

닭의 발생 단계별 세포내 Telomere의 양적 분포양상과 Telomerase 활성도 분석

조은정* · 최철환** · 손시환*

진주산업대학교 동물생명과학과 · 동물생명산업연구센터*, 농진청 축산연구소**

The Amount of Telomeres and Telomerase Activity on Chicken Embryonic Cells During Developmental Stages

E. J. Cho*, C. H. Choi** and S. H. Sohn*

Department of Animal Science and Technology & RAIRC, Jinju National University Jinju 660-758, Korea*,
National Livestock Research Institute, RDA**

ABSTRACT

Telomeres locate at the end of chromosomes and consist of a tandem repeat sequence of (TTAGGG)ⁿ and associated proteins. Telomerase is a ribonucleoprotein which act as a template for the synthesis of telomeric DNA. Telomeres are essential for chromosome stability and are related with cell senescence, apoptosis and cancer. This study was carried out to analyze the amount of telomeres and telomerase activity of chicken cells during embryonic and developmental stages. The whole embryos and prenatal tissues such as brain, heart, liver, kidney and testis at different developmental stages were obtained from Korean Native Chicken. The amount of telomeres on embryonic cells was analyzed by quantitative fluorescence *in situ* hybridization (Q-FISH) techniques using the chicken telomeric DNA probe. Telomerase activity was measured by telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay. Results indicated that the amounts of telomeric DNA on the most embryonic cells were gradually decreased during ontogenesis. Furthermore, the quantity of telomeres was quite different among embryonic tissues according to developmental origin. The relative amount of telomeres has more in regenerative cells such as embryonic disc and testicular cells than in non-regenerative cells such as liver, brain, heart and kidney cells. Telomerase activity was also highly detectable in most chicken cells at early embryonic stages. After 9 days of incubation, however, the telomerase activitie was gradually decreased in brain, heart and liver cells, but not in the testicular and kidney cells. In conclusion, the amount of telomeres and telomerase activity are closely related to cell differentiation and tissue specificity during chicken developmental stages. Moreover, the highly positive correlation is existed between telomere amount and telomerase activity in chicken cells.

(Key words : Chicken, Embryonic tissues, Telomere, Telomerase, Q-FISH, TRAP)

I. 서 론

대부분 진핵생물의 염색체 말단부는 TTAGGG의 반복 염기서열로 구성되어 있으며, 이들이 몇몇 단백질과 결합한 형태를 텔로미어(telomere)라 한다. 반면 텔로머레이스(telomerase)는 telomeric

DNA 합성에 직접 관여하는 ribonucleoprotein으로 알려져 있다. 최근 많은 연구들에서 텔로미어의 역할은 염색체의 안정성에 본질적으로 작용하여 세포의 노화, 사멸 및 암의 발생과 밀접한 관련이 있음을 보고하고 있다(Robinson, 2000; Ahmed와 Tollefsbol, 2001; Cottliar와 Slavutsky, 2001;

Corresponding author : S. H. Sohn, Dept. of Animal Science & Biotechnology, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea. Phone : (+82)55-751-3264, E-mail : shsohn@jinju.ac.kr

Pathak 등, 2002 Sohn 등, 2002). 정상 세포의 경우 1 세포 주기 당 약 50-200 bp의 telomeric DNA의 유실이 있음으로 알려져 있고, 일정 길이 이하에 이르면 분열 중단으로 인한 자연사적 세포의 사멸(apoptosis)이 유기된다(Greider와 Blackburn, 1985).

지금까지의 텔로미어 및 텔로머레이스에 대한 정보는 거의 인간을 포함한 포유동물에 국한된 것으로 사람에게 있어서 텔로머레이스의 발현은 태아조직에서는 왕성하나 신생자 이후 체세포들에서는 거의 나타나지 않는다(Meeker와 Coffey, 1997; Forsyth 등, 2002). 그러나 생식세포와 같이 지속적 재생력을 가진 분열세포와 무한정 분열하는 암세포의 경우 이의 발현이 지속적으로 나타난다(Bekaert 등, 2004). 반면 조류에 대해서는 이에 대한 정보가 극히 미흡한 실정으로 세포내 텔로미어의 분포 양상과 텔로머레이스의 조절 양상이 아직 명확히 밝혀지지 못한 상태이고, 단지 발생과 성장기 때 일부 조직에 대한 텔로머레이스의 활성 정도가 보고되고 있다. Venkatesan과 Price(1998)는 닭의 텔로머레이스 활성 양상은 마우스에서처럼 생후 지속적인 활성을 나타낸다고 보고한 바 있으나, Taylor와 Delany(2000)는 닭의 초기 배자 분화에서부터 기관 형성 시기까지는 텔로머레이스가 지속적 활성도를 보이나 기관 형성 이후 신생 개체에서는 활성도가 감소하였고 반면 장기, 면역기관 및 생식세포에서는 지속적 활성도를 보여 이의 기전이 사람과 유사함을 보고하여 매우 상반된 결과를 제시하였다.

