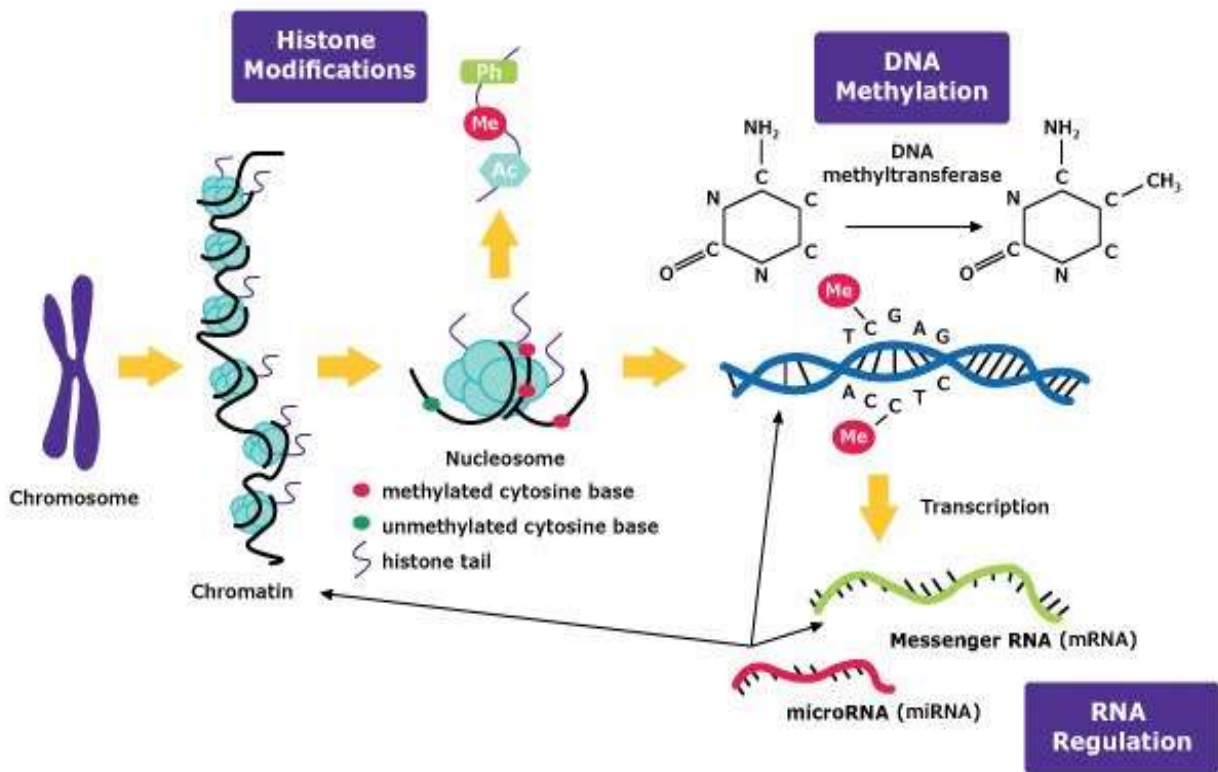


Epigenetics (후성유전학) 개요 및 기술

후성유전학(epigenetics)은 염색체상의 염기서열 자체의 변화가 아닌 주변 환경이 유전자 발현에 영향을 미치는 현상을 체계적으로 연구하는 것을 의미한다. 다시 말해, DNA 염기서열 변화가 아닌 후천적 영향에 의해 변화되는 유전자 발현을 통해 질병의 원인을 밝혀 치료법을 연구하는 학문을 말한다. 주요 기전으로는 DNA 메틸화, 히스톤 변형, RNA 조절 과정이 있다.[1]



<https://www.sigmaaldrich.com/KR/ko/applications/genomics/epigenetics>

미 국립보건원(NIH)은 3 억 달러의 연구비를 투입하여 후성유전학 프로젝트를 수행하였으며, 국내에서도 한국인 특정 질환에 대한 후성유전체를 연구하고 정보를 공개했다. 후성유전체 연구자들이 독립적으로 수행하고 있는 연구를 조직화한 국제인간후성유전체컨소시엄 (<https://ihec-epigenomes.org/>) 이 참조후성유전체데이터 (Reference epigenome) 생산을 목적으로 운영되고 있으며, 주요 참여국으로는 미국, 영국, 중국, 일본, 싱가포르, 호주, 캐나다, 등이 있다. 국내에서도 질병관리청 국립보건연구원이 참여하여 당뇨 관련 참조에피유전체 지도 11 종을 공개했다.

