

돼지 체세포 복제란 초기발달 과정 중 Dnmt1o 상류 영역의 다이내믹한 DNA 메틸화 변화

고응규[†] · 김성우 · 조상래 · 도운정 · 김재환 · 김상우 · 김현 · 박재홍 · 박수봉

농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장

Dynamic DNA Methylation Change of Dnmt1o 5'-Terminal Region during Preimplantation Development of Cloned Pig

Yeoung-Gyu Ko[†], Sung-woo Kim, Sang-Rae Cho, Yoon-Jung Do, Jae-Hwan Kim, Sang-Woo Kim, Hyun Kim, Jae-Hong Park and Soo-Bong Park

National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea

ABSTRACT

DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) gene contains three different isoform transcripts, Dnmt1s, Dnmt1o, and Dnmt1p, are produced by alternative usage of multiple first exons. Dnmt1o is specific to oocytes and preimplantation embryos, whereas Dnmt1s is expressed in somatic cells. Here we determined that porcine Dnmt1o gene had differentially methylated regions (DMRs) in 5'-flanking region, while those were not found in the Dnmt1s promoter region. The methylation patterns of the porcine Dnmt1o/Dnmt1s DMRs were investigated using bisulfite sequencing and pyrosequencing analysis through all preimplantation stages from one cell to blastocyst stage in *in vivo* or somatic cell nuclear transfer (SCNT). The Dnmt1o DMRs contained 8 CpG sites, which located in -640 bp to -30 bp upstream region from transcription start site of the Dnmt1o gene. The methylation status of 5 CpGs within the Dnmt1o DMRs were distinctively different at each stage from one-cell to blastocyst stage in the *in vivo* or SCNT, respectively. 55.62% methylation degree of the Dnmt1o DMRs in the *in vivo* was increased up to 84.38% in the SCNT embryo, moreover, *de novo* methylation and demethylation occurred during development of porcine embryos from the one-cell stage to the blastocyst stage. However, the DNA methylation states at CpG sites in the Dnmt1s promoter regions were hypomethylated, and dramatically not changed through one-cell to blastocyst stage in the *in vivo* or SCNT embryos. In the present study, we demonstrated that the DMRs in the promoter region of the porcine Dnmt1o was well conserved, contributing to establishment and maintenance of genome-wide patterns of DNA methylation in early embryonic development.

(Key words : Porcine DNA methyltransferase 1o/1s, DNA methylation, Differentially methylated region (DMR), Somatic cell nuclear transfer (SCNT))

서 론

하나의 개체 내에는 다양하게 분화한 체세포, 미분화한 간세포, 이상이 있는 암세포 등은 기본적으로 동일한 게놈을 갖고 있지만, 유전자 발현 패턴이 다르고, 그 형태나 기능은 놀라울 정도로 다르다. 발생의 과정을 보면 수정란이 분화 증식하는 것으로 다양한 세포·조직·기관 그리고 개체를 형성하고, 개체는 시간이 지남에 성장하고 노화하고 때로는 암과 같은 질환이 된다. 이것은 같은 게놈을 갖는 세포가 후성학적 변화하는 생명현상이다. 이러한 후성학적 정보 중 DNA 메틸화는 chromatin의 re-

modeling에 관여하고, 유전자의 silencing·안정화 등 후성학적 조절기구로서 중요하다. 포유류의 몸을 구성하는 다양한 조직과 세포는 각각 고유의 DNA 메틸화 패턴을 형성하고 있고, 개체발생·세포의 분화에 DNA 메틸화가 중요한 역할을 하고 있다(Shiota 등, 2002). 복제동물은 epigenetic 관점에서 세포의 분화나 게놈유전자 발현조절 기구를 명확히 할 수 있는 중요한 생물이나 복제동물은 체세포복제에 따른 DNA 메틸화에 따른 후성학적 리프로그래밍 이상이 있고(Ohgane 등, 2001; Kremenskoy 등, 2006), 이들 불완전한 리프로그래밍은 배반포 형성 및 임신 실패의 원인이 된다(Shi 등, 2002). 어쨌든 이들 리프로그래밍은 특정 genome 영역에서 다양한 메커니즘에 의해 독립적

[†] Corresponding author : Phone: +82-63-620-3535, E-mail: kog4556@korea.kr

으로 일어나고(Kim 등, 2004), DNA 메틸화는 초기 배 발달 과정의 정상적인 발달과 프로그램된 유전자 발현에 중요하다.

