

소 착상 전 초기수정란에서 Oct-4 유전자 Promoter 영역의 DNA 메틸화 변화

고응규¹ · 김종무² · 김동훈¹ · 차병현¹ · 황성수¹ · 양병철¹ · 임기순¹ · 김명직¹ · 민관식³ · 성환후^{1,†}

¹농촌진흥청 축산과학원 응용생명공학과

²충북대학교 축산학과, ³한경대학교 생물환경정보통신 전문대학원

DNA Methylation Change of Oct-4 Gene Promoter Region during Bovine Preimplantation Early Embryos

Yeoung-Gyu Ko¹, Jong-Mu Kim², Dong-Hoon Kim¹, Byung-Hyun Cha¹, Seongsoo Hwang¹,
Byoung-Chul Yang¹, Gi-Sun Im¹, Myung-Jick Kim¹, Kwan-Sik Min³ and Hwan-Hoo Seong^{1,†}

¹National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

²Department of Animal Science, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

³Hanyang University, Anseong 456-749, Korea

ABSTRACT

DNA methylation is involved in tissue-specific gene control and essential for normal embryo development. Octamer-binding transcription factor 4 (Oct-4) is one of the most important transcription factors for early differentiation. This study was performed whether the bovine Oct-4 is tissue specific or developmental dependent epigenetic mark, we investigated transcripts and the methylation status of CpGs of 5'-promoter region of Oct-4 in bovine preimplantation embryos. Oct-4 transcripts were highly detected in morula and blastocyst, while they were present low levels in sperm and 2- to 8-cell stage embryos. These results suggest that *de novo* expression of Oct-4 initiates at morula stage of embryogenesis. Here we determined that there is a tissue-dependent differentially methylated region (T-DMR) in the 5'-promoter region of Oct-4. The methylation status of the Oct-4 T-DMR was distinctively different in the oocyte from that in the sperm and adult somatic tissues and changed from zygote to blastocyst stage, suggesting that active methylation and demethylation occur during preimplantation development. Based on these results, the 5'-promoter region of Oct-4 gene is target for DNA methylation and the methylation status changes variously during embryonic development in bovine.

(Key words : Bovine Oct-4, DNA methylation, Gene expression, Embryos)

요약

DNA 메틸화는 조직특이적인 유전자 조절에 관여하고, 정상적인 배 발달에 필수적이다. POU5F1은 octamer-binding transcription factor 4 (Oct-4)를 encode하며, 초기 분화에 중요한 전사인자이다. 본 실험에서 소의 Oct-4가 조직특이적이 고 발달의존적인 epigenetic 표지 인지를 검토하고자, 착상 전 수정란에서 Oct-4 전사산물과 상류 promoter 영역의 CpGs 의 메틸화를 조사하였다. Oct-4 전사산물은 정자 그리고 2-cell에서 8-cell 수정란까지 낮은 수준으로 존재하지만, 상실배와 배반포에서 높게 검출되었다. 이러한 결과는 배 발달 과정의 상실배 단계에서 Oct-4의 *de novo* 발현이 시작됨을 의미한다. Oct-4 상류 promoter 영역에는 메틸화 가변 영역 (tissue-dependent differentially methylated region, T-DMR)이 존재한다. Oct-4 메틸화 가변 영역의 메틸화 상태는 정자, 성체 체조직과 난자에서 서로 다르고, 수정란으로부터 배반포 단계까지 변화하였는데, 이는 착상 전 초기 배 발달 과정에 active 메틸화와 탈메틸화가 일어남을 의미한다. 이상의 결과, Oct-4 유전자 상류 promoter 영역은 DNA 메틸화의 타깃이고, 그 메틸화 상태는 소 수정란 발달 동안에 다양하게 변화한다.

서론

Oct-4는 POU family의 일원으로 전능성과 다능성(Pluripotency)을 갖고 있는 난자, 착상 전 수정란들 그리고 배

* 농촌진흥청 축산과학원 경상과제 연구 결과임.