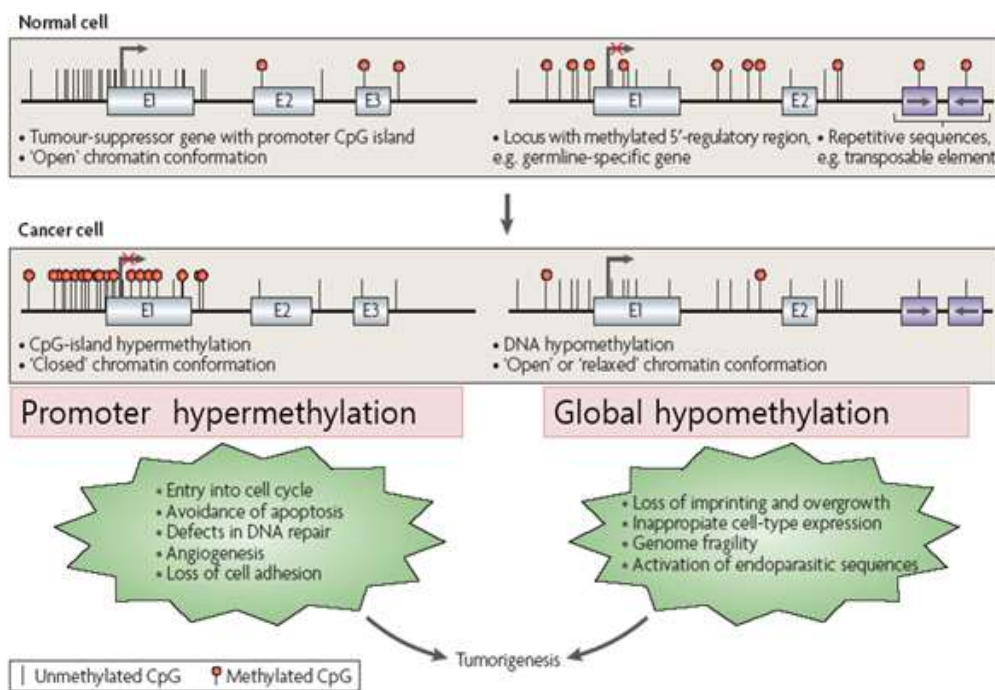
이처럼 질병에서 후성유전체 정보의 역할에 대한 관심이 증가되고 다양한 현상을 이해하려는 노력이 늘어나면서 후성유전학적 연구가 활발하게 진행되는 것을 확인할 수 있다. [1][2] 본 글에서는 후성유전학의 주요 기전들과 그에 대한 기술을 간략히 소개하고자 한다.

<DNA 메틸화(methylation)>

DNA 메틸화는 후성유전학적 변화 중 대표적인 것으로서 주로 사이토신(cytosine)의 5 번 탄소에 메틸기(-CH₃)가 붙어 5-methylcytosine 형태로 변형되는 것을 말한다. 이것은 사이토신과 구아닌(guanine)이 연속된 부위, 즉 5'-Cytosine-phosphate-Guanine-3' 구조의 염기 서열에서 주로 일어나기 때문에 이 부위를 CpG 부위라 부른다.[3]

인간의 유전체에는 CpG 부위가 특히 많이 모여 있는 부위를 CpG island 라고 부르며, 유전자 스위치에 해당되는 프로모터(promotor) 근처에 흔하게 존재한다. [4][6] 또한 대부분의 사이토신은 메틸화가 되어 있는 것에 비해 CpG island 의 사이토신은 메틸화가 되어있지 않은 특징이 있다.

암세포에서는 암 억제유전자의 프로모터 부위의 CpG 부위가 비정상적으로 과메틸화 (hypermethylation) 되면 유전자의 발현 (expression)을 억제시켜 암 발생에 영향을 줄 수 있으며, 반대로 암 활성화 유전자의 프로모터 부위의 CpG 부위에 메틸화가 없으면 저메틸화 (hypomethylation)가 일어나 유전자의 발현이 증가해 이 또한 암 발생을 촉진시킬 수 있다. [5] 즉, 아래 그림과 같이 프로모터의 과메틸화 (hypermethylation)는 종양억제 유전자의 스위치를 끄게 되므로 암이 발생하고, DNA 전체의 저메틸화 (hypomethylation)는 DNA 구조의 불안정성을 가중시켜 암을 일으키게 된다. [6] 이러한 메틸화의 이중적 작용이 암을 일으키는 핵심 메커니즘으로 설명되고 있다.

