

OCT4와 SOX2에 의한 인간 *Nanog* 유전자의 전사 조절

석현정 · 김영은 · 박정아 · 이영희[†]

충북대학교 자연과학대학 생화학과

Transcriptional Regulation of Human *Nanog* Gene by OCT4 and SOX2

Hyun Jeong Seok, Young Eun Kim, Jeong-A Park and Younghee Lee[†]

Dept. of Biochemistry, College of Natural Sciences,
Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

ABSTRACT : Embryonic stem (ES) cells can self-renew maintaining the undifferentiated state. Self-renewal requires many factors such as OCT4, SOX2, and NANOG. It is previously known that OCT4 and SOX2 can bind to NANOG promoter and support *Nanog* gene expression in mouse ES cells by the detailed studies using the mouse *Nanog* promoter. Here, we constructed serial deletion mutant promoter-reporter constructs to investigate the human *Nanog* gene promoter in detail. The highest promoter activity was obtained in the 0.6 kb (-253/+365) promoter-reporter construct which includes the binding sites of OCT4 and SOX2. To further confirm contribution of OCT4 and SOX2 in *Nanog* gene expression, we introduced site-directed mutation(s) in the OCT4 and/or SOX2 binding sites of the human *Nanog* promoter 0.6 kb (-253/+365) and checked the influence of the mutation on the promoter activity using human EC cell line NCCIT. Mutation either in OCT4 binding site or SOX2 binding site significantly reduced the activity of *Nanog* promoter which directly confirmed that OCT4 and SOX2 binding is essential in human *Nanog* gene expression.

Key words : Human *Nanog* gene, Promoter, Regulation, OCT4, SOX2.

요 약 : 배아 줄기세포는 미분화상태에서 자가 재생을 유지할 수 있다. 자가 재생은 OCT4, SOX2와 NANOG와 같은 많은 인자들이 작용한다. 생쥐 배아 줄기세포에서 OCT4와 SOX2가 *Nanog* 프로모터에 결합하여 *Nanog* 유전자의 발현을 촉진한다는 사실은 생쥐 promoter에 관한 정밀분석으로 알려져 있다. 본 연구에서는 인간 *Nanog* promoter를 정밀 분석하기 위해 연속적인 결손 돌연변이를 가진 promoter-reporter construct를 제조하였다. Promoter의 최대 활성은 0.6 kb(-253/+365) promoter-reporter construct에서 발견되었으며, 이 construct에는 OCT4 및 SOX2의 결합부위가 포함된다. OCT4와 SOX2의 기여도를 확인하기 위하여 OCT4 및 SOX2의 결합부위에 자리 특이적 돌연변이를 유도하고 promoter 활성에 미치는 영향을 조사한 결과, OCT4나 SOX2 어느 한 군데라도 돌연변이가 존재하면 promoter 활성이 현저히 저해되었다. 본 연구 결과를 통해 인간 *Nanog* 유전자 발현에 있어 OCT4 및 SOX2가 필수적임을 직접적으로 확인할 수 있었다.

서 론

다능성 줄기세포(pluripotent stem cell)는 자가 재생(self-renewal)을 통한 수적 증가와 다양한 조직세포로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있는 줄기세포로서, 향후 세포치료를 위한 다양한 세포의 공급원으로 활용할 수 있을 것으로 예측되며, 많은 과학자들이 줄기세포의 자가 재생에 관련된 mechanism

에 대해 연구 중에 있다(Evans & Kaufman, 1981; Thomson et al., 1995; Reubinoff et al., 2000; Odorico et al., 2001). 배아줄기세포(embryonic stem cell, ES cell)는 대표적인 다능성 줄기세포이다. 배아줄기세포의 자가 재생 유지에는 많은 요인(OCT4, SOX2, FOXD3와 NANOG)이 작용한다(Niwa et al., 2000; Silva et al., 2006; Babaie et al., 2007; Jaenisch & Young, 2008). 한편, 배아암세포(embryonal carcinoma cells, EC cells)는 배아줄기세포가 가지는 여러 가지 특성 즉, 줄기세포 마커인 SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, OCT4, TRA-1-60, TRA-1-81 등을 발현하며, alkaline phosphatase 활성