† Corresponding author : Phone: +82-82-31-290-1621, E-mail: seonghh@rda.go.kr

반포의 내부세포괴(inner cell mass, ICM)에서 특이적으로 발현하는 중요 전사인자이다(Okamoto 등, 1990; Rosner 등, 1990; Scholer 등 1990). 마우스에서 Oct-4를 Knock-Out 시켰을 때 내부세포괴는 전능성과 다능성을 잃고, 발달 증식이 멈추게 된다(Nichols 등, 1998). 이러한 Oct-4는 ES 세포(embryonic stem cell)에서 발현하나, TS 세포(trophoblast stem cell)에서는 발현되지 않고(Tanaka, 1998), Oct-4 유전자 발현의 감소는 적당한 배양 시스템 하에서 ES 세포가 TS 세포로 분화 전이되어 Oct-4 유전자가 줄기세포의 전능성 결정에 중요함을 보고하고 있다(Niwa 등, 2000). Oct-4 유전자는 GC-rich와 TATA-less의 짧은 promoter를 가지고 있으며(Okazawa 등, 1991), 2개의 enhancer 영역이 관여하고(Yoem 등, 1996), 다수의 trans-activators와 repressors가 Oct-4 발현을 조절하고 있다고 알려져 있다(Furhrmann 등, 1999; Pesce 등, 1999; Barnea 등, 2000; Fuhrmann 등, 2001). 마우스, 사람, 소에서 Oct-4의 유전자구조, 염기서열, 유전자의 위치, 조절영역은 높게 보존되어 있고, 발현 패턴과 기능 또한 보존되어 있을 것으로 생각되고 있다(Nordhoff 등, 2001). 소 orthologue에 있어서 Oct-4 단백질 수준의 homology는 사람에서 90.6%이고, 마우스에서 81.7%이다(Nordhoff 등, 2001). 게다가 소 Oct-4 단백질은 13일령 배반포 outgrowth의 모든 세포뿐만 아니라 배반포의 내부세포괴와 영양막세포에서 존재한다(Van Eijk 등, 1999; Kirchhof 등, 2000).

포유류의 몸을 구성하는 다양한 조직과 세포는 각각 고유의 DNA 메틸화 패턴을 형성하고 있는 것이 최근의 연구에서 밝혀졌고, 개체발생·세포의 분화에 DNA 메틸화가 중요한 역할을 하고 있다(Shiota 등, 2002). DNA 메틸화는 chromatin의 remodeling에 관여하고 유전자의 silencing·안정화 등, epigenetics 조절기구로서 중요하며, 마우스 ES 세포와 TS 세포에서 Oct-4 발현이 그 promoter 영역의 DNA 메틸화뿐만 아니라 아세틸화에 의해 제어 받고 있으며(Hattori 등, 2004), 그 외 많은 유전자들이 genome상의 유전자 영역 특히 promoter 일부의 cytosine이 메틸화에 의해 많은 경우 유전자 발현이 억제되는 것으로 알려지고 있다(Bird 등, 1999; Ko 등, 2005). 메틸화 패턴의 형성은 전사인자의 유무에 관계없이 유전자 발현의 스위치를 꺼진 상태로 유지하고 세포특이적인 유전자 발현 패턴의 제한을 가능하게 하고 있는 것으로 생각되고, genome DNA의 메틸화에 따른 전사의 제어는 유전자 발현 조절 기구의 최상위에 위치하게 된다.

소 Oct-4의 발달·세포 특이적 발현 조절 메커니즘이 아직까지 밝혀져 있지 않기에, 본 실험에서는 DNA 메틸화가 Oct-4 발현 조절의 메커니즘을 포함하고 있는지 명확히 하기 위하여, 체세포(신장, 귀 섬유아세포), 정자, 난자, 착상전 수정란에서 Oct-4 발현을 RT-PCR에 의하여 확인하였고, Oct-4 상류 promoter 영역의 DNA 메틸화 패턴을 bisulfite sequencing에 의하여 조사하였다. 또한, 귀 섬유아세포 배양액에 5-aza dC(메틸화 억제제)과 Trichostatin A(탈아세틸화 억제제)를 처리 Oct-4 발현 유도 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

체외수정란, 정자, 성체조직의 준비

정자는 동결 융해된 정액을 이용하였고, 체외수정란 생산방법은 다음 방법과 같다. 도축장에서 도축된 소의 난소에서 10 ml 주사기에 18G 주사침을 이용하여 직경 2~6 mm 난포로부터 채취하였다. 채취된 난자는 실체현미경 하에서 난구세포가 치밀하게 부착되고 세포질이 균일한 것만을 선별하여 체외성숙에 공시하였다. 체외수정 및 체외배양에 사용된 시약은 별도의 표기가 없는 한 Sigma사(St. Louis, Mo, USA) 제품을 사용하였다. 체외성숙에 사용된 배양액은 10% FBS (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) 가 함유된 TCM-199(Gibco-BRL)에 10 µg/ml FSH-P(Follitropin-V), 1 µg/ml estradiol-17beta 그리고 10 ng/ml EGF를 첨가하여 사용하였다. 성숙난자는 4-well dish(Nunc, Denmark)를 사용해 mineral oil이 피복된 500 µl 체외 성숙용 배양액에 30~50개의 난자를 침적하여, 39°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 20시간 동안 체외성숙을 실시하였다. 체외수정은 0.6% BSA, 2 µg/ml Heparin, 4% PHE(0.372 mg/ml penicillamine, 0.11 mg/ml hypotaurine, 0.018 mg/ml epinephrine)가 함유된 수정용 배양액(Fertilization-TALP)을 사용하였다. Mineral oil이 도포된 100 µl 수정용 소적에 난구세포를 제거하지 않은 성숙된 난자 20개씩을 침적, 각 소적당 1×10⁶개씩의 정자를 첨가 후 5% CO₂, 39°C 배양액에 24시간 배양하였다. 수정란은 난구세포를 완전히 제거한 후 0.3% BSA가 함유된 CR2aa 배양액 50 µl 소적 당 10개씩 넣어 3일간 배양하였고, 그 후 5% FBS가 함유된 50 µl 소적에 옮긴 후 다시 5일간 배양하고 배반포 및 수정란의 각 단계를 확인 PBS로 4회 이상 세척 후 회수하였다. Genomic DNA 추출에 MII oocyte는 50개, 2-cell 100개, 4-cell 30개, 8-cell 15개, 상실배 20개, blastocyst 10개를 회수 사용 전까지 -80°C에 보관하였다. 또한, 초기 배 발달 단계별 RT-PCR에 의하여 Oct-4 발현 차이 분석을 위한 난자 및 수정란은 각각 5개씩 준비하여 사용 전까지 -80°C에 보관하였다. 이외에 정자는 동결정액을 이용하였고, 24개월령 암소로부터 신장을 회수 사용 전까지 -80°C에 보관하였다.

