

## 한국 여성의 Lactadherin 유전자의 polymorphism 연구

김윤미, 엄행철  
호서대학교 생명과학과

## 요약

인간 Lactadherin은 비유 개시와 동시에 mammary gland의 epithelial cell에 의해 생성되는 46 Kd의 glycoprotein이다. 이 단백질은 성장기 어린이의 diarrheal disease의 원인이 되는 rotavirus에 specific하게 결합하여 그 증식을 억제시켜서 바이러스성 설사를 예방한다. 본 연구에서는 한국 여성의 lactadherin gene을 cloning 하여 그 sequence를 분석 비교하고 서양 여성과의 유전자 변이를 조사하였다. 보고된 서양 여성의 lactadherin 유전자와 비교하여 한 여성의 유전자에는 silent mutation을 포함하여 3 곳의 mutation이 있었고, 또 다른 여성의 유전자에서 새로운 3 곳의 mutation이 존재하여 이 유전자의 SNP가 여러 곳에 산재되어 있음이 관찰되었다.

## 서론

Rotavirus는 유아기의 어린이들에게 주로 감염되어 주로 소장 세포에서 번식하며 급성설사를 일으키는데 이로 인한 탈수증과 함께 급속히 성장하는 유아의 균형적인 영양공급을 방해함으로써 유아들의 발육과 성장, 그리고 심하면 생명에 커다란 영향을 미치게 된다. 세계적으로는 rotavirus에 의하여 5세 이하의 어린이가 연간 약 1억3천명이 감염되고 약 2천만 정도가 설사로 고통을 받으며 그 중에서 60만 정도의 사망자가 나오고 있다. 일반적으로 rotavirus성 설사는 위생상태와는 상관없이 선진국과 개도국에서 비슷한 정도가 발생하고 있다(American Academy of Pediatrics, 1998). 따라서 대부분의 취약한 유아들은 이 rotavirus에 한번 이상 감염된다고 볼 수 있는데 일반적인 경구용 탈수방지법으로는 사망률이 줄어들지 않는다.

한편 모유를 먹고 자란 아이는 설사 뿐만 아니라, 호흡기 질환, 중이염 등에 잘 감염되지 않는다는 사실은 오랫동안 알려져 있었다. 하지만 모유의 어떤 성분들이 이 같은 보호 작용을 하는지는 오랫동안 알려지지 않았고 다만 IgA가 중요한 역할을 할 것으로 추정하였다. 그러나 최근의 연구결과(Newburg et al., 1998)에 의하면 모유 성분 중에서 lactadherin이 rotavirus가 다른 분자와 결합하는 능력과 감염성을 약화시켜서 그들의 번식을 억제한다는 사실을 밝혀냈다. 따라서 유아 설사의 대부분의 원인이 rotavirus에 의한 것이었다는 사실을 상기하면(Black

and Armstrong, 1998), lactadherin을 충분히 섭취한다면 rotavirus에 의한 설사를 예방할 수 있다는 결론에 도달할 수 있다.

Lactadherin은 모유의 유단백질의 하나인 mucin과 결합되어 분비되는 당단백질의 하나로 분자량이 46 Kd이고, 지방구막 속에 연합되어 있다(Peterson et al., 1998a, Peterson et al. 1998b). 인간의 유선과 인간의 유방암 세포에서도 발견되며 한때는 BA46이라고 불려졌다(Couto et al., 1996; Taylor et al., 1997). 이 단백질은 3개의 영역으로 구성되어 있는데 하나는 EGF와 비슷한 영역이고 나머지는 응혈효소 V 및 VIII와 유사한 영역들이다. 인간, 소, 그리고 쥐의 lactadherin의 아미노산 배열들을 비교분석한 결과 아미노산 RGD(Arg-Gly-Asp)가 진화과정에서 중간에 잘 보존되어 있음을 보이고 있다. 또한 lactadherin의 378개의 아미노산 배열과 1.2kb의 cDNA sequence가 알려져 있다(Couto et al., 1996). Lactadherin과 mucin은 분만 직후(15일 까지)의 초유에서 그 함량이 그 이후(15-90일)에서 보다 현저히 높다. Lactadherin은 모유에 평균적으로 93  $\mu\text{g}/\text{ml}$  정도가 존재하고 pH 4이하의 위산에서 변성되지 않고 자연상태를 유지한다.

