

## 생쥐의 수정란 배아줄기세포와 체세포핵이식 배아줄기세포에서 각인유전자, *H19*, *Igf2r*, *Snrpn*의 메틸화 경향

이민호<sup>1</sup> · 주진영<sup>2</sup> · 조윤희<sup>3</sup> · 심성한<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>차의과학대학교 강남차병원 유전학연구소, <sup>2</sup>독일 Max Planck 연구소, <sup>3</sup>한양대학교 의과대학 유전학연구소

### Methylation Patterns of Imprinting Genes, *H19*, *Igf2r*, and *Snrpn*, in Mouse Embryonic Stem Cells and Nuclear Transferred Embryonic Stem Cells

Min-Ho Lee<sup>1</sup>, Jin Young Ju<sup>2</sup>, Youl Hee Cho<sup>3</sup> and Sung Han Shim<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Genetics Laboratory, Fertility Center of CHA Gangnam Medical Center, CHA University, Seoul 135-081, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Cell and Developmental Biology, Max Planck Institute for Molecular Biomedicine, Germany

<sup>3</sup>Dept. of Medical Genetics, College of Medicine, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

**ABSTRACT** : DNA methylation is one of the major epigenetic regulations of gene expression. The DNA methylation patterns are dramatically changed during gametogenesis and embryogenesis, and especially, it has been known that embryonic stem cells show a distinct methylation pattern. In this study, we examined the methylation patterns of imprinting genes, *H19*, *Igf2r*, and *Snrpn*, in stem cells induced from fertilized embryo (fES) and somatic cell nuclear transferred embryo (ntES). The methylation pattern of *H19* gene in both fES and ntES were similar. However, the methylation patterns of *Igf2r* and *Snrpn* in ntES (hypermethylated) were slightly different from fES cells.

**Key words** : Imprinting genes, Methylation pattern, Embryonic stem cells.

**요 약** : DNA 메틸화 (DNA methylation)는 유전자의 발현을 조절하는 대표적인 후생학적 조절기작 (epigenetic regulation) 중에 하나이다. DNA 메틸화 양상은 생식세포 형성과정 및 배 발생단계에서 탈메틸화 (demethylation)와 *de novo* 메틸화의 드라 마틱한 변화가 일어난다. 또한 이러한 DNA 메틸화는 배아줄기세포 (embryonic stem cells, ESCs)에서 특징적인 양상을 보이는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 생쥐 수정란 유래 배아줄기세포와 체세포핵이식 배아줄기세포 (nuclear transplanted ESCs)를 이용해서 대표적 각인유전자 (imprinting genes)로 알려진 *Snrpn*, *Igf2r*, *H19* 유전자들에 대한 메틸화 양상을 알아보고자 하였다. 연구 결과 *H19* 유전자에 대해서는 DNA 메틸화 양상은 수정란 유래 배아줄기세포와 체세포핵이식 배아줄기세포에서 비슷한 경향을 보였으나, *Snrpn*과 *Igf2r*의 경우에는 체세포핵이식 배아줄기세포에서 과메틸화 (hypermethylation) 경향을 보였다.

## 서 론

후생학적 유전자 조절(Epigenetic gene regulation)은 일반적으로 DNA의 염기서열 자체에는 변화가 발생하지 않으면서 유전자 발현이 조절되는 것을 말하며, 크게 세 가지 방법 - DNA 메틸화, histone 단백질의 화학적 변형, 그리고 small non-coding RNAs - 에 의해서 일어나는 것으로 알려져 있다(Goldberg et al., 2007)). 이중 DNA 메틸화는 유전체의 CpG dinucleotides

부위에서 Cytosine 5탄당의 5번 탄소에 메틸기(-CH<sub>3</sub>)가 결합하는 것으로, 유전체에서 과메틸화 된 부위의 유전자 발현을 억제시키는 것으로 알려져 있다(Goll & Bestor, 2005). DNA 메틸화는 몇 개의 DNA methyltransferase 들에 의해서 수행되며, DNMT1은 DNA 이중 나선의 주형 가닥에 있는 메틸화를 인식해서 새롭게 합성된 가닥이 메틸화되도록 하며, DNMT3a와 DNMT3b는 *de novo* 메틸화에 관여하는 것으로 알려져 있다(Bestor, 2000).