RT-PCR에 의한 Oct-4 발현 분석

DEPC 처리된 5 µl PBS 안에 수집된 난자와 수정란에 100 µl TRIzol(Invitrogen) 이용 RNA 분리 후 ethanol 침강 전에 carrier로써 2 µg의 glycogen이 첨가되었다. 조직으로부터 RNA 또한 TRIzol 이용 추출하였다. cDNA 합성은 SuperScript II 1st strand 합성 키트를(Invitrogen) 이용하여 제조하였다. 각각의 실험에서 PCR 증폭은 1 µl의 c-DNA를 주형으로 r-Taq polymerase(Toyobo) 이용 20 µl volume으로 수행되었다. Oct-4의 발현은 Forward primer로 5'-ATCCTCGGACCTGGATAGGC-3'를 reverse primer로 5'-TCTATCAGCAAACCGACTTG-3'를 이용하여, PCR은 증폭 조건은 95°C에서 1분간 pre-denaturation 반응 후, 94°C에서 30초, annealing 온도는 56°C에서 30초, 72°C에서 1분간 35회 반복시켰고, 72°C에서 10분간 최종 신장시켜 반응을 종료하였다. 대조구로 β-actin을 사용하였고 Forward primer로 5'-CAGATCATGTCGAGACCTT-3'를 reverse primer로 5'-GAAGGTAGTTCTGTGAATGC-3'를 이용하였다.

Bisulfite Sequencing에 의한 DNA 메틸화 해석

우선 Genomic DNA 추출은 Ko(2005)의 방법에 준하여

추출하였고, Sodium Bisulfite Genomic Sequencing은 Clark(1994) 방법에 따라 수행하였다. 간략히 Bisulfite Genomic Sequencing 방법을 설명하면 EcoRI 처리된 약 2 μ g의 genomic DNA가 0.33M NaOH에서 37°C에서 15분 동안 denature시켰고, pH 5의 2M의 Sodium metabisulfite와 0.5mM의 hydroquinone 농도로 55°C에서 12시간 빛을 차단하여 반응시켰다. Bisulfite 처리된 샘플은 Wizard DNA Clean-Up system(Promega, Madison, WI)을 이용하여 정제하였다. Bisulfite 처리된 DNA는 AmpliTaq Gold(Applied Biosystems)을 이용하여 Oct-4 전사 개시점 상류 promoter 영역으로 추정되는 영역을 포함 약 1,072bp를 다음의 primer set을 이용하여 증폭시켰다. Forward primer 1은 5'-GGTAAGGAAATTGATGTATGGGAT-3'이고 reverse primer 1은 5'-CCTCAATTCTTAACAAACTCCTTAC-3'이고, Forward primer 2는 5'-TTGGTTTAGGTGTAGGG-TGTTTG-3'이고 reverse primer 2는 5'-AAAATCAAAAAA-CAAAATATCCCACC-3'이다. PCR 증폭조건은 94°C에서 10분간 pre-denaturation 반응 후, 94°C에서 30초, annealing 온도는 56°C에서 30초, 72°C에서 1분간 43회 반응시켰고, 72°C에서 10분간 신장시켜 증폭반응을 종료하였다. 증폭된 PCR 산물을 2% agarose gel 전기영동하여 증폭 여부를 확인 후 증폭된 PCR 산물의 염기서열은 pGEM T-easy Vector System(Promega, USA)을 이용하여 PCR 산물을 클로닝한 후, Bigdye terminator와 ABI 377 자동염기서열 분석장치(PE Applied Biosystems, U.S.A.)를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 BLAST를 이용하여 상동성을 검색하였고, DNA Sequence Navigator(PE Applied Biosystems, USA) program을 사용하여 분석하였다.