개인과 개인간의 DNA에 존재하는 한 염기 쌍(single base-pair variation)의 차이로 DNA sequence 다형성(polymorphism)중에서 가장 많이 존재하는 형태인 SNP(single nucleotide Polymorphism)는 mutation rate이 낮고(0.1%), 인체 게놈 상에서의 발생 빈도가 높아 high-throughput genotyping(고효율 유전자형 분석)에 이용되고 있다(Pui-yan Lwok and Xhijie Gu, 2000). 또한 physical mapping 및 genetic mapping을 위한 marker로서 사용될 수 있으며 최근에는 complex genetic traits, 즉 각 개인의 genotype에 따라서 특정 약물에 대한 반응성이 다르다는 것을 연구하기 위한 marker로서 각광 받고 있다.

본 연구에서는 lactadherin 유전자의 다양성을 조사하기 위하여 유두 근처 정상 조직에서 mRNA를 분리한 다음 cDNA를 합성하여 lactadherin 유전자를 cloning하였고 그 sequence를 결정하여 한국 여성의 lactadherin 유전자를 보고된 유전자 서열과 비교 분석하였다.

재료 및 방법

**Total RNA의 분리 및 Reverse Transcription**

유두 근처 정상조직으로부터 total RNA를 분리하고, 그 total RNA에서 mRNA만을 선별, 역전사를 시키기 위해 oligo dT를 primer로 사용하여 cDNA library를 형성하였다.

**Primer design 및 PCR**

Lactadherin의 full sequence에서 coding region은 61-1224 base이므로 GC 함량과 Tm을 고려하여 primer가 선택되었다. 따라서 증폭될 부분은 31-1518 base이다. PCR의 효율상 1.5kb의 부분은 929번 염기를 기준으로 전체 sequence를 두 조각으로 나누어 시행하기로 하였다. 따라서 design된 primer는 31번에서 966번 염기까지를 포함하는 앞부분(A set)과 909번부터 1518번 염기까지를 포함하는 뒷부분(B set)의 두 가지로 제작을 하였다. 이렇게 Design된 primer와 역전사를 시킨 lactadherin cDNA library를 사용하여 PCR을 수행, lactadherin gene을 증폭하였다.

**Subcloning of PCR product**

PCR을 통하여 얻은 A set와 B set의 DNA를 pGEM-T vector에 각각 삽입하였다. Insert가 들어간 colony는 일차적으로 blue/white color selection을 통하여 각각 선별하였고 이차적으로 rapid screen method를 통하여 삽입이 확인을 하였다. 최종적으로 선별된 A와 B set의 fragment를 연결하여 full length clone을 얻었다. 그 후 restriction enzyme analysis에 의하여 최종 확인되었다.

**Sequencing**

최종적으로 얻은 lactadherin clone을 ABI PRISM model 377 DNA Sequencer를 사용하여 full sequence의 염기서열을 결정하였다.

결과 및 논의

**Cloning by RT-PCR**

A와 B set의 PCR 수행 결과 그림 1a과 1b에서 보는 바와 같이 A set : 931base, B set : 609base에 해당하는 product를 얻었다. 이들 fragment의 정확한 확인을 위해서 restriction enzyme digestion reaction을 수행하였고(그림 생략) 그 결과 원하는 product를 얻었음을 확인하였다.



그림 1a. PCR product of lactadherin(A)  
lane 1: size marker,  
lane 2: control PCR product,  
lane 3: A set PCR product.

그림 1b. PCR product of lactadherin(B)  
lane 1: size marker,  
lane 2: control PCR product,  
lane 3: B set PCR product.

**Selection and Screening of Lactadherin gene**

A와 B set는 sticky end를 이용하여 ligation되었다. Full length lactadherin clone의 일차적 선별은 rapid screen을 통하여 0.1% agarose gel 상에서 insert의 존재여부가 결정되었고 이들 colony를 restriction enzyme digestion reaction을 통해 orientation이 확인되었다. 그림 2와 같이 full sequence의 DNA는 EcoRI cut에 의해 2997, 964, 541base의 3개의 band(lane 3,4)가 보이므로 A와 B set 모두 같은 방향으로 삽입이 되었음을 알 수 있었으며 또한 lactadherin의 full length clone이 연결되었음이 확인되었다.