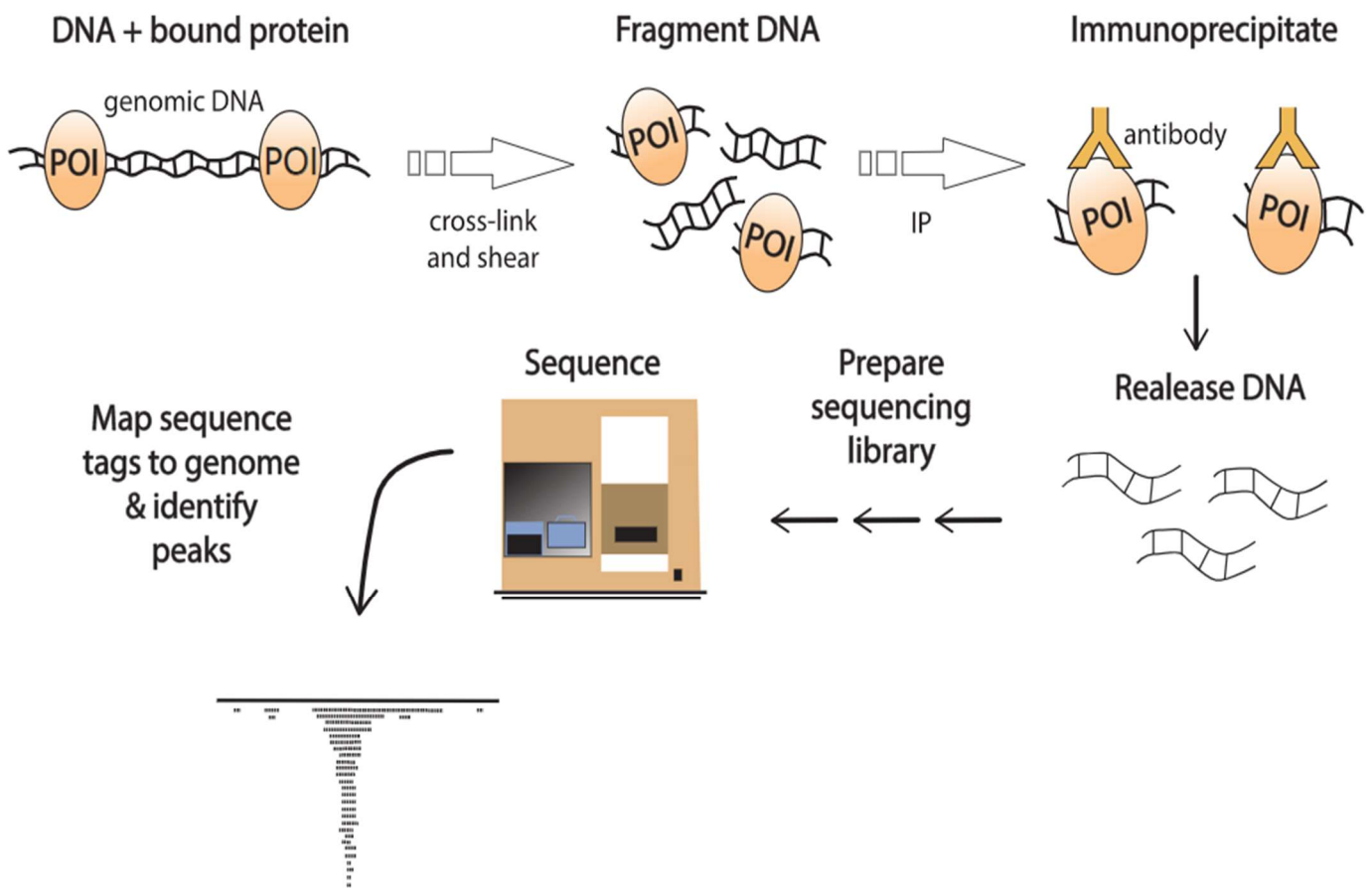


DNA 메틸화를 확인하는 방법으로는 메틸화가 되지 않은 사이토신 만을 제거하는 메틸화 특이적인 제한 효소 (methylation-sensitive restriction enzyme, MSRE)를 사용하는 방법이 있으며,[7][8] sodium bisulfite(NaHSO₃) 라는 화학물질을 이용하여 DNA 염기서열 중 사이토신을 우라실(uracil)로 변환(conversion) 시키는 방법이 있다. Bisulfite 는 특이적으로 메틸화 된 사이토신이 우라실로 변하지 않는 특성을 가지기 때문에 PCR 혹은 염기서열분석으로 타겟 부위의 염기서열이 변환된 정도와 메틸화 여부 및 정도를 알 수 있어 보다 많이 사용되고 있다.[9] NGS 를 이용한 DNA 메틸화 확인 방법 또한 bisulfite 법이 전처리 과정의 편의성과 분석의 용이성으로 가장 널리 사용되고 있다. bisulfite 처리된 모든 DNA 를 시퀀싱 하면 whole genome bisulfite sequencing(WGBS), bisulfite 처리된 CpG 영역만을 선별하여 시퀀싱 하면 reduced-representation bisulfite sequencing(RRBS)라고 한다.