귀섬유아세포(Ear Fibroblast Cell)의 5-aza dC와 TSA 처리

귀섬유아세포는 2살된 소의 귀 생체조직 절편을 통하여 채취되었고, 이 섬유아세포를 10% FBS가 함유된 DMEM에서 배양하였다. 5일간 배양 후 세포를 0.05% trypsin처리 후, Ca^{2+} , Mg^{2+} , free PBS로 세척하여 준비하였다. 회수된 세포는 10% FBS가 함유된 DMEM에서 배양하여 4회 정도 계대한 후 동결보존 하였다. 융해된 후 1회 계대한 섬유아세포를 이용하여 5-aza dC(DNA methylation inhibitor, Sigma) 무처리군, 5-Aza-dC 1 μ M, 5Aza-dC 5 μ M, 그리고 Trichostatin A(TSA; inhibitor of histone deacetylase 1, Sigma) 200nM, 5-Aza-dC 5 μ M+TSA 200 nM, 5-Aza-dC 5 μ M+TSA 400 nM 농도로 맞춰 DMEM 배양액(Invitrogen)에서 3일간 배양 후 앞에서 기술한 것과 같이 RNA 추출 및 RT-PCR로 Oct-4 발현 유무를 검정하였다.

결 과

초기 배 발달중의 Oct-4 발현 양상조사

정자와 미수정란 그리고 수정 후 2-cell에서 부화배반포 까지 착상 전 초기 배 발달 단계의 수정란 그리고 성체조직 신장과 섬유아세포에서 Oct-4 발현이 RT-PCR에 의해서 조사되었다. 그 발현은 발달단계별 5개의 미수정란과 수정란들을 이용하여 3반복 분석되었다. Oct-4의 발현은 정자에

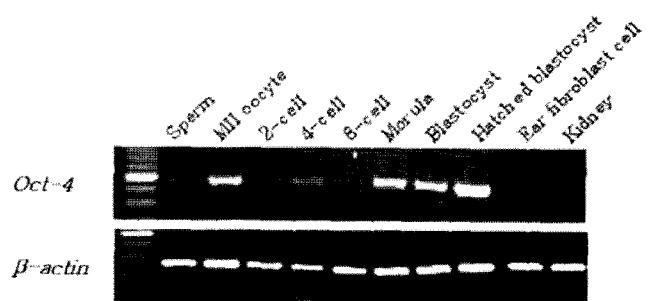


Fig. 1. Expression of Oct-4 during early development. Expressions of Oct-4 were analyzed by RT-PCR. The predicted sizes of the PCR products are 475bp (Oct-4) and 270bp (β -actin).

서 미약하게 미수정란에서 보통 수준으로 발현되었다. 그리고 수정 후 2-cell, 4-cell, 8-cell에서 매우 희미하게 발현을 유지하였고, 상실배에서 급격하게 증가 후 배반포까지 높은 수준으로 유지되었다(Fig. 1). 그러나 체세포인 신장과 섬유아세포에서는 발현되지 않았다. 특히 상실배단계에서 Oct-4가 급격히 강하게 발현되는 것은 활성화 된 수정란의 compaction이 형성되는 이 시기에서 *de novo*하게 발현됨을 시사하고 있다.

Oct-4 상류 Promoter 영역의 메틸화 패턴 조사

DNA 메틸화가 소의 Oct-4 유전자 발현을 조절하는지를 검토하고자, Oct-4 promoter로 추정되는 전사개시점 상류 영역의 메틸화 패턴을 Bisulfite sequencing법에 의하여 조사하였다. 조사된 영역은 소 Oct-4 promoter로 추정되는 전사 개시점 상류 영역 -1,072 bp 내 19개의 CpG site(1~19번)과 CpG가 다수 포함되어 있는 CpG Island 영역인 exon1 일부 영역의(+27bp) 2개 CpG site(21~22번)이다. 조사된 체조직인 신장, 간뿐만 아니라 정자 미수정란 및 착상 전 수정란의 CpG Island 영역인 exon 1은(20~21) 모두 탈메틸화 되었다(Fig. 2). 전사 개시점 상류 영역의 메틸화 패턴은 신장, 간에서는 5개의 CpGs(15~19)를 제외하고 나머지 CpGs는 고메틸화 되어 있었다. 생식세포 중 정자 경우는 영역 II에서 10, 11, 13번 CpG를 제외하고 모두 저메틸화 되었으나, 미수정란의 경우는 15번 CpG를 제외하고 전반적으로 고메틸화 경향을 보였다. 이를 결과는 Oct-4 상류 promoter 영역에 메틸화 가변 영역(tissue-dependent differentially methylated region: T-DMR)이 존재하며, Oct-4 상류 T-DMR이 정자 미수정란 그리고 성체 체조직에 따라서 다르고, 발달단계 의존적임을 의미한다.

