

## 계놈 연구의 신기술, 신기법의 개발과 현황

여상엽 · 허태린

경북대학교 유전공학과

미생물 및 고등 동·식물의 유전자 특성을 규명하기 위해서는 계놈에 대한 분석이 필수적으로 요구된다. 일반적으로 동식물은 대장균보다 약 1000배 또는 그 이상으로 거대한 계놈을 가지고 있어서 인체의 경우 그 크기가  $3 \times 10^9$  base pairs (bp)에 달하여 전체적인 유전자 분석을 위해서는 많은 노력과 비용이 소요된다. 현재까지 전세계적으로 계놈 프로젝트가 이루어지고 있으며 유전자의 산업적 이용가치에 대한 연구들이 활발하게 이루어지고 있다. 또한 계놈 분석을 위한 새로운 기술들이 개발 및 발전되어지고 있다.

### 계놈 분석을 위한 방법

계놈 분석을 위한 유용한 방법은 크게 세가지로 나누어 볼 수 있다. 첫번째로는 hybridization을 기초로한 분석 방법이 있다. 이 방법은 Brilliant *et al*에 의해 고안된 것으로 hybridization-based DNA fingerprinting에 의해 유전자를 분리하며 Gondo *et al*과 Luders에 의해 1차원적 및 2차원적 분석 방법과 interstitial large A-particle proviral elements(IAP)를 사용한 1차원적 hybridization 방법이 적용되었다. 또한 Litterlinden *et al*에 의해 2차원적 fingerprinting 방법의 해상도를 향상시키는 연구가 이루어졌다. 다른 방법으로는 fluorescent를 이용한 *in situ* hybridization(FISH)이 있다. 이것은 최근 Matsuda *et al*과 Windle *et al*에 의해 여러가지 색의 fluorescent를 이용한 고해상도의 DNA mapping에 적용되어지고 있다. 둘째로 polymerase chain reaction(PCR)을 기초로한 random amplified polymorphic DNA(RAPD)와 Alu PCR 분석 방법이 있으며 세째로 restriction landmark를 이용한 새로운 형태의 분석 방법인 restriction landmark genomic scanning(RLGS)이 있다. 이 방법은 Shibata *et al*은 imprinting되어지는 유전자의 분리에 적용하였으며 Watanabe *et al*은 세포 분화에 관련되 유전자의 분리 동정에 사용하였다. 그리고 Miwa *et al*에 의해 암 연구에 사용되었으며 Okuizumi *et al*에 의해 계놈 mapping(RLGS spot mapping)에 적용되었다. 그외에 다른 계놈 분석 방법으로는 genome mismatch scanning(Nelson *et al.*), in gel reassociation assay(IGRA; Ohishi *et al.*), representational

difference analysis(RDA)등과 같은 방법들이 있다.

### Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS) 방법의 원리

Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS) 방법(1,2)은 기본 원리는 Fig. 1과 같이 전체 계놈 유전자의 조사에 8-bp recognizing methylation sensitive 제한효소를 사용하여 절단된 genomic DNA를 직접적으로 end-labeling하고 1차원적 전기영동을 실시한 다음 다시 4-bp recognizing methylation sensitive 제한효소로 절단한 후 고해상도의 2차원적 전기영동