포유동물에서 밝혀진 DNA 메틸화 효소들은 Dnmt1, Dnmt2, Dnmt3a, Dnmt3b, Dnmt3l로 5개로 구성되어 있고, 세포분열 중 메틸화의 유지, 탈 메틸화, 신규메틸화 기능을 갖고 있으며, 이들 Dnmt family 분자가 복잡하게 협조해 가면서 genome DNA상의 메틸화를 형성하고 있다(Bestor, 2000; Chen and Li, 2004). 특히, Dnmt1은 체세포에서 폭넓게 발현하고 세포복제 동안 핵내 위치하고, 난세포에 메틸화의 유지기능을 갖고 있으며, 마우스에서 Dnmt1의 Knockout 경우 X-chromosome inactivation, 각 인유전자의 심각한 손상시키며, 배 발달 중 임신중기에 배 사망에 이른다(Li 등, 1992). Dnmt1은 마우스의 경우 exon1의 구분에 따라 난모세포 특이적으로 발현하는 Dnmt1o, Pachytene기 정모세포 특이적인 Dnmt1p, 그리고 체세포에서 폭넓게 보이는 Dnmt1s의 3종류의 isoform이 존재한다(Mertineit 등, 1998). Dnmt1p의 전사산물은 정모세포에서 다량 존재하지만, 단백질은 존재하지 않으나, Dnmt1o의 경우는 난자형성과 착상 전 수정란 발달 과정에 고 발현되고, 그 단백질의 분자량은 Dnmt1s의 190 kD보다 N-terminal 118개 아미노산이 짧은 175 kD의 분자량으로 발현된다(Mertineit 등, 1998). 최근에 마우스뿐만 아니라 돼지 수정란에서 Dnmt1o 전사산물과 단백질이 동정되어 그것의 존재와 기능이 제시되었다(Jeong 등, 2009).

본 연구는 복제란 및 체내수정란 1-cell에서 배반포까지의 초기 발달 과정에서 난모세포 특이적으로 발현하는 Dnmt1o와 체세포 특이적인 Dnmt1s 발현을 조절하는 메틸화 가변영역으로 추정되는 DMR(differentially methylated region) 영역의 DNA 메틸화 변화양상을 bisulfite sequencing 및 pyrosequencing 방법으로 상세히 분석하였다.

재료 및 방법

난자의 회수와 체외성숙

별도의 표기가 없는 한 본 실험에 사용된 시약은 Sigma사(St. Louis, Mo, USA) 제품을 사용하였고, 실험에 사용된 동물 관리 및 절차는 국립축산과학원 동물복지위원회(Suwon, Korea)의 승인을 얻었다. 난자는 도축장에서 도축된 돼지의 난소에서 10 ml 주사기에 18G 주사침을 이용하여 직경 3~6 mm 난포로부터 채취하였다. 채취된 난자는 실험현미경하에서 난구세포가 치밀하게 부착되고, 세포질이 균일한 것만을 선별하여 체외성숙에 공시하였다. 체외성숙에 사용된 배양액은 0.1% (w/v) polyvinyl alcohol(PVA), 3.05 mM D-glucose, 0.91 mM sodium pyruvate, 0.57 mM cysteine, 38.5°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 40시간 동안 체외성숙을 실시하였다.

Donor Cell의 준비

핵 이식에 사용된 체세포는 8개월령 랜드레이스 돼지 귀에서 생체조직 절편으로부터 채취되었고, 15% (v/v)

FBS와 75 ug/ml antibiotics가 함유된 DMEM (Gibo-BRL, Grand Island, NY, USA)으로 배양하였다. 세포는 3~4회 계대배양 후 10% dimethylsulfoxide가 함유된 DMEM에 동결보존 후 용해 공여세포로 핵 이식에 사용하였다.