생물체의 세포 내 텔로미어 및 텔로머레이스의 역할과 변화 양상의 연구는 생명 현상을 세포적 차원에서 구명할 수 있는 매우 중요한 과제로 사료되며, 텔로머레이스의 up-regulation과 down-regulation이 개체 발생의 어느 시점에서 이루어지고, 이들이 텔로미어에는 어떠한 영향을 미치는가가 작금의 연구 현안이라 할 수 있겠다. 발생 단계에서 텔로미어의 연구는 현안이 되고 있는 복제 동물의 생산과 줄기세포(stem cell)의 연구에도 근간이 된다. 이러한 관점에서 조류는 세포의 분화와 노화에 관련되어 매우 좋은 system을 가진 동물로서 다른 실험동물들에 비해 세

포의 수명이 엄격히 제한 조절되어 있고, 닭의 경우 포유류와 또 다른 척추동물의 모델로서 텔로미어나 텔로머레이스의 구조, 기능 및 발생계통학적 연구에 좋은 재료로 제공될 수 있다.

따라서 닭의 배 발생단계별 텔로미어와 텔로머레이스의 분석은 개체의 발생과 노화에 관한 생물학적 기작을 밝히는데 매우 중요한 자료라 사료되어 본 연구에서는 한국재래계의 초기 배자 및 발생 단계별 각 신생 조직에 대한 텔로머레이스 활성도와 텔로미어의 함량을 분석 고찰하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물

닭의 발생단계별 텔로미어 함량 분석 및 텔로머레이스 활성도 분석을 위하여 진주산업대학교 동물사육장에 사육중인 한국재래계를 이용하였고, 이들이 생산한 수정란으로서 부화 시기별 발생 개체의 조직을 채취하여 분석하였다.

2. 닭의 초기배자 및 발생조직 표본 제작

닭의 초기 배자 표본은 산란 직후, 부화 1일, 2일 및 3일령 수정란을 파각하여 배반을 채취하였고, 발생 조직 표본은 부화 7일, 9일, 13일, 18일째 및 부화 직후 발생 개체의 간, 뇌, 심장, 신장, 정소를 대상으로 이들 각 조직들을 실체현미경하에서 일부를 떼어 준비하였다. 채집된 조직들은 D-PBS(Gibco, Invitrogen Corp. Grand Island, N.Y, USA) 용액으로 세척 한 다음 RPMI 1640(Gibco, Invitrogen Corp. Grand Island, N.Y, USA) 배양액이 들어있는 시험관으로 옮겨 200 × g에서 10분간 원심분리 시켰다. 침전된 세포에 0.9% sodium citrate(Sigma Chem, St Louis, MO, USA) 용액을 첨가하여 15분간 저장처리하고 이후 고정액을 10방울 정도 첨가하여 원심분리 시켰다. 고정처리는 methanol과 acetic acid가 3:1로 혼합된 고정액을 이용하고 이를 3회 반복 처리한 후 세포액을 3~5방울 정도 떨어뜨려 슬라이드 표본을 제작하였다.

3. 형광접합보인법 분석

형광접합보인법(Fluorescence *in situ* Hybridization; FISH)은 Kobayashi 등(1998)의 방법을 다소 변형하여 적용하였다. 준비된 슬라이드 표본을 10 μ l RNase A(0.1 mg/ml)가 함유된 50 ml의 2 \times SSC 용액에 넣고 37 $^{\circ}$ C의 항온수조에서 30분간 처리하여 RNA를 제거한 후 초자수로 세척하고 80%, 90%, 100% 에탄올로 탈수시켜 상온에서 건조시켰다. Hybridization액(13 μ l formamide, 5 μ l hybridization buffer, Dig-labelled chicken telomeric DNA probe 2 μ l(100 ng/ μ l), 이상 Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA)을 표본 슬라이드에 떨어뜨리고 커버글라스로 덮은 후 가장자리를 종이본드(paper bond)로 밀봉하였다. 이를 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 처리하여 probe와 표본 DNA를 변성시키고 다시 38.5 $^{\circ}$ C에서 12시간 이상 접합(hybridization)시켰다. 이후 슬라이드는 2 \times SSC액에 담겨 72 $^{\circ}$ C에서 5분, PN buffer(0.1% sodium phosphate, 0.1% Nonidet P-40)로 실온에서 2분간 세척한다. 접합 탐지를 위하여 슬라이드에 20 μ l의 anti-digoxigenin-fluorescein(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA)을 떨어뜨리고 38.5 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 배경 염색을 위해 propidium iodide solution(PI, Sigma Chem, St Louis, MO, USA)을 이용하였으며, 형광 접합 발현 양상은 523 nm 파장대의 필터를 부착한 형광 현미경(Model AX-70, Olympus, Tokyo, Japan)으로 검경하고, 최소 50여 개의 상을 획득하였다. 획득한 각각의 상은 디지털 카메라(Model DP-70, Olympus, Tokyo, Japan)로 촬영하고, 이미지 분석 프로그램(MetaMorph, UIC, Pennsylvania, USA)을 이용하여 배경 염색된 붉은 색(PI)의 핵 면적 대비, 핵 내 녹색(FITC)의 형광 시그널의 분포 비를 계산하였으며, 분석 상들의 평균값으로 세포 당 telomeric DNA의 상대적 함량을 나타내었다.

