

## 스크래피에 감염된 마우스의 뇌 및 간조직에서의 DNA Methylation

한림대학교 의과대학 미생물학교실 및 환경·생명과학연구소,  
\*일본 동북대학교 의과대학 기초방사선학교실, \*\*미국 뉴욕주립연구소 바이러스 연구실

최은경 · S. Uyeno\* · T. Ono\* · R.I. Carp\*\* · 김용선

=Abstract=

### DNA Methylation in Brain and Liver Tissues of Mice Infected with Scrapie Agent

E.K. Choi, S. Uyeno\*, T. Ono\*, R.I. Carp\*\* and Y.S. Kim

*Institute of Environment & Life Science and Department of Microbiology, School of Medicine, Hallym University, Chuncheon, Korea, \*Department of Radiation Research, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan, \*\*Department of Virology, New York State Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, Staten Island, New York, USA*

DNA methylation degree in the several murine brain and liver genes of different ages and after scrapie infection have been examined by using methylation-sensitive restriction endonuclease digestion. We found that the methylation of *c-fos* and *c-myc* in the brain and liver was increased during the late fetal to one month postnatal developmental periods. However, those of the SGP-2, S100 $\beta$ , APP950, PrP, and APLP1 genes were decreased at the same periods. The comparison of the DNA methylation patterns between scrapie infected brains and controls demonstrated there is no significant difference in methylation degree of scrapie-infected brains. These observations indicate that DNA methylation might be importantly related to the aging process. The scrapie-infected murine brain was not significantly developed more senescent than the same age-controls did.

**Key Words:** Scrapie-infected mouse, Aging, DNA Methylation, Brain

### 서 론

스크래피는 감염성 프리온 단백질 (Prion 혹은 PrP<sup>Sc</sup>)에 의해 양이나 염소에서 유발되는 대표적인 퇴행성 신경질환으로 마우스를 포함한 작은 실험동물로 전염이 가능해지므로써 인간에서 치매를 포함하는 만성퇴행성 신경질환의 연구에 중

요한 실험동물 모델로 이용되어지고 있다 [1, 2, 3, 4]. 특히 감염된 실험동물에서는 노인에서 발생되는 대표적인 노인성 치매질환의 하나인 알츠하이머병 (Alzheimer's Disease)과 매우 유사한 신경병리학적 병변을 나타내므로써 프리온 감염에 의한 퇴행성 신경변화의 기전 규명 연구가 바로 알츠하이머병의 원인 및 치료제의 개발 연구에 직결된다고 생각된다 [5, 6, 7]. 알츠하이머병의 발

이 연구는 1995년도 교육부 학술연구조성비(유전공학)에 의해 수행되었음.

Corresponding author: Y.S. Kim, Institute of Environment & Life Science and Department of Microbiology, School of Medicine, Hallym University, Chuncheon, Korea

병 원인 및 자세한 병리기전은 아직 정확히 밝혀지지 않고 있으나, 알츠하이머병의 주요 신경병리학적 병변의 하나인 아밀로이드 플라크 (amyloid plaque)의 형성에 관여하리라 생각되는 여러 유전자 산물들 (S100 $\beta$ , APLP, ApoE, presenilins 1 or 2) 과의 상관관계 뿐만 아니라 노화에 따른 이들 산물들의 발현 변화가 아밀로이드 단백질 (A $\beta$ 4) 침착에 관여하리라 생각되고 있다 [8, 9, 10, 11].

최근 노화과정 및 암의 발생과정에서 많은 유전자의 메틸화의 변화가 관찰됨으로써 이들 변화가 중요 유전자의 전사 조절 기능에 관여될 가능성이 보고되었을 뿐만 아니라, 노화과정의 지표로서 이용될 수 있다는 여러 연구결과들이 발표되고 있다 [12, 13, 14]. DNA 메틸화 (methylation)는 DNA 구성 염기의 하나인 cytosine (C) 피리미딘 고리의 제 5번째 -H가 -CH<sub>3</sub>로 치환되어 5-methylcytosine (5mC)이 되는 것으로 수십년 전에 발견되었다 [12]. 이 5mC는 사람을 포함하여 고등진핵생물의 유전자 DNA를 구성하는 유일하게 변형된 염기로서 전체 cytosine의 2~7%를 차지하며 생물의 종, 그리고 조직에 따라 그 차지하는 비율이 다르다. 사람에게 있어서 약 4%의 C가 5mC이고, DNA 염기의 구성비는 A, T가 각각 30%, C, G는 각각 20%인 것에 의해 전체 DNA에서 차지하는 5mC 양은 겨우 약 1%를 차지하는 것에 지나지 않는다.

5mC는 genomic DNA상에서 무작위적으로 나타나는 것이 아니고 대부분이 G의 5'쪽에 위치하여, 즉 다시 말하면 5'-CpG-3' 배열의 C가 메틸화하여 5'-5mCpG-3'으로 되어 있는 것이 알려져 있다. 이 5'-CpG-3'배열은 유전자의 전이 제어영역을 함유한 5' 주변부에 많이 존재하고 일부 유전자에서는 DNA 메틸화 정도와 그 유전자 발현간에 역상관 관계가 보고되고 있다 [13]. 또한 특정 유전자의 DNA 메틸화에 있어서 oncogene, antioncogene의 DNA 메틸화는 정상 뇌조직에서는 연령이나 성별에 따라 일정한 DNA 메틸화 양상을 가지고 있으며 많은 유전자에 있어서 DNA 메틸화의 양상은 조직특이성이 있는 것으로 예전부터 보고되어 왔다 [13].