체세포 복제란의 생산

성숙된 난자는 4분간 0.1% (w/v) PVA와 0.1% (w/v) hyaluronidase가 포함된 PBS에서 vortexing에 의해 준비되었다. 색조가 균일하고 제 1극체가 확인된 난자만을 선별하여 제 1극체와 주변의 세포질을 약 1/3 정도 흡입하여 제 2 감수분열 중기 염색체를 제거하는 방법으로 탈핵을 시도하였다. 모든 micromanipulation 과정은 3 mg/ml BSA와 5 ug/ml cytochalasin B가 포함된 TCM-199에서 실시하였다. 난자들은 39°C에서 15분 동안 10 ug/ml의 Hoechst33342의 염색으로 제핵이 확인되었다. 제핵 후 난자들은 donor cell의 핵 이식까지 3 mg/ml BSA가 포함된 TCM-199에서 실시되었다. 전기 자극을 통하여 균형적인 세포융합을 위해 핵이식 난자들은 0.1 mM MgSO₄, 1.0 mM CaCl₂, 0.5 mM Hepes가 포함된 0.3 M mannitol 용액과 함께 fusion chamber의 0.2 mm 직경 와이어 전극(간격 1 mm) 사이에서 BTX Electro Cell Manipulator 2001 (BTX, San Diego, CA, USA) 이용 2DC 전류 1.2 kV/cm를 30 μ/sec 동안 유도하여 융합시켰다. 융합된 난자들은 6일 동안 PZM-3에서 배양되었다. Genomic DNA 추출용 발달 단계별 복제란은 PBS로 4회 이상 세척 후 회수하였다. Genomic DNA 추출에 MII 난자는 200개, 2-cell 100개, 4-cell 50개, 8-cell 25개, 상실배 20개, 배반포 10개를 회수 사용 전까지 -80°C에 보관하였다.

체내수정란의 회수

발달 단계별 체내수정란의 회수를 위하여 7~11개월령 랜드레이스 처녀돈을 이용, 과배란처리를 하여 회수하였다. HCG 주사 후 24~36시간에 자연중부시켰고, 중부 일을 0일로 하여 국립축산과학원내 도축장에서 도축하였다. 생식기의 회수 후 PBS를 이용 난관을 관류하여 1일 후 1-cell, 2일 후 2-cell, 3일 후 4-cell, 4~5일에 걸쳐 8-cell, 상실배를 회수하였다. 배반포의 회수는 자연중부 6일 후, 즉 HCG 주사 후(배란 후 약 120시간) 168시간에 도축 후 생식기를 회수하였다. PBS를 이용 자궁 관류하여 수정란은 30분 내에 37°C의 0.1%(w/v) PVA를 첨가한 Tyrode's lactate-HEPES를 이용하여 세척 Genomic DNA 추출 전까지 -80°C에 보관하였다.

Bisulfite Sequencing에 의한 DNA 메틸화 해석

우선 Genomic DNA 추출은 Ko 등(2005)의 방법에 준하여 추출하였고, sodium bisulfite genomic sequencing은 Clark 등(1994)의 방법에 따라 수행하였다. 간략히 bisulfite genomic sequencing 방법을 설명하면 EcoRI 처리된 약 2 μg의 genomic DNA가 0.33 M NaOH에서 37°C에서 15분 동안 denature시켰고, pH 5의 2M의 sodium metabisulfite와 0.5 mM의 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 H19 메

Table 1. Primer sequence of Dnmt1o and Dnmt1s for bisulfite PCR

Gene	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
Dnmt1o	F: 5'-TATTGAGTAGGGTTAGGAATTGA-3' R: 5'-CCTACCCTAACCATTAATCAAAAA-3'	610
Dnmt1s	F: 5'-AGGTAAGGTTTTAGTAAATAGAA-3' R: 5'-ACAAACAACCCTAACTTTT-3'	244

틸화 가변영역을 표 1의 primer set을 이용하여 증폭시켰다. PCR 증폭 조건은 94°C에서 10분간 pre-denaturation 반응 후, 94°C에서 30초, annealing 온도는 56°C에서 30초, 72°C에서 1분간 43회 반응시켰고, 72°C에서 10분간 신장시켜 증폭 반응을 종료하였다. 증폭된 PCR 산물은 2% agarose gel 전기영동하여 증폭 여부를 확인한 후, 증폭된 PCR 산물의 염기 서열은 pGEM T-easy vector system(Promega, USA)을 이용하여 PCR 산물을 클로닝한 후, Bigdye terminator와 ABI 377 자동 염기 서열 분석 장치(PE Applied Biosystems, U.S.A.)를 이용하여 염기 서열을 결정하였다. 결정된 염기 서열은 BLAST를 이용하여 상동성을 검색하였고, DNA Sequence Navigator(PE Applied Biosystems, USA) program을 사용하여 분석하였다.