[†] 교신저자: 충청북도 청주시 흥덕구 개신동 12번지 충북대학교 자연과학대학 생화학과. (우) 361-763, (전) 043-261-3387, (팩) 043-267-2306, E-mail: yhl4177@cbnu.ac.kr

을 보이는 특성을 공유하면서도 배아줄기세포보다 배양이 쉽고, 유전자 전달이 용이하므로 배아줄기세포 연구의 보조적인 시스템으로 활용되고 있다(<http://stemcells.nih.gov/info/2001report>).

다능성 세포의 유지에 필요한 인자 중 하나인 NANOG protein은 2003년 영국 에든버러 대학 Austin Smith 교수와 일본 나라 과학연구소 Shinya Yamanaka 박사에 의해 배아줄기세포에서 발견되었다(Mitsui et al., 2003; Chambers et al., 2003). NANOG 단백질은 전사인자로서 consensus sequence((C/G)(G/A)(C/G)C(G/C)ATTAN(G/C))에 결합하는 것으로 확인되었다(Mitsui et al., 2003). NANOG 단백질의 작용 기전에 대한 연구는 아직 완전하지는 않으나, NANOG는 자가 재생에 중요한 전사인자인 OCT4, SOX2, Rex-1 등과 함께 서로 상승적, 순환적(circuit)으로 작용하여 자가 재생에 기여하는 것으로 보인다(Shi et al., 2006; Shultz & Hoffmann, 2007). 한편, NANOG는 GATA6의 promoter에 결합하여 GATA6의 발현을 억제시키는 작용을 한다고 알려졌다(Singh et al., 2007). 최근의 연구 결과에 의하면, NANOG는 또한 분화를 유도하는 것으로 알려진 NF- κ B와 직접적인 결합을 통해 NF- κ B의 전사활성을 억제하고 STAT3과 협동하여 줄기세포의 특성 유지에 기여한다(Torres & Watt, 2008). NANOG는 multi-domain protein으로, 2가지 transactivation domain 즉 N-terminal transactivation domain과 C-terminal transactivation domain인 CD를 포함하고 있다(Pan & Pei, 2003). N-terminal domain은 일반적인 transactivator에서 찾을 수 있는 Ser, Thr, acidic residue가 풍부한 95개의 아미노산으로 구성된다. CD는 150 residue로 구성되어 있으며, transactivation motif에서 찾을 수 있는 아미노산 조성 또는 구조적인 특징이 없음에도 불구하고 transcription activation을 증대하는 것으로 알려져 있다. NANOG가 활성을 가질 때에 이 domain이 필수적인 것인가에 대한 점은 아직 분명하게 밝혀지지 않았으므로, 이 domain의 특징을 밝힌다면 NANOG의 줄기세포 다능성에 영향을 끼치는 factor로서의 구조적인 이해를 높일 수 있을 것으로 기대된다(Pan & Thomson, 2007).

특정 유전자의 발현을 이해하기 위해서는 해당 유전자의 promoter를 분석하고, 전사인자의 결합 부위를 예측한 후 결합 부위의 결손 또는 변형을 유도한 후 해당 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하는 과정이 중요하다. 기존의 다른 연구