그러므로 본 연구에서는 알츠하이머병 연구의 실험동물 모델로서 스크래피에 감염된 마우스를 이용하여 만성퇴행성 신경변화를 유발시킨 후 뇌 및 간조직에서 각각의 장기 특이 유전자 및 대사 관련 유전자들의 DNA 메틸화의 변화 유무를 관

찰함으로써 스크래피 감염이 이들 유전자의 DNA 메틸화에 미치는 영향을 관찰하여 간접적으로 알츠하이머병의 원인 규명 및 질병의 병리기전을 밝히는 기초적 자료로 제시하고자 하였다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 스크래피의 감염

실험동물 IM 마우스는 영국의 AFRC & MRC Institute의 Dr. Alan Dickinson으로부터, C57BL/6j 마우스는 미국의 Jackson Lab.에서 제공받아 한림대학교 실험동물부에서 현재 사육 중인 것을 사용하였다. 연령 변화에 따른 DNA 메틸화 변화에 사용된 마우스는 Ono 등의 결과 [15]에 기준하여 각 연령별 (태아 16일째, 출생 0일, 생후 1개월, 생후 1년)로 나누어 해당 시기에 뇌조직을 분리한 뒤 실험에 이용하였다. 스크래피 병원체는 미국 뉴욕주립연구소 (Staten Island, New York)의 Dr. Richard I. Carp으로부터 제공받은 87V와 22L 스크래피를 계대배양하여 사용하였다.

스크래피 감염에 의해 임상증세가 나타난 실험동물 마우스를 희생시켜 뇌조직을 분리한 후 Ten-Brock tissue homogenizer를 이용하여 phosphate buffer saline (PBS)으로 뇌조직균질액 (10%, w/v)을 만들었다. 이는 실험에 사용하기 전까지 -70°C에 보관하였으며, 사용전에 PBS로 10배 희석한 1% 전체 뇌조직균질액 (whole brain homogenate)을 만들어 사용하였다. 생후 4~6주된 마우스를 전신마취 (sodium pentobarbital, 50 mg/kg)한 후 Stereotaxic apparatus (Stoelting Co.)를 이용한 microinjection 방법 [6]으로 IM 마우스의 감염균은 87V를, C57BL/6j 마우스의 감염균은 22L을 각각 5  $\mu$ l씩 대뇌피질 (A +1.0, L 2.0, H +1.5) 부위에 접종하였으며, 대조군의 경우는 동량의 정상마우스 1% 전체 뇌조직균질액 (normal mouse brain homogenate)을 접종하였다.

### 2. 조직의 채취 및 보관

87V에 감염된 IM 마우스는 약 300일을 전후로 하여, 22L에 감염된 C57BL/6j 마우스는 약 150일을 전후로 하여 임상증세가 유발되면 경추탈구법으로 희생시킨 후 뇌 및 간조직을 적출하였다. 뇌 및 간조직의 일부는 DNA 메틸화의 변화 분석 실험에 이용하기 위하여 실험에 사용하기 전까지 -70°C에 보관하였으며, 일부는 신경병리학

적 연구를 위해 4% paraformaldehyde -0.2% picric acid 용액으로 심장관류 고정하였다.

### 3. 신경병리학적 염색법

관류 고정된 뇌조직은 파라핀에 포매하였으며 이를 Sliding microtome (Reichert-Jung Co., Germany) 으로 7  $\mu\text{m}$  두께의 조직절편을 gelatin (Sigma, USA) coating된 slide glass에 붙인 후 37°C 신전판에서 수일간 방치하였다. 준비된 조직절편은 xylene I, II, III에서 5분간, 100%, 95%, 90%, 80%, 70% 에탄올에서 각각 5분씩 처리하였다. Hematoxylin-Eosin 염색, Bodian plus Periodic acid-Schiff (PAS) 염색 및 Masson's trichrome 염색에 의하여 대뇌피질과 해마 부위에서의 신경세포의 소실, 공포 형성 및 아밀로이드 플라크의 형성 등을 광학현미경 (Carl Zeiss Co., Germany)으로 관찰하였다.

### 4. DNA 메틸화 변화 분석

#### (1) 뇌 및 간조직의 DNA 추출

뇌조직에서의 분자량이 큰 DNA 추출은 과거 Ono 등이 사용하였던 방법 [15]에 의해 이루어졌으며, DNA 정량은 260 nm에서 spectrophotometer (Hitachi 200-20, Japan)로 측정하였으며 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  정도의 농도로 만들고, 동시에 280 nm에서도 흡광도를 측정하여 고순도의 DNA임을 확인하였다. 또 0.8% agarose gel로 전기영동하여 추출한 DNA의 거의 전부가 23 kb 이상에 위치하는 것을 확인하여 변성되지 않는 고분자량 DNA임을 확인하였다.

#### (2) 제한효소 처리

추출한 각 군의 DNA를 agarose gel용도로 5  $\mu\text{g}$ 을 취하여 DNA 1  $\mu\text{g}$ 당 5unit의 제한효소로 DNA 농도 50 ng/ $\mu\text{l}$ 의 조건에서 절단하였다. 즉, 메틸화 감수성 효소인 *HpaII* (12 U/ $\mu\text{l}$ : Takara, Japan)와 비감수성 효소인 *MspI* (14 U/ $\mu\text{l}$ : Takara, Japan) 그리고 *EcoRI* (20 U/ $\mu\text{l}$ : Takara, Japan)을 사용하여 각 실험군을 *EcoRI* + *HpaII*, *EcoRI* + *MspII*, *EcoRI*만으로 처리, 또는 *BamHI* + *HpaII*, *BamHI* + *MspI*, *BamHI*만으로 처리하여 반응시켰다. 반응이 끝난 DNA에 1/20 용량의 5M NaCl과 2배량의 99.5% 에탄올을 가해 DNA를 침전 회수하여 진공 건조 후 20  $\mu\text{l}$  TE에 재용해하였다.

