이러스 질병 관련 메커니즘, 발생학, 면역학 관련 모델 동물로서의 활용 가치도 높아지고 있다. 최근에는 특정한 염기서열을 효과적으로 제거하거나 대체하는 기술 CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9)의 발전으로, 유전자 편집 기술을 통한 모델 동물 생산이 이전보다 더 용이해졌다.

조류는 포유류와 다르게 방란 이후 배자가 이미 40,000-60,000개의 세포로 형성되며 거대한 난황과 작은 배반(germinal disc)을 가지고 있기 때문에 단일 세포 단계에서 외래 DNA를 미세 주입하거나 유전자를 편집하는 것이 매우 어렵다. 이러한 문제점을 극복하고 형질전환 조류 모델을 생산하기 위해 원시생식세포(Primordial Germ Cells, PGCs)가 널리 활용되고 있다. PGC 매개 형질전환 조류 모델을 생산하기 전, 바이러스를 매개로 조류 생식세포에 외래 유전자를 도입하는 연구가 수행되었다. 예를 들어, 닭 백혈병 바이러스(Avian Leukosis

Virus, ALV)를 매개로 Eyal-Giladi와 Kochav (EGK) X 단계에 감염시켜 형질 전환 닭을 만들었으나 생식세포를 매개로 자손으로 전달되는 효율이 매우 낮았다 [Salter et al. 1986]. 이후 cytomegalovirus, lentivirus 등을 활용하여 형질전환 조류를 만들려는 시도가 이루어졌으나 이러한 시도 역시 생식선 전달 효율은 낮았다 [Harvey et al. 2002, McGrew et al. 2004]. 최근에는 아데노 바이러스 (adenovirus)를 매개로 CRISPR/Cas9을 메추리의 배반포에 전달하여 약 11%의 생식선 전달 효율로 유전자 편집된 조류를 생산하는 방법이 보고되었다 [Lee et al. 2019].

조류 PGC는 포유류와는 다르게 방란 시점에는 배반포 중앙 부위에서 관찰되다가 혈액을 타고 생식소로 이동하는 특성을 가진다. 이러한 특성을 활용하여 발달 중인 배아의 PGC를 혈관과 생식소에서 비교적 쉽게 분리할 수 있게 되었다. 특히, 닭에서는 PGC 특이적으로 발현되는 항원과 상호작용하는 항체를 이용하여 PGC를 효과적으로 분리할 수 있으며, 이렇게 분리된 PGC는 체외 배양이 가능하여 유전자 주입도 가능하다 [van de Lavoie et al. 2006]. 1976년에는 칠면조 PGC를 닭 배아의 혈관에 주입하여 생식선 키메라(germline chimera)를 생산한 선행연구가 이루어졌으며 [Reynaud 1976] 이후에는 메추리 PGC를 수용체 배자에 넣어 내재된 PGC와 외부에서 주입한 PGC가 섞인 생식선 키메라를 만드는 데 성공하였고, 이러한 접근법을 발전시켜 처음으로 PGC를 매개로 한 형질전환 닭이 처음으로 생산되었다 [Vick et al. 1993]. 외부에서 주입된 PGC가 수여자의 생식선에 효과적으로 안착하는 정도는 생식선 키메라의 생산 효율에 영향을 미치며, 최근에는 생식선 키메라가 자체적으로 갖고 있는 내재된 PGC (endogenous PGC)와 외부에서 넣어준 PGC (exogenous PGC)가 혼합된 상태에서 생식선으로의 전달 효율이 감소하는 문제를 해결하기 위한 시도가 다양하게 이루어졌다. 2010년, 연구진들은 수여자 배자에 부설판(busulfan)이라는 화합물을 처리하여 내재된 PGC를 제거함으로써 생식선 전달 효율을 올릴 수 있게 되었다 [Nakamura et al. 2010]. 또한, 체외 배양한 닭 PGC에 부설판 저항성 유전자인 *MGST1*를 삽입한 후 수용체 배자에 미세 주입하여 보다 높은 효율로 생식선 키메라 및 형질 전환 닭을 생산하는 방법이 보고되었다 [Kim et al. 2021]. 이외에도, TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease) 유전자 가위를 사용하여 PGC 기능에 중요한 *DDX4* 유전자가 제거된 무 생식 암탉을 생성하는 연구가 보고되었으며 [Taylor et al. 2017], inducible Caspase-9

(iCaspase9)을 PGC 발달에 중요한 *DAZL* 유전자 발현 하에 조절되도록 태깅 (tagging)하여 특정 조건 하에 iCaspase9의 발현을 조절하여 내재된 PGC를 제거할 수 있는 닭이 개발되었다 [Ballantyne *et al.* 2021]. 그 결과, 최근에는 PGC를 매개로 생식선 키메라를 생산하고, 생식선 키메라의 내재된 PGC를 제거하여 생식선 전달 효율을 높이는데 성공하였으며, 여기에 CRISPR/Cas9 기술을 접목시켜 유전자 편집 조류의 생산이 용이해졌다. 그림 1은 PGC를 이용한 유전자 편집 조류 생산과정을 나타낸 모식도이다. 앞으로의 본문에서는 조류 유전체 편집 기술에 필수적인 PGC의 분리와 이식, 효율적 생식선 키메라 생산, 조류의 유전자 편집기술의 발달, 그리고 유전자 편집기술의 활용에 대한 지금까지의 최근 연구 결과들을 살펴본다. 가금의 질병 저항성 계통 개발, 달걀 생체 반응기, 수정란의 성 감별 기술은 유전자 편집기술의 발전으로 많은 진보가 이루어졌으며 산업적 활용 범위가 매우 크다.

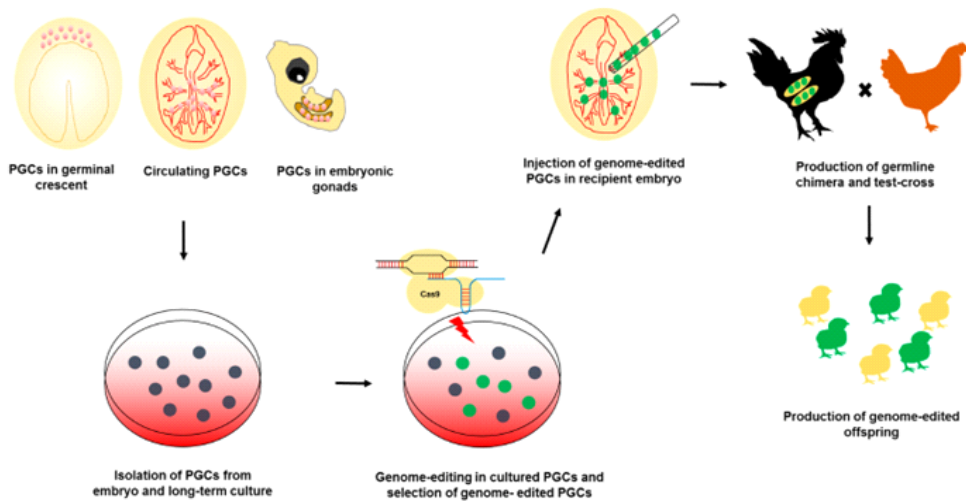


그림 1. PGC 매개의 조류 유전체 편집 과정 (Park *et al.*, 2020)

II. 원시생식세포 분리와 이식

1. 원시생식세포의 분리

조류의 PGC는 배아 발달 과정 중 primitive streak이 형성될 때 germinal crescent로 이동 후 혈류를 통해 생식선으로 이동하는 독특한 특성을 가지고 있다. 따라서, 조류의 PGC는 Hamburger-Hamilton (HH) 단계 4-8의 germinal crescent를 채취하여 분리하는 방법, 혈관으로 들어가 혈류를 순환하는 HH 단계 14-16에서 혈액을 채취하여 분리하는 방법, 또는 생식선에 정착하는 HH 단계 26-28에서 생식선을 분리하여 PGC를 분리하는 방법 등이 존재한다. PGC의 표면 발현 유전자를 발굴하기 전에는 조류의 PGC를 분리하기 위해 밀도 구배 의존 원심분리를 이용하였으나 이 방법은 수율 및 순도가 낮고 분리 후 생존 가능성도 낮아 그 유용성이 제한되었다 [Yasuda *et al.* 1992, Zhao and Kuwana 2003]. 이후, 닭 PGC의 효율적인 분리를 위한 특정 표면 마커를 검출하기 위한 연구에서 닭의 PGC의 경우 세포 표면에 Stage-Specific Embryonic Antigen 1 (SSEA-1)이 발현한다는 것을 확인하였고, anti-SSEA-1 항체를 이용한 Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) 또는 Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) 기술에 의해 PGC가 효과적으로 분리된다는 것을 확인하였다. 또한 분리된 PGC를 수용체 배아 혈관에 이식하였을 때, 생식선으로 효과적으로 이동한다는 것이 증명됨으로써 조류 PGC의 표면 마커를 통한 효율적인 분리법이 확립되었다 [Park and Han 2000, Kim *et al.* 2004, Mozdziak *et al.* 2005]. 메추리의 경우 PGC 특이적인 마커로써, anti-QCR1 항체를 사용하여 메추리의 PGC를 효과적으로 분리하는데 성공하였다 [Ono and Machida 1999].

