

체세포복제 소 배반포의 Oct-4 발현과 DNA 메틸화 변화

차병현¹, 최정상¹, 황성수¹, 정학재¹, 임기순¹, 양병철¹, 김명직¹, 조재현², 성환후¹, 고응규^{1,*}
¹농촌진흥청 축산과학원 응용생명공학과, ²경상대학교 수의학과

Expression and DNA Methylation Change of Oct-4 in Cloned Bovine Blastocysts

Byung-Hyun Cha¹, Jung-sang Choi¹, Seongsoo Hwang¹, Hak-Jae Chung¹, Gi-Sun Im¹, Byong-Chul Yang¹,
 Myong-Jik Kim¹, Jae-Hyeon Cho², Hwan-Hoo Seong¹ and Yeoung-Gyu Ko^{1,*}

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

²Dept. of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 200-701, Korea

ABSTRACT

Aberrant DNA methylation is one of the reasons for poor survival of clone animals. The OCT-4 gene is essential for maintaining pluripotency of embryonic stem (ES) cells and early embryos. We previously reported that the 5'-promoter region of Oct-4 gene was a target of DNA methylation and the methylation status was changed variously during embryonic development in bovine. The study conducted to examine the expression and methylation pattern of tissue-dependent differentially methylated region (T-DMR) of Oct-4 gene in bovine somatic cell nuclear transfer (SCNT) and *in vitro* fertilization (IVF) blastocysts. The Oct-4 gene expression was evaluated by RT-PCR and fluorescence immunocytochemistry. The methylation pattern of T-DMR was analyzed using restriction mapping and bisulfite sequencing methods. The Oct-4 transcripts were highly expressed in IVF, while they were not expressed in SCNT. The Oct-4 protein was not detected or expressed at very low level in SCNT, the intensity of Oct-4 protein, however, was strong in IVF. On the other hand, the T-DMR of Oct-4 gene was hypermethylated in SCNT compared to that of IVF. These results suggested that aberrant expression and the failure of demethylation of Oct-4 gene was closely associated with incomplete development of SCNT embryos.

(Key words : bovine, Oct-4, DNA methylation, somatic cell nuclear transfer, blastocyst)

서 론

DNA 메틸화는 유전자의 silencing, X 염색체 불활성화, Imprinting, chromatin의 remodeling과 같은 epigenetic mechanism의 하나로 다양한 유전자의 기능 조절을 통한 포유동물 발달에 관여하고 있다. 포유류의 몸은 다양한 기능과 형태를 갖는 약 200종류의 세포로 구성되어 있으며, 이들 다양한 조직과 세포는 각각 고유의 DNA 메틸화 패턴을 형성하고 있는 것이 최근의 연구에서 밝혀지고 있고 개체 발생, 세포의 분화에 중요한 역할을 하고 있다(Shiota 등, 2002). DNA 메틸화는 주로 CpG 연속 배열의 cytosine에서 일어난다. 그런데 CpG 배열이 고밀도로 존재하는 CpG island는 housekeeping 유전자 또는 많은 조직특이적인 유전자의 조절 영역에 존재하며, 메틸화가 변 영역으로서(tissue dependent, differentially methylated region: T-DMR) 조직과 세포에 존재하고 있다(Ohgane 등, 2004).

복제 기술이 금후 생물학의 발전과 재생의학에서 응용, 축산자원의 확보, 개량 등 많은 분야에서 인류에 공헌할 기술이란 것은 의심의 여지가 없으나, 현재로서 정상으로 출생까지 이르는 복제 동물은 극히 일부이고, 태어난 복제 동물도 태어난 후 곧바로 죽거나, 여러 가지 이상을 나타내는 개체가 있는 등 많은 경우에 이상이 있는 것으로 알려져 있다(Wilmut 등 1997; Wakayama 등, 1998; Kato 등 1998; Polejaeva 등, 2000). 소의 경우는 특히 중요한 축산자원인 소의 개량 및 형질 전환을 통한 부가가치 생산 등의 목적으로 많이 이용되지만, 그 복제 효율은 10% 이하로 낮고(Kubota 등, 1998; Rhind 등 2003), 호흡과 기립 불능, 태아 및 신생자의 급사, 거대 산자 증후군(LOS) 등 여러 가지 이상이 보고된 바 있다(Kato 등 1998; Renard 등, 1999; Wells 등, 1999; Hills 등, 2000; Tian 등, 2000; Kubota 등, 2004). 최근에 성숙된 복제마우스에서 불완전한 DNA 메틸화를 가지는 다수의 영역이 보고되었고

* 본 논문은 한국농촌진흥청 축산과학원 경상과제 연구 결과임.

