

Original Article

# 마우스 수정란에 있어서 부계 DNA 손상이 부계 DNA 퇴화 및 초기 배발달에 미치는 영향

김창진, 이경본\*

전남대학교 사범대학 생물교육과

## Effect of Paternal DNA Damage on Paternal DNA Degradation and Early Embryonic Development in Mouse Embryo: Supporting Evidence by GammaH2AX Expression

Chang Jin Kim and Kyung-Bon Lee\*

Department of Biology Education, College of Education, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

Received September 6, 2019  
Revised September 17, 2019  
Accepted September 23, 2019

**\*Correspondence**

Kyung-Bon Lee  
E-mail: [kblee@jnu.ac.kr](mailto:kblee@jnu.ac.kr)

**ORCID**

<https://orcid.org/0000-0001-9825-8891>

**ABSTRACT** This study was investigated to test whether the zygote recognized the topoisomerase II beta (TOP2B) mediated DNA fragmentation in epididymal spermatozoa or the nuclease degradation in vas deferens spermatozoa by testing for the presence of gammaH2AX ( $\gamma$ H2AX). The  $\gamma$ H2AX is phosphorylation of histone protein H2AX on serine 139 occurs at sites flanking DNA double-stranded breaks (DSBs). The presence of  $\gamma$ H2AX in the pronuclei of mouse zygotes which were injected with DNA broke epididymal spermatozoa was tested by immunohistochemistry at 5 and 9 h post fertilization, respectively. Paternal pronuclei that arose from epididymal spermatozoa treated with divalent cations did not stain for  $\gamma$ H2AX at 5 h. On the other hand, in embryos injected with vas deferences spermatozoa that had been treated with divalent cations,  $\gamma$ H2AX was only present in paternal pronuclei, and not the maternal pronuclei at 5 h. Interestingly, both pronuclei stained positively for  $\gamma$ H2AX for all treatments and controls at 9 h after sperm injection. In conclusion, the embryos recognize DNA that is damaged by nuclease, but not by TOP2B because H2AX in phosphorylated in paternal pronuclei resulting from spermatozoa treated with fragmented DNA from vas deferens spermatozoa treated with divalent cations, but not from epididymal spermatozoa treated the same way.

**Keywords:** DNA degradation, DNA fragmentation, DNA licensing, DNA replication, gammaH2AX

## 서론

포유동물은 세포주기 중 G1기에 DNA복제 라이센싱 기작이 이루어진다. G1기 이후 S기에 DNA복제가 시작되는데 DNA복제와 관련하여 포유동물의 1-세포기 수정란만의 독특한 특징이 존재한다. 포유동물 1-세포기 수정란의 특징은 수정이 된 후 일정시간이 지나면 정자 염색질(sperm chromatin)이 부계 전핵(paternal pronuclear)의 형태로 형성되며, 난자는 제2감수분열을 마치고 모계 염색질(maternal chromatin)이 모계 전핵(maternal pronuclear)의 형태로 탈 응축(decondensation)되어 형성된다. 또한 부계 전핵과 모계 전핵은 동일 세포질에서 서로 시·공간적으로 분리되어 라이센싱과 복제가 이루어진다(Blow와 Laskey, 1988; Leno 등, 1992; Blow, 1993). 첫 번째 DNA복제주기를 거치고 나서 DNA는 응축된 유사분열 염색체(mitosis chromosome)의 형태로 중기판(metaphase plate)에 배열되어 합쳐진다. 정상적인 교배 과정을 거쳐 만들어진 수정란의 경우 수정 후 4시간째에 전핵이 형성되고 5.5시간째에 DNA복제가 시작된다(Ortega 등, 2011). 이처럼 포유동물의 초기 수정란 내 2개로 구분된 전핵에서 라이센싱 및 복제의 특성은 DNA복제 관련 연구에 좋은 연구 사례 및 연구 모델이 된다(Sirlin과 Edwards, 1959; Kim 등, 2017).

마우스 정자에 2가 양이온(divalent cation)인  $MnCl_2$ 와  $CaCl_2$ 를 처리하면 Topoisomerase II B (TOP2B)에 의해 대략 25-50 kb크기의 DNA절편으로 나뉘는데 이를 정자 염색질 조각(sperm chromatin fragmentation, SCF)이라 한다(Shaman 등, 2006). 이러한 SCF는 EDTA에 의해 회복이 가능하며 이러한 회복된 SCF를 SCF-religated라 한다. 하지만 SCF의 형성과 EDTA에 의한 회복은 정자가 존재하는 위치에 따라 회복 정도가 달리 일어난다. 보고된 논문에 따르면, 정관 정자(vas deferens sperm)가 부정소 정자(epididymal sperm)보다 더욱 광범위하게 SCF가 일어나며(Yamauchi 등, 2007), EDTA에 의한 회복도 vas deferens sperm보다 epididymal sperm에서 거의 완벽하게 회복되었다(Shaman 등, 2006).

