Molecular Biological Method in Reproductive Medicine

서울대학교 분자생물학과

이 건 수

I. 분자생물학적 연구의 일반적 순서

분자생물학은 생명현상을 분자 수준에서 설명하려는 연구분야라고 정의할 수 있다. 생식 및 불임을 포함한 어떤 생명현상도 분자생물학적 연구방법의 적용대상이 될 수 있기에 분자생물학은 어떤 면에서는 독립적인 학문분야라기 보다는 연구방법론이라고 간주될 수도 있다. 생체에서 만들어지는 다양한 분자들이 분자생물학적 연구의 대상이지만 지금까지는 단백질에 대한 연구가 가장 많았고, 단백질의 구조, 발현 및 조절 등의 정보가 유전자에 입력되어 있기에 유전자가 보다 근본적인 연구대상이었다. 즉, 분자생물학을 유전자 연구의 관점에서 본다면 특정 생명현상에 참여하는 유전자를 동정하고 발현 및 조절을 연구하여 발현된 단백질의 기능을 이해하는 것이 분자생물학에서 자주 사용되어온 패러다임이다. 실제 연구에 사용되는 분자생물학적인 기법은 매우 다양하지만 이들 기법을 모두 소개하기는 시간적 제약이 따르므로, 본 강좌에서는 분자생물학 분야에서 매우 빈번하게 사용되는 유전자 분석방법을 단계적으로 살펴보고 (Table 참조), 그 예를 들어보고자 한다.

1. 유전자 동정

연구하려는 특정 생명현상 과정에 참여하는 유전자들의 종류를 파악하는 작업은 그 생명현상을 분자생물학적으로 설명하려는데 우선되는 작업이다. 유전자를 찾는데 핵심되는 실험재료는 cDNA library이다. cDNA library는 특정 세포에 존재하는 mRNA들을 reverse transcriptase와 restriction enzyme을 사용하여 cloning vector에 집어넣은 조합으로, 이 library 내에는 특정 세포에서 발현된 모든 유전자들이 집합되어 있다고 예상할 수가 있다. 그러므로 이 cDNA library로부터 연구대상이 될 유전자들을 찾아내는 것이 지금까지의 보편적인 유전자 동정방법이었다. 다음은 cDNA library를 이용한 유전자 동정방법의 일부이다.

1. 다른 동물에서 밝혀진 유전자와 유사한 구조를 가진 유전자들을 동정한다.
2. 순수 정제한 단백질의 아미노산 서열로부터 유추한 염기서열을 이용하여 동정한다.
3. 특정 단백질에 대한 항체를 이용하여 동정한다.
4. 특정 단백질과 결합하는 단백질을 담고있는 유전자를 yeast two-hybrid screening을 이용하여 동정한다.
5. library clone들을 무작위적으로 동정한다.

cDNA library를 이용한 유전자 동정방법 이외에도 유전학적인 동정방법들이 있는데, 최근에는 돌연변이 유전자를 찾아내는 방법으로써 positional cloning이 매우 유용하게 사용된다. 또한 genome project의 일환으로 많은 유전정보가 이미 genome database에 입력되어 있으므로, 이를

Table. General Patterns of Molecular Biological Analyses of the Genes

Experimental Steps	Experimental Techniques
Cloning	library screening
	· Isolation of homologous genes
	· Using an antibody to a specific protein
	· Using oligonucleotides predicted from amino acid sequences of an isolated protein
	· Yeast two-hybrid screening
	· Random sequencing
	Genetic approach
	· Suppression mutant screening
	· Positional cloning
	Computer-aided cloning
Gene expression and regulation	Expression
	RNA level
	· RT-PCR
	· Northern blot hybridization analysis
	· RNase protection assay
	· In situ hybridization analysis
	Protein level
	· Immunoblot analysis
	· Immunohistochemistry
	Regulation
	· Transcriptional level
	· Posttranscriptional level
	· Translational level
	· Posttranslational level
	· Proteolysis
Function	Biochemical Approaches
	· Isolation of interacting factors
	· Enzyme activity assay
	· DNA binding assay
	· etc.
	Genetic Approaches
	· Mutation study
	· Gene targeting study

이용하여 유전자를 동정하는 방법들이 최근 들어 가능하게 되었다.

