大韓不妊學會誌:第30卷 第4號 2003
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 30, No. 4, 2003, 12

Mobile transposon-like element, clone MTi7: RNA interference를 이용한 역할 규명[1]

차병원 여성의학연구소[2], 포천중문의과대학교 생명과학전문대학원[3],
충북대학교 농과대학 축산학과[4], 서울대학교 생명과학부[5]

박창은[2,3] · 신미라[4] · 전은현[3] · 조성원[2] · 이숙환[2,3] · 김경진[5] · 김남형[4] · 이경아[2,3]

Mobile transposon-like element, clone MTi7: Finding its role(s) by RNA interference[1]

Chang-Eun Park[2,3], Mi-Ra Shin[4], Eun-Hyun Jeon[3], Sung-Won Cho[2], Sook-Hwan Lee[2,3], Kyungjin Kim[5], Nam-Hyung Kim[4], Kyung-Ah Lee[2,3]

[2]Infertility Medical Center, CHA General Hospital
[3]Graduate School of Life Science and Biotechnology, Pochon CHA University, College of Medicine
[4]Department of Animal Science, Chungbuk National University
[5]School of Biological Sciences, Seoul National University

Objectives: The present study was conducted to evaluate the mobile transposon-like element, clone MTi7 (MTi7) expression in the mouse ovary and to determine its role(s) in the mouse oocytes by RNA interference (RNAi).

Methods: MTi7 mRNA expression was localized by in situ hybridization in day5 and adult ovaries. Double stranded RNA (dsRNA) was prepared for c-mos, a gene with known function as control, and the MTi7. Each dsRNA was microinjected into the germinal vesicle (GV) stage oocytes then oocyte maturation and intracellular changes were evaluated.

Results: In situ hybridization analysis revealed that MTi7 mRNA localized to the oocyte cytoplasm from primordial to preovulatory follicles. After dsRNA injection, we found 43-54% GV arrest of microinjected GV oocytes with 68%-90% decrease in targeted c-mos or MTi7 mRNA.

Conclusions: This is the first report of the oocyte-specific expression of the MTi7 mRNA. From results of RNAi for MTi7, we concluded that the MTi7 is involved in the germinal vesicle breakdown in GV oocytes, and MTi7 may be implicated with c-mos for its function. We report here that RNAi provides an outstanding approach to study the function of a gene with unknown functions.

Key Words: MTi7, Mouse, Oocyte Maturation, RNA Interference

포유동물 난소에 존재하는 난포는 태어날 때에 대부분 원시난포 (primordial follicle)로 성장이 멈추어 있는데 이때 난자는 감수분열 전기의 diplotene 시기로 존재한다. 포유류의 난포발달과정은 다양한 내적인 요인과 외적인 요인에 의해 조절된다[1]. 그러나, 성장을 멈추고 있는 원시난포와 1차 난포

주관책임자: 이경아, 우) 135-081 서울시 강남구 역삼1동 606-5, 차병원 여성의학연구소, 포천중문의과대학교 생명과학전문대학원
Tel: (02) 3468-3440, Fax: (02) 501-8704, e-mail: leeka@nuri.net
[1]본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (01-PJ10-PG6-01GN13-0002).

(primary follicle)로 성장을 개시하게 하는 궁극적인 기전에 대한 연구는 아직까지 미미한 상태에 있다. 원시난포 및 1차 난포는 크기가 매우 작아서 각 발달 단계별 난포를 각각 순수하게 분리하는 것이 용이하지 않으며 또한 연구를 위한 충분한 양을 얻기 어렵기 때문에 본 연구진은 대부분이 원시난포로 구성되어 있는 생쥐의 1일자 난소와, 원시난포와 1차 난포로만 구성되어 있는 5일자 난소를 이용하여[2] suppression subtractive hybridization (SSH) 방법으로 각 발달단계에서 차이 나게 발현하는 유전자 목록을 찾아 내었다[3].

이 유전자들 중 하나인 MTi7은 1일자 난소에 비해 5일자 난소에서 높게 발현하는 유전자 중 하나였는데 매우 높은 양으로 발현하고 있어서 이 MTi7 유전자가 난소에서 어떻게 발현하고 있으며 어떤 역할을 하고 있는지 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

MTi7 염기서열은 현재까지 생쥐에서만 알려져 있다. 최근에 MTi10이 난소에 선택적으로 발현한다는 보고가 있었는데[4], 본 연구진이 생후 5일자 난소의 subtracted cDNA library에서 얻은 MTi7은 MTi10과 96%의 상동성을 가지고 있었다. 그리고 MTi7의 염기서열을 이용해 단백질 서열을 재조합해 보았으나, stop codon이 많이 존재하여 단백질 수준에서 MTi7의 기능에 대한 연구는 불가능하다고 판단되어, MTi7의 발현양상을 관찰하기 위해서는 *in situ* hybridization 방법을 이용하고 그 기능을 분석하기 위해서는 RNAi 방법을 이용하기로 하였다.

