

한국 재래닭의 발생 · 발육단계별 telomere와 telomerase activity 분석

정길선, 조은정, 최철환¹, 손시환
 진주산업대학교 동물생명과학과, 농진청 축산연구소¹

Abstract

This study was carried out to analyze the amount of telomeres and telomerase activity of several chicken cells. Telomere quantity and telomerase activity were analyzed during organ development, growth and aging in embryonic and adults chicken. Analyzed cells were whole embryos and the cells from brain, heart, liver, kidney, lymphocytes and germinal tissues in Korean Native Chicken. The amount of telomeric DNA was analyzed by quantitative fluorescence in situ hybridization (Q-FISH) techniques using a chicken telomere repeat probe. Telomerase activity was performed by Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) assay. In results, telomerase activity was highly detectable in early embryonic cells, germinal cells and kidney cells. Whereas the cells from brain, heart, and liver had gradually down-regulated pattern of telomerase activity. Analyzing the telomere quantities on chicken cells, the amount of telomeric DNA of most chicken cells gradually decreased as growth. From these results, the amount of telomeric DNA was directly affected by telomerase activity. Consequently the telomere quantity and telomerase activity are closely relate to cell differentiation and tissue specificity during developmental and growing stages.

Key words : chicken, telomere, telomerase, FISH, TRAP

서론

Telomere는 염색체 말단에 위치하며, TTAGGG 라는 반복 염기배열을 하고 있으며 염색체의 안정성에 본질적으로 작용하여 세포의 노화, 암의 발생과 직접적으로 관련이 있다고 보고하고 있다. 반면 telomerase는 telomere의 길이를 유지하는 직접적인 효소로서 염색체의 3' 말단에 신생 telomeric DNA를 부가시키는 역할을 하며 이들은 RNA와 ribonucleoprotein으로 구성되어 있다.

지금까지 telomere와 telomerase에 대한 연구는 인간이나 설치류에서 폭넓게 연구된 반면, 가금류에 대한 연구는 상대적으로 매우 미흡한 실정이나 최근 닭의 telomeres는 0.5~2 Mb로 다른 동물종에 비해 상대적으로 매우 큰을 밝힌 바 있고, telomerase activity는 마우스에서처럼 성체에서도 지속적인 활성을 보인다는 보고와 사람과 같이 초기 배자에서부터 기관 형성시까지 거의 지속적인 활성도를 보이나 기관 형성 이후 신생 개체에서는 활성도가 감소한다는 상반된 결과를 제시하기도 한다(Venkatesan과 Price, 1998 ; Taylor와 Delany, 2000 ; Delany 등, 2003). 따라서 닭의 세포분화 및 활성적 특이성과 배 발생단계별 텔로미어와 텔로머레이스의 분석은 개체의 발생과 노화에 관한 생물학적 기작을 밝히는데 매우 중요한 자료라 사료되어 본 연구에서는 한국재래계를 대상으로 양적 형광접합보인법(Quantitative fluorescence in situ hybridization : Q-FISH)을 이용하여 수정란 및 발생단계별 신생조직과 출생 후 성장단계별 각 조직들에 대한 telomere의 함량을 분석하고, Telomeric Repeat Amplification Protocol

(TRAP)법을 이용한 이들의 telomerase 활성도를 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

닭의 발생 및 성장단계별 텔로미어 함량 분석과 텔로머레이스 활성도 분석을 위하여 진주산업대학교 동물사육장에 사육중인 한국재래계 암·수 100수를 이용하고, 분석세포는 초기배자, 간, 뇌, 신장, 심장, 생식선조직 및 백혈구를 대상으로 하였다.

Telomere의 함량분석은 각 표본에 Dig-labelled chicken telomeric DNA probe를 이용하여 FISH를 수행하고 획득한 상은 이미지 분석 프로그램 (MetaMorph)을 이용하여 핵 대비 텔로미어의 분포비에 대한 평균값을 분석하는 Q-FISH법을 이용하였다. Telomerase activity의 분석은 TRAP^{EZE} telomerase detection kit를 이용하여 PCR을 수행

한 후 증폭된 telomerase의 유무로서 관찰하였다.

결 과

닭의 초기 배자에서 성체 때까지 각 조직별 telomerase의 활성도를 비교 분석한 바 초기 배자에서부터 기관 형성시까지는 거의 지속적 활성도를 보이거나 기관 형성 이후 거의 모든 조직에서 감소(down-regulation)되는 양상을 나타내었고, 출생 후 성성숙 이후에는 거의 발현양상이 없는 것으로 보이거나 신장 및 생식세포에서는 출생 후에도 지속적 활성도를 보였다(Table 1). 이러한 활성 양상은 사람과 거의 유사한 양상으로 Venkatesan과 Price (1998)가 제시한 마우스의 양상과는 다른 것으로 보여진다.