들은 *Nanog* promoter의 분석을 통해 transcription의 시작하기 전 180 bp(생쥐) 또는 118 bp(인간) 위치에서 OCT4/SOX2 결합자리를 발견하였으며, 생쥐 promoter study를 통해 이들 부분이 *Nanog* 유전자 발현에 매우 중요함을 확인하였다(Rodda et al., 2005; Kuroda et al., 2005). 이 부분은 생쥐, 쥐, 인간에서 잘 보존되어 있으므로, 마찬가지로의 결과를 인간 promoter에서도 예측할 수 있으나, 실제로 직접 확인하여 보고한 결과는 없었다. 또한, 생쥐 *Nanog* promoter에 STAT3, T와 FOXD3 단백질 인자가 결합하게 되면 promoter가 활성화 되지만, p53과 TCF3 단백질 인자에 의해서 억제제가 됨이 알려졌다(Pan G & Thomson, 2007). 최근에는 인간 배아줄기세포에서 OCT4와 SOX2 단백질과 KLF4, PBX1 단백질이 서로 작용하여 *Nanog* promoter에 영향을 준다는 것이 알려졌다. 즉, KLF4와 PBX1 단백질을 과발현시키면 *Nanog* promoter의 활성이 증가하고, KLF4와 PBX1 단백질을 돌연변이시키면 *Nanog* promoter의 활성이 감소한다. 또한 OCT4와 SOX2 단백질과 KLF4, PBX1 단백질이 함께 있을 때 *Nanog* promoter의 활성이 더 증가함이 알려졌다(Chan et al., 2009). 본 연구에서는 인간 *Nanog* promoter를 cloning하고, 다양한 크기의 deletion을 가진 promoter construct를 제작하여 인간 배아암세포주에서 promoter 활성을 확인함으로써 promoter 부위의 중요성을 확인하였으며, 특히 OCT4/SOX2 결합 부위의 자리 특이적 돌연변이를 유도하고, 그 결과를 비교함으로써 인간 *Nanog* 유전자의 발현에 대한 기여도를 확인하였다.

재료 및 방법

1. 배아암세포주의 배양

인간 배아암세포주 NCCIT는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 배아 암세포는 2~3일마다 계대 배양을 해주었다. 배양 접시에 자라고 있는 배아암세포를 1X PBS(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄)로 두 번 세척한 후 TrypLE Express(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂, 습윤한 incubator에서 5분간 두었다. 단일 세포로 분리된 세포는 10% FBS, 100 U/ml penicillin과 0.1 mM 2-mercaptoethanol이 포함된 RPMI-1640 medium 배양액을 넣어 2,000 rpm으로 3분 동안 원심분리

하여 회수하였다. 상층액을 제거하고 새 배지에 재 부유시켜 배양접시에 칸 후(5×10^5 cells/10 cm dish), 5% CO₂가 유지되는 37°C 배양기에서 배양하였다. NCCIT의 분화가 필요한 경우에는 10^{-5} M retinoic acid(all-*trans*, Sigma-Aldrich)를 5일까지 처리하였다.

2. *Nanog* Promoter Constructs 제작

0.4 kb(-61/+365), 0.6 kb(-253/+365), 0.8 kb(-348/+365), 1.0 kb(-651/+365), 1.2 kb(-838/+365), 1.4 kb(-1,053/+365), 1.6 kb(-1,232/+365)의 길이에 해당하는 *Nanog* promoter 서열은 primer와 인간 genomic DNA를 이용하여 PCR로 증폭시켰다. 실험에 사용한 primer는 Table 1에 제시하였다. PCR 조건으로서 denaturation 94°C 1 min, annealing 58°C 1 min, extension 72°C 1 min 과정을 35 cycle 반복하였으며, HiPi Plus Taq polymerase(ELPIS-Biotech, Daejon, Korea)를 이용하였다. 증폭된 DNA는 agarose 전기영동을 통해 크기를 확인하였고, gel extraction kit(Solgent, Daejon, Korea)을 사용하여 순수 분리한 후 TA cloning kit(Solgent)를 사용하여 DH5α competent cell에서 cloning하였다. Cloning한 DNA 서열은 Solgent에 의뢰하여 서열을 분석한 뒤 비교 site(<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/>)를 통하여 서열 비교분석을 통해 확인하였다. 제한효소인 Kpn I과

Bgl II를 이용하여 각 promoter 서열을 promoter가 없는 pGL3-basic 벡터(Promega, Madison, WI, USA)에 클로닝하여 promoter-reporter construct를 제조하였다. 확인된 reporter vector는 midi prep kit(Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 순수분리한 후 transfection 실험에 사용하였다.

