발생과 생식 제 14권 제 4호, 243~251 (2010)
Dev. Reprod. Vol. 14, No. 4, 243~251 (2010)

인간 양수 유래 줄기세포에서 세포투과단백질을 이용한 ESRRB 단백질의 직접도입에 의한 전분화능 관련 유전자의 발현 조절

조중현[1] · 이유선[1] · 오미희[2] · 고정재[1] · 전용필[2,†] · 이동률[1,†]

[1]차의과학대학교 의생명과학과, [2]성신여자대학교 생명과학화학부

Up-regulation of Pluripotency-related Genes in Human Amniotic Fluid-derived Stem Cells by ESRRB Conjugated with Cell-Penetrating Peptide

Junghyun Jo[1], Yusun Lee[1], Mi Hee Oh, Jung Jae Ko[1], Yong-Pil Cheon[2,†] and Dong Ryul Lee[1,†]

[1]Dept. of Biomedical Science, College of Life Science, CHA University, Seoul 135-081, Korea

[2]Dept. of Biology, College of Natural Science, Sungshin Women's University, Seoul 136-742, Korea

ABSTRACT : ESRRB (Estrogen related receptor β) is an orphan receptor, and have a role on maintaining the undifferentiated state and self-renewal of pluripotent stem cell as a transcription factor which regulates the expression of *OCT4* and *NANOG* genes. Also, Feng et al. (2009) reported that *Esrrb, Oct4* and *Sox2* could induce pluripotent stem cell from somatic cells. The aim of the present study was to develop the direct delivery system of human ESRRB protein into human amniotic fluid-derived stem cells (AFSCs) and to analyze the effect of ESRRB on the regulation of pluripotency-related genes. Human *ESRRB* has three isoforms arisen by alternative splicing. We cloned short-form *ESRRB* and made a fusion protein of ESRRB and R7 for an efficient protein transfer to cell. R7 as cell-penetrating peptide(CPP) can help to transfer ESRRB into cells. R7-ESRRB-His6 protein was observed in the cytoplasm and nuclei within 5 hours after treatment. Also, we could observe R7-ESRRB-His6 protein only in the nuclei within 24 hours. Realtime PCR showed that ESRRB increased expression of *OCT4* and *NANOG* as well as *SOX2* gene. Therefore, we demonstrated that R7-ESRRB-His6 proteins were efficiently transferred into the nuclei of AFSCs and work well as a possible transcription factor.

Key words : ESRRB, Cell-penetrating peptide, Pluripotent-regulating genes, Human amniotic fluid-derived stem cells.

요 약 : Estrogen related receptor β (*Esrrb*)는 오르판 수용체 중 하나로 전분화능 관련유전자인 *Oct4*와 *Nanog*의 발현을 조절함으로써 줄기세포의 미분화를 유지시키고, 지속적인 자기 복제를 가능케 하는 유전자로 알려져 있다. 또한 Feng 등 (2009)은 체세포에 *Oct4*, *Sox2*와 함께 *Esrrb* 유전자를 함께 도입하면, 유전자가 변형된 체세포가 배아 줄기세포와 유사한 유도만능줄기세포로 리프로그래밍(reprograming)되어 진다는 결과를 보고한 바 있다. 본 연구에서는 인간 ESRRB 단백질을 양수유래줄기세포 내로 직접도입하는 방법을 개발하고, 이를 통해 전분화능 관련유전자의 기능 조절을 확인하고자 하였다. 클로닝 된 인간 short-form *ESRRB*를 세포투과 펩타이드(cell-penetrating peptide, CPP)의 일종인 R7(아르기닌 7개)에 접합(Fusion)하였고, 합성단백질 (R7-ESRRB-His6)의 형태로 배양중인 인간 양수 유래 줄기세포에 처리하여 세포내로 도입하였다. R7-ESRRB-His6 단백질은 5시간 내에 세포막을 통과하였고, 24시간 내에 핵 내로 이동하였다. 또한 핵 내로 이동한 ESRRB 단백질은 *OCT4*와 *NANOG* 유전자의 발현을 증가시켰을 뿐만 아니라, 또 다른 전분화능 관련유전자인 *SOX2*의 발현도 함께 증가시킨다는 것을 확인하였다. 이상의 결과는 세포투과 펩타이드와 유전자의 접합을 통해 생산된 R7-ESRRB-His6 합성단백질이 양수유래줄기세포내로 원활하게 도입되는 것을 확인하였고, 유전자의 변형 없이 전분화능 관련유전자의 기능을 조절할 수 있는 방법임을 확인하였다.

† 교신저자: 이동률, 서울시 강남구 역삼동 606-5, 차의과학대학교 강남차병원 여성의학연구소. (우) 135-081, (전) 02-3468-3421, (팩) 02-3468-2610, E-mail: drleedr@cha.ac.kr

† 교신저자: 전용필, 서울시 성북구 동선동3가 249-1, 성신여자대학교 생명과학화학부. (우) 136-742, (전) 02-920-7639, (팩) 02-920-2093, E-mail: ypcheon@sungshin.ac.kr

서 론

생식소와 부신에서 분비되는 스테로이드 호르몬은 주로 생식기관 형성, 표적 세포의 분화 및 대사 작용 조절에 관여한다. 이러한 호르몬은 세포 표면 및 세포질에 있는 특정 수

용체와 특이적으로 결합하여 그 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다. 그러나 일부의 호르몬 수용체는 리간드와 결합이 일어나지 않은 상태에서 그 기능을 수행할 수 있거나, 또는 아직 리간드가 알려져 있지 않은 경우도 있다. 이러한 경우에 해당하는 수용체를 희귀 수용체 또는 오르판 수용체(Orphan receptor)라 한다.

