

한우 성장단계 특이발현 유전자의 발현양상 분석

장요순* · 윤두학* · 김태현* · 정일정* · 조진기**
농촌진흥청 축산기술연구소*, 경북대학교 동물공학과**

Expression Patterns of the Differentially Expressed Genes During Growth Stages of Hanwoo (Korean Cattle)

Y. S. Jang*, D. H. Yoon*, T. H. Kim*, I. C. Cheong* and J. K. Jo**

National Livestock Research Institute, R.D.A, Omockchun-dong Suwon 441-350, Korea*

Department of Animal Science, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea**

ABSTRACT

We have investigated the expression patterns of candidates for growth stage specifically expressed genes. The expression patterns of the EPV20, aldolase A, Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) and Adipocyte Differentiation Related Protein (ADRP) were examined by semiquantitative RT-PCR and northern blot analysis in skeletal muscle tissues of Hanwoo, especially in the *longissimus dorsi* at various growth stages. The EPV20 mRNA was expressed in *longissimus dorsi* tissue of Hanwoo, but there was no difference of expression levels during growth stages. Though the aldolase A gene was reported to be muscle-specific and regulated at developmental stages, the expression levels of aldolase A mRNA in the *longissimus dorsi* tissues showed little differences at various growth stages. The expression levels of TCTP which was reported as growth-related protein regulated at translation step were gradually increased during growth of Hanwoo. The expression levels of ADRP mRNA were rapidly increased at 24-month-old *longissimus dorsi* tissue of Hanwoo, and decreased at 30-month-old. Our data suggest that the ADRP gene show as growth-stage dependent expression and is related to fat deposition within muscular tissue.

(Key words : Hanwoo, Expression pattern, EPV 20, Aldolase A, TCTP, ADRP)

I. 서 론

한우는 우리 나라의 기후풍토에 대한 적응력은 강하지만, 성장률이 낮고 후구 발달이 빈약하여 고기 생산능력이 작은 단점이 있다. 생시 체중은 23~25 kg이며 성우는 암소가 350~400 kg, 수소가 450~550 kg 정도로서, 육질은 우수한 편이고 도체율은 55%이다 (조와 고, 1998). 소의 생리상 성장이란, 유전적 소질과 영양 및 기타 요인에 대한 반응으로 체적이 증

가함을 뜻한다. 특히 성장단계에 따른 각 부위의 발달은 머리, 목, 가슴, 허리 순서로 발달하고, 조직의 경우는 두뇌, 골격, 근육, 지방 순서로 발육이 왕성하게 이루어지며, 지방의 발달은 신장지방, 피하지방, 근간지방, 근내지방의 순서로 이루어진다. 소의 주요 조직은 서로 다른 성장의 양상을 나타내는데, 지방의 성장은 뼈와 근육에 비하여 빠른 편이다. 한우의 체조직 발육은 뼈, 내장 등 소화기관의 대부분은 0~6개월령부터 시작되어 12개월령까지의 육성

Corresponding author : D. H. Yoon, National Livestock Research Institute, R.D.A, Omockchun-dong Suwon 441-350, Korea Tel: 031-290-1593 E-mail : dhyoon@rda.go.kr

기에 끝나지만, 적육 등은 20개월령 전후에 발육이 종료되며, 육질을 좌우하는 근내지방은 생후 약 12개월령부터 축적되기 시작하여, 12개월령은 지방 축적량이 육안으로 구분될 정도이며, 24~25개월령까지 축적이 진행된다. 비거세우는 거세우에 비해 성장은 우수하지만, 근내지방 축적량이 적으며 연도가 떨어지기 때문에 거세우의 육질 등급보다 낮게 나타난다 (축산기술연구소, 1997).