그러나, 야생 조류나 멸종 위기 조류의 PGC는 위에서 언급된 표면 마커를 이용한 분리가 어렵고, 아직까지 야생 조류종의 PGC에서 공통적으로 발현하는 표면 마커가 밝혀지지 않아 이를 이용한 PGC의 분리 및 정제가 여전히 어렵다. 이 문제를 극복하기 위해, PGC의 크기가 다른 체세포에 비해 상대적으로 크다는 것을 이용하여 PGC를 분리하는 방법이 개발되었다. 이 방법은 PGC가 혈류를 통해 순환하는 단계인 HH 단계 14-16의 배아의 혈액을 채취한 후, 혈액을 일정 지름의 미세 구멍이 있는 트랜스웰(transwell)에 통과시키면, 지름이 작은 체세포

는 트랜스웰을 통과하고, 지름이 큰 PGC는 트랜스웰을 통과하지 못하게 되는 원리를 이용한 것이다. 이 방법은 닭 뿐만 아니라 메추리, 오리와 같은 다양한 조류종에서 PGC의 분리가 가능함을 보여주었다 [Jung *et al.* 2017]. 특히, PGC의 경우 조류의 생물 다양성 보존과 관련하여 바이오 बैं킹 시스템의 중요한 요소로 사용될 수 있으므로 이와 같은 조류 PGC 분리 기술을 이용하여 효과적으로 조류의 PGC를 분리하고 이를 동결 보존하여 야생 조류 및 멸종 위기 조류종의 복원 및 바이오 बैं킹 시스템을 구축할 수 있을 것이다 [Nandi *et al.* 2016].

2. 미세주입에 의한 원시생식세포 이식

포유류의 경우 형질전환 동물을 생산하기 위해 배아줄기세포의 이식, 체세포 핵 이식 기법 (Somatic-cell nuclear transfer, SCNT) 및 전핵 주입법 (pronuclear injection)이 널리 사용되고 있다. 그러나, 포유류와 달리 조류의 경우 크고 불투명한 난황과 함께 배란이 이루어지기 때문에, SCNT를 위한 난자의 핵을 식별하기가 매우 어렵다. 또한, 조류의 경우 수정 시 수많은 정자들이 난황 막을 뚫고 들어가기 때문에, 어떤 정자핵이 실제로 수정에 관여하는 것인지 구별할 수 없고, 이로 인해 전핵 주입법에 의한 형질전환 조류 생산도 불가능하다 [Fofanova 1965, Waddington *et al.* 1998, Lee *et al.* 2013]. 조류 배아줄기세포의 경우 일부 연구에서 조류 배아줄기세포를 확립하고, 이를 이용한 체세포 키메라를 생산한 연구가 보고되었지만, 생식선 전이능이 매우 저조하여 형질전환 조류 생산에 널리 활용되지는 못하였다 [van de Lavoie *et al.* 2006]. 따라서, 조류에서는 형질전환 개체를 만들기 위한 방법으로, PGC가 혈류를 통해 생식선으로 이동한다는 특성을 이용해 체외에서 배양한 PGC를 수여자 배아 혈관에 이식하는 미세주입법이 사용되고 있다. 조류에서 사용되는 미세주입 방법은 다음과 같다. 먼저, 수정란을 약 2일 동안 배양시킨 뒤 달걀의 침단부에 작은 구멍을 만든다. 이 구멍을 통해 체외에서 배양시킨 원시생식세포를 배아 등쪽 대동맥을 통해 혈류로 미세주입하고, 그 구멍을 파라 필름으로 다시 밀봉한 후 배양한다 [Vick *et al.* 1993, Chang *et al.* 1997]. 1976년 칠면조의 PGC를 닭 배아의 혈관 내 미세주입을 통해 이식하여 칠면조의 원시생식세포가 숙주의 생식선 내에서 완전히 안착하여 성숙하고 어느 정도 수정에 적합한 배우자를 형성할 수 있도록 했으며 [Reynaud 1976], 메추리의 germinal crescent 에서 분리된 PGC는 성공적으로

로 수용자 배아로 옮겨져 메추리 생식계열 키메라를 생산했다 [Wentworth *et al.* 1989]. 또한, 1993년 HH 단계 5 배아의 germinal crescent 로부터 분리된 PGC를 사용하여 닭에서 최초의 형질전환 동물을 만들었다 [Vick *et al.* 1993]. HH 단계 14-16 배아의 혈액에서 분리된 PGC와 HH 단계 26-28 배아의 생식선으로부터 분리된 PGC를 이식하여 생식선 키메라도 생산되었다. [Chang *et al.* 1997, Kim *et al.* 2005]. 조류에서 이러한 방법은 생식선 키메라의 생산, 형질전환 및 유전체 편집 자손의 생산 연구 등에 활발히 이용되고 있다.

III. 생식선 키메라 생산

1. 생식선 키메라 생산과 효율 증진

생식선 키메라(Germline chimera)란 하나의 개체의 생식선에 다른 품종 (breed) 또는 다른 종(species)의 생식세포가 혼합되어 있는 상태를 나타낸다. 포유류의 경우, 배아줄기세포를 수여자의 배반포(blastocyst) 내에 주입함으로써 생식선 키메라가 만들어질 수 있다 [Chen *et al.* 1999]. 조류에서는 PGC가 배아의 혈류를 통해 생식선으로 이동하는 특성을 활용하여 생식선 키메라를 생산한다. 배아의 혈액에서 분리된 PGC를 수여자 배아의 혈관 내로 주입하여 생식선 키메라를 생산할 수 있는데, Rhode Island Red 종 닭 배아 HH 단계 13-14의 혈액에서 PGC를 분리하여 White Leghorn의 배아 내에 주입하여 서로 다른 품종 간의 생식선 키메라가 생산됨이 보고 되었다 [Tajima *et al.* 1993]. 보다 효율적인 생식선 키메라 생산을 위하여, 수여자 배아의 내재적 원시생식세포 (endogenous PGC)를 제거하는 방법이 연구되었다. 이러한 방법으로는 감마선 (Gamma ray)에 노출시켜 생식세포를 제거하거나, 배아에 백혈병 치료제인 busulfan을 처리하는 방식, HH 단계 14-15의 배아에 혈액을 제거하여 혈액 내 이동 중인 PGC를 제거하는 등의 방식이 개발되었다 [Carsience *et al.* 1993, Nakamura *et al.* 2010]. Busulfan을 처리하지 않은 수여자의 생식선 키메라 효율이 6%인 반면, busulfan을 처리하여 내재적 생식세포를 제거하였을 시 수여자의 효율은 99%까지 향상할 수 있다는 것이 보고되었다 [Nakamura *et al.*