* Correspondence : E-mail : kog4556@rda.go.kr

(Ohgane 등, 2001), 복제 소 태반조직에서 leptin과 Oct-4 유전자의 T-DMR이 정상과 다르게 메틸화되어 있음을 보고하였다 (Kremensky 등, 2006). T-DMRs과 관련된 CpG Island들이 genome-wide하게 분포되어 있고(Hattori 등, 2004), 그들의 DNA 메틸화 상태는 세포형과 조직에서 독특한 프로파일들을 나타낸다. DNA 메틸화 프로파일의 적절한 형성은 정상적인 분화와 발달의 기초가 되기 때문에 복제 동물의 발달을 평가하는데 이용될 수 있을 것이다.

Oct-4는 POU family의 일원으로 난자, 착상전 수정란, 그리고 배반포의 내부 세포괴(inner cell mass)에서 특이적으로 발현하며 배아줄기세포의 다능성 유지에 관여하는 가장 중요한 전사 인자 중 하나이다(Okamoto 등, 1990; Rosner 등, 1990; Scholer 등 1990). 우리는 이전의 보고에서 소의 Oct-4가 수정 후 초기 체외수정란 발달 과정에서 DNA 메틸화의 타깃이고, T-DMR의 메틸화는 수정 후 배반포까지 다양하게 변화함을 보고하였다(Ko 등, 2008). 본 연구에서 소 체외수정(*in vitro* Fertilization; IVF)과 체세포핵이식(somatic cell nuclear transfer; SCNT)을 통해 생산된 배반포에서 Oct-4 유전자의 프로모터 내 CpG island의 메틸화 패턴을 restriction mapping과 bisulfite sequencing에 의해 조사였고, 그 발현 양상을 RT-PCR과 면역 염색에 의해 비교하였다.

재료 및 방법

1. 체외 수정란(IVF Blastocyst) 생산

정자는 동결 정액을 이용하였고, 체외수정란 생산 방법은 다음 방법과 같다. 도축장에서 도축된 소의 난소에서 10 ml 주사기에 18G 주사침을 이용하여 직경 2~6 mm 난포로부터 채취하였다. 채취된 난자는 실험현미경 하에서 난구세포가 치밀하게 부착되고 세포질이 균일한 것만을 선별하여 체외 성숙에 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 μ g/ml FSH-P(Follitropin-V), 1 μ g/ml estradiol-17beta 그리고 10 ng/ml EGF를 첨가하여 사용하였다. 성숙난자는 4-well dish(Nunc, Denmark)를 사용해 mineral oil이 도포된 500 μ l 체외 성숙용 배양액에 30~50개 난자를, 39°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 20시간 동안 체외성숙을 실시하였다. 체외수정은 0.6% BSA, 2 μ g/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 μ l 수정용 소적에 난구세포를 제거하지 않은 성숙된 난자 20개씩을 각 소적당 1×10⁶개씩의 정자

를 첨가 후 5% CO₂, 39°C 배양액에 24시간 배양하였다. 수정란은 난구세포를 완전히 제거한 후 0.3% BSA가 함유된 CR2aa 배양액 50 μ l 소적당 10개씩 넣어 3일간 배양하였고, 그 후 5% FBS가 함유된 50 μ l 소적에 옮긴 후 다시 5일간 배양하고 배반포를 확인 PBS로 4회 이상 세척 후 회수하였다. Genomic DNA 추출에 배반포 20개를 회수 사용 전까지 -80°C에 보관하였다. 또한, 초기 배 발달 단계별 RT-PCR에 의하여 Oct-4 발현 차이 분석을 위한 수정란은 각각 2개씩 준비하여 사용 전까지 -80°C에 보관하였다.