한우를 개량하기 위한 많은 연구들이 이루어져 왔는데, 1990년대에 들어서면서 한우의 개량은 육질개선을 통한 고급육 생산에 중점을 두고 연구되고 있다. 최근 국내외적으로 고급육 생산을 위한 분자유전학적 연구는 육질관련 경제형질 유전좌위 규명, 육질관련 후보유전자 선정, 유전자의 다형성 및 발현조절 양상 조사 등의 방법으로 이루어지고 있으며, 특히 육질 관련 유전적 표지인자 발굴 목적으로 fatty acid-binding protein (Gerbens 등, 1998), Rendement Napole RN gene (Miller 등, 2000), leptin gene (Marti 등, 1998), 그리고 myostatin gene (Gonzalez-Cadavid 등, 1998) 등에 관한 연구가 수년간 이루어지고 있다. 또한 근육분화 및 발달 관련 유전자와 지방대사 및 지방 축적 관련 유전자 등이 후보유전자로 선정되어 연구가 진행되고 있다.

축산기술연구소 연구자료 (1998)에 의하면, 한우에 있어 DNA 표지인자의 개발은 주로 육질 관련 후보유전자의 다형성을 검정하고, 단일 후보유전자의 다형성과 경제형질과의 관련성의 분석위주로 연구가 이루어져 왔다.

동물 각 조직의 발달단계, 특히 근육조직의 성장단계별 발달변화에 따라 발현되는 유전자를 확인하고, 발현기작 등 특성해명에 관한 연구는 한우의 육질 관련 유전자 해명에 있어 도움이 될 것이다. 본 연구에서는 한우 성장단계 특이발현 유전자 탐색에 관한 연구 (장 등, 2002)에서 성장단계 특이발현 유전자로 선발된 유전자들의 성장단계에 따른 발현양상을 분석하였다. 성장단계 특이발현 유전자를 밝히고, 그 유전자를 분리하여 전체적인 구조 및 특성을 파악하고 발현조절 기작을 해명하고자 하였

으며, 근육내 지방축적 관련 유전자 또는 유전자 그룹을 밝히기 위한 기초자료를 얻고자 한우 등심조직에서 발현양상을 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시재료

축산기술연구소에서 자유급식 형태로 사료를 공급하여 사육한 거세된 한우 수소 2개월령, 6개월령, 12개월령, 18개월령, 24개월령 및 30개월령의 등심조직을 이용하였다. 개체간의 변이를 평준화하기 위하여 각 월령별 시료는 동일한 월령의 한우 5두로부터 취하였다.

2. Total RNA 분리

RT-PCR을 수행하기 위한 total RNA는 Chirgwin 등 (1979)의 방법으로, 한우 등심조직 1g에 denaturing solution [26mM sodium citrate (pH 4.0), 0.5% N-lauroyl sarcosine, 0.125M β -mercaptoethanol, 4M guanidine thiocyanate] 12 ml을 첨가하여 조직을 파쇄한 후, phenol/chloroform/isoamylalcohol (125:24:1) 동량으로 추출하였다. Northern blot 분석을 위한 total RNA는 Auffray와 Rougeon (1980)의 방법을 변형하여 분리하였다. 등심조직 1.2g에 3M LiCl/6M Urea/0.2% SDS 용액 25ml을 첨가하여 조직을 파쇄한 후, 얼음에 3시간동안 방치하였다. 30분간 원심분리(2,000xg, 4°C)하여 RNA pellet을 회수하고 10mM Tris (pH 7.4)/0.5% SDS/1mM EDTA 용액 5ml에 완전히 용해시킨 후, Phe/Chl (5:1)을 이용하여 정제하였다. Ammonium acetate 및 ethanol을 이용하여 침전시켰고, DEPC 처리된 멸균수에 녹여 사용하였다.

3. Semiquantitative RT-PCR

Total RNA를 DNase I 처리 (37°C, 30분)하여 여분의 genomic DNA를 제거한 후, Reverse Transcription System (Promega, USA)을 사용하여 한가닥 cDNA로 전환하였다. Bovine