2010]. 최근에는, 생식세포 특이적으로 세포사멸 유도 인자인 inducible Caspase9 (iCaspase9)을 발현하는 형질전환 닭이 생산되어 이 형질전환 닭이 생산한 배아의 혈관에 체외에서 배양한 외래 생식세포와 iCaspase9을 활성화하는 화학물질을 동시에 주입하면, 외래 생식세포만 선택적으로 살아남고, 내재적 생식세포는 모두 사멸하여 생식선 키메라의 생산 효율을 크게 향상시킬 수 있다는 것이 보고되었다 [Ballantyne *et al.* 2021]. 그러나, 모든 조류종에서 PGC를 분리하여 생식선 키메라를 생산하는 방법은 적용이 어렵고 적용할 수 있는 조류종이 소수로 국한되어져 있다. 따라서, 조류의 PGC 대신, 배반엽 세포, 배아 생식세포(Embryonic germ cells, EGCs), 생식선 줄기세포(Germline stem cells, GSCs), 정원줄기세포(Spermatogonial stem cells, SSCs) 등과 같은 생식세포 유능 줄기세포(Germline-competent stem cells)를 이용한 생식선 키메라 생산에 대한 연구도 진행되고 있다. 그러나, PGC를 이용한 사례보다 생식선 키메라 생산 효율이 낮다는 한계도 있다 [Petitte *et al.* 1990, Park *et al.* 2003, Jung *et al.* 2010]. 결론적으로, 현재까지는 체외에서 배양된 PGC가 생식선 키메라 생산에 있어 가장 최적화된 생식 줄기세포로 알려져 있으며, 이를 효율적으로 사용하기 위하여 PGC의 생식 능력 조절과 관련된 추가적인 연구도 필요하다.

2. 이종간 키메라의 생산 및 멸종 조류 복원

환경 오염 및 기후 변화로 인해 멸종 위기종의 수가 해마다 증가하고 있어 전 세계적인 문제점으로 인식되고 있으며, 이종 간 생식선 키메라는 조류의 유전자 보전과 복원에 강력한 도구로 활용될 수 있다 (그림 2). 그러나, 종 마다 다른 생식 주기, 알 크기의 차이 등과 같은 생리학적 종간 차이에 의해 이식한 공여자 생식세포 유래 자손 생산 효율이 현저히 낮다는 문제점이 존재한다. 이를 극복하기 위해, 우선 이종 PGC를 주입하여 기능을 하는 생식세포가 생성되는지 확인하는 실험이 수행되었다. Kang 등은 7일령 꿩 배아에서 PGC를 분리한 후 2일령 닭 배아에 이식하여 생식선 키메라를 생산하였고, 수컷 생식선 키메라에서 꿩의 정액이 성공적으로 생산됨을 확인하였다. 이후, 닭 생식선 키메라와 암컷 꿩의 교배를 통해 꿩의 자손이 성공적으로 생산되어 이종 간 키메라 생산이 가능함을 최초로 증명하였다. [Kang *et al.* 2008, Kang *et al.* 2009]. 또한, 북, 중 아프리카

에 서식 중이며 멸종 위기에 처한 Houbara bustard종의 PGC를 닭에 주입하여 생식선 키메라 정액을 생산할 수 있으며, 이를 암컷 Houbara bustard와 인공 수정하여 개체를 늘릴 수 있는 방법이 보고되었다 [Wernery *et al.* 2011]. 또한 메추리, 타조, 오리의 PGC를 닭의 배아에 주입하여 키메라를 생산하거나, 닭의 PGC를 오리나 불닭(Guinea fowl)의 배아에 주입하여 이종 생식선 키메라를 생산한 사례도 보고되었다 [van de Lavoir *et al.* 2012]. 이러한 연구는 조류의 PGC를 이용한 생식선 키메라의 생산으로 조류 종의 보존 및 복원을 효과적으로 수행할 수 있다는 것을 증명한 것이다. 이 외에도 멸종 위기 종 보존을 수행하기 위해 체세포로부터 역분화 줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC)를 생산하였고, 이를 닭 배아에 주입하였을 경우 일부 체세포 키메라를 형성할 수 있다는 것을 보임으로써, 향후 iPSC 또한 추가적인 연구를 통해 조류 유전 자원으로써 활용될 수 있다는 가능성이 제시되었다 [Katayama *et al.* 2022]. 따라서, 멸종 위기 조류 보존 및 복원을 위해 다양한 조류 종의 PGC의 분리, 배양 및 보존과 다양한 세포주를 활용한 방법이 계속해서 연구될 필요가 있다.

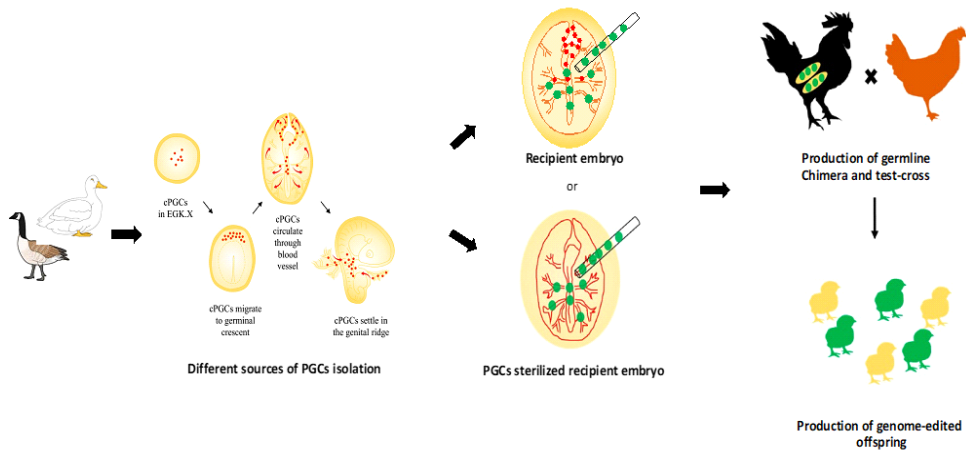


그림 2 이종 간 키메라를 통한 멸종위기종 복원

IV. 조류 유전자 편집 기술의 발달

특정 염기 서열을 수정할 수 있는 유전자 편집 기술은 면역학, 뇌신경과학, 발생생물학, 질병 치료, 동식물 육종 등의 분야에 광범위하게 활용되고 있다. 유전자 편집 조류의 생산은 주로 PGC를 매개로 하거나 아데노 바이러스 시스템을 통해 이루어진다. 2013년에는 PGC 매개 자연적인 상동 재조합에 의한 유전자 적중 방식으로 면역글로불린(immunoglobulin, Ig) 유전자를 녹-아웃(Knock-out, KO) 하여 B 세포의 발달이 일어나지 않는 닭이 생산되었다 [Schusser *et al.* 2013]. 그러나, 이 연구에서는 PGC에서의 유전자 녹-아웃 효율은 약 0.1%로 매우 낮았다. 따라서, 표적 염기서열을 목표로 하여 DNA 이중나선 손상을 일으켜, DNA 복구 기작 활성화에 의한 PGC에서의 유전자 편집 기술이 필요하게 되었다.

특정 염기 서열을 인지하여 DNA 이중 가닥 손상을 일으켜 유전자 편집을 수행할 수 있는 기술을 Programmable Genome Editing이라고 하며, 이 기술은 Zinc-Finger Nucleases (ZFNs), Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN), 그리고 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR)-Cas 기술로 나누어진다. 이 기술들은 공통적으로 대상 유전체 서열의 이중 가닥 DNA를 절단시켜, 비상동 말단 접합(Non-Homologous End Joining, NHEJ) 또는 상동 접합(Homology-Directed Repair, HDR)을 유발해 특정 유전체를 편집한다. 2014년, TALEN 기술을 활용하여 난백 단백질에서 높은 비율을 차지하는 오브알부민(Ovalbumin) 유전자를 제거한 유전자 편집 닭의 생산이 최초로 보고되었다 [Park *et al.* 2014]. 이것은 programmable genome editing 기술을 조류의 PGC에 적용한 최초의 연구였으며, TALEN 기술을 통해 PGC에서의 유전자 편집 효율이 33.3%로 크게 증가하였다. 또한, TALEN 매개 유전자 편집 기술로 닭의 PGC 생존 및 발달에 중요한 *DDX4* 유전자에 Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) 유전자를 삽입하여 *DDX4* 유전자의 기능을 녹-아웃 하여 내재적 생식세포를 제거한 닭도 개발되었다 [Taylor *et al.* 2017]. 이와 같이 특정 염기 서열 부위에 이중 가닥 손상을 일으킬 수 있는 programmable genome editing 기술을 통해 PGC에서 녹-아웃 및 녹-인(Knock-In)을 효율적으로 유도할 수 있는 기반이 마련되었다.