다음으로 착상 전 발달단계별 수정란에서 Oct-4 상류 T-DMR의 메틸화 변화를 조사하였다(Fig. 3). 2-cell 수정란에서 CpGs 메틸화는 정자 미수정란과 차이를 보이는데, CpGs 1번과 15~19 대부분은 거의 완전히 탈메틸화를 보이고 나머지는 메틸화 되었다. 이를 결과는 정자 계놈 12와 14 CpGs의 site 특이적인 *de novo* 메틸화와, 난자 계놈 16~19 CpGs의 탈메틸화가 cleavage되는 2-cell 특이적인 메틸화 패턴이 수정 후에 형성되었음을 의미한다. 다음으로 4-cell에서는 CpGs 16~19에서 다시 *de novo*하게 메틸화 되고, 8-cell에서는 그대로 메틸화 패턴을 유지하였다. 흥미롭게 Oct-4 전사산물이 다시 발현하는 상실배 단계에서 CpGs 10, 17~19의 탈메틸화 되었고, 배반포 단계에서는,

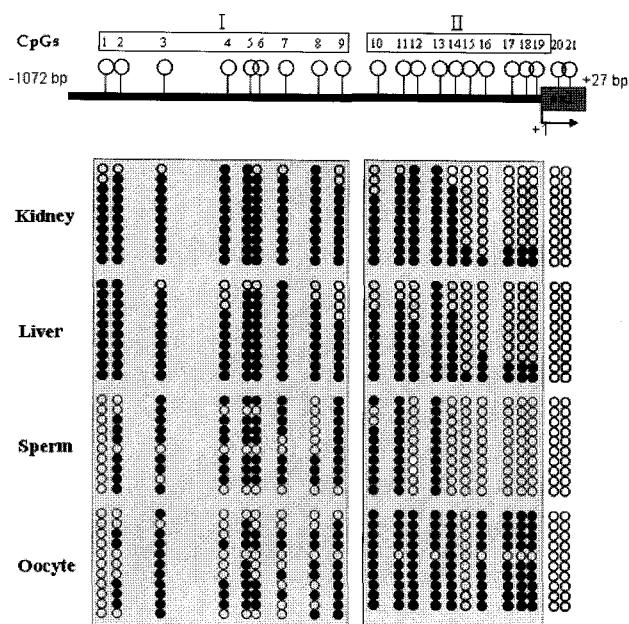


Fig. 2. Methylation status of CpGs in the promoter region of Oct-4 in adult somatic tissues and germ cells. Methylation status of each CpG in the 5'-regions of Oct-4 analyzed by means of sodium bisulfite genomic sequencing method, are shown. Open and closed circles indicate unmethylated and methylated cytosine residues, respectively. 18 CpGs in the 5'-regions of Oct-4 are numbered, 1-21, and divided into two groups (I and II).

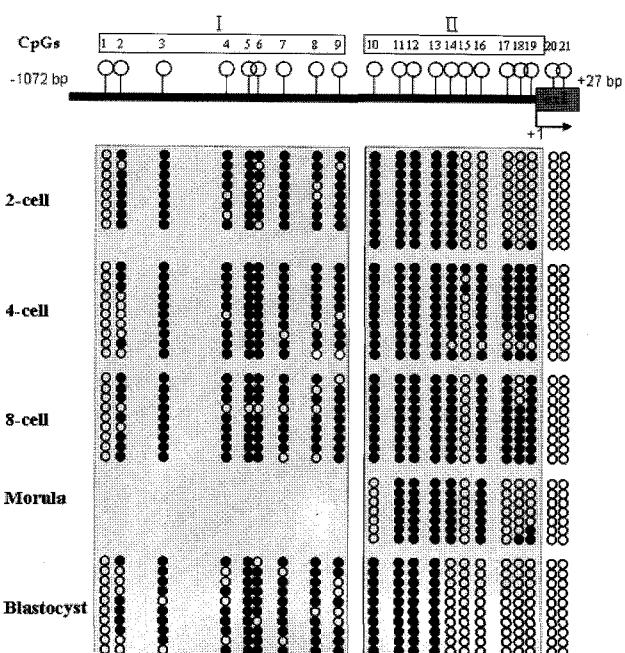


Fig. 3. Methylation status of CpGs in the promoter region of Oct-4 in preimplantation embryos. Methylation status of each CpG in the 5'-regions of Oct-4 analyzed by means of sodium bisulfite genomic sequencing method, are shown. Open and closed circles indicate unmethylated and methylated cytosine residues, respectively. 18 CpGs in the 5'-regions of Oct-4 are numbered, 1-21, and divided into two groups (I and II).

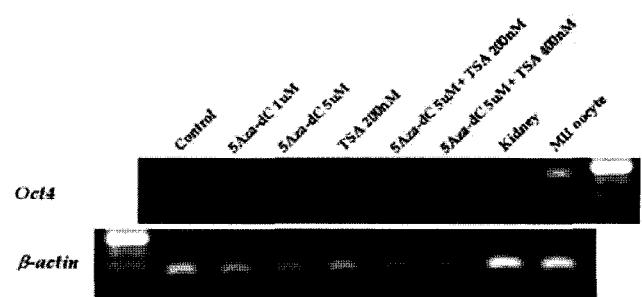


Fig. 4. Reactivation of Oct-4 gene in Oct-4-negative cells. The expression profile of Oct-4 mRNA in 5'-aza dC and TSA-treated bovine fibroblast cells. MII-oocyte were used as a positive control for Oct-4 expression. The expression of Oct-4 mRNA and β -actin were determined by RT-PCR in bovine fibroblast cells cultured for 72h under with 5'-aza dC(1 or 5 μ M) or TSA(200nM or 400nM).

