

식물 유성 생식과정에서 후성유전학적 정보해석 및 연구현황

정유진 · 조용구 · 강권규

Current status and prospects of epigenetic information in sexual reproductive processes of plants

Yu Jin Jung · Yong-Gu Cho · Kwon Kyoo Kang

Received: 25 March 2017 / Revised: 26 March 2017 / Accepted: 27 March 2017

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Rapid progress in epigenetic studies has resulted in genome wide information of genetic functions, other than DNA sequence information. However, insufficient understanding and unclear research direction in epigenetics has failed to attract many researchers. Here, we review the sexual reproduction processes that are particularly related to epigenetics in plants. We aim to elucidate the roles of epigenetic information and molecular mechanisms involved in the complex sexual reproduction process of plants, and examine their biological significance.

Keywords Epigenetic, Sexual reproduction, Reprogramming, DNA demethylation, DNA methylation

서 언

식물은 적당한 광과 온도 조건이 되면 꽃을 피우게 되는데 이는 다음 세대에 종자를 전달하는 가장 기본적인 행위이다. 식물의 생식과정은 수술과 암술의 상호작용에 의해 종의 정체성 유지 및 집단의 다양성 유지 면에서 놀라운 정도

로 역동성을 지니고 있다. 식물은 후성유전학 정보를 포함한 유전정보를 다음세대로 어떻게 제대로 전달하는지, 어떤 허용범위 내에서 변화되어 전달하는지, 만약 전달되었다면 어떤 특성과 다양성이 부여되는지, 또는 세대를 거듭함에 따라 진화에 어떤 영향을 주는지에 대한 정보는 아직 자세히 밝혀져 있지 않다. 지금까지 많은 연구자들은 후성유전학에 대해 DNA의 메틸화, 히스톤 수식, 저분자 RNA 등 DNA의 염기배열 이외의 정보들에 대해서 어느 정도 밝혔으나(He et al. 2011; Ito et al. 2011), 그 정보가 생식과정 상에서 어떻게 재설계(reprogramming) 되는지에 대해서 새로운 연구결과들이 계속 보고되고 있는 실정이다. 식물의 생장과 정에서 일어나는 DNA 메틸화 제어에 대한 리뷰 논문은 많이 보고되어 있으나, 수정 후 생식과정에서 일어나는 후성유전학에 대한 리뷰논문은 거의 없는 실정이다. 식물에는 세 가지 범주의 DNA 메틸화 부위가 존재한다. 최근에는 포유동물에서 ES 세포 등 극히 일부의 세포에서 CpG 배열 이외의 배열에서의 DNA 메틸화가 발견되고 있지만, 식물에서는 종종 CpG 배열 외에도 CpHpG 배열 및 CpHpH 배열(H=C, T, A) 시토신 염기의 5번째 탄소 위에 메틸기가 부가된 5-메틸시토신이 된다. 애기장대에서는 CpG 배열은 주로 DNA 복제에 따라 한쪽 DNA 가닥만 메틸화한 hemimethyl화 부위에서 유지형 DNA 메틸화 효소 MET1에 의해 메틸화 된다. CpHpG 배열은 히스톤 H3의 9번째의 리신 잔기의 메틸화를 담당하는 히스톤 메틸화 효소 KYP의 기능에 의존하는 식물에 특이적인 chromomethyl화 효소 CMT3 의해 메틸화 된다. CpHpH 배열은 RdDM (RNA-directed DNA methylation, RNA 지향형 DNA 메틸화)의 기구에 의해 저분자 RNA를 통해 *de novo*형 메틸화 효소 DRM에 의해 메틸화 된다고 보고하였다(Saze et al. 2012; Nathan and Robert 2014). 식물의 생식과정에서 후성유전학 정보 특히 DNA의 메틸화가 어떻게 제어되는지를 이해하려면 속씨 식물의 중복수정의 구조를

Y. J. Jung · K. K. Kang (✉)
국립한경대학교 원예생명과학과
(Department of Horticultural Life Science, Hankyong National University, Ansong 17579, Korea)
국립한경대학교 유전공학연구소
(Institute of Genetic Engineering, Hankyong National University, Ansong 17579, Korea)
e-mail: kykang@hknu.ac.kr, yuyu1216@hknu.ac.kr

Y. G. Cho
충북대학교 식물자원학과
(Department of Crop Science, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea)

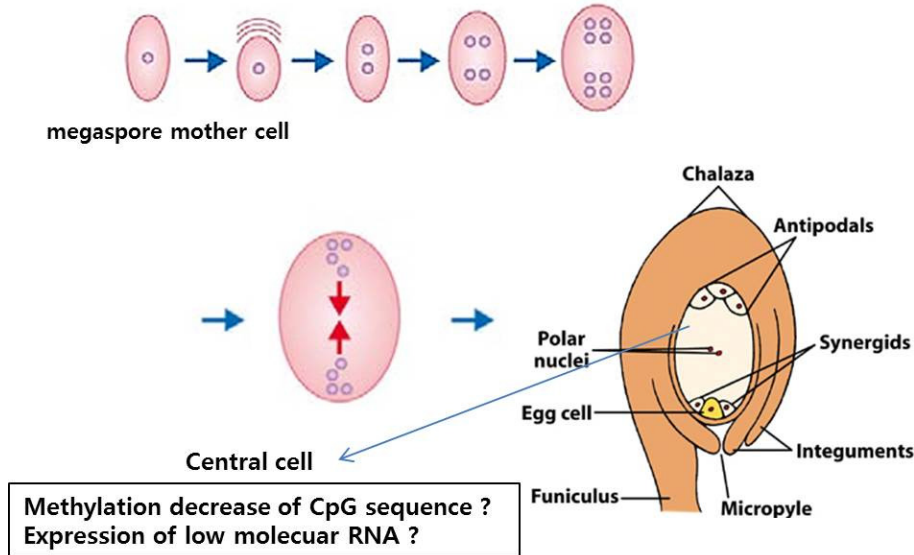


Fig. 1 Process of male gametophyte formation: Expression of a DNA demethylation related gene in the central cell; DNA demethylation occurs by targeting genes related to imprinting, resulting in the production of a 24-base low-molecular weight RNA

이해하는 것이 필수적이다. 본 리뷰에서는 식물의 생식과정에서 일어나는 암수 배우체, 수정 후 배 발생 및 배유 발생에 있어서 후성유전학 정보의 제어 및 재설계에 대해 이해하고자 현재까지 밝혀진 내용을 중심으로 자세히 설명하고자 한다.