진핵생물에서 DNA의 이중 나선이 손상되면 세포 내에서 일어나는 초기 반응 중 하나는 히스톤 단백질 변이체인 H2AX의 인산화이다. H2AX의 C-terminal tail에 존재하는 Serine 139 (Ser139)가 손상되면, 손상 후 1-3분 안에 Serine139가 인산화된다. 인산화 된 H2AX 분자의 수는 손상이 심할수록 이에 비례하여 증가한다. 이처럼 인산화 된 형태의 H2AX를 gammaH2AX ( $\gamma$ H2AX)라 한다(Rogakou 등, 1998; Redon 등, 2010). 특히 마우스 수정란에서는 H2AX가 히스톤 H2A의 주된 형태로 존재하기 때문에(Nashun 등, 2010), 마우스 배아가 DNA손상에 있어서 비정상적으로 민감할 수 있다는 가능성도 제기된다(Gawecka 등, 2013). 이러한 H2AX의 인산화가 수정란에서 발생하는 것을 통해 세포가 DNA손상을 인식하는 능력을 갖고 있음을 추정할 수 있다. 그러나 마우스 수정란의 경우는 위에서도 언급되었듯이 수정 후

동일한 세포질에 2개의 서로 다른 전핵으로 구분되어 있다는 점에서 복잡하기 때문에 이와 관련하여 심도 있게 연구되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 마우스의 epididymal sperm과 vas deferens sperm에 실험적 조작을 가하여 SCF와 SCF-religated를 유도한 후, 세포질 내 정자미세주입(Intracytoplasmic sperm injection, ICSI)을 이용하여 1세포기 수정란을 만들어 1-세포기 수정란의 전핵에서  $\gamma$ -H2AX의 발현을 확인하였다. 또한, 수정란이 손상된 DNA를 인식할 수 있는지와 부계 DNA손상이 향후 배아 발달에 미치는 영향을 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 공시 재료

본 연구에 사용된 마우스는 B6D2F1 (C57BL/6N X DBA/2)으로 온도  $23 \pm 1^\circ C$ , 습도  $50 \pm 1\%$  내외, 그리고 12시간 명암 주기(light 8:00-20:00, dark 20:00-8:00)로 유지되는 동물 사육실에서 사육하였다. 1주간의 적응 기간 동안 실험 동물에게 음식과 물을 자유로이 공급하였다. 모든 실험 계획은 전남대학교 동물윤리위원회의 규정에 의거해서 실험하였다. 본 재료 및 방법에서 별도로 회사를 기재하지 않은 시약은 모두 Sigma-Aldrich사의 제품을 사용하였다.

### 정자 준비

8-12주령의 마우스의 epididymis 및 vas deferens의 내강 내용물을 분리 추출하여 HCZB (Hepes-CZB) 배양액(Kimura와 Yanagimachi, 1995)에 넣는다. 정자를 HCZB배양액에 넣은 후 피펫팅으로 고르게 섞어준 후 control, SCF 및 SCF-religated 그룹으로 각각 나누었다. Control 그룹의 정자는 실온(room temperature)에서 1시간 30분 동안 배양하였다. SCF 그룹과 SCF-religated 그룹은 10 mM  $MnCl_2$ 와  $CaCl_2$ 를 첨가한 후 실온에서 1시간 30분 동안 배양하였다. 그 후, SCF-religated 그룹에는 100 mM EDTA를 첨가하고 다시 실온에서 30분 동안 추가 배양하였다. 배양 후 정자들은 바로 세포질 내 정자 미세 주입에 이용하였다.

### 과배란 유도 및 난자 채취

8-12주령의 성숙한 암컷 마우스에 5 IU eCG를 복강 주사하고, 48시간 후 5 IU hCG를 주입하여 과배란을 유도하였다. hCG 주입 후 14-15시간에 난관(oviduct)을 절개하여 배란된 난구세포-난자 복합체(cumulus-oocyte complexes)를 방출시켜 0.1% hyaluronidase (300 USP units/mg)가 함유된 HCZB 배양액에 침지하였다. 난구 세포가 분리된 난자는 HCZB 배양액으로 3회 세척 후 즉시 세포질 내 정자 미세 주입에 이용하였다.

## 세포질 내 정자 미세 주입(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)

ICSI는 Szczygiel와 Yanagimachi의 방법(2003)을 변형하여 실시하였다. 먼저 60 mm petri dish (Falcon, NJ, USA)에 12% PVP (polyvinyl pyrrolidone)가 포함된 HCZB 배양액 소적을 만든 후 이와 동일한 부피의 정자 부유액 소적을 만들어 두 소적을 섞어주었다. 그 후, 준비된 난자 1개당 1개의 정자 머리를 주입하였다. 난자에 정자 머리(head)의 주입 과정은 Eppendorf Micromanipulators (Micromanipulator Transferman, Eppendorf, Germany)와 Piezo-electric actuator (PMM Controller, model PMAS-CT150, Prime Tech, Tsukuba, Japan)을 이용하여 실시하였다. 제일 먼저 하나의 정자를 주입용 피펫 (injection pipette)으로 꼬리(tail)를 우선 흡인한 후 압전 전류 (piezo pulse)를 흘려 중편과 꼬리를 떼어 내었다. 그 후, 머리를 주입용 피펫으로 재 흡인한 후 난자 안에 즉시 주입하였다.

## 체외 배양

ICSI를 이용하여 정자가 주입된 난자는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 CZB 배양액을 이용하여 배양하였다. 1-세포기 수정란에서  $\gamma$ H2AX 발현 확인은 ICSI 후 각각 5, 9시간째에 이를 확인하였다.