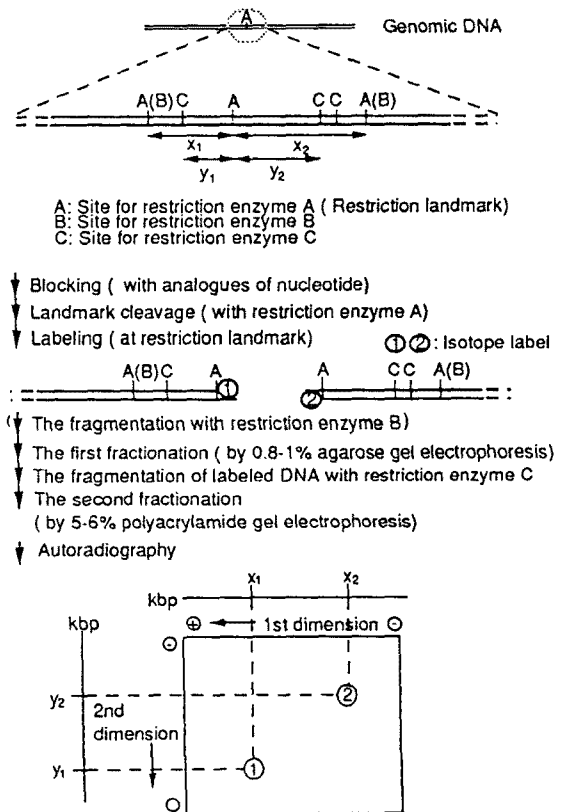
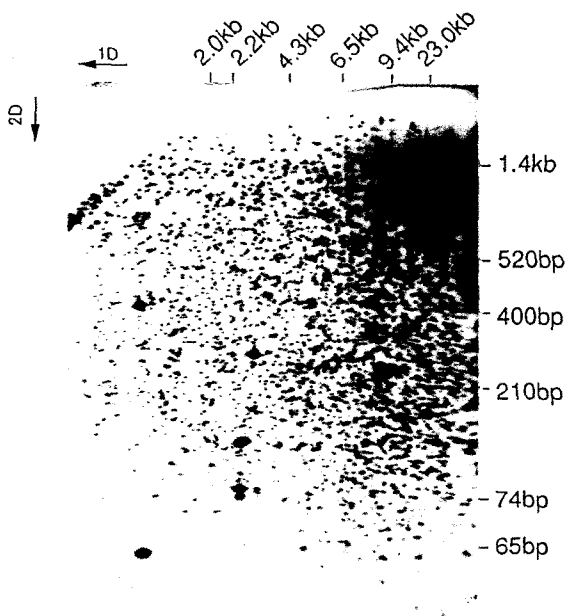


Fig. 1. Procedure of RLGS.

을 실시하여 전체적인 restriction landmark들의 변화를 관찰하는 것이다. RLGS 방법은 손상받은 게놈 DNA의 nicks, gaps 그리고 double-strand breakages를 우선적으로 보상하는 단계로 시작하며 이때는 ddNTP, dNTP $\alpha$ S, ddNTP $\alpha$ S와 같은 다양한 핵산이 사용되어 radio-isotope가 정해진 장소에만 들어갈 수 있도록 하여 다음 단계에서 landmark로 사용되며 8 base pair를 인식하고 methylation-sensitive 제한효소를 사용하여 절단한다. 절단으로 인해 생성된 cohesive-end에 radio-isotope인 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP 및 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dGTP를 이용하여 직접적인 게놈 유전자의 labeling을 실시하고 size fractionation을 수행한다음 1차원적 agarose gel 전기영동을 실시한다. 1차원적 전기영동에 의해 분리된 유전자 조각들을 다시 agarose gel상에서 4 base pair를 인식하는 제한효소로 절단한후 2차원적 polyacrylamide gel 전기영동을 실시하여 분리되어져 Fig. 2와 같이 가의 나타난 점들은 landmark로 사용한다.

### RLGS 방법을 효용 가치

RLGS 방법은 게놈의 physical state의 차이 및 변화에 따른 restriction landmark들의 차이를 비교 확인함으로써 probe나 primer가 없이도 게놈의 변화를 짧은 기간내에 다량으로 확인할 수 있고 또한 유전자의 분리도 가능하게하는 새로운 genomic scanning 방법이다. 이 RLGS 방법의 장점은 첫째, 약 4000개 이상의 상이한 restriction landmark를 모두 전기영동에



**Fig. 2.** RLGS profile of mouse genome DNA. About two thousand spots/loci can be screened on one gel. The size markers of the 1st and 2nd dimension are shown at the upper right of the RLGS pattern.

