

한우 CCAAT/enhancer-binding protein α(C/EBPα) 유전자의

동정과 mRNA의 발현

정영희* · 이상미* · 박효영* · 윤두학** · 문승주* · 정의룡*** · 강만종*

전남대학교 농업생명과학대학, 농업과학기술연구소, 동물자원학부*,

농촌진흥청 축산연구소**, 상지대학교***

Molecular Cloning and mRNA Expression of the Hanwoo CCAAT/enhancer-binding Protein α(C/EBPα) Gene

Y. H. Jeoung*, S. M. Lee*, H. Y. Park*, D. H. Yoon**, S. J. Moon*, E. R. Chung***

and M. J. Kang*

Department of Animal Science, Insti. of Ag. Sci. and Tech., College of Agriculture & Life Science, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea*, National Livestock Research Institute, RDA**, Department of Biotechnology, College of Life Science and Natural Resources, Sangji University***

ABSTRACT

CCAAT/enhancer binding proteins(C/EBP) are a group of transcription factors expressed during preadipocyte differentiation. In the C/EBPs, C/EBPα plays an important role in lipid deposition and adipocyte differentiation. In this studies, we report the identification, characterization, and expression of a Hanwoo C/EBPα. The Hanwoo C/EBPα DNA includes a 1059 bp open reading frame encoding a protein of 353 amino acids. The C/EBPα amino acid sequences of the Hanwoo show strong conservation with the corresponding sequences reported in other species. The distribution of C/EBPα mRNA in various tissues of Hanwoo aged 12 months were investigated using Northern blotting analysis. The highest expression was detected in adipose tissue and more lower expression was detected in colon and lung. We also identified expression of C/EBPα mRNA in Hanwoo sirloin and adipose tissue aged 12, 26, and 30 months by real-time RT-PCR. The highest expression were detected at 26 months in the sirloin and at 12 and 26 months in the adipose tissue.

(Key words : Adipocyte differentiation, C/EBPα, Hanwoo)

I 서 론

지방세포의 분화에는 많은 전사인자와 지방 세포 특이적 유전자의 발현이 복합적으로 관여 하는 것으로 보고 되고 있다(Cowherd 등, 1999;

Grimaldi, 2001). 사람과 생쥐 등의 지방세포 분 화에 대한 연구에 있어서 CCAAT/enhancer-binding proteins(C/EBPs)과 peroxisome proliferator-activated receptors(PPARs)와 같은 전사인자군은 지방세포 특이적 유전자의 발현과 지방세포

Corresponding author : Man-Jong Kang, Department of Animal Science, College of Agriculture & Life Science, Chonnam National University, 300 Yongbong-Dong, Puk-Gu, Gwangju 500-757, Korea. Tel : 062-530-2113, E-mail : mj kang@chonnam.ac.kr

로의 분화에 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다(Grimaldi, 2001). C/EBP 군은 leucine zipper(bZip) 전사인자 군에 속하고 모든 C/EBP 군은 C 말단에 leucine zipper domain을 가지고 있으며 이 domain은 dimer의 형성과 DNA 결합에 중요한 역할을 수행하고 있는 것으로 보고되고 있다 이러한 C/EBP 군은 현재 C/EBP α , C/EBP β , C/EBP γ , C/EBP δ , C/EBP ϵ , CHOP 등 6가지가 보고되고 있으며 이 단백질은 homodimer 또는 서로간의 heterodimer를 형성하여 C/EBP consensus sequence에 결합하여 전사인자로서 작용한다(Grimaldi, 2001). 이들 중 C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ 는 백색지방과 갈색지방에서 발현하는 것으로 보고되고 있다(Cao 등, 1991; Manchado 등, 1994).

일반적으로 지방전구세포의 지방세포로 분화는 지방산과 프로스타글란딘과 같은 라이간드가 PPAR δ 에, Glucocorticoids와 같은 호르몬은 C/EBP β 와 C/EBP δ 에 작용하는 것으로 분화유도가 시작되며 insulin은 adipocyte determination and differentiation factor-1(ADD-1)에 작용하는 것으로 알려져 있다. 이러한 인자들에 의하여 분화가 유도되면서 활성을 받은 전사인자 PPAR δ 는 분화과정에서 PPAR γ 의 발현을 유도하며 C/EBP β 와 C/EBP δ 는 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현에 관여하고 insulin에 의한 ADD-1의 활성은 PPAR γ 의 전사를 유도하는 것으로 보고되고 있다. 이렇게 전사활성을 받은 C/EBP α 와 PPAR γ 는 지방세포로 분화하는데 관여하는 유전자들의 전사활성을 조절하는 것으로 알려져 있다(Cowherd 등, 1999). 또한 돼지에 있어서 지방조직 유래 초대배양세포를 지방전구세포의 분화유도 물질인 dexamethasone과 troglitazone으로 처리하면 지방세포로의 분화가 촉진되며 이에 따라 C/EBP α 의 발현이 유도되는 것으로 보고되고 있다(Yu와 Hausman 1998; Tchoukalova 등, 2000). 이와 같이 지방전구세포가 지방세포로의 분화에 있어서 중요한 역할을 수행하고 있는 것으로 생각되는 C/EBP α 는 사람, 쥐, 생쥐 등에서 보고되고 있으며 대가축인 소에 있어서는 일본화우에서 보고되어져 있고 소 염색체 18q24에 위치하며 한 개의

