

생쥐 태아 및 성체 조직에서의 N-Methylpurine-DNA Glycosylase 유전자의 발현

손태중¹ · 김남근^{1,2} · 이숙환^{1,2} · 한세열^{1,2} · 고정재^{1,2} · 박 찬^{1,3} · 이우식^{1,3}
이 찬^{1,3} · 이용희^{1,4} · 차광열^{1,2}

¹포천중문 의과대학교 기초의학연구소, ²차병원 여성의학연구소 유전학연구소,
³분당 차병원 산부인과, ⁴해부병리과

Expression of N-Methylpurine-DNA Glycosylase Gene during Fetal Development and Adult in Mice

Tae-Jong Sohn¹, Nam-Keun Kim^{1,2}, Sook-Hwan Lee^{1,2}, Sei-Yul Han^{1,2}, Jung-Jae Ko^{1,2}, Chan Park^{1,3},
Woo-Sik Lee^{1,3}, Chan Lee^{1,3}, Yong-Hee Lee^{1,4} and Kwang-Yul Cha^{1,2}

¹Institute of Medical Research, College of Medicine, Pochon CHA University, Pochon 487-800

²Human Genetics Lab. Infertility Medical Center, CHA General Hospital, Seoul 135-081

³Obstetrics and Gynecology, ⁴Pathology, Pundang CHA General Hospital, Sungnam 463-070

요 약 : N-Methylpurine-DNA glycosylase (MPG)는 DNA에서 N-methylpurine과 다른 손상된 purine기를 제거하는 DNA 회복 효소이다. 생쥐의 임신 8일 후의 태아조직부터 생후 400일까지의 조직들로부터 RT-PCR 방법으로 MPG mRNA 발현을 조사하였다. MPG mRNA는 태아 형성기동안 많은 양이 발현되었으며, 특히 15일에서 가장 높게 발현되었다. 태반에서의 MPG mRNA는 8 p.c. (post coitum)부터 18 p.c. 까지 계속적으로 감소하였다. 태아 형성기의 뇌와 간 조직에서 높은 mRNA 발현을 보였으나, 400일 되는 성체에서는 현저히 감소하였다. 부정소, 정낭, 정소, 정관, 난소, 난관 그리고 자궁 등의 생식기관에서의 MPG mRNA는 비교적 높게 발현되었고, 그들 중 부정소에서의 발현 정도가 가장 높았다. 이러한 결과들로 보아 MPG 유전자는 태아 발생단계 및 조직 특이적으로 발현됨을 알 수 있었다.

ABSTRACT : N-Methylpurine-DNA glycosylase (MPG) removes N-methylpurine and other damaged purines in DNA. RT-PCR analysis revealed MPG mRNA expression at various tissues of fetal development from day 8 to day 18 fetus and day 400 mature adult. The MPG transcripts were abundant during fetal development in mice. In placenta, the MPG mRNA was continuously decreased from day 8 post coitum (p.c) to day 18 p.c. fetus. The high level of mRNA in fetal brain and liver was drastically declined in day 400 mature adult. The expression of MPG, originally characterized by its highest level of expression in the epididymis of adult mouse, was detected with high level in several other reproductive organ, including the ovary, oviduct, testis, vas deference, uterus, and seminal vesicles. These results demonstrate developmental stage- and tissue-specific variation of MPG gene expression.

Key words : MPG, DNA repair, Tissue-specific, mRNA, Fetus.

서 론

DNA 회복은 자발적 혹은 외부의 물리적·화학적 요소들
로 인한 지속적인 유전자 손상으로부터 계승을 유지하는데 필
요한 일반적인 생체 현상이다. N-Methylpurine- DNA gly-
cosylase (MPG)는 alkyl adduct에 의해 손상된 DNA로부터
우선적으로 N-alkylpurines (7-methylguanine/3-methyladen-
ine)를 제거하며, 이 AP-endonuclease, DNA polymerase 그
리고 ligase에 의한 DNA 회복과정을 수반한다 (Lindahl et
al., 1982; Mitra and Kaina, 1993; Tatsuka et al., 1995).