이후, single guide RNA (sgRNA)를 통해 손쉽게 목적 부위를 타겟하고 이중 가닥 손상을 일으킬 수 있는 3세대 유전자 편집 기술인 CRISPR/Cas9 시스템의

등장으로 유전자 편집 기술은 더욱 발전하였으며[Jinek *et al.* 2012], 이는 유전자 편집 닭을 생산하는데도 활용되었다. 2016년에는, 달걀 알레르기의 주요 원인인 오브알부민과 오보뮤코이드(Ovomucoid)를 CRISPR/Cas9을 이용하여 녹-아웃 한 닭이 보고되었다 (Oishi *et al.* 2016). 이를 통해 난백 단백질의 성분을 변형함으로써 알레르기 반응을 줄일 수 있는 저감란 등의 고부가가치 달걀의 개발 가능성을 보여주었다. 동시에, CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 닭의 IgH의 가변 영역(Variable Region, V region) 서열을 표적해 DNA 이중 가닥을 절단, 상동 재조합을 통해 *EGFP* 유전자를 삽입한 사례도 보고 되었다 [Dimitrov *et al.* 2016]. 이러한 유전자 편집 도구를 이용한 유전자 편집은 닭에만 국한되지 않고 다양한 가금류에서도 활용되었다. 그 일례로 근육 발달과 관련있는 *MSTN* 유전자의 42번째 시스테인(cysteine)을 제거할 수 있게 설계한 CRISPR/Cas9을 재조합 아데노 바이러스를 운반체로 이용하여 메추리의 배반엽에 주입하여 체중과 근육량을 증가시킨 유전자 편집 메추리를 보고하였다 [Lee *et al.* 2020]. 또한 닭에서 단일 염기편집(base editing) 시스템으로 염기 전이(Transition)를 유도하여 DNA 이중 가닥 절단 없이 염기 치환이 된 연구 결과도 보고되었다. 닭의 *MSTN* 유전자와 난백 단백질 중 하나인 오보트랜스페린(Ovotransferrin) 유전자를 염기 치환함으로써 종결코돈을 유도하여 각각 35.7%와 55.5% 효율로 염기가 치환된 자손을 얻은 사례가 최초로 보고 되었다 [Lee *et al.* 2020]. 뿐만 아니라 prime editing의 경우, prime editing guide RNA (Peg RNA)와 역전사 효소(Reverse Transcriptase, RT) 영역이 결합된 Cas9을 이용하여 표적 유전자 내 염기 제거, 치환, 삽입을 수행할 수 있다. 이러한 Prime editing을 이용하여 생식세포 관련 유전자인 *DDX4*의 종결 코돈을 유발하였을 때, 8.3%의 치환 효율을 확인하였다 [Atsuta *et al.* 2022]. 하지만 prime editing의 경우 여전히 낮은 유전자 편집 효율을 개선할 필요가 있으며, 유전자 편집 효율과 정확성을 높이는 전략이 필요하다 (그림 3).

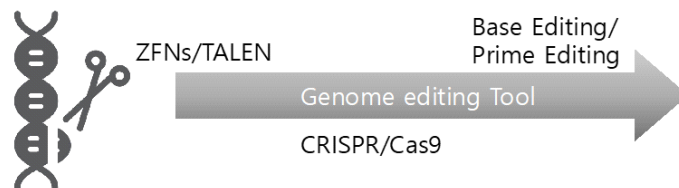


그림 3. 유전자 편집 기술의 발전

V. 가금의 유전자 편집 기술의 활용

1. 질병 저항성 품종개발

조류 인플루엔자 바이러스(Avian Influenza Virus, AIV), 마렉 질병 바이러스(Marek's Disease Virus, MDV), 닭 백혈병 바이러스(Avian Leukosis Virus, ALV)와 같은 가금류 질병들은 가금 사육 농가에 전파되었을 막대한 경제적, 환경적, 윤리적 문제를 일으킨다. 따라서 조류 질병을 사전에 예방하기 위해 철저한 방역 시스템을 구축하고, 바이러스 감염을 예방하기 위한 백신 프로그램도 개발되었다. 그럼에도 불구하고, 조류 인플루엔자 바이러스와 같은 RNA 바이러스는 항원 돌연변이가 빈번히 일어나고, 최근에는 닭 백혈병 바이러스의 새로운 변종이 등장하는 등 기존의 방법으로 질병을 효과적으로 통제하기가 점점 어려워지고 있다. 이에 대응하여, 조류 유전자 편집 기술을 활용해 닭 체내에 바이러스가 감염 시 이용하는 숙주 수용체 유전자를 편집한 질병 저항성 닭이 개발되고 있다. 닭 백혈병 바이러스 감염을 막기 위해 ALV-A, K의 수용체인 *TVA* 유전자를 제거한 닭이나 ALV-J의 수용체인 닭 NHE1 단백질의 38번째 트립토판(tryptophan)만을 제거한 닭이 개발되었고, 이 유전자 편집 닭의 경우 조류 백혈병 바이러스 감염에 대한 저항성을 획득한 것으로 확인되었다 [Koslová *et al.* 2020, Koslová *et al.* 2021]. 한편, 마렉 질병 바이러스의 *ICP4* 유전자를 제거할 수 있는 Cas9, sgRNA를 발현하는 형질전환 닭이 개발되어 마렉 질병 바이러스 감염에 저항성을 가지는 닭의 생산이 보고되었다 [Challagulla *et al.* 2021]. 추가적으로, 마렉 바이러스의 숙주 인자가 명확히 확인된 경우, 해당 인자를 변형하여 마렉 질병 바이러스에 대한 저항성을 가지는 닭을 더 많이 개발할 수 있을 것으로 예상된다.

조류 인플루엔자 바이러스의 중합효소 기능에 중요한 숙주인자 ANP32A가 밝혀지면서 *ANP32A* 유전자를 편집하여 조류 인플루엔자 저항성 닭을 생산하기 위한 연구가 활발히 진행되었다. 닭의 ANP32A에 특이적으로 존재하는 서열을 제거하거나, 녹-아웃을 통해 *ANP32A* 유전자를 닭 섬유아세포에서 제거하면 조류 인플루엔자 바이러스의 복제가 억제됨이 확인되었다. [Long *et al.* 2016, Park *et al.* 2020]. 또한, ANP32A의 149, 152번째 아스파르트산(aspartate)이 바이러스 PB2 단백질과의 상호작용에 필수적으로 작용한다는 것이 밝혀져 *ANP32A* 유

전자와 바이러스의 상호작용에 대한 이해가 이루어졌다 [Park *et al.* 2021]. 최근에는 ANP32A 단백질의 기능이 상실된 유전자 편집 닭의 생산을 통해 조류 인플루엔자 저항성 닭의 개발이 가능하다는 것을 증명하였다. 그러나, ANP32A 녹-아웃 닭에서 돌파 감염을 일으킨 바이러스의 경우 ANP32B, ANP32E를 이용하도록 PB2 단백질의 서열에 돌연변이가 유도되어, ANP32A 기능이 상실된 숙주 세포에 적응하는 양상을 보여 ANP32A 이외에 ANP32B, ANP32E를 모두 제거한 유전자 편집 닭의 개발이 필요함이 보고되었다 [Idoko-Akoh *et al.* 2023]. 또한, 조류 인플루엔자 바이러스를 인지하는 RIG-I 수용체가 닭 유전체에는 진화적으로 존재하지 않아 RIG-I과 같은 족(family)의 닭 MDA5가 RIG-I이 없어도 조류 인플루엔자 바이러스 인지에 중요함이 밝혀졌다 [Liniger *et al.* 2012, Lee *et al.* 2020]. MDA5의 바이러스 인지 부위를 RIG-I의 것으로 교체했을 때 보다 인플루엔자 바이러스에 저항성을 가지고, RIG-I을 닭 섬유아세포에 도입했을 때 인플루엔자 바이러스 감염에 저항성을 보였다 [Ichikawa *et al.* 2021, Woo *et al.* 2022]. 이러한 결과를 바탕으로 미래에는 다양한 유전자를 교정한 질병 저항성 닭이 개발될 것으로 기대된다.

