

## Laser Capture Microdissection을 이용한 유전자 발현 연구(II) : 원시난포와 1차난포 유전자 발현의 차이에 대한 분석

박창은 · 고정재 · 이숙환 · 차광렬 · 김정진<sup>1</sup> · 이경아<sup>†</sup>  
차병원 여성의학연구소, 포천중문의과대학교, <sup>1</sup>서울대학교 생명과학부

## Analysis of the Gene Expression by Laser Capture Microdissection(II) : Differential Gene Expression between Primordial and Primary Follicles

Chang-Eun Park, Jung-Jae Ko, Sook-Hwan Lee,  
Kwang-Yul Cha, Kyungjin Kim<sup>1</sup> and Kyung-Ah Lee<sup>†</sup>

Infertility Medical Center, CHA General Hospital  
College of Medicine, Pochon CHA University, Seoul 135-081, Korea  
<sup>1</sup>School of Biological Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

**ABSTRACT** : The present study was conducted to elucidate genes involved in the primordial-primary follicular transition. By using suppression subtractive hybridization, day1- and day5-subtracted cDNA libraries were obtained with the forward and reverse subtraction method, respectively. In toto, 357 clones were sequenced and analyzed by BLAST and RIKEN program. Sequences of 330 clones significantly matched database entries while 27 clones were novel. Forty-two and 47 genes with known functions were different between day1 and day5 ovaries. Four genes, GDF8, lats2, septin2, and wee1, from the day1 subtracted cDNA library, and 6 genes, HSP84, laminin2, MATER, MTi7, PTP, and wrn, from day5-subtracted cDNA library were chosen, and their differential expression was evaluated using RNAs from whole ovaries as well as captured primordial and primary follicles by laser captured microdissection. Results from the present study would provide insight for the future study on the mechanisms involved in primordial-primary follicle transition in the mouse in addition to the human ovary.

**Key words** : Primordial-primary follicle transition, Laser capture microdissection, Suppression subtractive hybridization.

**요약** : 성장을 멈추고 있는 원시난포(primordial follicle)에서 난포발달이 개시되어 1차난포(primary follicle)로 발달하는 조절 기전은 잘 알려져 있지 않다. 이 초기 난포발달 과정에 관여하는 유전자를 알아내기 위해 suppression subtractive hybridization(SSH)을 사용하였다. 생후 1일과 5일째의 생쥐 난소로부터 얻은 cDNA로 forward와 reverse subtraction을 수행하여 각각 day1과 day5-subtracted cDNA library를 얻었다. 이를 cloning한 결과, 357개 clone의 염기 서열을 BLAST와 RIKEN을 이용해 분석하여 27개의 clone은 novel gene으로 330개의 clone은 데이터 베이스와 일치함을 알았다. 이 중에 기능이 알려진 유전자는 day1에서는 42종, day5에서는 47종이 각각 차이 나게 발현하고 있는 것으로 나타났다. Day1-subtracted cDNA library에서는 GDF8, lats2, septin2, wee1 등 4개 유전자를, day5-subtracted cDNA library에서는 HSP84, laminin2, MATER, MTi7, PTP 및 wrn 등 6개 유전자를 선택하여 LCM-RT-PCR방법으로 실제로 원시난포와 1차난포에서 차이 나게 발현되고 있는 것을 확인하였다. 본 연구에서 얻은 유전자 발현 양상의 결과는 앞으로 생쥐뿐만 아니라 사람 난소에서 primordial-primary follicle transition에 관여하는 기전을 연구하는데 중요한 정보를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

## 서 론

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(2000-2-20500-001-2)지원으로 수행되었음.

<sup>†</sup>교신저자: 서울시 강남구 역삼1동 650-20, 차병원 여성의학연구소, 포천중문의과대학교 생명과학전문대학원. (우) 135-081, (전): 02-3468-3440, (팩): 02-501- 8704, E-mail: leeka@nuri.net

포유류의 난포발달 과정은 난소 내외의 여러 가지 요인에 의해 복잡한 과정으로 조절된다. 후기 난포발달 과정, 즉 강소형성 난포(antral follicle)의 발달과 분화에 대한 연구는 많은 반면 초기 난포발달 과정에 대한 연구는 상대적으로 미약하다(Fortune et al., 2000). 모든 포유류는 일정한 숫자의 원시난포를 가지고 태어나는데 대부분이 성장을 멈추고 있다. 특정시기를 지나면서부터 발달을 멈추고 있던 원시난포 중 일

부만이 선택적으로 1차난포로 자라기 시작한다. 이와 같이 원시난포에서 1차난포로 성장이 다시 시작되는 기전, 즉 원시난포의 성장이 멈추어 있다가 활성화되는 기전에 대해서는 아직까지 완전히 알려져 있지 않다. 원시난포가 활성화되어 다시 성장하기 시작하는 과정을 이해함으로써 여성의 생식능력이 시작되는 시기를 조절하거나 혹은 폐경이 시작되는 시기를 뒤로 미룰 수 있는 등 궁극적으로는 여러 가지 조절이 인위적으로 가능하게 될 것이다. 또한 배란이 되지 않거나 조기 폐경 등 난포발달과 관련된 여성의 난소질병에 대한 기전 연구 및 그 치료도 가능할 것이다.