DNA손상 후 일련의 DNA 회복 시스템이 제대로 작동하
지 않는다면, DNA는 돌연변이, 염색체 이상등의 유전적인
질병을 초래하게 될 것이다. 이 회복 시스템의 결여로 인한
cell death, point mutations, chromosome aberrations, 그리
고 carcinogenesis 과정의 유발이 많은 연구자들에 의해 보고
되었다 (Craddock and Handerson, 1982; Generoso, 1982;
Strauss, 1985; Lijinsky, 1986; Loeb and Preston, 1986;
Washington et al., 1989). 또한 DNA회복 활성은 노화과정
과 밀접한 관련을 보이고 있으며 (Kovacs et al., 1984;
Licastro and Walford, 1986), DNA손상은 출생 후보다는 초
기 배발생 혹은 태아 발생단계에 더욱 더 심각한 문제를 야

기한다 (Boue et al., 1985; Ashwood-Smith and Edward, 1996).

MPG의 cDNA가 사람과 쥐에서 분리되어 특성이 규명되었으나 (Leona et al., 1991; Tatsuka et al., 1995), 이 DNA 회복효소의 발생단계에서의 조절, 특히 배 발생기, 태아 발생단계 및 생식기관에서 분자수준의 발현과 조절에 대한 연구는 미미한 실정이다 (Kim et al., 1997, 1998a,b). 본 연구에서는 Balb/c 생쥐의 태아 발생단계에서의 MPG mRNA 발현을 조사하였으며, 성체의 각 조직별 발현을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 각 조직 채취

Balb/c 생쥐를 교배하여 vaginal plug가 관찰된 날을 임신 1일로 정하였다. 임신된 생쥐에서 8, 10, 15, 18일째의 태아와 태반 조직을 채취하였다. 부정소, 정낭, 정소, 정관, 난소, 난관, 그리고 자궁을 포함하는 생식기관은 6-7주의 생쥐로부터 획득하였으며, 13개월 (400일)된 생쥐로부터 각각의 조직들을 취하고 액체질소에 담근 후 -70°C 에 보관하였다. 모든 조직들은 3 세트씩 채취하여 세번의 실험을 수행하였다.

2. RNA 분리 및 RT-PCR

생쥐의 태아, 태반, 간, 뇌 조직, 및 성숙된 생쥐의 다양한 조직에서의 RNA는 Chomczynski and Sacchi (1987) 방법에 의해 분리하였다. MPG 및 β -actin 유전자의 RT-PCR 과정을 수행하기 위한 프라이머는 Bioneer Co. (Korea)로부터 주문 합성하였다. 생쥐 MPG 유전자의 증폭을 위한 프라이머는 Tatsuka et al. (1995) 에서 발췌했으며, 프라이머 합성은 genomic DNA 증폭의 결과를 배제하기 위하여 생쥐 MPG 유전자에서의 2개의 intron (intron 2, 3)을 포함시켜 exon 2-4 까지를 증폭하여 470 bp가 합성되도록 고안하였다. 이를 위한 합성된 프라이머는 #1; 5'-CAGAGCAGCAGCAGACCCC-3', #2; 5'-CCTTGAGGGAACGGCCGACAGTGC-3' 이다. 대조군으로 사용되어진 β -actin 유전자의 증폭을 위한 프라이머는 Tokunaga et al. (1986)으로부터 발췌하였고, 그 염기서열은 #1; 5'-GATTACTGCTCTGGCTCCTA-3', #2; 5'-CAGTAACAGTCCGCCTAGAA-3'이며, β -actin 유전자중 195 bp가 증폭되도록 고안하였다.

RNA는 cDNA로 역전사 시켰고, 중합연쇄반응 (polymerase chain reaction)을 수행하였으며, 이를 위한 시약은 Bioneer Co. 에서 구입하였다. 역전사 과정은 42°C 에서 60분간 수행하였으며, 95°C 에서 5분간 열을 가해 역전사 과정을

종결하였다. 중합연쇄 과정은 포화단계에 도달하지 않도록 25 cycles를 수행하였으며, Thermal Cycler (Perkin Elmer, 2400)를 사용하여 95°C 에서 30초간 변성, 64°C 에서 서냉 복원, 그리고 72°C 에서 30초간 신장과정을 수행하였다. 마지막 신장은 72°C 에서 5분간 수행하였다. 각각의 RT-PCR 산물들은 1.2% agarose gel (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EtBr) 안에서 전기영동 하였다. 각 조직에서의 MPG mRNA의 발현은 MPG/ β -actin의 상대적인 양을 densitometer (VIBER LOURMAT, France)를 사용하여 측정하였다.

3. 통계분석

통계학적 유의성 검정은 one-way AVONA 및 log linear model을 이용하여 수행하였으며, P값이 0.05 보다 작은 경우에 통계적으로 유의하다고 판정하였다. 실험은 적어도 3회 이상 실시하였다.