Estrogen-related-receptor β (*ESRRB*)는 대표적인 오르판 수용체 중 하나이며, 핵수용체 슈퍼패밀리(Nuclear receptor super family)에 속한다. 그리고 *ESRRB* 유전자는 선택적 이어맞추기(alternative splicing)를 통해 3종류 전사체를 만들 수 있으며, 각각 세포내에 존재하는 위치가 달라 서로 다른 기능을 수행할 것으로 추정하고 있다(Zhou et al., 2006). 단백질은 부분적으로 시스테인 리치 부분(cysteine-rich domain)을 가지고 있으며, 이를 통해 DNA에 결합하여 전사를 조절하는 것으로 알려져 있다(Giguère et al., 1988). ESRRB는 전형적인 Estrogen response element(ERE)에 결합하여 전사를 조절하는 공동 활성 인자(coactivator)이며, 전사 조절 과정에서 다수의 다른 공동 활성 인자들과 에스트로겐수용체(estrogen receptor, ER)를 공유하고 있다(Xie et al., 1989). 또한 ESRRB는 자연 살생세포(nature killer cells)와 대식 세포(Macrophage) 등을 포함한 면역세포와 자궁 내막(endothelium), 자궁기질(stroma), 분비샘(glands)을 포함한 자궁 내막 세포(edometrial cell)에서 다량 발현하며, 핵으로 이동하여 기능을 수행한다(Bombail et al., 1988). 특히, 전립선에서 ESRRB의 정상적 발현이 유지된다면 전립선 암 조직의 성장을 상당히 억제한다는 보고가 있었다(Yu et al., 1988). 더불어 Rod photoreceptor에서 선택적으로 발현하는 ESRRB 유전자에 돌연변이가 일어났을 경우에 Rod의 기능 저하 및 퇴행이 일어난다(Onishi et al., 2010).

최근에는 배아줄기세포의 핵심 전사 네트워크(core transcriptional network)에 포함되어 있는 것이 알려짐(Chen et al., 2008)에 따라, 배아줄기세포에서 ESRRB의 기능에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. ESRRB가 *Oct4* 유전자의 전사를 활성화 시켜 인간 배아줄기세포의 전분화능과 자가 증식능을 유지할 수 있게 하며(Zhang et al., 2008), *Oct4*와 함께 상호작용하여 *Nanog*의 발현을 강화시킨다는 결과가 최근에 보고된 바 있다(van den Berg et al., 2008). 특히 Feng et al.은 *Oct4*, *Nanog*와 함께 *Esrrb*를 일반 체세포에서 과발현시켜, 체세포를 유도만능줄기세포로 유도하였다고 보고함으로써 *Esrrb*는 배아줄기세포의 유지 배양뿐만 아니라 유도만능줄기세포의 유도에도 핵심적인 유전자로 주목받고 있다.

줄기세포의 유지, 배양 및 유도를 위한 중요 단백질은 유전자를 세포에 도입하는 방식으로 과발현을 유도하는 것이 최근까지 일반적인 연구 방법이었다(Takahashi et al., 2006). 그러나 이러한 방식은 유전자 도입을 위해 주로 바이러스를 이용한다. 이러한 방식은 연구 목적에 한해서 이용될 수 있을 뿐, 임상적으로 응용되는 것에 많은 제한점을 가진다. 이러한 한계를 극복하기 위해 최근 연구되어지고 있는 방법은 cell-penetrating peptide(CPP)를 이용한 단백질 자체를 세포내에 직접 도입하는 방식이다. CPP가 처음 연구되었던 것은 HIV가 만들어 내는 단백질 중 trans-activator로 기능을 하는 Tat 단백질에 관한 것이었다. Tat 단백질을 순수 분리하여 배양액에 첨가하였을 때 이 단백질은 쉽게 단백질내로 도입되고 핵까지 이동하여 trans-activator로써 기능을 수행하였다(Frankel et al., 1998). CPP는 라이신(lysine) 또는 아르기닌(arginine)과 같은 양전하를 가지고 있는 아미노산의 반복으로 구성되어 있다. 최근 한 연구팀이 9개의 아르기닌이 결합된 줄기세포 중요 인자(OCT4, SOX2, KLF4, c-Myc)를 이용하여 유도줄기세포를 확립하였다고 보고한 바 있다(Kim et al., 2009).

본 연구에서는 7개의 아르기닌으로 구성된 CPP가 결합된 인간 ESRRB 단백질을 생산할 수 있도록 유전자를 재조합하여 클로닝하고, 단백질을 순수 분리하여 양수유래 줄기세포에 도입함으로써 인간 ESRRB가 줄기세포에 관련된 중요 유전자의 발현에 미치는 영향을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 인간 ESRRB의 번역 개시 위치(Open Reading Frame) 클로닝(Cloning)

배양 중 미분화 상태를 유지하고 있는 인간배아줄기세포주(CHA-hES3, Lee et al., 2010) 1,000콜로니를 회수하였고, RNeasy mini kit(QIAGEN, Inc., Basel, Switzerland)을 이용하여 전체 RNA를 추출하였다. 추출된 1 μg의 RNA를 PrimeScript^{TM} 1st strand cDNA Synthesis Kit(TAKARA Bio, Shiga, Japan)를 이용하여 역전사중합효소 반응(reverse transcriptase reaction)을 통해 cDNA를 합성하였다. 이렇게 합성된 cDNA는 인간 *ESRRB*의 번역 개시 위치(open reading frame;