이제까지는 대개 알려진 유전자의 기능을 하나씩 연구하였으나 suppression subtractive hybridization(SSH)을 이용하면 많은 유전자를 한꺼번에 탐색할 수 있을 뿐만 아니라 새로운 유전자를 탐색할 수도 있다. SSH는 두 개의 실험 그룹간에 차이 나게 발현하고 있는 유전자를 탐지하고 분리할 수 있는 실험기법으로(Robert et al., 2000; Hennebold et al., 2000; Mohan et al., 2002), 전통적인 subtraction 방법의 기술적인 한계를 극복하여 차이 나게 발현하고 있는 염기 서열을 선택적으로 증폭시키는 방법이다(Diatchenko et al., 1996; Gurskaya et al., 1996).

본 연구의 목적은 성장이 정지되어 있는 원시난포와 성장이 다시 시작된 1차난포에서 차이 나게 발현하고 있는 유전자들이 무엇인지를 알아보는 것이다. 그러나 원시난포 및 1차난포의 크기가 매우 작아서 각 발달 단계별 난포를 각각 순수하게 분리하는 것이 기술적으로 어렵기 때문에 본 연구에서는 대신 대부분이 원시난포로 구성되어 있는 1일자 난소와 주로 원시난포와 1차난포로 구성되어 있는 5일자 난소를 사용하여 SSH를 수행했다. SSH를 수행한 후 1일자와 5일자 각각의 난소에서 차이 나게 발현되고 있는 유전자를 포함하는 subtracted cDNA library를 얻은 후, 이 유전자 중 몇 개의 유전자를 선택하여 원시난포와 1차난포간 유전자 발현의 차이를 laser capture microdissection을 이용하여 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 생쥐 난소의 준비

생후 1일자 및 5일자의 ICR 생쥐로부터 난소를 적출하여 해부현미경하에서 난소 주변의 포낭을 제거하고 곧바로 액화질소에 급속 냉각시켜 RNA 추출에 사용하였다. LCM을 위해서는 적출한 난소를 isopentane 용액에 담근 후 OCT compound에 포매하여 5  $\mu$ m 두께로 슬라이드를 제작하였고 사용 전까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

### 2. RNA 분리

각 시기의 난소는 Trizol(Gibco BRL, Grand Island, NY)을 이용해 total RNA를 추출하였고 Oligotex mRNA mini kit(QIAGEN, Santa Clara, CA)을 이용해 mRNA를 얻었다. Genomic DNA를 제거하기 위해 DNase I(Gibco BRL)을 실온에서 15분 처리하고 acid phenol로 추출한 후, RNA의 양은 OD값을 측정하여 정량하고 사용 전까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

### 3. Suppression Subtractive Hybridization (SSH)

생후 1일과 5일자 난소에서 발현하는 subtracted cDNA libraries를 얻기 위해 forward와 reverse SSH를 각각 수행하였다. cDNA 합성과 SSH는 PCR-Select cDNA Subtraction Kit(CLONTECH Laboratories Inc, Palo Alto, CA)를 이용해 수행하였다. 각 난소에서 얻어진 Poly(A)+RNA를 이용해 cDNA를 합성한 후, RsaI을 처리하여 blunt end를 만들고 adaptor 1과 adaptor 2R을 붙인 후 두 번의 hybridization을 시행하였다. 첫 번째는 각 adaptor를 달고 있는 tester를 다량의 driver와 반응하게 되면 특이적으로 발현하는 tester는 단일가닥으로 남게 되고, 이를 합한 후 driver cDNA를 다시 한번 다량 첨가하여 양쪽에 서로 다른 adaptor를 붙이고 있으면서 tester에서 특이적으로 발현하는 유전자를 얻게 된다. 이를 primer 1과 primer 2R을 이용하여 PCR로 증폭하면 tester에서 차이 나게 발현하고 있는 유전자들을 얻게 된다. Reverse subtraction의 경우, tester와 driver를 바꾸어 같은 과정을 반복한다.

### 4. Subtraction의 효율성 분석

동량의 unsorted와 subtracted cDNA를 가지고 house-keeping glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(G3PDH)를 forward(TCCACCACCCTGTTGCTGTA)와 reverse(ACCACAGTCC ATGCCATCAC) primer를 이용해  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 45초간 denaturation,  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 45초간 annealing,  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 30초간 extension 반응하여 18, 23, 28, 33 cycle로 PCR하고, PCR 산물을 2% agarose gel에서 확인하였다.