자성 배우체의 모친 유래 후성유전학적 제어

자성 배우체는 암술의 깊은 곳에 존재하는 배주조직에서 대포자 모세포의 감수분열 과정을 거쳐 얻어진 4개의 반수체 중에 3개는 퇴화되고 남아있는 한 개의 대포자가 3회 핵분열을 통해 성숙하게 된다. 대부분의 나자식물은 난세포, 중앙세포, 2개 조세포, 3개 반축세포 등 8핵 7세포로 구성되며, 배낭(embryo sac)이라고 불리고 있다(Fig. 1). 이들 중 화분에 의해 운반되어온 2개의 정세포와 수정에 참여하는 난세포는 중앙 세포이며, 각각 배와 배유를 형성한다. 이들 세포 가운데 중앙세포에서 현저하게 DNA 메틸화에 의한 후성유전학적 정보 변화가 있다고 보고되고 있다(Hsieh et al. 2009; Ibarra et al. 2012). 중앙세포에서 후성유전학적 제어 연구의 발단이 된 것은 imprinting 유전자로서 MEDEA (MEA) 유전자가 발견되면서부터 시작되었다(Kinoshita et al. 1999; Grossniklaus et al. 1998; Scott and Brian 2014). Imprinting 유전자는 그 대립유전자가 부친으로부터 유래했는지, 모친으로부터 유래되었는지에 따라 유전자 발현의 on/off가 결정된다. 이와 같은 현상은 주로 포유류와 피자식물에서 발견되었고, 이를 계놈 imprinting이라고 부르고 있다(Kinoshita et al. 2008). Imprinting 관련 MEA 유전자 및 HD-ZIP형 전사인자 관련 FWA 유전자 등은 DEMETER (DME) 유전자에 코딩된 DNA 탈메틸화 효소에 의해 수정전에 자성 배우체 중앙

세포에서 DNA 탈메틸화되어 유전자 발현이 유도된다고 하였다(Kinoshita et al. 2004; Gehring et al. 2006; Scott and Brian 2014)(Fig. 2). MEA 유전자에 관해서는 DNA 탈메틸화 이외에도 chromatin loop 구조를 통해 후성유전학적으로 제어된다는 모델이 보고되었다(Wohrmann et al. 2012). 또한 마우스와 마찬가지로 차세대시퀀서를 이용한 SNP (single nucleotide polymorphism, 단일염기다형성) 분석에서 부친 유래 대립유전자 또는 모친 유래 대립유전자 특이적으로 발현하는 imprinting 관련 후보유전자들이 많이 알려졌다(Ikeda et al. 2012; Bjorn and Anne 2014). 대부분의 imprinting 유전자는 애기장대를 이용한 돌연변이체 연구에 의해 발견되어 왔다. 애기장대는 polycomb 복합체의 구성단백질을 관여하는 MEA 유전자와 FIS2 (fertilization independent seed) 유전자에서 계놈 imprinting이 발견되었다. 유전자들간 상동성 분석에 의해 유전자는 비교할 수 있지만, 식물에서 polycomb 복합체 구성 단백질을 관여하는 유전자 중 하나가 계놈 imprinting을 받고 있었기 때문에, 포유동물 및 피자식물에서 imprinting 유전자는 선택적 압력을 받으면서 진화되었다(Haig and Westoby 1991; Moore and Haig 1991; Wu et al. 2013). 그러나 차세대 시퀀서를 이용한 분석 결과는 벼, 애기장대, 옥수수 속 등에서 놀라운 다양성이 있다고 보고되었다(Ikeda et al. 2012). Imprinting 유전자가 어떻게 생겨났는지 여부는 향후 검증할 필요가 있지만, 어쨌든 식물의 생식과정에서의 후성유전학적 제어는 이러한 imprinting 유전자 해석을 모델로 이해하는 것이 바람직하다고 생각한다.

능동적 DNA 탈메틸화 기구

복제과정에서 DNA의 두 가닥이 풀리면, 어미 가닥 각각은

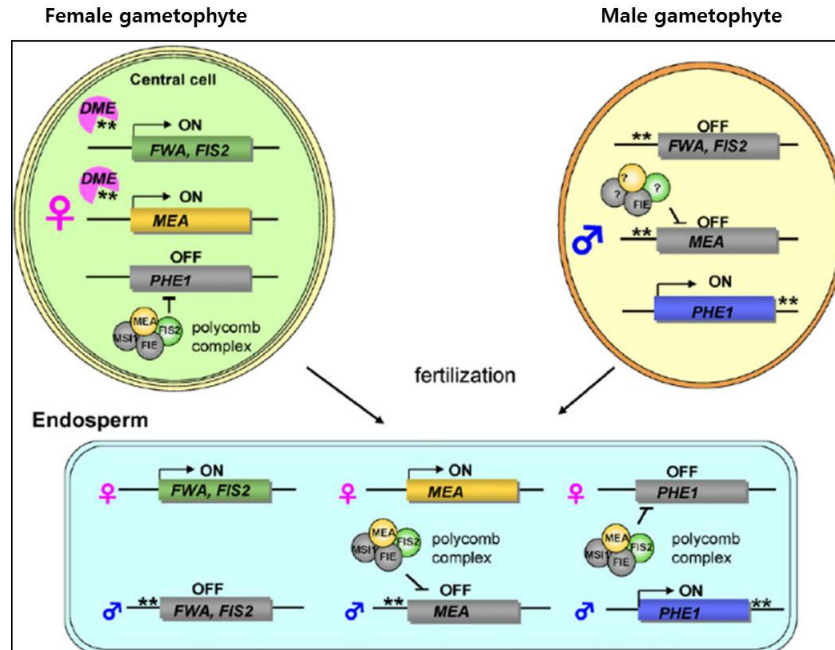


Fig. 2 Regulatory mechanism of genomic imprinting with FWA gene in *Arabidopsis thaliana*. Imprinting gene in the central cell of the female gametophyte encoding the FWA gene, occurs due to DNA demethylation in the repetitive sequence of the 5' region (Ikeda et al. 2011)