## $\gamma$ H2AX의 면역형광염색

마우스 1-세포기 수정란을 CZB 배양액에 배양한 후 실온에서 30분 동안 4% 파라포름알데히드로 고정하였다. 파라포름알데히드 저장 용액은 고정 전 16% 저장 용액(Alfa Aesar stock no. 43368)을 희석하여 4%로 만든 후 하룻밤 동안 4°C에 보관한 후 이용하였다. 고정 후, 세포를 씻어 낸 후 10분 동안 0.1% Tween 이 함유된 PBS (PBST)로 2회 세척하였다. 그 후 1-세포기 수정란을 15분 동안 0.5% Triton X-100으로 permeabilization 시킨 후 0.5% BSA가 함유된 PBST로 10분씩, 2회 세척하였다. 그 후, 실온에서 1시간 동안 BSA로 blocking 후 4°C에서 하룻밤 동안 1:300으로 희석시킨 1차 항체에 배양하였다. 배양 후 1세포기 수정란을 0.5% BSA가 함유된 PBST로 10분씩 2회 세척하고 1시간 동안 실온에서 1:1000으로 희석된 형광물질이 붙어있는 2차 항체가 부착되도록 배양하였다. 형광표지 후, 1-세포기 수정란을 PBST로 10분씩, 3회 세척하였다. 슬라이드글라스에 ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen, USA)를 떨어 뜨려 소적을 만들고 수정란을 투여한 후, 커버글라스로 덮고 형광현미경으로 관찰하였다. 1차 항체로 anti-phospho Histone H2AX (Ser139) (Millipore, USA)를 이용하였다. 2차 항체는 Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546 (Invitrogen, USA)을 이용하였다.

## 통계 분석

본 연구에서는 각 실험군에 대하여 4회 이상 반복 실험을 실시하였고, 얻어진 모든 실험 결과의 통계 처리는 SPSS software

(Version 13.0)를 이용한 일원분산분석법(One-way ANOVA)으로 처리구간 유의성을 검정하였으며,  $p < 0.05$ 의 유의성만을 통계학적 차이가 있는 것으로 인정하였다.

## 결 과

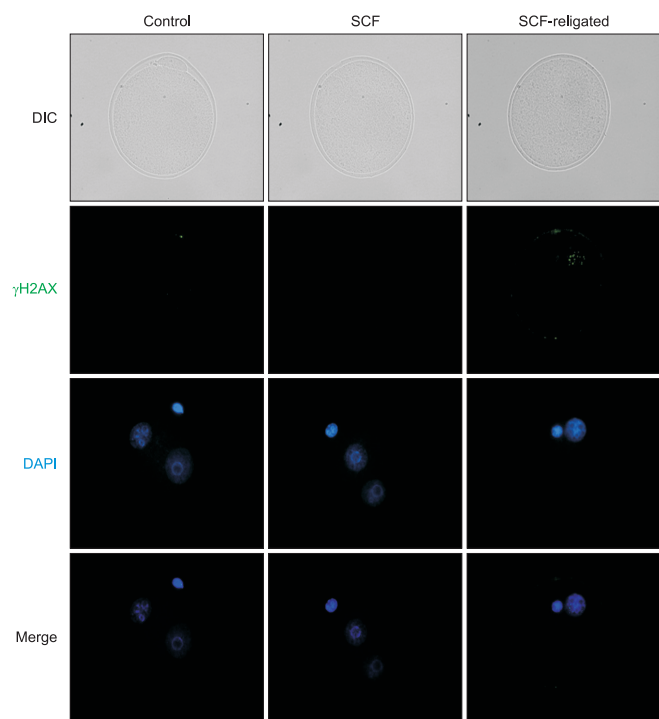
### SCF와 SCF-religated가 $\gamma$ H2AX의 발현에 미치는 영향

1-세포기 수정란에서  $\gamma$ H2AX 발현을 확인함으로써 1-세포기 수정란이 손상된 부계 전핵을 인식하는지 확인하였다. Gawecka 등(2013)의 연구결과에서는  $\gamma$ H2AX가 발현되는 패턴을 따라 부분적으로 관찰된 경우를 punctate expression, 전핵 전체에 걸쳐 관찰된 경우를 fluid expression으로 구분하였다. 본 연구에서는  $\gamma$ H2AX가 부분적으로만 관찰된 경우를 partial expression, 전핵 전체에 걸쳐 관찰된 경우를 full expression으로 구분하였다.

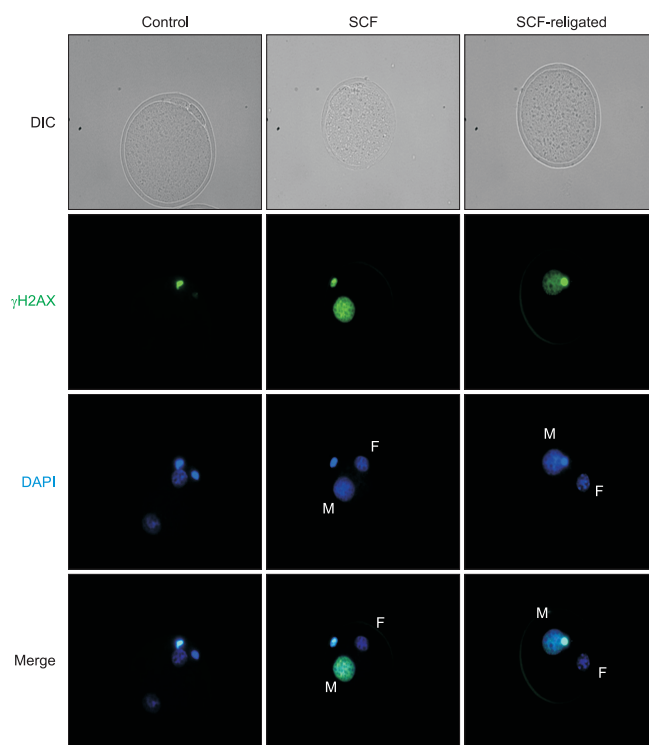
정자 주입 후 5시간 째(DNA복제 전) epididymal sperm-Control (Epi-Con), epididymal sperm-SCF (Epi-SCF) 및 epididymal sperm-SCF-religated (Epi-SCF-religated) 그룹의 전핵에서  $\gamma$ H2AX가 발현되지 않은 경우는 각각 81.0%, 30.7% 및 28.3%였다. Epi-SCF 그룹은 Epi-Con과 Epi-SCF-religated 그룹과 비교했을 때 유의적으로 높았다( $p < 0.05$ ). 그리고 Epi-Con, Epi-SCF 및 Epi-SCF-religated 그룹의 부계 전핵에서만  $\gamma$ H2AX가 partial로 발현된 경우는 각각 19.1%, 49.0% 및 44.5%였다. Epi-Con 그룹은 Epi-SCF 및 Epi-SCF-religated 그룹과 비교했을 때, 유의적으로 낮았다( $p < 0.05$ ). Epi-Con, Epi-SCF 및 Epi-SCF-religated 그룹의 부계 전핵에서만  $\gamma$ H2AX가 full로 발현된 경우는 각각 0%, 20.3% 및 27.3%였다. 각 그룹을 비교했을 때, 유의적 차이는 없었다(Fig. 1, Table 1).