### 5. Subtracted cDNA의 클로닝 및 염기 서열 분석

Subtraction 후 증폭된 PCR 산물을 pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, WI)를 이용해 cloning하였다. Ligated DNA를 JM109에 형질 전환시키고 X-gal/IPTG/ampicillin이 포함된 LB plate에서 colony를 선택하여 16시간 배양 후, Quia mini prep kit(QIAGEN)을 이용해 plasmid DNA를 얻었다. 그

리고 각각의 DNA를 EcoR I(New England Biolabs Inc, Beverly, MA)으로 처리하여 삽입된 유전자를 확인하였다. 이렇게 얻은 유전자의 염기서열은 ABI 310 DNA Analyzer (Perkin-Elmer APPLIED Biosys, Foster City, CA)를 이용하여 분석하였고, BLAST와 RIKEN 데이터 베이스를 이용해서 유전자를 확인하였다.

6. LCM 과정과 Total RNA 추출

동결된 난소 조직이 부착된 슬라이드를 실온에서 OCT-compund를 녹이고 70% 알코올에 30초간 고정 단계와 DEPC-dH<sub>2</sub>O의 수세 과정을 거친 후, hematoxylin 용액으로 염색하고 DEPC-dH<sub>2</sub>O와 bluing 용액으로 처리하였다. 그리고 70% 알코올과 90% 알코올에서 탈수 과정을 거친 후 eosin 용액으로 세포질을 염색하고, 70%, 95%, 100% 알코올 순으로 30초씩 탈수과정을 거쳤다. 그런 후 신선한 xylene에 5분씩 2번의 탈수과정을 마치고 후드에서 20분간 공기 중 건조시킨 후 LCM을 시행하였다.

PixCell II™ system(Arcturus Engineering, Inc., Mountain View, USA)을 이용하여 원시난포와 1차난포를 순수하게 분리하였다(Fig. 1). 이때 난포는 각각 1일자와 5일자 난소로부터 얻었다. LCM을 위한 laser beam의 크기는 선택하고자 하는 세포의 크기에 따라 조절할 수 있는데, 본 연구에서는 7.5 μm의 laser를 사용하였고 power는 20~40mW 범위에서 사용하였다. 원시난포와 1차난포를 각각 200~300개를 포획한 직후 바로 PicoPure™ RNA isolation kit(Arcturus)를 이용해

total RNA를 얻었다. 이때 포획한 세포가 붙어있는 transfer film(CapSure TF-100)은 200 μl의 digestion buffer가 담긴 튜브 (Brinkmann Inc, Westbury, NY)에 담아 film 표면이 완전히 buffer에 닿도록 튜브를 거꾸로 세운 채 42°C에서 30분간 처리하여 얻었다.

7. 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)

총 반응용액을 20 μl로 하여 Superscript II RTase 200U (GIBCO BRL), 10mM dNTP, oligo(dT) primer 0.5 μg, 25mM MgCl<sub>2</sub>을 사용하고 42°C에서 60분간 반응하여 cDNA를 합성하였다. PCR은 75mM Tris-HCl (pH 8.8), 20mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% Tween 20, 0.2mM dNTP 그리고 0.625U Taq DNA polymerase가 포함된 PCR master mixture(ABgene, Survey, UK)를 사용하여 시행하였다. PCR의 조건과 primer 염기서열은 Table 1에 나타내었다. 이렇게 얻어진 증폭된 산물은 1.5% agarose gel로 전기영동한 후, Image Analyzer

Table 1. Primer sequences and conditions for PCR

Genes	GI No.	Primer sequences	Annealing temp(°C)	size (bp)
GDF-8	6754751	For ATAAGGCCAATTACTGCTCA Rev CTCCTAACTCAGCAGACCAC	60	542
lats2	7657294	For GAGTTACTCCCCTTATGCCT Rev ACTTGGAAATTGTGAGTCCAC	60	686
septin2	6754815	For TGCTGCTGTAGTTCATTCCG Rev GCTGCTTTGGTTCTCTCCAC	60	253
wee1	11342590	For AACTAAAGGCGCCTACCAT Rev AGAGGTTCGGTACCCGACT	55	537
HSP84	6680304	For CGAGCTGATACCTGAGTACC Rev TTAGTCACTGAGACCAGGCT	60	513
laminin2	699109	For TGCAGAGAGTGGGACTTACT Rev AACCTAATGTTGGTGGTCAG	60	441
MATER	5802697	For ATTACCACCAGAAACACAGG Rev CTGGAGAAGGATGTTTCATGT	57	498
MTi7	602948	For AAAACTTTGCATTACTGGGA Rev ATGTGTCATCTGTAGGCTC	60	422
PTP	17225444	For CAAATTTAGTTGAGGTTGGC Rev TAAGCAGGCTTCTAAAATGG	57	493
wrn	381580	For GGTAGAGGCTAAGATGGGTT Rev ACAAAGGTAACATGGTGAGG	60	199
G3PDH	20828350	For TCCACCACCCTGTTGCTGTA Rev ACCACAGTCCATGCCATCAC	60	451