RNAi는 목적하는 유전자와 같은 염기서열을 갖는 double stranded RNA (dsRNA)를 세포 안에 주입하면 해당 유전자의 RNA 발현이 감소하여 그 유전자의 기능을 알아낼 수 있는 기법이다[5]. 이 방법이 알려진 이래로 RNAi는 식물, 무척추동물, 척추동물 등에서 유전자 기능을 분석 하기 위한 생물학적 기술로 많이 이용되고 있다[6]. 최근 RNAi를 이용한 몇몇 보고에서는 생쥐 난자와 착상 전 배아에 dsRNA를 미세주입 하거나[7,8], short interfering RNA (siRNA)를 미세주입 또는 형질전환 (transfection) 등의 방법으로 연구 하였다[9,10]. 위의 여러 보고들은 유전자 적중 (knockout) 방법을 이용하여 세포 내 수준에서 유전자의 기능이 이미 잘 알려져 있는 유전자 즉, c-mos, E-cadherin, plasminogen activator, Oct-3/4 등을 이용하여 포유동물의 난자와 배아에서 RNAi의 영향을 확인하였고, 특히 이들 연구를 통하여 생쥐의 난자와 착상 전 배아는 400-500 bp 정도의 long dsRNAs를 이용하여 유전자 기능을 연구하는데 적합하다는 것을 알 수 있었다.

본 연구에서는 *in situ* hybridization방법으로 발달 단계별 난소에서 MTi7의 발현 위치를 알아 보았고, 그 결과 MTi7이 난자에서 특이적으로 발현함을 알았기 때문에 난자에서 MTi7의 기능을 알아보고자 long dsRNA를 이용한 RNAi를 시행하였다.

연구 대상 및 방법

1. 조직과 배아준비

In situ hybridization을 위해 생후 5일자와 6주령의 ICR 생쥐의 난소를 얻어 슬라이드를 제작하였다. RNAi에 사용할 난자는 4주령 ICR 생쥐에 PMSG (5 IU/ml)를 주사하여 48시간째에 미성숙난자 (GV)를 채취하였다.

2. *In situ* hybridization

생쥐의 난소 조직을 4% paraformaldehyde에서 하루동안 고정시킨 후 파라핀 블록을 제작하였으며, 파라핀 침투조직은 5 um 두께의 연속절편을 슬라이드 (ProbeOn Plus, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)에 부착하여 사용 전까지 4°C에서 보관하였다. RNA probe는 in vitro transcription kit (Promega)을 이용하여 제작하였다. 이때 1 ug/ul DNA template (1 ul), 5X Trans buffer (4 ul), RNAsin (2 ul), T7 또는 SP6 RNA polymerase (2 ul), DIG RNA labeling mix (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN; 2 ul), 100 mM DTT (2 ul) 및 DEPC-H_2O를 전체 20 ul가 되도록 첨가하여 37°C에서 6시간 합성한 후, RNase-free DNase I (Invitrogen)을 처리하였다. 합성된 RNA probe의 효율을 확인하기 위하여 반응물 1 ul를 1% agarose gel에 전기 영동하여 확인하였다. Probe 반응물을 G-50 columns (Amersham Pharmacia Biotech Ltd., Piscataway, NJ)으로 정제한 후 농도가 100 ug/ml이 되도록 hybe buffer (50% formamide, 5X SSC, 1 mg/ml Torula yeast RNA, 100 ug/ml heparin, 1X Denhardt's solution, 0.1% Tween-20, 0.1%

CHAPS, 0.5 mM EDTA)로 희석하였다. 파라핀 절편 슬라이드를 xylene에 처리하여 파라핀을 제거하고, 알코올 처리과정과 D-PBS 세척 후, 4% paraformaldehyde 용액으로 실온에서 10분간 재고정 하였다. 그리고 0.1M triethanolamine (TEA) 용액으로 5분간 반응시키고, 0.25% acetic acid가 포함된 0.1M TEA 용액으로 실온에서 10분간 처리하였다. 알코올 처리과정을 거쳐 탈수 시킨 후 hybe buffer에 RNA probe를 100배 희석하여 조직 위에 처리하였다. 조직이 마르지 않도록 파라필름을 덮어서 65°C humid chamber에서 하루동안 처리하였다. 이후 65°C로 예열된 2X SSC-50% formamide 용액으로 30분간 처리한 후 blocking reagent (20% sheep serum, 2% BMB; Boehringer Mannheim Blocking buffer)가 들어있는 MAB (100 mM maleic acid in 150 mM NaCl, pH 7.5) 용액으로 실온에서 1시간 반응시켰다. 여분의 용액을 제거하고 anti-DIG alkaline phosphatase-conjugated Fab antibody fragments (anti-DIG-AP, Roche; 1:1000)를 blocking reagent가 포함된 MAB 용액으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. MAB 용액으로 10분씩 4회 세척하고, BCIP-NBT (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO)로 실온에서 1시간 발색 시켰다. 발색 후 PBS로 세척하고, Nuclear Fast Red로 대조염색 후 수용성 봉입제 (DAKO, Carpinteria, CA)로 봉입하였다.