GAPDH primer를 이용하여 한 가닥 cDNA의 합성여부 및 합성효율을 확인하였으며, cDNA를 normalize 하였다. 동일한 양의 cDNA와 target primer를 사용하여 RT-PCR을 수행한 후, agarose gel 전기영동으로 PCR 산물을 확인하였다. RT-PCR에 이용된 primer는 GAPDH (FW: 5'-ACCACAGTCCATCAC-3', RV: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'), EPV20 (FW: 5'-CGATGCGTTTCTTGACTG-3', RV: 5'-GTA-CATGGCATTGTGATGG-3') 및 Aldolase A (FW: 5'-ATTTCTCTGAAGCACCGGA-3', RV: 5'-ACTTCTGAGTGCAAGCATGG-3')이고, PCR은 TaKaRa사의 rTaq 중합효소를 이용하였다. GAPDH PCR 산물은 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초 조건으로 18회 반응시켜 얻었으며, EPV 20 94°C에서 30초, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분 조건으로 25회 그리고 Aldolase A는 94°C에서 30초, 51°C에서 1분, 72°C에서 1분 조건으로 25회 반응시켜 PCR 산물을 확보하였다. PCR 산물은 densitometer (Vilber Lourmat, France)를 이용하여 정량하고 발현량을 비교분석하였다.

4. Northern blot 분석

Total RNA 30µg에 RNA sample buffer (64.5% deionized formamide, 8.35% formaldehyde, 0.64x MOPS)를 첨가하여 65°C에서 15분간 변성시킨 후, formaldehyde gel-loading buffer (50% glycerol, 1mM EDTA (pH 8.0), 0.25% Xylene cyanol FF, 0.25% Bromophenol blue)를 첨가하였다. 변성된 1.2% formaldehyde gel에 loading한 후, formaldehyde gel-running buffer [5x formaldehyde gel-running buffer: 0.1 M MOPS (pH 7.0), 40mM sodium acetate, 5mM EDTA (pH 8.0)]로 전기영동 하였다. Capillary transfer 방법으로 nylon membrane에 RNA를 옮기고, high SDS hybridization buffer [5x SSC, 0.1% N-lauroylsarcosine, 7% SDS, 2% blocking reagents, 50% formamide, 50mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)]를 첨가하여

hybridization을 실시하였다. Probe DNA는 25 ng/ml 농도로 hybridization 반응에 사용하였으며, CDP-star (Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 signal을 확인하고 분석하였다.

5. 염기서열 결정 및 상동성 검색

DNA의 염기서열을 결정은 Bigdye terminator (PE Applied Biosystems, USA)를 사용하여 cycle sequencing reaction을 실시하였다. 반응이 끝난 PCR 산물은 ethanol로 정제한 후, ABI 377 자동염기서열 분석장치 (PE Applied Biosystems, USA)를 이용하여 염기서열을 결정하였으며, BLAST를 이용하여 상동성을 검색하였다.

III. 결과 및 고찰

한우 성장단계 특이발현 유전자를 분리하고 특성을 규명하기 위한 연구(장 등, 2002)에서 선정한 성장단계 특이발현 유전자의 발현양상을 성장단계에 따라 분석하고자 하였다. Table 1에 나타낸 바와 같이 6개월령, 12개월령 및 24개월령 cDNA probe에 대하여 특이적인 signal을 나타낸 clone을 대상으로 발현양상을 분석하였다. A12-66 및 A12-70 cDNA clone은 6개월령, A24-18은 12개월령, A12-62 cDNA clone은 24개월령 특이발현 후보유전자이다. A12-66 clone의 염기서열은 단백질의 크기가 20 kDa이고, 아미노산 서열이 EPV로 시작하는 것에 기인하여 EPV 20으로 명명되어진 유전자, Bos taurus clone TUS4 (GenBank Accession No. X85799)와 99%의 상동성을 나타내었다. A12-70 clone은 사람의 translationally controlled tumor protein (TCTP) mRNA (GenBank Accession No. NM003295)와 95%의 상동성을 나타내었으며, 12개월령 cDNA probe에 대하여 강한 signal을 나타낸 A24-18 clone은 염기서열 분석 결과, aldolase A (GenBank Accession No. AF233072)에 해당하였다. 24개월령 특이발현 유전자로 선정한 A12-62 clone은 adipocyte 분