2. 달걀 생체 반응기에 의한 재조합 단백질 생산

달걀에는 매우 높은 함량의 단백질이 포함되어 있으며, 암탉의 경우 연간 약 300개 이상의 달걀을 생산할 수 있는 높은 산란율을 나타낸다. 이를 응용하여 달걀 단백질을 암호화하는 유전자를 고부가 가치 단백질 의약품을 암호화하는 유전자로 치환한다면, 달걀을 단백질 의약품을 대량 생산할 수 있는 효율적인 생체 반응기로 활용될 수 있다. 달걀에 재조합 단백질을 축적시키는 방법으로는 오브알부민 합성 프로모터를 이용하는 방법과, 유전자 편집 기술을 이용하여 오브알부민 유전자 좌위에 재조합 단백질 유전자를 녹-인 하여 삽입시키는 방법이 있다. 현재까지 오브알부민 합성 프로모터를 이용하여 인간 인터페론 베타, 인간 인터페론 알파, 상피세포 성장인자 및 항 CD20 항체 등을 난백 내에 축적시킨 연구결과들이 보고되었다 [Lillico *et al.* 2007, Park *et al.* 2015, Herron *et al.* 2018, Kim *et al.* 2018]. 특히, 항 CD20 항체를 달걀의 난백에서 생산할 경우, 난백 특이적인 탈 류코실화 및 갈락토실화로 인하여 항암효과에 중요한 영향을 미치는 Fc 효과 기능을 비약적으로 향상시킬 수 있음이 증명되었다 [Kim *et al.* 2018].

이외에도 오브알부민 유전자 좌위에 재조합 단백질 유전자를 삽입시키는 방법으로 CRISPR/Cas9을 활용하여 닭 오브알부민 유전자 좌위에 사람 인터페론 베타 (interferon-beta) 유전자 및 anti-HER2 항체 유전자를 삽입하여 난백에서 사람 인터페론 베타 및 anti-HER2 항체를 대량 생산한 연구가 보고되었다 [Oishi *et al.* 2018, Mukae *et al.* 2020]. 또한, 사람의 아디포넥틴 (Adiponectin)을 달걀 난백 내에서 생산하였을 경우, 보다 높은 생리 활성을 갖는 고분자 아디포넥틴이 달걀에서 효율적으로 대량 생산됨이 보고되어 높은 활성을 갖는 재조합 아디포넥틴 생산에 있어서 달걀 생체 반응기의 우수함이 증명되었다 [Kim *et al.* 2022]. 최근에는 닭의 간 특이적으로 인간 IgG1 Fc를 분비하여, 풍부한 말단 sialylation 및 탈 푸코실화 형태의 당쇄를 가진 인간 IgG1 Fc를 난황에 대량 축적시킬 수 있는 유전자 편집 닭의 생산이 보고되었다 [Park *et al.* 2023].

3. 조류 유전체 편집 기술을 활용한 수정란의 성 감별

조류 유전체 편집 기술은 닭의 성 감별에도 활용될 수 있다. 한 예시로 CRISPR/Cas9 기술을 활용하여 Z 성염색체에 마커 형광 유전자를 삽입한 유전자 편집 닭이 만들어졌다. 닭은 ZW 성 염색체 시스템을 바탕으로 성이 구분되는데 수컷은 2개의 Z 염색체를 갖는 반면 암컷은 1개의 Z 염색체, 1개의 W 염색체를 갖는다. 유전자 편집된 암탉을 일반 수탉과 교배하면 수평아리는 ZZ 성염색체를 가져 유전자 편집된 암탉의 Z 성염색체를 하나 물려받아 형광을 띄고, 암평아리는 모계로부터 W 성염색체 하나와 부계로부터 Z 성염색체를 물려받아 형광을 띄지 않는다 (그림 4) [Lee *et al.* 2019]. 이를 이용하면 수정란 내의 배아로부터 형광을 조사하여 부화 전 암, 수를 구분할 수 있다. 현재 이러한 유전자 편집 기술을 이용하여 부화하지 않은 수정란 단계에서의 성 감별이 가능해졌으며 앞으로 상업적으로 승인이 나면 무분별한 수컷 병아리 도태를 해결할 수 있다. 암컷 병아리는 유전자 편집이 안되어 이들 닭에서 생산된 달걀은 GM(genetically modified) 닭과는 무관하게 식용으로도 소비자에게 긍정적인 것이다. 유전자 편집 닭을 활용한 수정란 단계에서의 성 감별은 신뢰도가 100%에 가까울 만큼 높아 미래에 각광받는 기술로 평가되고 있다.

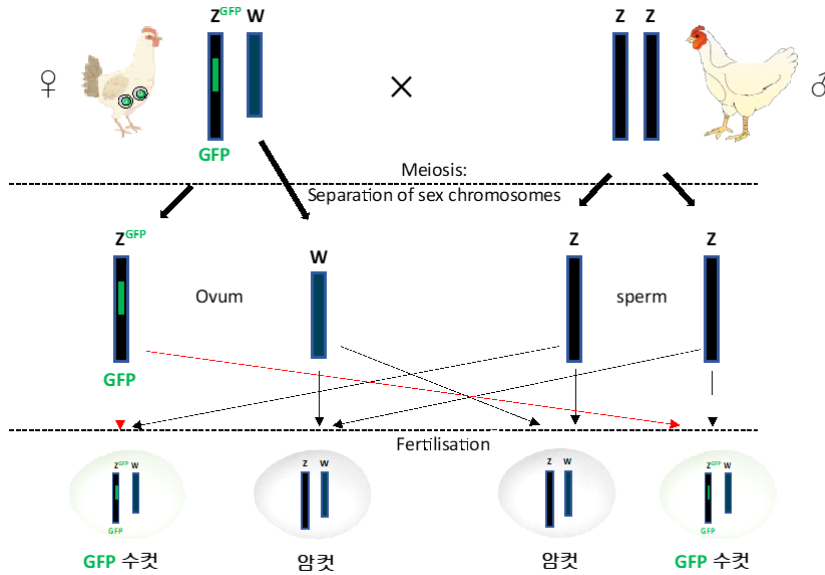


그림 4. 조류 유전체 편집 기술을 활용한 수정란 단계에서의 성 감별

4. 동물모델 개발연구

이 외에도 조류 유전체 편집 조류는 다양한 분야의 연구 수행을 위한 모델 동물로 사용될 수 있다. 닭 생식세포의 발달 과정을 분석하기 위해 닭 PGC에서 특이적으로 발현하는 *DAZL* 유전자 뒤에 녹색 형광 유전자를 삽입한 생식세포 추적 닭 모델이 개발되었다. 이러한 조류 생식세포 추적 모델을 활용하여, 배아 발달 전 과정에서 형광을 이용해 생식세포를 분리하는 것이 가능하게 되었고, 이를 활용해 배아기부터 부화 후 1주령까지 생식세포의 발달 과정을 규명할 수 있었으며, 종 간 생식세포 발달에 필요한 신호 체계의 공통점 및 차이점에 대해 분석할 수 있게 되었다 [Rengaraj *et al.* 2022]. 이와 비슷하게 마우스 PGC의 발달에 중요한 역할을 하는 *PRDM14* 유전자가 닭의 생식세포 발달에도 중요한 역할을 하는지 알아내고자 닭 *PRDM14* 유전자 뒤에 녹색 형광 유전자가 삽입된 유전자 편집 닭의 생산이 보고되었다 [Hagihara *et al.* 2020]. 또한, 닭 성 분화의 원리를 밝혀내고자 닭 성 결정에 중요한 역할을 하는 *DMRT1* 유전자를 제거한 닭이 개발되었다. *DMRT1*이 제거된 닭을 분석하여 Z 염색체의 *DMRT1*이 닭의 남성화에 중요한 역할을 하는 유전자임을 밝혀냈고, *DMRT1* 이외에 성 결정에 영