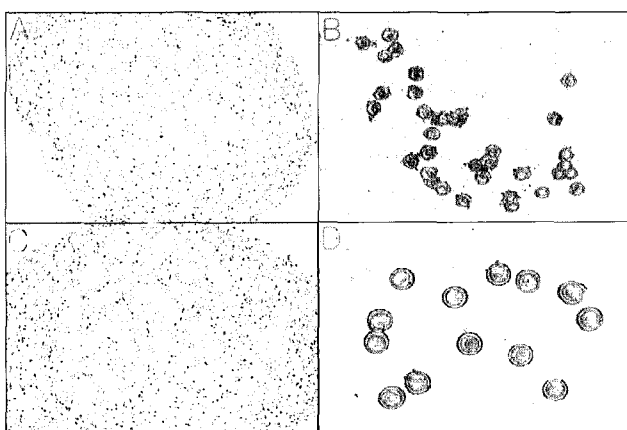


Fig. 1. Microphotographs depict the LCM procedure for capturing follicles of each stage out from ovarian tissues. A, Map of day1 ovarian section before capturing; B, Captured primordial follicles from the day1 ovarian section; C, Map of day5 ovarian section before capturing; D, Captured primary follicles from the day5 ovarian section.

(Vilber Lourmat, France)를 이용하여 각 유전자의 발현양을 G3PDH의 발현에 대하여 환산하였다. 그리고 1일자와 5일자의 차이 혹은 원시난포와 1차난포의 차이는 1일자와 원시난포의 결과를 기준으로 fold change로 산출하였고 3~4회 반복 실험의 결과를 평균값±SEM으로 나타내었다.

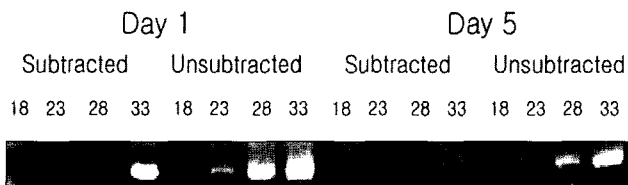
## 8. 통계처리

결과의 통계분석은 t-tests를 사용하여 검증하였으며 유의 차에 대한 수준은 p값이 0.05보다 작은 경우에 유의성이 있다고 분석하였다.

## 결 과

### 1. SSH 결과

Subtraction 효율성은 각각 동량의 cDNA를 사용하여 증폭하였을 때 subtracted cDNA의 G3PDH가 unsubtracted cDNA와 비슷한 발현양을 나타내기 위해서는 PCR에서 8~10 cycle이 더 필요하였다(Fig. 2). 이는 SSH에 의해 G3PDH가 256~1024배 감소되었다고 계산할 수 있다. SSH로 얻은 cDNA를 cloning하고 염기서열을 분석하여 1일자와 5일자의 난소에서 차이 나게 발현되는 유전자들을 얻었다. 총 357개의 clone을 얻었는데 그 중 330개는 데이터 베이스에 등록되어 있는 유전자와 일치하였고 27개의 clone은 novel로 확인되었다(Table 2). 이들 중 기능이 알려져 있는 유전자는 1일자와 5일자의 subtracted cDNA에서 각각 42개, 47개로 나타났다. 1일자와 5일자 모두 신호전달계(signal transduction)과 유전자/단백질 발현(gene/protein expression)에 관여하는 유전자가 많았고, 1일자에는 세포주기/세포사멸(cell cycle/apoptosis)에 관여하는



**Fig. 2. SSH subtraction efficiency.** Subtraction efficiency was determined by analyzing the amount of G3PDH present in both the unsubtracted starting cDNA and the subtracted target cDNA through the use of increasing number of PCR cycles. PCR was performed on subtracted(lanes 1~4) and unsubtracted(lanes 5~8) secondary PCR products with G3PDH primers in both forward(lanes 1~8) and reverse subtraction(lanes 9~16). Numbers on the each lane indicate PCR cycles.

**Table 2. Characteristics of the day1- and day5-subtracted cDNA libraries**

	Day 1 <sup>a</sup>	Day 5 <sup>b</sup>
With known functions	49( 78)	54( 88)
With unknown functions	7( 8)	5( 17) <sup>c</sup>
ESTs	30( 60)	31( 79)
Novel	13( 13)	14( 14)
Total clones sequenced	92(159)	97(198)

<sup>a</sup> Data are expressed as numbers of genes(number of clones sequenced).

<sup>b</sup> Seven genes were overlapped in both libraries. Therefore, differentially expressed genes were 42 in day1- and 47 in day5- subtracted cDNA library

<sup>c</sup> Among 5 genes(17 clones) with unknown functions in the day5-subtracted cDNA library, one gene(13 clones) was MT transposon-like element. Three kinds of MT transposon-like elements, MTi5, MTi7, and MTi10 were found.