2. 체세포 복제란(SCNT Blastocyst) 생산

도축장에서 회수된 난소의 난포로부터 난구세포가 균일하고 세포질이 균질한 난자를 선별하여 5% CO₂, 39°C의 조건하에서 16~24시간 성숙 배양하였다. 난포란의 성숙은 TCM-199액에 10% FBS를 첨가하여 사용하였고, 성숙시킨 난자의 난구세포를 제거한 후 세포질의 색조가 균일하고 제1극체가 확인된 난자만을 선별하여 제1극체와 주변의 세포질을 약 1/3 정도 흡입하여 제2 감수분열 중기 염색체를 제거하는 방법으로 탈핵을 시도하였다. 핵이식에 사용된 체세포는 24개월령된 소의 귀에서 생체조직 절편으로부터 채취되었고, 이 섬유아세포를 10% FBS가 함유된 DMEM으로 배양하였다. 5일 동안 배양 후 세포를 0.05% trypsin 처리 후, Ca²⁺, Mg²⁺, free PBS로 세척하여 준비하였다. 회수된 세포는 10% FBS가 함유된 DMEM에서 배양하여 4회 계대배양 후 동결보존 후 용해 공여세포로 핵이식에 사용하였다. 핵이식 조작은 Im 등(2001) 방법에 준하여 실시하였고, 전기 자극을 통하여 세포융합을 실시하였다. 균형적인 융합을 위해 Zimmerman 세포융합기술과 전기 융합 니들(needle)을 이용 DC 전류 25V/mm를 10 μ /sec 동안 유도하여 융합시켰다. 융합된 embryo들을 1.5 mg/ μ l BSA, 5% FBS, 10 μ M 칼슘 이온으로 구성된 CR2aa 용액에서 5분간 그리고, DMAP에서 3시간 동안 활성화한다. 활성화 이후 융합된 embryo를 BSA 함유된 CR2aa medium에 배양하였고, 융합 후 7일째 질이 좋은 배반포기 수정란을 선별 사용 전까지 -80°C에 보관하였다.

3. RT-PCR에 의한 Oct-4 발현 분석

DEPC 처리된 5 μ l PBS 안에 수집된 난자와 수정란에 100 μ l TRIzol(Invitrogen) 이용 RNA 분리 후 ethanol 침강 전에 carrier로써 2 μ g의 glycogen이 첨가되었다. cDNA 합성은 SuperScript II 1st strand 합성 키트(Invitrogen)를 이용하여 제조하였다. 각각의 실험에서 PCR 증폭은 1 μ l의 c-DNA를 주형으로 r-Taq polymerase(Toyobo)이용 20 μ l volume으로 수행되었다. Oct-4의 발현은 Forward primer로 5'-ATCCTCGGACCTGGATAGGC-3'를 reverse primer로 5'-TCTATCAGCAA

CCGACTTG-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'-CAGATCATGTTTCGAGACCTT-3'를 reverse primer로 5'-GAAGGTAGTTTCGTGATGTC-3'를 이용하였다.

4. Immunocytochemistry

IVF 및 SCNT 배반포는 4% formaldehyde 20분간 고정 후 blocking buffer(3% BSA/ 0.5% Triton X-100)에서 1시간 반응시켰다. Oct-4의 발현을 검출하기 위하여 1차 항체를 blocking buffer에 1 : 200으로 희석하여 반응시켰고, 2차 항체로 FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG(Santa Cruz)를 1 : 500 희석 반응시켰다. 면역 염색 된 수정란은 마지막으로 30분 동안 실온에서 10 μ g/ml 농도의 Propidium Iodide(Sigma)를 이용 핵을 염색하였다. 염색 된 배반포는 slide glass위에 mounting medium (Biomedex, Foster, CA)을 이용 mount하였다. 그리고 배반포의 Oct-4의 발현 상태를 형광현미경을 이용 관찰하였고 image를 얻었다.

5. Restriction Mapping과 Bisulfite Sequencing에 의한 메틸화 해석

Genomic DNA 추출과 Sodium Bisulfite Genomic Sequencing은 ko(2005) 방법에 따라 수행하였다. 간략히 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 개시 상류 promoter 영역으로 추정되는 영역을 포함 약 1,072 bp를 다음의 primer set을 이용하여 증폭시켰다. Forward primer 1은 5'-GGTAAGGAAATTTGATGTATGGGAT-3'이고, reverse primer 1은 5'-CTCAATTCCTTAACAACTCCTTAC-3'이며, Forward primer 2는 5'-TTGGTTTTAGGTGTTAGGGTGTGTTG-3'이고, reverse primer 2는 5'-AAAATCAAAAACAAAATATCCCACC-3'이다. 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 product는 2% agarose gel 전기영동하여 증폭 여부를 확인 후 QIAprep Miniprep Kit(Qiagen)로 정제하였다. Oct-4 promoter 영역의 메틸화를 분석하기 위하여 이들 PCR product들은 TaqI(Roche Applied Science)과 AciI