ORF) 클로닝을 위한 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction: PCR)의 주형으로 사용되었다. 중합효소 연쇄 반응은 95℃, 30초; 60℃, 1분; 72℃, 1분을 28 사이클(cycle) 실시하였다. 중합효소 연쇄 반응에 사용된 5'-프라이머(5'-primer)에는 개시코돈(start codon)과 제한 효소인 XhoI(New England Biolabs, Inc., MA, USA)의 염기서열이 포함되도록 제작되었고, 3'-프라이머는 종결코돈(stop codon)과 제한 효소 BamHI(New England Biolabs, Inc.) 염기서열이 포함되도록 제작되었다(Table 1). 중합효소 연쇄 반응의 반응 산물은 pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning Kit(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 pCR®8/GW/TOPO 벡터에 클로닝하였다. 클로닝 수행 후 염기서열 분석을 통해 돌연변이 유무를 확인하였다. pCR®8/GW/TOPO 벡터로 클로닝된 *ESRRB*의 ORF는 XhoI과 BamHI 제한 효소를 처리한 후 전기영동을 통해 분리하고, 이를 추출하여 박테리아 단백질 발현벡터인 변형된 pET20b 벡터로 옮겼다. 변형된 pET20b는 5'쪽에 아르기닌이 7차례 반복(R7)되어 번역될 수 있도록 설계되어 있으며, 3'쪽에는 여섯 개의 히스티딘(His 6x)이 번역될 수 있도록 하였다. 7개의 아르기닌이 연결된 짧은 아미노산 잔기는 대표적인 CPP 중에 하나이다(Fig. 1).

2. 박테리아에서 R7-ESRRB-His6 단백질의 순수 분리 및 처리

pET20b-*ESRRB* 벡터를 BL21(DE3)pLysS 균주에 도입한 후 Ampicillin(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)이 포함된 고체 배지에서 배양하였다. 배양된 단일 클론을 100 ㎎/㎖ 농도의 Ampicillin이 포함된 액체 배지 3 ㎖에 접종하고 220 rpm 속도로 회전하는 37℃ 진탕 배양기에서 약 16시간 배양하였다. 배양된 균주는 대량 배양을 위해 1:100의 비율로 항생제가 첨가되지 않은 200 ㎖의 액체 배지에 접종하였고, 약 2시간 정도 배양(약 OD600:0.8)한 후 최종 농도가 1 mM이 되도록 IPTG(Isopropyl-1-thio-β-Dgalactopyranoside : Sigma Aldrich)를 처리하였다. IPTG를 처리한 후에는 배양기의 온도를 20℃로 변경한 후 8시간을 추가로 배양하였고, 배양된 균은 원심분리기를 통해 수거한 후 사용시까지 −20℃에서 동결 보관하였다. 이후 동결된 균을 상온에 15분 정도 노출시켜 해동하고 NP-10[50 mM NaH_2PO_4(Sigma Aldrich), 300 mM NaCl(Sigma Aldrich), 10 mM imidazole(Sigma Aldrich), pH to 8.0]과 lysozyme(Sigma Aldrich) 용액(10 ㎎/㎖) 1 ㎖(10 ㎎), 그리고 Benzonase(3 units/㎖ : QIAGEN, Inc.)을 첨가하고 상온에서 30분간 방치하여 균주를 용해시켰다. 균이 용해된 액체는 15,000 rpm으로 원심분리하여 불필요한 물질은 침전시키고, 상층액을 모아 Ni-NTA Superflow Columns(QIAGEN Inc.)에 적용하여 히스티딘에 붙어 있는 ESRRB를 순수 분리하였다(Fig. 2). 순수 분리된 CPP-ESRRB-His(X6) 단백질은 2 ㎍/㎖ 단위로 양수 유래 줄기세포 배양액에 첨가되었으며, 48시간 간격으로 총 4회 처리하였다.

Table1. Primer sequence for cloning and realtime-PCR

Genes		Primer sequence	Size(bp)
ESRRB	Forward	CTCGAGATGTCGTCCGAAGACAGGCAC	1,364
	Reverse	GGATCCCACCTTGGCCTCCAGCATCTC	
Oct3/4	Forward	AGCGAACCAGTATCGAGAAC	140
	Reverse	TTACAGAACCACACTCGGAC	
Sox2	Forward	AGCTACAGCATGATGCAGGA	125
	Reverse	GGTCATGGAGTTGTACTGCA	
Nanog	Forward	TGAACCTCAGCTACAAACAG	124
	Reverse	TGGTGGTAGGAAGAGTAAAG	
β-actin	Forward	TGAAGTGTGACGTGGACATC	152
	Reverse	GGAGGAGCAATGATCTTGAT	