exon으로 구성되어져 있다(Landschulz 등, 1988a; Christy 등, 1991; Antonson와 Xanthopoulos, 1995; Taniguchi와 Sasaki, 1996, Ihara 등, 1997). 그러나 한우에 있어서 C/EBP α 에 대한 유전자는 보고된 바가 없다. 그러므로 본 연구에서는 한우 genomic DNA로부터 C/EBP α 의 coding region을 동정하여 일차구조를 해석하고, 각 조직에 있어서 C/EBP α 유전자의 발현을 확인하고자 실시하였다.

II 재료 및 방법

기본적인 분자생물학적 방법은 Sambrook와 Russell(2001)의 Molecular cloning을 참고하였다.

1. Genomic DNA의 분리

Genomic DNA는 축산연구소에서 사육된 한우로부터 채취한 혈액을 이용하여 Miller 등(1998)의 방법에 의하여 분리하였으며 분리 정제된 DNA는 TE buffer에 용해하여 분석에 사용하였다.

2. 한우 C/EBP α 의 cloning

C/EBP α 유전자는 1개의 exon으로 이루어져 있으므로 genomic DNA를 이용하여 아래와 같은 조건으로 C/EBP α 유전자를 cloning하였다. primer는 NCBI에 보고되어 있는 일본 화우의 C/EBP α 유전자 염기서열(Accession NO. D82984)을 기본으로 제작하였다. sense primer로 GCGA CAAACCGGTATAAATGCTGGGCCCGC를, anti-sense primer로 CTCACGCGCAGTTGCCCATGG CCTTGACCA를 사용하였으며, PCR 조건은 denaturation 94 $^{\circ}$ C 30초, annealing 68 $^{\circ}$ C 30초, extension 72 $^{\circ}$ C 2분, 33cycle의 반응조건으로 PCR을 수행하였다. PCR 산물은 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였고 염기서열 결정을 위하여 T-vector(Promega)에 subcloning하였다. 염기서열 결정은 ABI PRISM 377 sequencer (Applied Biosystems)를 사용하여 결정하였다. 결정된 염기서열의 분석은 Genetyx-win(version

4.0)을 이용하여 분석하였다.

3. Total RNA 정제

Total RNA는 숫컷 한우 12개월령 또는 30개월령의 뇌, 심장, 간, 대장, 폐, 소장, 갈비, 등심, 신장, 안심, 피하지방, 대장지방의 각 장기를 사용하여 제조하였다. 먼저 1 ml의 Trizol Reagent (Gibco BRL)에 0.2g의 조직을 넣고 Homogenizer 한 후 에탄올 침전을 수행하여 Total RNA를 회수한 후 RNase-free water에 녹여 사용 전까지 -70°C 에 보존하였다.

4. Northern blotting에 의한 발현 분석

Northern blotting을 위하여 $15\mu\text{g}$ 의 Total RNA를 glyoxal에 의하여 변성시키고 1.5% 아가로즈 겔에서 전기영동한 다음 zeta-probe membrane (Bio-Rad 사)에 전이시켰다. membrane은 $5\times\text{SSPE}$, $5\times\text{Denhardt's}$, 1% SDS(w/v), 50% fromamide(w/v)을 포함하는 용액에서 42°C , 15시간 hybridization을 실시하였다. probe는 cloning된 한우 C/EBP α 1.2kb의 DNA 단편을 random labeling kit(Amersham 사)와 [α - ^{32}P]dCTP(110TBq/mmol, Amersham 사)를 이용하여 제조하였다. membrane은 hybridization 후 0.2% SSC, 0.1% SDS(w/v)에서 68°C , 30분, 3회 세척한 다음 autoradiography를 실시하였다.

5. Real-time PCR에 의한 발현 분석

Real-time PCR용 RNA는 Trizol Reagent(Gibco BRL)로 지방조직과 등심에서 제조한 후 genomic DNA를 제거하기 위하여 DNase를 처리한 다음 사용하였다. real-time PCR용 primer는 http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi에서 design하였다. 한우 C/EBP α 용 sense primer는 TGGACAAGAACAGCAACGAG (20mer), antisense primer는 TTGTCACCTGGTCAGCTCCAG(20mer)를 이용하였으며 internal control로 18S RNA를 측정하기 위하여 sense pri-

mer로 CCCGAAGCGTTTACTTTGAA (20mer), antisense primer로 CCCTCTTAATCATGGCCTCA (20mer)를 이용하였다.