정자 주입 후 5시간 째(DNA복제 전) vas deferens sperm-Control (Vas-Con), vas deferens sperm-SCF (Vas-SCF) 및 vas deferens sperm-SCF-religated (Vas-SCF-religated) 그룹의 전핵에서  $\gamma$ H2AX가 발현되지 않은 경우는 각각 46.6%, 5.8% 및 7.1%였다. Vas-Con 그룹은 Vas-SCF 및 Vas-SCF-religated 그룹과 비교했을 때, 유의적으로 높았다( $p < 0.05$ ). Vas-Con, Vas-SCF 및 Vas-SCF-religated 그룹의 전핵에서  $\gamma$ H2AX가 partial로 발현된 경우는 각각 53.4%, 42.7% 및 22.8%였다. Vas-Con과 Vas-SCF 그룹은 Vas-SCF-religated 그룹과 비교했을 때 유의적으로 높았다( $p < 0.05$ ). Vas-Con, Vas-SCF 및 Vas-SCF-religated 그룹의 전핵에서  $\gamma$ H2AX가 full로 발현된 경우는 각각 0%, 51.5% 및 70.1%였다. Vas-SCF와 Vas-SCF-religated 그룹을 비교했을 때, Vas-SCF-religated 그룹이 유의적으로 높았다( $p < 0.05$ ) (Fig. 2, Table 2).

정자 주입 후 9시간 째(DNA복제 진행 중) Epi-Con, Epi-SCF 및 Epi-SCF-religated 그룹의 전핵에서  $\gamma$ H2AX가 발현되지 않은 경우와 부계 전핵에서만 partial로 발현된 경우는 없었다. Epi-Con, Epi-SCF 및 Epi-SCF-religated 그룹의 부계 전핵에



**Fig. 1.** Immunocytochemical localization of  $\gamma$ H2AX at 5 h after epididymal sperm injection into mouse oocyte (before DNA synthesis). Embryos were fixed and stained for  $\gamma$ H2AX (green). Pronuclei were also stained with DAPI (blue) and then visualized by confocal microscopy.



**Fig. 2.** Immunocytochemical localization of  $\gamma$ H2AX at 5 h after vas deferens sperm injection into mouse oocyte (before DNA synthesis). Embryos were fixed and stained for  $\gamma$ H2AX (green). Pronuclei were also stained with DAPI (blue) and then visualized by confocal microscopy. F: female pronuclei, M: male pronuclei.

**Table 1.**  $\gamma$ H2AX expression at 5 h after epididymal sperm injection into mouse oocyte (before DNA synthesis)

Group	No. of injected oocytes	No. of zygotes (%)		
		None	Partially stained with MPN	Fully stained with MPN
Control	104	84 (81.0 $\pm$ 2.6) <sup>a</sup>	20 (19.1 $\pm$ 2.6) <sup>a</sup>	0 (0.0)
SCF	107	33 (30.7 $\pm$ 2.4) <sup>b</sup>	52 (49.0 $\pm$ 3.2) <sup>b</sup>	22 (20.3 $\pm$ 2.8)
SCF-religated	99	28 (28.3 $\pm$ 1.6) <sup>b</sup>	44 (44.5 $\pm$ 1.2) <sup>b</sup>	27 (27.3 $\pm$ 2.5)

MPN: male pronuclei, FPN: female pronuclei, SCF: sperm chromatin fragmentation.

