

상호작용에 의해서 processing되고 있다고 보여지는 Notch1의 활성화된 형태인 NotchIC가 핵에서도 관찰된 점으로 보아 인간배아줄기세포에서도 미분화 상태 유지에 관계할 가능성을 확인하였다. 이런 결과를 뒷받침하는 것은 인간배아줄기세포를 배양할 때에 한 colony에서 자연 분화된 부분과 미분화 상태가 공존하는 경우가 종종 관찰되는데 이런 colony에서 Notch1의 발현이 미분화 표지인 Oct-4와 SSEA-4와 같은 패턴으로 분화되지 않은 곳에서는 발현되지만 자연 분화된 부분에서는 줄어든다는 점이다.

**Conclusions:** 본 연구에서는 Notch 신호가 인간배아줄기세포에서 자가복제능을 유지하는데 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 분화 억제 및 lineage commitment에도 관여할 가능성에 대해서 알아본 것이다. 우리의 결과들은 생쥐 모델에서 Notch 신호가 분화를 억제하여 미분화상태 유지에 관여한다는 기존의 보고와 일치한다. 또한 siRNA나 lentivirus 등을 이용하여 Notch 발현을 억제하거나 그 하위단계 유전자들의 발현을 억제하여 분화가 가속화되는지를 확인하는 실험을 수행하여 본다면 미분화상태가 유지되는데 중요한 하위단계의 pathway를 찾을 수 있을 것으로 기대된다. 이러한 결과들은 인간배아줄기세포의 미분화 특성을 한층 더 깊이 이해하는 초석이 될 것이라 사료된다.

## O-16(기초) Changes in Mitochondria and Oxidative Metabolism During the Early Differentiation of Human Embryonic Stem Cells

Dae Hoon Yoo, Hae Seon Kang, Byoung Yong Ahn,  
Kyong Soo Park, Hong Kyu Lee, Young Min Cho

*Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea*

**Background & Objectives:** Prior to vascularization in vivo, embryonic cells and many of their differentiated progeny exist in an environment with an oxygen partial pressure that is often far less than 40 mmHg. Therefore, they must rely on anaerobic metabolism to produce ATP. Once oxygenated blood comes into the embryonic tissues after implantation, mitochondrial oxidative phosphorylation system will be activated. We aimed to examine the changes in mitochondrial content in undifferentiated human embryonic stem (hES) cells, which have been derived from inner cell mass of blastocyst, and their early differentiation stage in vitro.

**Method:** We removed feeder cells (STO), bFGF, and SR from undifferentiated hES cells (SNU hES3) for 1 and 2 weeks to induce spontaneous differentiation. The presence of Oct4 and nanog mRNA expression were used as markers for stemness. Mitochondria were stained with Mitotracker and also were observed with electron microscope. Intracellular ATP content, intracellular amount of reactive oxygen species, and antioxidant system were measured.

**Results:** Undifferentiated hES cells have scanty amount of mitochondria compared to the differentiated cells. Interestingly, the margin of hES cell colony in the very early differentiation stage have lots of mitochondria compared to the undifferentiated cells inside of the colony. Therefore, Mitotracker staining can be used for one of the differentiation markers. Electron microscope showed that the hES cells have few

mitochondria, which forms some cluster around the nucleus and differentiated cells have numerous mature mitochondria. Real-time PCR for mitochondrial DNA showed that the mitochondrial DNA copies were increased more than 30% compared to undifferentiated hES cells. Intracellular ATP content increased about 4 fold and ROS amount also increased about 3 fold after differentiation. Glutathione peroxidase 1 expression were increased in the differentiated ES cells compared to undifferentiated cells.

**Conclusions:** In summary, undifferentiated hES cells have few mitochondria and lower intracellular ATP content. However, the mitochondrial content dramatically increases in the early differentiation stage followed by the increase of the intracellular ATP content. ROS, by-product of oxidative respiration, were also increased and antioxidant system was activated to reduce oxidative stress.

## 0-17(기초) 생쥐 초기 배아와 배아줄기세포에서 Amino Acid Transporter 및 mTOR Pathway 관련 유전자의 발현과 조절

최혜원 · 이형송 · 신미라 · 임천규 · 전진현

성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 생식생물학 및 불임연구소

**Background & Objectives:** 아미노산은 세포의 가장 기본적인 대사물질로서 이들의 공급과 결핍이 세포의 생리화적인 기능과 관련된 유전자의 발현에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 초기 배아 및 배아줄기세포 배양액에 첨가한 아미노산이 그들의 수송에 관여하는 amino acid transporter (AAT) 유전자와 세포의 증식과 관련이 있는 mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway 와 어떠한 관련성이 있는지 살펴보고자 하였다.

**Method:** 생쥐 초기 배아는 일차적으로 대조군인 *in vivo* 배아와 아미노산이 첨가되어 있는 G1/G2 배양액에서 2-세포기에서 포배기까지 체외배양하면서 각각의 발생 단계에 따라 배아를 수확하여 AAT 유전자 발현 양상을 분석하였다. 이차적으로 아미노산이 들어있지 않은 T6 배양액에서 체외배양한 배아에서의 AAT와 mTOR 유전자의 발현 양상을 G1/G2에서 배양한 배아와 비교하였다. 배아줄기세포는 계대배양과정에서 지지세포 (feeder cell)을 제거한 후 아미노산이 첨가된 DMEM/F-12와 아미노산을 첨가하지 않은 T6 배양액에서 24시간 동안 배양한 후 시료를 수확하였다. 이러한 시료들에서 RNA를 추출하여 4종류의 AAT (mATB, mASCT2, mLAT1, my + LAT2)와 mTOR pathway에 관여하는 유전자 mTOR, mS6K1, mS6K2, mE1F4e 대한 정량적인 real time RT-PCR을 수행하였다.

**Results:** 생쥐 초기 배아의 발생 단계별 AAT 유전자 발현 양상에서는 대조군인 *in vivo*에 비해 G1/G2 배양액에서 체외배양한 배아에서의 유전자 발현 양이 통계적으로 유의하게 낮게 나타났다 ( $p < 0.05$ ). 그리고 아미노산이 첨가된 G1/G2 배양액에서 배양한 배아들에서 아미노산이 포함되지 않은 T6 배양액에 배양한 배아에 비해 AAT와 mTOR pathway 관련 유전자의 발현 양이 통계적으로 유의하게 높게 관찰되었다 ( $p < 0.01$ ). 또한, 배아줄기세포에서도 아미노산이 첨가된 DMEM/F-12 배양액에서 AAT와 mTOR pathway 관련 유전자의 발현 양이 T6 배양액에 비해 통계적으로 유의하게 높게 발현되었다 ( $p < 0.01$ ).

**Conclusions:** 결론적으로 생쥐 초기 배아와 배아줄기세포의 체외배양액에 첨가된 아미노산에 의해