

생명정보학을 이용한 전사인자의 하위표적유전자 분석에 관한 연구

포천중문의과대학교 생명과학전문대학원¹, 전남대학교 생명과학기술학부²,
차병원 여성의학연구소³

황상준^{1,2} · 전상영² · 이경아^{1,3*}

In silico Analysis of Downstream Target Genes of Transcription Factors

Sang-Joon Hwang^{1,2}, Sang-Young Chun², Kyung-Ah Lee^{1,3*}

¹Graduate School of Life Science and Biotechnology, Pochon CHA University College of Medicine, Seoul, Korea,

²School of Biological Sciences and Technology, Chonnam National University, Gwangju, Korea,

³CHA Research Institute, Fertility Center, CHA General Hospital, Seoul, Korea

Objective: In the previous study, we compiled the differentially expressed genes during early folliculogenesis.¹ Objective of the present study was to identify downstream target genes of transcription factors (TFs) using bioinformatics for selecting the target TFs among the gene lists for further functional analysis.

Materials & Methods: By using bioinformatics tools, constituent domains were identified from database searches using Gene Ontology, MGI, and Entrez Gene. Downstream target proteins/genes of each TF were identified from database searches using TF database (TRANSFAC[®] 6.0) and eukaryotic promoter database (EPD).

Results: DNA binding and trans-activation domains of all TFs listed previously were identified, and the list of downstream target proteins/genes was obtained from search of TF database and promoter database. Based on the known function of identified downstream genes and the domains, 3 (HNF4, PPAR γ , and TBX2) out of 26 TFs were selected for further functional analysis. The genes of wee1-like protein kinase and p21WAF1 (cdk inhibitor) were identified as potential downstream target genes of HNF4 and TBX2, respectively. PPAR γ , through protein-protein interaction with other protein partners, acts as a transcription regulator of genes of EGFR, p21WAF1, cycD1, p53, and VEGF. Among the selected 3 TFs, further study is in progress for HNF4 and TBX2, since wee1-like protein kinase and cdk inhibitor may involved in regulating maturation promoting factor (MPF) activity during early folliculogenesis.

Conclusions: Approach used in the present study, *in silico* analysis of downstream target genes, was useful for analyzing list of TFs obtained from high-throughput cDNA microarray study. To verify its binding and functions of the selected TFs in early folliculogenesis, EMSA and further relevant characterizations are under investigation.

Key Words: Folliculogenesis, Bioinformatics, Transcription factor, Binding element, Downstream target gene

포유동물의 난소에 존재하는 난포는 태어날 때에 대부분 원시 난포 (primordial follicle)로 성장이 멈춰 있으며 이때 난자는 제 1 감수분열 전기 상태로 존

재한다. 포유류의 난포 발달 과정은 난소 내외의 다양한 요인에 의해 조절되고,² 사춘기를 지나면서 성장이 억제되어 있는 원시 난포 중 일부만이 선택적

주관책임자: 이경아, 우) 135-081 서울특별시 강남구 역삼동 606-13, 차병원 기초의학연구소 분자생식생리학 연구실
Tel: 822-557-3937, Fax: 822-563-2028, e-mail: leeka@ovary.co.kr

*이 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KRF-2004-C00135).

으로 1차 난포 (primary follicle)로의 성장을 개시하게 된다. 이와 같이 원시 난포에서 1차 난포로 성장이 다시 시작되는 기전은 여성의 생식능, 난소의 노화, 폐경의 시기 및 불임 등에 대한 정보를 제공함으로써 여성 생식을 좀더 정확히 이해하는데 필수적이나 그 기전에 대한 연구는 매우 미약하다.^{3,4} 본 연구진은 난소 내에서 원시 난포의 초기 발달에 관여하는 특이적인 유전자를 찾아내기 위해 DNA Chip을 이용하여 원시 난포, 1차 난포 및 2차 난포 사이에서 차이 나게 발현하는 유전자를 발굴하는 연구를 수행하였고,¹ 이렇게 선행 연구로부터 얻어진 유전자들의 목록 중에서 전사인자 (transcription factors) 유전자에 관심을 갖고 본 연구를 시작하였다. 이를 통하여 초기 난포 발달 과정에 연관되어 있는 유전자 발현 조절 네트워크 (transcriptional regulatory network)를 분석할 수 있을 것으로 사료되기 때문이다.