<히스톤 변형과 Chromatin immunoprecipitation(ChIP)>

히스톤의 변형은 후성유전학적 조절의 초기 지표이며, 이 현상을 연구하는 방법으로는 Chromatin immunoprecipitation(ChIP)이 있다.[10] ChIP은 살아있는 세포에서 특정 단백질이 결합하는 DNA 부분을 해당 단백질의 항체를 이용하여 선택적으로 농축하는 실험 방법으로 단백질과 DNA의 상호작용을 분석하는데 활용된다.

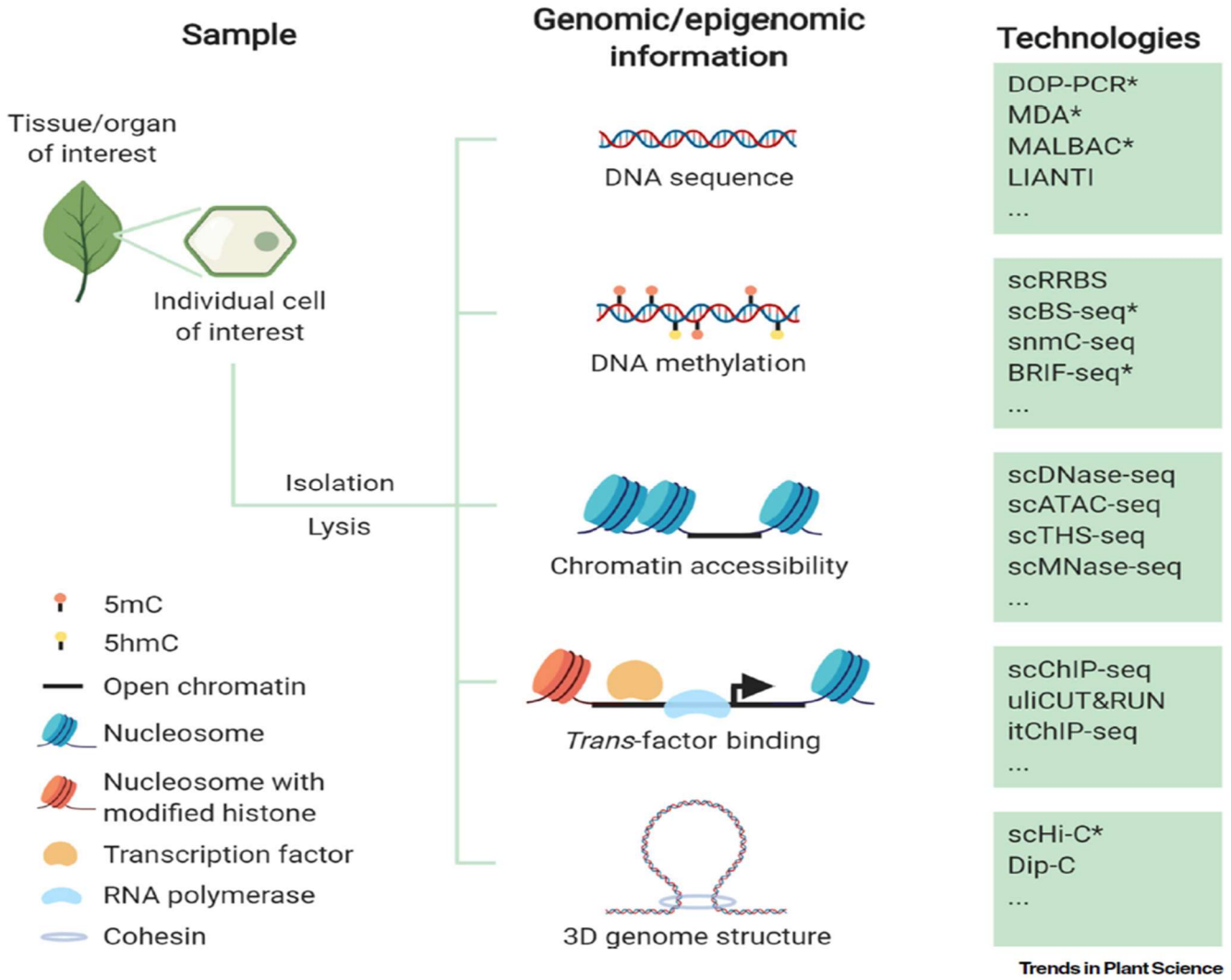
NGS의 발달로 초창기 array 방식(ChIP-chip)이 아닌 ChIP sequencing (ChIP-Seq)이 등장하면서 그 밖의 조건에 따른 지놈 상의 단백질의 위치까지 확인할 수 있게 되었다.[11] ChIP-Seq은 농축된 단백질에 결합된 DNA를 추출하여 NGS를 통해 분석하는 방식으로 시퀀싱 depth가 높게 나오는 부위가 해당 단백질의 결합 부위(binding site)라고 추측해 볼 수 있다. ChIP-Seq법으로 분석할 수 있는 단백질에는 전사 조절 인자(transcript factor), 활성화자(activator), 억제자(repressor), 구조 단백질 등이 있으며, 결합부위 분석을 통해 전체 유전체에서 그들의 새로운 타겟 위치를 찾거나 결합부위의 염기서열을 분석하여 해당 단백질이 인식하는 염기서열 모티프(motif)를 찾을 수도 있다.[12]