3. dsRNA의 제작, 미세주입 및 체외배양

생쥐 6주령 난소로부터 Trizol (Invitrogen)을 이용해 total RNA를 추출하고, superscript preamplification system (Invitrogen)으로 역전사 반응을 수행하였다. 합성된 cDNA를 가지고 MTi7과 c-mos의 primers를 이용해 PCR을 수행하였다 (Table 1). PCR 반응조건은 94°C에서 40초, 60°C에서 40초, 72°C에서 1분으로 35 cycle을 수행하여 최종산물은 각각 422, 535 bp이었다. MTi7과 c-mos의 증폭산물을 pGEM T-easy vector (Promega)에 삽입하고 JM109 competent cell에 형질 전환시켜 다량의 재조합된 clone을 얻었다. 그런 후 삽입된 유전자가 antisense 또는 sense로 삽입되었는지를 PCR을 통해 확인하고 in vitro transcription을 위해 T7 또는 SP6를 promotor로 반응 할 수 있게 Sal I 으로 linearization시키고, MEGAscript RNAi Kit (Ambion, Austin, TX)의 T7 RNA polymerase를 이용하여 single stranded RNA를 합성하였다. 이렇게 합성된 각 complementary RNAs는 75°C에서 5분간 반응한 후 실온에서 5분간 식혀 1% agarose gel에서 dsRNA를 확인하였다.

Table 1. Primer sequences and RT-PCR conditions.

Genes	GI number	Primer sequences	Set	Anneal (°C)	Product size (bp)	Nucleotide location
MTi7	602948	For AAAACTTTGCATTACTGGGA Rev ATGTGTCATCCTGTAGGCTC	A	60	422	385-806
MTi7	602948	For GGTACCAGCAGAGTGGGGTA Rev CCAGTACAATTGACCCCTTG	B	60	1099	76-1174
c-mos	199769	For CCATCAAGCAAGTAAACAAG Rev AGGGTGATTCCAAAAGAGTA	A	60	535	2264-2798
c-mos	199769	For TGGCTGTTCCTACTCATTTC Rev CTTTATACACCGAGCCAAAC	B	55	297	1943-2239
Plat	6679374	For CATGGGCAAGAGTTACACAG Rev CAGAGAAGAATGGAGACGAT	-	60	650	819-1468
Globin	1443	For GCAGCCACGGTGGCGAGTAT Rev GTGGGACAGGAGCTTGAAAT	-	60	257	92-348
18s rRNA	200732	For GCTTGCGTTGATTAAGTCCC Rev AGTTCGACCGTCTTCTCAGC	-	60	139	27-165

본 연구에서는 knockout 생쥐에서 뿐만 아니라 knockdown 방법으로도 많은 연구가 되어있는 c-mos dsRNA를 대조군으로 사용하였다[7,8,12,13]. 각각의 표적 유전자에 대한 primer를 두 set 작성하여 set A primer는 dsRNA를 제작하는데 사용하였으며, set B primer는 RNAi 후, mRNA발현 차이를 확인하기 위해 RT-PCR에 이용하였다 (Table 1).

GV 난자는 10% FBS와 0.1% hyaluronidase, germinal vesicle breakdown (GVBD)를 방지하기 위해 300 uM dbcAMP를 첨가한 M199에서 채취하고, 배양액, c-mos, MTi7을 각각 미세 주입한 후, 20 ul의 M16배양액 (Sigma)으로 37°C, 5% CO_2 배양기에서 하루동안 배양하였다.

4. Semi-quantitative RT-PCR

2개의 난자를 150 ul lysis/binding buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM LiCl, 10 mM EDTA, 1% LiDS, 5 mM DTT)에 용해하고 rabbit globin mRNA (Sigma)를 2 pg 첨가하고 5분 후 Dynabeads mRNA Direct Kit를 이용해 mRNA를 추출하였다.[14] 전 처리된 20 ul의 dynabeads oligo (dT_{25})와 함께 실온에서 5분간 합성한 후, Dynal MPC-S(magnetic particle concentrator)에 의해 bead를 포획하고 2번의 세척과정을 거친다. poly(A)+ RNAs 는 10 ul Tris-HCl (10 mM Tris-HCl, pH 7.5)를 첨가하고 65°C에서 2분간 방치한 후 정제된 mRNA를 얻어 즉시 역전사 반응을 수행하였다. PCR은 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl2, 0.2 mM dNTPs, 25 pmol forward/reverse primer, 2.5 U Taq DNA polymerase (Promega)를 이용해 총 25 ul로 수행하였다. PCR수행 후 최종산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 Image Analyzer (Vilber Lourmat, France)로 분석하였다. 상대적인 유전자 발현의 차이는 globin 발현으로 normalization 한 후 다시 대조군과 비교하여 분석하였다. 결과는 mean ± SEM으로 나타내었고 실험은 5-6번 반복 수행하였다.