Table 1. Summarise of cDNA clones selected from the subtractive cDNA libraries

Clone Name	Specificity of Growth Stage (month)	Length	Putative Gene Name (GenBank Accession No.)	Species	Identity
A12-66	6	480 bp	<i>Bos taurus</i> mRNA from clone TUS4, EPV20 (X85799)	<i>Bos taurus</i>	99%
A12-70	6	830 bp	Translationally-controlled Tumor protein (TCTP) (NM003295)	<i>Homo sapiens</i>	95%
A24-18	12	790 bp	Aldolase A (AF233072)	<i>Ovis aries</i>	94%
A12-62	24	650 bp	Adipophilin (ADRP) (AJ011680)	<i>Bos taurus</i>	99%

화 초기단계에서 발견되는 것으로 알려진 adipophilin [Adipocyte Differentiation Related Protein (ADRP), GenBank Accession No. AJ-011680]과 99%의 상동성을 나타내었다. 이와 같은 성장단계 특이발현 후유전자들의 발현양상을 한우 등심조직 월령별 시료를 이용하여 분석한 후, 한우 성장단계 특이발현 유전자를 밝히고, 나아가 특이발현 유전자의 전체적인 구조 및 발현기작, 또 근육내 지방과의 관련성을 해명하기 위한 기초자료로 활용하고자 하였다.

Table 1에 나타난 유전자들의 발현양상은 semiquantitative RT-PCR 및 northern blot 분석을 이용하여 분석하였으며, EPV 20 및 aldolase A 유전자의 발현양상은 등심조직에서의 발현량이 극히 적은 이유로 northern blot 분석방법으로는 signal 검출이 어려웠으므로 RT-PCR 분석법을 이용하여 비교·분석하였다 (Fig. 1). EPV 20 및 aldolase A 유전자의 발현양상은 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)의 PCR 산물을 이용하여 cDNA 합성여부 및 효율을 확인한 후, 동일한 량의 cDNA가 사용될 수 있도록 평준화 하였으며, EPV 20 및 aldolase A 유전자를 증폭시켜 PCR 산물을 정량하였다. Target 유전자의 증폭 및 증폭산물의 정량은 3반복을 실시하였으며, GAPDH의 PCR 산물을 대조구로 이용하여 정량하였고, 비교·분석하였다. Semiquantitative RT-PCR을 이용하여 EPV 20 유전자의 PCR 산물을 분석한 결과, 6개월령 cDNA probe에 대해서 강한 signal을

나타낸 것과는 달리, 성장단계별 등심조직에서 발현량 차이가 거의 없는 것으로, 근육조직에서 발현되지만 발달단계에 따른 특이적 발현은 없는 유전자로 판단하였다. EPV 20 유전자는 젖소의 milk의 skim milk fraction에서 처음 분리하여 동정된 (Larsen 등, 1997) 크기가 20-kDa인 glycoprotein으로서 정확한 기능은 밝혀지지 않았으며, 사람의 epididymis HE1 cDNA와 아미노산 수준에서 79%의 similarity를 나타내고, 소의 신장, 비장, 간 및 유선조직에서 발현되고, 사람의 epididymis에서 특이적으로 발현되는 (Kirchhoff 등, 1990) 반면에, 소의 testis에서는 발현되지 않는 것으로 보고되었다 (Larsen 등, 1997). Aldolase A의 발현양상 분석결과, 한우 6개월령 이후의 등심조직에서 성장단계에 따른 발현량에 있어 현저한 차이는 없었다. Aldolase는 glycolytic enzyme으로 3개의 isozyme을 가지며, aldolase A (muscle type), aldolase B (liver type) 및 aldolase C (brain type)가 알려졌고, 각각의 type은 조직특이성을 나타내며, 발달단계에 따라 조절되는 것으로 보고되었다 (Horecker 등, 1972). Minoru 등 (1985)은 aldolase A mRNA를 사람의 간 조직으로부터 분리·동정하였고, 동물의 거의 모든 조직에서 발현되지만, 근육 특이적인 promoter를 가짐에 따라 근육에서 발현량이 많은 것으로 보고하였다. 사람의 aldolase A 유전자 전체 크기는 7,530 bp로서 12개의 exon으로 이루어져 있으며 (Izzo 등, 1988), chromosome 16q22-q24 band에 위치하고 있다 (Kukita 등, 1987). Kishi 등

GAPDH

EPV20

Aldolase A

Fig. 1. RT-PCR analysis to examine relative EPV 20 and Aldolase A mRNA levels among various age Hanwoo *longissimus dorsi* tissues. The GAPDH gene was used as a positive control for cDNA normalize and quantitation. The expected sizes of the GAPDH, EPV 20 and aldolase A product were 452 bp, 645 bp, 769 bp, respectively.