<https://www.chegg.com/learn/biology/introduction-to-biology/chromatin-immunoprecipitation-dna-sequencing>

이처럼 ChIP-Seq은 후성유전학 연구에 매우 필수적이며, 이바이오젠에서는 오랜 기간의 실험 노하우와 분석기법을 통해 연구자가 필요로 하는 ChIP-Seq(Chromatin Profiling) 데이터를 만족도 높게 제공해오고 있다.

<유전자 발현과 염색질 접근성(chromatin accessibility)>



Single-Cell Genomics and Epigenomics: Technologies and Applications in Plants

위 그림과 같이 유전자 발현과 관련된 후성유전학적 정보들은 굉장히 다양하지만 그 중에서도 최근 염색질 접근성에 따른 연구가 활발히 진행되고 있다. [13]

진핵 생물에서 DNA는 뉴클레오솜(nucleosome)이라는 히스톤 단백질 복합체에 의해 감싸져서 염색질을 이루고 있으며, 염색질의 구조는 전사, DNA 복구, DNA 재조합, DNA 복제 등의 유전적인 조절 과정과 관련된 DNA 결합 단백질(DNA binding protein)이 광범위하게 접근하는 것을 조절한다. 따라서 열린 염색질 영역(open chromatin region)은 조절자들이 접근하기 쉬운 영역을 나타내며, 게놈에서 조절인자(promoter, enhancer, silencer, insulator, replication origin, recombination hotspots 등)의 영역을 발견하는데 사용되어 왔다. 실제로, 프로모터에서의 뉴클레오솜 분포에 따른 염색질의 다양한 패턴(구조적 변화)은 유전자 발현의 변화, 종 수준의 유전자 발현 다양성, 유전자 발현에 영향을 주는 돌연변이의 영향 등과 상관관계가 있음이 많은 연구에서 증명되었다. [14][15]

NGS 발달로 열린 염색질 영역을 캡처하는 FAIRE-seq (Formaldehyde-Associated Isolation of Regulatory Elements Sequencing)과 DNA 분해효소에 의하여 절단된 단편들을 검출하여 열린 염색질 영역을 확인하는 DNase-seq이 활용되었다. 또한, Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing (ATAC-seq)은 유전체 여러 곳을 이동하는 유전자로 알려진 트랜스포존(transposon)을 이용하여 앞서 언급한 다른 방법과 같이 열린 염색질 영역(chromatin open region)을 찾고 이를 유전체 관련 연구에 활용하는데 사용되고 있다. [16]

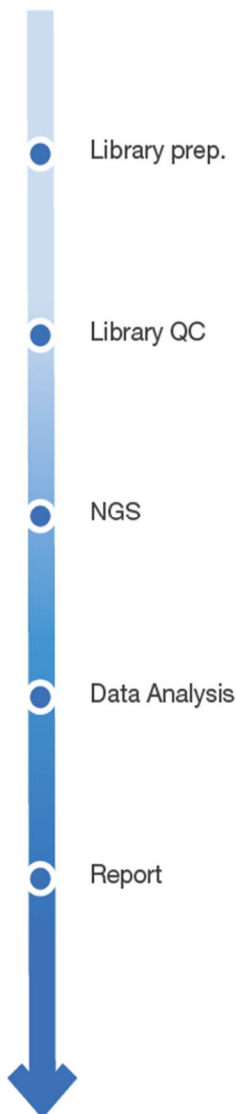
이바이오젠에서는 후생유전학 연구에 필수적 도구인 ChIP-Seq 서비스와 ATAC-Seq 데이터 분석을 지원하고 있다.