5. Immunofluoresence staining

난자는 Buffer M (25% glycerol, 50 mM KCl, 0.5 mM MgCl2, 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1 mM β-mercaptoethanol, 50 mM imidazol, 3% Triton X-100, 25 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)에 20분간 침투과정을 거친다[15,16]. 그 후 –20°C에서 10분간 메탄올에 고정하고 0.02% sodium azide, 0.1% BSA가 첨가된 PBS에 4°C에서 보관한다. Microtubule을 탐지하기 위해 1차 항체로는 anti-α-tubulin monoclonal antibody (Sigma)를 이용하였다. 고정된 난자는 PBS에 1000배 희석된 1차 항체와 함께 39°C에서 90분간 반응시킨 후, 0.5% Triton-X 100과 0.5% BSA가 포함된 PBS로 여러 번 수세하고 난자를 blocking solution (0.1 M glycine, 1% goat serum, 0.01% Triton-X 100, 1% powdered milk, 0.5% BSA, 0.02% sodium azide)으로 39°C에서 1시간 처리한 후, fluoroisothiocyanate (FITC)-labeled goat anti-mouse antibody (Sigma)와 50 ug/ml propidium iodide (Sigma)에 1시간 동안 반응하였다. 염색된 난자는 anti-fade mounting medium (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)을 이용해 봉입하고 laser-scanning confocal microscope (Bio-Rad MRC 1024 with a Krypton-argon ion laser)으로 관찰하였다.

6. 통계분석

결과의 통계분석은 one-way ANOVA방식을 이용하였으며 p값이 0.05이하일 때 통계적인 유의차가 있는 것으로 분석하였고 난자 발달율은 Chi-square 방식으로 분석하였다.

결 과

1. 난소내에서 MTi7의 발현양상

MTi7 *in situ* hybridization 결과, 생후 5일자 ICR 생쥐 난소에서 MTi7이 원시난포와 1차 난포의 난자의 세포질 부분에 특이적으로 발현하는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 1A). 그리고 6주령 생쥐 난소에서도 MTi7 발현을 확인한 결과, 같은 양상으로 MTi7이 모든 난자의 세포질에서 높게 발현하고 있음을 알 수 있었다 (Figure 1B).