포유류에서 DNA 메틸화는 특정 발생 단계 또는 조직특이적인 유전자 발현, 세포의 분화, 유전체 각인(genomic imprinting), 암컷에서 X 염색체의 불활성화(X inactivation) 등 다양한 세

\* 교신저자: 서울시 강남구 역삼1동 606-13, 차의과학대학교 강남차병원 유전학연구소. (우) 135-081, (전) 02-3468-3443, (팩) 02-3468-3464, E-mail: shshim@cha.ac.kr

포 기능과 관련되어 있다(Bird A, 2002). DNA 메틸화 양상은 발생 단계에서 역동적인 변화를 보이고 매우 정교하게 조절되며, 정확한 메틸화의 확립 및 유지는 포유류의 정상적인 배아 발달에 있어서 매우 중요하다.

DNA 메틸화 양상에 대한 연구는 각인유전자(imprinting genes)들을 대상으로 많이 이루어져 왔는데, 각인유전자란 유전자의 두 대립인자가 부계 또는 모계 기원에 따라 서로 상이하게 메틸화가 됨으로써, 세포에서 부계 또는 모계 대립인자만이 발현되는 유전자들로 사람과 생쥐에서 *Snrpn*, *H19*, *Igf2r*를 포함한 약 80여 개의 유전자들이 알려져 있다(Morison et al., 2005). 체세포에서 *Snrpn*은 모계 각인되어 있으며, 부계 유전자만이 발현되며, *Igf2r*과 *H19*은 부계 각인되어 모계 유전자만이 발현한다. 이들 유전자들에서 비정상적인 메틸화 또는 탈메틸화에 의한 각인의 변화는 개체 발달에 영향을 미쳐 질환을 유발한다.

생쥐의 정자와 성숙한 난자에서 *Snrpn*, *H19*, *Igf2r* 유전자들의 메틸화 경향을 분석한 결과에 의하면, 정자에서는 *Snrpn*, *Igf2r* 유전자는 완전 탈메틸화 경향을 보이고, 난자에서는 완전 메틸화되어 있으며, *H19* 유전자에 대해서는 반대로 정자에서는 완전 메틸화 경향을, 성숙한 난자에서는 완전 탈메틸화 경향을 보였으며, 성숙한 난자에서 *Snrpn* 유전자의 메틸화는 출생 직후 난자 생성 과정에서 완전 탈메틸화 상태에서 완전 메틸화 상태로 급격한 변화가 일어난다는 것을 제시하였다(Lucifero et al., 2002). 한편, 수정란 배아줄기세포에서는 세 유전자 모두에서 약 50%의 메틸화를 보였으며, 단성 생식(pathenogenetic)에 의해서 만들어진 배아줄기세포에서는 *H19*, *Igf2r* 유전자는 거의 탈메틸화 되어 있는데 반해서 *Snrpn* 유전자에서는 약 60% 정도의 메틸화 경향을 보이는 것으로 보고되고 있다(Li et al., 2009). 이상에서 살펴본 바와 같이 DNA 메틸화는 세포의 단계 및 기원에 따라서 상이하게 나타남을 알 수 있다.

본 연구에서는 생쥐의 생식세포들과 초기배아 수정란 배아줄기세포, 체세포핵이식 배아줄기세포에서 *Snrpn*, *H19*, *Igf2r* 유전자들의 메틸화 경향을 분석함으로써, 메틸화 경향의 변화 양상을 알아보고, 특히 체세포핵이식 배아줄기세포와 수정란 배아줄기세포 사이에 메틸화 경향의 차이가 있는지를 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 생식세포 및 수정란 시료 획득

생쥐의 생식세포 및 수정란은 Ju et al.(2008)의 방법으로 획득

하였다. 난자는 생후 6주 이상의 F<sub>1</sub> hybrid인 129B6JF1(C57BL/6J Cr Slc×129×SvJ Jms Slc) 암컷 생쥐에서 채취하였다. 5 IU PMSG(pregnant mare serum gonadotropin, Sigma)를 투여한 다음 2일 후에 5 IU hCG(human chorionic gonadotropin, Follimon)를 투여하여 과배란(super-ovulation)을 유도하였다. 13~14시간이 지난 후 난관(oviduct)에서 난구세포-난자 복합체(cumulus-oocyte complex: COCs)를 분리한 다음 0.1% (w/v) bovine testicular hyaluronidase(300 USP units/mg)가 포함된 M2 media에 2~3분 동안 처리하여 난구세포-난자 복합체로부터 난자를 분리하였다(Ju et al., 2008). 정자는 수컷 생쥐의 정관을 관류(flushing)하여 획득하였다.