(Takara) 제한 효소로 반응시켰다. Sodium bisulfite 반응에 의해 탈메틸화된 cytosine 잔기 만이 thymine으로 변환되기에 탈메틸화된 genomic DNA는 TaqI과 AciI 제한 효소에 절단되지 않고 메틸화된 DNA만이 절단된다. 이렇게 restriction mapping의 반응 산물은 2% agarose gel 전기영동하여 그 이미지를 얻어 메틸화 여부를 판단하였다. 다음으로 좀더 정확하게 모든 CpG들의 메틸화 여부를 확인하기 위하여 염기서열 분석을 다음과 같이 수행하였다. 증폭된 PCR 산물이 pGEM T-easy Vector System(Promega, USA)을 이용하여 PCR product를 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.

결 과

1. Oct-4 발현 양상 조사

소의 체외수정란(IVF) 배반포 그리고 체세포복제(SCNT) 배반포에서 Oct-4의 발현을 RT-PCR에 의하여 3반복 조사하였다. 그 발현은 IVF 배반포에서 높게 발현되었고, 부화 배반포에서 증가되었다. 그러나 SCNT 배반포 및 부화 배반포에서는 Oct-4 전사산물이 발현되지 않거나 매우 희미하게 발현되었다(Fig. 1A).

다음으로 IVF와 SCNT 배반포에서 단백질의 발현 및 세포내 분포를 면역염색에 의하여 확인한 결과는 Fig. 1B에서와 같이 IVF 배반포에서 Oct-4 단백질의 발현은 소에서는 내부세포외(ICM) 뿐만 아니라 영양막외배엽(TE)에서도 강하게 발현되었다. 그러나 SCNT 배반포에서 Oct-4 단백질의 발현 결과는 부화 중 배반포에서 전혀 발현되지 않거나, 희미하게 부분적으로 발현되는 것 또는 정상적으로 발현되는 것 등 정상과 다른 다양한 발현 패턴을 보였다.

2. Oct-4 상류 Promoter 영역의 메틸화 패턴 조사

IVF와 SCNT 배반포의 DNA 메틸화 양상을 비교하고자 Oct-4 promoter 영역의 메틸화 패턴을 Restriction mapping법과 Bisulfite sequencing법에 의하여 분석하였다. 우선 Restriction mapping법에 의하여 Oct-4 promoter 영역의 메틸화 패턴을 IVF와 SCNT 배반포 수정란에 대하여 분석하였다. 분석한 영역은 소 Oct-4 promoter로 추정되는 전사개시점 상류 -372 bp 안에 CpG site 수는 9개와 CpG가 다수 포함되어 있는 CpG Island 영역인 exon1 일부 영역(+27 bp)의 2개 CpG site이다. 이 가운데 조사한 메틸화 영향을 받는 제한 효소 site는 3개가 존재하는데, Aci I site1은 exon1의 +5와 상류 -114 지역에 2개 존

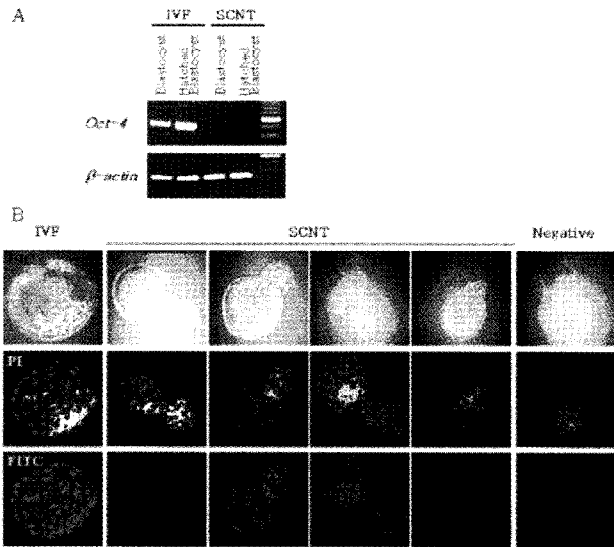


Fig. 1. Expression and subcellular localization of Oct-4 gene in IVF and SCNT hatching blastocyst. (A) RT-PCR analysis of the expressions of Oct-4. The predicted sizes of the PCR products are 475bp (Oct-4) and 270bp (β -actin). The experiment was repeated three times. (B) Immunostaining of Oct-4 in IVF and SCNT hatching blastocyst. Propidium iodide (PI) counterstain is false-colored red (PI) and antibody staining is false-colored green (FITC). Treatment with primary antibodies was omitted from the procedure in the negative controls (NC).