2. GV난자에서 MTi7 RNAi 결과

1) 난자 성숙률

GV 난자에 대조군으로 배양액 혹은 c-mos dsRNA를 주입하고, 실험군으로 MTi7 dsRNA를 미

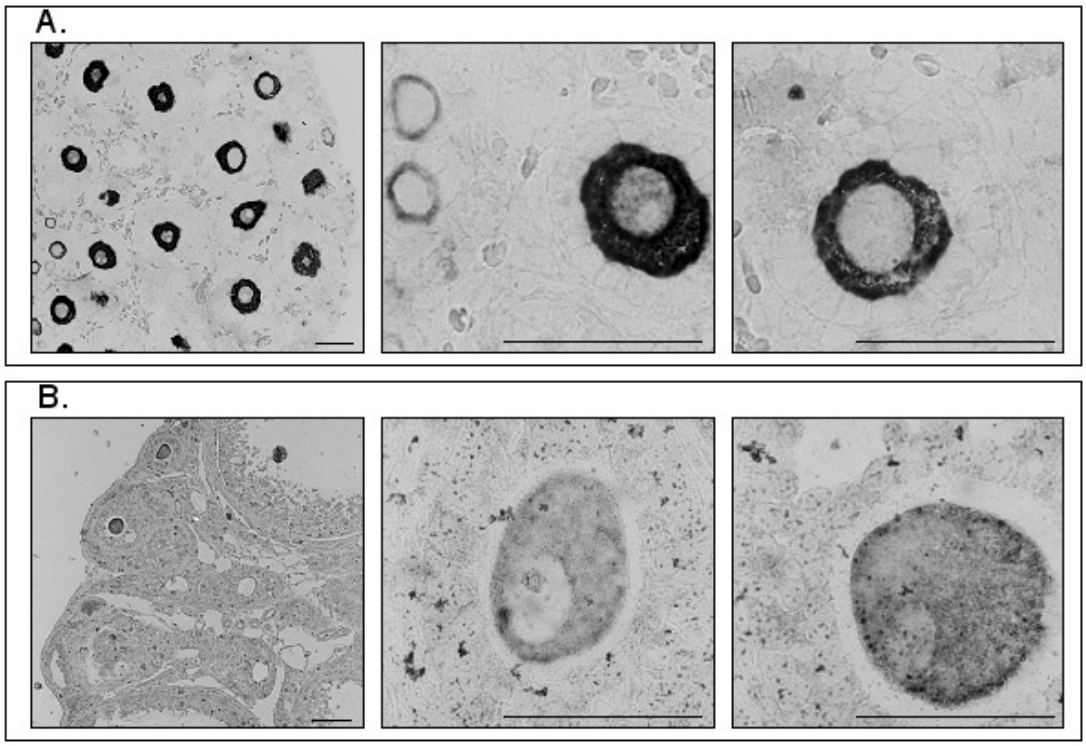

Figure 1. *In situ* hybridization analysiin the mouse ovaries at postnatal day5 (**A**) and 6-week-old adult mice (**B**). MTi7 expressed in oocytes at all stage of follicles from primordial to preovulatory. Bars indicate 50 um.

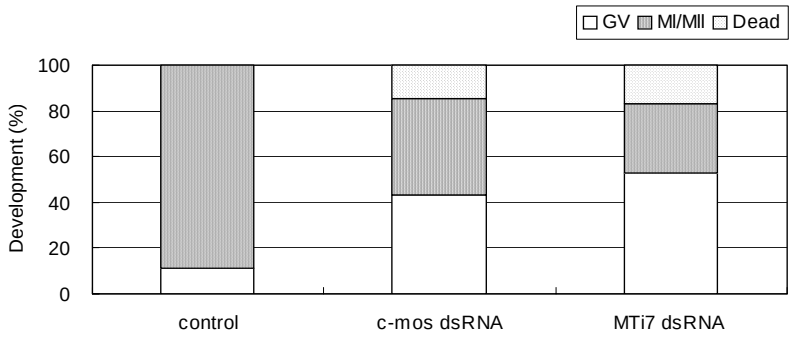

Figure 2. Maturation rate after RNAi. Maturation rate was scored 16h after microinjection of medium (control) or c-mos and MTi7 dsRNA into GV oocytes.

세 주입하여 16시간째에 난자의 성숙률을 확인하였다 (Figure 2). RNAi 결과, 배양액을 주입한 경우 89% 난자가 GVBD/MII로 난자성숙이 일어난 반면 (11% GV), c-mos dsRNA를 주입한 경우는 43.4%, MTi7 dsRNA를 주입한 경우는 53%가 GV에 정지되었다. 현미경으로 형태학적인 변화를 관찰한 후, GV상태의 난자의 절반은 mRNA의 양적 발현차이를 알아보기 위해 RT-PCR에 공시하였고, 절반은 핵과 세포질 내 tubulin의 변화를 관찰하기 위해 immunofluoresence staining에 공시하였다.

2) RNAi Target 유전자의 발현양상

RNAi 후, GV에 정지된 난자에서 MTi7과 c-mos

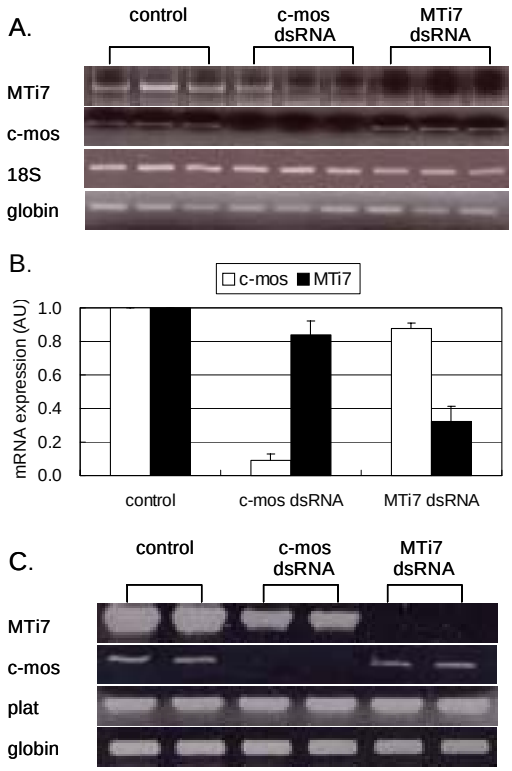

Figure 3. Expression of targeted and untargeted genes after microinjection of dsRNA for c-mos or MTi7 into GV oocytes. (**A**) Typical gene expression profile for targeted c-mos or MTi7 in GV-arrested after RNAi in triplicate. (**B**) Expression of each gene in control GV was taken as 100% and the relative expression of these genes in the other samples are compared to this amount. Data are expressed as mean ± SEM. (**C**) Typical gene expression profile for targeted and untargeted plat gene expression in the c-mos or MTi7 dsRNA-injected GV-arrested after RNAi in duplicate. There were 10-12 oocytes assayed for each group.