OCT4나 SOX2 binding site 중 하나 혹은 두 부위에 돌연변이를 유도한 promoter mutant를 제조하기 위하여 mutation 도입용 primer를 제작하였다. 사용한 primer 서열은 Table 1에 제시하였다. Mutation 유도용 primer를 이용하여 1차 PCR을 수행한 후, 얻어진 PCR product를 annealing하여 primer를 추가하지 않고 Taq polymerase를 첨가하여 extension이 되게 한 후, 0.6 kb(-253/+365) 제작을 위해 사용한 primer를 이용하여 mutant promoter 서열을 증폭시켰다. 증폭된 서열을 TA cloning 및 DNA sequencing을 통해 서열을 확인하고, pGL3-basic 벡터로 subcloning하여 mutant promoter를 완성하였다.

3. Reporter Construct Transfection 및 Luciferase Activity 분석

5×10^5 의 배아암세포를 6-well dish에 plating한 뒤 12시간 후 Lipofectamine 2000(Invitrogen)을 이용하여 *Nanog* promoter construct와 pRL-null 벡터를 함께 transfection시킨

Table 1. PCR primer sequences used in this study

Purpose	Target	Primer sequence (5' → 3')	
For deletion mutant constructs	0.4 kb	CGCTCGAGTCAGTAGGGGGTGTG	
	0.6 kb	CGCTCGAGGAACCATATTCCTGAT	
	0.8 kb	CGCTCGAGACCATGCGTGGCTAA	
	1.0 kb	CGCTCGAGCTAATGAGAATTTCAA	
	1.2 kb	CGCTCGAGACTAAGGTAGGTGCT	
	1.4 kb	CGCTCGAGATGTTAGTGCTGGAA	
	1.6 kb	CGCTCGAGAGCAGAGTGCAGAG	
For site-directed mutagenesis	Downstream primer	CGAGATCTTGAGGCATCTCAGCA	
	OCT4 mutation	5'	CAGCTACTTTCAAATTACAATGGCCTTG
		3'	CCATTGTAATTTGAAAGTAGCTGCAGAG
	SOX2 mutation	5'	TTTTGCATTAACCTGGCCTTGGTGAGAC
		3'	ACCAAGGCCAGGTTAATGCAAAAGTAGC
	OCT4 and SOX2 mutation	5'	CAGCTACTTTCAAATTAACCTGGCCTTGGTGAGAC
		3'	ACCAAGGCCAGGTTAATTTGAAAGTAGCTGCAGAG

다. 16시간 후 Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega)을 이용하여 세포조각을 얻고 luciferase 활성을 측정 후, pRL-null 활성을 이용하여 측정치를 보정하였다. Luciferase 활성은 luminometer(Junior LB 9509, Berthold, Bad Wildbad, Germany)를 이용하여 측정하였다.

4. Western Blotting

세포 lysate를 얻은 후 분리한 단백질은 정량하여 같은 양의 시료를 12% SDS-PAGE gel에 분주하고 전기영동하였다. 전기영동으로 분리한 단백질은 nitrocellulose membranes (Millipore Corp, Bedford, MA, USA)로 옮겼다. 비특이적인 단백질의 결합을 방지하기 위해 5% skim milk가 첨가된 1X PBS-Tween 20(PBS-T) 용액으로 1시간 동안 반응한 후 1차 OCT4(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), NANOG(Millipore Corp) 또는 GAPDH에 특이적인 항체(Santa Cruz Biotechnology)로 한 시간 동안 반응시켰다. PBS-T 용액으로 세척한 후, 2차 항체(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)로 한 시간 동안 반응시켰다. West-Zol™ Plus(iNtRON Biotechnology, Seoul, Korea)를 사용하여 면역반응성을 확인하였다.