재하고, Taq I site는 promoter내 -263 지역에 1개 존재한다. PCR product가 이들 제한 효소에 의해 절단되는지를 확인함으로써 메틸화 여부를 판단할 수 있는데, PCR 단편이 절단되면 제한 효소 site의 CpG는 메틸화로 판단하고 절단되지 않았을 시는 탈메틸화로 판단할 수 있다. Site1과 site2의 Aci I site는 IVF 배반포에서 절단되지 되지 않는데 반하여, SCNT 배반포에서 SCNT#1은 대부분 절단이 되었고, SCNT#2는 약간의 미 절단 부분이 남아 있었다. 이들 결과는 site1과 site2의 CpG가 IVF 배반포에서 탈메틸화되어 있고, SCNT 배반포에서는 메틸화되어 있음을 의미한다. Site3의 Taq I site의 경우 IVF#1의 경우 완전히 탈메틸화되고 IVF#2의 경우는 메틸화됨을, 그리고 SCNT#1과 SCNT#2 모두 메틸화되어 있었다. 이들 결과는 Oct-4 promoter 영역이 IVF 배반포에서 저메틸화되고, NT 배반포에서 고메틸화되어 있음을 시사하고 있다.

다음으로 Oct-4 상류 영역의 모든 CpG site들의 메틸화 패턴을 상세하게 조사하기 위하여 Oct-4 promoter로 추정되는 영역을 포함하여 전사 개시점 상류 영역 -1,072 bp 내 19개의 CpG site(1~19번)와 CpG가 다수 포함되어 있는 CpG Island 영역인 exon1 일부 영역의(+27bp) 2개 CpG site(21~22번) 영

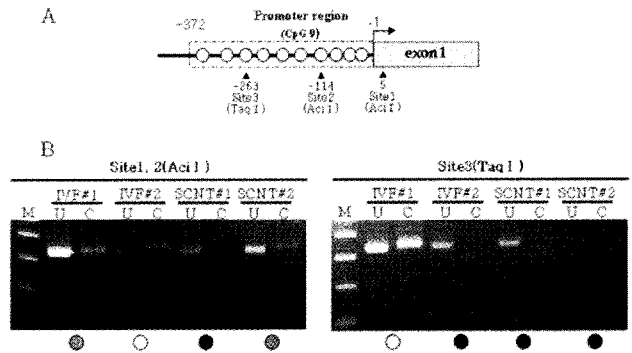


Fig. 2. DNA methylation status of Oct-4 promoter region in IVF and SCNT blastocyst. (A) schematic diagram of the upstream region of the Oct-4 gene. The genomic structure of Oct-4 analyzed in this experiment is shown in the upper panel. Open boxes indicate the promoter. Arrowheads indicate the recognition sites of restriction enzymes AciI and TaqI. (B) DNA methylation status of the Oct-4 promoter in bovine IVF and SCNT blastocyst. PCR products were digested with AciI(CCGC and GCGG) and TaqI(TCGA). Where the enzyme sites are methylated, PCR products are fragmented, and where PCR products are not fragmented, the enzyme sites are unmethylated. Levels of CpG methylation, estimated by the intensity of each band, are indicated below the gels. The conditions of undigested (U) and digested (C) are indicated. The DNA ladder 100-bp marker (indicated by M) shows the size of the PCR products. White gray, and black circles indicate 0~30%, 30~70% and 70~100% methylation, respectively. The promoter region of the Oct-4 gene was hypomethylated in IVF but was hypermethylated in SCNT blastocyst.

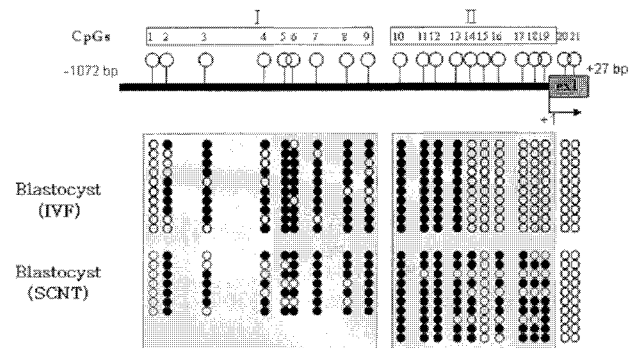


Fig. 3. Methylation status of CpGs in the promoter region of Oct-4 in IVF and SCNT blastocysts. Methylation status of each CpG in the 5' regions of Oct-4 analyzed by means of sodium bisulfite genomic sequencing method, are shown. Open and closed circles indicate unmethylated and methylated cytosine residues, respectively.