전사인자는 sequence-specific DNA-단백질 복합체를 형성함으로써 유전자 발현 조절에 중심적인 역할을 수행한다.⁵ 진핵 생물에서의 전사 개시는 RNA 중합효소 II 복합체 (RNA polymerase II complex)와 전사 개시 부위와의 결합뿐만 아니라 염색질 변형 효소 (chromatin-modifying enzyme)나 전사인자와 프로모터 부위 (promoter region)와의 결합에도 영향을 받는 복잡한 과정이다.⁶

최근 생명과학 분야에서는 대량 분석 (High-ThroughPut Screening; HTS) 기술의 발전에 힘입어 새로운 분자 생물학 실험 기법이 발달하고 이로 인하여 엄청난 양의 데이터들이 쏟아져 나오고 있다. 예를 들면, 많은 종 (species)에 대한 대규모의 genome 서열 정보 해독 작업뿐만 아니라 DNA microarray 및 proteomics, Yeast-Two-Hybrid (Y2H) 실험 방법 역시 HTS 기술로서 기존의 분자 생물학 실험 스케일과는 다른 차원의 데이터를 제공하고 있다. 그 중에서도 기능적인 유전자 발굴을 위해, 내외부의 자극에 대한 transcriptome의 반응을 확인함으로써 전체 유전자의 발현 양상 (gene expression profiling)을 분석하는 DNA microarray와 같은 기능유전체학 접근 방법은 다양한 생명 현상과 관련된 다수 유전자들의 발현 양의 변화에 대한 정보를 제공함으로써 미지 유전자의 기능에 대한 실마리를 제시할 수 있다. 또한 특정 병리학적, 생리학적 현상에 대

한 분자 수준에서의 조절 기전을 이해 하는데 많은 도움을 주고 있다.

그러나 이런 기능유전체학 실험 기법은 방대한 규모의 접근 방식에 내재되어 있는 false data의 생산이라는 약점을 가지고 있다. 따라서, 이런 방대한 양의 데이터 중에서 특정 생명 현상과 관련하여 의미 있는 데이터를 선별해 내기 위해서는 생명정보학 (Bioinformatics)이라는 computer science 기술 및 통계학적 접근 방법을 통한 분류, 가공 처리의 과정이 필요하게 되었다. 생명정보학적 연구는 computer science 및 통계학적 접근을 통한 원료 데이터 (raw data)의 분석 과정을 거쳐 유용한 정보를 발굴해 내는 data-driven discovery로써, 최근 Human Genome Project의 성공적인 진행, DNA microarray 실험기술의 발달, 단일염기변이 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) 연구의 발달 등으로 인하여 생명정보학 분야는 더욱 더 그 중요성이 부각되고 있으며, 그 연구 성과들은 다양한 생명 현상에 대한 분자 수준에서의 이해를 위해 많은 정보들을 제공하고 있다.

따라서 본 연구는 선행된 cDNA microarray 연구로부터 얻은 유전자 목록 중에서 생명정보학적 분석을 통해 초기 난포 발달 과정에 긴밀하게 관여하고 있을 것으로 추정되는 전사인자를 선별해 냄으로써 이후 해당 전사인자에 대한 심도 있는 연구를 진행 하기 위하여 이루어졌다.

본 연구의 결과는 유전체학적 대량 분석 기술로 얻어진 방대한 양의 데이터를 연구함에 있어 의미 있는 정보를 선별해 내는 새로운 접근 방식을 제시하여 생명정보학 작업의 유용성을 보여줄 것이며, 이후 실험적인 검증 결과와 더불어 초기 난포 발달 과정에서의 유전자 발현 조절 네트워크를 이해하는데 중요한 초석이 될 것이다.