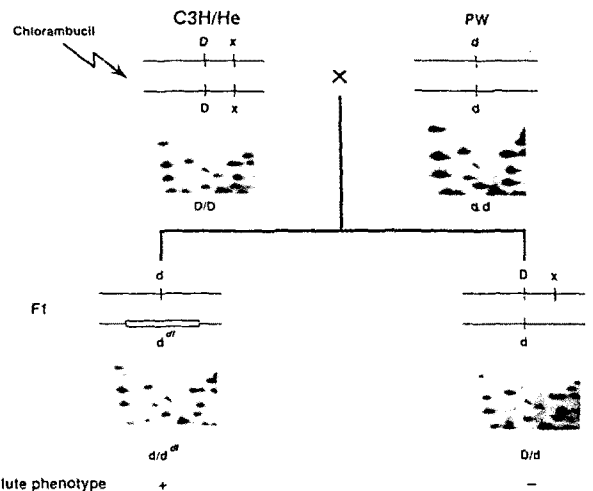
생물산업

의하여 분리하고 그 중 약 2000개 이상의 각기 다른 landmark를 식별할 수 있는 고속의 scanning 방법이며 둘째, 제한 효소의 변화에 따른 다른 종류의 restriction landmark들을 얻을 수 있으므로 scanning field의 확장을 가져올 수 있고 셋째, hybridization을 시행하지 않고 restriction landmark들에 대하여 직접적인 end-labeling시킴으로서 모든 종류의 유전자 검색에 이용될 수 있으며 넷째, 얻어진 restriction landmark들의 spot intensity에 의하여 게놈내의 유전자 copy number의 측정 등이 가능하다.

### RLGS의 효용 범위

#### 게놈상의 돌연변이 유전자의 분리

Fig. 3에서와 같이 돌연변이 물질인 chlorambucil을 처리한 쥐에서 게놈상의 large deletion을 RLGS profile로 확인한 다음 실제로 deletion된 d locus가 게놈의 어느부위에 속하는지를 알아보기 위하여 다른 종의 쥐와 cross-breeding한다후 2세대의 RLGS profile을 상호 비교하여 genetic mapping한 결과



**Fig. 3.** Detection of deleted region in mice mutant by RLGS. The dilute mutant carrying the deleted allele induced by chlorambucil was established. The drug was administrated at 6 mg/body weight kg to wild type male C3H/He(D/D) intraperitoneally, and the drug-treated mice were crossed with(d/d) homozygous female mutants which were on the PW background. The F1 progeny which carries the chlorambucil-induced deletion allele(d/d<sup>dl</sup>) was screened by the phenotype, because the F1 mouse with deletion allele should show the dilute phenotype. The progenitor female mutant with d/d genotype also carries short ear mutation(se/se) homozygously, which is located on the 1 cM separate from the d locus. A part of the RLGS profile for each mouse was shown. The spot indicated by the arrowhead was located at 2.5 cM from dilute locus. D, wild type allele of d gene; d, functional defective allele of d genes; d<sup>dl</sup>, deletion allele of d gene; x, the restriction enzyme sites.

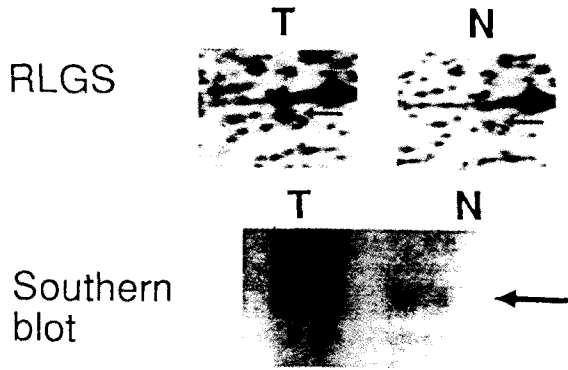


Fig. 4. Detection of DNA amplification and loss of heterozygosity in cancer DNA. "T" and "N" indicate the RLGS pattern of the DNA isolated from tumor and normal tissue, respectively. The spot amplified in cancer DNA is indicated by the arrow.