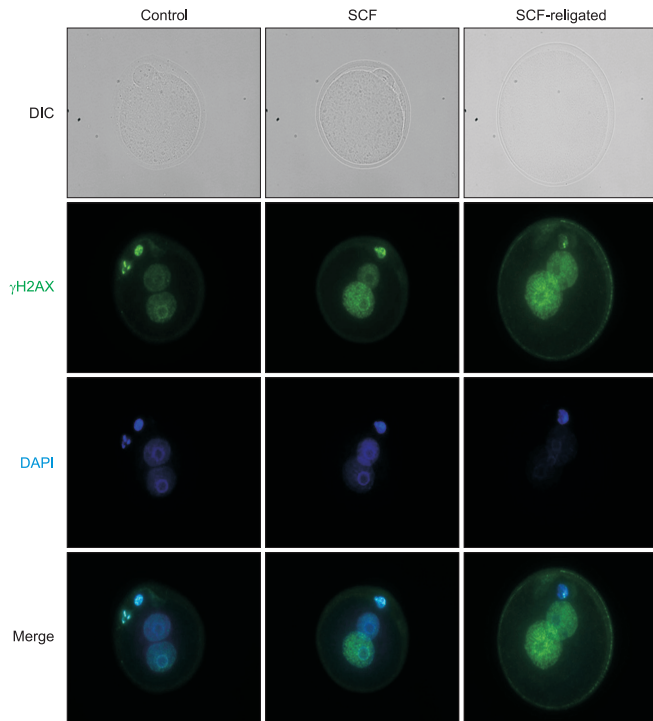
<sup>a,b</sup>Values with different superscripts within the same columns are different significantly ( $p < 0.05$ ).

**Table 2.**  $\gamma$ H2AX expression at 5 h after vas deferens sperm injection into mouse oocyte (before DNA synthesis)

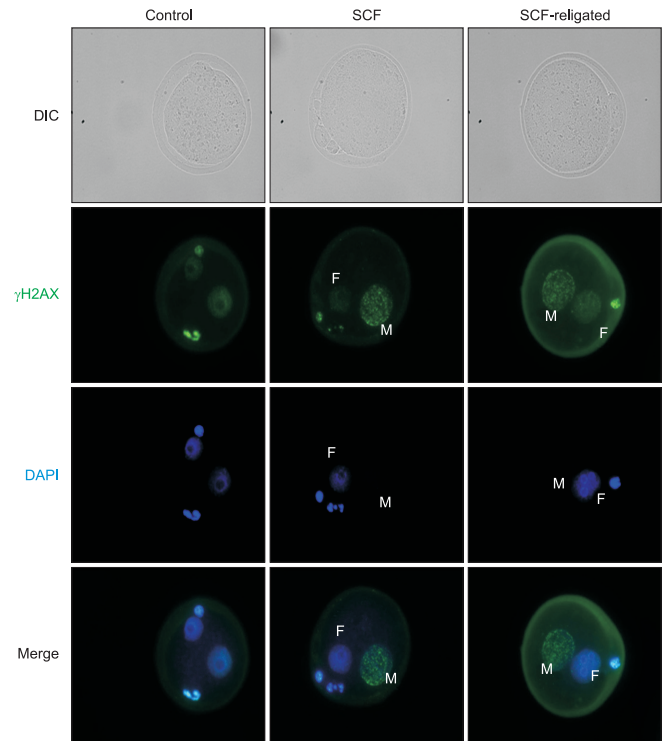
Group	No. of injected oocytes	No. of zygotes (%)		
		None	Partially stained with MPN	Fully stained with MPN
Control	99	46 (46.6 $\pm$ 3.8) <sup>a</sup>	53 (53.4 $\pm$ 3.8) <sup>a</sup>	0 (0.0)
SCF	103	6 (5.8 $\pm$ 1.0) <sup>b</sup>	44 (42.7 $\pm$ 4.1) <sup>a</sup>	53 (51.5 $\pm$ 3.3) <sup>a</sup>
SCF-religated	93	7 (7.1 $\pm$ 1.2) <sup>b</sup>	21 (22.8 $\pm$ 3.3) <sup>b</sup>	65 (70.1 $\pm$ 3.5) <sup>b</sup>

MPN: male pronuclei, FPN: female pronuclei, SCF: sperm chromatin fragmentation.

<sup>a,b</sup>Values with different superscripts within the same columns are different significantly ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 3.** Immunocytochemical localization of  $\gamma$ H2AX at 9 h after epididymal sperm injection into mouse oocyte (during DNA synthesis). Embryos were fixed and stained for  $\gamma$ H2AX (green). Pronuclei were also stained with DAPI (blue) and then visualized by confocal microscopy.



**Fig. 4.** Immunocytochemical localization of  $\gamma$ H2AX at 9 h after vas deferens sperm injection into mouse oocyte (during DNA synthesis). Embryos were fixed and stained for  $\gamma$ H2AX (green). Pronuclei were also stained with DAPI (blue) and then visualized by confocal microscopy. F: female pronuclei, M: male pronuclei.

**Table 3.**  $\gamma$ H2AX expression at 9 h after epididymal sperm injection into mouse oocyte (during DNA synthesis)

Group	No. of injected oocytes	No. of zygotes (%)			
		None (%)	Partially stained with MPN	Fully stained with MPN	Fully stained with MPN and FPN
Control	113	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (6.3 $\pm$ 0.9)	106 (93.8 $\pm$ 0.9)
SCF	112	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (6.4 $\pm$ 1.9)	105 (93.6 $\pm$ 1.9)
SCF-religated	106	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	106 (100)

MPN: male pronuclei, FPN: female pronuclei, SCF: sperm chromatin fragmentation.

**Table 4.**  $\gamma$ H2AX expression at 9 h after vas deferens sperm injection into mouse oocyte (during DNA synthesis)

Group	No. of injected oocytes	No. of zygotes (%)			
		None (%)	Partially stained with MPN	Fully stained with MPN	Fully stained with MPN and FPN
Control	102	0	11 (10.7 $\pm$ 1.0) <sup>a</sup>	16 (15.5 $\pm$ 2.8)	75 (73.8 $\pm$ 3.8) <sup>ab</sup>
SCF	102	0	18 (17.0 $\pm$ 2.4) <sup>b</sup>	17 (17.6 $\pm$ 2.7)	67 (65.5 $\pm$ 2.4) <sup>b</sup>
SCF-religated	102	0	6 (5.8 $\pm$ 0.7) <sup>c</sup>	16 (15.3 $\pm$ 2.3)	80 (79.0 $\pm$ 3.0) <sup>bc</sup>

MPN: male pronuclei, FPN: female pronuclei, SCF: sperm chromatin fragmentation.