수정란은 생후 6주 이상의 C57BL/6J Cr Slc 암컷과 129SvJ Jms Slc 수컷의 생쥐를 교배시켜 얻었다. 교배 후 암컷 생쥐의 plug를 확인한 다음 임신한 생쥐를 격리시켜 사육하였다. Plug가 확인된 날을 0.5 days post coitum(dpc)라 하며, 0.5 dpc를 기준으로 1일 후(1.5 dpc)에 임신한 암컷 생쥐의 난관을 적출하였다. 적출된 난관을 관류하여 2세포기의 수정란을 획득하였다. 2세포기의 수정란은 G1.3(Vitrolife, Gothenburg, Sweden) 배양액에서 2세포 막음(2-cell block)을 지나 4세포기가 될 때까지 약 2일간 배양하였다. 4세포기가 되면 G2.3(Vitrolife, Gothenburg, Sweden) 배양액으로 교체하여 포배(blastocyst) 단계까지 배양하였다.

### 2. 수정란 배아줄기세포 및 체세포핵이식 배아줄기세포

F<sub>1</sub> hybrid인 129B6JF1(C57BL/6 x 129P3/J)의 배아로부터 수정란 배아줄기세포주를 확립하였으며, 체세포핵이식 배아줄기세포주는 Ju et al.(2008)이 확립한 세포주를 이용하였다. 체세포핵이식 배아줄기세포는 수정란 배아줄기세포와 동일한 유전적 배경을 가지고 있으며, 세포주 확립 과정에서 수정란 유래 배아줄기세포에 비해서 매우 낮은 발생률을 보였으나, 일단 확립된 세포주는 일반적인 방법으로 만들어진 배아줄기세포주와 동일한 능력을 가지는 것으로 보고되었다(Ju et al., 2008). 두 줄기세포는 미분화 상태의 세포이므로 이를 유지하기 위해서 지지세포(feeder cell)인 mitomycin C(Sigma-Aldrich)가 처리된 STO 세포와 함께 1,000 units/ml LIF(leukemia inhibitory factor ESGRO<sup>®</sup>; Chemicon, Temecula, CA)가 포함된 DMEM F/12 배양액에서 공배양(co-culture)하였다. DNA 추출을 위해 STO 세포와 줄기세포들간의 부착 차이를 이용하여 순수한 줄기세포만을 획득하여 수집하였다.

획득된 세포에서 RNA를 추출하여 *Oct4*와 *Nanog*의 발현

을 확인하였고, 표면 단백질의 발현 양상을 확인하기 위하여, alkaline phosphatase 염색과 줄기세포 표지들인 Oct-4와 SSEA-1 항체를 이용한 면역조직화학법으로 세포가 줄기세포 특성을 가진 것을 확인하였다.

### 3. Genomic DNA 추출과 Bisulfite 변환과 정제

대조군으로 C57BL/6J Cr Slc와 129SvJ Jms Slc 각 암수 한 마리의 꼬리에서 genomic DNA를 추출하여 사용하였다. 대조군, 정자, 난자, 2세포 배아, 포배기 그리고 줄기세포로부터 D Neasy Tissue Kit(Qiagen GmbH, German)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 genomic DNA를 추출하였으며, Ultraspec 1000(Amersham Pharmacia Biotech, England)을 이용하여 정량하였다.

메틸화 특성을 분석하기 위해서 EpiTect Bisulfite Kit(Qiagen GmbH, German)를 사용하여 2  $\mu$ g의 genomic DNA를 bisulfite 처리하였다. Bisulfite를 처리할 경우 메틸화되어 있지 않은 cytosine을 uracil로 변환되며, 메틸화되어 있는 부분은 변환이 일어나지 않는다. Bisulfite 처리된 DNA는 정제하여 사용하였다(Benanti et al., 2007).