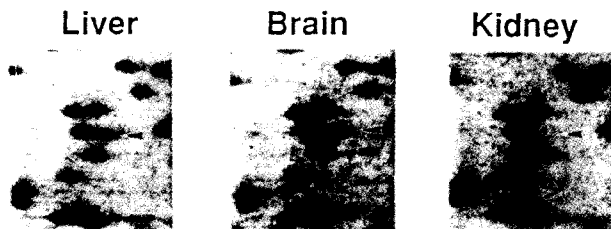


Fig. 5. Tissue-specific methylation detected by RLGS. Using RLGS, Tissue-specific methylation of genomic DNA was detected. The DNA sample of each tissue was prepared from the same C57BL/6 inbred mouse. The spot indicated by the arrowhead is one of the 66 spots(out of 1500 spots) which show tissue-specific methylation

*dilute* locus와는 2.5 cM 떨어져 있는 것을 확인할 수 있었다(2).

**Oncogene들의 amplification이나 deletion의 확인 및 분리**

유방암 조직과 정상 조직의 계놈 DNA를 분리하여 RLGS를 수행한후 전체적인 RLGS의 profile을 비교 분석하여 Fig. 4에 나와 같이 암조직에서에서만 특이적으로 7개 증폭된 점을 분리 동정한 결과 *int-2*로 밝혀졌다(3).

**조직 특이적 유전자의 분리**

RLGS 방법에서 사용되어지는 제한효소의 특성인 methylation-sensitive를 이용하여 C57BL/6 쥐의 간과 뇌 그리고 콩팥의 계놈 DNA의 RLGS profile 비교에 의해 조직 특이적 methylation을 알 수 있으며 Fig. 5에서는 66개의 변화된 점들중의 한개를 예로 보여준다. 화살표로 나타난 점은 뇌 조직에서 두 allele에 모두 methylation되어 있지 않으며 간에서는 한 개의 allele만이 methylation되어 있고 콩팥 조직에서는 두 allele 모두 methylation되어 있음을 보여준다(4).

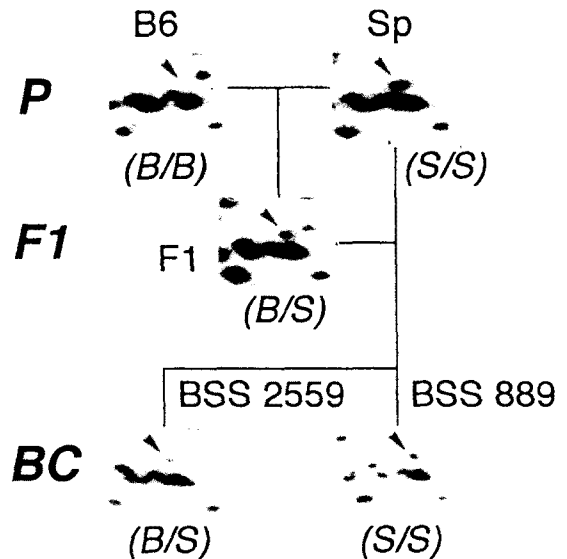


Fig. 6. Segregation of spot S729 in the BSS backcross pedigree. Spot S 729 is indicated by the arrowhead. The spot profile of B6(C57BL/6) and Sp(M.spretus) parent, the F1 hybrid and two backcross progeny(BS2559 and BSS889) are shown in this figure.