그림 2. Full sequence of lactadherin was digest by EcoRI  
lane 1: size marker, lane 2: control(B+vector),  
lane 3: full(A+B), lane 4: full(A+B)

**Polymorphism of Korean lactadherin gene**

그림 3는 lactadherin gene의 polymorphism을 보이고 있는데 백인여성의 염기서열(c)과 한국여성(K1, K2)에서의 변이를 보여 주고 있다. K1에서는 67번에서 C가 A로 바뀌면서 Arg에서 Ser로 변화되었고 454번에서 C가 T로 바뀌었지만 silent mutation이 되고 1419번에서 G가 C로 변이되면서 Ser이 Thr로 바뀌었다. K2에서는 다른 형태의 변이가 관찰되었다. 286번에서 A가 C로 바뀌면서 Met에서 Leu로 변화되었고 329번에서 A가 G로 바뀌었지만 silent mutation이 되고 1330번에서 G가 A로 변이되면서 Gly가 Ser로 바뀌었다. 여기서 관찰되어진 각각 3 곳의 sequence의 변이는 한국 사람이 가

지는 lactadherin gene의 SNP의 일부라고 생각되어진다. DNA상에서 변이의 의미는 더 연구되어야 할 것으로 사료되며 단백질 수준에서 어떤 의미를 갖고 있는지 즉 여러가지 형태의 변이가 rotavirus의 증식 억제에 어떠한 영향을 주는 지에 대하여 더 면밀히 검토되어야 한다. 또한 여러가지 virus에 대한 반응성이 다르다는 것을 연구하기 위한 marker 또는 physical mapping 및 genetic mapping을 위한 marker로 사용될 수 있는지의 여부는 더 연구되어야 한다.

glycoproteins in human milk and in gastric aspirates of mother's milk-fed preterm infants. *Pediatr Res*, 44, 499-506.

Pui-yan Lwok and Xhijie Gu. (2000) Single nucleotide polymorphism librarise : why and how ade we buliding them?. *Molecular medicine today*, 5, 538-543.

Taylor MR et al. (1997) Lactadherin(formerly BA46), a membrane-associated glycoprotein expressed in human milk and breast carcinomas, promotes Arg-Gly-Asp(RGD)-dependent cell adhesion. *DNA Cell Biol*, 16, 861-9.

	61	67	280	286	327				
C	.....ATG	CCG	CGC.....	CTG	GGC	ATG.....	GCC	TCA	TCT
			<b>Arg</b>	<b>Met</b>			<b>Ser</b>		
K1			AGC						
			<b>Ser</b>						
K2				CTG			TCG		
				<b>Leu</b>			<b>Ser</b>		
	454	1327	1330		1418				
C	.....CTG	CTG.....	GAG	GGT	GTT.....	CTA	AGC		
			<b>Gly</b>				<b>Ser</b>		
K1	TTG						ACC		
	<b>Leu</b>						<b>Thr</b>		
K2			AGT						
			<b>Ser</b>						

그림 4. Sequence comparison of lactadherin among Caucasian and Korean  
 C : Caucasian, K1 : Korean 1, K2 : Korean 2  
 Bold letter : mutation

참고문헌

American Academy of Pediatrics (1998) Prevention of rotavirus disease: Guidelines for use of rotavirus vaccines (RE9840). *Pediatr*, 102, 1483-1491.

Black ME and Armstrong D. (1998) Human-milk lactadherin in protection against rotavirus. *Lancet*, 351, 1815-6.

Couto JR et al. (1996) Cloning and sequence analysis of human breast epithelial antigen BA46 reveals an RGD cell adhesion sequence presented on an epidermal growth factor-like domain. *DNA Cell Biol* 15, 281-6.

Newburg DS et al. (1998) Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. *Lancet*, 351, 1160-4.

Peterson JA, Patton S, and Hamosh M. (1998) Glycoproteins of the human milk fat globule in the protection of the breast-fed infant against infections. *Biol Neonate*, 74, 143-62.

Peterson JA et al. (1998) Milk fat globule