연구대상 및 방법

1. 전사인자 유전자의 1차 구조 분석

Figure 1은 선행 연구 결과 DNA Chip을 이용한 유전자 발현 분석 연구로부터 얻어진 초기 난포 발달 단계에 따라 차이 나게 발현하는 양상을 보이는 전사인자의 유전자 목록이다. 각 전사인자의 구성

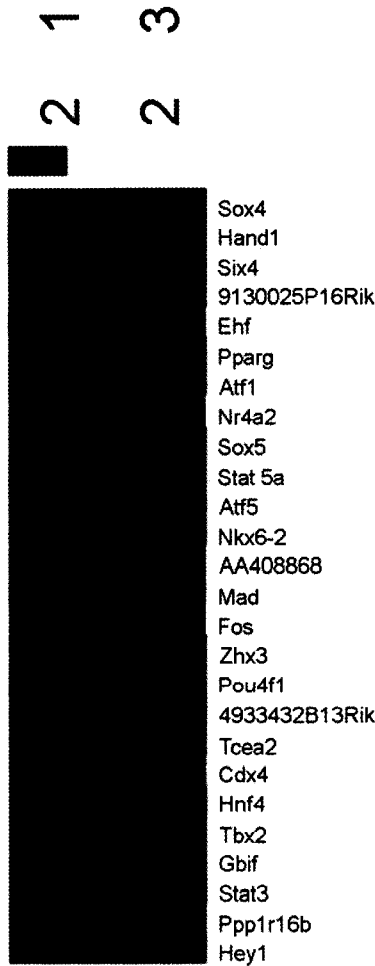


Figure 1. Heat map of the transcription factors obtained from previous DNA microarray analysis. The numbers 1, 2 and 3 indicate the primordial, primary, and secondary follicles, respectively. Green color indicates down-regulation of gene expression from primordial to primary (numbers 1 and 2) or primary to secondary (numbers 2 and 3) follicles. Red color indicates up-regulation, and black color indicates no change in gene expression.

도메인을 확인하기 위해 데이터 베이스 검색을 수행하였고, 연구에 사용된 방법론의 전체적인 흐름도는 Figure 2에 요약하였다. 전사인자의 1차 구조 분석을 위해서는 MGI (<http://www.informatics.jax.org/>), Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene>), UniGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=UniGene>) 유전자 데이터 베이스, 그리고 Swiss-Prot (<http://www.expasy.org/sprot/>) 단백

질 데이터 베이스 검색을 수행하여 각 전사인자가 가지고 있는 도메인을 확인하였다.

2. 전사인자의 도메인 분석

전사인자의 1차 구조 분석에서 확인된 각 구성 도메인의 분석을 위해서는 Web-based Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>, <http://www.godatabase.org/cgi-bin/amigo/go.cgi>) 데이터 베이스와 InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>), Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) 도메인 데이터 베이스를 참조하였다.

3. 전사인자의 cis-acting 및 trans-acting 하위 표적유전자 분석

cis-acting DNA 결합 부위를 통해 각각의 전사인자와 결합하여 유전자 발현이 조절되는 것으로 알려진 하위표적유전자와 그 DNA 결합 부위에 대한 정보를 얻기 위하여 TRANSFAC® 6.0 (<http://www.biobase.de/pages/products/transfac.html>) 전사인자 데이터 베이스 검색을 수행하였다. DNA 결합 부위의 염기 서열 정보를 이용하여 binding element를 가지고 있는 잠재적인 하위표적유전자를 동정하기 위해 EPD (<http://www.epd.isb-sib.ch/>) 프로모터 데이터 베이스 검색을 수행하였다. 또 전사인자와 상호 작용하는 다른 작용 단백질 (protein partner)과 단백질-단백질 상호 작용을 통해 발현이 조절되는 trans-acting 하위표적유전자 검색도 동일한 전사인자 데이터 베이스를 통해 수행하였다.

결 과

1. 전사인자의 1차 구조 분석

26개의 각 전사인자들의 1차 구조에 대한 생명정보학적 분석을 위해 MGI 데이터 베이스를 기본 플랫폼으로 해서 Entrez Gene, UniGene 유전자 데이터 베이스와 Swiss-Prot 단백질 데이터 베이스 검색을 수행하였다. 분석된 1차 구조에 대한 정보를 바탕으로 각 전사인자를 구성하는 도메인을 확인하였다. 26개의 전사인자에 대하여 모두 구조 분석을 실행하였으나, 그 결과는 양적으로 너무나 방대하여 본 논문에 다 발표하지 않고 그 중에서 가장 관심을 갖