(1987)은 적혈구의 aldolase deficiency는 128번 아미노산인 aspartic acid가 glycine으로 바뀌므로 인하여 생기는 것으로 hemolytic anemia와 관련이 있는 것으로 보고하였고, 이 128번 아미노산 (aspartic acid)은 진핵생물의 aldolase A, aldolase B 및 aldolase C에서 잘 보존되어 있는 아미노산 잔기로서, enzyme의 정확한 spatial 구조를 유지하거나 촉매작용 수행시 결정적인 역할을 하는 것으로 추정하였다. Kreuder 등 (1996)은 aldolase A (ALDOA) 유전자의 transition [206번 Glu (GAG) → Lys (AAG)]으로 인하여 myopathic symptom이 나타나는 것을 보고하였다. 본 연구에서 확인한 등심조직에서의 aldolase A 발현양상 분석결과와 Horecker 등 (1972)이 보고한 aldolase의 발달과정에서의 조절작용에 관한 연구결과로부터 근육 특이적인 promoter를 가진 aldolase A 유전자는 근육분화가 시작되기 이전의 단계에서 조절되며, 근육 내 지방축적 및 지방 함량과의 연관성 분석에 이용이 가능한 유전자로 판단하였다. 근육분화 및 근육수축에 있어 aldolase A의 역할 및 조절작용을 밝히기 위하여 aldolase A의 muscle specific promoter와 근육분화 관련 transcription factor에 관한 연구가 필요한 것으로 사료된다.

한우의 등심조직에서 성장단계에 따라 특이적인 발현양상을 나타낼 것으로 추정된 EPV 20 및 aldolase A 유전자의 발현양상 분석 결

과, 한우 등심조직에서 성장단계에 따른 뚜렷한 발현량 차이는 확인할 수 없었다. 이는 가능한 오류를 두 가지 측면에서 설명할 수 있는데, 첫 번째는 두 집단에서 발현량 차이를 나타내는 유전자를 분리하기 위한 differential screening 방법 중 하나인 subtraction 기법 자체의 문제로, 두 집단간에 동일한 mRNA의 subtraction이 완전히 이루어지지 못한 경우이다. 두 번째는 제작한 subtractive cDNA library로부터 특이적인 clone을 선정하기 위한 reverse northern blot 분석에 사용한 cDNA probe 준비 과정에서 생길 수 있는 오류로서, probe로 이용할 각 월령별 total RNA를 두 가닥의 cDNA 형태로 전환시키는 과정에서 mRNA 전체가 cDNA로 전환되지 않아서 생긴 오류로 설명이 가능하다. 그러므로 subtraction 기법을 이용한 differential screening에서는 제작된 subtractive cDNA library로부터 얻은 cDNA clone에 대한 확인작업이 반복적으로 수행되어야 할 것으로 판단된다.

TCTP 및 ADRP 유전자의 발현양상은 northern blot 분석을 이용하여 분석하였으며, subtractive cDNA library로부터 얻은 cDNA 단편을 probe로 사용하였다. TCTP 유전자의 발현양상을 성장단계별 한우 등심조직에서 분석한 결과 (Fig. 2), transcript의 크기는 약 1.04 kb이었고, 등심조직에서 월령이 증가할수록 발현량

Fig. 2. Northern blot analysis of translationally controlled tumor protein (TCTP) gene in various age of Hanwoo *longissimus dorsi* tissues using the A12-70 cDNA fragment obtained from subtractive cDNA library. The GAPDH level was measured as control. The rRNA indicates total RNA stained with ethidium bromide. For northern blot analysis, 30 μ g of total RNA isolated from 6-, 12-, 18-, 24-, and 30-month-old Hanwoo *longissimus dorsi* was loaded on each lane of a denatured agarose gel, respectively.