<sup>a-c</sup>Values with different superscripts within the same columns are different significantly ( $p < 0.05$ ).

서  $\gamma$ H2AX가 full로 발현된 경우는 각각 6.3%, 6.4% 및 0%였다. 각 그룹을 비교했을 때, 유의적인 차이는 없었다. Epi-Con, Epi-SCF 및 Epi-SCF-religated 그룹의 부계와 모계 전핵에서  $\gamma$ H2AX가 full로 발현된 경우는 각각 93.8%, 93.6% 및 100%였다. 각 그룹을 비교했을 때, 유의적인 차이는 없었다(Fig. 3, Table 3).

정자 주입 후 9시간째(DNA복제 진행 중) Vas-Con, Vas-SCF 및 Vas-SCF-religated 그룹의 전핵에서  $\gamma$ H2AX가 모두 발현되었다. Vas-Con, Vas-SCF 및 Vas-SCF-religated 그룹의 부계 전핵에서  $\gamma$ H2AX가 partial로 발현된 경우는 각각 10.7%, 17.0% 및 5.8%였다. Vas-SCF 그룹이 Vas-Con과 Vas-SCF-religated 그룹보다 유의적으로 높았다( $p < 0.05$ ). Vas-Con, Vas-SCF 및 Vas-SCF-religated 그룹의 부계 전핵에서  $\gamma$ H2AX가 full로 발현된 경우는 각각 15.5%, 17.6% 및 15.3%였다. 각 그룹을 비교했을 때 유의적 차이는 없었다. Vas-Con, Vas-SCF 및 Vas-SCF-religated 그룹의 부계와 모계 전핵에서  $\gamma$ H2AX가 full로 발현된 경우는 각각 73.8%, 65.5% 및 79.0%였다. 각 그룹을 비교했을

때, 그룹 간에 유의적 차이가 있었다( $p < 0.05$ ) (Fig. 4, Table 4). 또한 정자 주입 후 9시간째(DNA합성 진행 중) Vas-SCF와 Vas-SCF-religated 그룹의 DAPI염색을 보면 DNA degradation이 되어 부계 전핵이 관찰되지 않았다(Fig. 4).

### SCF와 SCF-religated가 체외 배발달률에 미치는 영향

Epididymal sperm과 vas deferens sperm을 이용하여 SCF와 SCF-religated가 체외 배발달률에 미치는 영향을 알아보았다(Fig. 5, Table 5 및 Table 6). Epi-Con, Epi-SCF 및 Epi-SCF-religated 그룹의 난할률은 각각 97.5%, 94.1% 및 92.6%였다. DNA손상이 일어난 Epi-SCF와 Epi-SCF-religated 그룹의 난할률을 비교해봤을 때, 유의적인 차이가 없었다(Table 5). Vas-Con, Vas-SCF 및 Vas-SCF-religated 그룹의 난할률은 각각 94.1%, 37.0% 및 35.0%였다. Vas-Con 그룹보다 Vas-SCF와 Vas-SCF-religated 그룹의 난할률이 유의적으로 낮았다( $p < 0.05$ ) (Table 6).

**Table 5.** The portion of cleavage at 24 h after epididymal sperm injection into mouse oocyte

Group	No. of injected oocytes	No. of uncleaved embryos (%)	No. of cleaved embryos (%)
Control	113	3 (2.6 ± 0.8)	110 (97.5 ± 0.8)
SCF	104	6 (5.9 ± 2.0)	98 (94.1 ± 2.0)
SCF-religated	107	8 (7.4 ± 1.3)	99 (92.6 ± 1.3)

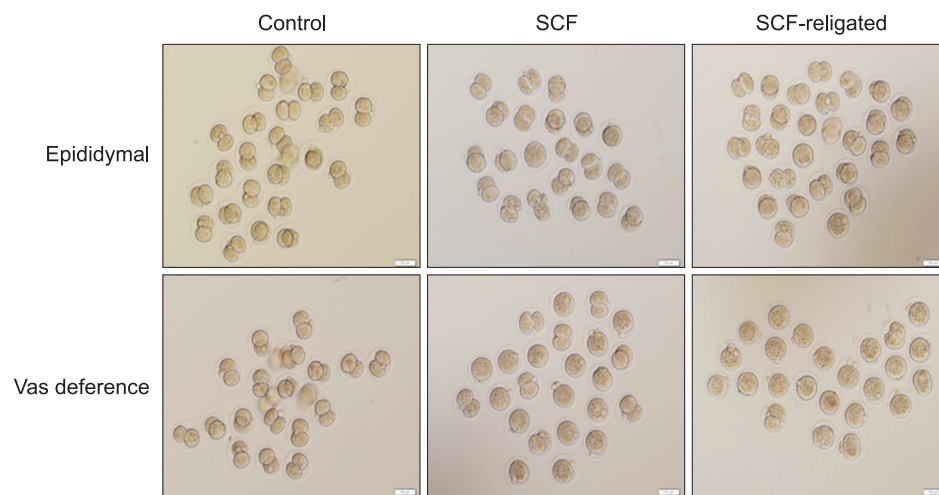
SCF: sperm chromatin fragmentation.