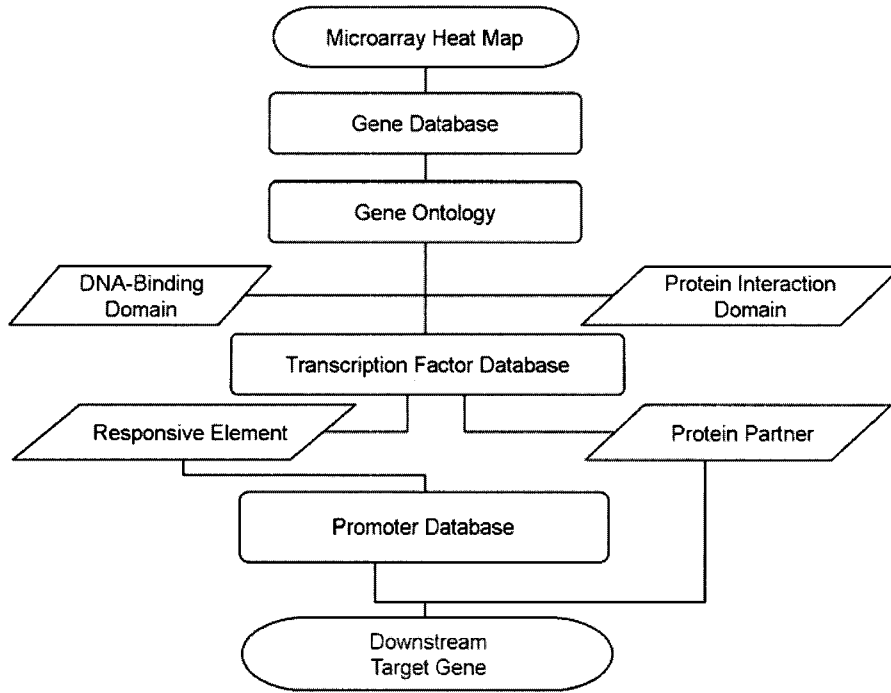


Figure 2. Flow chart of *in silico* analysis of downstream target genes of the transcription factors.

Table 1. Constituent domains of the selected 3 TFs

TF	MGI ID	Protein Domains (InterPro ID)
HNF4 (HNF4 α , HNF4 α 1, TCF4)	MGI : 109128	Retinoid X receptor (IPR000003) Vitamin D receptor (IPR000324) NHR, ligand-binding (IPR000536) NHR, DNA-binding (IPR001628) STR (IPR001723)
PPARg	MGI : 97747	NHR, ligand-binding (IPR000536) NHR, DNA-binding (IPR001628) STR (IPR001723) PPAR (IPR003074) PPAR, gamma (IPR003077)
TBX2	MGI : 98494	TF, T-box (IPR001699) TF, Brachyury (IPR002070)

TF (transcription factor), NHR (nuclear hormone receptor), STR (steroid hormone receptor), PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor)

고 연구하고자 축약된 세 개의 유전자 즉, 목적하는 바 하위표적유전자의 분석까지 이루어진 후에 하위

표적유전자의 종류에 의해 채택된 세 개의 전사인자 (HNF4, PPARg, TBX2)에 대해서만 구조 분석의 결

과를 정리하였다 (Table 1).

HNF4와 PPAR γ 는 스테로이드 수용체의 리간드 결합 도메인 (IPR000536)과 DNA 결합 도메인 (IPR-001628)으로 구성되어 있는데, 스테로이드 수용체는 배아 발생이나 세포 분화의 조절을 포함하여 다양한 생리적인 기능의 전사 조절자로 알려져 있다. 리간드 결합 도메인은 리간드와 결합한 후 구조 변화를 통해 nuclear translocation, oligomerisation, cofactor/kinase/transcription factor association, 그리고 DNA binding 등의 현상을 유도하여 전사 활성을 조절하는 분자 스위치로서 작용한다.⁷ DNA 결합 도메인은 hormone-response element로 불리는 DNA의 특이적 부위를 인식한 후 결합을 통해 스테로이드 수용체의

위치를 지정함으로써 수용체가 전사 조절자로서 발현을 활성화 시키거나 억제 시키도록 유도한다.^{8,9}

TBX2는 특정 염기 서열에 결합하는 DNA 결합 도메인인 T-box (IPR001699)를 가지고 있으며, T-box family의 전사인자들은 특정 조직의 세포에서만 발현되어 초기 배 발생 과정에서 세포의 운명을 결정하는데 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다.¹⁰