상보적인 딸 가닥의 형성을 위한 주형(template)으로 작용하는데, 5-mC는 딸 DNA 가닥에 포함되지 않기 때문에 DNA 메틸화 유지 기구가 없는 경우에는 DNA 복제에 따라 DNA 메틸화는 감소된다. 이를 수동적 DNA 탈메틸화(passive DNA demethylation)라고 부른다. 한편, DNA 복제에 의존하지 않는 메틸기를 적극적으로 제거하는 기구도 존재한다. 이를 능동적 DNA 탈메틸화(active DNA demethylation)라고 부른다. 애기장대에서 DME 유전자의 돌연변이체 분리와 능동적 DNA 탈메틸화 효소로서 DME의 연구는 식물의 생식과정에서 후성유전학적 재편집을 이해하는데 하나의 돌파구가 되었다고 보고되었다(Choi et al. 2002; Lee et al. 2015). DME 유전자는 비교적 큰 단백질을 코딩하지만, C-말단 측에 염기 제거복구에 관련된 DNA glycosylase와 비슷한 domain 구조를 가지고 있다(Mok et al. 2010). 애기장대에서 이와 상동성이 높은 DME 유전자, DML2 유전자, DML3 유전자, ROS1 유전자 등 4개를 분리하였다고 하였다(Zhu et al. 2009). 이들 중에서 DME 유전자는 중앙세포에서 중심적인 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다(Ikeda et al. 2012). 벼에서 *OsROS1a* 및 *NtROS2a* 유전자를 이용하여 RNAi에 의해 유전자 발현을 억제할 경우, 생식과정에서 변화가 초래된다고 알려졌다(Ono et al. 2012; Choi et al. 2016). DME 유전자와 유사한 단백질 도메인 구조를 가진 DNA glycosylase는 다양한 생물종에서 염기 제거복구능력이 있다고 알려져 있다. 염기 제거복구 메커니즘은 먼저 G/T 등 불일치 염기의 인식과 결실이 일어나고, 뉴클레오티드 골격의 절단, 복구 DNA의 합성과 DNA ligase에 의한 Cap 수복이 일어나, DNA

수복이 완료된다. 애기장대 ROS1와 DME 단백질은 구아닌과 5-메틸 시토신과 쌍을 이루어도 미스매치 쌍처럼 인식하여 5-메틸시토신 염기의 결손과 뉴클레오티드 골격이 절단하는 DNA 탈메틸화 효소로 알려져 있다(Ikeda et al. 2012; Lee et al. 2015). 또한 DNA ligase 및 DNA phosphatase 등 염기 제거복구 메커니즘을 위협하는 효소가 이 후 단계에서 DNA 탈메틸화에 필요하다는 것을 보여주고 있다(Martinez-Macias et al. 2012). 식물의 DNA 탈메틸화는 염기 제거복구 기구의 분자 메커니즘과 유사한 경로에 의해 이루어져 있다(Fig. 3). DNA 탈메틸화 과정은 이와 같은 염기 제거복구 기구에 의해 5-메틸시토신의 제거 이외에도 DNA 탈메틸화 배열의 인식과 결정, 크로마틴 구조와 크로마틴 기능 변화 및 히스톤 수식의 변화 등을 동반 할 것으로 알려져 있다(Ikeda et al. 2009, 2011; Qian et al. 2012). Kinoshida et al. (2004)는 imprinting 관련 FWA 유전자의 발현을 시각화 할 수 있는 FWA-GFP를 이용하여 계놈 imprinting에 이상이 있는 돌연변이체의 선발에 성공하였다. FWA 유전자는 5' 측 영역에 SINE retrotransposon 삽입에 따른 반복 배열이 존재하는데, 이들 배열이 imprinting의 cis 제어영역이라고 하였다(Kinoshida et al. 2004). 반복배열은 일반적으로 DNA 메틸화가 많이 일어나고, 유전자 발현은 억제되지만, 중앙세포에서 DME에 의해 DNA 탈메틸화되면 유전자 발현은 증가된다고 보고 하였다(Kinoshida et al. 2004). Ikeda et al. (2011)은 돌연변이체를 선발하기 위해 사용된 구조에는 FWA 유전자 계놈 imprinting 제어에 필요한 cis 영역이 포함되어 있으며, 이들 구조를 이용하여 HMG 도메인을 가진 SSRP1 (structure specific recognition

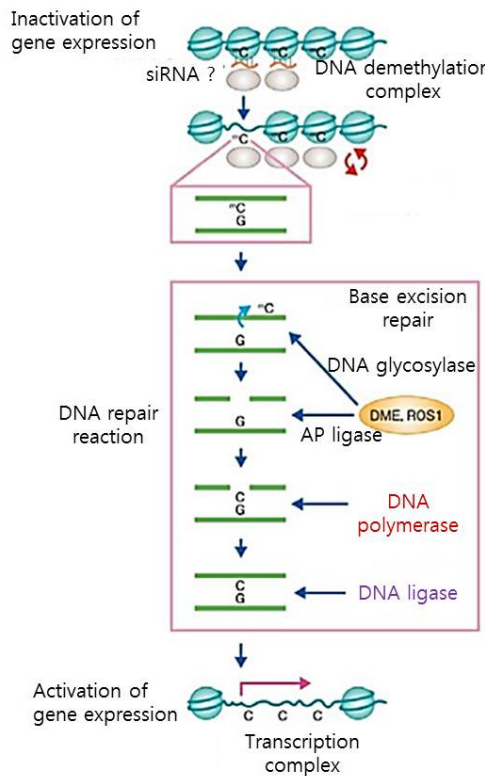


Fig. 3 Mechanism of DNA demethylation in plants (Ikeda et al. 2012; Martinez-Macias et al. 2012)