결 과

생쥐의 태아 조직과 태반에서 MPG mRNA의 조직 및 발생단계에 따른 유전자 발현을 RT-PCR 방법으로써 관찰하였다. 임신기간중 태아에서의 MPG 유전자 발현은 임신 8일 후 부터 15일까지 증가하였으며, 임신 18일에서는 다소 감소하였다 (Fig. 1A). 그러나, 태반 조직에서의 MPG mRNA 발현은 임신 8일부터 18일까지 계속적으로 감소하였다 (Fig. 1B). 태아와 성체의 뇌 조직에서의 발현은 임신 15, 18일된 태아에서 모두 높게 발현되었으나, 성체에서는 매우 낮게 나타났다 ($P < 0.01$) (Fig. 1C). 그리고, 태아의 간 조직에서는 임신 15일째 가장 높게 나타났으며, 임신 18일과 성체에서는 현저히 낮은 발현 양상을 보였다 ($P < 0.05$) (Fig. 1D). MPG mRNA 발현은 뇌와 간 조직에서 모두 성체에서 매우 낮게 나타났다 (Fig. 1C, D).

MPG mRNA 발현은 정소, 위, 근육, 흉선, 그리고 난소 조직에서는 비교적 높게 나타났고, 뇌, 심장, 신장, 간, 폐, 지라 조직에서는 비교적 낮게 나타났다. 특히, 생식기관인 난소 및 정소 조직에서 높게 발현되었으며, 이러한 결과는 6~7주의 생식기관에서도 비슷한 양상으로 나타났다 ($P < 0.05$) (Fig. 2).

출생후 6-7주된 생쥐의 생식기관에서의 MPG 유전자 발현을 보면 부정소 조직에서 가장 높게 나타났으며, 난소, 난관, 정소 조직에서는 비교적 강한 발현을 보였으나, 정낭, 정관, 자궁 조직에서는 비교적 낮은 발현을 보였다 (Fig. 3).