한편 각 세포별 telomere의 함량 분석에서 초기 배자상태에서 높은 telomere의 함유율을 보이다가

Table 1. Telomerase activity profiles during organ development, growth and aging in embryonic and adult chickens

Tissues	Embryonic					Postnatal				
	E0~E3	E7	E9	E13	E18	Hatched	10Wks	30Wks	60Wks	120Wks
Whole embryo	+++									
Mesonephros	N/A	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+
Brain	N/A	+++	++	+	+	+	+	-	-	-
Liver	N/A	+++	++	+	+	+	+	-	-	-
Heart	N/A	+++	++	+	+	+	+	-	-	-
Gonad	N/A	+++	+++	+++	N/A	+++	+++	+++	+++	N/A
Blood	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	N/A	-

(+++): Strong activity ; (++) moderate activity ; (+) trace activity ; (-) no activity ; N/A not analyzed

Table 2. The amount of telomeric DNA on cells during organ development, growth and aging in embryonic and adult chickens

Tissues	Embryonic			Postnatal				
	E0~E3	E7	E13	Hatched	10Wks	30Wks	60Wks	120Wks
Whole embryo	2.42±0.05	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Mesonephros	N/A	2.28±0.09 ^{ab}	2.79±0.13 ^b	2.13±0.12 ^b	1.82±0.14 ^a	1.71±0.05 ^c	1.47±0.04 ^c	1.66±0.04 ^c
Brain	N/A	2.17±0.11 ^a	1.88±0.10 ^b	1.72±0.12 ^{bc}	1.78±0.06 ^{bc}	1.71±0.06 ^{bc}	1.63±0.04 ^c	1.31±0.03 ^d
Liver	N/A	2.22±0.09 ^a	1.89±0.08 ^b	1.78±0.11 ^{bc}	1.69±0.04 ^{bc}	1.69±0.05 ^{bc}	1.63±0.06 ^c	1.29±0.04 ^d
Heart	N/A	2.13±0.11 ^a	2.01±0.10 ^{ab}	1.83±0.10 ^{bc}	1.75±0.05 ^c	1.67±0.05 ^{cd}	1.68±0.05 ^{cd}	1.47±0.05 ^d
Gonad	N/A	2.61±0.10 ^a	2.78±0.10 ^a	2.54±0.14 ^a	2.78±0.11 ^a	2.41±0.11 ^{ab}	2.17±0.10 ^b	N/A
Blood	N/A	N/A	N/A	N/A	2.61±0.05 ^a	2.20±0.03 ^b	2.17±0.03 ^b	2.02±0.06 ^c

The values are means ± standard error / ^{a,b,c,d} Means with different superscripts in same row significantly differ at p<0.01.

기관 형성 이후 배 발생단계가 진행됨에 따라 조직내 텔로미어 함유량이 유의적으로 감소되고 성체에서 주령이 증가됨에 따라 지속적으로 감소되는 양상을 나타내었다. 특히 간, 뇌, 심장 조직의 경우 발생이 진행되면서 유의적으로 감소양상을 보인 반면 생식선 조직과 신장에서는 발생진행에 따른 함유율의 변화는 거의 없었다(Table 2). 동일 발생시점에 조직세포간 텔로미어 함유율은 생식선 조직이 가장 높았고 신장, 심장, 간, 뇌 순으로 나타났다.

이상의 결과로 telomerase의 활성도와 telomere의 함량간에 매우 밀접한 연관성을 보이며, 닭 조직별 세포의 분화 및 증식성 특이성과도 밀접한 관련이 있는 것으로 사료된다.

적 요

본 연구는 닭의 여러 조직별 세포들의 telomere 함유율과 telomerase 활성도를 분석 제시하고자 하였다. 한국재래계의 수정란 및 발생단계별 신생 조직과 출생 후 성장단계별 각 조직들에 대한 telomere의 함량과 telomerase 활성도를 분석하였고, 초기배자, 간, 뇌, 신장, 심장, 생식선 조직 및 백혈구 세포를 분석대상으로 하였다.

Telomere의 함량 분석은 chicken telomeric DNA probe를 이용한 Q-FISH법으로 수행하였고, telomerase activity의 분석은 TRAP법을 이용하였다. 분석결과 초기 배자, 생식선 세포 및 신장세포에서는 지속적으로 매우 높은 telomerase activity를 나타내었으나 뇌, 심장, 간 등에서는 발생 및 발육이 진행됨에 따라 유의적 감소 양상을 보였다. 닭의 각 조직별 telomere의 함량 분석결과, 대부분의 세포들이 성장이 진행됨에 따라 telomere 함유율이 감소되는 양상을 보였다.

이상의 결과로부터 telomerase의 활성도와 telomere의 함량간에 매우 밀접한 연관성을 보이며, 이들이 닭 조직별 세포의 분화 및 증식성 특이성 과도 밀접한 관련이 있는 것으로 나타났다.

참고문헌

- Delany, M. E., Daniels, L. M., Swanberg, S. E. and Taylor, H. A. 2003. Telomeres in the chicken : Genome stability and chromosome ends. Poultry Science 82:917-926.
- Taylor, H. A. and Delany, M. E. 2000. Ontogeny of telomerase in chicken: Impact of down-regulation on pre- and postnatal telomere length in vivo. Develop. Growth Differ. 42:613-621
- Venkatesan, R. N. and Price, C. 1998. Telomerase expression in chicken constitutive activity in somatics tissues and down-regulation in culture. The National Academy of Sciences 95:14763-14768.