

P-7 생쥐 배아의 전사와 발생에서 DNA/RNA 메틸화의 역할

김종철, 홍석호, 이정복, 오은정, 양혜영, 김성례¹, 김문규
한양대학교 생물학과, 이화여대 의학과¹

서론

생쥐에서 착상전 초기배아 발생과정은 난할과 밀접 및 포배강형성과 같은 분화과정으로 특징지어지는데, 이것은 시공간적인 유전자발현과 밀접한 관련을 맺고 있다(Kidder and McLachlin, 1985). 생쥐 배아발생 과정에서 DNA 메틸화(DNA methylation)의 중요성은, 상동재조합 실험에서 DNA methyltransferase 유전자를 targeted disruption한 결과, 배아의 DNA 메틸화 정도가 3배나 감소되며 임신중기 시기에 죽는다(Li et al., 1992)는 사실에 의해 확인되었다. 메틸화에 의한 DNA 변형은 cis-acting factor를 변화시키는 하나의 인자이며 수많은 유전자 조절기작 중 하나로 trans-acting factor의 조성은 변화시키지 않은채 분열중인 세포의 DNA에 존재하게 된다.

생쥐에서 전반적인 DNA 메틸화양상은 분화가 끝난 체세포에서 60-90 % 정도를 유지하고 있으며, 생식관련 세포들에서는 매우 낮은 수준을 유지하고 있다. 각기 다른 메틸화양상을 갖는 배우자는 수정과 더불어 일정수준의 메틸화 정도를 유지하다 8-세포기에서 포배기 사이에 전반적인 탈메틸화가 일어나게 된다. 이후 각 조직특이적인 세포로의 분화과정에서 DNA 메틸화가 일어나는 것으로 알려져 있다(Monk, 1995). 이러한 과정에서 DNA 메틸화는 cis-acting factor의 조성을 변화시킴으로써 세포특이 유전자의 발현과 억제를 조절, 세포 분화과정에 관여하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 착상전 초기배아에서 DNA 메틸화에 의한 유전자발현 조절과 배아발생 과정에서의 역할에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 따라서, DNA 메틸화 억제제 처리실험을 통하여 유전자 발현과정에서의 작용기작과 난할 그리고 형태형성 과정에서 역할을 알아보았다.

재료 및 방법

배아의 수획과 배양

Albino mice(6-8 weeks old, ICR strain)에 superovulation 방법을 이용하여 상실기 배아를 수획하였다. 그리고, 기본배양액은 0.3% BSA를 함유한 KSOM(Potassium Simplex Optimized Medium) 배양액을 사용하여 CO₂ 배양기내에서 24 시간동안 배양하였다.

Drugs 처리

Cytidine analog이며 DNA 메틸화 억제제로 알려진 5-azacytidine (5-azaCR)과 5-aza-2'-

deoxycytidine (5-azaCdR) 그리고 6-azacytidine (6-azaCR)은 10 mM stock solution을 기본배양액에 희석하여 최종농도가 100 μM이 되게하여 실험에 사용하였다. 그리고 aphidicolin (aphi)은 100 μg/ml (0.3 μM) 농도를 사용하였다.

배아의 할구 계수

배아의 할구 수는 배아를 0.1 % glutraldehyde로 고정한 후 핵염색 물질인 Hoechst 33258로 5 분간 염색하여 형광현미경으로 관찰, 계수하였다.

Total RNA 추출, cDNA 합성 및 PCR

Total RNA는 30개의 배아에서 TRIzol을 사용하여 추출하였다. cDNA 합성은 30개의 배아에 상응하는 total RNA, 그리고 PCR은 3개 배아에 상응하는 cDNA를 갖고 수행하였다.

통계적 검증

실험에서 포배강 형성율과 할구 수에 대한 유의성 검증은 Student-t test로하였으며, 이때 p<0.05인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 논의

메틸화의 유지와 배아발생

hCG 주사 후 72 시간째에 수획한 상실기배아를 cytidine analog이며 DNA methylation 억제제인 5-azaCR과 5-azaCdR 그리고 6-azaCR(제2대조군)을 함유한 0.3% BSA+KSOM 배양액(제1대조군)에 24 시간동안 배양하여 포배강형성 여부를 관찰하였으며, DNA 염색물질(Hoechst 33258)로 배아를 염색하여 형광현미경으로 할구 수를 조사하였다. 포배강 형성율은 5-azaCR과 5-azaCdR 처리군에서 각각 6.0±1.3%와 8.0±8.0%로 유의하게(p<0.005) 낮았다. 또한, 할구 수도 14.0±1.2개와 12.6±1.5개로 대조군의 45.8±10.7개 보다 유의하게(p<0.05) 낮았다. 이러한 결과는 배아자체의 DNA 메틸화의 유지가 정상발생에 필수적임을 알 수 있으며, 메틸화에 의한 배아발생 조절기작이 존재함을 암시하고 있다. 그럼에도 불구하고 5-azaCR과 5-azaCdR이 배아발생을 억제하는 기작은 모르고 있는 실정이다. 이전의 실험자들의 보고 (Jones and Taylor, 1980)에 의하면 5-azaCR과 5-azaCdR은 복제기간동안 DNA로 incorporation되어 새로이 합성된 DNA strand의 메틸화를 억제함으로써 억제된 유전자를 활성화 시키거나 세포분화를 유도하는 등의 생물학적인 효과를 나타낸다고 보고하고 있다.