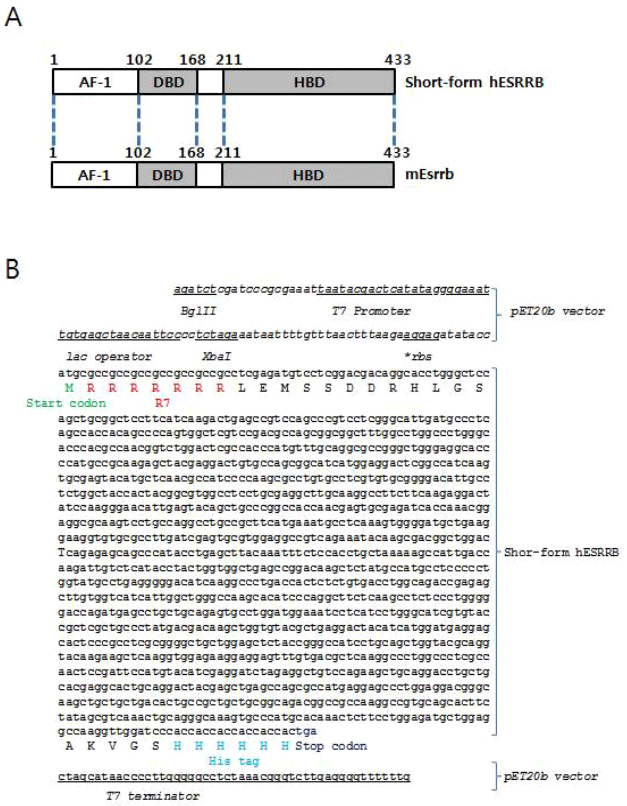

Fig. 1. Cloning of short-form hESRRB in modified pET20b vector. A. Comparision of gene structures between human short-form ESRRB and mouse Esrrb. Human and mouse Esrrb gene have three functional domain. DBD stands for DNA binding domain, HBD stands for hormone (lingand) binding domain, AF-1 stands for Activation function-1. B. Sequence analysis of short-form hESRRB which cloned in pET20b. Short-form hESRRB was connected with seven arginine at 5' end and six histidine at 3' end. *rbs stand for ribosome binding site.

3. Western Blot Analysis

각 20 ㎍의 단백질을 10% SDS-PAGE를 통해 전기영동하고, gel 상의 단백질을 nitrocellulose membrane(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)으로 이동시켰다. Membrane은 1차 항체(anti-ESRRB goat IgG : Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 blocking solution으로 1:200 희석한 용액에 담가 상온에서 1시간 처리하였고, 이 후 PBS로 5분씩 3차례 세척하였다. 다시 2차 항체[anti-goat HRP (horseradish peroxidase) conjugated antibody : Vector laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA]가 1:1,000

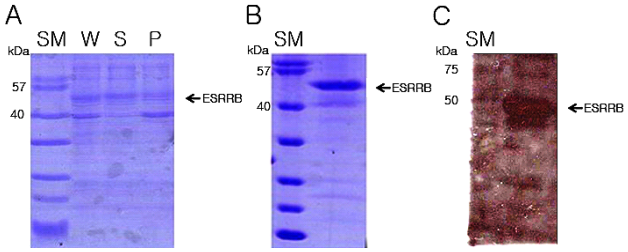

Fig. 2. Purification of R7-hESRRB-His6 protein. A. Purfication of R7-hESRRB-His6 protein was confirmed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. SM: protein size markers, W: whole of *E. coli*, S: soluble form, P: inclusion body form. B. SDS-PAGE gel running of 2 ㎍ R7-hESRRB-His6 protein after purification. SM: protein size marker, C. Western blot of ESRRB. SM: protein size marker.

으로 희석된 용액에 담가 상온에서 1시간 처리한 후 PBS로 충분히 세척하고 ECL(enhanced chemiluminescense) 용액을 처리하여 감광하였다.

4. 면역세포화학법(Immunocytochemistry)

각 처리군과 대조군의 세포는 4% paraformadehyde에 담가 상온에서 15분 정도 방치하여 고정하였다. 고정된 세포는 PBS로 3분간 3회 세척한 후 0.1% Triton-X100(Sigma Aldrich)에 15분간 방치하여 permeabilization하였다. 이 후 상온에서 Blocking solution(Dako North America, Inc., CA, USA)에 담가 1시간 방치하고, 이어 Blocking solution으로 1:100으로 희석된 1차 항체(His-Taq polyclonal antibody : Cell Signaling Technology, MA, USA)와 1시간 상온에서 반응시켰다. 이후 PBS로 충분히 세척하고 1:500으로 희석된 형광 결합 2차 항체[Alexa Fluor 555-labeled goat anti-rabbit(Molecular Probes, Eugene, OR, USA)]와 상온에서 다시 1시간 반응시켰다. 충분히 세척한 후, 핵의 대조염색을 위해 DAPI(Sigma Aldrich)를 1:500으로 희석하여 15분간 염색하였다. 마지막으로 Vector Shield mounting(Vector laboratories, Inc.) 용액을 이용하여 커버 글라스를 덮고, 공초점 현미경(confocal microscope)으로 관찰 및 촬영하였다.

5. 양수 유래 줄기세포(Amniotic Fluid Stem Cell)의 배양

양수검사(amniocentesis)를 실시한 환자의 동의를 받아 염색체 검사에 사용되고 남은 여분의 세포를 4 ng/㎖의 FGF2 (Invitrogen), 10% FBS, 2-merchaptoethanol(Gibco-BRL,

Frankin Lakes, NJ, USA), MEM non-essential amino acid solution(Gibco-BRL), 100 U/㎖ penicillin(Gibco-BRL), 100 ㎍/㎖ streptomycin(Gibco-BRL) 등이 첨가된 DMEM/F12 (Gibco-BRL) 배양액으로 배양하였다. 배양액은 3 또는 4일에 한번 교체하였고, 세포가 배양 용기 표면의 70%에서 80% 정도를 채웠을 때마다 계대 배양을 실시하였다.

6. 유세포 분석기(Flurescene Actvated Cell Sorting: FACS) 분석

Trypsin/EDTA(Hyclone, Logan, UT, USA)를 이용하여 세포를 배양용기로부터 회수하고, 원심분리한 후 25 ㎕의 PBS(Hyclone, Logan, UT, USA)에 재부유하였다. 부유된 세포에 적당량의 FACS용 항체(CD14, CD29, CD31, CD44, CD45, CD73, HLA-ABC, HLA-DR: BD/Pharmingen, CA, USA)를 첨가하고 상온에서 약 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후에는 PBS를 이용하여 세척하고 단일 세포로의 분리를 위해 촘촘한 그물망(mesh)을 통과시켰다. 그물망을 통과한 세포는 FACS 기계를 통해 분석을 실시하였다.