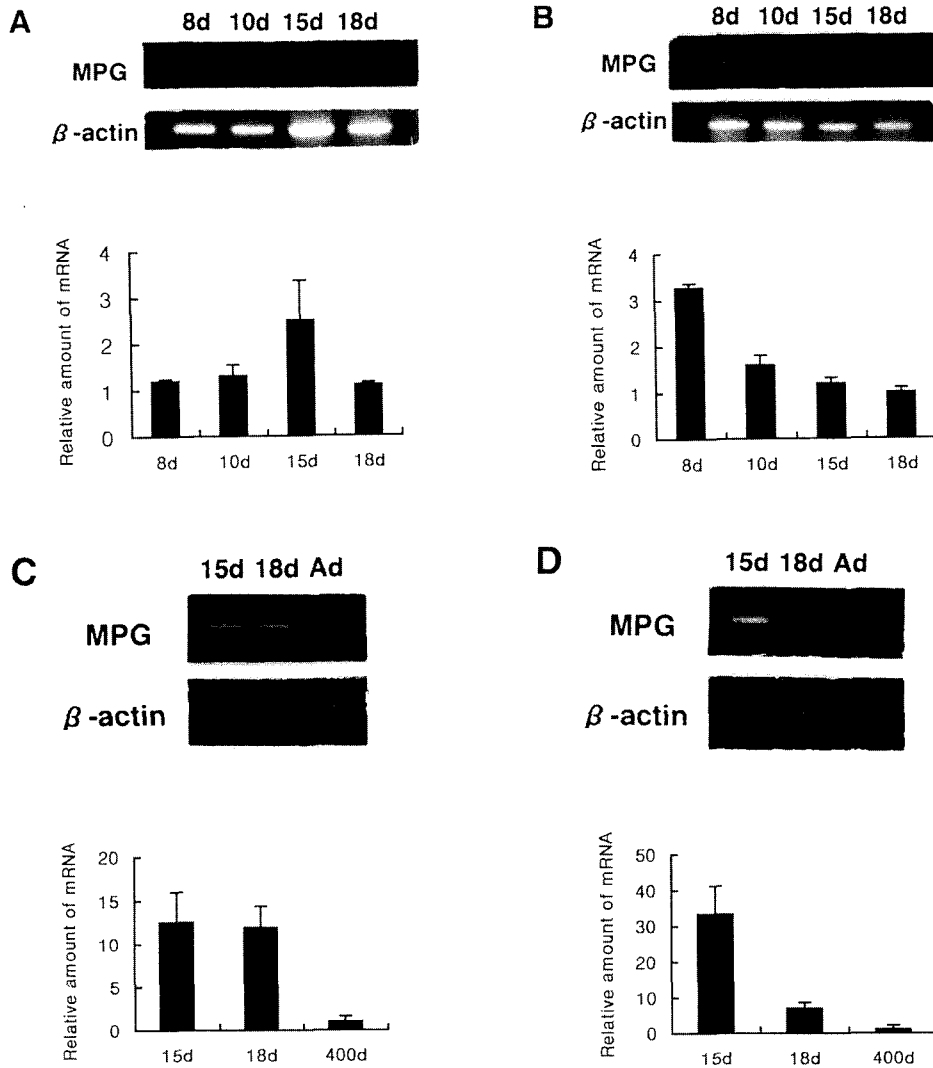


Fig. 1. Expression of MPG during various developmental stages of (A) whole fetus (B) placenta (C) fetal brain (D) fetal liver of Balb/c mice by RT-PCR. Relative amount of MPG were normalized with the level of β -actin mRNA and the levels were calculated by densitometer. (C) Fetal brain: $P < 0.01$, (D) Fetal liver: $P < 0.05$.

고 찰

본 연구에서는 생쥐의 태아 발생단계와 성체의 각 조직별 MPG mRNA 발현을 조사하였다. MPG mRNA는 태아 발생 시기에 따라 상이한 발현을 보였다. 생쥐의 임신 후 태아에서의 MPG mRNA 발현은 임신 15일에서 가장 높게 나타났으며, 임신 18일에는 명백히 감소함을 보였다 (Fig. 1A). 이러한 결과로 미루어 보아 임신 15일의 시기가 가장 활발한 기관형성 시기로 생각된다. 태반의 경우, mRNA의 발현은 임신 8일째부터 18일까지 계속적으로 감소하였다 (Fig. 1B). 그리고, 태아의 간 조직에서 이 효소의 mRNA를 분석한 결

과 임신 18일에 급격히 감소하였으며, 태아의 뇌 조직에서는 임신 후 18일까지 발현이 매우 높게 유지되었다 (Fig. 1C, D). 그러나, 성체시기에서의 MPG mRNA의 발현은 태아시기보다 현저히 감소됨이 관찰되었다. 성체시기의 이러한 발현의 감소는 이 시기의 세포증식의 감소와 관련이 있을 것으로 생각된다. MPG는 세포 내에서 DNA가 복제될 때 손상이 있는 DNA의 사슬을 복구하는데 관여하는 효소이다. 따라서 증대되는 세포분열과 MPG 유전자의 발현은 밀접한 관계가 있을 것으로 추측된다. 그러나, 성체 시기에는 손상된 DNA에 대한 회복 효소의 부족으로 효과적으로 대응하지 못하기 때문이라는 주장도 제기되고 있다 (Christi et al., 1997).

MPG mRNA 발현은 젊고, 성숙한 생쥐 (생후 4주~8주)

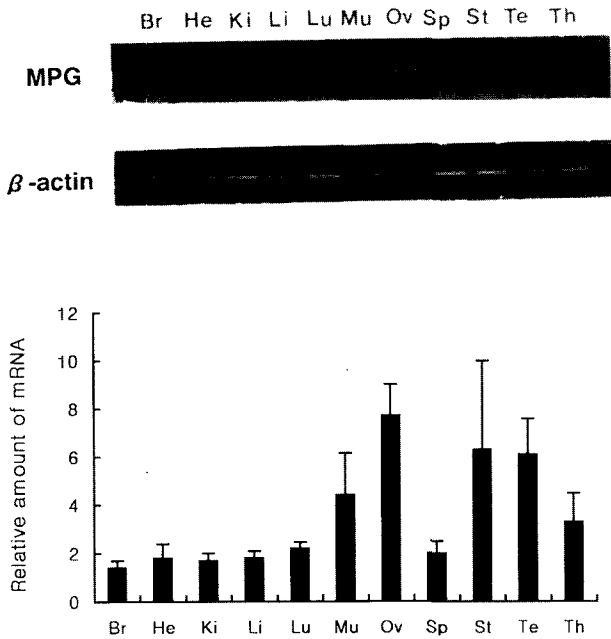


Fig. 2. Expression of MPG mRNAs from various tissues of Balb/c mature adult mice by RT-PCR. Relative amount of MPG were normalized with the level of β -actin mRNA and the levels were calculated by densitometer. $P < 0.05$ (MPG mRNA levels in ovary, stomach and testis differ significantly). Abbreviations: Br; brain, He; heart, Ki; kidney, Li; liver, Lu; lung, Mu; muscle, Sp; spleen, St; stomach, Te; testis, Th; thymus.