#### (3) Southern blot analysis

DNA 메틸화를 검사하는데 사용된 여러 유전자들 (S100 $\beta$ , SGP-2, PrP, APP950, *c-fos*, *c-myc*, APLP1

등)의 cDNA 및 genomic DNA probe는 random primed DNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim, German)을 이용하여  $^{32}\text{P}$ 를 labeling하였다. 그 후 Sepadex G-50 column을 만들어 TE 200  $\mu\text{l}$ 로 칼럼을 세척한 뒤 labeling된 probe DNA를 넣고 TE 200  $\mu\text{l}$ 씩 칼럼에 가하면서 peak가 생기기 시작하는 때부터 약 600  $\mu\text{l}/\text{ml}$  probe를 eppendorf tube에 수집하였고 labeling되지 않은 것은 칼럼을 통해 제거하였다.

Filter는 12 ml 정도의 Hybridization buffer (1 $\times$  Denhardt 용액: 2% Ficoll, 2% BAS, 2% polyvinylpyrrolidone), 1 $\times$  SDS, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  salmon sperm DNA (6 $\times$  SSC)로 65°C에서 16시간 정도 prehybridization한 후 다시 buffer를 교환하여 95°C에서 5분간 가열, 급냉하여 single strand로 변성시킨  $^{32}\text{P}$ -labeling probe DNA를 넣어 65°C에서 16시간 이상 hybridization하였다. 그 후 filter는 3 $\times$  SSC로 65°C에서 1시간, 0.2 $\times$  SSC로 65°C에서 1시간 washing하여 background가 100 rpm 이하가 될 때 건조시켜 노출시켰다. Autoradiography는 Fuji BAS 2,000 (Fuji film, Tokyo)을 이용하여 radioactivity를 측정하였다. Filter는 필요에 따라 0.1N NaOH로 Re-probing한 뒤 2 $\times$  SSC로 세정하여 재사용하였다.

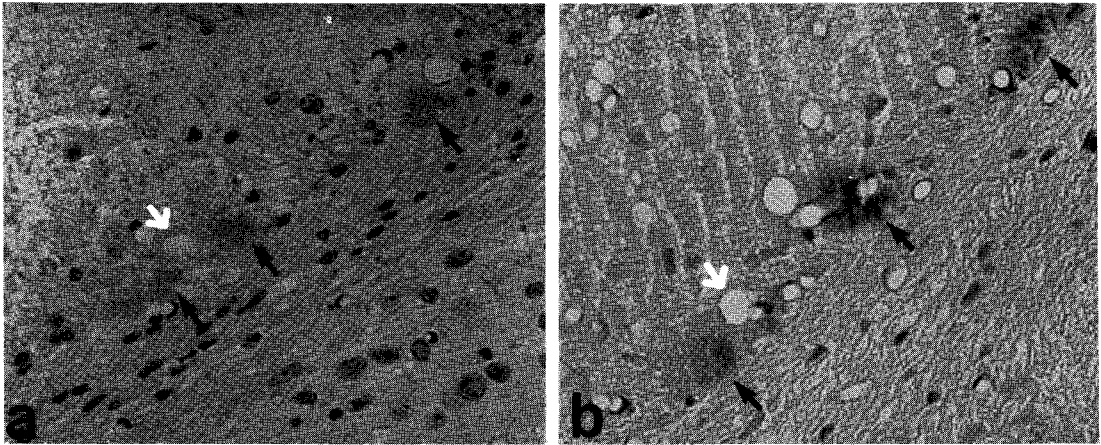
## 결 과

### 1. 스크래피 감염 및 임상증세 분석

87V 및 22L 스크래피를 stereotaxic apparatus를 이용하여 IM 및 C57BL 마우스의 대뇌피질에 5  $\mu\text{l}$ 를 주입하였다. 초기 임상증세는 IM 마우스의 경우 250일, C57BL 마우스의 경우 감염 후 100일부터 활동성의 감소로 시작되었으며, 각각 310일, 150일을 전후하여 심한 운동 실조를 나타내었다. 즉, 실험군을 평행봉 위로 걷게 하였을 경우 감염군 모두 평행봉 사이로 다리가 빠져 정상적으로 건너갈 수 없었고 이와 같은 증세는 운동신경의 실조를 의미하였다. 잠복기는 앞에서 설명한 임상증세가 3주째 계속될 때를 기준으로 결정하였다.

### 2. 신경병리학적 소견

87V 스크래피에 감염된 IM 마우스에서 임상증세가 나타난 후 대뇌피질에서 Bodian plus PAS 및 Masson's trichrome 염색방법으로 관찰한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 약 310일 후에는 노인



**Fig. 1.** Vacuolation (spongiform encephalopathy) in the cerebral cortex (white arrow) and amyloid plaques in the corpus callosum (black arrow) of IM mice infected with 87V scrapie agent. Stained by Bodian plus PAS (a,  $\times 300$ ), and Masson's trichrome (b,  $\times 450$ ).

**Table 1.** The changes of DNA methylation of individual genes in maturation and senescence process

Gene	Brain		Liver	
	Maturation	Senescence	Maturation	Senescence
<i>c-fos</i>	↑	↔	↑	↑
<i>c-myc</i>	↑	↔	↑	↑
SGP-2	↓	↔	—	—
APLP1	↓	↓	—	—
S100 $\beta$	↓	↔	—	—
APP950	↓	↔	—	—
PrP	↓	↔	↓	↓

↑ : an increase of methylation, ↓ : an decrease of methylation, ↔ : no change, — : not studied

성 치매 환자의 특징적인 소견인 아밀로이드 플라크가 대뇌피질에 형성되었음을 발견하였다 (Fig. 1A). 그리고 스크래피 감염질환의 특징적인 병리 소견의 하나인 vacuolation (spongiform encephalopathy)도 아밀로이드 플라크와 더불어 관찰되었다 (Fig. 1B). 그러나 대조군에서는 vacuolation 및 아밀로이드 플라크의 형성이 전혀 발견되지 않았다.