protein 1) 유전자를 분리하는데 성공하였다. SSRP1 유전자는 FACT (facilitate to chromatin transcription/transaction) 히스톤 Chaperone 복합체의 구성 단백질을 코딩하고 있으며 (Formosa, 2012), 효모에서 인간에 이르기까지 널리 분포하고 있다. SSRP1은 SPT16과 이종이합체를 형성하여 전사의 시작, 전사 신장, DNA 복제 및 DNA 수선 등 염색질의 기능 변환이 필요한 히스톤 chaperone인 것으로 알려져 있다 (Formosa 2012). *ssrpl* 유전자의 돌연변이체는 FWA GFP 유전자를 활성화할 수 없으며, 더불어 수정하지 않음에도 불구하고 Forward 신장과 중앙세포의 핵분열을 보였다. 이러한 표현형은 자발적인 배아발생 (autonomous endosperm development) 이라고 불리며, 다른 imprinting 관련 MEA 유전자의 돌연변이체에서도 같은 결과가 보여졌다. 다양한 imprinting 유전자들의 발현 양상을 조사한 결과 *ssrpl* 유전자의 돌연변이체는 많은 imprinting 유전자의 발현에 영향을 주는 것으로 나타났다. 또한, FWA 유전자의 DNA 메틸화 영역, 즉 계놈 imprinting 제어 영역의 DNA 탈메틸화에 영향을 미치는 것으로 나타났다 (Ikeda et al. 2012). DNA 탈메틸화 연구에서 가장 어려운 점은 언제 어디서 어떤 유전자가 어떻게 DNA에 탈메틸화 되는가에 대한 생화학적 해석이 불가능하다는 것이다. 동물 및 식물을 통해 genome wide DNA 탈메틸화가 일어나는 세포나 조직은 극히 제한되어 있다. 예를 들어, 포유동물에서 생식계열이나 수정 후 초기 배아 등 한

정된 세포에서 능동적인 DNA 탈메틸화가 일어난다. 이것은 식물에서도 마찬가지이며, 중앙세포는 배주조직 속에서 단 1 개의 세포에 불과하다. 따라서 생화학적인 분석을 통해 이 질문에 대답하기 위해서는 epigenome 해석의 분석 감도가 획기적으로 향상되거나, 효율적인 세포분리방법의 개선이 필요하다. 한편, 영양 조직에서 DNA 탈메틸화에 관련된 ROS1에 대해서도 언제 어디서 어떤 유전자의 DNA 탈메틸화하고 있는가 라는 질문에 대답하기 어렵다는 것이다. 이것은 언제 어디서 어떤 유전자가 라는 질문에 대답 즉, 수정 전에 중앙세포에서 FWA 유전자가 DNA 탈메틸화되는 것을 밝히는 것으로, FWA-GFP 유전자를 이용하여 유전학적 해석을 행하는 것이 효과적임을 의미하고 있다. 그래서 몇몇 연구자들은 유지형 DNA 메틸화 효소 MET1 돌연변이체 *met1*와 DNA 탈메틸화 효소 DME의 돌연변이체 *dme*와 이중체로 접합체를 육성하고, FWA-GFP 유전자를 이용하여 GUS 활성 정도를 분석하였다. 그 결과 중앙세포에서 *dme* 돌연변이체는 FWA-GFP 유전자가 활성화되지 않았으며, *met1* 돌연변이체는 활성이 완전하게 억제되는 것을 확인하였다. 따라서 *dme* 돌연변이에 의해 DNA 탈메틸화를 할 수 없게 된 세포에서도 미리 *met1* 돌연변이에 의해 DNA 메틸화의 수준을 저하시켜주면 유전자가 발현된다는 사실을 보여줬다 (Ikeda et al. 2012). 한편, Ikeda et al. (2011)은 FACT 히스톤 chaperone 구성 단백질을 코딩하는 SSRP1 유전자의 경우에는 *met1* 돌연변이체와 *ssrpl* 돌연변이체와 이중체로 접합체에서는 중앙세포의 *met1* 변이에 의한 *ssrpl* 돌연변이 억제 효과는 미미하였으며, *met1* 돌연변이체와 *dme* 돌연변이체와 이중체로 접합체의 결과와는 다른 양상을 보였다. 이 때문에 DNA 메틸화 이외에도 크로마틴 기능이 FWA 유전자의 전사를 저해하고 있다고 생각되며, SSRP1 유전자의 기능과 잘 일치한다고 하였다 (Formosa 2012). 또한, 중앙세포에서 핵이 분열을 시작하면 그에 따라 FWA-GFP 유전자의 발현은 점차 강해졌다. 이런 결과도 DNA 메틸화가 잃어버린 상태에서 분열을 반복하면 발현하지 않았던 크로마틴 정보도 활성을 갖는 크로마틴 정보로 치환해가는 것과 일치했다고 보고하였다 (Ikeda et al. 2011) (Fig. 4).