<ChIP-Seq Service>

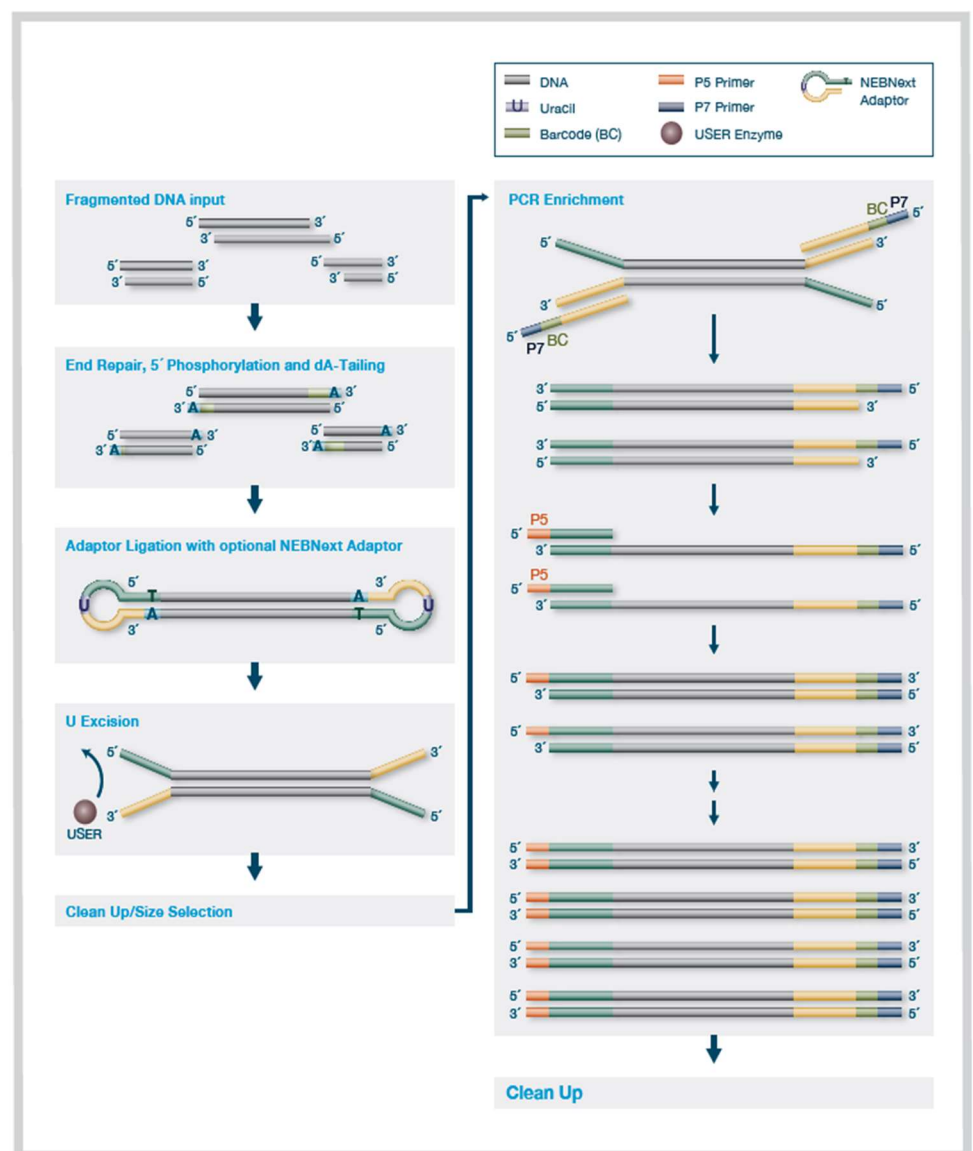
Sample Requirement	> 25ul IP-DNA++
Library Method	NEB Ultra DNA Library kit
NGS Run Format	NextSeq 550, SE75
Data Yield	> 20M reads/sample
Sample Type	IP-DNA, gDNA (input DNA 실험시)