**Table 3. Proportions of genes with known functions found by SSH day1- and day5- subtracted cDNA libraries**

	Day 1 (42 genes)	Day 5 (47 genes)
Cell cycle/Apoptosis	10(23.8%)	5(10.5%)
Cellular structure	3( 7.1%)	8(17.0%)
Metabolism	5(11.9%)	11(23.5%)
Signal transduction	11(26.2%)	12(25.5%)
Gene/protein expression	13(31.0%)	11(23.5%)

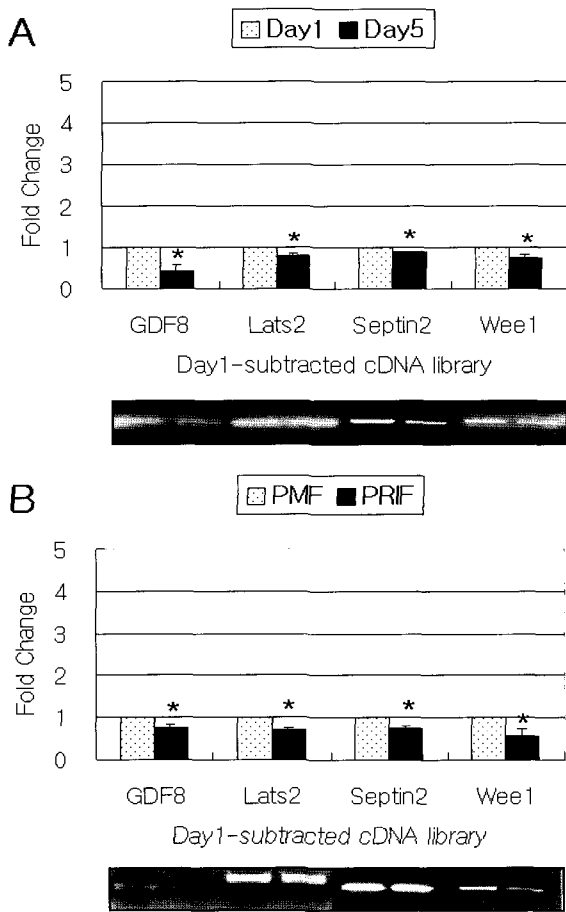
유전자, 반면에 5일자에는 대사과정(metabolism)에 관여하는 유전자가 많이 발현하고 있는 것을 알 수 있었다(Table 3).

### 2. Day1-subtracted cDNA library의 유전자

Fig. 3은 1일자-subtracted cDNA library중 growth differentiation factor 8(GDF-8), large tumor suppressor 2(lats2), septin2, wee1의 전사체 발현 차이를 알아보기 위해 1일자와 5일자의 전체 난소와 LCM을 이용해 순수하게 분리한 원시난포와 1차난포에서의 발현양상을 RT-PCR로 관찰한 결과다. 4개의 유전자 모두 1일자의 난소와 원시난포에서 상대적으로 높게 발현하였다( $p < 0.05$ ).

### 3. Day5-subtracted cDNA library의 유전자

Fig. 4는 5일자-subtracted cDNA library중 heat shock protein 84(HSP84), laminin 2, maternal antigen that embryos require (MATER), MT transposon like element 7(MTi7), protein tyrosin phosphatase(PTP), wrn의 전사체 발현 차이를 알아보기 위해

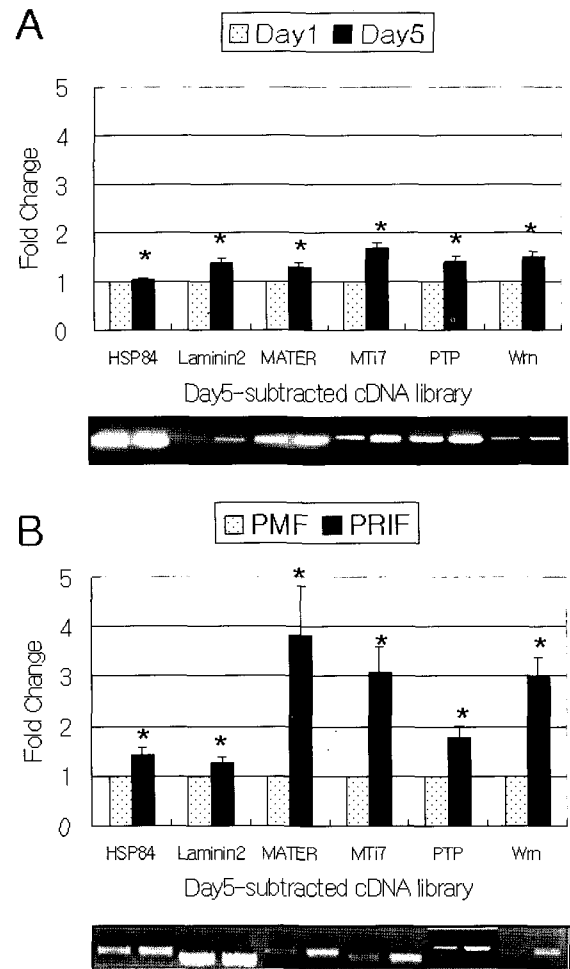


**Fig. 3. Results of RT-PCR(A) and LCM-RT-PCR(B) of 4 genes found in day1-subtracted cDNA library after semi-quantitative expression analysis.** Each band density after RT-PCR was normalized against the level of G3PDH mRNA, and fold change was calculated against to that of day1 ovary or primordial follicle. Experiments were repeated 3~4 times and the data were expressed as mean  $\pm$  SEM. Asterisks depict a value of  $p < 0.05$  that considered as statistically significant. A, Comparison between day1 and day5 whole ovaries; B, Comparison between primordial (PMF) and primary follicles (PRIF) procured by LCM.