4. 텔로머레이스 활성도 분석

텔로머레이스 활성도 분석은 Kim과 Wu(1997)가 제시한 telomeric repeat amplification protocol

(TRAP) 방법으로 상업용 telomerase detection kit(TRAP_{EZE}[®], Intergen Co., Purchase, NY, USA)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 다음과 같이 실시하였다. 분석할 조직들은 3-cholamidopropyl dimethylammonio-1-propane-sulfonate(CHAPS) lysis buffer를 이용하여 단백질을 분리하고, 30분 동안 얼음 위에 정치시켰다. 이 후 4 $^{\circ}$ C에서 12,000 \times g로 20분간 원심분리하고 상층액을 새 튜브로 옮긴 후 단백질 정량을 시행하였고(Bradford, 1976), 정량된 추출물은 급속 냉동시킨 후 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다. Polymerase chain reaction(PCR)을 위해 10 \times TRAP reaction buffer 5 μ l, 50 \times dNTP mix 1 μ l, TS primer 1 μ l, TRAP primer mix 1 μ l, Taq polymerase(2.5 units/ μ l) 1 μ l를 섞은 PCR 혼합물을 준비하고, 각 튜브에 혼합물을 9 μ l씩 분주하여 여기에 초자수 40.5 μ l와 세포 및 조직 추출물 0.5 μ l(1 mg/ μ l)를 섞어 총량이 50 μ l이 되게 하였다. PCR은 30 $^{\circ}$ C에서 30분간 TS-telomerase product를 확장시킨 다음 94 $^{\circ}$ C 30초, 59 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초간 3단계로 35 사이클을 시행하였다. 증폭된 텔로머레이스는 15% polyacrylamide 겔 전기영동을 통해 75 V에 이어 100 V에서 2시간동안 실시하고 ethidium bromide(EtBr, Sigma Chem, St Louis, MO, USA)로 염색한 후 결과를 관찰하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 닭 발생 단계별 조직의 텔로미어 함량 분석

초기 배자 및 발생 개체 각 조직들의 텔로미어 함량 분석을 위하여 산란 직후 수정란 및 1일령, 2일령 배반과 부란 7일령, 13일령 및 부화 직후 병아리의 간, 뇌, 심장, 신장, 정소 조직을 대상으로 양적형광접합보인법(quantitative fluorescence *in situ* hybridization; Q-FISH)을 수행하였다. 분석할 발생 개체의 각 조직은 실체 현미경하에 채집한 후, 표본을 제작하여 FISH를 수행하고, 형광현미경하에서 5~6개의 세포 간기상을 한 개의 프레임으로 이미지를 획득하였다. 획득한 50개 이상의 이미지를 이미지

분석 프로그램을 이용하여 각 조직별 세포내 텔로미어 함량을 분석하였다.

Table 1은 닭의 초기 배반 세포의 telomeric DNA의 상대적 함유율을 분석 제시한 것이고, Table 2는 닭의 발생 단계별 각 조직 세포의 telomeric DNA 함유율로서 부란 7일령, 13일령 및 부화 직후 병아리의 간, 뇌, 심장, 신장, 정소 조직의 분석 값이다. Table 3은 초기 배자를 포함한 부란 중 각 발생 조직 간 세포의 telomeric DNA의 함유율을 비교 분석한 결과이고, Fig 1은 초기 배자 및 발생 조직별 세포에 대한 텔로미어 분포 양상의 대표적 FISH 결과이다.