을 주는 신호 전달 체계 및 호르몬 변화에 대한 분석이 이루어졌다 [Ioannidis *et al.* 2021, Lee *et al.* 2021]. 뿐만 아니라, 닭의 면역 세포를 연구하기 위한 모델도 개발이 되었다. *RAG1* 유전자는 B 세포, T 세포 수용체의 가변 부위 재조합에 관여하여 다양한 항원에 대항할 수 있는 성숙한 B 세포 및 T 세포의 발달에 중요한 역할을 한다. 후천적 면역 세포의 수용체 가변 경쇄(variable light chain)는 V, J 부위로 이루어지고, 가변 중쇄(variable heavy chain)는 V, D, J 부위로 이루어지는데 *RAG1*에 의해 V(D)J 재조합이 이루어져 다양한 항원을 인식할 수 있는 수용체가 된다. 최근, CRISPR/Cas9을 활용하여 *RAG1* 유전자가 녹-아웃 된 면역 결핍 닭 모델이 개발되었으며, *RAG1* 유전자가 녹-아웃 되었을 때 B 세포, T 세포의 발달이 정상적으로 이루어지지 않고 항체의 V(D)J 재조합이 이루어지지 않음이 확인되었다 [Lee *et al.* 2022]. 이러한 면역 결핍 닭 모델을 활용하여 다양한 조류 면역 세포의 분석이 가능할 것으로 기대된다. 또한, 닭은 자발적으로 난소암이 발생하는 가축 중 하나로 암 연구 모델 동물로 주목받고 있다 [Johnson and Giles 2013]. 따라서 후천적 면역 세포가 없는 면역 결핍 모델을 활용하여 암 연구, 바이러스 감염 후 선천적 면역계 반응을 분석하는 등 닭 면역계 분석을 위한 모델 동물로 활용될 것으로 사료된다.

VI. 결론

닭에서는 PGC 장기 체외배양이 가능하여 닭의 유전자 편집에 적극 활용되고 있다. 아직까지는 주로 닭 PGC를 매개로한 유전자 편집 연구가 이루어지고 있지만, 닭 이외의 다른 조류 중에서도 PGC의 분리 및 배양 연구가 세계적으로 진행되고 있어 다른 조류 중에서도 유전자 편집이 가까운 시일 내에 가능할 것이다. 또한, PGCs 이외의 ESCs, SSCs, GSCs, 및 iPSCs를 활용한 바이러스 시스템 및 이식 방법은 아직 안정성과 효율성에 있어 제한적이지만, 향후 연구를 통해 위의 세포들을 이용하여 생식선 키메라의 생산 효율을 증가시킬 수 있다면, 다양한 조류 종의 유전 자원의 보존 및 형질전환 조류 생산에 보다 광범위하게 적용할 수 있을 것이다. 최근, TALEN 및 CRISPR/Cas9과 같은 유전자 가위 기술은 조류 분야에 성공적으로 적용되었고, 질병 저항성 모델, 달걀 생체 반응기의 생산 및 다양한 학술연구를 위한 유전자 편집 조류 모델의 생산이 가능하게 되었다. 이러

한 고부가가치 유전자 편집 조류 모델의 생산은 가금류 산업 발전을 위해 광범위한 연구에 응용될 수 있으며, 향후 우수한 형질을 가진 가금류가 실제 산업 현장에 적용될 수 있을 것이다. 따라서, 유전자 편집 조류는 다양한 학문 분야에서 활용될 수 있는 모델 동물을 생산할 뿐만 아니라, 질병에 감염된 무리의 도살을 줄이고 동물 복지를 향상시키며, 가금 생산 효율성을 높이는 기반을 마련함으로써 친환경적인 농업 방식의 발전에 기여할 것이다. 또한, 달걀 성분의 조절을 통해 알레르기 저감란, 고부가가치의 달걀의 개발 및 단백질 의약품의 경제적 대량 생산을 통해 인류 복지의 향상에 기여할 수 있을 것이다.

VII. 감사의 글

본 논문의 자료 수집을 도와준 서울대학교 동물유전공학실 석박사과정 우승제, 김진이, 신윤지, 이의신 학생, 그리고 논문을 면밀하게 검토해준 서울대학교 그린바이오과학기술연구원 김진규 책임연구원, 아비노젠의 박진세박사, 이경연박사에게 감사 드립니다.

참 고 문 헌

- Atsuta, Y., Suzuki, K., Iikawa, H., Yaguchi, H., and Saito, D. 2022. Prime editing in chicken fibroblasts and primordial germ cells. *Dev, Growth Differ* 64(9), 548-557.
- Ballantyne, M., Woodcock, M., Doddamani, D., Hu, T., Taylor, L., Hawken, R. J., and McGrew, M. J. 2021. Direct allele introgression into pure chicken breeds using Sire Dam Surrogate (SDS) mating. *Nat Commun* 12(1), 659.
- Carsience, R. S., Clark, M. E., Verrinder Gibbins, A. M., and Etches, R. J. 1993. Germline chimeric chickens from dispersed donor blastodermal cells and compromised recipient embryos. *Development* 117(2), 669-675.
- Challagulla, A., Jenkins, K. A., O'Neil, T. E., Shi, S., Morris, K. R., Wise, T. G., Paradkar, P. N., Tizard, M. L., Doran, T. J., and Schat, K. A. 2021. In Vivo Inhibition of Marek's Disease Virus in Transgenic Chickens Expressing Cas9 and gRNA against ICP4. *Microorganisms* 9(1).
- Chang, I. K., Jeong, D. K., Hong, Y. H., Park, T. S., Moon, Y. K., Ohno, T., and Han, J. Y. 1997. Production of germline chimeric chickens by transfer of cultured primordial germ cells. *Cell Biol Int* 21(8), 495-499.
- Chen, W. S., Han, R., and Shang, K. G. 1999. Formation of germline chimeras from murine embryonic stem cell lines. *Yi Chuan Xue Bao* 26(2), 126-134.
- Dimitrov, L., Pedersen, D., Ching, K. H., Yi, H., Collarini, E. J., Izquierdo, S., van de Lavoie, M.-C., and Leighton, P. A. 2016. Germline Gene Editing in Chickens by Efficient CRISPR-Mediated Homologous Recombination in Primordial Germ Cells. *PLoS One* 11(4), e0154303.
- Fofanova, K. A. 1965. Morphologic Data on Polyspermy in Chickens. *Fed Proc Transl Suppl* 24, 239-247.
- Hagihara, Y., Okuzaki, Y., Matsubayashi, K., Kaneoka, H., Suzuki, T., Iijima, S., and Nishijima, K. I. 2020. Primordial germ cell-specific expression of eGFP in transgenic chickens. *Genesis* 58(8), e23388.
- Harvey, A. J., Speksnijder, G., Baugh, L. R., Morris, J. A., and Ivarie, R. 2002. Expression of exogenous protein in the egg white of transgenic chickens. *Nat Biotechnol* 20(4), 396-399.
- Herron, L. R., Pridans, C., Turnbull, M. L., Smith, N., Lillico, S., Sherman, A., Gilhooley, H. J., Wear, M., Kurian, D., Papadakos, G., Digard, P., Hume, D. A., Gill,