일단 유전자를 동정하면 유전자의 염기서열을 밝히고, 이에 따른 단백질의 일차구조를 추측할 수 있게 되는데, 많은 경우에 단백질의 일차구조를 알면 그 단백질의 기능을 어느 정도 짐작할 수가 있다. 예를 들어 동정된 유전자로부터 유추된 단백질 일차구조에서 RNA binding domain이 관찰되면 그 유전자는 전사후 조절 (posttranscriptional regulation)과 연관된 단백질을 담고 있을 확률이 높을 것이다.

2. 유전자 발현 및 조절

유전자의 발현양상을 파악하는 것은 유전자의 기능을 유추하는데 매우 중요한 정보이다. 즉, 세포는 꼭 필요한 유전자만을 발현시킬 것이라는 보편적인 예측에 근거하여, 발현되는 유전자들은 연구대상 생명현상에 참여할 것으로 유추하게 된다. 그리고 이 유추는 대부분 맞는다.

유전자의 발현은 RNA 수준과 단백질 수준에서 조사할 수 있다. RNA 수준에서의 조사는 특정 유전자의 mRNA를 nucleotide probe를 사용하여 양적으로 측정하는 방법으로써, 유전자의 염기서열만 알고 있으면 유전자 특이 probe를 제작하기에 용이하기에 다양한 유전자들의 발현을 동시에 측정할 수 있다. RNA 수준에서의 발현 연구방법으로는 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 방법, Northern blot hybridization 방법, RNase protection assay, in situ hybridization 방법 등이 있다.

단백질 수준에서의 발현 조사는 실제로 생물학적인 기능을 수행하는 물질을 대상으로 한 발현 조사라는 측면에서 RNA 수준의 발현 조사보다는 더욱 의미가 있다. 하지만 대상 단백질마다 특이 항체를 준비해야 하고, 항체를 이용한 실험결과에는 때때로 항체의 non-specific interaction으로 말미암아 예상치 않은 오류가 포함될 수 있으므로 조심하여 분석해야 한다. 단백질 수준에서의 발현 연구방법으로는 immunoblot 방법과 immunohistochemistry 방법 등이 있다.

일단 연구하고자 하는 생명현상에 발현되는 유전자가 파악되면, 이 특정 유전자의 발현이 조절되는 기작을 이해하는 것이 생명현상을 분자생물학적인 수준에서 이해하는데 필수적일 수가 있다. 유전자의 발현은 전사, 전사후, 번역, 번역후, 그리고 분해 등의 수준에서 이루어지는데, 특정 유전자의 발현이 어떤 수준에서 주요하게 조절되는지를 파악하고, 더 나아가 조절인자를 동정하는 것이 일반적인 연구 순서이다. 즉, 유전자의 발현 조절 기작을 이해함으로써 생명현상의 조절을 이해하는 실마리를 찾아낼 수 있다.

3. 유전자 기능 이해

유전자의 기능을 이해한다는 뜻은 정확하게 말하면 유전자로부터 만들어지는 특정 단백질의 기능을 이해한다는 의미이다. 즉, 단백질의 역할을 규명하는 것이다. 단백질의 일차구조와 발현양상을 통하여 그의 역할을 어느 정도는 짐작할 수 있는 경우가 대부분이다. 그럼에도 불구하고 정확한 기능을 이해하려는 연구는 필수적이며, 어떤 의미에서는 가장 의미있는 연구이다. 유전자의 기능을 이해하는 방법은 크게 생화학적 방법과 유전학적 방법으로 대별해 볼 수 있다.