결 과

1. 인간 배아암세포주에서 *Nanog* 유전자의 발현 확인

인간 배아줄기세포는 transfection 효율이 매우 낮으므로 promoter 연구가 어려우나, 배아암세포주의 경우에는 이보다 transfection이 훨씬 용이하므로, 본 연구에서는 *Nanog* 유전자 발현을 확인하기 위하여 인간 배아줄기세포 대신에 인간 배아암세포주를 사용하기로 하였다. 인간 배아암세포주인 NCCIT에는 줄기세포 마커인 OCT4, NANOG 단백질이 발현됨을 단백질 수준에서 확인할 수 있었다. 이는 기존의 보고와 일치하는 결과이다(<http://stemcells.nih.gov/info/2001report>). 한편, 배아줄기세포 및 배아암세포에서 분화를 유도하는 물질로 알려진 retinoic acid를 처리한 후 OCT4 및 NANOG의 발현을 살펴본 결과, 분화유도 기간이 경과할수록 이들 단백질의 발현이 점차 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 그러므로 미분화상태를 유지하면서 배양한 세포에서 *Nanog* 유전자 promoter의 활성을 확인하기로 하였다.

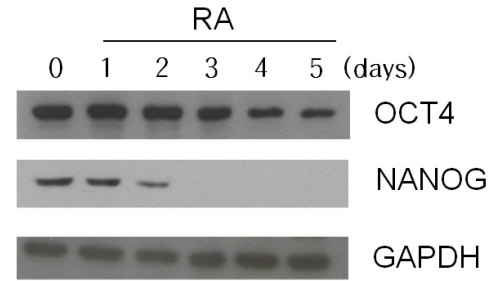


Fig. 1. Expression of OCT4 and NANOG in NCCIT cells and during differentiation of NCCIT cells. Differentiation of NCCIT cells was stimulated by treating the cells with 10^{-5} M retinoic acid (RA) for 5 days. Expression levels of OCT4 and NANOG were confirmed by Western blotting analysis. The amount of GAPDH was shown as a control.

2. *Nanog* Promoter의 Deletion Mutant Construct 제작 및 Promoter 활성 확인

Nanog promoter의 전사 조절기작을 이해하기 위하여, 1.6 kb promoter에서 시작하여 다양한 길이의 *Nanog* promoter 서열을 확보하고, deletion mutant construct를 제작하였다(Fig. 2A). 얻어진 promoter-reporter construct를 NCCIT cell에 transfection시킨 후 promoter 활성을 살펴본 결과, 0.4 kb promoter(-61/+365)에서는 활성이 매우 낮으나, 0.6 kb promoter(-253/+365)에서는 promoter construct 중에서 가장 강한 활성을 확인할 수 있었다(Fig. 2B). 0.4 kb promoter(-61/+365)와 0.6 kb promoter(-253/+365) construct를 비교해 보면, Fig. 2B에 보는 바와 같이 0.6 kb promoter(-253/+365)에는 OCT4, SOX2의 결합 자리가 포함된다(-118/-101). 그러므로 이들 promoter construct 사이에서 보이는 promoter 활성의 차이는 OCT4, SOX2의 존재 여부에 의해 결정되는 것임을 예측할 수 있다. Promoter construct에서 upstream 서열이 더 길어질 경우(0.8 kb, 1.0 kb, 1.2 kb, 1.4 kb, 1.6 kb)에는 promoter 활성이 오히려 감소하는 것을 확인할 수 있었는데, 이는 negative element의 존재 가능성을 제시하고 있다(Fig. 2).

3. OCT4, SOX2 결합 부위의 자리 특이적 돌연변이 Promoter 제작 및 Promoter 활성 확인

OCT4, SOX2 단백질의 결합 인자의 중요성을 재확인하기 위하여, 0.6 kb(-253/+365) promoter construct를 기반으로 하여, OCT4 또는 SOX2 단백질 결합 부위를 한 개만 변