의 mRNAs 발현양의 변화를 비교 분석한 결과, GV에 정지된 난자에서는 c-mos와 MTi7 mRNAs 발현양이 각각 90%와 68% 감소함을 관찰할 수 있었다 (Figure 3A). 그런데, 예상치 않게도 우리는 c-mos를 RNAi 한 후, MTi7의 발현양이 ~16% 감소하였고, MTi7 RNAi 한 난자에서 c-mos mRNA 발현이 ~12% 감소함을 관찰하였다 (Figure 3B). 이렇게 c-mos와 MTi7이 함께 감소하는 것이 dsRNA의 염기서열에 비특이적으로 일어나는 mRNA 발현의 변화현상인지의 여부를 알아보기 위해 다시 한번 MTi7과 c-mos dsRNA를 각각 주입한 후 이번에는 두 유전자와 염기서열이 전혀 상관없는 새로운 비특정 유전자의 변화를 관찰하였다 (Figure 3A). 이때 사용한 유전자는 tissue type plasminogen activator (plat)로서, plat은 난자 내 발현이 c-mos처럼 풍부하며 그 기능과 염기서열은 c-mos와 전혀 관련이 없는 유전자이다[17]. 우리는 비특정 유전자인 plat의 발현이 c-mos 와 MTi7을 RNAi 한 후, GV에 정지된 난자에서 대조군과 차이 없이 RNAi에 상관없이 일률적으로 발현함을 확인하였다 (Figure 3C).

3) 염색체 물질 및 tubulin의 변화

Figure 4는 c-mos dsRNA와 MTi7 dsRNA를 각각 주입한 후, GV에서 염색체 물질과 tubulin의 변화 양상을 보여주는 결과이다. c-mos dsRNA를 주입한 경우는 염색체 물질이 뭉쳐있으며 (Figure 4A, B), 방추사 (spindle)의 형성에도 이상이 있음이 관찰되었다 (Figure 4A, B, C). 그러나, MTi7 dsRNA를 주입한 경우는 염색체물질이 GV 안에 퍼져있으며 (Figure 4D), GVBD가 일어난 난자의 경우에도 GV 막이 그대로 남아있는 마치 GV와 같은 양상을 띄는 것이 관찰되었다 (Figure 4E). 그러면서도, 2개의 방추극 (spindle poles)은 양쪽에 정상적으로 형성된 것으로 관찰되었고 (Figure 4D, E; 화살표), MII의 경우 염색체와 방추사 형성이 정상적이었다 (Figure 4F).

고찰 및 결론

1. 생쥐 난자에서 MTi7의 발현

본 연구에서는 MTi7이 모든 발달 시기의 난포 내 난자에서 높게 발현하고 있음을 발견하였다. 이는 growth differentiation factor-9[18], factor in germline, alpha[19], maternal antigen that embryos require[20]와 함께 몇 안 되는 난자 특이적 발현을 보이는 물질에 대한 보고로써 의미가 있는 일이다. MTi7은 그 안에 stop codon이 산재하고 있어 단백질을 합성하지 않는 noncoding RNAs (ncRNAs)의 일종으로 생각된다[21,22]. 이러한 ncRNAs은 전사 조절 (transcriptional regulation)과 염색체 복제 (chromosome replication) 그리고 RNA 합성과 변형 등 여러 과정에 다양한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다. 또한 mRNA 안정화와 단백질 번역, 변성 등에 관여하는 것으로