생화학적인 방법은 단백질 자체에 초점을 맞추어 단백질의 특성을 규명하려는 연구이다. 예를 들면 연구대상 단백질이 효소이면 그 효소가 활성화되는 기작과 기질들을 동정하는 연구를 수행할 것이고, 연구대상 단백질이 전사인자이면 이 전사인자가 결합할 DNA consensus sequence를 찾으려는 연구를 수행할 것이다. 생화학적인 연구방법은 셀 수 없을 정도로 다양하지만 대표적인 방법으로는 면역침강법, yeast two-hybrid screening, DNA binding assay, enzyme activity assay 등을 예로 들 수 있다.

유전학적인 방법은 한마디로 돌연변이체를 만들고, 이의 표현형을 관찰함으로써 특정 유전자의 기능을 예측해 보는 방법론이다. 전통적인 방법으로는 돌연변이체를 찾아내고 이 변이에 책임있는 유전자를 동정하는 방법이 사용되어져 왔다. 이런 전통적인 방법은 특히 초파리 등

의 실험동물에서 빈번히 적용되어왔다. 하지만 포유동물에 이런 전통적인 유전학적 방법을 적용하기에는 여러 제약들이 있다. 그러므로 최근에는 특정 유전자의 변이를 유도하는 인위변이 방법을 사용하기 시작했다. 전통적인 유전학적인 방법과 반대로 연구를 진행한다고 하여 역유전학적 방법이라고도 불리우는 이 방법의 대표적인 예가 유전자 결손생쥐 (knockout mouse)의 제작이다.

II. 분자생물학적 연구의 예: *Nek2*의 연구

앞에서 유전자를 대상으로 하는 분자생물학적인 연구방법들을 개략적으로 살펴보았다. 이 방법들이 실제 연구에서 어떻게 적용되는지를 살펴보는 것은 분자생물학적인 방법을 이해하는데 도움이 될 것으로 생각한다. 그러므로 본장에서는 *Nek2*라는 유전자의 연구를 통하여 분자생물학적인 방법이 실제로 생식생물학에 어떻게 적용될 수 있는지를 살펴보겠다.

1. *Nek2* 유전자의 발견

세포주기 조절 기작은 1980년대 말부터 집중적인 연구를 통하여 많이 이해되었다. 이를 간단히 종합해보면, 세포주기의 조절은 checkpoint라는 일정한 시기에서만 일어나고, cyclin dependent kinase라는 단백질 인산화 효소가 checkpoint 통과에 결정적인 역할을 하며, 이러한 세포주기 조절 기작은 기본적으로 모든 유핵세포에 동일하게 적용됨이 알려졌다.

본인은 남성 생식세포 발생 기작, 특히 감수분열을 세포주기 조절의 측면에서 연구하였다. 감수분열도 일반적인 세포주기 조절인자들에 의하여 조절됨은 이미 알려졌다. 하지만 감수분열에는 체세포분열에서 관찰되지 않는 현상들, 예를 들어 동형염색체 접합, DNA 합성 없이 두번 연속분열 등이 포함되어 있고, 이런 현상들이 일어나려면 체세포분열과는 다른 조절 기작이 있을 것으로 짐작해 볼 수가 있다. 또한 이런 차이점은 유전적으로 입력되어 있을 것으로 생각할 수 있다. 즉, 생식세포의 감수분열 조절에 특이하게 관여하는 세포주기 조절인자가 있을 것으로 가정하였다. 이 가정은 그 감수분열 특이 세포조절인자를 동정해 냄으로서 검정해 보기로 하였고, 이에 따라 mouse testis cDNA library를 검색하였다. 그 결과 동정된 유전자들 중에서 *Nek2* 유전자를 소개하도록 하겠다.

*Nek2*는 *Aspergillus nidulans*라는 곰팡이 유전자 가운데 *nimA*라는 유전자와 구조적, 생화학적으로 유사하다. *nimA*는 세포주기 조절인자이며, 특히 G2/M phase 진행에 중요하다고 알려져 있다. 그러므로 *Nek2*도 세포주기인자 가운데 하나일 수가 있고, 특히 남성 생식세포의 감수분열에 특이한 역할을 할지도 모른다고 생각되어 계속 연구하기로 결정하였다.