메틸화 억제제의 작용기작

동일 시기의 배아에 DNA 합성억제제인 aphI (제2대 조균)과 5-azaCR 또는 5-azaCdR을 함유한 0.3 % BSA +KSOM 배양액 (제1대조균)에 24 시간동안 배양하여 포배강형성 여부를 관찰하였다. aphI+5-azaCR 처리군의 포배강 형성율은 8.0±8.0%로 제1대조균의 93.0±3.7%와 제2대조균의 41.3±18.8%에 비하여 유의하게 ($p<0.05$) 낮았다. 그러나, aphI+5-azaCdR 처리군은 포배강 형성율이 40.9±5.5%로 제1대조균의 93.0±3.7%에 비해서 여전히 낮았으나 제2대조균의 41.3±18.8%와 차이를 보이지 않았다. 이것은 5-azaCR과 5-azaCdR이 배아발생을 억제하는 기작이 서로 다름을 암시하고 있다. 결과적으로, 5-azaCdR은 주로 DNA에 incorporation되어 작용하는 것으로 사료되지만, 5-azaCR의 경우는 DNA 보다는 RNA에 incorporation되어 작용하는 것으로 여겨진다.

유전자의 전사과정에서 탈메틸화의 영향

DNA 메틸화 억제제가 처리된 동일시기의 배아에서, 전사인자로서 세포분열에 밀접하게 관련되어 있는 c-myc proto-oncogene과 fluid transport에 관련이 있는 Na^+,K^+ -ATPase 유전자 그리고 endogenous control로써 purine biosynthesis에 관여하며 house keeping 기능을 갖는 hprt 유전자들의 전사 여부를 RT-PCR 방법으로 조사하였다. 0, 2, 6, 8, 16, 24 시간 배양 후, hprt mRNA는 5-azaCR과 5-azaCdR 처리군에서 거의 변화가 없었다. 그러나, c-myc mRNA의 경우, 5-azaCdR 처리군에서는 모두 검출되었으나, 5-azaCR 처리군에서는 6 시간째부터 검출되지 않았다. Na^+,K^+ -ATPase mRNA는 5-azaCdR 처리군에서는 모두 검출되었으며, 5-azaCR 처리군에서도 16 시간까지는 검출되었으나 24 시간째에는 검출되지 않았다.

요약

생물체에서 유전외적 변형의 하나인 DNA 메틸화는 cis-acting factor의 조성변화를 통하여 세포특이 유전자의 발현과 virus latency, genomic imprinting, mutagenesis등과 같은 생물학적 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(reviewed by Olle Heby, 1995).

5-azaCR, 5-azaCdR 그리고 6-azaCR의 처리결과는 배아자체의 DNA 메틸화의 유지가 정상발생에 필수적임을 알 수 있으며, 메틸화에 의한 배아발생 조절기작이 존재함을 암시하고 있다.

이러한 과정에서, 5-azaCR과 5-azaCdR은 서로다른 경로를 통하여 배아발생에 관여함을 보여주었다. 즉, 5-azaCdR은 주로 DNA에 incorporation되어 작용하는 것으로 여겨지며, 5-azaCR은 DNA 보다는 RNA에 incorporation되어 작용하는 것으로 나타났다. 그리고, 비록 소수의 유전자만이 조사되었지만, 5-azaCdR의 incorporation에한 cis-acting factor의 변화는 전사인자인 c-myc proto-oncogene과 fluid 수송에 관여하는 Na^+,K^+ -ATPase 유전자의 전사를 억제하지 않았다. 반면, 5-azaCR의 RNA로의 incorporation은 전사인자인 c-myc proto-oncogene의 전사를 억제하였으며, 연이어 fluid 수송에 관련되어있는 Na^+,K^+ -ATPase 유전자의 전사를 억제 하였다. 이것은 아마도 RNA로 incorporation된 5-azaCR은 RNA의 post-transcriptional processing에 영향을 주어 trans-acting factor의 조성률 변화, 전사적 repression을 유발한 것으로 사료된다.

생쥐 착상전 초기배아에서 DNA 메틸화는 short-term하게는 cis-acting factor로써 전사적수준에서 유전자발현 조절하며, 그리고 유전자발현을 통하여 long-term하게는 배아발생에 관여 할 것이라고 사료된다.

참고문헌

- Heby O (1995) DNA methylation and polyamines in embryonic development and cancer. *Int J Dev Biol* 39: 737-757.
- Jones PA and Taylor SM (1980) Cellular differentiation, cytidine analogs, and DNA methylation. *Cell* 20: 85-93.
- Kidder GM and McLachlin JR (1985) Timing of transcription and protein synthesis underlying morphogenesis in preimplantation mouse embryos. *Dev Biol* 112: 265-275.
- Li E, Bestor TH, and Jaenisch R (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69: 915-926.
- Monk M (1995) Epigenetic programming of differential gene expression in development and evolution. *Devel Genet* 17: 188-197.