마찬가지로 1일자와 5일자의 전체 난소에서 발현과 LCM을 이용해 순수하게 분리한 원시난포와 1차난포에서의 발현양상을 RT-PCR로 관찰한 결과이다. 6개의 유전자 모두 5일자의 난소와 1차난포에서 상대적으로 높게 발현하였음을 확인하였다( $p < 0.05$ ).

**고 찰**

본 연구에서는 subtractive hybridization 방법으로 생후 1일



**Fig. 4. Results of RT-PCR(A) and LCM-RT-PCR(B) of 6 genes found in day5-subtracted cDNA library after semi-quantitative expression analysis.** Each band density after RT-PCR was normalized against the level of G3PDH mRNA, and fold change was calculated against to that of day1 ovary or primordial follicle. Experiments were repeated 3~4 times and the data were expressed as mean  $\pm$  SEM. Asterisks depict a value of  $p < 0.05$  that considered as statistically significant. A, Comparison between day1 and day5 whole ovaries; B, Comparison between primordial (PMF) and primary follicles (PRIF) procured by LCM.

과 5일자 난소에서 주로 발현되고 있는 유전자들의 목록을 성공적으로 확보하였고, 이들 중에서 몇 개의 유전자를 선택하여 원시난포와 1차난포 간에 이들 유전자 전사체 발현의 차이를 확인하였다.

원시난포에서 높게 발현하고 있는 유전자는 주로 세포주기와 세포사멸, 신호전달계, 그리고 유전자 및 단백질의 발현에 관여하는 인자들이었고, 반면에 1차난포에서는 원시난포

에 비하여 세포주기와 세포사멸에 관여하는 유전자가 적은 반면에 물질대사에 관여하는 유전자의 빈도가 높았다. 모든 종에서는 난소 안에 일정한 수의 원시난포를 갖고 태어나는데, 원시난포가 성장을 개시하여 발달하거나 혹은 세포사멸로 죽어 가는 과정을 통해 이 원시난포의 수가 감소하게 된다. 따라서 원시난포 안에 세포주기와 세포사멸에 관여하는 유전자가 높게 발현하고 있다는 사실이 매우 흥미로운 결과였으며, 이들 유전자에 대한 연구를 통하여 원시난포의 발달이 정지되거나 다시 시작되는 분자생물학적 기전을 밝힐 수 있는 길을 열 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구에서는 생후 1일자 난소에서 높은 빈도로 발현되고 있는 유전자들 중에서 GDF8, *lats2*, *septin2*, *wee1* 등 네 개의 유전자를 선택하여 이들 모두 1차난포에 비하여 원시난포에서 높게 발현하고 있는 것을 확인하였다. Subtraction 결과 가장 높은 빈도로 나타난 *wee1*은 mitotic 세포주기의 억제인자로 잘 알려져 있는데(Pendergast, 1996), 생쥐의 원시난포에서 *wee1*의 발현을 보고한 것은 본 연구 결과가 처음이다. 강소 형성 난포로부터 얻은 미성숙 혹은 성숙한 난자에서 *wee1*이 발현하며, 난자성숙에 역할하고 있을 것이라는 보고가 있다(Albertini & Carabatsos, 1998; Mitra & Schultz, 1996). 또한 개구리의 난자에서 *wee1*이 없을 경우 감수분열 세포주기가 재개된다는 연구보고도 있다(Nakajo et al., 1999). 본 연구결과 원시난포에서 높게 발현되고 있다는 사실은 난자가 감수분열 I 전기의 dictyate 시기에 발달을 멈추고 있도록 하는 기전에 *wee1*이 매우 깊이 관련되어 있을 것이라고 추측할 수 있으며 이에 따라 원시난포의 성장을 멈추게 하는 역할도 하고 있을 것으로 추측된다. 원시난포에서 1차난포로 전환하는 과정과 *wee1*의 기능을 연관지어 본 연구실에서 연구가 진행 중이다.