2. 전사인자의 하위표적유전자 분석

전사인자 데이터 베이스와 프로모터 데이터 베이스 검색을 통해 26개 각각의 전사인자가 유전자의 responsive element에 결합하여 그 유전자의 발현을

Table 2. Downstream target genes of the selected 3 TFs

TFs*	Cis-acting downstream target gene ^{†††}	Protein partner [†]	Trans-acting downstream target gene ^{††}
HNF4	(Wee1-like protein kinase)	N/A ^{†††}	N/A ^{†††}
PPAR γ	aqp 7	RXR- α ↔ β -catenin↔	(RXR- α →) EGFR / p21WAF1 / H1(0) / CYP7A
		SMAD3↔HNF4	(RXR- α ↔ β -catenin↔LEF-1→)CAD1 / cycD1
			(RXR- α ↔ β -catenin↔TCF-4E→)cycD1
		RXR- α ↔RAR- α 1/	(RXR- α ↔COUP-TF2→)HNF4 α
		RAR- γ 1↔cyclin H↔p53	(RXR- α ↔PPAR- γ 2↔p300→)cycD1
			(RXR- α ↔RAR- α 1/RAR-beta/RAR- γ →)H1(0) / HOXA1
		(RXR- α ↔T3R- α /T3R- β 1/T3R- β →)GH	
		(RXR- α ↔T3R- β 1→)EGFR	
		(RXR- α ↔TIF1↔ER- α →)p53/LH β /VEGF	
		(RXR- α ↔VDR→)GH/p21WAF1	
TBX2	trp-1 (p21WAF1)	N/A ^{†††}	N/A ^{†††}

* Transcription Factors: HNF4 (hepatocyte nuclear factor 4), PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma), TBX2 (T-box protein 2).

† Protein Partners

RXR-alpha (retinoid X receptor alpha), SMAD3 (Similar to mothers against decapentaplegic 3), RAR-alpha1/RAR-gamma1 (retinoic acid receptor alpha1/-gamma1), p53 (tumor protein p53), LEF-1 (lymphocyte enhancer binding factor 1), TCF-4E (= TCF7L2; transcription factor-7-like-2), COUP-TF2 (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor 2), p300 (transcriptional co-activator p300), T3R-alpha/ T3R-beta1/ T3R-beta (thyroid hormone receptor-alpha/ beta1/beta), TIF1 (transcriptional intermediary factor 1), ER-alpha (estrogen receptor alpha), VDR (Vitamin D3 Receptor).

†† Downstream target genes

aqp7 (aquaporin 7), trp-1 (tyrosinase-related protein 1), p21WAF1 (cdk inhibitor p21), EGFR (epidermal growth factor receptor), H1 (0) (histone 1 zero), CYP7A (cholesterol 7alpha-hydroxylase), CAD1 (E-cadherin), cycD1 (cyclin D1), HOXA1 (homeobox gene 1), GH (growth hormone), LHbeta (luteinizing hormone beta), VEGF (vascular endothelial growth factor).

††† N/A: Not applicable

직접 조절하는 하위표적유전자들에 대한 목록을 작성한 후 (data not shown), 표적 유전자의 종류에 따라 원시 난포에서 1차 난포로의 선택적 성장 개시 과정 조절에 중요한 역할을 할 것으로 생각되는 3개의 전사인자를 일차적으로 선택하였다.

세 개의 전사인자에 대한 하위표적유전자는 이외에도 데이터 베이스 검색으로부터 결합 부위 (binding element)의 염기 서열, 상호 작용하는 단백질에 관한 정보를 얻었다. cis-acting element의 염기 서열 정보를 바탕으로 진핵 생물의 프로모터 데이터 베이스 검색을 통해 그 결합 부위를 가지고 있는 잠재적인 하위표적유전자도 동정하여 구성된 하위표적유전자 목록에 추가하였고 이는 Table 2에서 괄호로 묶어 표시하였다. 또한 전사인자의 상호 작용 단백질에 관한 정보를 바탕으로 전사인자 데이터 베이스 검색을 실시하여, 단백질 partner와 상호 작용함으로써 간접적으로 발현을 조절하는 하위표적유전자도 동정 후 목록에 추가하였다. Table 2에서 ↔는 단백질 상호 작용을 나타내며 (괄호로 묶음), →는 전사인자가 하위표적유전자의 발현을 조절함을 의미한다.