DEM 돌연변이체를 이용한 genome wide DNA 메틸화 해석

지금까지는 옥수수 배유를 재료로 DNA 메틸화 감수성 효소를 이용하여 다른 조직과 DNA 메틸화를 비교 분석한 결과 배유에서는 모친에서 유래한 계놈 DNA 메틸화는 저하하는 것이 알려졌다 (Lauria et al. 2004). 중앙세포에서 중추적인 기능을 가진 DNA 탈메틸화 효소인 DME에 돌연변이 애기장대 식물체의 배유를 분획하여 genome wide DNA 메틸화 분석을 수행하였다. Shotgun bisulphite sequencing 해석에서 야생형 애기장대의 배유 분획에서는 모든 카테고리의 DNA 메틸

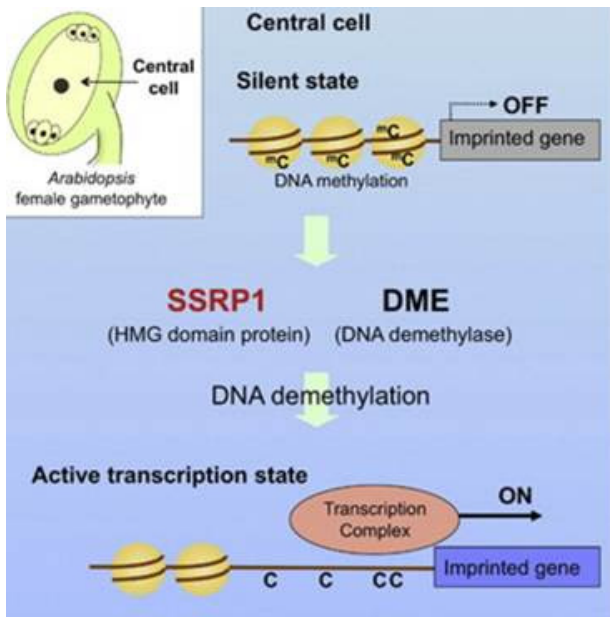


Fig. 4 Model of DNA demethylation and induction of gene expression by SSRP1 and DEMETER. For DNA demethylation, DNA excision repair mechanism are required, including DEMETER and SSRP1, which is a constituent protein of FACT histone chaperone complex (Ikeda et al. 2011; Ikeda et al. 2012)

화 수준이 배 분획보다 낮은 것으로 나타났다(Hsieh et al. 2009). 주목할 점은 배 분획의 CpHpH 배열의 메틸화 수준은 지상부의 영양 조직보다 높았다. 그들 중 많은 transposon 배열을 가진 중앙세포와 배아의 DNA 탈메틸화의 결과는 transposon이 전사되어 24 염기쌍의 저분자 RNA가 축적하고, 그것이 난세포 또는 배로 이행하여 transposon의 발현제어를 높인다는 가설을 세워 발표하였다(Feng et al. 2010; Hsieh et al. 2009). DME에 대한 계놈 영역을 자세히 분석한 결과 DME는 AT가 많은 500 bp 이하의 작은 transposon이 존재하며, 이중 크로마틴 영역에는 없으며, 뉴클레오소움의 작은 유크로마틴 영역에 많이 존재하고 있다고 밝혀졌다(Ibarra et al. 2012). DNA 탈메틸화 효소 돌연변이체의 영양조직에서 기능하는 ROS1 유전자, DML2 유전자, DML3 유전자의 삼중 돌연변이체를 육성한 후, 이들 식물체를 이용하여 genome wide DNA 메틸화 분석을 수행하였다(Hsieh et al. 2009; Ibarra et al. 2012; Penterman et al. 2007). 그 결과 ROS1 유전자의 돌연변이체 분석에서 DNA 탈메틸화 효소는 영양조직에 과도하게 발현하여 유해한 5-메틸시토신을 제거하고, 유전자 발현을 일정하게 유지하는 기능이 있었다고 하였다(Zhu et al. 2009). 따라서 이들 결과로부터 식물은 DNA 메틸화의 정보를 다이나믹하게 제어하고 있다는 것을 알 수 있다.

웅성 배우체의 후성유전학적 제어

식물의 후성유전학적 변이는 후대에 안정적으로 전달되는 경우가 많다고 보고되었다(Kakutani 2002). DNA 메틸화 정

보가 변화된 후성유전학적 돌연변이체는 생식과정에서 재설계 된다고 가정하면, 잃어버린 DNA 메틸화 정보는 원상태로 되돌아가기 위해 후대에 전달되지 않을 것으로 예상된다. 따라서 식물의 생식과정에서 DNA 메틸화 정보의 재설계는 포유동물과 차이를 보일 것으로 예상된다. 식물에서 수정에 참여한 정핵을 형성하는 생식계열이나 난세포의 생식계열은 미량조직 또는 세포이기 때문에 이에 대한 분석이 어려워 명확한 재설계에 대한 정보가 부족하다. 이전의 연구에서는 담배 화분을 5-메틸시토신 항체를 이용하여 DNA 메틸화 과정을 살펴보았는데(Oakeley et al. 1997), 정핵 전구세포인 웅원세포에서 DNA 메틸화가 현저하게 저하된 상을 얻을 수 있으며, 재설계 가능성을 시사하고 있었지만, 항체를 사용하였기 때문에 정확한 정량에 대한 신뢰성을 얻지 못했다. 애기장대에서 genome wide DNA 저메틸화 유도 및 크로마틴 리모델링 단백질 DDM1 (decreased in DNA methylation)의 RNAi 돌연변이체를 이용하여 한 번 잃어버린 DNA 메틸화 정보를 복귀하는 영역과 그렇지 않은 영역이 존재하는 한다고 보고하였다(Teixeira et al. 2009). 야생형과 DNA 메틸화가 저하된 ddm1 돌연변이체와 교배하면 ddm1 변이에서 유래한 계놈 영역에 다시 DNA 메틸화가 나타나게 되었다. 또한 이것은 RdDM 경로의 돌연변이체에서는 관찰되지 않기 때문에 저분자 RNA를 통한 기구임을 보여 주었다고 보고하였다(Teixeira et al. 2009). 언제 어디서라는 질문의 답은 아직 해결하지 못했지만, 저분자 RNA를 통한 DNA 메틸화의 보상 작용이 있는 것으로 밝혀졌다. 또한 웅성 배우체(화분)에서 영양세포핵과 정핵세포핵은 원래 핵의 크기가 다르기 때문에 농축도의 차이가 있을 수 있다. 애기장대는 영양세포핵에서 DDM1는 축적하지 않는 것, 중심체에 특이적인 히스톤 H3 변종은 존재하지 않는 것, 화분과 정세포핵에 21 염기쌍의 저분자 RNA가 축적하는 것 등이 계속해서 보고 되었다(Slotkin et al. 2009; Schoft et al. 2009). 이런 결과로부터 영양세포는 genome wide DNA의 저메틸화가 일어나고 동시에 21 염기쌍의 저분자 RNA에 의해 정세포에서 transposon의 발현이 억제된다는 사실을 보고하였다(Slotkin et al. 2009). Calarco et al. (2012)은 화분의 영양세포핵과 정세포핵, 또는 양자의 전구 세포인 소포자 세포핵을 분리하여 회수하고 genome wide DNA 메틸화 분석 및 저분자 RNA를 해석하였다. DNA 메틸화 해석에서는 Shotgun bisulphite sequencing에 의해 데이터화하여 DNA 메틸화의 정도를 통계적으로 유의한 차이가 있는 영역(DMR: differentially methylated region)을 결정하였다고 보고하였다(Calarco et al. 2012). 따라서, CpG 배열에서는 실험에 사용한 세포의 계놈내에서 DMR은 명확하게 구별할 수 있었으나, 포유동물의 결과와는 상이하게 나타났다고 하였다. 그러나 CpHpG 배열에서는 DMR이 관찰되지 않았으며, CpHpH 배열에서는 소포자의 세포 단계에서 이미 DNA 메틸화의 정보가 유실되어 있는 것을 보고하였다(Calarco et al. 2012).