2. *Nek2*의 발현

생체에서 *Nek2*의 발현을 조사하기 위하여 Northern blot hybridization 실험을 시행하였다. *Nek2*는 ovary, embryo, placenta 등 세포분열이 왕성하다고 알려진 조직들에서 발현이 관찰되었으나, 정소에서 가장 강력하게 발현하였다. 정소 내 체세포들에서는 그의 발현이 미약하였고 거의 대부분 남성 생식세포에서만 발현됨을 또한 확인할 수 있었다.

정소를 구성하는 여러 세포군 가운데 *Nek2*가 특이하게 발현되는 세포군을 확인하기 위하여 in situ hybridization 실험을 시행하였다. *Nek2*는 생식세포에서만 발현되었고, 그 가운데 감수분

열이 일어나기 직전의 생식세포인 spermatocyte에서 가장 강력하게 발현하였다. 감수분열이 일어난 직후의 세포군인 spermatid에서는 *Nek2*의 발현이 거의 관찰되지 않는 점으로 보아 *Nek2*가 감수분열에 그의 기능이 있음을 강력하게 암시한다.

*Nek2*의 단백질 수준에서의 발현을 조사하기 위하여 *Nek2* 특이 항체를 만들고, immunoblot 시험을 시행하였다. 남성 생식세포를 발생 단계에 따른 세포군으로 분리할 수 있는 방법을 사용하여 얻은 시료를 이용하여 immunoblot을 실행한 결과 *Nek2*는 spermatocyte fraction에만 특이적으로 존재함을 관찰하였다. 이는 이전의 RNA 수준에서의 *Nek2*의 발현양상과 일치하는 결과이다. 또한 본 실험을 통하여 *Nek2* 항체가 *Nek2*의 발현을 조사하기에 적절함을 확인하였다.

Nek2 단백질의 세포 내 위치를 확인하기 위하여 immunohistochemistry 실험을 시행하였다. *Nek2* 항체는 spermatocyte의 meiotic chromatin을 강력하게 염색함을 관찰하였다. 이는 *Nek2*가 meiotic chromatin과 결합해 있음을 암시하는 결과로서, *Nek2*가 meiotic chromosome condensation에 그의 기능이 있을 가능성을 뒷받침해 준다.

3. *Nek2*의 기능

*Nek2*의 기능을 연구하기 위하여 유전학적, 생화학적 방법을 동원하여 연구하였다. 유전학적인 방법으로서 *Nek2* 유전자 결핍생쥐를 만들어가고 있는 과정에 있다. *Nek2*가 spermatocyte에서 매우 강력하게 발현되므로 기대되는 표현형은 male sterility이다.

Nek2 단백질의 기능을 이해하기 위한 생화학적인 접근법으로서 *Nek2*와 결합하는 단백질을 yeast two hybrid screening으로 동정하여서 *Nip1, Nip2* 등을 동정하였다. 하지만 이들도 그의 기능이 아직 알려지지 않은 novel gene이기 때문에 현재 본 실험실에서는 *Nip1, Nip2*의 발현 및 기능을 이해하기 위한 연구를 수행하고 있다.

III. 결 론

분자생물학적인 연구방법은 생명현상을 설명하는데 매우 유용한 방법으로 사용되어왔고, 앞으로는 더욱 중요하게 이용될 것이다. 그러므로 모든 실험실에서는 기초적인 분자생물학적 실험을 수행할 수 있을 정도의 실험장비 등을 확보하고 이를 적절히 활용하는 것이 필요하다. 하지만 분자생물학의 기법을 한 실험실에 모두 구비해 놓는 것은 가능하지도 않고 효과적이지도 않다. 따라서, 실험실간의 공동연구를 모색하는 것이 현대 분자생물학의 추세이다.