Pyrosequencing에 의한 DNA 메틸화 해석

Bisulfite 처리된 genomic DNA는 표 1의 Dnmt1o, Dnmt1s 상류 영역을 증폭하기 위하여 Pyrosequencing Assay Design Software (Biotage AB, Uppsala, Sweden)를 이용하여 PCR primer와 sequencing primer를 설계하였다. 이때 sequencing primer와 상보적인 strand의 PCR primer는 5'에 biotin으로 modify하여 합성하였고, PCR 조건은 Bisulfite sequencing PCR 조건과 같다. Streptavidin sepharose HP bead(Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden)를 이용한 PCR 산물의 정제는 Vacuum Prep Workstation을 이용하여 진행하였다. Primer의 annealing 후 500 ng의 single strand DNA결합 단백질 (Sigma, St Louis, MO)이 sequencing 반응 혼합물에 가해졌다. Sequencing은 제공된 방법에 준하여 SNP reagent kit (Pyrosequencing, Uppsala, Sweden)와 함께 PSQ 96MA system 장비를 이용하여 분석하였다. Data의 분석은 장비에 제공된 software의 allele 정량 algorithm을 이용하여 분석하였다.

Table 2. Primers for pyrosequencing analysis of the bovine Dnmt1o and Dnmt1s gene

Region	PCR primers	Length	Sequencing primers	CpG #
Dnmt1o	F: 5'-TTTATTGAGTAGGGTTAGGAATTGA-3' R: 5'-TCCTCACCACAATAAACAAAAAT-3'	645	5'-ATTAGATTTAAATTATGT-3'	8, 9, 10, 11
			5'-AAAAATGTTGATTGGG-3'	5, 6, 7
			5'-GGATGTTGTTGGTATGTAGT-3'	3, 4
			5'-GGAATGTGGGGATGTT-3'	1, 2
Dnmt1s	F: 5'-AGGTAAGGTTTTAGTAAATAGAA-3' R: 5'-ACAAACAACCCTAACTTTT-3'	244	5'-AAGTTTGGATTAGTTTATTT-3'	11~24
			5'-GTATAATTAGTTTATTGAG-3'	1~10

결 과

체세포 복제란 초기 배 발달 중 Dnmt1o 상류 영역의 DNA 메틸화 변화

돼지 체세포 복제 수정란 1-cell에서 배반포까지 착상 전 초기 배 발달 단계의 Dnmt1o 발현조절영역으로 생각되는 전사개시점 상류 -30 bp에서 -675 bp내 645 bp 영역에 존재하는 11개의 CpG site에 대하여 pyrosequencing법에 의하여 cleavage stage별 발달단계에서 상세하게 메틸화의 변화를 조사하였다(Fig. 1A). 분석 결과, Dnmt1o 상류 영역은 체세포 복제란 1-cell에서 51.1%, 2-cell에서 63.1%, 4-cell에서 63.18%, 8-cell에서 67.3%로 1-cell에서 8-cell까지 조금씩 메틸화 증가 경향을 보였고, 상실배에서는 51.2% 탈 메틸화 되었고, 배반포에서는 69%로 재차 메틸화의 증가되는 양상을 보였다. 이들 결과는 착상 전 복제란 발달 과정에서 신규메틸화와 탈 메틸화 그리고 재차 신규메틸화가 일어나는 다이내믹한 메틸화의 패턴의 변화가 일어남을 의미한다. 그리고 체내수정란의 cleavage stage에서도 2-cell에서 75%로 고 메틸화로 신규 메틸화가, 4-cell에서 51.91%로 탈 메틸화, 8-cell에서 71.91% 신규 메틸화, 상실배, 배반포에서는 70.27, 44.27%로 점점 탈 메틸화 되어가는 패턴을 보여 초기 배 발달 세포분열 과정에서 발달 stage별로 급격한 또는 부분적인 신규메틸화 및 탈 메틸화 변화가 일어나고 있으며, 복제란의 메틸화 패턴은 체내수정란과 다른 메틸화 패턴을 보였다.