이것은 *de novo*형 DNA 메틸화 효소 DRM2은 작은 포자 세포에서 축적되지 않는다고 할 수 있다. 한편, 영양세포는 다른 세포에 비해 CpHpH 배열의 메틸화가 높아져, 이 DRM2 패턴과 일치하고 있었기 때문에 새로운 DNA 메틸화가 일어나는 것으로 예상된다. 즉, 웅성 배우체(화분)는 세포의 유형별 또한 DNA 메틸화의 카테고리마다 다른 제어가 일어나고 있는 것을 알 수 있다.

웅성 배우체의 imprinting 유전자 제어

웅성 배우체의 형성 과정에서 imprinting 유전자는 어떻게 제어될까에 대한 의문을 가진다. 영양세포의 CpG 서열은 DNA 탈메틸화 되는 정도는 한정되지만, 정세포와는 명확한 차이가 있다. 또한, 이러한 많은 DNA 탈메틸화 효소의 표적 배열과 오버랩하고 있는 것으로 밝혀졌다(Calarco et al. 2012). 지금까지 DNA 탈메틸화 효소는 화분에서 어떤 기능을 하는지에 대해 명확하게 보고되지 않았지만, *dme* 돌연변이체에서 화분 발아율이 저하된다고 알려져 있다(Schoft et al. 2011). 이들 표현형과의 인과관계는 밝혀지지 않았지만, 영양세포와 정세포에서 DNA 메틸화를 비교하면 imprinting 관련 FWA 유전자의 cis 제어 영역 또는 같은 imprinting 관련 MEA 유전자의 5' 영역과 3' 영역의 CpG 배열의 메틸화가 영양세포에서 감소하고 있는 것으로 보고하였다(Schoft et al. 2011). 모친 유래 대립유전자 특이적으로 발현하는 FWA 유전자와 MEA 유전자 활성화는 자성 배우체의 중앙세포에 발현하는 DNA 탈메틸화 효소를 코딩하는 DME 유전자에 의존하고 있다. 저분자 RNA의 축적을 분석한 자료에 따르면 정세포에서 모친 유래 대립유전자 특이적으로 발현하는 imprinting 관련 DMR 유전자 이외에도 부친 유래 대립유전자 특이적으로 발현하는 imprinting 관련 DMR 유전자와 일치하며, 24 염기의 저분자 RNA를 축적하고 있다고 알려졌다(Calarco et al. 2012). 또한, 정세포에서 CpG 배열 또는 CpHpH 배열에 대한 DMR과 일치하는 저분자 RNA는 종자와 비교해 보면 21 염기의 저분자 RNA가 더 많이 발견되고 있다. 이런 21 염기 또는 24 염기의 저분자 RNA는 영양세포핵에서 발현하여, 정세포핵으로 이행하여 각각 transposon 및 imprinting 유전자를 제어하는 것으로 생각된다. 즉, 자성 배우체와 마찬가지로 유전정보를 전달하는 정세포에서 epigenome 정보를 더 견고하게 보강하고 있다고 생각된다. 포유동물에서 imprinting 유전자 재설계는 생식세포에서 일어난다. 생식세포에서는 이전 세대의 DNA 메틸화의 정보를 일단 삭제하고, 자웅생식세포에 따라 *de novo*형 메틸화 효소에 의해 DNA 메틸화가 기록됨으로써 재설계가 완료된다. 이미 쓰여진 imprinting 유전자의 DNA 메틸화 정보는 수정란의 genome wide DNA 탈메틸화에서 보호되어, 체세포로 계승됨으로써 편친성 발현이 유지된다고 하였다(Feng et al. 2010). 한편, 애기장대의 모친 유래 대립유전자에