이 증가하는 양상을 나타내었지만, 발현량 차이는 미미하였다. 이 결과로부터 Thiele 등 (1998)이 보고한 바와 같이 TCTP 유전자는 성장과 관련된 기능을 갖지만 동물의 성장에 있어서 직접적으로 관여하지는 않을 것으로 판단하였다. TCTP는 histamin releasing factor (HRF) p23으로서, translation level에서 조절되는 성장 관련 단백질로 알려져 있으며 (Thiele 등, 1998), Sturzenbaum 등 (1998)은 Pb, Zn, Cd 및 다른 오염된 광물질에 의해 TCTP 발현이 up-regulation 되는 것으로 보고하였다. TCTP 유전자는 전체 크기가 3,819 bp로서, 6개의 exon과 5개의 intron으로 구성되어 있고, 포유 동물을 비롯하여 고등식물 및 *Saccharomyces cerevisiae*에 존재하는 것으로 알려져 있다 (Thiele 등, 1998).

지방세포 분화의 초기단계에서 발견되며, 지방합성 및 축적과 관련있는 것으로 보고된 (Brasaemle 등, 1997) ADRP 유전자의 발현양상

을 성장단계에 따른 등심조직에서 분석하였다. 지방 생합성 관련 유전자들의 발현양상과 육질을 좌우하는 근육내 지방 함량과의 관련성을 파악하기 위하여 2개월령부터 30개월령의 한우 등심조직을 사용하였다. ADRP는 지방세포의 전구체가 완전한 지방세포로 분화될 때 전사조절 작용에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있으며, 최근에는 ADRP가 지방산 결합 단백질임이 입증되기도 하였다(Gao 등, 2000). Brasaemle 등 (1997)은 ADRP가 여러종류의 세포에서 lipid droplet으로서 중성지방 저장에 관련된 역할을 할 것으로 추정하였으며, Ye와 Serrero (1998)는 ADRP가 adipose differentiation program marker로의 이용 가능성이 있음을 밝혔다. ADRP 유전자에 해당하는 A12-62 cDNA 단편을 probe로 사용하여 northern blot 분석결과 (Fig. 3), 소 ADRP 유전자의 transcript의 크기는 약 1.82 kb 이었고, GAPDH의 발현량과 비교분석한 결과, ADRP 유전자는 월령이 늘어날수록 발현량이 증가하여 24개월령에서 가장 많은 발현량을 나타내었고, 30개월령 조직에서

Fig. 3. Differential expression pattern of ADRP gene during growth stages. Total RNA was extracted from Hanwoo *longissimus dorsi* tissues, electrophoresed 1% denaturing agarose gel and hybridized with DIG-labeled A12-62 cDNA fragment from subtractive cDNA library. The same stripped blot was reprobred with a control bovine GAPDH cDNA. The rRNA indicates total RNA stained with ethidium bromide.

는 다소 감소하는 양상을 나타내었다. 이와 같은 등심조직에서의 발현양상 분석을 통하여 ADRP 유전자를 한우 성장단계 특이발현 유전자로 선정하였다. 또 근육내 지방이 생후 8~10개월부터 축적되기 시작하여 24~25개월령까지 축적이 진행된다는 보고 (축산기술연구소, 1997)에 미루어볼 때, ADRP 유전자가 근육내 지방증가와 관련이 있는 것으로 판단하였다. 이후의 연구에서는 한우의 다른 조직 및 성장단계의 간격을 좁힌 월령별 시료를 이용한 ADRP 유전자의 발현양상 분석이 이루어져야 하고, 더 나아가 ADRP 유전자의 전체구조를 분석하며 발현조절 기구를 해명해야 할 것으로 사료된다. 이러한 연구결과는 근육내 지방 함량 및 지방분포와 관련있는 유전자 또는 유전자 그룹을 밝히는데 기초자료가 될 것으로 사료된다.