### 4. 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR) 및 염기서열 분석

Bisulfite 처리된 genomic DNA로부터 각인유전자인 *H19*, *Igf2r*, *Snrpn* 유전자를 PCR 방법으로 증폭하였다. 각 유전자의 증폭을 위해서 사용한 primer의 염기서열, annealing 온도 및 반응산물의 크기를 Table 1에 나타내었다(Leakey et al., 2008). *Snrpn* 유전자는 outer primer set를 사용해서 1차 증폭한 후, 1차 증폭된 산물을 주형으로 inner primer set를 사용하여 2차 증폭을 시행하였다(Lucifero et al., 2002). PCR 반응 조건은

Bisulfite 처리된 DNA 2  $\mu$ l, 10 $\times$  PCR buffer 3  $\mu$ l, 각 2.5 mM dNTP mixture(TaKaRa, Japan) 1.2  $\mu$ l(100 uM), 각 primer(10 pmol) 0.3  $\mu$ l, Taq polymerase 0.3  $\mu$ l(1.25U)(Biotools Spain), Nuclease free water 22.9  $\mu$ l를 혼합해서 94 $^{\circ}$ C 4분, 59 $^{\circ}$ C 2분, 72 $^{\circ}$ C 2분씩 2회 반복하고, 이후 94 $^{\circ}$ C 1분, 59 $^{\circ}$ C 2분, 72 $^{\circ}$ C 2분씩 35회 반복하였다. PCR 산물은 2% agarose gel에서 확인하였으며, gel 상에서 원하는 band 부위만을 QIAEX2 Gel Extraction Kit(Qiagen GmbH, German)를 이용해서 정제하였다.

Bisulfite 처리에 의해서 uracil로 변형된 cytosine과 변형되지 않은 methyl-cytosine은 염기서열 분석(sequencing analysis)을 통해서 쉽게 구별할 수 있다. 각 유전자에 대해 증폭된 PCR 산물은 ExoSAP-IT purification Kit(USB, USA)를 사용하여 정제하고, 정제된 PCR 산물을 Big Dye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems, USA)를 이용해서 제조사의 방법에 따라 직접염기서열 분석 반응을 시행하였다. Sequencing reaction 산물은 125 mM EDTA와 100% 에탄올로 침전시킨 다음 10  $\mu$ l Hi-Di formamide를 넣고 denature 시켰다. 준비된 시료는 ABI PRISM 3100 자동 유전자 분석 장비(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 분석하였다(Bell, 2008).

## 결 과

### 1. 줄기세포 특성 확인

실험에 사용된 수정란 배아줄기세포와 체세포핵이식 배아줄기세포의 미분화 줄기세포 특성을 확인하기 위해서 Alkaline phosphatase(AP) 염색, 줄기세포 표지들인 Oct-4와 SSEA-1 항체를 이용한 면역조직화학법, Oct4와 Nanog의 발현 여부를 확인하였다. 본 연구에 사용된 수정란 배아줄기세포와 체세포핵이식

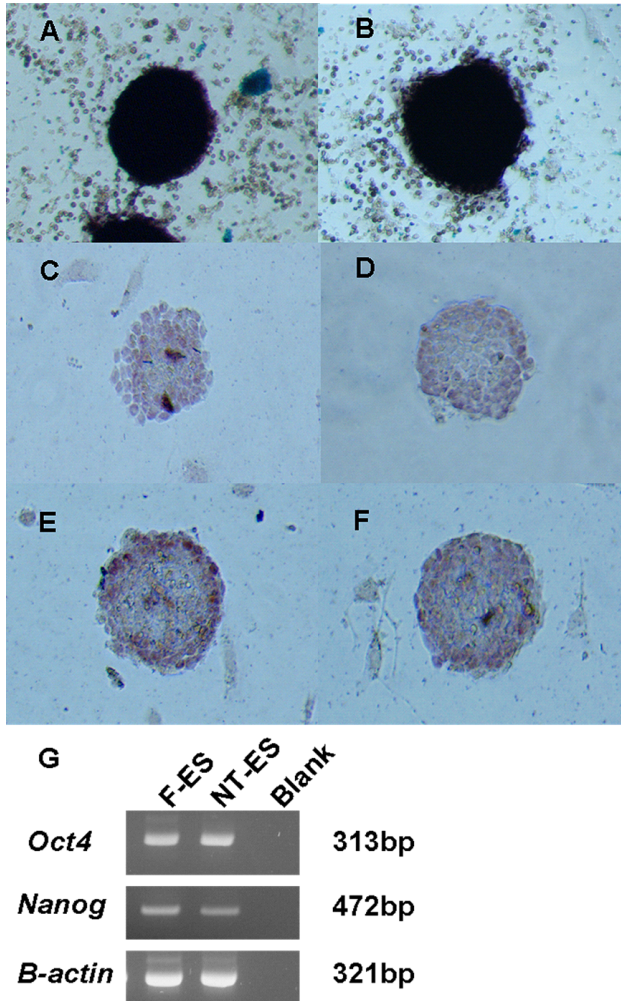
Table 1. Details of primers for *H19*, *Igf2r*, and *Snrpn*