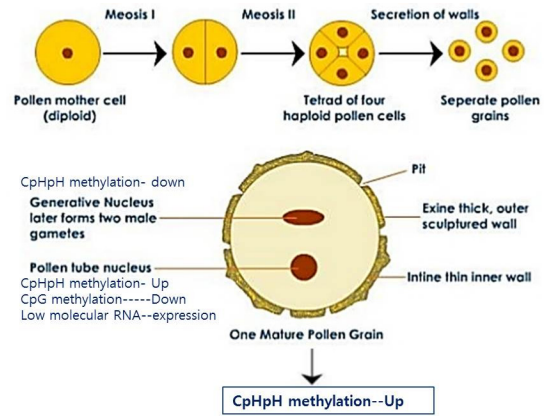


Fig. 5 Process of male gametophyte formation and CpHpH methylation

특이적인 FWA 유전자와 MEA 유전자에 대하여 부친 유래 대립유전자의 불활성화는 *de novo* 메틸화 효소를 코딩하는 DRM1 유전자 및 DRM2 유전자에 의존하지 않는 것으로 나타난다고 하였다(Kinoshida et al. 2004; Cao et al. 2002). 동물 및 식물의 genome imprinting에는 DNA 메틸화가 후성유전학 정보로서 공통으로 이용되고 있지만, 그 제어기구는 다른 것으로 생각되어진다. 애기장대의 imprinting 유전자의 DNA 메틸화 제어는 앞서 언급한 바와 같이, 불활성화되는 유전자를 모친 측의 중앙세포에서 DNA 탈메틸화에 의해 일어난다. FWA 유전자는 웅성 배우체에서 CpG 배열의 메틸화 유지가 유전자 발현 억제에 중요하다는 것을 보여주기 위해 정세포의 CpHpH 배열의 genome wide DNA 메틸화의 손실에 영향을 주지 않는다고 하였다(Chen et al. 2010). 한편, 최근의 게놈 분석을 통해 확인된 imprinting 유전자인 SDC (Suppressor of *drm1*, *drm2*, *cmt3*) 유전자 프로모터 서열에 존재하는 반복 서열의 시토신이 RdDM 경로에 의존하여 DNA 메틸화되고 있는 것으로 알려져 있다(Calarco et al. 2012). 아마도 이 배열이 SDC 유전자의 genome imprinting의 cis 제어 영역이라고 생각된다. 놀랍게도, SDC 유전자의 cis 제어 영역의 DNA 메틸화는 정세포의 CpHpH 배열의 genome wide DNA 메틸화 손실로부터 보호하고 있다고 생각한다. 포유동물에서 genome wide DNA 탈메틸화에서 필요한 메틸화 정보를 보호하는 기구가 알려져 있으며, 이와 관련된 기구가 식물에서도 발견될 가능성이 있다.

수정 후 후성유전학적 제어

수정 후 배 발생 단계에 따라 다양한 유전자의 DNA 메틸화에 대해 분석한 데이터에서 배 발생 단계별로 CpHpH 배열의 메틸화 level이 상승하는 것이 관찰되었다고 하였다(Jullien et al. 2012)(Fig. 5). 생식과정에서 후성유전학적 제어가 수정 후 유전자 발현에 크게 영향을 준다는 실험으로 초파리 잡종치사 현상(hybrid dysgenesis)을 들 수 있다. 또한, 이 현상은

종종 식물의 생식과정에서 저분자 RNA 제어와 비교하여 논의되고 있다(Bourchis and Voinnet, 2010). 애기장대의 배발생 과정에서 CpHpH 배열의 메틸화는 RdDM을 통해 저분자 RNA에 의해 제어된다고 하였다(Jullien et al. 2012). 또한, 배유 발생 원인으로 배수체간 교잡에도 저분자 RNA가 관여하고 있으며, 종자 크기 제어에도 관여하는 것으로 알려져 있다(Chen et al. 2010). 종자의 등숙과정에서 모친 유래 저분자 RNA가 많이 축적하고 있는 것(Mosher et al. 2009)에 대해 매우 흥미를 갖게 한다.

결론

차세대 시퀀서를 이용한 DNA 메틸화 분석 등을 통해 식물의 웅성배우체의 영양세포와 정세포에서 3가지 범주의 DNA 메틸화 제어가 밝혀졌다. 정세포에서 CpHpH 배열의 메틸화 손실과 수정 후 재설계 기능, 생식에 부수적인 기능을 가진 영양세포에서 CpG 배열의 DNA 탈메틸화 기구, 그리고 정세포와 저분자 RNA의 상호작용 등에 대해서도 계놈 안정성, 이러한 과정의 생물학적 의의에 대해 더 많은 연구가 이루어질 것으로 예상된다. 본 리뷰에서는 식물의 생식 과정에서 후성유전학적 제어기구는 애기장대 같은 균일한 계놈 정보 및 후성유전학 정보를 가진 모델 생물을 중심으로 연구가 진행된 결과를 토대로 설명하였다. 한편, 향후 우리 인간을 포함한 유전 정보가 균일하지 않은 생물을 대상으로 집단 및 개체의 후성유전학 정보에 다양성을 내포하면서 후성유전학 정보는 어떻게 견고성을 유지하고 있는지, 다양성이 없어지면 유성생식 과정에 어떤 파탄을 초래되는지, 그들이 오랜 세월 동안 진화과정에서 어떻게 영향을 주는지, 연구해 나아가야 할 것으로 생각된다. 특히 식물 종간 또는 배수체간에서 잡종형성이 비교적 용이하고 잡종강세기구 등 그 과정에서 후성유전학적 제어기구의 해명이 급후 과제라고 생각된다.

사사

본 성과물은 농림수산식품기술기획평가원 Golden Seed Project 원예종자사업단(213007-05-1-SBD30)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

Bjorn TA, Anne CFS (2014) Epigenetic Control of the Genome—Lessons from Genomic Imprinting. *Genes* 5:635-655
 Bourchis D, Voinnet O (2010) A small-RNA perspective on gametogenesis, fertilization, and early zygotic development.