7. 정량적 실시간 중합효소 연쇄 반응(Real-Time Quantitative PCR)

R7-ESRRB-His6 단백질을 처리하거나 처리하지 않은 양수 유래 줄기세포로부터 RNeasy mini kit(QIAGEN, Inc.)을 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA 중 I ㎍은 역전사 중합효소 반응(reverse transcriptase reaction)에 이용하였으며, cDNA의 합성은 PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit(TAKARA Bio)를 이용하여 수행하였다. 합성된 cDNA 1㎕와 프라이머 각각 1 ㎕ 그리고 SYBR green PCR mix(TAKARA Bio) 10 ㎕를 함께 섞고 최종 증류수를 이용 20 ㎕가 되게 하였고, 이 혼합물을 Realtime PCR 기계(TA KARA TP800 : TAKARA Bio)를 통해 증폭하고 형광량을 분석하였다. 이때 사용되는 realtime PCR용 프라이머 염기서열과 PCR 산물의 크기는 Table 1에서 정리하였다. 3회 이상 반복 실시하였고, 그 결과물은 Agarose gel에 전기 영동하여 실시간 중합효소 연쇄 반응을 이용한 정량 결과 수치와 비례하는지를 확인하였다.

8. 염색체 분석

염색체 분석을 위해서 배양 중인 양수유래 줄기세포를 0.1 ㎍/㎖ KaryoMAX colcemid(Invitrogen)를 처리하여 2시간 추가적으로 배양하였고, 37℃에서 저장액(1% sodium citrate)에 30분간 처리한 후 Carnoy 고정액(3:1 methanol : acetic acid)에 수득하여 4℃에 보관하였다. 염색체 분석은 전문검사 기관(네오딘의학연구소, Seoul, South Korea)에 의뢰하여 수행하였다.

9. 통계분석

정량적 실시간 중합효소 연쇄 반응을 통한 실험군과 대조군의 전분화능 관련 유전자의 발현량을 비교하는 data는 최소 세 번 이상의 독립적인 실험 수행에 근거한 결과이며, 평균값과 표준 오차 값으로 나타냈다. 통계 분석은 Student's *t*-test로 수행하였으며, $p<0.05$인 경우를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 인간 ESRRB의 동정과 순수 분리

본 연구에서 human short form ESRRB(hESRRB)를 RT-PCR을 통해 클로닝하였으며, 이를 변형된 pET20b 벡터로 옮겨 세균에서 단백질을 생산할 수 있는 벡터를 완성하였다. 최종 벡터가 완성되고 난 후 중요 부분의 염기서열을 분석함으로써 R7, ESRRB, 그리고 His6 모두에서 돌연변이가 없으며, Open reading frame이 정확하다는 것을 확인하였다(Fig. 1B). hESRRB는 1mM의 IPTG로 단백질 발현을 유도하고, C 터미널에 붙인 His 6x-tag을 이용하여 순수 분리하였다. 최종 분리가 이루어지고 약 3 ㎍을 SDS-PAGE gel에 전기영동하여 순수분리를 확인하였다(Fig. 2B). SDS-PAGE gel에 전기영동 상에 보이는 밴드가 hESRRB인지를 확인하기 위하여 ESRRB antibody를 활용하여 Western blot을 수행하였다(Fig. 2C). 결과적으로 Fig. 2는 본 연구에서 분리된 단백질은 상당히 높은 순도에 인간 ESRRB라는 것을 보여주고 있다.

2. 양수 유래 세포(Amniotic Fluid Derived Cell)의 동정

양수 유래 세포는 양수 검사 후 잉여 세포를 배양하여 획득하였다. 양수 유래 세포는 양끝이 뾰족한 모양을 하고 있는 방추(spindle) 모양을 하고 있으며, 성체 줄기세포로 잘 알려진 중간엽 줄기세포와 비슷한 모양을 하고 있다(Fig.

3A, 3B). 대부분의 세포에서 중배엽 줄기세포 특이적 표지 인자(CD29, CD44, CD73)를 보유하고 있는 것으로 나타났다. 그러나 배아줄기세포에서 특이적으로 나타나는 SSEA4, SSEA3, TRA-1-81, TRA-1-60, CD117 등의 표지 인자는 전혀 가지고 있지 않았다. 또한 면역세포들의 표지인자인 CD14[단구세포(monocyte)], CD31[혈관 내피 세포(Platelet endotherial cell)], CD45[과립구(Granulocyte)] 등은 대부분의 세포에서 음성으로 나타났다. 특히 면역 반응에 관여하는 항원 중 HLA- ABC는 대부분의 세포가 양성으로 나타났고, HLA-DR은 대부분 세포에서 음성으로 나타났다. 이러한 표지 인자의 특성은 기존의 성체 줄기세포가 가지고 있는 표지 인자 특징과 정확히 일치하고 있다(Fig. 3C). 양수 유래 세포는 1차적 배양 이후에 약 20번의 계대 배양을 실시하는 동안 지속적인 성장을 보여 주었고, 배양 도중 염색체 검사를 실시하여 정상적인 염색체를 유지하고 있음을 확인하였다(Fig. 3D).