의 조직들보다는 태아시기와 생후 1주까지의 조직들에서 많은 양이 발현됨을 보였으나, 생식기관인 정소에서는 생후 1주된 생쥐보다는 생후 4주~8주된 생쥐에서 더 많은 MPG 유전자의 발현이 있음을 Northern blot으로 확인하였다 (Kim et al., 1998). 생쥐의 MPG mRNA 발현은 조직 특이적 발현을 명백히 보여주고 있다 (Fig. 2). 생식기관인 난소와 정소 조직에서의 이 효소의 mRNA는 매우 높은 발현을 나타냈으며, 위 조직에서도 역시 높은 발현을 보였다. 그런데, 위 조직에서의 발현은 개체간에 많은 차이를 보였다. 6~7주 된 생쥐의 생식기관으로부터 MPG mRNA의 발현을 조사한 결과 부정소에서 그 발현이 가장 높았으며, 난소, 정소조직에서 역시 MPG mRNA의 높은 발현을 보였다 (Fig. 3). 또다른 DNA 회복 유전자인 XPBC/ERCC-3는 정소 조직에서 높은 발현을 보였으며, 생식세포에서는 일반적으로 DNA 회복 효소의 발현이 증가함을 보고하고 있다 (Weeda et al., 1991; Engelward et al., 1993). 이는 저자들의 결과와도 일치한다. 이러한 결과로 미루어 보아 생식기관에서는 세포분열 및 증식이 다른 조직들보다 더 활발하게 일어나기 때문일 것으로 추정된다. 이런 이유로 생식기관에서의 MPG

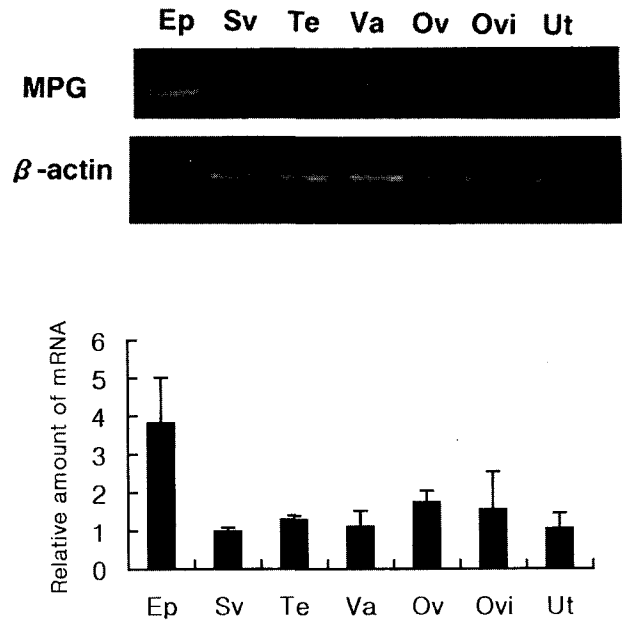


Fig. 3. Expression of MPG mRNA from reproductive organs of Balb/c mouse by RT-PCR. Relative amount of MPG were normalized with the level of β -actin mRNA and the levels were calculated by densitometer. Abbreviations: Te; testis, Ep; epididymis, Sv; seminal vesicle, Va; vas deferens, Ov; ovary, Ovi; oviduct, Ut; uterus.

유전자의 역할은 상당히 중요하리라 생각된다.

따라서, DNA 회복 효소인 MPG는 태아의 기관형성기를 거쳐 완전한 성체가 되었을 때 그 발현 정도가 낮아지지만, 정소와 난소 등을 포함하는 생식기관에서는 그 발현이 증가함을 알 수 있었다. 본 연구결과는 Kim et al. (1998a,b)에 의해 보고한 바 있는 Northern blot 방법에 의한 성체 (4-8주) 조직에서의 조직별 발현과 유사하며, 정소 조직에서 높게 발현되는 양상 등이 일치하였다.

저자들은 생쥐의 태아 발생단계와 성체의 조직들로부터 MPG 유전자의 발현정도를 RT-PCR 방법을 이용하여 조사하였다. 이 RT-PCR 방법은 너무 민감하기 때문에 양적인 변화의 측정에는 다소 무리가 있지만, 이를 보완하기 위하여 대조군 (β -actin)과 비교하여 분석하였고, 실험의 재현성을 확인하기 위하여 적어도 3회이상 수행하였다.