++ Immuno Precipitation 은 고객이 직접해서 IP-DNA 를 제공해주셔야 합니다

ChIP-Seq Service Process

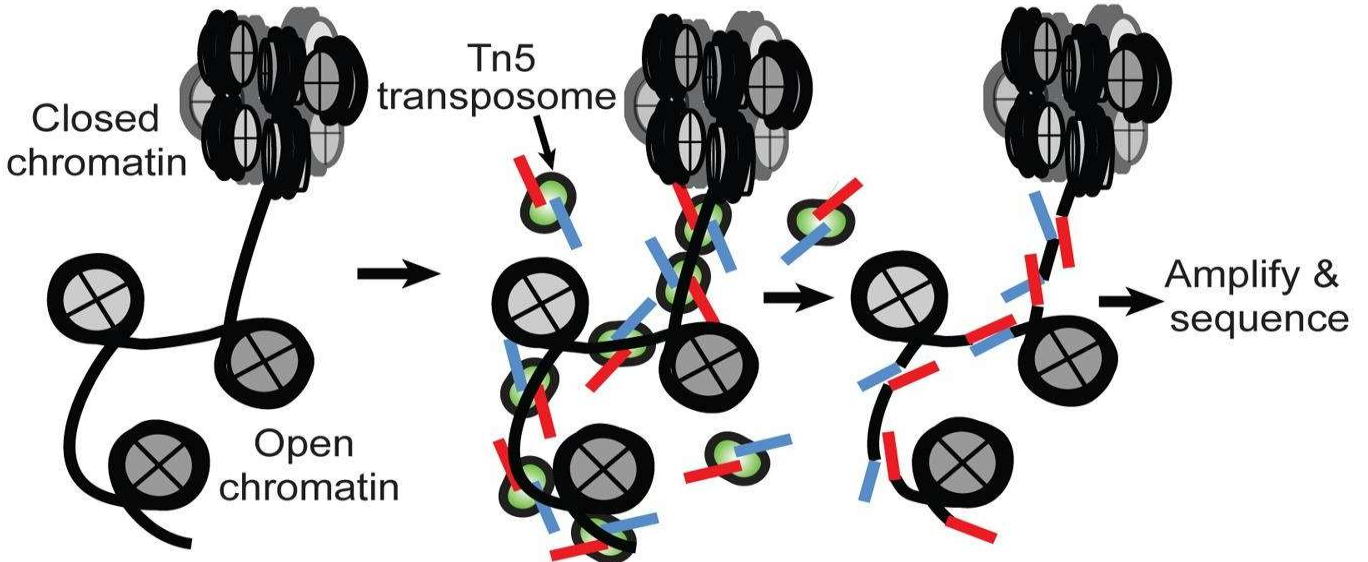


Library Construction Workflow



<ATAC-Seq DATA Exchange Service>

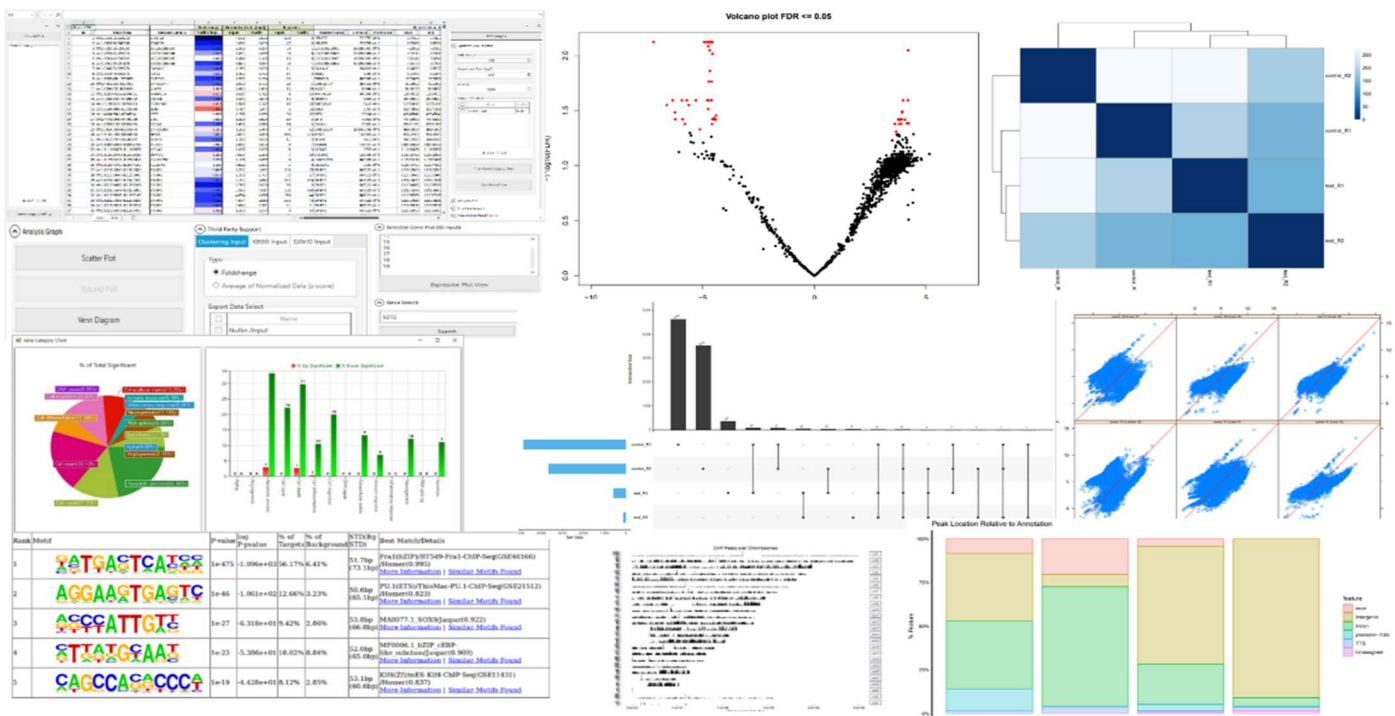
열린 염색질 영역에 다양한 조절인자가 결합하게 되면 유전자 발현 변화가 생기게 된다. ATAC-Seq 의 경우 종래 사용되었던 DNase-Seq 보다 열린 염색질 영역을 더 빠르고 민감하게 분석할 수 있는 장점을 가지고 있으며, 구체적으로 Tn5 transposase 를 사용하여 어댑터를 열린 염색질 영역에 붙여 시퀀싱 하는 방식을 말한다. 여기서 Tn5 transposase 는 tagmentation 이라고 불리는 과정을 통해 긴 DNA 가닥을 절단하는 역할을 말하며, tagmentation 은 시퀀싱 어댑터가 미리 로딩된 Tn5 transposase 로 DNA 를 '태깅(tagging)'과 동시에 '절편화(fragmentation)' 하는 것을 의미한다. 다시 말해 태그가 붙은 DNA 단편을 정제하고 라이브러리를 만들어 시퀀싱을 수행한다. 이를 통해 얻어지는 시퀀싱 리드(read)로 염색질의 접근 가능한 영역인 '개방 부위'를 유추할 수 있다.[16]