탈메틸화가 14~19번 CpG들까지 증가되었다. 이들 6개의 CpG들은 완전히 탈메틸화 되었는데, 이것은 발달된 배반포 각 할구들이 동일한 메틸화 패턴을 갖고 있음을 의미한다. 이처럼 착상 전 발달과정 중에 Oct-4 상류 T-DMR의 메틸화 패턴은 stage-specific DNA 메틸화의 활발한 변화를 나타내었다.

Epigenetic 상태에 영향을 미치는 시약처리에 의한 Oct-4 발현유도 실험

Oct-4가 발현하지 않는 체세포인 섬유아세포를 이용 DNA 메틸화 억제제 5'-aza dC 또는 히스톤 탈아세틸화 억제제인 TSA 처리에 의한 Oct-4 전사산물의 발현 유도를 통하여 Oct-4 발현이 DNA 메틸화 및 chromatin remodeling에 의하여 제어 받는지를 확인하고자 실시하였다. 실험 결과 5'-aza dC 또는 TSA 처리한 어떠한 시험구에서도 Oct-4 발현은 유도되지 않았다(Fig. 4). 이들 결과는 소에서는 Oct-4의 발현 조절이 그 상류 영역의 메틸화·아세틸화 외에 다른 조절 메커니즘에 의해 제어 받고 있음을 시사하고 있다.

고찰

본 실험은 착상 전 초기 배 발달 과정에서 Oct-4 발현이 그 상류 T-DMR의 DNA 메틸화에 의해서 제어 받는지 조사하고자 실시하였다. 정상발달 동안에 소 Oct-4 발현에 관한 많은 결과들이 있는데, RT-PCR에 의한 Oct-4 발현은 난자와 배반포에서 높게 발현하며, 착상 전 초기 배 발달과정에서 모두 발현하고(van Eijk 등, 1999; Kirchhof 등, 2000), RT-PCR과 *in situ* hybridization에 의한 결과에서는 미수정란에서 미약하게 존재하며 compaction이 일어나는 상실배 전까지는 그 전사산물이 존재하지 않으며(Kurosaka 등 2004), 또 다른 결과는 배반포에서 발현이 미수정란보다 20배 이상이라고 보고하고 있다(Vigneault 등, 2004). 본 연구의 결과에서도 이들 보고된 내용과 유사한 결과를 보였는데, 수정 후 2-cell, 4-cell, 8-cell에서 매우 희미하게 발현되었고, 미수정란에서 보통 수준 그리고 상실배에서 급격히 강하게 발현되었다. 이들 결과는 미수정란에서 전사된 다양

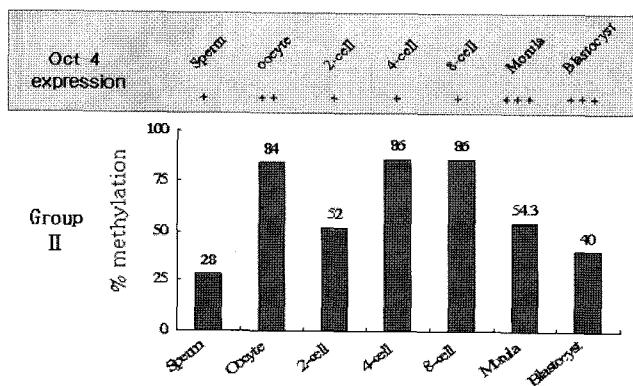


Fig. 5. Schematic representation of the expression of Oct-4 and change in methylation status of Oct-4 T-DMR. RNA expressions of Oct-4 are summarized above the graph that indicate average percentage of methylated CpGs in group II of Oct-4 T-DMR in the indicated cells/stages. + Weakly present, ++ medium present, +++ strongly present.

한 종류의 mRNA들이 수정 후 착상 전 수정란으로 이행되는데, 전사는 초기 수정란 단계에 한정된다고 알려져 있는 것과 같이(Aoki 등, 1997; 2003) 수정 전 미수정란에서 발현된 Oct-4 전사산물이 수정 후 이행되고, 상실배 단계에서 *de novo*하게 발현됨을 시사하고 있다.