IV. 요약

한우 성장단계 특이발현 유전자 탐색에 관한 연구(장 등, 2002)에서 선정된 후보유전자 중, EPV 20, TCTP 및 aldolase A를 비롯하여 24개월령 cDNA probe에 대하여 강한 signal을 나타낸 ADRP 유전자의 발현양상을 분석하기 위하여 성장단계별 한우 등심조직 시료를 사용하여 semiquantitative RT-PCR 및 northern blot 분석을 실시하였다. EPV 20 유전자는 한우 등심조직에서 성장단계에 따른 발현량 차이가 거의 없는 결과를 근거로, 근육조직에서 항상 발현되는 유전자로 판단하였다. 또한 발달단계에 따라 발현량 차이가 있는 것으로 보고된 aldolase A 유전자 역시 뚜렷한 발현량 차이는 없었으며, aldolase A의 muscle specific promoter와 근육분화 관련 transcription factor에 관한 연구를 통하여 근육분화 및 근육수축에 있어 aldolase A의 역할 및 조절작용을 밝힐 수 있을 것으로 사료된다. 성장관련 단백질로 알려져 있는 TCTP의 발현양상을 분석한 결과, 한우 등심조직에서 성장함에 따라 발현량이 약간 증가하는 양상을 나타내었다. 이와 같은 발현양상 분석결과로 TCTP 유전자는 성장과 관련된

기능이 있지만 동물의 성장에 있어 직접적으로 관여하지는 않을 것으로 판단된다. 지방세포 분화의 초기단계에서 발현량이 급증하고 lipid droplet 형성에 관여하며 지방축적과도 관련이 있는 것으로 보고된 ADRP 유전자의 transcript의 크기는 약 1.82 kb 이었고, 24개월령 한우 등심조직에서 발현량이 급격히 증가하였으며, 30개월령 조직에서는 감소하는 양상을 나타내었다. 이와 같은 결과로부터 ADRP 유전자를 한우 성장단계 특이발현 유전자로 선정하였으며, ADRP 유전자의 발현양상은 근육내 지방축적과 관련이 있을 것으로 추정하였다. 이후에는 발현조절 기작의 해명 및 근육내 지방축적과의 관련성 분석을 위하여 ADRP 유전자의 전체적인 구조 및 전사조절 인자 분석을 비롯하여 다른 지방대사 및 지방축적 관련 유전자와의 상호작용 및 다형성 탐색분석에 관한 연구가 필요 할 것으로 판단하였다.

사 사

본 연구는 1998년 과학기술부의 특정연구개발사업 연구로 수행된 연구결과의 일부이며 연구비 지원에 감사를 드립니다.

V. 인용문헌

1. Auffray, C. and Rougeon, F. 1980. Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain messenger RNAs from total myeloma tumor RNA. *Eur. J. Biochem.* 107: 303-314.
2. Brasaemle, D. L., Barber, T., Wolins, N. E. Serrero, G., Blanchette-Mackie, E. J. and Londos, C. 1997. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J. Lipid Res.* 38:2249-2263.
3. Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. and Rutter, W. J. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18:5294-5299.
4. Gao, J., Ye, H. and Serrero, G. 2000. Stimulation of adipose differentiation related protein (ADRP) expression in adipocyte precursors by long-chain fatty acids. *J. Cell Physiol.* 182(2):297-302.