이상의 분석 결과로부터 닭의 초기 배자상태에서는 발생 일령에 따른 배반 세포의 텔로미어 함량의 변화는 거의 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 배반의 경우 조직 분화의 잠재성을 가진 증식성 세포이기 때문에 초기 분열 단계에서 양적 변화 없이 지속적으로 높은 함유율을 나타내는 것으로 사료된다. 반면 발생 과정 중 기관 형성 이후 발육 단계가 진행됨에 따라 조직 내 텔로미어의 함유율은 감소되는 양상을 나타내었는데, 특히 간, 뇌, 심장 조직

의 경우 발생이 진행되면서 유의적인 감소를 나타내고 있다. 그러나 생식선 조직인 정소와 신장에서는 발생 진행에 따른 함유율의 변화는 거의 없는 것으로 나타나는데 정소 조직의 경우 이를 구성하는 세포들이 지속적 분열 세포들이기 때문에 발생 기간에 따른 텔로미어 함량의 변화는 없는 것으로 생각되며, 이러한 결과는 사람을 포함한 포유동물에서도 동일

Table 1. The relative amounts of telomeric DNA in early chicken embryonic cells

	Number of analyzed cells	Percentage of telomeric DNA
Day-0 embryos	1,000	2.71 ± 0.11
Day-1 embryos	1,000	2.49 ± 0.10
Day-2 embryos	1,000	2.49 ± 0.08

The values are means ± standard errors.

Table 2. The relative amounts of telomeric DNA in chicken tissues during developmental stages

	Number of analyzed cells	Developmental tissues					Total mean
		Liver	Brain	Heart	Kidney	Testis	
Day-7 fetus	250	2.22 ± 0.09 ^a	2.17 ± 0.11 ^a	2.13 ± 0.11 ^a	2.28 ± 0.09 ^a	2.61 ± 0.10 ^a	2.29 ± 0.10 ^a
Day-13 fetus	250	1.89 ± 0.08 ^{ab}	1.88 ± 0.10 ^{ab}	2.01 ± 0.10 ^{ab}	2.12 ± 0.10 ^a	2.79 ± 0.13 ^a	2.13 ± 0.10 ^{ab}
Hatched chicken	250	1.78 ± 0.11 ^b	1.72 ± 0.12 ^b	1.83 ± 0.10 ^b	2.13 ± 0.12 ^a	2.54 ± 0.14 ^a	2.00 ± 0.12 ^b

The values are means ± standard errors.

^{ab} Means with different superscripts in the same column significantly differ at p < 0.01.

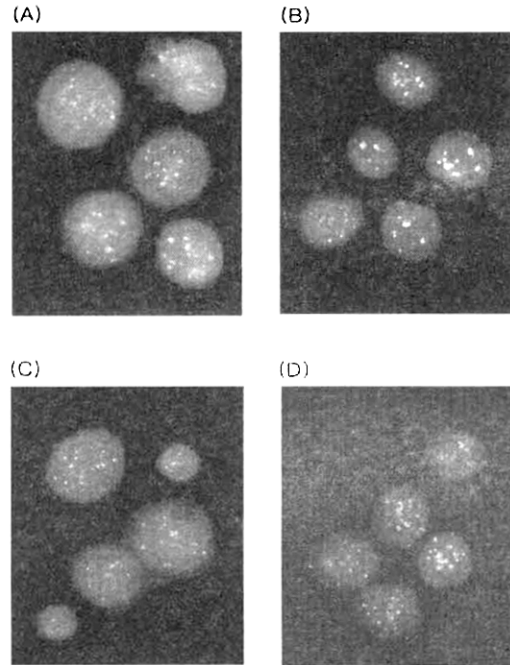


Fig. 1. Telomere distribution of chicken cells after FISH using telomeric DNA probe; Day-0 embryonic cells (A), Brain cells from 7-days fetus (B), Brain cells in hatched chicken (C), Testicular cells in hatched chicken (D).

Table 3. Comparison of the amounts of telomeric DNA among chicken tissues during ontogenesis

Developmental tissues	Number of analyzed cells	Percentage of telomeric DNA
Whole embryo	3,000	2.56 ± 0.10 ^a
Liver	750	1.97 ± 0.09 ^b
Brain	750	1.92 ± 0.11 ^b
Heart	750	2.01 ± 0.10 ^b
Kidney	750	2.18 ± 0.10 ^b
Testis	750	2.64 ± 0.12 ^a

The values are means ± standard errors

^{a,b} Means with different superscripts in the same column significantly differ at $p < 0.01$.