세포는 자신의 세포골격(cytoskeleton)의 상태를 감시하여 세포주기를 조절한다(Barral et al., 1999). Barral 등(1999)은 yeast의 *swel*(*wee1* homolog) class kinase로 알려진 Nim1-related kinase가 외세포 골격의 구성 요인인 septin의 상태에 따라 세포주기를 조절한다는 것을 보고하였다. 본 연구 결과에서 *septin2*와 *wee1*이 함께 발굴되었다는 것은 생쥐의 난소에서도 *septin*과 *wee1*의 상관성을 통해 난포발달 과정을 설명할 수 있을 것으로 생각된다.

*Lats2*는 초파리의 tumor suppressor gene(*lats/warts*)과 상동성이 있는 *lats1*과 기능이 유사할 것으로 생각되는데, 그 이유는 *lats1*과 *lats2*사이에 전사 발현 양상과 구조가 유사하기 때문이다(Yabuta et al., 2000). *lats*는 성장의 조절과 세포주기에 관여하는 budding yeast kinase와 상동성을 가진 Ser/Thr

protein kinase를 만든다(Xu et al., 1995; Yabuta et al., 2000). 포유류 세포에서 *lats1*은 세포주기에 따라 인산화되는데, 체세포분열 초기에는 *cdc2*와 복합체를 형성한다. *lats1*과 관련된 *cdc2*는 동반하는 cyclin이 없으며 histone H를 활성화하는 kinase 기능도 없는 것으로 보고되어 있다(Tao et al., 1999). 또한 초파리의 *lats* 변이 세포에서 cyclin A가 비정상적으로 축적되는 것으로 보아 *lats*는 *cdc2/cyclin A*의 음성적 조절자일 것으로 추정된다(Tao et al., 1999; Turenchalk et al., 1999). 앞으로 포유동물의 난포발달 과정과 난자의 감수분열에서 *lats2*의 기능에 대한 연구가 심도 있게 이루어져야 할 것으로 생각된다.

Day5-subtracted cDNA library에서 선택한 6개의 유전자(HSP84, laminin2, MATER, MTi7, PTP, 및 *wrn*) 모두 또한 1차난포에서 유의적으로 높게 발현되는 것을 확인하였다. Heat shock protein 84는 day5-subtracted library중에서 높은 빈도로 출현한 유전자중의 하나이며, p53 수송체로 알려진 MDM2와 더불어 균형을 유지하면서 mutant p53 단백질과 복합체를 형성하여 세포사멸을 조절하는데 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있기 때문에(Sepehrnia et al., 1996) 난포발달 과정에서도 세포사멸 조절에 관여할 것으로 생각되어 연구대상으로 선택하였다. 또한 laminin2, MATER, MTi7, PTP 및 *wrn*은 SSH결과에서 3번 이상의 빈도를 보여서 선택하였다.

본 연구에서는 5일자의 subtracted library중 기능이 알려져 있지 않은 유전자 17개 clone중 13개가 MTi5, MTi7, MTi10에 해당되었으며 그들 중 MTi7이 빈도 높게 나타났다. 이전의 연구 중 SSH에 의해서 난소에서 얻은 cDNA library에서 MTi10이 매우 높게 나타났다는 보고가 있다(Hennebold et al., 2000). 대부분의 포유류 유전체에 MT transposon-like element가 현저히 많이 분포하고 있다는 연구보고가 있으나(Smit, 1993) 그 기능은 아직 밝혀져 있지 않다. 앞으로 원시난포에서 1차난포로의 발달 과정에서 MT transposon-like element 전사체의 발현 양상과 역할에 대해 연구할 가치가 매우 높을 것으로 사료된다.

충분히 자란 난자에서만 발현하는 것으로 알려진 MATER(Tong et al., 2000) 이외에도, 난포성장의 표지인 zona pellucida 2(Liang et al., 1990), fetuin(Hoyer et al., 2001) 등의 유전자가 day5-subtracted cDNA library에 포함되어 있었다. 반면에 난자에서 특이적으로 발현하는 유전자로 알려진 growth differentiation factor-9(Dong et al., 1996), bone morphogenetic protein-15(Dube et al., 1998), factor in the germline- $\alpha$  (Liang et al., 1997) 등은 day5-subtracted cDNA library에서 발견되지 않

았다. 이러한 유전자들을 찾을 수 없었던 것은 subtraction 과정에서 tester cDNA를 만들기 위한 적절한 mRNA를 얻지 못했을 가능성이거나 혹은 전사체의 발현이 낮거나 불안정했기 때문일 것으로 추측된다.

지난 수십 년 동안 난소생리학 연구 분야에서는 위에서 언급한 각각의 유전인자들이 난소에서 발현된다는 것을 하나씩 알아내었고, 유전자 결핍 생쥐를 만드는 등의 방법으로 해당 유전자의 기능을 분석하는 연구가 진행되었다(Matzuk & Lamb., 2000). 그러나 최근 계놈을 바탕으로 연구를 진행할 수 있는 분자생물학적 방법론의 개발로 한꺼번에 많은 유전자를 대량으로 연구할 수 있게 되었다. 본 연구에서도 subtractive hybridization을 이용하여 원시난포와 1차난포에서 높게 발현하고 있는 여러 유전자를 대량으로 발굴할 수 있었고, 앞으로 이들 각각 유전자의 기능을 연구함으로써 원시난포의 성장 억제 및 1차난포로의 성장 재개에 관여하는 분자생물학적 기전을 밝혀내는데 공헌할 수 있을 것으로 기대한다.