Gene	Primer sequences (5'→3')	Product size	Annealing Tm (°C)
<i>H19</i>	F: GAGTATTTAGGAGGTATAAGAATT R: ATCAAAAACATAACATAAACCCCT	472	59
<i>Igf2r</i>	F: TTAGTGGGGTATTTTTATTTGTATGG R: AAATATCCTAAAAATACAACTACAC	235	59
<i>Snrpn</i> <Outer>	F:TATGTAATATGATATAGTTTAGAAATTAGT R: AATAAACCCAAATCTAAAATATTTTAATC	531	59
<i>Snrpn</i> <Inner>	F: AATTTGTGTTATGTTTGAATTATTTGG R: TAAAATACACTTTCCTACTAAAATCC	420	

배아줄기세포 모두 강한 AP 염색 결과를 얻을 수 있었으며, 또한 Oct4, SSEA-1, Nanog의 발현을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

### 2. 각인유전자들의 메틸화 양상 분석

각 유전자들에 대해서 암컷과 수컷 생쥐, 정자, 난자, 2세포, 포배기(blastocyst), 수정란 배아줄기세포 및 체세포핵이

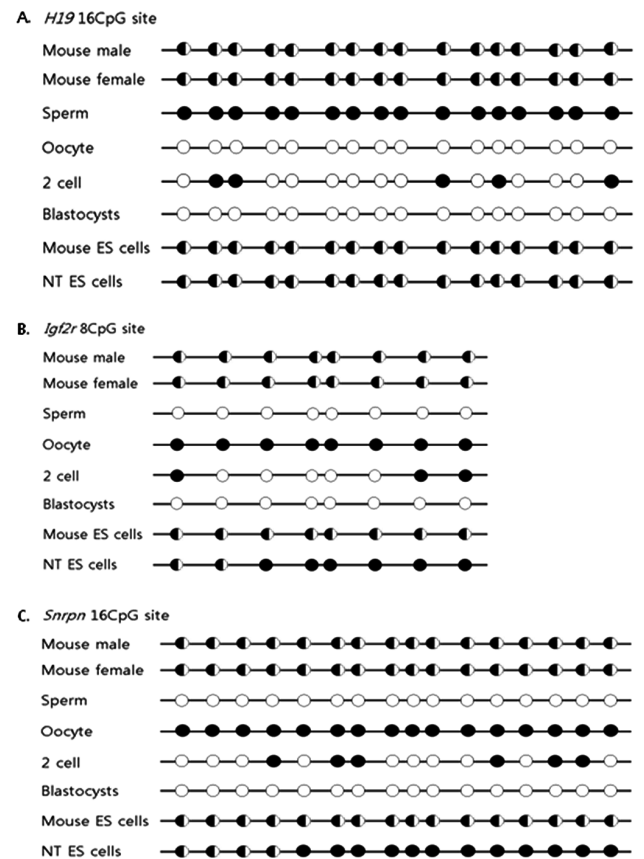


**Fig. 1.** Characterization of embryonic stem cells and nuclear transferred embryonic stem cells. Both fertilized ES cells and NT-ES cells showed strong alkaline phosphatase activity (A, B), Expression of stem cell markers, Oct-4 (C, D) and SSEA-1 (E, F), were detected by immunohistochemistry. And *Oct-4* and another stem cell marker, *Nanog* expression were also identified by RT-PCR (G). These results represented that the cells were stem cells with undifferentiated state (F-ES, A, C, E : Fertilized ES cells, NT-ES, B, D, F : Nuclear transfer ES cells).

식 배아줄기세포에서 메틸화 양상을 분석하였다.