양상임이 확인 된 바 있다(Bekaert 등, 2004). 하지만 비 증식성 세포인 신장 조직의 특이적인 양상은 신장 조직 중 사구체 세포가 표본의 대부분을 차지한 것에 기인된 것이라 사료되어 신장 조직을 구성하고 있는 세포의 특이성에 대해서는 또 다른 생리학적 연구가 뒷받침되어야 한다고 생각된다. 한편 동일 발생 시점의 조직 간 텔로미어 함유율에서도 유의적 차이를 나타내고 있는데 정소 및 초기 배자의 세포가 신장, 심장, 간, 뇌에 비해 월등히 높게 나타났다. 이러한 결과는 Taylor와 Delany(2000)가 텔로미어 제한 단편 길이 측정법(telomere restriction fragment; TRF)으로 닭 발생 시 조직별 분석에서 텔로미어의 길이가 생식선 조직이 체세포 조직에 비해 평균 0.4 kb가 길고, 심장 세포보다는 무려 1.1 kb가 길었다는 보고를 재 입증하는 결과라 할 수 있겠다.

현재 텔로미어의 양적 분석을 위한 대표적인 방법으로는 TRF법과 Q-FISH 방법이 있다. Southern blot 분석을 이용한 TRF법은 직접적인 텔로미어 길이 측정법으로서 가장 보편적으로 이용되고 있으나 blotting하는 동안 DNA의 소실이 발생하고 텔로미어 길이가 극단적으로 길 경우 측정하는데 오차가 생길 수 있을 뿐만 아니라 방사선 동위원소를 사용해야 하는 불편함이 있다(Byant 등, 1997; Oexle, 1998, Gan 등, 2001). 한편 분자세포유전학적 기술인 Q-FISH

방법은 핵 내 특정 유전자에 대한 접합 탐침기 술로서 특정 프로브(probe)를 이용하여 알고자 하는 유전자의 위치 또는 상대적 함량을 분석하는 기술이다. 특히 Telomeric Q-FISH 방법은 peptide nucleic acid(PNA) telomere oligonucleotides를 프로브로 하여 세포 내 telomeric DNA의 함량을 디지털 이미지 분석기로 분석하는 방법이다(Rufer 등, 1998; Poon 등, 1999; Ferlicot 등, 2003). 이는 간기 세포뿐만 아니라 각 염색체별 텔로미어의 분포양상과 양적 측정이 가능하며 다양한 세포에 적용하여 신속하게 분석할 수 있고 분석치의 정확도도 매우 높은 것으로 알려져 있다(Hultdin 등, 1998; Slijepcevic, 2001). 지금까지 닭의 텔로미어 양적 분석에 관한 연구는 TRF법에 의한 결과로만 한정되어있는데 Lejnine 등(1995)이 이의 크기를 3~100 kb로 보고한 이래 Venkatesan과 Price(1998)가 8~20 kb 정도임을 제시하였고, Delany 등(2003)은 분포된 텔로미어의 크기, 염색체상 위치 및 연령에 따른 안정성을 기초로 3개 군으로 나누고 Class I은 0.5~10 kb, Class II는 10~45 kb 및 Class III는 40 kb~2 Mb로 구분하였다. 이러한 크기는 이배체내 TTAGGG의 함유율이 약 3~4% 정도로서 사람의 0.3%에 비하여 현저히 높은 구성비를 나타내고 있다. 이는 본 연구 결과와 비교하였을 때 거의 비슷한 수준이거나 다소 높은 분석치이나 분석 조직의 종류, 표본의 연령, 분석 방법 등에 따라 많은 편차가 있으므로 이들 분석치와 직접 비교에는 무리가 있다고 생각된다.

닭의 초기 배 및 발생 과정 중 각 조직별 세포내 텔로미어의 함량을 Q-FISH 방법에 의해 분석한 것은 본 연구가 처음 시도한 것으로 분석 결과에서 나타난 발생 시기별, 조직별 텔로미어 함유율의 차이는 세포적 특이성을 설명할 수 있는 훌륭한 표지(marker)로 사료된다.