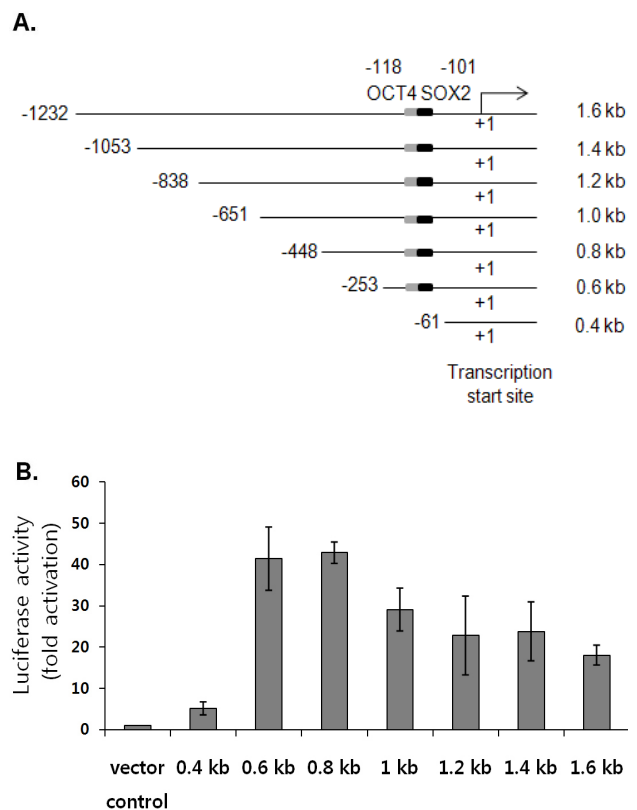


Fig. 2. Construction and analysis of serially deleted mutant constructs of the *Nanog* promoter. (A) Schematic illustration of serially deleted mutant promoter constructs cloned in pGL3-basic luciferase reporter plasmid. The positions of the OCT4 and SOX2 binding sites are indicated. (B) Luciferase activity of the serially deleted mutant promoter constructs. Promoter-reporter constructs were transfected to NCCIT cells along with pRL-null vector. After 16 hr incubation, luciferase activity was measured and normalized with pRL-null activity. Luciferase activity is shown as a fold-activation compared with the cells transfected with pGL3-basic vector as a control. The data represent mean fold activation from three independent experiments.

형시킨 mutant와, 두 결합 부위 모두를 변형시킨 mutant를 제조하였다. 돌연변이를 유도한 위치 및 변경된 서열은 Fig. 3A에 제시하였다. Mutant promoter construct을 NCCIT cell에 transfection 시킨 후 promoter 활성을 살펴본 결과, OCT4, SOX2 단백질 결합 부위 중 하나만 돌연변이 시켜도 *Nanog* promoter의 활성이 급격히 감소하여 pGL-basic vector control과 유사한 수준이 되는 것을 확인할 수 있다(Fig. 3B).