- A. C., and Sang, H. M. 2018. A chicken bioreactor for efficient production of functional cytokines. *BMC Biotechnol* 18(1), 82.
- Ichikawa, K., Motoe, Y., Ezaki, R., Matsuzaki, M., and Horiuchi, H. 2021. Knock-in of the duck retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) into the Mx gene in DF-1 cells enables both stable and immune response-dependent RIG-I expression. *Biochem Biophys Rep* 27, 101084.
- Idoko-Akoh, A., Goldhill, D. H., Sheppard, C. M., Bialy, D., Quantrill, J. L., Sukhova, K., Brown, J. C., Richardson, S., Campbell, C., Taylor, L., Sherman, A., Nazki, S., Long, J. S., Skinner, M. A., Shelton, H., Sang, H. M., Barclay, W. S., and McGrew, M. J. 2023. Creating resistance to avian influenza infection through genome editing of the ANP32 gene family. *Nat Commun* 14(1), 6136.
- Ioannidis, J., Taylor, G., Zhao, D., Liu, L., Idoko-Akoh, A., Gong, D., Lovell-Badge, R., Guioli, S., McGrew, M. J., and Clinton, M. 2021. Primary sex determination in birds depends on DMRT1 dosage, but gonadal sex does not determine adult secondary sex characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118(10).
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., and Charpentier, E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337(6096), 816-821.
- Johnson, P. A., and Giles, J. R. 2013. The hen as a model of ovarian cancer. *Nat Rev Cancer* 13(6), 432-436.
- Jung, J. G., Lee, Y. M., Kim, J. N., Kim, T. M., Shin, J. H., Kim, T. H., Lim, J. M., and Han, J. Y. 2010. The reversible developmental unipotency of germ cells in chicken. *Reproduction* 139(1), 113-119.
- Jung, K. M., Kim, Y. M., Ono, T., and Han, J. Y. 2017. Size-dependent isolation of primordial germ cells from avian species. *Mol Reprod Dev* 84(6), 508-516.
- Kang, S. J., Choi, J. W., Kim, S. Y., Park, K. J., Kim, T. M., Lee, Y. M., Kim, H., Lim, J. M., and 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., and 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(4), 519-527.
- Katayama, M., Fukuda, T., Kaneko, T., Nakagawa, Y., Tajima, A., Naito, M., Ohmaki, H., Endo, D., Asano, M., Nagamine, T., Nakaya, Y., Saito, K., Watanabe, Y.,

- Tani, T., Inoue-Murayama, M., Nakajima, N., and Onuma, M. 2022. Induced pluripotent stem cells of endangered avian species. *Commun Biol* 5(1), 1049.
- Kim, J. N., Kim, M. A., Park, T. S., Kim, D. K., Park, H. J., Ono, T., Lim, J. M., and Han, J. Y. 2004. Enriched gonadal migration of donor-derived gonadal primordial germ cells by immunomagnetic cell sorting in birds. *Mol Reprod Dev* 68(1), 81-87.
- Kim, M. A., Park, T. S., Kim, J. N., Park, H. J., Lee, Y. M., Ono, T., Lim, J. M., and Han, J. Y. 2005. Production of quail (*Coturnix japonica*) germline chimeras by transfer of gonadal primordial germ cells into recipient embryos. *Theriogenology* 63(3), 774-782.
- Kim, Y. M., Park, J. S., Choi, H. J., Jung, K. M., Lee, K. Y., Shim, J. H., Park, K. J., and Han, J. Y. 2022. Efficient production of recombinant human adiponectin in egg white using genome edited chickens. *Front Nutr* 9, 1068558.
- Kim, Y. M., Park, J. S., Kim, S. K., Jung, K. M., Hwang, Y. S., Han, M., Lee, H. J., Seo, H. W., Suh, J. Y., Han, B. K., and Han, J. Y. 2018. The transgenic chicken derived anti-CD20 monoclonal antibodies exhibits greater anti-cancer therapeutic potential with enhanced Fc effector functions. *Biomaterials* 167, 58-68.
- Kim, Y. M., Park, K. J., Park, J. S., Jung, K. M., and Han, J. Y. 2021. In vivo enrichment of busulfan-resistant germ cells for efficient production of transgenic avian models. *Sci Rep* 11(1), 9127.
- Koslová, A., Trefil, P., Mucksová, J., Krchlíková, V., Plachý, J., Krijt, J., Reinišová, M., Kučerová, D., Geryk, J., Kalina, J., Šenigl, F., Elleder, D., Kožich, V., and Hejnar, J. 2021. Knock-Out of Retrovirus Receptor Gene Tva in the Chicken Confers Resistance to Avian Leukosis Virus Subgroups A and K and Affects Cobalamin (Vitamin B(12))-Dependent Level of Methylmalonic Acid. *Viruses* 13(12).
- Koslová, A., Trefil, P., Mucksová, J., Reinišová, M., Plachý, J., Kalina, J., Kučerová, D., Geryk, J., Krchlíková, V., Lejčková, B., and Hejnar, J. 2020. Precise CRISPR/Cas9 editing of the NHE1 gene renders chickens resistant to the J subgroup of avian leukosis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117(4), 2108-2112.
- Lee, H. C., Choi, H. J., Park, T. S., Lee, S. I., Kim, Y. M., Rengaraj, D., Nagai, H., Sheng, G., Lim, J. M., and Han, J. Y. 2013. Cleavage events and sperm dynamics in chick intrauterine embryos. *PLoS One* 8(11), e80631.

- Lee, H. J., Seo, M., Choi, H. J., Rengaraj, D., Jung, K. M., Park, J. S., Lee, K. Y., Kim, Y. M., Park, K. J., Han, S. T., Lee, K. H., Yao, H. H., and Han, J. Y. 2021. DMRT1 gene disruption alone induces incomplete gonad feminization in chicken. *FASEB J* 35(9), e21876.
- Lee, H. J., Yoon, J. W., Jung, K. M., Kim, Y. M., Park, J. S., Lee, K. Y., Park, K. J., Hwang, Y. S., Park, Y. H., Rengaraj, D., and Han, J. Y. 2019. Targeted gene insertion into Z chromosome of chicken primordial germ cells for avian sexing model development. *FASEB J* 33(7), 8519-8529.
- Lee, J., Kim, D.-H., and Lee, K. 2020. Muscle Hyperplasia in Japanese Quail by Single Amino Acid Deletion in MSTN Propeptide. *Int J Mol Sci* 21(4), 1504.
- Lee, J., Ma, J., and Lee, K. 2019. Direct delivery of adenoviral CRISPR/Cas9 vector into the blastoderm for generation of targeted gene knockout in quail. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116(27), 13288-13292.
- Lee, K. Y., Choi, H. J., Park, K. J., Woo, S. J., Kim, Y. M., and Han, J. Y. 2022. Development and characterization of a CRISPR/Cas9-mediated RAG1 knockout chicken model lacking mature B and T cells. *Front Immunol* 13, 892476.
- Lee, K. Y., Lee, H. J., Choi, H. J., Han, S. T., Lee, K. H., Park, K. J., Park, J. S., Jung, K. M., Kim, Y. M., Han, H. J., and Han, J. Y. 2020. Highly elevated base excision repair pathway in primordial germ cells causes low base editing activity in chickens. *FASEB J* 34(12), 15907-15921.
- Lee, S. B., Park, Y. H., Chungu, K., Woo, S. J., Han, S. T., Choi, H. J., Rengaraj, D., and Han, J. Y. 2020. Targeted Knockout of MDA5 and TLR3 in the DF-1 Chicken Fibroblast Cell Line Impairs Innate Immune Response Against RNA Ligands. *Front Immunol* 11(678).
- Lillico, S. G., Sherman, A., McGrew, M. J., Robertson, C. D., Smith, J., Haslam, C., Barnard, P., Radcliffe, P. A., Mitrophanous, K. A., Elliot, E. A., and Sang, H. M. 2007. Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(6), 1771-1776.
- Liniger, M., Summerfield, A., Zimmer, G., McCullough, K. C., and Ruggli, N. 2012. Chicken cells sense influenza A virus infection through MDA5 and CARDIF signaling involving LGP2. *J Virol* 86(2), 705-717.
- Long, J. S., Giotis, E. S., Moncorge, O., Frise, R., Mistry, B., James, J., Morisson, M., Iqbal, M., Vignal, A., Skinner, M. A., and Barclay, W. S. 2016. Species difference in ANP32A underlies influenza A virus polymerase host restriction.