Science 330:617-622
 Calarco JP, Borges F, Donoghue MT et al. (2012) Reprogramming of DNA methylation in pollen guides epigenetic inheritance via small RNA. *Cell* 151:194-205
 Cao X and Jacobsen SE (2002) Role of the A rhabdopsis DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Curr Biol* 12:1138-1144
 Chen HM, Chen LT, Patel K. et al. (2010) 22-Nucleotide RNAs trigger secondary siRNA biogenesis in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:15269-15274
 Choi JS, Lee IH, Cho YG, Jung YJ, Kang KK (2016) Overexpression of NtROS2a gene encoding cytosine DNA demethylation enhances drought tolerance in transgenic rice. *J Plant Biotechnol* 43:376-382
 Choi Y, Gehring M, Johnson L et al. (2002) DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in *Arabidopsis* *Cell* 110:33-42
 Feng S, Jacobsen SE, Reik W (2010) Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science* 330:622-627
 Formosa T (2012) The role of FACT in making and breaking nucleosomes. *Biochim Biophys Acta* 1819:247-255
 Gehring M, Huh JH, Hsieh TF et al. (2006) DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. *Cell* 124:495-506
 Grossniklaus U, Vielle-Calzada JP, Hoepfner MA et al. (1998) Maternal control of embryogenesis by MEDEA, a polycomb group gene in *Arabidopsis*. *Science* 280:446-450
 Haig D, Westoby M (1991) Genomic imprinting in endosperm: its effect on seed development in crosses between species, and between different ploidies of the same species, and its implications for the evolution of apomixis. *Phil Trans R Soc Lond B* 333:1-14
 He YF, Li BZ, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, Ding J, Jia Y, Chen Z, Li L, Sun Y, Li XDai Q, Song CX, Zhang K, He C, Xu GL (2011) Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* 333:1303-1307
 Hsieh TF, Ibarra CA, Silva P et al (2009) Genome-wide demethylation of *Arabidopsis* endosperm. *Science* 324:1451-1454
 Ibarra CA, Feng X, Schoft VK et al. (2012) Active DNA demethylation in plant companion cells reinforces transposon methylation in gametes. *Science* 337:1360-1364
 Ikeda Y (2012) Plant imprinted genes identified by genome-wide approaches and their regulatory mechanisms. *Plant Cell Physiol* 53:809-816
 Ikeda Y and Kinoshita T (2009) DNA demethylation: a lesson from the garden. *Chromosoma*, 118:37-41
 Ikeda Y, Kinoshita Y, Susaki, D et al. (2011) HMG domain containing SSRP1 is required for DNA demethylation and genomic imprinting in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 21:589-596
 Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, He C, Zhang Y (2011) Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 333:1300-1303
 Jullien PE, Susaki D, Yelagandula R et al. (2012) DNA methylation dynamics during sexual reproduction in *Arabidopsis thaliana*.

- Curr Biol 22:1825-1830
- Kakutani T (2002) Epi-alleles in plants: Inheritance of epigenetic information over generations. *Plant Cell Physiol* 43:106-111
- Kinoshita T, Ikeda Y, Ishikawa R (2008) Genomic imprinting: a balance between antagonistic roles of parental chromosomes. *Semin. Cell Dev Biol* 19:574-579
- Kinoshita T, Miura A, Choi Y et al. (2004) One-way control of FWA imprinting in Arabidopsis endosperm by DNA methylation. *Science* 303:521-523
- Kinoshita T, Yadegari R, Harada JJ et al. (1999) Imprinting of the MEDEA polycomb gene in the Arabidopsis endosperm. *Plant Cell* 11:1945-1952
- Lauria M, Rupe M, Guo M et al. (2004) Extensive maternal DNA hypomethylation in the endosperm of Zea mays. *Plant Cell* 16:510-522
- Lee IH, Choi JS, Marjohn N, Cho YG, Kang KK, Jung YJ (2015) Regulation of Abiotic Stress Response Through NtROS2-mediated Demethylation in Tobacco. *Plant Breed Biotech* 3(2):108-118
- Martinez-Macias MI, Qian W, Miki D et al. (2012) A DNA 3' phosphatase functions in active DNA demethylation in Arabidopsis. *Mol Cell* 45:357-370
- Mok YG, Uzawa R, Lee J et al. (2010) Domain structure of the DEMETER 5-methylcytosine DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:19225-19230
- Moore T, Haig D (1991) Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet* 7:45-49
- Mosher RA, Melnyk CW, Kelly KA et al. (2009) Uniparental expression of PolIV-dependent siRNAs in developing endosperm of Arabidopsis. *Nature* 460:283-286
- Nathan RR, Robert JK (2014) Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1839:1362-1372
- Oakeley EJ, Podesta A, Jost JP (1997) Developmental changes in DNA methylation of the two tobacco pollen nuclei during maturation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:11721-11725
- Ono A, Yamaguchi K, Fukada-Tanaka S et al. (2012) A null mutation of ROS1a for DNA demethylation in rice is not transmittable to progeny. *Plant J* 71:564-574
- Penterman J, Zilberman D, Huh JH et al. (2007) DNA demethylation in the Arabidopsis genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:6752-6757
- Qian W, Miki D, Zhang H et al. (2012) A histone acetyltransferase regulates active DNA demethylation in Arabidopsis. *Science* 336:1445-1448
- Saze H, Tsugane K, Kanno T et al (2012) DNA methylation in plants: relationship to small RNAs and histone modifications, and functions in transposon inactivation. *Plant Cell Physiol* 53:766-784
- Schoft VK, Chumak N, Choi Y et al. (2011) Function of the DEMETER DNA glycosylase in the Arabidopsis thaliana male gametophyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:8042-8047
- Schoft VK, Chumak N, Mosiolek M et al. (2009) Induction of RNA-directed DNA methylation upon decondensation of constitutive heterochromatin. *EMBO Rep* 10:1015-1021
- Scott BR, Brian DS (2014) Interpreting the language of histone and DNA modifications *Biochimica et Biophysica Acta* 1839(8):627-643
- Slotkin RK, Vaughn M, Borges F et al. (2009) Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. *Cell* 136:461-472
- Teixeira FK, Heredia F, Sarazin A et al. (2009) A role for RNAi in the selective correction of DNA methylation defects. *Science* 323:1600-1604
- Wohrmann HJ, Gagliardini V, Raissig MT et al. (2012) Identification of a DNA methylation-independent imprinting control region at the Arabidopsis MEDEA locus. *Genes Dev* 26:1837-1850
- Wu X, Johansen JV, Helin K (2013) Fbx110/Kdm2b recruits polycomb repressive complex 1 to CpG islands and regulates H2A ubiquitylation. *Mol Cell* 49:1134-1146
- Zhu JK (2009) Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annu Rev Genet* 43:143-166