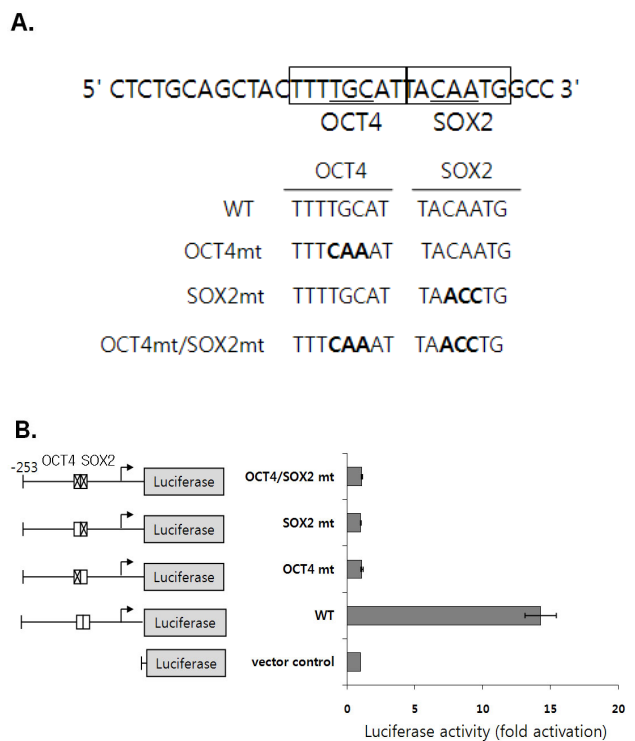


Fig. 3. Construction and analysis of mutant *Nanog* promoter constructs including site-directed mutation(s) in the OCT4 and/or SOX2 binding sites. (A) Site-directed mutagenesis. Changes of the nucleotides are indicated in bold letters. (B) Effect of OCT4 and/or SOX2 binding site mutation on the *Nanog* promoter activity. NCCIT cells were transfected with the mutant promoter-reporter constructs. Cell lysates were prepared and the luciferase activity was measured and normalized with pRL-null activity. Luciferase activity is shown as a fold-activation compared with the cells transfected with pGL3-basic vector as a control.

두 부위 모두에 돌연변이가 유도된 경우에도 동일한 결과를 얻었다. 이는 *Nanog* 유전자 promoter의 OCT4, SOX2 결합 부위의 중요성, 즉 OCT4 및 SOX2 두 단백질의 결합이 모두 필수적임을 확인하는 실험결과이다. 이전의 생쥐에서의 실험결과를 보면, OCT4 및 SOX2 결합 부위의 결손이 부가적인 효과를 보인다는 보고(Rodda et al., 2005)와 이들 간의 차이가 거의 없음을 보이는 보고가 공존하므로(Kuroda et al., 2005) 추가적인 확인이 이루어져야 하겠지만, OCT4 및 SOX2 결합 부위의 결손의 중요성은 생쥐와 인간에서 매우 유사한 것으로 판단된다.

고 찰

배아줄기세포의 연구에 있어 자가 재생의 mechanism을 규명하는 것은 배아 줄기세포를 분화되지 않게 배양하는 데 있어 중요한 기초를 제공하며, 유도만능줄기세포의 생성 및 유지 mechanism을 규명하는데도 필수적인 정보가 된다 (Yamanaka, 2007). 배아줄기세포에서 NANOG 단백질은 자가 재생의 중요한 단백질 중의 하나이므로 NANOG 단백질의 발현 mechanism을 규명하는 것은 매우 중요하다. 지금까지의 많은 연구는 생쥐 *Nanog* promoter 및 생쥐 배아줄기세포 또는 배아암세포를 이용하여 이루어졌으며, promoter 서열의 유사성을 기반으로 인간 *Nanog* 유전자의 발현도 유사함을 chromatin immunoprecipitation assay 등을 통해 확인하는 방식으로 진행되었다(Rodda et al., 2005; Kuroda et al., 2005). 그러므로 실제로 인간 *Nanog* promoter를 cloning 하여 site-directed mutagenesis 등을 통해 세밀하게 분석한 결과는 제시되지 않은 셈이다. 본 실험에서는 인간 *Nanog* promoter의 다양한 mutant construct를 제조하고 인간 배아암세포주에서 그 활성을 확인함으로써, 인간 *Nanog* promoter의 조절을 직접 확인하고자 하였다. 본 실험의 결과, 0.6 kb(-253/+365) promoter construct가 minimal promoter로 작동할 수 있음을 확인하였으며(Fig. 2), 자리 특이적 돌연변이를 통해 OCT4와 SOX2 단백질의 결합 부위가 모두 다 중요하다는 사실을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 인간 *Nanog* promoter construct를 생쥐 배아암세포주인 F9에 transfection 하여 동일한 실험을 수행한 경우에도 마찬가지로의 결과를 얻을 수 있었는데, 이를 통해 종에 무관하게 *Nanog* promoter가 작동할 수 있으며, 특히 OCT4, SOX2의 중요성은 마찬가지로 지임을 직접적으로 확인할 수 있었다(결과 제시하지 않음).