Wee1-like protein kinase와 p21WAF1 (cdk inhibitor) 유전자는 각각 HNF4와 TBX2에 대한 binding element를 그 프로모터 부위에 가지고 있는 잠재적인 하위표적유전자로 동정 되었으며, PPAR γ 는 RXR- α 를 비롯한 여러 다른 단백질과의 상호 작용을 통해 그들과 복합체를 형성하여 EGFR, p21WAF1, cycD1, p53, VEGF 등 기능이 많이 알려진 여러 가지 중요한 유전자들의 발현에 영향을 미치는 것으로 나타났다.

고찰 및 결론

본 연구진은 초기 난포 발달에 관여하는 인자들을 밝혀내고 그들을 통해 조절 기전을 연구하고자 cDNA microarray를 이용하여 초기 난포 발달 단계에서 차이 나게 발현하는 유전자 목록을 획득하였고,^{1,11} 그 유전자 목록을 중심으로 중요한 유전자에 대한 연구를 하나하나 진행하고 있다.¹²⁻¹⁴ 본 연구에서는 그 중에서도 특히, 전사 조절인자 (transcription factor)군에 대하여 초점을 맞추어 연구를 진행

하였다.

대량으로 얻어진 유전자 목록 중에서 어떤 유전자를 먼저 연구 대상으로 택할 것인지를 결정하는 일은 쉬운 일은 아니다. 특히 전사인자와 같이 자기 자신만이 아니라 해당 전사인자가 영향을 미치는 하위표적유전자가 무엇인가에 따라서 그 기능의 중요성이 달라지는 경우는 목록에 작성된 유전자만으로 연구 대상을 결정하기 어려운 점이 있겠다. 따라서 cDNA microarray 결과 얻어진 26개의 전사인자 목록 중, 각 전사인자에 대한 하위표적유전자를 생명정보학적 방법론을 이용하여 찾아낸 하위표적유전자의 종류 및 기능에 따라 중요하다고 생각되어지는 전사인자를 결정하여, 그 다음 기전 연구를 진행하기로 계획을 세우고 본 연구를 진행하였다.

생명정보학적 방법을 이용하여 26개의 전사인자에 대한 하위표적유전자 분석한 결과, 매우 다양한 기능을 갖는 유전자의 목록이 얻어졌는데, 그 중에서 특별히 관심을 갖게 된 유전자는 HNF4와 TBX2, 그리고 PPAR γ 였다. HNF4의 cis-acting 하위표적유전자로 wee1-like protein kinase가 분석되었는데 이미 본 연구실에서는 wee1 protein kinase가 일반적으로 잘 알려진 체세포의 mitosis 억제 뿐 아니라 동일한 기전으로 난자의 meiosis arrest에도 관여하고 있을 것으로 보고한 바 있다.¹³ 따라서 아직까지 그 염기 서열이나 기능이 확실하게 보고된 바 없이, 염기 서열의 유사성으로 이름 붙여진 wee1-like protein kinase가 HNF4의 하위표적유전자로 검색되었다는 것은 매우 고무적인 결과로서, wee1과의 유사성 및 관련성을 연구해 볼 필요가 있다고 사료되었다.

또한 TBX2가 cyclin-dependent kinases (cdk) inhibitor 유전자의 발현을 억제한다는 것이 보고되어 있음을 알게 되었다.¹⁵ Cdk는 mitosis 조절 과정에 관련되어 있는 세포분열의 중요한 조절인자이므로 TBX2가 cdk inhibitor의 발현을 조절한다는 사실은 HNF4와 함께 초기 난포 발달을 조절함에 있어 난자 및 과립세포의 meiosis 및 mitosis 조절에 매우 긴밀하게 연결되어 있는 전사인자를 찾아내었음을 시사하는 일이라 할 수 있다. 따라서 이 두 전사인자 자체의 발현과 더불어 하위표적유전자와의 관계 등을 조사분석 함으로써 초기 난포 발달에 관여하는 역할을 밝혀낼 수 있을 것으로 기대된다.