**계놈 mapping**

일본의 RIKEN 연구소, Genome Science Laboratory에서는 Mouse Genome Projects에 RLGS 방법을 이용한 mapping을 하였다. 이곳에서는 유전자 배경이 많이 다른 두 종류의 쥐를 선택하여 각각의 RLGS profile에서 나온 점에 대하여 dominant와 codominant로 나누어 일련번호를 붙이고 Fig. 6에서와 같이 역교배를 통해 각각의 점들을 정의 내리고 Progeny Distribution Patterns을 작성한다음 computer simulation을 통해 각 점들의 segregation과 recombination 비율을 환산하고 Logarithm of the Odds(LOD) 수치를 구하여 genetic map을 작성하였다(5).

**결론**

계놈 분석을 위하여 개발된 신기술, 신기법들 중 Restriction Landmark Genomic Scanning(RLGS) 방법은 계놈의 물리적인 상태의 변화들인 gene amplification, deletion, methylation 정도의 차이들에 대하여 손쉽게 빠르게 확인할 수 있을 뿐만 아니라 genomic imprinting 유전자의 분리(6)와 발생 단계 및 분화 과정에 따라 변화되어지는 유전자의 분리 및 linking library와 boundary library의 제조(7)에도 이용될 만큼 계놈 연구에 광범위하게 이용될 수 있어서 매우 유용한 실험 방법이다.

## 참고문헌

1. Hatada, I., Hayashizaki, Y., Hirotsune, S., Komatsubara, H. and Mukai, T. 1991. "A Genomic Scanning Method for Higher Organisms using Restriction Sites as Landmarks" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9523-9527.
2. Hayashizaki, Y., Hirotsune, S., Okazaki, Y., Hatada, I., Shibata, H., Kawai, J., Hirose, K., Watanabe, S., Fushiki, S., Wada, W., Sugimoto, T., Kobayakawa, K., Kawara, T., Katsuki, M., Shibuya, T., Mukai, T. 1993. "Restriction Landmark Genomic Scanning Method and its Various Applications" *Electrophoresis* **14**, 251-258.
3. Miwa, W., Yashima, K., Sekine, T., Sekiya, T. 1995. "Demethylation of a repetitive DNA sequence in human cancers" *Electrophoresis* **16**, 227-232.
4. Watanabe, S., Kawai, J., Hirotsune, S., Suzuki, H., Hirose, K., Taga, C., Ozawa, N., Fushiki, S., Hayashizaki, Y. 1995. "Accessibility to tissue-specific genes from methylation profiles of mouse brain genomic DNA" *Electrophoresis* **16**, 218-226.
5. Okuizumi, H., Okazaki, Y., Ohsumi, T., Hayashizaki, Y., Plass, C., Chapman, V. M. 1995. "Genetic mapping of restriction landmark genomic scanning loci in the mouse" *Electrophoresis* **16**, 233-240.
6. Shibata, H., Yoshino, K., Muramatsu, M., Plass, C., Chapman, V. M., Hayashizaki, Y. 1995. "The use of restriction landmark genomic scanning to scan the mouse genome for endogenous loci with imprinted patterns of methylation" *Electrophoresis* **16**, 2107-2117.
7. Hayashizaki, Y., Hirotsune, S., Hatada, I., Tamatsukuri, S., Miyamoto, C., Furuichi, Y. and Mukai, T. 1992. "A new method for constructing NotI linking and boundary libraries using a restriction trapper" *Genomics* **14**, 733-739.

## 韓國産業微生物學會 原文 CD-ROM

## ◆ 산업미생물학회지 (1973. 창간~1995)

Korean Journal of Applied Microbiology and Biotechnology

## ◆ 생물산업 (1988. 창간~1995)

BIOINDUSTRY

## ◆ Journal of Applied Microbiology and Biotechnology (1991. 창간~1995)

사용환경: IBM PC 386 이상

가격: 단체회원: ₩600,000 일반회원: ₩250,000(6월 10일까지 신청시 ₩200,000)

신청: 한국산업미생물학회 02) 552-4733, 제주 이미지 02) 374-5992