- Nature* 529(7584), 101-104.
- McGrew, M. J., Sherman, A., Ellard, F. M., Lillico, S. G., Gilhooley, H. J., Kingsman, A. J., Mitrophanous, K. A., and Sang, H. 2004. Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep* 5(7), 728-733.
- Mozdziak, P. E., Angerman-Stewart, J., Rushton, B., Pardue, S. L., and Petite, J. N. 2005. Isolation of chicken primordial germ cells using fluorescence-activated cell sorting. *Poult Sci* 84(4), 594-600.
- Mukae, T., Okumura, S., Watanobe, T., Yoshii, K., Tagami, T., and Oishi, I. 2020. Production of Recombinant Monoclonal Antibodies in the Egg White of Gene-Targeted Transgenic Chickens. *Genes (Basel)* 12(1).
- Nakamura, Y., Usui, F., Ono, T., Takeda, K., Nirasawa, K., Kagami, H., and Tagami, T. 2010. Germline replacement by transfer of primordial germ cells into partially sterilized embryos in the chicken. *Biol Reprod* 83(1), 130-137.
- Nandi, S., Whyte, J., Taylor, L., Sherman, A., Nair, V., Kaiser, P., and McGrew, M. J. 2016. Cryopreservation of specialized chicken lines using cultured primordial germ cells. *Poult Sci* 95(8), 1905-1911.
- Oishi, I., Yoshii, K., Miyahara, D., Kagami, H., and Tagami, T. 2016. Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports* 6(1), 23980.
- Oishi, I., Yoshii, K., Miyahara, D., and Tagami, T. 2018. Efficient production of human interferon beta in the white of eggs from ovalbumin gene-targeted hens. *Sci Rep* 8(1), 10203.
- Ono, T., and Machida, Y. 1999. Immunomagnetic purification of viable primordial germ cells of Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 122(2), 255-259.
- Park, J. S., Choi, H. J., Jung, K. M., Lee, K. Y., Shim, J. H., Park, K. J., Kim, Y. M., and Han, J. Y. 2023. Production of recombinant human IgG1 Fc with beneficial N-glycosylation pattern for anti-inflammatory activity using genome-edited chickens. *Commun Biol* 6(1), 589.
- Park, J. S., Lee, K. Y., and Han, J. Y. 2020. Precise Genome Editing in Poultry and Its Application to Industries. *Genes (Basel)* 11(10).
- Park, T. S., and Han, J. Y. 2000. Derivation and characterization of pluripotent embryonic germ cells in chicken. *Mol Reprod Dev* 56(4), 475-482.
- Park, T. S., Hong, Y. H., Kwon, S. C., Lim, J. M., and Han, J. Y. 2003. Birth of

- germline chimeras by transfer of chicken embryonic germ (EG) cells into recipient embryos. *Mol Reprod Dev* 65(4), 389-395.
- Park, T. S., Lee, H. G., Moon, J. K., Lee, H. J., Yoon, J. W., Yun, B. N., Kang, S. C., Kim, J., Kim, H., Han, J. Y., and Han, B. K. 2015. Deposition of bioactive human epidermal growth factor in the egg white of transgenic hens using an oviduct-specific minisynthetic promoter. *FASEB J* 29(6), 2386-2396.
- Park, T. S., Lee, H. J., Kim, K. H., Kim, J.-S., and Han, J. Y. 2014. Targeted gene knockout in chickens mediated by TALENs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(35), 12716-12721.
- Park, Y. H., Chungu, K., Lee, S. B., Woo, S. J., Cho, H. Y., Lee, H. J., Rengaraj, D., Lee, J. H., Song, C. S., Lim, J. M., and Han, J. Y. 2020. Host-Specific Restriction of Avian Influenza Virus Caused by Differential Dynamics of ANP32 Family Members. *J Infect Dis* 221(1), 71-80.
- Park, Y. H., Woo, S. J., Chungu, K., Lee, S. B., Shim, J. H., Lee, H. J., Kim, I., Rengaraj, D., Song, C. S., Suh, J. Y., Lim, J. M., and Han, J. Y. 2021. Asp149 and Asp152 in chicken and human ANP32A play an essential role in the interaction with influenza viral polymerase. *FASEB J* 35(6), e21630.
- Petitte, J. N., Clark, M. E., Liu, G., Verrinder Gibbins, A. M., and Etches, R. J. 1990. Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. *Development* 108(1), 185-189.
- Rengaraj, D., Cha, D. G., Lee, H. J., Lee, K. Y., Choi, Y. H., Jung, K. M., Kim, Y. M., Choi, H. J., Choi, H. J., Yoo, E., Woo, S. J., Park, J. S., Park, K. J., Kim, J. K., and Han, J. Y. 2022. Dissecting chicken germ cell dynamics by combining a germ cell tracing transgenic chicken model with single-cell RNA sequencing. *Comput and Struct Biotechnol J* 20, 1654-1669.
- Reynaud, G. 1976. Reproductive capacity and offspring of chickens submitted to a transfer of primordial germ cells during embryonic life. *Wilehm Roux Arch Dev Biol* 179(2), 85-110.
- Salter, D. W., Smith, E. J., Hughes, S. H., Wright, S. E., Fadly, A. M., Witter, R. L., and Crittenden, L. B. 1986. Gene insertion into the chicken germ line by retroviruses. *Poult Sci* 65(8), 1445-1458.
- Schusser, B., Collarini, E. J., Yi, H., Izquierdo, S. M., Fesler, J., Pedersen, D., Klasing, K. C., Kaspers, B., Harriman, W. D., van de Lavoie, M. C., Etches, R. J., and Leighton, P. A. 2013. Immunoglobulin knockout chickens via efficient

- homologous recombination in primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(50), 20170-20175.
- Tajima, A., Naito, M., Yasuda, Y., and 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.
- Taylor, L., Carlson, D. F., Nandi, S., Sherman, A., Fahrenkrug, S. C., and McGrew, M. J. 2017. Efficient TALEN-mediated gene targeting of chicken primordial germ cells. *Development* 144(5), 928-934.
- van de Lavoie, M. C., Collarini, E. J., Leighton, P. A., Fesler, J., Lu, D. R., Harriman, W. D., Thiyagasundaram, T. S., and Etches, R. J. 2012. Interspecific germline transmission of cultured primordial germ cells. *PLoS One* 7(5), e35664.
- van de Lavoie, M. C., Diamond, J. H., Leighton, P. A., Mather-Love, C., Heyer, B. S., Bradshaw, R., Kerchner, A., Hooi, L. T., Gessaro, T. M., Swanberg, S. E., Delany, M. E., and Etches, R. J. 2006. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature* 441(7094), 766-769.
- van de Lavoie, M. C., Mather-Love, C., Leighton, P., Diamond, J. H., Heyer, B. S., Roberts, R., Zhu, L., Winters-Digiacinto, P., Kerchner, A., Gessaro, T., Swanberg, S., Delany, M. E., and Etches, R. J. 2006. High-grade transgenic somatic chimeras from chicken embryonic stem cells. *Mech Dev* 123(1), 31-41.
- Vick, L., Li, Y., and Simkiss, K. 1993. Transgenic birds from transformed primordial germ cells. *Proc Biol Sci* 251(1332), 179-182.
- Waddington, D., Gribbin, C., Sterling, R. J., Sang, H. M., and Perry, M. M. 1998. Chronology of events in the first cell cycle of the polyspermic egg of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Int J Dev Biol* 42(4), 625-628.
- Wentworth, B. C., Tsai, H., Hallett, J. H., Gonzales, D. S., and Rajcic-Spasojevic, G. 1989. Manipulation of avian primordial germ cells and gonadal differentiation. *Poult Sci* 68(7), 999-1010.
- Wernery, U., Liu, C., Baskar, V., Guerineche, Z., Khazanehdari, K. A., Saleem, S., Kinne, J., Wernery, R., Griffin, D. K., and Chang, I.-K. 2011. Primordial Germ Cell-Mediated Chimera Technology Produces Viable Pure-Line Houbara Bustard Offspring: Potential for Repopulating an Endangered Species. *PLoS One* 5(12), e15824.
- Woo, S. J., Choi, H. J., Park, Y. H., Rengaraj, D., Kim, J. K., and Han, J. Y. 2022. Amplification of immunity by engineering chicken MDA5 combined with the

- C terminal domain (CTD) of RIG-I. *Appl Microbiol Biotechnol* 106(4),1599-1613.
- Yasuda, Y., Tajima, A., Fujimoto, T., and Kuwana, T. 1992. A method to obtain avian germ-line chimaeras using isolated primordial germ cells. *Reproduction* 96(2), 521-528.
- Zhao, D.-F., and Kuwana, T. 2003. Purification of avian circulating primordial germ cells by Nycodenz density gradient centrifugation. *Br Poult Sci* 44(1), 30-35.