이 외에도 전사인자의 cis-acting 또는 trans-acting downstream 유전자에 대한 결과와 유전자 발현의 패턴이 매우 흥미로운 PPAR γ 를 선택할 수 있었다. PPAR γ 의 경우는 EGFR, p21WAF1, cycD1, p53, VEGF와 같이 매우 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있는 여러 가지 하위 유전자의 기능을 조절 하는데 관련되어 있는 것으로 초기 난포 발달 과정에도 복잡하고 긴밀하게 관련되어 있을 것으로 추정할 수 있다. 따라서 앞으로 이 세 전사인자 및 하위표적유전자의 유전자 발현 및 상호 작용에 대한 심도 있는 후속 연구가 진행 되어야 할 것이다.

전사인자와 프로모터와의 결합은 특정 유전자의 발현 조절을 위한 필요 조건이지만 충분 조건이라 할 수는 없다. 결과적으로, 단순히 전사인자와 프로모터 지역의 작은 DNA 조각과의 결합 여부를 확인 하는 electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 실험은 어떤 유전자의 발현이 특정 전사인자에 의해서 조절될 것이라는 가능성만을 *in vitro* 수준에서 보여주는 것이다. 염색체 상에서 전사인자의 표적 유전자와 그 프로모터 부분의 binding element를 동정하는 것은 유기적인 유전자 발현 조절을 위한 전사 단계에서의 조절 네트워크를 연구하는데 매우 유용한 도구이다. 따라서 어떤 유전자가 특정 전사인자의 실제적인 표적 (functional target)임을 증명하여 생명 현상과 관련된 전사 단계에서의 조절 네트워크를 구성하기 위해서는 *in vivo* 수준에서 전사인자의 모든 DNA 결합 부위를 동정하여 genomewide transcription factor binding pattern을 확인하는 Chromatinimmunoprecipitation (ChIP)-microarray나 Sequence Tag Analysis of Genomic Enrichment (STAGE) 등의 실험 방법을 이용하여 연구할 수 있을 것이다.

ChIP은 세포 내에서 특정 전사인자가 어떠한 프로모터 부위에 직접 결합 하는지를 실험적으로 규명하는 방법이다. ChIP 방법으로 얻어진 게놈 sequence들을 분석하는 방법으로는 DNA microarray를 이용한 전사체 분석 방법이 주로 사용되어 왔으나,¹⁶ 최근에는 Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)를 이용한 분석 방법이 제안되었다.¹⁷ SAGE는 원래 transcriptome 수준에서 유전자 발현 분석을 위해 고안된 기능유전체학적 방법이며,¹⁸ ChIP과 연결하여 얻어진 각각의 게놈 sequence들의 짧은 tag로 이루

어진 연속 접합체 (concatemer)를 클로닝한 후, 그 염기 서열을 분석하는 과정으로 사용될 수 있다.

참 고 문 헌

1. Yoon SJ, Kim KH, Chung HM, Choi DH, Lee WS, Cha KY, Lee KA. Gene expression profiling of early follicular development in primordial, primary, and secondary follicles. *Fertil Steril* 2006; 85: 193-203.
2. Richards JS. Perspective: The ovarian follicle-A perspective in 2001. *Endocrinol* 2001; 142: 2184-93.
3. Fortune JE, Cushman RA, Kito WS. The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 163: 53-60.
4. Fortune JE. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci* 2003; 78: 135-63.
5. Wingender E, Dietze P, Karas H, Knüppel R. TRANSFAC: A database on transcription factors and their DNA binding sites. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 238-41.
6. Pilpel Y, Sudarsanam P, Church GM. Identifying regulatory networks by combinatorial analysis of promoter elements. *Nat Genet* 2001; 29: 153-9.
7. Edwards DP. The role of coactivators and corepressors in the biology and mechanism of action of steroid hormone receptors. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2000; 5: 307-24.
8. Moehren U, Eckey M, Baniahmad A. Gene repression by nuclear hormone receptors. *Essays Biochem* 2004; 40: 89-104.
9. Claessens F, Gewirth DT. DNA recognition by nuclear receptors. *Essays Biochem* 2004; 40: 59-72.
10. Wilson V, Conlon FL. The T-box family. *Genome Biol* 2002; 3: REVIEWS3008.
11. Park CE, Cha KY, Kim K, Lee KA. Expression of cell cycle regulatory genes during primordial-primary follicle transition in the mouse ovary. *Fertil Steril* 2005; 83: 410-8.
12. Park CE, Shin MR, Jeon EH, Cha KY, Lee SH, Kim