**Table 6.** The portion of cleavage at 24 h after vas deferens sperm injection into mouse oocyte

Group	No. of oocyte	No. of uncleaved (%)	No. of cleaved (%)
Control	101	6 (9 ± 0.9) <sup>a</sup>	95 (94.1 ± 0.9) <sup>a</sup>
SCF	106	67 (63.1 ± 1.3) <sup>b</sup>	39 (37.0 ± 1.3) <sup>b</sup>
SCF-religated	103	67 (65.0 ± 2.2) <sup>b</sup>	36 (35.0 ± 2.2) <sup>b</sup>

SCF: sperm chromatin fragmentation.

<sup>a,b</sup>Values with different superscripts within the same columns are different significantly ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 5.** Morphology of embryos cleaved at 24 h after epididymal and vas deferens sperm injection into mouse oocyte.

## 결론

포유동물의 1-세포기 수정란의 DNA에 심각한 손상이 존재할 경우 정상적인 배아 발달 과정이 진행되지 않는 것은 분명하다. 다만 DNA손상에 1-세포기 수정란의 반응 기작은 여전히 불분명하다. 따라서 DNA손상에 대한 1-세포기 수정란의 반응 기작에 대한 이해는 배아 발달 과정을 심도 있게 이해하는데 중요한 정보를 제공할 것이다. 따라서 본 연구에서는 DNA손상에 따른 1-세포기 수정란의 DNA 손상 인식 차이, 배아 발달의 차이를 연구하였다.

Epididymal sperm과 vas deferens sperm을 이용하여 SCF와 SCF-religated가  $\gamma$ H2AX 발현에 미치는 영향을 알아본 결과, DNA복제 전 Epi-Con그룹 보다 Epi-SCF와 Epi-SCF-religated 그룹의 부계 전핵에서  $\gamma$ H2AX가 관찰된 비율이 유의적으로 높았다. 또한, Vas-Con그룹 보다 Vas-SCF와 Vas-SCF-religated 그룹의 부계 전핵에서  $\gamma$ H2AX가 관찰된 비율이 유의적으로 높았다. 이는 정자의 DNA손상이 발생한 경우 부계 전핵에서 이를 인식하여  $\gamma$ H2AX가 발현되었음을 의미한다. 더불어 Epi-SCF와 Vas-SCF 그룹 간에 부계 전핵에서  $\gamma$ H2AX가 발현된 1-세포기 수정란의 비율을 비교했을 때, Vas-SCF 그룹이 Epi-SCF그룹보다 유의적으로 높았다. 이는 vas deferens sperm의 핵산분해효소의 추가적인 활성으로 DNA손상이 광범위하게 일어났고, 1-세포기 수정란이 이를 손쉽게 인식하여 H2AX의 인산화가 잘 일어난 것으로 유추할 수 있었다. 그리고, DNA복제 전 Epi-SCF-religated 그룹과 Vas-SCF-religated 그룹 간에 부계 전핵에서  $\gamma$ H2AX가 발현된 1-세포기 수정란의 비율을 비교했을 때, Vas-SCF-religated 그룹이 Epi-SCF-religated 그룹보다 유의적으로 높았다. 이는 vas deferens sperm이 epididymal sperm보다 DNA 손상이 광범위하게 이루어져 EDTA에 의해 완벽하게 회복되지 않는다는 연구결과와 일치함을 알 수 있었다(Yamauchi 등, 2007). 하지만, Epi-SCF와 Epi-SCF-religated 그룹 간의 부계 전핵에서  $\gamma$ H2AX가 발현된 비율을 비교했을 때, 매우 유사하였고 유의적으로 차이가 없었는데, 이는 Shaman 등의 연구결과와 다른 결과를 보였다(2006). Shaman 등에 따르면 SCF가 일어난 epididymal sperm은 EDTA에 의해 회복이 거의 완벽하게 이루어진다고 하였다. 이럴 경우 Epi-SCF-religated 그룹에서  $\gamma$ H2AX가 발현되는 비율이 Epi-SCF그룹보다 조금 낮아지거나 유의적으로 낮아질 것으로 예상하였기 때문이다.

DNA복제 전과 달리 DNA복제 진행 중에  $\gamma$ H2AX의 발현 결과는 앞선 결과와 달랐다. Epi-Con과 Epi-SCF 그룹 간에 부계 전핵에서만  $\gamma$ H2AX가 발현된 1-세포기 수정란의 비율을 비교했을 때, 유의적으로 차이 없이 낮은 비율이었다. 이는  $\gamma$ H2AX가 DNA 이중나선 절단 부위에서만 나타난다는 연구 결과(Rogakou 등, 1998; Redon 등, 2010)와도 일치하지 않았다. 또한, Epi-Con, Epi-SCF 및 Epi-SCF-religated 그룹 모두  $\gamma$ H2AX가 부계와 모계 전핵에서 발현된 1-세포기 수정란의 비율이 유의적 차이 없이

높은 비율이었다(Table 3). 다른 연구 결과에 따르면 포유류 1-세포기 수정란에서 H2AX 인산화는 DNA손상 없이 이루어질 수 있으며, 이는 H2AX가 수정란에서 대부분 H2A의 변이체로 존재하기 때문이다(Zigler-Birling 등, 2009; Nashun 등, 2010). 따라서, DNA복제 진행 중에 모계 전핵에서도  $\gamma$ H2AX가 발현된 것은 1-세포기 수정란에서 DNA복제 과정 중에 H2AX의 인산화과정 이 정상적인 일부로 추정할 수 있었다. 다만 정상적인 H2AX 인산화에 대해서는 향후 추가 연구가 필요하다고 생각된다.