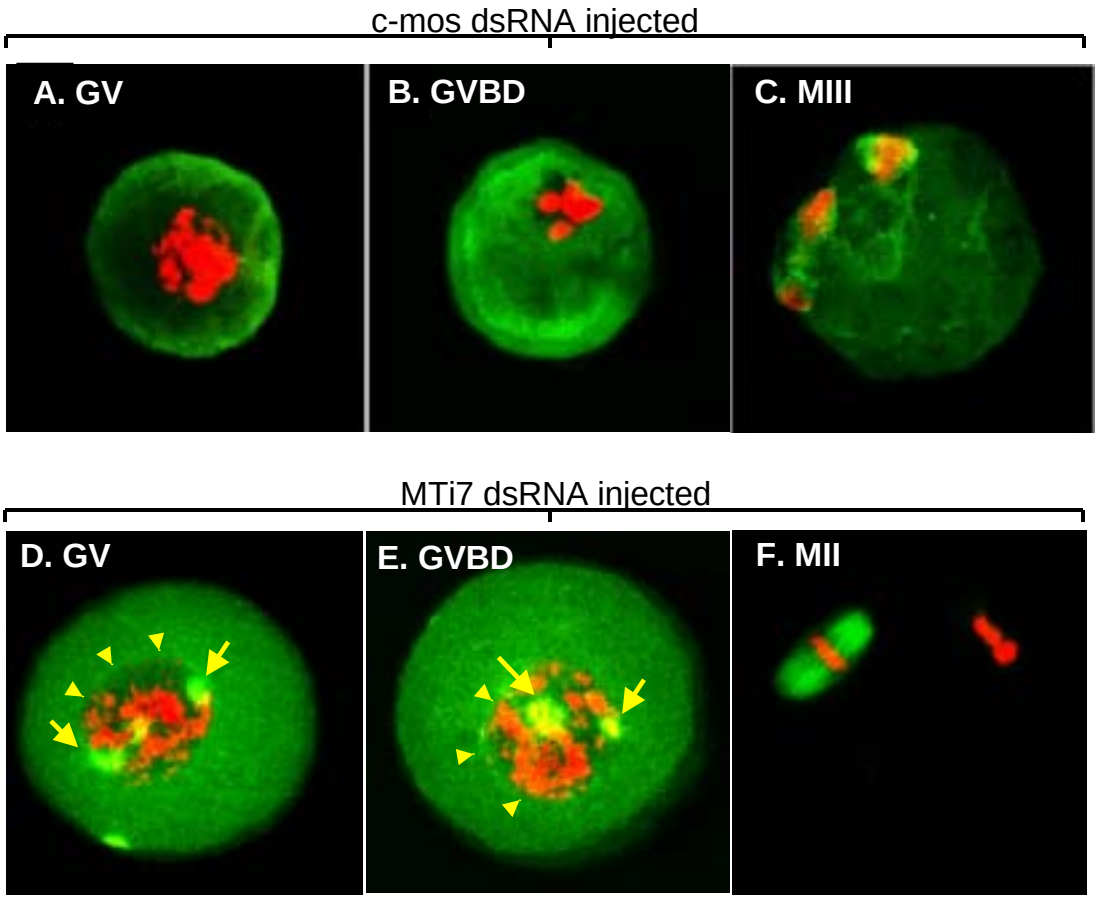

Figure 4. Laser scanning confocal microscopic images of microtubules (green) and chromatin (red) in mouse oocytes following dsRNA injection targeting c-mos and MTi7. Arrows indicate spindle poles and arrowheads indicate boundary for germinal vesicle membrane.

알려져 있다[22]. 따라서 난자 내 MTi7은 ncRNA 일종으로 난자의 성장과 분화를 조절하는 riboregulator로 작용할 것으로 추측된다.

2. 난자에서 MTi7 RNAi의 영향

본 연구의 RNAi 결과, MTi7이 난자성숙 특히 germinal vesicle breakdown에 관여할 것으로 생각된다. 지난 몇 년 동안에 상동성을 지닌 유전자의 변성을 유도하는 dsRNA의 세포반응은 생물학 분야에서 새로운 기법으로 자리 매김을 하고 있다. 본 RNAi 연구에 있어서 생쥐의 난자에 MTi7 dsRNA를 미세주입 후, 표현형의 변화 (phenotypic changes)가 나타났는데, 바로 GV 난자에 MTi7 dsRNA를 주입하였을 때 대조군에서는 90%정도 GVBD가 일어남에 비하여, RNAi 군에서는 53% (살아있는 난자중에서는 63%)가 GV에 그대로 멈추어 있었다. 이 때 GV에서는 난자 중앙 부위에 염색체와 핵막이 그대로 유지되어 있는 반면, 두 개의 방추극 (spindle poles)은 정상적으로 분포하고 있었다. 이 결과로 미루어 MTi7의 기능은 난자성숙동안 방추체 형성에는 영향을 미치지 않지만, 염색체 응집과 핵막붕괴에 관여할 것으로 추측된다. 즉, 실제로 핵막붕괴가 일어나지 못한 것이 어떤 기전에 의한 것인지에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 사료된다.