체세포 복제란 초기 배 발달 중 Dnmt1s 상류 영역의 DNA 메틸화 변화

Dnmt1s는 Dnmt1o에 비하여 대부분의 체세포에서 발현하는 Housekeeping gene이다. CpG site가 다수 분포하는 CpG Island 영역인 Dnmt1s exon1을 포함하는 상류 -229 bp 범위까지의 244 bp에 존재하는 24개의 CpG site

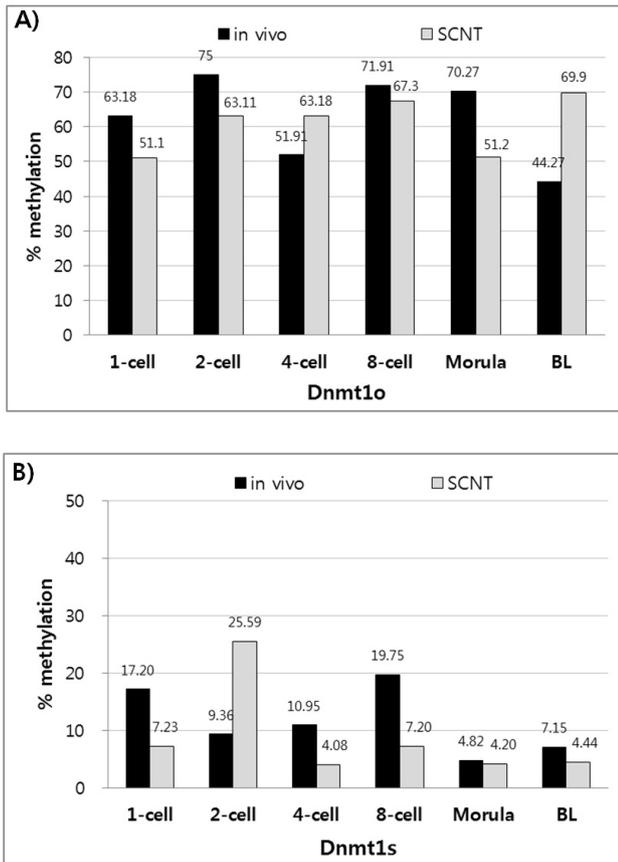


Fig. 1. CpG methylation patterns of porcine *Dnmt1o* and *Dnmt1s* 5'-region in the early embryos produced *in vivo* or SCNT. Methylation status of *Dnmt1o* and *Dnmt1s* 5'-region analyzed by means of pyrosequencing method. Percent methylation of *Dnmt1o* (A) and *Dnmt1s* (B) 5'-region is the proportion of methylated CpG sites relative to the whole CpG.

에 대하여 pyrosequencing법에 의하여 수정 후 1-cell에서 배반포까지 착상 전 초기 배 발달 단계에서 메틸화의 변화를 조사하였다(Fig. 1B). 체세포 복제란 *Dnmt1s* 상류 영역은 1-cell에서 7.23%로 저 메틸화 되었고, 2-cell에서 25.59%로 메틸화가 증가하였다. 이후 4-cell에서 4.08% 탈 메틸화 후 8-cell, 상실배, 배반포에서 각각 7.20%, 4.20%, 4.44% 저 메틸화 상태를 유지하고 있었다. 체내수정란의 메틸화 양상과 비교에서도 2-cell을 제외하고, 각 stage별로 체내수정란에 비하여 저 메틸화 패턴을 보였다. 이들 결과에서 *Dnmt1s* 상류 영역은 수정 후 초기 배 발달 stage별 복제란과 체내수정란 모두 그 변화 정도가 미비한 저 메틸화 패턴을 보였다.

Bisulfite Sequencing 방법에 의한 DNA 메틸화 분석

앞에서 우리는 pyrosequencing법에 의하여 복제란의 착상 전 초기 배 발달 단계별 *Dnmt1o*와 *Dnmt1s* 상류 영역의 DNA 메틸화 패턴을 분석하였다. Pyrosequencing법이 크로닝 과정 없이 PCR 산물의 직접적인 sequencing으로 분석이 간단 용이하나, 그 정확도에 한계가 있을 것으로 생각되어 체내수정란, 복제 배반포, 체세포인 태아