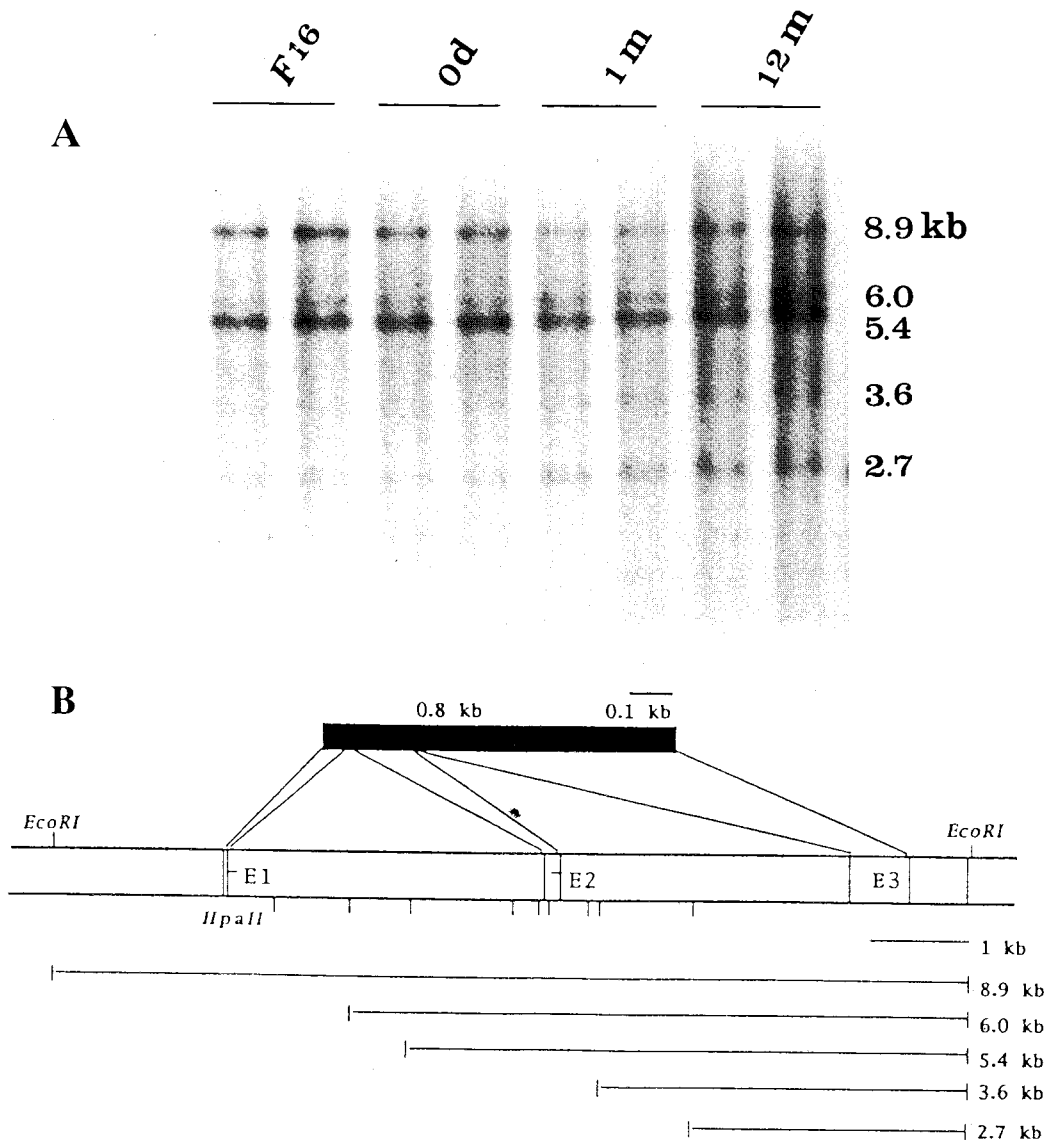
### 3. Southern blot analysis

본 연구에서는 메틸화 감수성 효소 (methylation sensitive enzyme) 중의 하나인 *HpaII*와 메틸화 비감수성 효소(methylation nonsensitive enzyme)인 *EcoRI*, *BamHI*, 그리고 *HpaII*의 이성화효소인 *MspI*을 사용하여 DNA를 절단한 후 메틸화 유무에 따라 DNA 절단부위가 변화하여 생성된 DNA 단편에 대한

전기영동상에서 이동거리의 차이를 이용하여 특정 유전자에서의 DNA 메틸화를 검사하였다.

#### (1) 노화과정에 따른 DNA 메틸화 변화

노화과정에 따른 DNA 메틸화 변화는 각각의 유전자에 따라 서로 다른 양상을 나타내었다. S100 $\beta$ 의 경우 연령이 증가할수록 hypomethylation의 양상을 나타냄에 반해 (Fig. 2) *c-fos*의 경우는 hypermethylation 양상을 나타내었다 (Fig. 3). 즉, S100 $\beta$ , PrP, SGP-2, APLP1, APP950 등의 신경조직 특이유전자들의 DNA 메틸화는 연령이 증가할수록 hypomethylation 양상을 나타내었다 (Table 1). 이와 반대로 *c-fos*, 및 *c-myc* 등의 oncogene 유전자들의 DNA 메틸화는 연령이 증가할수록 hypermethylation 양상을 나타내었다 (Table 1). 또한 간조직의 경우 *c-fos*, *c-myc* 등은 태생기에서 출생기, 성숙기, 노화기에 이르는 동안 계속적인 hyper-