3. R7-hESRRB-His6 단백질의 기능 분석

R7-hESRRB-His6 단백질은 2 ㎍/㎖의 단위로 배양액과 함께 처리하였다. 단백질을 처리한 후 단백질의 도입과 시간과의 연관관계를 알아보기 위해 단백질 처리 후 5시간, 24시간에 세포를 고정하고 anti-His-Taq(6X) antibody로 형광 염색하여 관찰하였다. 결과적으로 R7-hESRRB-His6 단백질은 처리 후 5시간 만에 세포질과 핵에 모두 존재하는 것으로 관찰되었고, 처리 후 24시간이 지난 후에는 세포질에 있는 단백질의 양은 현격히 줄어들고, 핵에 존재하는 R7-hESRRB-His6 단백질의 양은 상당히 늘어나 있는 것을 관찰할 수 있었다. 세포막 주변에는 도입되지 않고 세포 밖에 존재하는 단백질의 양도 상당히 많이 관찰되었다(Fig. 4). 이와 같은 결과는 R7-hESRRB-His6 단백질이 처리 후 24시간이 지나면 핵으로의 이동이 완료된다는 것을 보여 주고 있다.

ESRRB는 세포 수준에서 OCT4 및 NANOG의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다(van den Berg et al., 2008). 본 연구에서는 R7-hESRRB-His6 단백질이 세포의 핵 위치로 이동한 후 본래의 기능을 수행하고 있는지를 확인하기 위해 하위 유전자 즉 OCT4, NANOG, SOX2의 발현을 정량적 실시간 중합효소 연쇄 반응을 통해서 확인하였다. 우선 R7-hESRRB- His6 단백질을 48시간 간격으로 4회 정도 처리한 후 세포를 수거하여 OCT4, NANOG, SOX2 유전자를 대상으로 정량적 실시간 중합효소 연쇄 반응을 수행하였다. 결과적으로, Fig. 5에서 보여주는 바와 같이 R7-hESRRB-His6 단백질이 처리되지 않은 대조군에 비하여 R7-hESRRB-His6 단백질이 처리된 실험군에서는 OCT4의 경우 약 1.6배, NANOG는 약 2배, SOX2는 약 2.4배 가량 발현이 증가되었다.

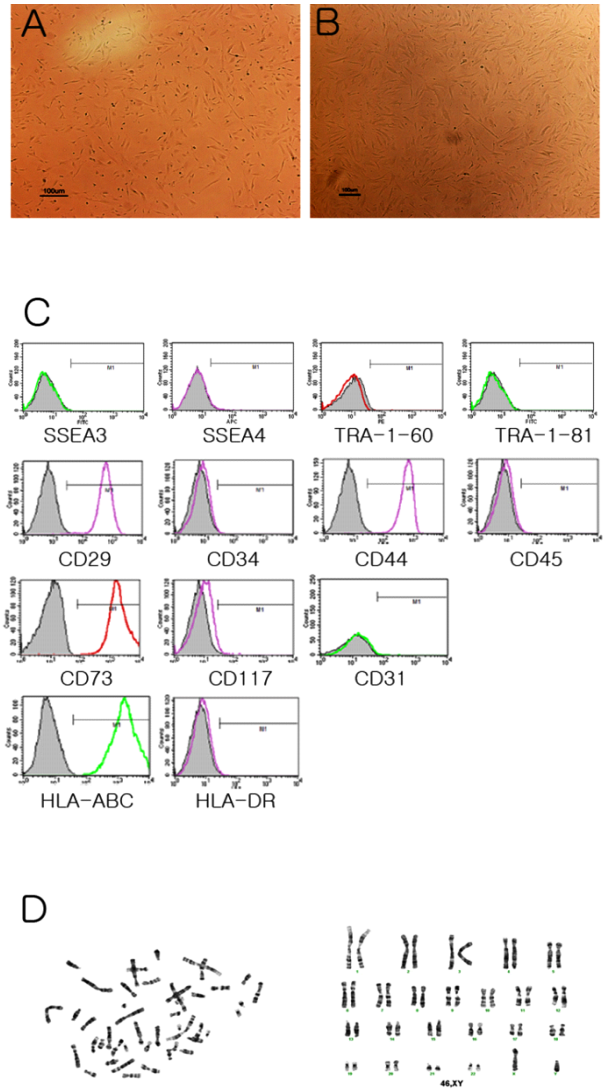

Fig. 3. Characterization of amniotic fluid-derived stem cells (AFSCs). AFSCs have morphological similarity with hMSCs and also share general surface markers with hMSCs. Images were captured using a optical microscope(NIKON Eclipse TE-2000 U, Nikon, Tokyo, Japan) A, morphology of hAFSCs (×40). B, morphology of hMSCs (×40). C, FACS analysis of hAFSCs at passage 6. D, karyotype of hAFCs at passage 6.