섬유아세포(PFF), 귀 세포에 대하여 bisulfite sequencing 방법에 의하여 *Dnmt1o* 상류 영역의 DNA 메틸화를 분석하였다. 분석한 영역은 *Dnmt1o* 발현조절영역인 전사개시점 상류 -30 bp에서 -640 bp내 610 bp 영역에 존재하는 8개의 CpG site를 분석하였다. 복제란은 체내수정란 배반포의 55.62%에 비하여 84.38%로 고 메틸화 되었고, 체세포인 태아섬유아세포와 귀 세포는 87.50%, 84.38%의 고 메틸화 패턴을 보였다(그림 2). 이들 결과는 pyrosequencing법에 의해 분석한 체내 배반포의 44.27%에 비하여 55.62%보다 고 메틸화 되었고, 복제배반포의 경우에서도 69.9%보다 높은 81.62%로 bisulfite sequencing법은 pyrosequencing법에 의한 분석 결과보다 10% 가량 고 메틸화 결과를 보였다. 이들 결과는 분석 방법에 따라 메틸화 결과가 약간의 차이는 보이지만 그 결과는 비슷한 양상을 보여 유의적인 결과임을 시사한다.

고 찰

본 논문은 복제란 및 체내수정란 1-cell에서 배반포까지의 초기 발달 과정에서 *Dnmt1o*과 *Dnmt1s*의 발현을 제어 할 것으로 예상되는 이들 유전자 상류 영역 메틸화 가변영역의 메틸화 패턴을 pyrosequencing법과 bisulfite sequencing법에 의하여 분석하였다. 본 실험의 결과, 착상 전 초기 배 발달 과정의 복제란, 체내수정란 그리고 체세포에서 *Dnmt1o* 발현 조절 영역으로 생각되는 전사개시점 상류 영역에 -30 bp에서 -640 bp내 610 bp 영역에 존재하는 8개의 CpG site 중 전사개시점 상류 5개의 CpG site가 메틸화 가변영역(DMR)임을 확인하였으나(Fig. 2), *Dnmt1s* 영역은 CpG Island 영역으로 발달 단계별 대부분이 저 메틸화 수준으로 메틸화 변화가 적고 DMR이 아닌 것으로 생각된다. *Dnmt1o* DMR의 메틸화는 복제란의 경우는 체내수정란 배반포의 55.62%에 비하여 84.38%로 고 메틸화 되어 불완전한 리프로그래밍의 한 범주로 속한다. 어쨌든 복제 동물의 정상적인 발달에 중요한 많은 유전자의 비정상적인 메틸화와 발현이 많은 그룹에서 보고하고 있고(Dean 등, 1998; Kang 등, 2001; Ko 등, 2008; Park 등, 2008), 후성학적 관점에서 정상적인 리프로그래밍을 유지하는 TSA 등의 처리로 복제 생산효율 향상을 꾀하고 있다(Kishigami 등, 2006; Wakayama 등 2007; Kishigami 등, 2009).

또한 우리의 결과에서 *Dnmt1o* DMR 영역은 복제란 및 체내수정란 초기발달 과정에서 그 메틸화 패턴은 cleavage stage별로 급격한 또는 부분적인 신규메틸화 및 탈 메틸화가 일어나며, 이때 복제란의 메틸화 패턴은 체세포 복제에 따른 체내수정란과 다소 다른 메틸화 양상을 보였다. 이러한 결과는 마우스 초기 배 발달 과정에서 *Dnmt1o* DMR내 DNA 메틸화의 다이내믹한 변화에서와 같이(ko 등 2005), 돼지 *Dnmt1o* DMR의 DNA 메틸화는 착상 전 배 발달 동안에 신규메틸화와 능동적인 탈 메틸화에 의해 일어난다고 할 수 있다. 어쨌든 이들 특정 stage에서 독특한 메틸화 패턴을 갖고 변화하며, 일반적으로 수정 후 DNA 복제와 세포분열에 따른 유지 메틸화 부족으로 genome-wide한 탈 메틸화 현상이 일어난다(Rougier 등, 1998; Reik 등, 2001; ko 등, 2005), 수정 후 음성전핵