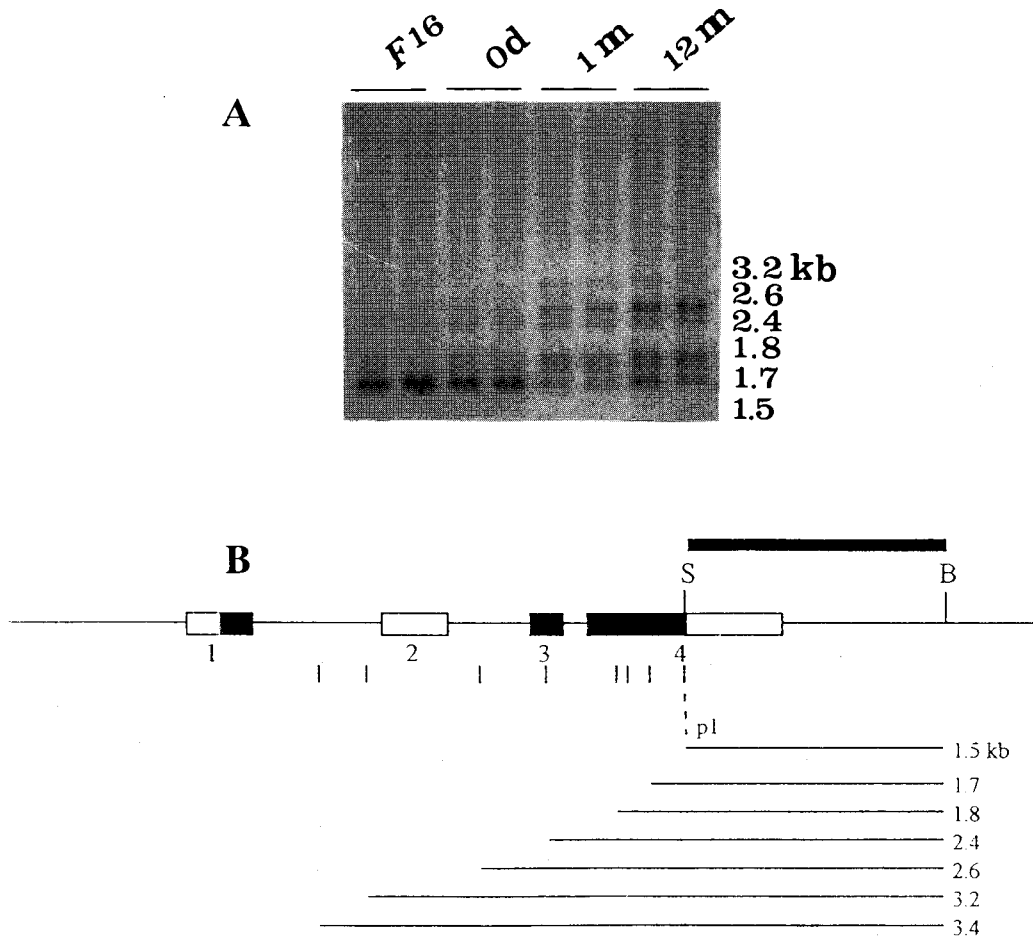


**Fig. 2.** The effects of age on DNA methylation in the mice brains. **(A)** Total DNAs were extracted from the brains of mice at different ages, digested with restriction enzymes, and subjected to Southern blot analysis using S100 $\beta$  probe. F16, 16-day-old fetus; 0d, 0-day-old infants; 1m, 1-month-old mice; 12m, 12-month-old mice. Lanes 1-8, *HpaII* + *EcoRI*; lanes 9-10, *MspI* + *EcoRI*; lanes 11-12, *EcoRI* only. **(B)** Map of S100 $\beta$  illustrating detected in the Southern blot analyses in A. The sizes of the fragments shown correspond to the sizes of the bands indicated to the panel A. The thick line above the map indicates the probe used.

methylation의 양상을 나타내었으나 PrP의 경우는 동일기간 동안에 hypomethylation의 양상을 관찰할 수 있었다. 각각의 유전자들에 대한 발달과정 및 노화과정 중의 DNA 메틸화 변화를 종합한 결과는 Table 1과 같다.

(2) 스크래피 감염에 따른 DNA 메틸화 변화  
스�크래피 감염군 및 대조군의 뇌조직에서는

신경성장인자로 알려져 있는 S100 $\beta$ 를 비롯하여 PrP, SGP-2, APP950, APLP1 등의 DNA 메틸화 변화를 관찰하였으나 두 군사이의 차이점은 발견되지 않았다. 연령이 증가할수록 hypomethylation의 양상을 나타내는 S100 $\beta$ 의 경우와 연령이 증가할수록 hypermethylation의 양상을 나타내는 *c-fos*의 경우도 감염군과 대조군의 차이점은 발견되지



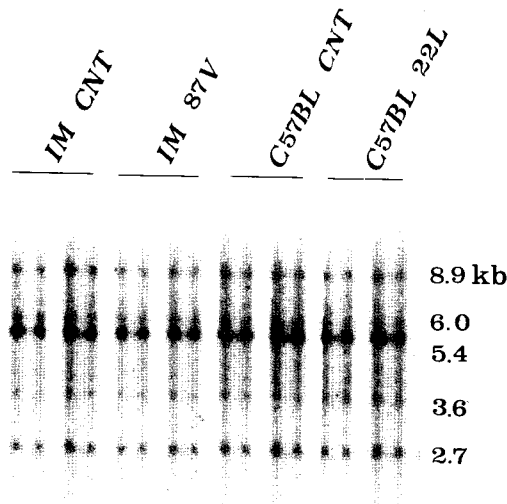
**Fig. 3.** The changes of DNA methylation in the MB mice brains of different ages. **(A)** DNA samples were digested with *HpaII* and *BamHI*, and subjected to Southern blot analysis using *c-fos* probe. F16, 16-day-old fetus; Od, 0-day-old infants; 1m, 1-month-old mice; 12m, 12-month-old mice. **(B)** Map of *c-fos* illustrating *HpaII* sites (vertical lines) around exons 2, 3 and 4 and the fragments (horizontal lines) detected in the Southern blot analysis in A. The sizes of the fragments shown correspond to the sizes of the bands indicated to the panel A. The thick line above the map indicates the probe used.