2. 닭 발생 단계별 조직의 텔로머레이스 활성도 분석

닭의 배 발생단계별 각 신생 조직에 대한 텔로머레이스 활성도를 TRAP법으로 비교 분석하

었다. Fig. 2는 닭의 초기 배자(whole embryo) 및 부화 7일령 이후부터 개체 발생시까지 각 발생 일령별 개체의 간, 뇌, 심장, 신장, 정소 조직에 대한 TRAP 분석 결과이다. 본 그림에서 가장 아래의 층은 primer-dimer이고, 그 윗 층은 36bp 위치의 substrate internal control (S-IC)을 나타내며, 이후 50 bp부터 텔로머레이스 활성도가 증가할 때마다 6 bp씩 telomeric DNA의 band가 추가하여 나타난다. 분석 결과, 초기배자에서는 지속적으로 강한 텔로머레이스의 활성도를 보이며, 7~9일령 부란 개체의 모든 조직에서도 비교적 강한 활성을 나타내었다. 하지만 9일령 이후 간, 뇌, 심장 조직의 텔로머레이스 활성도는 현저하게 떨어지는 반면 신장, 정소 조직에서는 지속적인 활성을 보였다. 이러한 결과는 초기 배자 및 생식선 조직은 증식성 세포들로서 분열능력이 높고 많은 세포들이 미분화 단계임에 따라 텔로머레이스의 지속적인 활성을 나타내고, 간, 뇌, 심장 조직의 경우 거의 비 증식성 세포들로 구성되어 있으므로 분화가 완료되는 시점에서부터 텔로머레이스의 활성도가 떨어지는 것으로 보인다. 사람의 경우에도 발생 단계에서 조직의 분화가 일어난 후 곧바로 대부분의 조직에서 텔로머레이스의 활성도가 감소되는데 심장, 뇌, 간, 폐, 근육, 신장의 순으로 활성 양상이 없으며, 신생자 및 성체에서 생식선이나 골수를 제외한 거의 모든 조직에서 텔로머레이스 활성도는 나타나지 않는다고 알려져 있다(Ulaner 등, 1998, 2001; Wright 등, 1996, 2001). 또한 소의 경우에서도 생식세포 및 초기 배자 상태, 즉 상실배(morula)나 포배

(blastocyst)상태일 때 이들의 활성도가 발생 조직에 비해 상대적으로 높고 조직의 분화 이후 감소

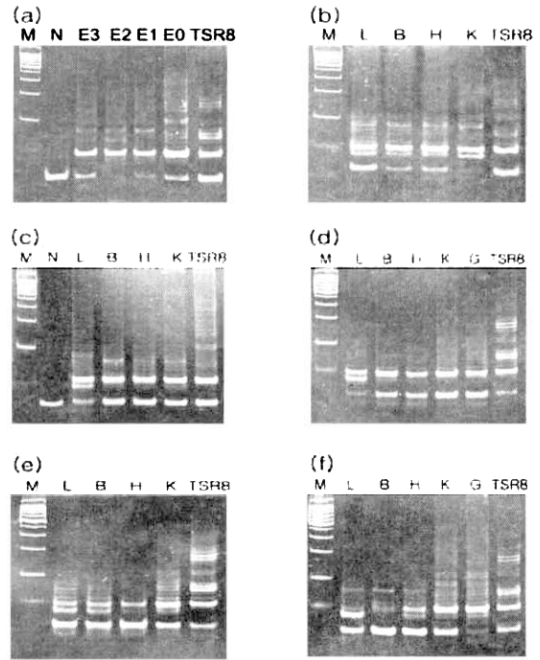


Fig. 2. Telomerase activity of whole embryos, liver, brain, heart, kidney and gonad tissues during chicken developmental stages; Samples from 0 to 3-days whole embryos (a), 7-days fetus (b), 9-days fetus (c), 13-days fetus (d), 18-days fetus (e), and hatched chicken (f). M: 100bp size marker, E0, E1, E2, E3: 0, 1, 2, 3-days whole embryos, N: negative control, L: liver, B: brain, H: heart, K: kidney, G: gonad, TSR8: positive control.

Table 4. Telomerase activity profiles of chicken tissues during ontogenesis

Tissues	Embryonic and developmental stages								Hatched
	E0	E1	E2	E3	E7	E9	E13	E18	
Whole embryo	+++	+++	+++	+++					
Kidney			N/A		+++	+++	+++	+++	+++
Brain			N/A		+++	++	+	+	+
Liver			N/A		+++	++	+	+	+
Heart			N/A		+++	++	+	+	+
Gonad			N/A		+++	+++	+++	N/A	+++

(+++), strong activity; (++) , moderate activity; (+) , trace activity; () , no activity; N/A, not available.

한다고 보고하고 있다(Betts와 King, 1999; Xu와 Yang, 2000). 닭의 발생 과정 중 텔로머레이스의 활성 양상도 연구자간에 다소의 이견은 있으나 사람과 거의 유사하다고 보고하고 있다(Taylor와 Delany, 2000; Delany 등, 2003). 즉, 초기 배자 단계에서 강한 텔로머레이스의 활성도를 보이다가 부란 10일경부터 뇌, 간, 심장, 근육 조직의 텔로머레이스의 활성이 감소하기 시작하여 부란 17일 이후부터 거의 없어지며, 폐와 신장 조직은 부화 시까지 감소가 지속되다가 신생자 이후 없어지고, 증식성 조직이라 할 수 있는 면역조직과 생식선 조직은 생후에도 지속적 활성을 나타낸다고 하였다. 이러한 결과는 본 연구에서 분석된 결과와 거의 일치되는 것으로 부란 9일령 이후 발생 조직들의 텔로머레이스 활성도가 급격히 감소하는 양상은 닭의 배 발육 과정 중 부란 10일이 지나면 모든 조직이 형성되고 이후 분화 조직들이 발달 단계에 들어감에 따라 세포 증식이 비 활성화되는 것과 밀접한 관련이 있는 것으로 생각된다.