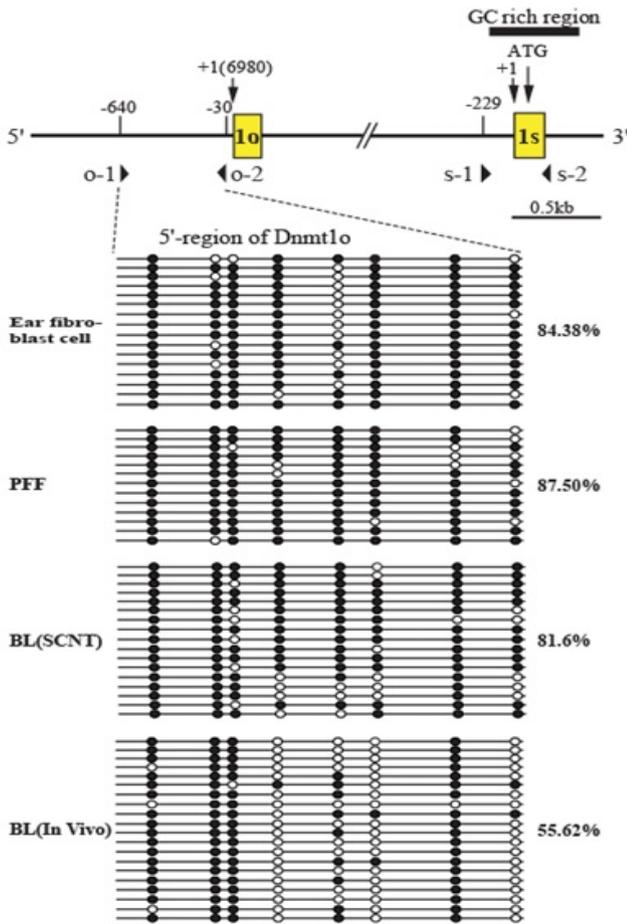


Fig. 2. Methylation patterns of Dnmt1 α 5'-region in blastocyst and somatic cell produced *in vivo* or SCNT. Methylation status of each CpG in the 5'-regions of Dnmt1 α analyzed by means of sodium bisulfite genomic sequencing method, are shown. Blank and filled circles indicate unmethylated and methylated CpGs, respectively.

에서 급격한 탈 메틸화가 일어나는 마우스뿐만 아니라 (Santos 등, 2002), 돼지(Dean 등, 2001), 사람(Fulka 등, 2004)에서 보고되었고, 면양과 소에서는 부분적인 약간의 탈 메틸화 현상이 나타난다(Beaujean 등, 2004; Dean 등 2001). 이들 결과는 본 실험의 결과뿐만 아니라 수정 후 포유동물 초기 배 발달 과정은 다이내믹한 epigenetic modification의 큰 축을 차지하고 있는 것 같다.

본 연구에서 돼지 Dnmt1 α 유전자 상류 영역에 DMR이 잘 보존되어 있으며, DNA 메틸화 효소인 Dnmt1 유전자 자체가 DNA 메틸화의 타깃임을 시사한다. 또한, 체내수정란뿐만 아니라 체세포 복제란의 착상 전 초기 발달 과정에서 cell stage별로 다이내믹한 메틸화의 변화를 갖고 있음을 시사한다.

결론

본 연구는 복제란 및 체내수정란 1-cell에서 배반포까지의 초기 발달 과정에서 난모세포 특이적으로 발현하는

Dnmt1 α 와 체세포 특이적인 Dnmt1s 발현을 조절하는 메틸화 가변영역으로 추정되는 DMR(differentially methylated region) 영역의 DNA 메틸화 변화양상을 bisulfite sequencing 및 pyrosequencing 방법으로 상세히 분석하였다. 착상 전 초기 배 발달 과정의 복제란, 체내수정란 그리고 체세포에서 Dnmt1 α 발현 조절 영역으로 생각되는 전사개시점 상류 영역에 -30 bp에서 -640 bp내 610 bp영역에 존재하는 8개의 CpG site 중 전사개시점 상류 5개의 CpG site가 메틸화 가변영역(DMR)임을 확인하였다. 그러나 Dnmt1s 영역은 CpG Island 영역으로 발달 단계별 대부분이 저 메틸화 수준으로 메틸화 변화가 적고 DMR이 아니었다. 또한, 복제란에서 Dnmt1 α DMR의 메틸화는 체내수정란 배반포의 55.62%에 비하여 84.38%로 고 메틸화 되어 있었으며, 1-cell에서 배반포까지의 cleavage stage에 따라 급격한 또는 부분적인 신규 메틸화 및 탈 메틸화가 다이내믹하게 이어졌고, 그 메틸화 패턴은 체내수정란과 다른 메틸화 패턴을 보였다. 결론적으로 Dnmt1 α 유전자 상류 영역에 DMR이 잘 보존되어 있으며, DNA 메틸화 효소인 Dnmt1 유전자 자체가 DNA 메틸화의 타깃임을 시사한다. 앞으로 초기 발달 단계에서 Dnmt1 발현 및 Dnmt family 간의 메틸화 기능 해석이 필요하다.