않았다 (Fig. 4, 5). 그리고 다른 유전자들의 경우도 두 군 사이에서는 DNA methylation의 변화된 차이점을 발견할 수 없었다 (data not shown).

### 고 찰

DNA 메틸화 수준의 변화는 전체 DNA에서의 5mC 양을 측정함으로써 알아볼 수 있으나 이는 특정부위에서의 메틸화 변화를 확인할 수는 없다. 특정 cytosine 잔기의 메틸화 상태는 여러 서로 다른 조직으로부터 추출한 DNA를 절단하는 메틸화 감수성 제한효소를 사용함으로써 측정할

수 있으며 생성된 단편의 크기 변화는 적절한 probe 사용에 의한 Southern blot hybridization 방법에 의해 확인될 수 있다. 예를 들면 메틸화 상태의 확인부위 중의 하나인 CC(A/T)GG는 여러 이성화효소 (isoschizomer)를 이용하여 측정할 수 있다. 제한효소 *HpaII*는 -CCGG- 배열을 인식하며 그 부위를 절단하지만 내측의 cytosine이 methylation되어 -C5mCGG-가 되면 절단할 수 없는 메틸화 감수성 효소이다. 한편 *HpaII*의 이성화효소인 제한효소 *MspI*은 내측의 cytosine이 메틸화되어 -C5mCGG-가 된 경우 절단할 수 있는 (단, -5mCCGG-인 경우에는 절단하지 못한다) 메틸화

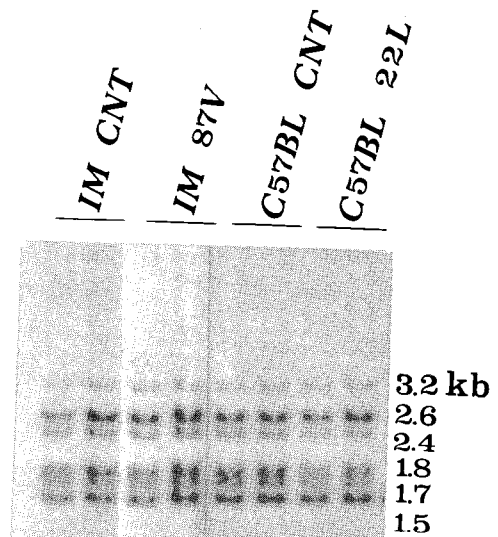


**Fig. 4.** Southern blot analysis of DNA from the control and scrapie-infected brain in IM and C57BL mouse. DNA samples were digested with *HpaII* and *EcoRI*, and subjected to Southern blot analysis using S100 $\beta$  probe.

비감수성 효소이다.

그러나 제한효소 인식부위에 놓여 있지 않은 부분의 메틸화 상태는 이 방법의 분석으로는 알 수 없으며, 최근에는 genomic sequencing이나 PCR (polymerase chain reaction) 방법에 의해 분석되고 있다. 그외 PrP, SGP-2, APLP1, APP950 등의 뇌조직 특히 유전자들의 경우 대부분 연령이 증가할수록 hypomethylation의 양상을 나타내는 반면 *c-fos*를 포함한 *c-myc* 등의 oncogene들은 hypermethylation 양상을 나타내었다 (Table 1).

본 연구결과에서는 과거 노화 및 스크래피 감염군의 뇌조직에서 S100 $\beta$  단백질의 유전자 발현이 증가됨이 발견되었음에도 불구하고, 스크래피 감염에 의한 메틸화 정도는 별다른 차이가 발견되지 않음으로써 S100 $\beta$  단백질 유전자 발현과 DNA 메틸화와의 역상관 관계는 나타나지 않았다 [16, 17]. 또한 *c-fos*, *c-myc*, SGP-2, APLP1, PrP, APP950 등의 서로 다른 유전자들에 있어서도 스크래피 감염에 따른 차이를 보이지 않았다. 한편 노화과정에 따른 메틸화 연구에 있어서는 뇌조직의 경우 태생기에서 출생기에 이르는 동안 *c-fos* 및 *c-myc* 유전자가 hypermethylation 양상을 나타낸 반



**Fig. 5.** Southern blot analysis of DNA from the control and scrapie-infected brain in IM and C57BL mouse. DNA samples were digested with *HpaII* and *EcoRI*, and subjected to Southern blot analysis using *c-fos* probe.

면 동일기간 동안 SGP-2, S100 $\beta$ , APP950, PrP 및 APLP1 등은 hypomethylation의 양상을 나타내었다. 간조직의 경우에는 *c-fos* 및 *c-myc* 등의 유전자가 연령이 증가할수록 hypermethylation 양상을 나타낸 반면 다른 유전자들은 차이가 없었고 PrP만이 hypomethylation 양상을 나타내었다 (Table 1).

한편 노화에 따른 DNA 전체의 메틸화 변화에 대한 정확한 연구결과는 아직 없지만, *in vitro*에서 세포가 노화하는 동안 DNA 메틸화는 감소한다고 보고되었으며 DNA 전체에서 보면 5'-methylcytosine 함량은 마우스 뿐만 아니라 사람에서도 약간이지만 노화에 의해 감소하는 경향을 보인다고 한다 [18, 19, 20]. 지금까지 연구결과에 의하면 전체 DNA 중에 A, T, G, C 외에 5'-methylcytosine이 존재하는 것이 알려져 있으며 그 양은 포유류에서는 전 cytosine의 2~7%이고, 거의 CG 배열부위에 집중되어 있을 뿐만 아니라 이 DNA 메틸화는 DNA와 단백질의 결합에 영향을 주고, 유전자 발현에 관여하고 있는 것이 알려져 있다 [21, 22].