따라서 닭의 발생 단계별 텔로머레이스 활성도는 일령 및 조직에 따라 각기 다른 활성 양상을 보이며, 재생 능력이 있는 증식성 세포는 지속적인 활성(constitutive activity)을 나타내고, 비 증식성 세포는 발생이 진행됨에 따라 텔로머레이스 활성도가 점진적으로 떨어지는 감소(down-regulation) 양상을 보인다(Table 4). 특히, 조직별 세포의 분화 및 증식성 특이성과 텔로머레이스 활성도 간에는 매우 밀접한 관련이 있으며, 더불어 본 분석에서 나타난 텔로미어의 양적 분석과도 매우 높은 상관관계가 있는 것으로 보여 닭의 경우 세포내 텔로미어의 함량은 텔로머레이스의 활성도에 절대적으로 영향을 받는 것으로 사료된다.

IV. 요약

텔로미어는 염색체 말단에 존재하며 TTAGGG의 단순 반복 DNA 염기서열과 특정 단백질로 구성되어 있으며, 염색체의 안정성에 주된 작용을 하며 세포의 노화, 사멸 및 암의 발생과 깊은 관련이 있다고 알려져 있다. 한편, 텔로머레이스는 리보핵산단백질로서 telomeric DNA 합성에

주된 관여를 한다. 본 연구에서는 닭의 초기 배자 및 신생 조직에 대한 배 발생 단계별 텔로머레이스 활성도와 텔로미어 함량을 분석 고찰하였다. 공시계로는 한국재래계를 이용하였고, 이들의 수정란, 초기 배자 및 발생 과정 중 부란 개체의 간, 뇌, 심장, 신장, 정소 조직을 분석 대상으로 하였다. 텔로미어의 양적 분석은 chicken telomeric DNA probe를 이용하여 Q-FISH로 수행하였고, 텔로머레이스 활성도의 분석은 TRAP 방법을 이용하였다. 분석 결과, 대부분의 배아 조직들내 텔로미어 함유율은 발생 단계가 진행될수록 점진적으로 감소되는 양상을 보였다. 뿐만 아니라 발생 기원에 따른 조직간 텔로미어 함유율에도 많은 차이를 나타내었는데 증식성 세포인 초기배자 및 생식선 세포내의 함유율이 비 증식성 세포인 간, 뇌, 심장, 신장에 비해 월등히 높았다. 텔로머레이스의 활성도는 초기 배 상태에서는 모든 세포에서 강한 활성을 보였으나, 부란 9일령 이후부터 발생이 진행됨에 따라 간, 뇌, 심장조직에서의 활성도가 점진적으로 떨어졌다. 그러나 정소 및 신장 조직의 텔로머레이스는 발생 전 과정 동안 지속적 활성 양상을 나타내었다. 본 연구를 통하여 닭의 발생 과정 중 세포의 분화 및 조직 특이성과 텔로머레이스 활성도, 텔로미어 함량 간에는 밀접한 관련이 있는 것으로 사료되며, 더불어 텔로머레이스 활성도와 텔로미어 함량 간에도 매우 높은 상관관계가 존재함을 확인하였다.

V. 사 사

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(과제 번호: R05-2002-000-00226-0)지원으로 수행되었음.

VI. 인용 문헌

1. Ahmed, A. and Tollefsbol, T. 2001. Telomeres and telomerase: basic science implications for aging. *J. Am. Geriatr. Soc.* 49(8):1105-1109.
2. Bekaert, S., Derradji, H. and Baatout, S. 2004. Telomere biology in mammalian germ cells and during development. *Dev. Biol.* 274(1):15-30.
3. Betts, D. H. and King, W. A. 1999. Telomerase activity and telomere detection during early bovine