## 인용문헌

- Albertini DF, Carabatsos MJ (1998) Comparative aspects of meiotic cell cycle control in mammals. *J Mol Med* 76:795-799.
- Barral Y, Parra M, Bidlingmaier S, Snyder M (1999) Nim1-related kinases coordinate cell cycle progression with the organization of the peripheral cytoskeleton in yeast. *Genes Dev* 13:176-187.
- Diatchenko L, Lau Y-FC, Campbell AP, Chenchik A, Moqudam F, Huang B, Lukyanov S, Loukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD (1996) Suppression subtractive hybridization : A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6025-6030.
- Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM (1996) Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383:531-535.
- Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM (1998) The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol* 12:1809-1817.
- Fortune JE, Cushman RA, Kito WS (2000) The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* 163:53-60.
- Gurskaya NG, Diatchenki L, Chenchik A, Siebert PD, Khaspekov GL, Lukyanov KA, Vagner LL, Ermolaeva OD, Lukyanov SA, Sverdlov ED (1996) Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction : Cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal Biochem* 240:90-97.
- Hennebold JD, Tanaka M, Saito J, Hanson BR, Adashi EY (2000) Ovary-selective genes I : The generation and characterization of an ovary-selective complementary deoxyribonucleic acid library. *Endocrinol* 141:2725-2734.
- Hoyer PE, Terkelsen OB, Grete Byskov A, Nielsen H (2001) Fetuin and fetuin messenger RNA in granulosa cells of the rat ovary. *Biol Reprod* 65:1655-1662.
- Liang L, Soyal SM, Dean J (1997) FIG  $\alpha$ , a germ cell specific transcription factor involved in the coordinate expression of the zona pellucida genes. *Development* 124:4939-4947.
- Liang LF, Chamow SM, Dean J (1990) Oocyte-specific expression of mouse Zp-2: developmental regulation of the zona pellucida genes. *Mol Cell Biol* 10:1507-1515.
- Matzuk MM, Lamb DJ (2000) Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nature Cell Biol* 4(S1):S33-S40.
- Mitra J, Schultz RM (1996) Regulation of the acquisition of meiotic competence in the mouse : changes in the subcellular localization of cdc2, cyclin B1, cdc25C and wee1, and in the concentration of these proteins and their transcripts. *J Cell Science* 109:2407-2415.
- Mohan M, Ryder S, Claypool PL, Geisert RD, Malayer JR (2002) Analysis of gene expression in the bovine blastocysts produced *in vitro* using suppression-subtractive hybridization. *Biol Reprod* 67:447-453.
- Nakajo N, Yoshitome S, Iwashita J, Iida M, Uto K, Ueno S, Okamoto K, Sagata N (1999) Absence of Wee1 ensures the meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes. *Genes Dev* 14:328-338.
- Pendergast AM (1996) Nuclear tyrosine kinases : from Abl to WEE1. *Curr Opin Cell Biol* 8:174-181.
- Robert C, Barnes FL, Hue I, Sirard M-A (2000) Subtractive hybridization used to identify mRNA associated with the maturation of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 57:167-175.
- Sepehrnia B, Paz IB, Dasgupta G, Momand J (1996) Heat shock protein 84 forms a complex with mutant p53 protein predominantly within a cytoplasmic compartment of the cell.

- J Biol Chem 271:15084-15090.
- Smit AF (1993) Identification of a new, abundant superfamily of mammalian LTR-transposons. Nucleic Acids Res 21:1863-1872.
- Tao W, Zhang S, Turenchalk GS, Stewart RA, St John MA, Chen W, Xu T (1999) Human homologue of the *Drosophila melanogaster* *lats* tumor suppressor modulates CDC2 activity. Nat Genet 21:177-181.
- Tong ZB, Gold L, Pfeifer KE, Dorward H, Lee E, Bondy CA, Dean J, Nelson LM (2000) Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. Nat Genet 26:267-268.
- Turenchalk GS, St John MA, Tao W, Xu T (1999) The role of *lats* in cell cycle regulation and tumorigenesis. Biochim Biophys Acta 1424:M9-M16.
- Xu T, Wang W, Zhang S, Stewart RA, Yu W (1995) Identifying tumor suppressors in genetic mosaics : the *Drosophila lats* gene encodes a putative protein kinase. Development 121:1053-1063.
- Yabuta N, Fujii T, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Nishiguchi H, Endo Y, Toji S, Tanaka H, Nishimune Y, Nojima H (2000) Structure, expression, and chromosome mapping of LATS2, a mammalian homologue of the *Drosophila tumor* suppressor gene *lats/warts*. Genomics 63:263-270.