역을 bisulfite genomic sequencing을 수행하였다.

앞의 restriction mapping 결과와 마찬가지로 SCNT에서는 IVF 배반포의 52.6%에 비하여 75.3%의 고메틸화를 보였다. 특히 promoter 영역 내 그룹 II의 14, 16~19번 5개의 CpG들은 IVF 배반포가 완전히 탈메틸화 된 것과는 달리 SCNT 배반포에서 대부분 메틸화되었다. 이들 결과는 Oct-4 상류 promoter 영역에 메틸화 가변영역(tissue-dependent differentially methylated region: T-DMR)이 존재하며, SCNT에서 IVF 배반포와 다른 불완전한 탈메틸화가 존재하며, 이에 따라 Oct-4 발현에 이상이 있음을 시사하고 있다.

고 찰

많은 유전자들은 메틸화 가변영역(T-DMR)을 가지며, 그 T-DMR들의 DNA 메틸화 프로파일들은 조직특이적 발달특이적으로 유전자들의 발현을 조절한다(Shiota 등, 2002). Oct-4 유전자의 발현은 promoter와 2개의 enhancer 영역이 관여하고 있는 것으로 알려져 있고(Yoem 등, 1996), 마우스와 원숭이의 확장 배반포에서 Oct-4 단백질은 TE에서 발현되지 않는데 비하여, 소에서는 초기 또는 확장 배반포에서 Oct-4가 ICM과 TE 양쪽 모두에서 발현한다(van Eijk 등, 1999; Kirchhof 등, 2000). 마우스에 비하여 소에서 Oct-4 단백질이 TE에 존재함은 소에서 Oct-4가 영양막외배엽(TE) 기능 차이에 관여할 수 있음을 추론할 수 있다. 소 수정란의 착상은 마우스에 비하여 지연되고, 배반포는 착상 전 TE의 대규모 증식과 함께 확장과 연장이 이루어진다. 또한, 돼지에 있어서도 임신 10~12일간의 peri-implantation 동안 지연되어 지속적인 발현이 보이고, 15~17일 이후 착상 발현이 억제된다(Spencer 등, 2006). 소에서 Oct-4는 interferon- γ 와 같이, TE 특이적인 유전자들이 억제에 작용할 수 있고, TE의 분화조절에 관련됨을 보고하고 있다(Vigneault 등, 2004). 이렇듯, TE에 존재하는 Oct-4 단백질은 preimplantation 수정란 발달 동안에 extraembryonic-lineage 특이적인 유전자들의 발현을 억제하거나 착상 전 TE의 증식을 허용할지 모른다. 우리의 결과에서도 IVF 배반포에서 Oct-4 단백질의 발현은 ICM 뿐만 아니라 TE에서도 강하게 발현되었다. 그러나 복제배반포에서 Oct-4 전사산물이 RT-PCR 결과 보이지 않거나 미약하게 발현되었고, 단백질의 발현 결과는 정상과 다른 다양한 발현 패턴을 보였다. 이전의 보고에서도 대부분의 복제된 마우스 배반포에서 Oct-4 발현은 비정상적이고 이러한 비정상적인 발현이 복제산자 생산의 낮은 원인으로 알려져 있다(Boiani 등, 2002). 그러므로 NT 배반포에서 Oct-4 전사산물과 단백질의 발현을 조사하는 것으로 핵이식 수정란의 정상적인 핵 리프로그래밍 평가를 위한 수단으로 이용 가능성이 제기되었고, 또한, 복제수정란 생산 효율 향상을 위한 배양 체계 개선 방법의 검증 수단과 수란우에 복제수정란을 이식할

때 이식 전 복제수정란의 질 평가를 위한 유용한 수단으로 이용 가치가 있을 것으로 고려되어 왔다. 그리고 복제 동물에서 빈번하게 대반의 이상이 관찰되기에, 특히 extraembryonic-lineage 분화에 포함되어 상호작용하는 단백질 파트너와 관련하여 Oct-4 이외 임신 착상 signal 관련 유전자들의 발현을 분석하는 것 또한 임신 초기 복제에서 보이는 여러 가지 이상에 관한 정보를 제공할 것이다.