- K, Kim NH, Lee KA. Oocyte-selective expression of MTi7 and finding its role in oocyte maturation and cell division in zygote by RNA interference. *Mol Reprod Dev* 2004; 69: 365-74.
13. Park CE, Kim YH, Jeon EH, Cha KY, Lee SH, Lee KA. Expression of weel and its related cell cycle components in mouse early stage follicles. *Cells Tissues Organs* 2004; 177: 221-8.
14. Kim KH, Park CE, Yoon SJ, Lee KA. Characterization of genes related to the cell size growth and CCN family according to the early folliculogenesis in the mouse. *Kor J Fertil Steril* 2005; 32: 269-77.
15. Harrelson Z, Kelly RG, Goldin SN, Gibson-Brown JJ, Bollag RJ, Silver LM, Papaioannou VE. Tbx2 is essential for patterning the atrioventricular canal and for morphogenesis of the outflow tract during heart development. *Development* 2004; 131: 5041-52.
16. Saha S, Sparks AB, Rago C, Akmaev V, Wang CJ, Vogelstein B, et al. Characterization of the yeast transcriptome. *Cell* 1997; 88: 243-51.
17. Jonghwan K, Akshay AB, Xochitl CM, Vishwanath RI. Mapping DNA-protein interactions in large genomes by sequence tag analysis of genomic enrichment. *Nature Methods* 2005; 2: 47-53.
18. Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science* 1995; 270: 484-7.

= 국문초록 =

목 적: 본 연구진은 초기 난포 발달 과정의 각 발달 단계별 난포를 분리하여 cDNA microarray를 이용한 유전자 발현 목록을 보유하고 있다.¹ 본 연구는 이들 유전자 중에서 전사인자들의 목록에 주목하여 이들의 하위표적유전자를 생명정보학적 기법을 이용해 동정함으로써 이 후 초기 난포 발달의 조절 기전 연구를 위한 중요한 전사인자를 결정하고자 실시하였다.

연구방법: 26개의 전사인자들에 대해서 Gene Ontology, MGI, 그리고 Entrez Gene 등의 유전자 데이터 베이스 검색을 통해 전사인자들을 구성하는 도메인을 확인하였고, 전사인자 데이터 베이스 (TRANSFAC[®] 6.0)와 진핵세포 프로모터 데이터 베이스 검색을 실시하여, 전사인자의 cis-acting 및 trans-acting 하위표적유전자를 분석하였다.

결 과: 26개 전사인자들에 대해서 DNA 결합 도메인과 단백질 상호 작용 도메인을 확인하였다. 또 전사인자 데이터 베이스와 프로모터 데이터 베이스 검색으로부터 하위표적유전자에 대한 정보를 얻었다. 위와 같은 생명정보학적 분석 결과로부터 흥미로운 하위표적유전자를 갖는 3개의 전사인자로 목표를 압축할 수 있었다. 그 중에서 HNF4는 MPF 억제 조절자로 알려져 있는 Wee1 단백질 인산화 효소의 유사 유전자 프로모터 부위에 결합하는 전사인자며, TBX2는 cdk 억제자 유전자의 발현을 억제하는 전사인자로 알려져 있어, 초기 난포 발달 과정의 MPF 기능 조절에 매우 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

결 론: 본 연구는 생명정보학적 분석을 통하여 전사인자의 하위표적인자를 알아내고, 이를 이용하여 26개 전사인자 중에서 다음 연구를 위한 목표를 결정하는 접근 방법을 제시했다는 데 의미가 있다고 사료된다. 실제로 이렇게 결정된 전사인자들이 초기 난포 발달을 조절하는 분자 생물학적 기전에 어떻게 관여하는지를 연구하기 위해서는 EMSA 등과 같은 실험적 증명을 통한 확인과 보충 연구가 필요할 것으로 사료된다.

중심단어: 난포 발달, 생명정보학, 전사인자, 결합요소, 하위표적유전자