### 3. *H19* Gene

*H19* 유전자의 PCR 산물 내에는 총 16개의 CpG 부위들이 있으며, 암컷과 수컷 생쥐에서는 모든 부위에서 메틸화와 탈메틸화가 혼재되어 나타났으며, 수정란 배아줄기세포와 체세포핵이식 배아줄기세포에서도 동일한 양상을 보였다. 정자에서는 모든 부위에서 완전 메틸화 경향을 보인 반면, 난자에서는 반대로 모든 부위에서 탈메틸화 경향을 보였다. 또한 2세포기에서는 완전 메틸화와 완전 탈메틸화 된 부위가 혼재되어 있었으며, 포배기에서는 모든 부위에서 탈메틸화 되어 있었다(Fig. 2A).



**Fig. 2.** Methylation patterns of imprinting genes, *H19* (A), *Igf2r* (B), and *Snrpn* (C) in male and female somatic cells, germ cells (sperm and oocyte), 2-cell embryos, embryonic stem cells and nuclear transferred embryonic stem cells. The methylation patterns of *Igf2r* and *Snrpn* were slightly different between ES cells and NT-ES cells (Filled circle: fully methylation, Semi filled circle: semi methylation, Open circle: demethylation).

#### 4. *Igf2r* Gene

*Igf2r* 유전자의 PCR 산물 내에는 총 8개의 CpG 부위들이 있으며, *H19*과 반대로 난자에서 모든 부위가 완전 메틸화되어 있고 정자에서는 완전 탈메틸화되어 있는 것으로 확인되었다. 또한 수정란 배아줄기세포는 모든 부위에서 메틸화와 탈메틸화가 혼재되어 있는데 비해서 체세포핵이식 배아줄기세포에서는 대부분의 부위(6/8)에서 완전 메틸화 된 것을 확인할 수 있었다. 성체 생쥐와 2세포기 포배기에서의 메틸화 경향은 *H19*과 유사하였다(Fig. 2B).

#### 5. *Snrpn* Gene

*Snrpn* 유전자의 promoter 부위를 증폭한 PCR 산물 내 총 16개의 CpGs 부위를 분석한 결과, 성체 체세포와 2 세포기, 포배기에서는 *H19*과 *Igf2r*에서 보였던 것과 같은 메틸화 양상을 보였으며, 생식세포들에서 메틸화 양상은 *Igf2r*과 동일하였다. 또한 수정란 배아줄기세포와 체세포핵이식 배아줄기세포에서의 메틸화 경향도 *Igf2r*과 같은 양상으로 나타났다(Fig. 2C).

## 고 찰

본 연구를 통해서 각 각인유전자들의 메틸화 양상이 세포의 기원 및 시기에 따라서 차이가 남을 확인할 수 있었다. 생식세포에서 각인유전자들의 메틸화 양상은 앞선 기존의 연구 결과와 일치하였다. 즉, 생식세포에서 각 각인유전자는 완전 메틸화되어 있거나 - 정자에서 *H19*, 난자에서 *Igf2r*과 *Snrpn* - 혹은 완전 탈메틸화 된 상태 - 정자에서 *Igf2r*과 *Snrpn*과 난자에서 *H19* - 를 보여주고 있다(Lucifero et al., 2002). 이는 생식세포가 반수체(haploid) genome으로 구성되어 있기 때문에 메틸화 혹은 탈메틸화의 한쪽 만을 나타내는 것으로 생각할 수 있다. 하지만 이러한 메틸화 경향이 체세포에서 부계 혹은 모계 각인을 나타내는 것은 아닌 것 같다. *Igf2r* 유전자는 체세포에서 부계 각인으로 모계 대립인자만이 발현하는 것으로 알려져 있으나(Yamasaki et al., 2005), 생식세포에서 메틸화 양상은 반대로 난자에서 완전 메틸화 현상을 나타내고, 정자에서 완전 탈메틸화 현상을 보이고 있다. 따라서 체세포에서 각인유전자의 메틸화 양상은 생식세포 단계에서의 메틸화 양상과 관계없이 수정 후에 reprogramming 과정을 거쳐 확립된다는 것을 나타낸다. 본 연구 결과에서도 보여주는 바와 같이, 수정 후 2-세포기에서 포배기에 이르는 동안 광범위한 탈메틸화가 일어나는 것을 알 수 있으며, 이 후 재메틸화 되는 과정에서 부계 혹은

모계각인이 확립된다는 것을 나타낸다. 본 연구에서 살펴본 각인유전자들 이외에 *Dnmt1* 유전자에 대한 메틸화 경향 분석에서도 이와 유사한 결과를 나타내는데, 수정 직후 탈메틸화 과정을 거치고 inner cell mass가 형성되는 시기에 다시 재메틸화 되는 경향을 보여주고 있다(Ko et al., 2005).