최근의 많은 연구에서 착상 전 초기 배발달 과정에서 복제란의 메틸화 이상을 보고하고 있으며(Thomas 등 2001; Bourc'his 등, 2001; Kang 등, 2001), 이들 결과는 게놈 전체적인 메틸화를 반영하고 있다. 게놈의 많은 부분들이 유전자 영역이 아닌 반복 영역으로 구성되어 있기에, DNA 메틸화 수준은 유전자 영역의 한정된 영역이 아닌 genome-wide 반복 영역의 메틸화를 반영하기 쉽다. CpG Island의 DNA 메틸화는 조직특이적인 유전자들의 발현을 조절하고 있기에 복제 동물에서 보여지는 비정상적인 표현형들은 CpG Island들의 불완전한 메틸화를 반영하기 쉽다. 소 Oct-4는 유전자 구조, 염기 서열, 유전자의 위치, 조절 영역이 마우스와 인간에서 높게 보존되어 있고, 발현 패턴과 기능 또한 보존되어 있다(Nordhoff 등, 2001). 마우스의 경우, Oct-4 유전자의 promoter 근방으로부터 enhancer에 이르는 1.1kb에 있어서 T-DMR이 존재하는 것이 밝혀졌고, DNA 메틸화에 의해 발현이 제어 받고 있다(Hatori 등, 2004). Beaujean 등의 보고에서도 면양 체세포 핵이식 수정란이 각 stage에서 계속적으로 고메틸화를 보이며 이후 배반포에서 고메틸화되어 있다(Beaujean 등, 2004). 우리의 이전의 보고에서 소 Oct-4 T-DMR의 DNA 메틸화 상태는 착상 전 배 발달 동안에 특정 stage에서 독특한 메틸화 패턴을 갖고 변화함을 보고하였다(Kim 2007; Ko, 2008). 우리의 결과는 IVF 배반포는 Oct-4 유전자가 강하게 발현되었을 때 그 promoter 영역은 저메틸화되고, Oct-4 유전자가 발현되지 않은 SCNT에서는 고메틸화되어 Oct-4 발현이 메틸화에 의해 제어 받고 있음을 부분적으로 추론할 수 있다. SCNT 배반포에서 비정상적인 발현과 그에 따른 DNA 메틸화의 이상을 야기하였음을 시사하고 있다. 결과적으로 Oct-4 promoter에서 보이는 복제배반포의 고메틸화는 Oct-4 유전자 발현 program을 바꿔 발달 잠재성의 혼란을 초래하기 쉬울 것이고, 이식 후 착상에 이르지 못하게 하는 한 요인이 되는 것 같다.

참고문헌

- Beaujean N, Taylor JE, McGarry M, Gardner JO, Wilmut I, Loi P, Ptak G, Galli C, Lazzari G, Bird A, Young LE and Meehan RR. 2004. The effect of interspecific oocytes on demethylation of sperm DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:7636-7640.