Fig. 5에서 Oct-4 발현과 T-DMR의 메틸화 변화를 정리하였다. T-DMR중 특히 그룹II의 영역의 CpGs에서 Oct-4가 급격히 발현되는 상실배, 배반포에서 저메틸화 경향을 보였으나, Oct-4가 미약하게 발현되는 2-cell, 4-cell, 8-cell에서는 2-cell을 제외하고 고메틸화 되는 경향을 보였다(Fig. 5). 그러므로 착상 전 cleavage 발달과정 중 Oct-4의 전사조절은 그 상류 promoter 영역의 그룹II의 CpG들의 DNA 메틸화에 의한 epigenetic 시스템에 의해 부분적으로 제어 받는 것 같다. 이전의 보고에서 마우스 초기 발달과정 중 Oct-4 promoter 메틸화 상태가 조사되었고(Marikawa 등 2005; Kim 등 2007), 그 메틸화 수준은 전반적으로 4% 미만으로 낮고 cleavage 발달단계별 배반포(1.6%)까지 점차적으로 감소하였고(Yamazaki 등, 2006), 또한 ES 및 TS 세포를 이용하여 Oct-4 유전자의 상류 영역의 메틸화 상태를 해석한 실험에서 Oct-4 발현이 메틸화에 의해 세포특이적으로 제어 받고 있음을 증명하였다(Hatori 등, 2004). 본 실험 결과, 소에서는 그 메틸화 변화가 마우스와 달리 착상 전 초기 배에서 높게 유지되며, cleavage 단계별 그 발현에 따라 뚜렷하게 변화하였다. 섬유아세포 이용 5'-aza dC 또는 TSA 처리에 의한 Oct-4 전사산물의 발현유도를 통하여 그 발현이 DNA 메틸화 및 chromatin remodeling에 의하여 제어 받는지를 확인 결과 Oct-4 발현은 유도되지 않았는데, 이것은 소에서 Oct-4의 전사 조절이 epigenetic 시스템과 함께 전사 인자들과의 상호작용이 존재함을 추정할 수 있고, 이에 대한 분석이 좀더 수행되어야 할 것으로 생각된다.

포유동물에서 계놈의 다이내믹한 epigenetic modification은 마우스에서는 수정 후 4시간 이내에 웅성전핵에서 급격한 탈메틸화가 발생한다(Santos 등, 2002; Oswald, 2000). 이러한 급격한 탈메틸화는 마우스 외에 rat, 돼지(Dean 등, 2001), 사람(Fulka 등, 2004; Dean 등, 2001)에서

보이고, 면양과 소에서는 부분적인 약간의 탈메틸화 현상이 보인다(Beaujean 등, 2004; Dean 등 2001). 본 실험에서는 착상 전 초기 배 발달 과정 동안 메틸화 패턴은 Oct-4 발현 조절 영역으로 생각되는 T-DMR내 그룹II의 CpG들에서 정자에서 28% 미수정란에서 84%이고, 수정 후 2-cell에서는 52%의 메틸화를 보여주는데(Fig. 5), 미수정란 축면에서 보면 수정에 의한 세포복제 과정에서 탈메틸화가, 정자 축면에서 보면 메틸화 증가현상을 보여 이전의 결과들에서 보이는 paternal의 탈메틸화 범주에 포함되어 있지 않는다. 이처럼 이전의 genome-wide하게 메틸화를 분석하는 면역염색 결과와는 달리 bisulfite-sequencing 방법은 상세하게 계놈상의 특정영역의 메틸화 패턴을 조사함에 따라 특정 유전자 영역의 보다 정확한 메틸화 패턴을 얻을 수 있다. 이후 4-cell과 8-cell에서 86% 메틸화 증가 후, 상실배에서 54.3% 배반포에서 40% 메틸화 감소를 보여 다이내믹한 메틸화의 변화를 보이고 있어 세포특이적인 메틸화 패턴이 이 시기에 존재한다. 어째든 Oct-4 T-DMR의 DNA 메틸화 상태는 착상 전 배 발달 동안에 특정 stage에서 독특한 메틸화 패턴을 갖고 변화하며, 이러한 모든 변화는 *de novo* 메틸화와 능동적인 탈메틸화에 의해 일어난다 할 수 있다. 일반적으로 수정 후 genome-wide한 탈메틸화 현상이 일어나는데, 이것은 DNA 복제와 세포분열에 따른 유지 메틸화 부족에 의한 것으로 알려져 있어(Rougier 등, 1998), 본 실험의 결과뿐만 아니라 수정 후 포유동물 초기 배 발달 과정은 다이내믹한 epigenetic modification의 큰 축을 차지하고 있는 것 같다.

결론적으로 본 연구에서 Oct-4는 수정 후 초기 배 발달 과정에서 DNA 메틸화의 타깃이고, 특히 소에서 Oct-4 T-DMR의 메틸화는 수정 후 배반포까지 다양하게 변화함을 보여준다.

인용문헌

1. Aoki F, Worrard DM, Schultz RM (1997): Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 181:296-307.
2. Aoki F, Hara KT, Schultz RM (2003): Acquisition of transcriptional competence in the 1-cell mouse embryo: requirement for recruitment of maternal mRNAs. *Mol Reprod Dev* 64:270-274.
3. Barnea E, Bergman Y (2000): Synergy of SF1 and RAR in activation of Oct-3/4 promoter. *J Biol Chem* 275: 6608-6619.
4. Beaujean N, Taylor JE, McGarry M, Gardner JO, Wilmut I, Loi P, Ptak G, Galli C, Lazzari G, Bird A, Young LE, Meehan RR (2004): The effect of interspecific oocytes on demethylation of sperm DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:7636-7640.
5. Bird AP, Wolffe AP (1999): Methylation-induced repression-belts, braces, and chromatin. *Cell* 99:451-454.
6. Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M (1994): High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 22:2990-2997.

7. Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, Reik W (2001): Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13734-13738.
8. Fuhrmann G, Sylvester, Scholer HR (1999): Repression of Oct-4 during embryonic cell differentiation correlates with the appearance of TRIF, a transiently induced DNA-binding factor. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 45:717-724.
9. Fuhrmann G, Chung AC, Jackson KJ, Hummelke G, Baniahmad A, Sutter J, Sylvester I, Scholer HR, Cooney AJ (2001): Mouse germline restriction of Oct-4 expression by germ cell nuclear factor. *Dev Cell* 1: 377-387.
10. Fulka H, Mrazek M, Tepla O, Fulka JJr (2004): DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos. *Reproduction* 128:703-708.
11. Hattori N, Nishino K, Ko YG, Ohgane J, Tanaka S, Shiota K (2004): Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *J Biol Chem* 279:17063-17069.
12. Kim JM, Ko YG, Seong HH, Chung HJ, Chang WK, Kim NH (2007): Alteration of DNA methylation in Oct-4 gene in mouse preimplantation embryos by the interference RNA. *Reprod Dev Biol* 31:21-28.
13. Kirchhof N, Carnwath JW, Lemme E, Anastassiadis K, Scholer H, Niemann H (2000): Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biol Reprod* 63:1698-1705.
14. Ko YG, Nishino K, Hattori N, Arai Y, Tanaka S, Shiota K (2005): Stage-by-Stage Change in DNA Methylation Status of Dnmt1 Locus during mouse early development. *J Biol Chem* 280:9627-9634.
15. Kurosaka S, Eckardt S, John, MK (2004): Pluripotent lineage definition in bovine embryos by Oct-4 transcript localization. *Biol Reprod* 71:1578-1582.
16. Marikawa Y, Fujita TC, Alarco'n VB (2005): Heterogeneous DNA methylation status of the regulatory element of the mouse Oct-4 gene in adult somatic cell population. *Cloning Stem Cells* 7:8-16.
17. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, Smith A (1998): Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct-4. *Cell* 95:379-391.
18. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. (2000): Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24: 372-376.
19. Nordhoff V, Hubner K, Bauer A, Orlova I, Malapesta A, Scholer HR (2001): Comparative analysis of human, bovine, and murine Oct-4 upstream promoter sequences. *Mamm Genome* 12:309-317.
20. Okamoto K, Okazawa H, Okuda A, Sakai M, Muramatsu M, Hamada H (1990): A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* 60:461-472.
21. Okazawa H, Okamoto K, Ishino F, Ishino-Kaneko T, Takeda S, Toyoda Y, Muramatsu M, Hamada H (1991): The oct3 gene, a gene for an embryonic transcription factor, is controlled by a retinoic acid repressible enhancer. *Embo J* 10:2997-3005.
22. Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, Dean W, Reik W, Walter J (2000): Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* 10:475-478.
23. Pesce M, Marin Gomez M, Philipsen S, Scholer HR (1999): Binding of Sp1 and Sp3 transcription factors to the Oct-4 gene promoter. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 45:709-716.
24. Rosner MH, Vigano MA, Ozato K, Timmons PM, Poirier F, Rigby PW, Staudt LM (1990): A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* 345: 686-692.
25. Rougier N, Bourc'his D, Gomes DM, Niveleau A, Plachot M, Paldi A, Viegas-Pequignot E (1998): Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. *Genes Dev* 12:2108-2113.
26. Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W (2002): Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* 241:172-82.
27. Scholer HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, Gruss P (1990): New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* 344:435-439.
28. Shiota K, Kogo Y, Ohgane J, Imamura T, Urano A, Nishino K, Tanaka S, Hattori N (2002): Epigenetic marks by DNA methylation specific to stem, germ and somatic cells in mice. *Genes Cells* 7:961-969.
29. Tanaka S, Kunath T, Hadjantonakis AK, Nagy A, Rossant J (1998): Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* 282:2072-2075.
30. Van Eijk MJ, van Rooijen MA, Modina S, Scesi L, Folkers G, van Tol HT, Bevers MM, Fisher SR, Lewin HA, Rakacolli D, Galli C, de Vaureix C, Trounson AO, Mummery CL, Gandolfi F (1999): Molecular cloning, genetic mapping, and developmental expression of bovine POU5F1. *Biol Reprod* 60:1093-1103.
31. Vigneault C, McGraw S, Massicotte L, Sirard MA (2004): Transcription factor expression patterns in bovine *in vitro*-derived embryos prior to maternal-zygotic transition. *Biol Reprod* 70:1701-1709.
32. Yamazaki Y, Fujita TC, Low EW, Alarco'n VB, Yanagimachi R, Marikawa Y (2006): Gradual DNA demethylation of the Oct4 promoter in cloned mouse embryos. *Mol Reprod Dev* 73:180-188.
33. Yeom YI, Fuhrmann G, Ovitt CE, Brehm A, Ohbo K, Gross M, Hubner K, Scholer HR (1996): Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development* 122:881-894.

(접수일자: 2008. 2. 29 / 채택일자: 2008. 3. 14)