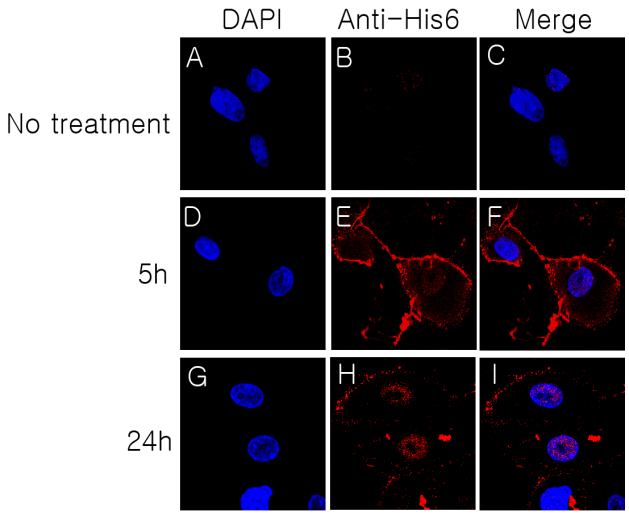

Fig. 4. R7-hESRRB-His6 protein can penetrate the membrane of cell within 5 hours after treatment and are completely localized in nuclear within 24 hours after treatment. A, B and C: the cells were not treated with R7-hESRRB-His6 protein, but immunostained by anti-His-Taq(6X) antibody; D, E and F: the cells were immunostained by anti- His-Taq(6X) antibody at 5 hours after treatment of R7- hESRRB-His6 protein; G, H and I: the cells were immunostained by anti-His-Taq(6X) antibody at 24 hours after treatment of R7-hESRRB-His6 protein. Images were captured using a conforcal microscope(Carl Zeiss LSM 510 META, Zeiss, Jena, Germany) by ×1,000 magnification.

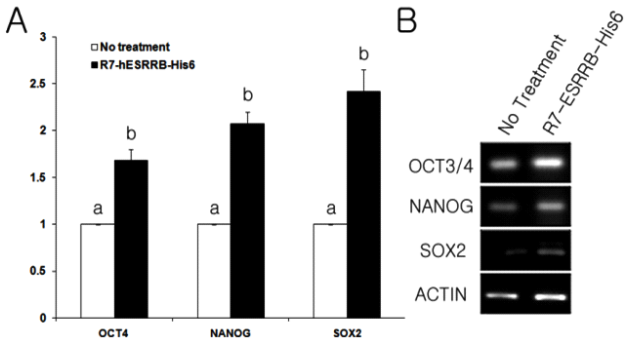

Fig. 5. Treatment of R7-hESRRB-His6 protein for 8days (192 hours) increased expression of OCT4, NANOG and SOX2. A. Realtime PCR for expression of OCT4, NANOG and SOX2, B. Agarose gel running and EtBr staining after realtime PCR performance. Statistically significant differences between each group were denoted by different letters (p<0.05)

고 찰

본 연구를 통해서 만들어진 R7-hESRRB-His6 단백질은 5'쪽에는 CPP를, 3'쪽에는 His-Tag을 가지고 있다. His-Tag을 이용한 단백질의 순수 분리를 통하여 거의 90% 이상의 순도를 가진 단백질 시료를 확보할 수 있었고, 이는 Western blot을 통해 다시 한 번 확인되었다. 순수 분리 과정에서 IPTG 유도 후 세균을 저온 배양(20℃)해야만 재조합 단백질의 과발현을 유도하고 단백질을 가용성 상태로 확보할 수 있었다.

실험에 사용된 양수 유래 세포는 표지 인자 발현 양상 분석 결과, 중간엽 줄기세포 특이적으로 발현하는 표지인자(CD29, CD44, CD73) 모두에서 양성의 결과를 보여주었고, 혈구 줄기세포에서 특이적으로 나타나는 표지인자(CD31, CD34, CD45)에서는 음성 결과를 보여주었다. 이와 함께, 인간 배아줄기세포에서 특징적으로 나타나는 표지 인자(SSEA4, SSEA3, TRA-1-61, TRA-1-80, CD117)에서도 마찬가지로 음성의 결과를 보여주었다. 이러한 결과를 토대로 볼 때, 본 연구에서 사용되는 인간 양수 유래 세포는 중간엽 줄기세포에 가까운 성체 줄기세포로 생각되어진다. 특히 양수 유래 세포는 ESRRB 단백질의 하위 유전자인 OCT4, NANOG 유전자가 기본적으로 발현되고 있어 R7-ESRRB-His6 단백질의 도입으로 이들 유전자의 발현 변화를 관찰하기에 용이하다는 장점이 있었다.

R7-ESRRB-His6 단백질은 처리 후 5시간 만에 핵과 세포질 모두에서 관찰되기 시작하였고, 24시간이 흐르고 나면 세포질에 있는 단백질은 거의 관찰하기가 힘들고 대부분의 단백질이 핵에서 관찰되고 있었다. 이 결과는 R7-ESRRB-His6 단백질이 매우 빠르게 세포막을 통과할 뿐만 아니라, 핵까지 이동하는 데 걸리는 시간도 24시간이면 충분하다는 것을 보여 주고 있다. 그리고 세포의 핵으로 전달된 ESRRB는 줄기세포의 중요 인자로 알려진 OCT4와 NANOG의 발현을 상당히 증가시킬 뿐만 아니라 SOX2의 발현 또한 증가시키는 것으로 나타났다. 기존 연구에서 생쥐 Oct4 유전자의 전사 조절 부위에는 두 개의 Esrrb 결합 부위가 있어 Esrrb가 직접 결합을 하여 전사를 조절하는 것으로 밝혀졌으며(Zhang et al., 2008), Nanog 유전자의 전사 조절 부위에도 Esrrb와 Oct4/Sox2 결합 부위가 존재하는 것으로 밝혀진 바 있다(van den Berg et al., 2008). 이와 더불어, 본 연구의 결과에서는 ESRRB 단백질이 OCT4와 NANOG 유전자의 발현 조절뿐만 아니라 SOX2의 발현도 조절할 수 있다는 가능성을 보여주고 있다.