사실 세포분열을 반복해도 DNA 메틸화 양상은 변화하지 않지만, 발생, 분화과정에서는 크게 변화하는데 이 DNA 메틸화가 노화과정에서도 변화하는 것을 알게 된 것은 비교적 최근의 연구 결

과이다 [23]. 즉, 전체 DNA 중에 함유된 5-methylcytosine 양은 노화에 의해 변화하는 경우와 그렇지 않은 경우가 있지만, 몇가지의 생물 종이나 조직에서 연구된 결과에 의하면 아직 일정한 범칙이 발견되지는 않고 있다. 예를 들면, 마우스 간 조직에서는 5-methylcytosine 함량이 노화됨에 따라 저하하지만, 사람 간조직에서는 큰 변화를 보이지 않았다 [24, 25].

그러나, 각각의 유전자에서의 메틸화를 관찰해 보면, 많은 유전자에서 노화에 의한 변화는 보이지 않지만, 일부 유전자에서는 확실한 변화가 발견되고 있다 [13]. 이들은 조직 및 유전자 특이성을 나타내며 이외에 30종 이상의 유전자가 조사되어 있으나 노화에 의한 변화는 보여주고 있지 않다. 본 연구결과에서도 나타났듯이 일부 결과는 mouse strain만 다를 뿐 Ono 등의 결과 [26, 27]와 일치하는 결과를 나타내 주었다. 또한 대부분 발달 단계상의 차이만 나타낸 것은 변화가 없다는 것으로 단정하기보다는 각 연령군을 좀더 세분화하여 관찰해 볼 필요성을 제시해 주며 probe로 사용된 유전자들의 다른 부위, 예를 들면 promoter 부위를 관찰해 볼 필요가 있음을 시사해 준다.

Ono 등의 보고 [13]에 의하면 메틸화가 노화과정에서 변하는 경우, 그 변화 양상 (증가 또는 감소)은 성장과정에서의 변화와 동일하다고 한다. *c-myc* 유전자는, 마우스 간조직에서 연령이 증가함에 따라 메틸화가 증가되었을 뿐만 아니라, 사람 간조직에서도 동일하게 증가되었다 [23]. 다만 그 증가속도는 사람에서 마우스의 약 1/20로서 각각의 수명에 대략 비례한 값을 나타내고 있으며 그 변화속도는 두 종 사이에 모두 노화속도와 비례함을 보여 주었다. 따라서 이것은 DNA 메틸화를 검사하는 것에 의해 사람의 연령을 추측할 수 있는 것을 의미하고 있으며 노화의 기본 메카니즘에 있어 DNA 메틸화의 중요성을 제시해 주고 있다.

이상의 결과를 종합해 보면 스크래피에 감염된 마우스 뇌조직은 알츠하이머병과 유사한 퇴행성 신경변화를 나타내에도 불구하고 퇴행성 신경변화에 밀접한 관련이 있는 유전자들의 DNA 메틸화의 뚜렷한 변화는 관찰할 수 없었다. 그러나 앞으로 여러 유전자들의 특정부위 (promotor) 뿐만 아니라 퇴행성 신경변화에 따라 발현의 변화를 보이는 이들 유전자들을 조직의 병리학적 병변

에 따라 보다 세밀하게 세분된 뇌부위를 선택하여 계속적으로 연구가 이루어진다면 노화 현상 및 여러 퇴행성 질환의 발병기전과 DNA 메틸화의 변화에 대한 중요한 기초자료를 얻을 수 있다고 생각된다.

## 결 론

최근 노인 인구의 증가와 더불어 노인성 치매 환자가 급증하고 있으며 치매를 일으키는 대표적인 질환은 알츠하이머병이다. 그러나 알츠하이머병의 원인 규명, 조기 진단 기술 및 치료제 개발 등에 많은 어려움이 따르고 있다. 노화에 따른 DNA 메틸화의 변화에 대한 연구는 노화의 기전 규명 연구에 중요한 지표로 여겨지고 있다. 그러므로 본 연구에서는 알츠하이머병 연구에 이용되는 실험동물의 하나인 스크래피 감염 마우스의 뇌조직에서 알츠하이머병의 병인에 직·간접적으로 관련이 있다고 사료되는 유전인자 (SGP-2, S100 $\beta$ , APP950, PrP 및 APLP1)와 노화에 따라 간조직에서 메틸화의 특이적인 변화를 유발하는 유전인자 (*c-fos*, *c-myc*)를 선택하여 메틸화의 변화를 연구하였다.

뇌조직의 경우 태생기에서 출생기에 이르는 동안 *c-fos* 및 *c-myc* 유전자는 메틸화 정도가 증가하여 hypermethylation을 나타낸 반면 동일기간 동안 SGP-2, S100 $\beta$ , APP950, PrP 및 APLP1 유전자는 메틸화 정도가 감소되어 hypomethylation 양상을 나타내었다. 그리고 간조직의 경우 *c-fos* 및 *c-myc* 유전자의 경우 태생기에서 출생기, 성숙기, 노화기에 이르는 동안 지속적인 hypermethylation의 양상을 나타내었으나 PrP의 경우는 동일기간 동안에 hypomethylation의 변화를 관찰할 수 있었다.