본 연구에서 수정란 유래 배아줄기세포에서 각인유전자들에 대한 메틸화 양상은 체세포에서의 메틸화 경향과 차이가 없음을 보여주고 있는데, 이것은 기존의 연구 결과와도 일치하는 것이다(Reik et al., 2007; Li et al., 2009). 하지만 체세포핵이식 배아줄기세포의 경우에는 *Igf2r*와 *Snrpn* 유전자에서 수정란 배아줄기세포와는 조금 다른 메틸화 양상(과메틸화)을 보여주고 있다. 분화된 체세포의 핵은 각인유전자에 대해서 부계 혹은 모계 각인이 이미 확립되어 있으며, 이러한 핵을 이식해서 만든 배아줄기세포가 일반적인 수정란 배아줄기세포와 동일한 능력을 갖기 위해서는 특별한 reprogramming 과정이 필수적이다. 본 연구 결과에서 나타난 메틸화의 차이가 줄기세포주의 기원이 다름으로 인한 reprogramming 과정의 차이에서 비롯된 것으로 생각할 수 있다. 일반적으로 체세포핵이식을 통해 만들어진 배아의 경우, 이식 후 초기 유산의 비율이 증가한다고 알려져 있으며, 출산 후 초기 사망이 발생하는 경우 같은 비정상적인 증상이 나타나는 것으로 알려져 있다. 이러한 이유는 후생학적으로 유전적 특성이 남아있는 체세포의 핵과 탈핵된 난자의 세포질 사이에서 불완전한 reprogramming에 의한 것으로 생각되며, 이로 인한 각인유전자의 비정상적인 발현 양상을 유도하기 때문에, 체세포핵이식 배아줄기세포와 수정란 배아줄기세포에서 메틸화 양상의 차이가 발생하는 것으로 생각되어지고 있다(Dean et al., 2001; Wee et al., 2007; Chang et al., 2009).

최근에 분화된 체세포에 배아줄기세포로 유도하는 인자를 넣어줌으로써 만들어진 유도 만능줄기세포(induced pluripotent stem cells, iPS cells)에서 Oct-4 유전자 promoter 부위의 메틸화 양상을 분석한 결과, 세포에 따라서 차이를 보이는데 Oct-4 promoter 부위에서 낮은 메틸화를 보일 경우 수정란 배아줄기세포와 비슷한 능력을 보이는 것으로 보고되었다(Okita et al., 2007; Wernig et al., 2007). iPS 세포들 사이에서 메틸화 양상의 차이로 인한 줄기세포 능력의 차이를 보이는 것은 체세포핵이식 배아줄기세포와 마찬가지로 reprogramming 과정에서의 문제에 의한 것으로 생각된다.

또한 DNA 메틸화 과정은 외부적인 요인에 의해서도 영향을 받는데, 수정란의 초기발생 과정에서 *in vivo* 상태와 *in vitro*

상태에서 서로 차이를 보인다. 배아줄기세포에서 후생학적 상태는 장기간의 *in vitro* 배양 과정에서 변하게 되며, 이것은 배아줄기세포의 분화능이나 유전적 안정성에 좋지 않은 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다(Humphrey et al., 2001; rug-Gunn et al., 2005). 따라서 DNA 메틸화를 포함한 후생학적 조절 기전이 적절하게 이루어질 수 있는 배양 환경을 유지하는 것이 좋은 배아줄기를 얻는데 필수적이다(Li et al., 2009).