- Boiani M, Eckardt S, Scholer HR and McLaughlin KJ. 2002. Oct-4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes. Dev.* 16:1209-1219.
- Bourchis D, Le Bourhis D, Patin D, Niveleau A, Comizzoli P, Renard JP and Viegas-Pequignot E. 2001. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Curr. Biol.* 11:1542-1546.
- Hattori N, Nishino K, Ko YG, Hattori N, Ohgane J, Tanaka S and 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.
- Hill JR, Winger QA, Long CR, Looney CR, Thompson JA and Westhusin ME. 2000. Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biol. Reprod.* 62:1135-1140.
- Im GS, Yang BS, Yang BC, Chang WK, Yi YJ and Park CS. 2001. Effect of cell cycle stage on the development of embryos produced by cumulus cell nuclear transfer in Hanwoo (Korea cattle). *Asian-Aus. J. Anim. Sci.* 14:759-764.
- Kang YK, Koo DB, Park JS, Choi YH, Chung AS, Lee KK and Han YM. 2001. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat. Genet.* 28:173-177.
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H and Tsunoda Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282:2095-2098.
- Kim JM, Ko YG, Seong HH, Chung HJ, Chang WK and 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.
- Kirchhof N, Carnwath JW, Lemme E, Anastassiadis K, Scholer H and Niemann H. 2000. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biol. Reprod.* 63:1698-1705.
- Ko YG, Nishino K, Hattori N, Arai Y, Tanaka S and Shiota K. 2005. Stage-by-stage change in DNA methylation status of Dnmt1 locus during mouse early development. *J. Biol. Chem.* 280:9627-9634.
- Kremenskoy M, Kremenska Y, Suzuki M, Imai K, Takahashi S, Hashizume K, Yagi S and 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.
- Kubota C, Yang X, Dinnyes A, Todoroki J, Yamakuchi H, Mizoshita K, Inohae S and Tabara N. 1998. *In vitro* and *in vivo* survival of frozen-thawed bovine oocytes after IVF, nuclear transfer, and parthenogenetic activation. *Mol. Reprod. Dev.* 51:281-286.
- Mizoshita K, Watanabe T, Hayashi H, Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J and Sugimoto Y. 2004. Quantitative trait loci analysis for growth and carcass traits in a half-sib family of purebred Japanese Black (Wagyu) cattle. *J. Anim. Sci.* 82:3415-3420.
- Nordhoff V, Hubner K, Bauer A, Orlova I, Malapetsa A and Scholer HR. 2001. Comparative analysis of human, bovine, and murine Oct-4 upstream promoter sequences. *Mamm. Genome* 12:309-317.
- Ohgane J, Wakayama T, Kogo Y, Senda S, Hattori N, Tanaka S, Yanagimachi R and Shiota K. 2001. DNA methylation variation in cloned mice. *Genesis* 30:45-50.
- Ohgane J, Wakayama T, Senda S, Yamazaki Y, Inoue K, Ogura A, Marh J, Tanaka S, Yanagimachi R and 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.
- Okamoto K, Okazawa H, Okuda A, Sakai M, Muramatsu M and Hamada H. 1990. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* 60:461-472.
- Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A and Campbell KH. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407:86-90.
- Renard JP, Chastant S, Chesne P, Richard C, Marchal J, Cordonnier N, Chavatte P and Vignon X. 1999. Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. *Lancet* 353:1489-1491.
- Rhind SM, Taylor JE, De Sousa PA, King TJ, McGarry M and Wilmut I. 2003. Human cloning: can it be made safe? *Nat. Rev. Genet.* 4:855-864.
- Rosner MH, Vigano MA, Ozato K, Timmons PM, Poirier F, Rigby PW and Staudt LM. 1990. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* 345:686-692.
- Scholer HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K and Gruss P. 1990. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* 344:435-439.
- Shiota K, Kogo Y, Ohgane J, Imamura T, Urano A, Nishino K, Tanaka S and Hattori N. 2002. Epigenetic marks by DNA methylation specific to stem, germ and somatic cells in mice.

- Genes. Cells 7:961-969.
- Spencer DS, Ross JW, Ashworth MD, Geisert RD and Rickords LF. 2006. Porcine conceptus Oct-4 mRNA expression during peri-implantation development. *Reprod. Domest. Anim.* 41:571-572.
- Thomas L, Wallace JM, Aitken RP, Mercer JG, Trayhurn P and Hoggard N. 2001. Circulating leptin during ovine pregnancy in relation to maternal nutrition, body composition and pregnancy outcome. *J. Endocrinol.* 169:465-476.
- Tian XC, Xu J and Yang X. 2000. Normal telomere lengths found in cloned cattle. *Nat. Genet.* 26:272-273.
- 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 and Gandolfi F. 1999. Molecular cloning, genetic mapping, and developmental expression of bovine POU5F1. *Biol. Reprod.* 60:1093-1103.
- Vigneault C, McGraw S, Massicotte L and Sirard MA. 2004. Transcription factor expression patterns in bovine *in vitro*-derived embryos prior to maternal-zygotic transition. *Biol. Reprod.* 70:1701-1709.
- Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M and Johnson KR, Yanagimachi R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394:369-374.
- Wells DN, Misica PM and Tervit HR. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol. Reprod.* 60:996-1005.
- Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ and Campbell KH. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813.
- Yeom YI, Fuhrmann G, Ovitt CE, Brehm A, Ohbo K, Gross M, Hubner K and Scholer HR. 1996. Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development* 122:881-894.
- 고응규, 김종무, 김동훈, 차병현, 황성수, 양병철, 임기순, 김명직, 민관식, 성환후. 2008. 소 착상 전 초기수정란에서 Oct-4 유전자 Promoter 영역의 DNA 메틸화 변화. *한국가축번식학회지* 32(1):33-38.

(접수일: 2008. 6. 1 / 채택일: 2008. 9. 12)