- development. *Dev. Genet.* 25(4):397-403.
4. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anim. Biochem.* 72:248-254.
 5. Byant, J. E., Hutchings, K. G., Moyzis, R. K. and Griffith, J. K. 1997. Measurement of telomeric DNA content in human tissues. *Biotech.* 23:476-478.
 6. Cotliar, A. S. and Slavutsky, I. R. 2001. Telomeres and telomerase activity: their role in aging and in neoplastic development. *Medicina* 61(3):335-342.
 7. Delany, M. E., Daniels, L. M., Swanberg, S. E. and Taylor, H. A. 2003. Telomeres in the chicken: genome stability and chromosome ends. *Poul. Sci.* 82:917-926.
 8. Ferlicot, S., Youssef, N., Feneux, D., Delhommeau, F., Paradis, V. and Bedossa, P. 2003. Measurement of telomere length on tissue sections using quantitative fluorescence *in situ* hybridization(Q-FISH). *J. Path.* 200:661-666.
 9. Forsyth, N. R., Wright, W. E. and Shay, J. W. 2002. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: Turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation* 69:188-197.
 10. Gan, Y., Engelke, K. J., Brown, C. A. and Au, J. L. 2001. Telomere amount and length assay. *Pharm. Res.* 18(12):1655-1659.
 11. Greider, C. W. and Blackburn, E. H. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43:405-413.
 12. Hultdin, M., Gronlund, E., Norrback, K., Eriksson-Lindstrom, E., Just, T. and Roos, G. 1998. Telomere analysis by fluorescence *in situ* hybridization and flow cytometry. *Nucleic Acids Res.* 26(16):3651-3656.
 13. Kim, N. W. and Wu, F. 1997. Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol(TRAP). *Nucleic Acids Res.* 25(13):2595-2597.
 14. Kobayashi, J., Sekimoto, A., Uchida, H., Wada, T., Sasaki, K., Sasada, H., Umezumi, M. and Sato, E. 1998. Rapid detection of male-specific DNA sequence in bovine embryos using fluorescence *in situ* hybridization. *Mol. Reprod. Dev.* 51:390-394.
 15. Lejnine, S., Vladimirov, L. and Langmore, J. P. 1995. Conserved nucleoprotein structure at the ends of vertebrate and invertebrate chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2393-2397.
 16. Meeker, A. K. and Coffey, D. S. 1997. Telomerase: a promising marker of biological immortality of germ, stem, and cancer cells. A review. *Biochem. (Mosc.)* 62(11):1323-1331.
 17. Oxle, K. 1998. Telomere length distribution and southern blot analysis. *J. Theor. Biol.* 190:369-377.
 18. Pathak, S., Mutani, A. S., Furlong, C. L. and Sohn, S. H. 2002. Telomere dynamics, aneuploidy, stem cells and cancer. *Int. J. Oncology* 20(3):637-641.
 19. Poon, S. S., Martens, U. M., Ward, R. K. and Lansdorp, P. M. 1999. Telomere length measurements using digital fluorescence microscopy. *Cytometry* 36:267-278.
 20. Robinson, M. O. 2000. Telomere and cancer. *Genet. Eng.* 22:209-222.
 21. Rufer, N., Dragowska, W., Thornbury, G., Roosnek, E. and Lansdorp, P. M. 1998. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat. Biotechnol.* 16(8):743-747.
 22. Slijepcevic, P. 2001. Telomere length measurement by Q-FISH. *Cell Sci.* 23:17-22.
 23. Sohn, S. H., Mutani, A. S., Gugnani, P. K. and Pathak, S. 2002. Telomere erosion-induced mitotic catastrophe in continuously grown Chinese hamster Don cells. *Exptl. Cell Res.* 279(2):271-276.
 24. Taylor, H. A. and Delany, M. E. 2000. Ontogeny of telomerase in chicken: Impact of downregulation on pre- and postnatal telomere length *in vivo*. *Dev. Growth Differ.* 42:613-621.
 25. Ulaner, G. A., Hu, J. F., Vu, T. H. and Hoffman, A. R. 1998. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res.* 58:4168-4172.
 26. Ulaner, G. A., Hu, J. F., Vu, T. H. and Hoffman, A. R. 2001. Tissue-specific alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase(hTERT) influences telomere lengths during human development. *Int. J. Cancer* 91:644-649.
 27. Venkatesan, R. and Price, C. 1998. Telomerase expression in chickens: Constitutive activity in somatic tissues and down-regulation in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14763-14768.
 28. Wright, D. L., Jones, E. L., Mayer, J. F., Oehninger, S., Gibbons, W. E. and Lanzendorf, S. E. 2001. Characterization of telomerase activity in the human oocyte and preimplantation embryo. *Mol. Hum. Reprod.* 7:947-955.
 29. Wright, W. E., Piatyszek, M. A., Rainey, W. E., Byrd, W. and Shay, J. W. 1996. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev. Genet.* 18:173-179.
 30. Xu, J. and Yang, X. 2000. Telomerase activity in bovine embryos during early development. *Biol. Reprod.* 63(4):1124-1128.
- (접수일자 : 2005. 3. 14. / 채택일자 : 2005. 4. 18.)