인용문헌

- Ashwood-Smith MJ, Edward RG (1996) DNA repair by oocytes. *Mol Hum Reprod* 2(1):46-51.
- Boue A, Boue J, Gropp A (1985) Cytogenetics of preg-

- nancy wastage. *Adv Hum Genet* 14:1-57.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Christi AW, David TG, Karah AS, Craig CC, Arlan R (1997) Analysis and modulation of DNA repair in aging. *Mech Aging Dev* 8:203-222.
- Craddock VM, Henderson AR (1982) The activity of 3-methyladenine DNA glycosylase in animal tissues in relation to carcinogenesis. *Carcinogenesis* 3:747-750.
- Engelward BP, Boosalis MS, Chen BJ, Deng Z, Siciliano MJ, Samson LD (1993) DNA glycosylase cDNA whose gene maps to chromosome 11. *Carcinogenesis* 14(2):175-181.
- Generoso WM (1982) A possible mechanism for chemical induction of chromosomal aberrations in male meiotic and postmeiotic germ cells of mice. *Cytogenet Cell Genet* 33(1-2):74-80.
- Kim NK, Lee SH, Kwak IP, Han SY, Park C, Lee HK, Cha KE, Cha KY (1997) Expression of DNA repair gene, N-methylpurine-DNA glycosylase during the development of Balb/c mice. *Dev Reprod* 1(1):37-43.
- Kim NK, Lee SH, Ko JJ, Rabindra R, Lee HK, Kwak IP, Cha KY (1998a) Tissue-specific expression of DNA repair gene, N-methylpurine-DNA glycosylase (MPG) in Balb/c mice without external damage. *J Gene Med* 2(1):31-34.
- Kim NK, Lee SH, Seo JS, Cha KY (1998b) Tissue-specific expression and activation of N-methylpurine-DNA glycosylase (MPG) in SV40 T-antigen gene expressing transgenic mice. *Mol Cells* 8(4):383-387.
- Kovacs E, Weber W, Muller HJ (1984) Age-related variation in the DNA repair synthesis after UV-c irradiation in unstimulated lymphocytes of healthy blood donors. *Mutat Res* 31: 231-237.
- Licastro F, Walford RL (1986) Modulatory effect of nicotinamide on unscheduled DNA synthesis in lymphocytes from young and old mice. *Mech Aging Dev* 35:123-131.
- Lijinsky W (1986) Mutagenesis, carcinogenesis, and alkylating properties of nitrosamines and related compounds. *Prog Clin Biol Res* 209B141-148.
- Lindahl T (1982) DNA repair enzymes. *Annu Rev Biochem* 51:61-87.
- Loeb LA, Preston BD (1986) Mutagenesis by apurinic/aprimidinic sites. *Annu Rev Genet* 20:201-203.
- Leona S, Bruce D, Michael B, Katherine C (1991) Cloning and characterization of a 3-methyladenine DNA glycosylase cDNA from human cells whose gene maps to chromosome 11. *Proc Natl Acad Sci* 88:9127-9131.
- Mitra S, Kaina B (1993) Regulation of repair of alkylation damage in mammalian genomes. *Prog Nucleic Acids Res Mol Biol* 44:109-142.
- Strauss BS (1985) Cellular aspects of DNA repair. *Adv Cancer Res* 45:45-105.
- Tatsuka M, Ibeanu GC, Izumi T, Narayan S, Ramana CV, Kim NK, Roy G, Mitra S (1995) Structural organization of the mouse DNA repair gene, N-methylpurine-DNA glycosylase. *DNA Cell Biol* 14(1):37-45.
- Tokunaga K, Taniguchi H, Yoda K, Shimizu M, Sakiyama S (1986) Nucleotide sequence of a full-length cDNA for mouse cytoskeletal β -actin mRNA. *Nucleic Acids Research* 14(6): 2829.
- Washington WJ, Foote RS, Dunn WC, Generoso WM, Mitra S (1989) Age-dependent modulation of tissue-specific repair activity for 3-methyladenine and O6-methylguanine in DNA in inbred mice. *Mech Ageing Dev* 48:43-52.
- Weeda G, Ma L, van Ham RCA, Bootsma D, van der Eb AJ, Hoeijmakers JHJ (1991) Characterization of the mouse homolog of the XPBC/ERCC-3 gene implicated in xeroderma pigmentosum and Cockayne's syndrome. *Carcinogenesis* 12:2361-2368.