3. 난자의 성숙 동안 c-mos와 MTi7의 관계

RNAi는 특정 mRNAs의 염기서열에 특이적인 발현 저해 혹은 분해를 가져 오는 것으로 알려져 있다. 그러나, 본 연구에서는 난자에 MTi7을 RNAi 한 경우 c-mos의 동반된 감소 혹은, 그 반대로 c-mos RNAi 경우 MTi7의 감소를 관찰할 수 있었는데, 이는 염기서열 비특이적인 감소가 아니고 아마도 기능이 연관되어 있는 유전자이기 때문으로 사료된다. 이를 검증하기 위해 18S RNA의 발현 이외에도 c-mos 나 MTi7과는 염기서열이나 그 기능이 관계가 없다고 알려져 있는 tissue type plasminogen activator의 발현을 관찰한 결과, 이 유전자의 발현에는 아무런 변화가 없음을 확인하였기 때문이다. 이는 이미 보고되어 있는 연구결과 즉, 생쥐의 난자와 배아에서 특정 염기서열 유전자의 감소와 연관성이 없는 다른 유전자의 무변화 즉, c-mos와 E-cadherin[8] 또는 c-mos와 tissue type plasminogen activator[9]의 결과와 동일한 결과임을 알 수 있었다. 이러한 c-mos와 MTi7의 동반 감소 현상은 배아에 Oct-4 siRNA를 미세 주입한 경우 Oct-4와 함께 nanog 유전자의 감소가 일어나는 현상이 관찰된 경우로 미루어 기능이 연관된 유전자 사이에 일어나는 현상으로 추측된다 (충북대 김남형교수 연구결과, 미발표). 따라서 본 연구결과, c-mos와 MTi7은 유전자간에 그 기능이 연관되어 있거나 발현기전이 얽혀있을 것으로 사료된다. c-mos는 mitogen-activated protein kinase (MAPK)를 활성화 시키는 것으로 알려져 있다[23,24]. 이와 같은 결과에 미루어 c-mos와 MTi7의 동반된 감소는 MAPK 또는 MPF의 발현 및 기능조절에 관여할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Richards JS. Perspective: The ovarian follicle-A perspective in 2001 Endocrinol. 2001; 142: 2184-93.
2. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, et al. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. Endocrinol 2002; 143: 1076-84.
3. Park CE, Ko JJ, Lee SH, Cha KY, Kim K, Lee KA. Analysis of the gene expression by laser capture microdissection (Ⅱ): Differential gene expression between primordial and primary follicles. Dev. Reprod. 2002; 6: 89-96.
4. Hennebold JD, Tanaka M, Saito J, Hanson BR, Adashi EY. Ovary-selective genes I: The generation and characterization of and ovary- selective complementary deoxyribonucleic acid library. Endocrinol 2000; 141: 2725-34.
5. Fire A. RNA-triggered gene silencing. Trends Genetics 1999; 15: 358-63.
6. Sharp PA. RNA interference-2001. Genes & Dev 2001; 15: 485-90.
7. Svoboda P, Stein P, Hayashi H, Schultz RM. Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. Development 2000; 127: 4147-56.
8. Wianny F, Zernicka-Goetz M. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. Nat. Cell Biol 2000; 2: 70-75.
9. Kim MH, Yuan X, Okumura S, Ishikawa F. Successful inactivation of endogenous Oct-3/4 and c-mos genes in mouse preimplantation embryos and oocytes using short interfering RNAs. Biochem. Biophys. Res Commun 2002; 296: 1372-77.
10. Grabarek JB, Plusa B, Glover DM, Zernicka-Goetz M. Efficient delivery of dsRNA into zona-enclosed mouse oocytes and preimplantation embryos by electroporation. Genesis 2002; 32: 269-76.
11. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor; 1989.
12. Araki K, Naito K, Haraguchi S, Suzuki R, Yokoyama M, Inoue M, et al. Meiotic abnormalities of c-mos knockout mouse oocytes: activation after first meiosis or entrance into third meiotic metaphase. Biol Reprod 1996; 55: 1315-24.

13. Colledge WH, Carlton MB, Udy GB, Evans MJ. Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. Nature 1994; 370: 65-8.
14. Wrenzycki C, Wells D, Herrmann D, Miller A, Oliver J, Tervit R, Niemann H. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. Biol Reprod 2001; 65: 309-17.
15. Kim NH, Funahashi H, Prather RS, Schatten G, Day BN. Microtubule and microfilament dynamics in porcine oocytes during meiotic maturation. Mol Reprod Dev 1996; 43: 248-55.
16. Simerly C, Schatten G. Techniques for localization of specific molecules in oocytes and embryos. Methods Enzymol 1993; 225: 516-53.
17. Svoboda P, Stein P, Hayashi H, Schultz RM. Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. Development 2000; 127: 4147-56.
18. Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. Nature 1996; 383: 531-35.
19. Soyal SM, Amleh A, Dean J. FIG alpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. Development 2000; 127: 4645-54.
20. Tong ZB, Nelson LM. A mouse gene encoding an oocyte antigen associated with autoimmune premature ovarian failure. Endocrinol 1999; 140: 3720-26.
21. Erdmann VA, Barciszewska MZ, Szymanski M, Hochberg A, de Groot N, Barciszewski J. The non-coding RNAs as riboregulators. Nucleic Acids Res 2001; 29: 189-93.
22. Storz G. An expanding universe of noncoding RNAs. Science 2002; 296: 1260-63.
23. Sagata N. Introduction: Meiotic maturation and arrest in animal oocytes. Semin. Cell. Dev Biol 1998; 9: 535-37.
24. Verlhac MH, Kubiak JZ, Weber M, Geraud G, Colledge WH, Evans MJ, et al. Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. Development 1996; 122: 815-22.