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/coreqj/tileshop/tileshop.fcgi?p=PMC3&id=1058913&s=42&r=2&c=4>

이바이오젠에서는 엑셀 기반 분석 프로그램인 ExPADA(Excel based Peak Annotation and Differential enrichment Analysis)를 통해 ATAC-Seq 데이터를 보다 쉽고 직관적으로 분석할 수 있는 서비스를 제공하고 있다.

<ExPADA DATA 예시>



<참고문헌>

1. (Korean Herb. Med. Inf.) 2018;6(2):279-288, Analysis of the epigenome research trends and study on utilization of Korean Medicine
2. PUBLIC HEALTH WEEKLY REPORT, KCDC, 제 7 권 제 19 호, Current trends in a method of epigenetic variation analysis
3. Jin, B., Y. Li, and K.D. Robertson, DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes Cancer*, 2011. 2(6)
4. Deaton, A.M. and A. Bird, CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev*, 2011. 25(10)
5. Kulis, M. and M. Esteller, DNA methylation and cancer. *Adv Genet*, 2010. 70: p. 27-56.
6. <http://medigatenews.com/news/print/3261360825>
7. Tarasova, G.V., T.N. Nayakshina, and S.K. Degtyarev, Substrate specificity of new methyl-directed DNA endonuclease Glal. *BMC Mol Biol*, 2008. 9: p. 7.
8. López Castel, A., et al., Identification of restriction endonucleases sensitive to 5-cytosine methylation at non-CpG sites, including expanded (CAG)_n/(CTG)_n repeats. *Epigenetics*, 2011. 6(4): p. 416-20
9. Hayatsu, H., Y. Wataya, and K. Kazushige, The addition of sodium bisulfite to uracil and to cytosine. *J Am Chem Soc*, 1970. 92(3): p. 724-6
10. <https://www.sigmaaldrich.com/KR/ko/technical-documents/technical-article/genomics/epigenetics/histone-modification-and-chromatin-remodeling>
11. https://www.ksmcb.or.kr/webzine/2015_08_03
12. <http://www.biotimes.co.kr/news/articleView.html?idxno=4622>
13. <https://2wordspm.wordpress.com/2021/07/08/epigenomic-profiling-%d%84-%c%84%ed%95%9c-atac-sequencing-%d%98-%b%90%eb%a6%ac/>
14. www.bioin.or.kr/board.do?num=307593&cmd=view&bid=tech&cPage=23&cate1=all&cate2=all2&s_key=&s_str=&sdate=&edate=l
15. <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1003778>
16. <https://patents.google.com/patent/WO2021141220A1/ko>