Epididymal sperm과 vas deferens sperm을 이용하여 SCF와 SCF-religated가 체외배아발달에 미치는 영향을 알아보기 위해 조사한 난할률은 Epi-Con, Epi-SCF 및 Epi-SCF-religated 그룹 간에 유의적인 차이가 없었다. 이는 epididymal sperm의 DNA에 일정수준의 손상은 정상적인 배아 발달에 부정적인 영향을 미치지 않음을 나타냈다. 그리고 이러한 결과는 Gawecka 등 (2013)의 연구결과에서 SCF를 일으킨 Epididymal sperm로부터 만들어진 1-세포기 수정란이 24시간째에 2-세포기가 32.9% 이고 나머지는 1-세포 단계에서 전핵이 사라졌다는 결과와 일치하였다.

Vas-SCF와 Vas-SCF-religated 그룹은 Vas-Con 그룹에 비해 난할률이 유의적으로 낮았다. 이 역시 핵산분해효소에 의한 일정 규모 이상의 광범위한 DNA손상으로 1-세포기 수정란이 이를 손쉽게 인지하고, 이러한 손상된 DNA의 복제를 방지하기 위해 부계 전핵에서 DNA degradation이 일어남으로써 정상적인 배아 발달이 이루어지지 않아 난할률이 저하된 것으로 판단된다.

결론적으로, 본 연구에서 DNA복제 전 2가 양이온이 처리되어 SCF를 유도한 정자를 주입하여 만들어진 1-세포기 수정란은 손상된 DNA를 인지하였다. 또한, 1-세포기 수정란이 DNA손상을 인지하고 이러한 DNA 복제를 방지하기 위해 부계 전핵에서 전형적인 세포자살경로와는 다른 기작이 존재하는 것으로 판단되며, 이에 대한 구체적인 경로 파악을 위한 추가 연구가 필요한 것으로 판단된다.

## CONFLICTS OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (NRF-2017R1A2B4010283), Republic of Korea.

## ORCID

Chang Jin Kim: <https://orcid.org/0000-0002-7599-1502>  
Kyung-Bon Lee: <https://orcid.org/0000-0001-9825-8891>

## REFERENCES

- Blow JJ. 1993. Preventing re-replication of DNA in a single cell cycle: evidence for a replication licensing factor. *Journal of Cell Biology*. 122:993-1002.
- Blow JJ, Laskey RA. 1988. A role for the nuclear envelope in controlling DNA replication within the cell cycle. *Nature*. 332:546-548.
- Gawecka JE, Marh J, Ortega M, Yamauchi Y, Ward MA, Ward WS. 2013. Mouse zygotes respond to severe sperm DNA damage by delaying paternal DNA replication and embryonic development. *PLoS One*. 8:e56385.
- Kim CS, Kim TH, Lee EW, Lee KB. 2017. Evidence of DNA replication licensing and paternal DNA degradation by MCM7 and ORC2 in the mouse one-cell embryo. *Biomedical Science Letters*. 23:372-379.
- Kimura Y, Yanagimachi R. 1995. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol Reprod*. 52:709-720.
- Leno GH, Downes CS, Laskey RA. 1992. The nuclear membrane prevents replication of human G2 nuclei but not G1 nuclei in *Xenopus* egg extract. *Cell*. 69:151-158.
- Nashun B, Yukwa M, Liu H, Akiyama T, Aoki F. 2010. Changes in the nuclear deposition of histone H2A variants during preimplantation development in mice. *Development*. 137:3785-3794.
- Ortega MA, Sil P, Ward WS. 2011. Mammalian sperm chromatin as a model for chromatin function in DNA degradation and DNA replication. *Syst Biol Reprod Med*. 57(1-2):43-49.
- Redon CE, Nakamura AJ, Zhang YW, Ji JJ, Bonner WM, Kinders RJ, Parchment RE, Doroshow JH, Pommier Y. 2010. Histone gammaH2AX and poly(ADP-ribose) as clinical pharmacodynamic biomarkers. *Clin Cancer Res*. 16:4532-4542.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. 1998. DNA double stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*. 273:5858-5868.
- Shaman JA, Prisztoka R, Ward WS. 2006. Topoisomerase IIB and an extracellular nuclease interact to digest sperm DNA in an apoptotic-like manner. *Biol Reprod*. 75:741-748.
- Sirlin JL, Edwards RG. 1959. Timing of DNA synthesis in ovarian oocyte nuclei and pronuclei of the mouse. *Exp Cell Res*. 18:190-194.
- Yamauchi Y, Shaman JA, Ward WS. 2007. Topoisomerase II-mediated breaks in spermatozoa cause the specific degradation of paternal DNA in fertilized oocytes. *Biol Reprod*. 76:666-672.
- Yamauchi YS, Shaman JA, Boaz SM, Ward WS. 2007. Paternal pronuclear DNA degradation is functionally linked to DNA replication in mouse oocyte. *Biol Reprod*. 77:407-415.
- Zielger-Birling C, Helmrich A, Tora L, Torees-Padilla ME. 2009. Distribution of p53 binding protein 1 (53BP1) and phosphorylated H2A.X during mouse preimplantation development in the absence of DNA damage. *Int J Dev Biol*. 53:1003-1011.