결론적으로, 생식세포에서는 각기 다른 메틸화 양상을 갖고 있던 정자와 난자가 만나서 수정이 되며, 생식세포가 갖고 있던 유전적 특징들은 새롭게 재해석되어 새로운 메틸화 양상을 갖게 되는데, 초기 배아에서는 수정과 동시에 점차적인 탈메틸화가 시작되고, 포배기에 이르면 모두 탈메틸화 된다. 그리고 수정란 배아줄기세포는 일반적인 체세포와 동일한 메틸화 양상을 나타내지만, 체세포핵이식 배아줄기세포는 불완전한 re-programming으로 인하여, 수정란 배아줄기세포와 다른 메틸화 양상을 나타내는 것으로 생각할 수 있다. 본 연구 결과, 단 하나의 체세포핵이식 배아줄기세포주만을 분석한 것으로써, 일반적인 genomic DNA의 reprogramming 경향을 설명하는 데는 부족함이 있다. 또한 체세포핵이식 배아줄기세포주에서 이러한 불완전한 reprogramming이 배발달과 분화에 미치는 영향 및 유전적 안정성에 미치는 영향 등에 대해서는 보다 광범위하고 심도 있는 연구를 통해서 규명되어야 할 것이다.

## 감사의 글

이 논문은 2006년도 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구(KRF-2006-E00015)입니다.

## 인용문헌

- Bell J (2008) A simple way to treat PCR products prior to sequencing using ExoSAP-IT. *Biotechniques* 44:834.
- Benanti JA, Wang ML, Myers HE, Robinson KL, Grandori C, Galloway DA (2007) Epigenetic down-regulation of ARF expression is a selection step in immortalization of human fibroblasts by c-Myc. *Mol Cancer Res* 5:1181-1190.
- Bestor TH (2000) The DNA methyltransferases in mammals. *Hum Mol Genet* 9(16):2395-2402.
- Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16:6-21.
- Chang G, Liu S, Wang F, Zhang Y, Kou Z, Chen D, Gao S (2009) Differential methylation status of imprinted genes in nuclear transfer derived ES (NT-ES) cells. *Genomics* 93:112-119.
- 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.
- Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E (2007) Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 128:635-638.
- Goll MG, Bestor TH (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 74:481-514.
- Humphrey D, Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, Rideout WM III, Biniszkiwicz D, Yanagimachi R, Jaenisch R (2001) Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science* 293:95-97.
- Ju JY, Park CY, Gupta MK, Uhm SJ, Paik EC, Ryoo ZY, Cho YH, Chung KS, Lee HT (2008) Establishment of stem cell lines from nuclear transferred and parthenogenetically activated mouse oocytes for therapeutic cloning. *Fertil Steril* 89(5 Suppl):1314-1323.
- 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(10):9627-9634.
- Leakey TI, Zielinski J, Siegfried RN, Siegel ER, Fan CY, Cooney CA (2008) A simple algorithm for quantifying DNA methylation levels on multiple independent CpG sites in bisulfite genomic sequencing electropherograms. *Nucleic Acids Res* 36:e64.
- Li C, Chen Z, Liu Z, Huang J, Zhang W, Zhou L, Keefe DL, Liu L (2009) Correlation of expression and methylation of imprinted genes with pluripotency of parthenogenetic embryonic stem cells. *Hum Mol Genet* 18:2177-2187.
- Lucifero D, Mertineit C, Clarke HJ, Bestor TH, Trasler JM (2002) Methylation dynamics of imprinted genes in mouse germ cells. *Genomics* 79:530-538.
- Morison IM, Ramsay JP, Spencer HG (2005) A census of

- mammalian imprinting. *Trends Genet* 21:457-465.
- Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S (2007) Generation of germ-line-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448(7151):313-317.
- Reik W (2007) Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 447(7143):425-432.
- Rugg-Gunn PJ, Ferguson-Smith AC, Pedersen RA (2005) Epigenetic status of human embryonic stem cells. *Nat Genet* 37:585-587.
- Wee G, Shim JJ, Koo DB, Chae JI, Lee KK, Han YM (2007) Epigenetic alteration of the donor cells does not recapitulate the reprogramming of DNA methylation in cloned embryos. *Reproduction* 134:781-787.
- Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE, Jaenisch R (2007) *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell like state. *Nature* 448:318-324.
- Yamasaki Y, Kayashima T, Soejima H, Kinoshita A, Yoshiura K, Matsumoto N, Ohta T, Urano T, Masuzaki H, Ishimaru T, Mukai T, Niikawa N, Kishino T (2005) Neuron-specific relaxation of *Igf2r* imprinting is associated with neuron-specific histone modifications and lack of its antisense transcript *Air*. *Hum Mol Genet* 14:2511-2520.

---

(received 14 November 2010, received in revised form 10 December 2010, accepted 11 December 2010)