다양한 길이의 인간 *Nanog* promoter construct의 promoter 활성을 비교한 결과(Fig. 2)는 기존에 알려진 *Nanog* promoter 활성에 필요한 부위 외에 negative regulation에 관여하는 부위 및 단백질이 존재함을 제시한다. 기존에 알려진 negative element로는 p53 결합 부위가 있다(Lin et al., 2005). p53은 배아줄기세포에서 그 활성이 낮으며, 이는 SIRT1에 의한 저해 작용에서 기인함이 밝혀진 바가 있다(Han et al., 2007). p53이 *Nanog* promoter에 결합하면 *Nanog* 유전자의 발현이 저해되며, 분화에 따른 p53의 활성화는 분화 과정에서 *Nanog*의 발현이 저해되는데 기여하는 것으로 알려져 있

다. 이외에도 다른 promoter 부위의 중요성 및 관련 단백질에 관한 연구 결과가 향후에 더 나올 것으로 예상된다. 본 연구에서 제작한 promoter-reporter construct는 향후 인간 *Nanog* promoter 활성을 조절하는 인자를 검색하는데 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 2008년도 충북대학교 학술연구지원사업의 지원을 받아 수행되었습니다.

인용문헌

- Babaie Y, Herwig R, Greber B, Brink TC, Wruck W, Groth D, Lehrach H, Burdon T, Adjaye J (2007) Analysis of OCT4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 25:500-510.
- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A (2003) Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113:643-655.
- Chan KK, Zhang J, Chia NY, Chan YS, Sim HS, Tan KS, Oh SK, Ng HH, Choo AB (2009) KLF4 and PBX1 directly regulate NANOG expression in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 27:2114-2125.
- Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156.
- Han MK, Song EK, Guo Y, Ou X, Mantel C, Broxmeyer HE (2008) SIRT1 regulates apoptosis and Nanog expression in mouse embryonic stem cells by controlling p53 subcellular localization. *Stem Cells* 2: 241-251.
- Jaenisch R, Young R (2008) Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 132:567-582.
- Kuroda T, Tada M, Kubota H, Kimura H, Hatano SY, Suemori H, Nakatsuji N, Tada T (2005) Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regu-

- lation of *Nanog* gene expression. *Mol Cell Biol* 25:2475-2485.
- Lin T, Chao C, Saito S, Mazur SJ, Murphy ME, Appella E, Xu Y (2005) p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing *Nanog* expression. *Nat Biotechnol* 7:165-171.
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S (2003) The homeoprotein *Nanog* is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113:631-642.
- Niwa H, Miyazaki J, Smith AG (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24:372-376.
- Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA (2001) Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 19:193-204.
- Pan G, Thomson JA (2007) *Nanog* and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res* 17:42-49.
- Pan GJ, Pei DQ (2003) Identification of two distinct transactivation domains in the pluripotency sustaining factor *nanog*. *Cell Res* 6:499-502.
- Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A (2000) Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. *Nat Biotechnol* 18:399-405.
- Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, Robson P (2005) Transcriptional regulation of *nanog* by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem* 280:24731-24737.
- Shi W, Wang H, Pan G, Geng Y, Guo Y, Pei D (2006) Regulation of the pluripotency marker *rex-1* by *nanog* and *sox2*. *J Biol Chem* 281:23319-23325.
- Shultz WA, Hoffmann MJ (2007) Transcriptional networks in embryonic stem cells and testicular cancer and the definition of epigenetics. *Epigenetics* 2:37-42.
- Silva J, Chambers I, Pollard S, Smith A (2006) *Nanog* promotes transfer of pluripotency after cell fusion. *Nature* 441:997-1001.
- Singh AM, Hamazaki T, Hankowski KE, Terada N (2007) A heterogeneous expression pattern for *Nanog* in embryonic stem cells. *Stem Cells* 25:2534-2542.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147.
- Torres J, Watt FM (2008) *Nanog* maintains pluripotency of mouse embryonic stem cells by inhibiting NF- κ B and cooperating with Stat3. *Nat Cell Biol* 10:194-201.
- Yamanaka S (2007) Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 1:39-49.

(received 26 March 2010, received in revised form 8 May 2010, accepted 9 May 2010)