세포가 가지고 있는 속성은 유전자의 발현을 조절함으로써 변화시킬 수 있고, 원하는 방향으로 속성을 유도할 수도 있다. 실제로 유도 만능 줄기세포의 확립은 특정 유전자의 발현을 조절함으로써 세포의 속성이 변경된 대표적인 예가 될 수 있다. 이러한 기존의 연구 방법은 세포의 속성을 바꾸기 위해 외부에서 유전자를 도입하는 방법을 사용하였다. 하지만 외래 유전자의 genome 내에 도입은 효과적으로 속성의 변화를 유도할 수 있으나(Takahashi et al., 2006), 유전자 수준에서의 변형을 초래하여 영구적인 속성의 변성, 또는 돌연변이 유도와 같은 치명적인 결과를 초래할 수 있다는 것 또한 사실이다(O'Malley et al., 2009). 최근 연구에서는 이러한 문제점을 피하기 위해 genome의 변화가 아닌 small molecule, 단백질을 이용한 유도만능줄기세포의 확보가 시도되어지고 있으며, 그것의 일환으로 CPP를 이용한 단백질의 도입을 통해 한시적으로 세포의 속성을 변화시키고, 이를 통해 원하는 방향으로 세포를 유도하고자 하는 시도가 있어왔다(Kim et al., 2009; Zhou et al., 2009).

본 연구는 그러한 연구들의 연속선상에서 줄기세포 중요인자의 발현에 중요한 조절인자로 알려진 ESRRB를 CPP와 연결하여 세포내에 도입하였다. 결과적으로 본 연구에서 도입된 인간 ESRRB 단백질의 줄기세포 내 전달 시스템은 OCT4, NANOG 뿐만 아니라 SOX2의 발현을 조절할 수 있음을 확인하였고, 이러한 형태의 단백질 도입이 줄기세포의 전분화능이나 다분화능의 조절, 또는 미분화능의 유지에 영향을 미칠 수 있을 것을 추론할 수 있었다. 따라서 추후 연구를 통해 확보된 R7-ESRRB-His6 단백질의 단독 도입이나 타단백질과의 복합 도입을 이용한 세포 속성의 변화 조절을 확인하고자 한다.

감사의 글

이 논문은 2009년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 대학중점연구소 지원사업으로 수행된 연구(2009-0093821)입니다.

인용문헌

Bombail V, MacPherson S, Critchley HO, Saunders PT (2008) Estrogen receptor related beta is expressed in human endometrium throughout the normal menstrual cycle. Hum Reprod 23:2782-2790.

Chen X, Xu H, Yuan P, Fang F, Huss M, Vega VB, Wong E, Orlov YL, Zhang W, Jiang J, Loh YH, Yeo HC, Yeo ZX, Narang V, Govindarajan KR, Leong B, Shahab A, Ruan Y, Bourque G, Sung WK, Clarke ND, Wei CL, Ng HH (2008) Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. Cell 133:1106-1117.

Feng B, Jiang J, Kraus P, Ng JH, Heng JC, Chan YS, Yaw LP, Zhang W, Loh YH, Han J, Vega VB, Cacheux-Rataboul V, Lim B, Lufkin T, Ng HH (2009) Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. Nat Cell Biol 11 197-203.

Frankel AD, Pabo CO (1988) Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. Cell 55: 1189-1193.

Giguère V, Yang N, Segui P, Evans RM (1988) Identification of a new class of steroid hormone receptors. Nature 331:91-94.

Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, Kim KS (2009) Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. Cell Stem Cell 4:472-476.

Lee JE, Kang MS, Park MH, Shim SH, Yoon TK, Chung HM, Lee DR (2010) Evaluation of 28 human embryonic stem cell lines for use as unrelated donors in stem cell therapy : implications of HLA and ABO genotypes. Cell Transplant June 29 [Epub ahead of print]

O'Malley J, Woltjen K, Kaji K (2009) New strategies to generate induced pluripotent stem cells. Curr Opin Biotech. 20:1-6.

Onishi A, Peng GH, Poth EM, Lee DA, Chen J, Alexis U, de Melo J, Chen S, Blackshaw S (2010) The orphan nuclear hormone receptor ERRbeta controls rod photoreceptor survival. Proc Natl Acad Sci USA 107:11579-11584.

Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent

stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126:663-676.

van den Berg DL, Zhang W, Yates A, Engelen E, Takacs K, Bezstarosti K, Demmers J, Chambers I, Poot RA (2008) Estrogen-related receptor beta interacts with Oct4 to positively regulate Nanog gene expression. Mol Cell Biol 28:5986-5995.

Xie W, Hong H, Yang NN, Lin RJ, Simon CM, Stallcup MR, Evans RM (1999) Constitutive activation of transcription and binding of coactivator by estrogen-related receptors 1 and 2. Mol Endocrinol 13:2151-2162.

Yu S, Wong YC, Wang XH, Ling MT, Ng CF, Chen S, Chan FL (2008) Orphan nuclear receptor estrogen-related receptor-beta suppresses *in vitro* and *in vivo* growth of prostate cancer cells via p21 (WAF1/CIP1) induction and as a potential therapeutic target in prostate cancer. Oncogene 27:3313-3328.

Zhang X, Zhang J, Wang T, Esteban MA, Pei D (2008) Esrrb activates Oct4 transcription and sustains self-renewal and pluripotency in embryonic stem cells. J Biol Chem 283:35825-35833.

Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Scholer HR, Duan L, Ding S (2009) Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. Cell Stem Cell 4:381-384.

Zhou W, Liu Z, Wu J, Liu JH, Hyder SM, Antoniou E, Lubahn DB (2006) Identification and characterization of two novel splicing isoforms of human estrogen-related receptor beta. J Clin Endocrinol Metab 91:569-579.

(received 6 November 2010, received in revised form 30 November 2010, accepted 1 December 2010)