인용문헌

1. 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.
2. Bestor TH (2000): The DNA methyltransferases of mammals. Hum Mol Genet 9:2395-2402.
3. Chen T, Li E (2004): Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. Curr Top Dev Biol 60:55-89.
4. Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M (1994): High sensitivity mapping of methylated cytosines. Nucleic Acids Res 22:2990-2997.
5. Dean W, Bowden L, Aitchison A, Moore T, Menezes JJ, Reik W, Feil R (1998): Altered imprinted gene methylation and expression in completely ES cell-derived mouse fetuses: Association with aberrant phenotypes. Development 125:2273-2282.
6. 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.
7. Fulka H, Mrazek M, Tepla O, Fulka Jr (2004): DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos. Reproduction 128:703-708.
8. Jeong YS, Dh KB, Park JS, Kim JS, Kang YK (2009): Cytoplasmic localization of oocyte-specific variant of porcine DNA methyltransferase-1 during early

- development. *Dev Dyna* 238:1666-1673.
9. Kang YK, Koo DB, Park JS, Choi YH, Chung AS, Lee KK, Han YM (2001): Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat Genet* 28:173-177.
 10. Kim SH, Kang YK, Koo DB, Kang MJ, Moon SJ, Lee KK, Han YM (2004): Differential DNA methylation reprogramming of various repetitive sequences in mouse preimplantation embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 324:58-63.
 11. Kishigami S, Bui HT, Wakayama S, Tokunaga K, Van Thuan N, Hikichi T, Mizutani E, Ohta H, Suet-sugu R, Sata T, Wakayama T (2007): Successful mouse cloning of an outbred strain by trichostatin A treatment after somatic nuclear transfer. *J Reprod Dev* 53:165-170.
 12. Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, Hikichi T, Thuan NV, Wakayama S, Bui HT, Wakayama T (2006): Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem Biophys Res Commun* 340: 183-189.
 13. 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.
 14. Kremenskoy M, Kremenska Y, Suzuki M, Imai K, Takahashi S, Hashizume K, Yagi S, Shiota K (2006): Epigenetic characterization of the CpG islands of bovine *Leptin* and *POU5F1* genes in cloned bovine fetuses. *J Reprod Dev* 52:277-285.
 15. Li E, Bestor TH, Jaenisch R (1992): Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69:915-26.
 16. Mertineit C, Yoder JA, Taketo T, Laird DW, Trasler JM, Bestor TH (1998): Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. *Development* 125:889-897.
 17. Ohgane J, Wakayama T, Senda S, Yamazaki Y, Inoue K, Ogura A, Marh J, Tanaka S, Yanagimachi R, Shiota K (2004): The *Sall3* locus is an epigenetic hotspot of aberrant DNA methylation associated with placentomegaly of cloned mice. *Genes Cells* 9:253-260.
 18. Park MR, Hwang IS, Shim JH, Moon HJ, Kim DH, Ko YK, Seong HH, Im GS (2008): Effect of osmolarity of culture medium on imprinting and apoptotic gene expression in miniature pig nuclear transfer embryos. *Reprod Dev Biol* 32:183-191.
 19. Reik W, Dean W, Walter J (2001): Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293: 1089-1093.
 20. 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.
 21. Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W (2002): Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* 241:172-82.
 22. 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.
 23. Shi W, Haaf T (2002): Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. *Mol Reprod Dev* 63:329-334.
 24. Wakayama T (2007): Production of cloned mice and ES cells from adult somatic cells by nuclear transfer: how to improve cloning efficiency? *J Reprod Dev* 53:13-26.
- (접수일자: 2012. 2. 26 / 채택일자: 2012. 3. 26)