5. Gerbens, F., Jansen, A., van Erp, A. J., Harders, F., Meuwissen, T. H., Rettenberger, G., Veerkamp, J. H. and te Pas, M. F. 1998. The adipocyte fatty acid-binding protein locus: characterization and association with intramuscular fat content in pigs. *Mamm. Genome* 9(12):1022-1026.
6. Gonzalez-Cadavid, N. F., Taylor, W. E., Yarasheski, K., Sinha-Hikim, I., Ma K., Ezzat, S., Shen, R., Lalani, R., Asa, S., Mamita, M., Nair G., Arver, S. and Bhasin, S. 1998. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95(25):14938-14943.
7. Horecker, B. L., Tsolas, O. and Lai, C. Y. 1972. In *The Enzymes*, Boyer, P. D. Ed., Academic Press, New York. Vol. 7, pp. 213-258. in Minoru, S., Tsunehiro, M. and Katsuji, H. (ed.) *Biochem. Biophys. Res. Comm (BBRC)* 1985. Nucleotide sequence of a cDNA clone for human aldolase : A messenger RNA in the liver. 131(1):413-420.
8. Izzo, P., Costanzo, P., Lupo, A., Rippa, E., Paolella, G. and Salvatore, F. 1988. Human aldolase A gene : structural organization and tissue-specific expression by multiple promoters and alternate mRNA processing. *Europ. J. Biochem.* 174:569-578.
9. Kirchhoff, C., Osterhoff, I., Habben, I. and Ivell, R. 1990. Cloning and analysis of mRNA expressed specifically in the human epididymis. *Int. J. Androl.* 13:155-167, in Larsen, L. B., Raven, P., Boisen, A., Berglund, L. and Petersen, T. E. (ed.) *Eur. J. Biochem.* 1997. 243(1-2):437-441. Primary structure of EPV20, a secretory glycoprotein containing a previously uncharacterized type of domain.
10. Kishi, H., Mukai, T., Hirono, A., Fujii, H., Miwa, S. and Hori, K. 1987. Human aldolase A deficiency associated with a hemolytic anemia: thermolabile aldolase due to a single base mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84(23):8623-8627.
11. Kreuder, J., Borkhardt, A., Repp, R., Pekrun, A., Gottsche, B., Gottschalk, U., Reichmann, H., Schachenmayr, W., Schlegel, K. and Lampert, F. 1996. Brief report: Inherited metabolic myopathy and hemolysis due to a mutation in aldolase A. *New Eng. J. Med.* 334:1100-1104.
12. Kukita, A., Yosida, M. C., Fukushige, S., Sakakibara, M., Joh, K., Mukai, T. and Hori, K. 1987. Molecular gene mapping of human aldolase A(ALDOA) gene to chromosome 16. *Hum. Genet.* 76:20-26.
13. Larsen, L. B., Raven, P., Boisen, A., Berglund, L. and Petersen, T. E. 1997. Primary structure of EPV20, a secretory glycoprotein containing a previously uncharacterized type of domain. *Eur. J. Biochem.* 243(1-2):437-441.
14. Marti, A., Novo, F. J., Martinez-Anso, E., Zariatigui, M., Aguado, M. and Martinez, J. A. 1998. Leptin gene transfer into muscle increases lipolysis and oxygen consumption in white fat tissue in ob/ob mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246(3):859-862.
15. Miller, K. D., Ellis, M., McKeith, F. K., Bidner, B. S. and Meisinger, D. J. 2000. Frequency of the Rendement Napole RN- allele in a population of American Hampshire pigs. *J. Anim. Sci.* 78(7): 1811-1815.
16. Minoru, S., Tsunehiro, M. and Katsuji, H. 1985. Nucleotide sequence of a cDNA clone for human aldolase : A messenger RNA in the liver. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 131(1):413-420.
17. Sturzenbaum, S. R., Kille, P. and Morgan, A. J. 1998. Identification of heavy metal induced changes in the expression patterns of the translationally controlled tumor protein (TCTP) in the earthworm *Lumbricus rubellus* l. *Biochim. Biophys. Acta.* 1398(3):294-304.
18. Thiele, H., Berger, M., Lenzner, C., Kuhn, H. and Thiele, B. J. 1998. Structure of the promoter and complete sequence of the gene coding for the rabbit translationally controlled tumor protein (TCTP) P23. *Eur. J. Biochem.* 257(1):62-68.
19. Ye, H. and Serrero, G. 1998. Stimulation of adipose differentiation related protein (ADRP) expression by ibuprofen and indomethacin in adipocyte precursors and in adipocytes. *Biochem J.* 330:803-809.
20. 장요순, 김태현, 윤두학, 박응우, 정일정, 조진기. 2002. Subtraction 기법을 이용한 한우 성장단계 특이발현 유전자 탐색. *한국동물자원과학회지.* 44(1):13-22.
21. 조병대, 고영두. 1998. 한국의 축산. p 3-25.
22. 축산기술연구소. 1997. 새로운 한우사육기술. p 81.
23. 축산기술연구소. 1998. 유전공학 기법에 의한 가축개량 기술개발 연구 최종 연구보고서. *과학기술부.* p 3-118.

(접수일자 : 2002. 10. 10 / 채택일자 : 2002. 11. 28)