그러므로 본 연구 결과를 통하여 DNA 메틸화는 노화과정에서 주요 지표임을 재입증하였으나 스크래피 감염 후 퇴행성 신경병변이 유발됨에도 불구하고 DNA 메틸화의 차이점은 발견되지 않았다. 그러나 이와 같은 결론을 얻기 위해서는 앞으로 퇴행성 신경변화의 유발원인과 관련된 유전인자들의 보다 많은 연구가 수행되어야 한다고 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Prusiner SB: Novel proteinaceous infectious par-



- ticles cause scrapie. *Science* 216: 136-144, 1982.
2. Kimberlin RH: Scrapie: the disease and the infectious agent. *Trends in Neuroscience* 7: 312-316, 1984.
  3. Kim YS, Carp RI, Callahan SM and Wisniewski HM: Incubation and survival times for mice injected stereotaxically with three scrapie strains in different brain regions. *J Gen Virol* 68: 695-702, 1987.
  4. Carp RI and Callahan SM: Variation in the characteristics of 10 mouse-passaged scrapie lines derived from five scrapie positive sheep. *J Gen Virol* 72: 293-298, 1991.
  5. Bruce ME and Dickinson AG: Genetic control of amyloid plaque production and incubation period in scrapie-infected mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 44: 385-394, 1985.
  6. Kim YS, Carp RI, Callahan SM and Wisniewski HM: Incubation periods and histopathological changes in mice injected stereotaxically in different brain areas with the 87V scrapie strain. *Acta Neuropathologica (Berl)* 80: 388-392, 1990.
  7. Diedrich J, Weitgreffe S, Zupancic M, Staskus K, Retzel E, Hasse A and Race R: The molecular pathogenesis of astrogliosis in scrapie and Alzheimer disease. *Microbiol Pathol* 2: 435-442, 1987.
  8. Marshak DR, Pesce SA, Stanley LC and Griffin St: Increased S100 $\beta$  neurotrophic activity in Alzheimer's disease temporal lobe. *Neurobiol Aging* 13: 1-7, 1991.
  9. Wasco W, Gurubhagavatula S, Paradis MD, Romano D, Sisodia SS, Hyman BT, Neve RL and Tanzi RE: Isolation and characterization of the human APLP2 gene encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid  $\beta$  protein precursor. *Nature Genetics* 5: 95-100, 1993.
  10. Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK and Hyman BT: Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interaction. *Neuron* 11: 575-580, 1993.
  11. Wasco W and Tanzi RE: Etiological clues from gene defects causing early onset familial Alzheimer's disease. pp. 1-19. In Wasco W and Tanzi RE (Eds.), *Molecular mechanisms of dementia*. Humana Press New Jersey 1997.
  12. Razin A, Riggs AD: DNA methylation and gene function. *Science* 210: 604-610, 1980.
  13. Ono T, Uehara Y, Kurishita A, Tawa R, Sakurai H: Biological significance of DNA methylation in the ageing process. *Age and Ageing* 22: 534-543, 1993.
  14. Choi EK, Uyeno S, Nishida N, Okumoto T, Fujimura S, Aoki Y, Nata M, Sagisaka K, Fukuda Y, Nakao K, Yoshimoto T, Kim YS, Ono T: Alterations of *c-fos* gene methylation in the processes of aging and tumorigenesis in human liver. *Mutat Res* 354: 123-128, 1996.
  15. Ono T, Takahashi N, Okada S: Age-associated changes in DNA methylation and mRNA level of the *c-myc* gene in spleen and liver of mice. *Muta Res* 219: 39-50, 1989.
  16. Kato K, Suzuki F, Morishita R, Asano T, Sato T: Selective increase in S100 $\beta$  protein by aging in rat cerebral cortex. *J Neurochemistry* 54: 1269-1274, 1990.
  17. Kim YS, Choi EK, Yang HM, Kim J, Yu IJ, Marshak DR, Carp RI, Wisniewski HM: Increased expression of S100 $\beta$  in brain of IM mice injected with 87V scrapie agent. *Neurobiology of Aging* 15(1): 589, 1994.
  18. Wilson VL, Jones PA: DNA methylation decreases in ageing but not in immortal cells. *Science* 220: 1055-1057, 1983.
  19. Wilson VL, Smith RA, Ma S, Cutler RG: Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age. *J Biol Chem* 262: 9948-9951, 1987.
  20. Singhal RP, Mays-Hoopers LL, Eichhorn GL: DNA methylation in aging of mice. *Mech Ageing Dev* 41: 199-210, 1987.
  21. Ehrlich M, Wang YH: 5-Methylcytosine in eukaryotic DNA. *Science* 212: 1350-1357, 1981.
  22. Lewis J, Bird A: DNA methylation and chromatin structure. *FEBS Letters* 285: 155-159, 1991.
  23. Ono T, Yamamoto S, Kurishita A, Yamamoto K, Yamamoto Y, Ujeno Y, Sagisaka K, Fukui Y, Miyamoto M, Tawa R, Hirose S, Okada S: Comparison of age-associated changes of *c-myc*

- gene methylation in liver between man and mouse. *Mutat Res* 237: 239-246, 1990.
24. Tawa R, Ono T, Kurishita A, Okada S, Hirose S: Changes of DNA methylation level during pre-and postnatal periods in mice. *Differentiation* 45: 44-48, 1990.
  25. Tawa R, Uyeno S, Yamamoto K, Yamamoto Y, Sagisaka K, Katakura R, Kayama T, Yoshimoto T, Sakurai H, Ono T: Methylated cytosine level in human liver DNA does not decline in aging process. *Mechanisms of Ageing and Development* 62: 255-261, 1992.
  26. Ono T, Takahashi N, Okada S: Age-associated changes in DNA methylation and mRNA level of the *c-myc* gene in spleen and liver of mice. *Mutat Res* 219: 39-50, 1989.
  27. Uehara Y, Ono T, Kurishita A, Kokuryu H, Okada S: Age-dependent and tissue-specific changes of DNA methylation within and around the *c-fos* gene in mice. *Oncogene* 4: 1023-1028, 1989.
-