Real-time PCR은 QuantiTect SYBR Green RT-PCR(Qiagen) kit와 Roter-Gene 3000 system (Corbett Research)을 이용하여 아래와 같이 수행하였다. total RNA $5\mu\text{l}$ (500ng), 5 pmole/ μl sense와 antisense primer를 각각 $2\mu\text{l}$, $2\times$ QuantiTect SYBR Green $25\mu\text{l}$, QuantiTect RT Mix $0.5\mu\text{l}$, RNase free 멸균 증류수 $17.5\mu\text{l}$ 을 이용하여 전체 $50\mu\text{l}$ 계에서 실시하였다. PCR 조건은 Revers transcription을 위하여 50°C 에서 30분 1 cycle 수행한 후 95°C 15분 1 cycle을 실시하였다. PCR은 94°C 에서 15초 denaturation, 50°C 에서 25초 annealing, 72°C 에서 20초 extension의 cycle을 45 cycle 수행하였다.

유전자 발현의 상대적 정량은 ΔCt (시료의 Ct 값 - 18S RNA의 Ct 값)을 계산하고 난 다음 $\Delta\Delta\text{Ct}$ (시료의 ΔCt 값 - 12개월 한우 등심의 ΔCt 값)을 구하여 12개월 한우 등심의 발현을 1로 보았을 때의 상대적 정량을 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 값으로 계산하였다.

6. Real-time PCR 결과의 통계적 분석

각 개월별 3회 반복을 실시한 결과를 SPSS 프로그램의 one-way ANOVA을 이용하여 평균 간의 유의성을 검증하였다.

III 결과 및 고찰

1. 한우 C/EBP α 유전자의 cloning

지방분화에 관여하는 전사인자인 것으로 보고 되고 있는 C/EBP α 유전자를 동정하기 위하여 한우 genomic DNA를 이용하여 PCR를 수행한 결과 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 1.2kb의 밴드를 검출할 수 있었다. 이러한 결과는 Taniguchi와 Sasaki(1996)에 의하여 보고되어 있는 일본화우 C/EBP α (NCBI Accession No. D82984)로부터 제작한 primer로부터 증폭될 수

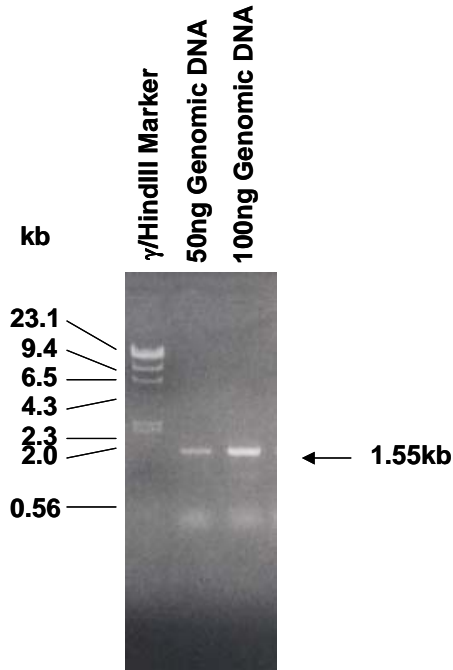


Fig. 1. PCR of Hanwoo C/EBP α gene.

Genomic DNA was extracted from blood of Hanwoo. Genomic DNA PCR-amplification was carried out in 50 μ l containing standard 1 \times PCR-buffer, 0.5 U Ex Taq-polymerase(Takara), 200 μ M of each dNTP, 20 pmole of sense(GCGACAAA CCGGTATAAATGCTGGGCCCGC) and antisense(CTCACGCGCAGTTGCCCATG GCCTTGACCA) primer and 1 μ l(50 and 100ng) of the genomic DNA. The template was denatured for 1 min at 94 $^{\circ}$ C, followed by 35 cycles of amplification at 94 $^{\circ}$ C for 30 sec., 68 $^{\circ}$ C for 30 sec., 72 $^{\circ}$ C for 2 min., and terminated with 15 minutes at 72 $^{\circ}$ C. Expected size of Hanwoo C/EBP α is 1231bp. The number on the left side indicate the sizes (Kilo base) of the λ /Hind III molecular weight marker.

있는 DNA 크기와 일치하였다. 또한 C/EBP α 유전자는 1개의 엑손으로 구성되어 있는 것으로 보고되고 있으며 한우에 있어서도 genomic DNA로부터 coding region을 정상적으로 확보할 수 있었다.

본 연구에서 동정된 한우 C/EBP α 유전자를

sequencing 한 결과 1231bp 염기서열, 353 아미노산으로 구성되어 있었다(Fig. 2). 그리고 3' 말단 쪽에는 C/EBP α 의 dimer 형성과 DNA 결합에 중요한 basic region leucine zipper(bZIP) domain를 가지고 있으며 이와 같은 결과는 Taniguchi와 Sasaki(1996)의 보고와도 일치하였다. Fig. 3은 한우 C/EBP α 아미노산의 염기서열을 일본화우, 사람, 흰쥐, 생쥐와 비교한 결과를 나타내고 있다. 한우 C/EBP α 아미노산의 염기서열은 일본 화우와 189번째의 히스티딘이 아스파라긴산, 222번째 알라닌이 트레오닌, 253번째 알라닌이 발린, 307번째 루신이 글루타민, 336번째 트레오닌이 이소루신으로 다른 아미노산 차이를 보여 98.6%의 상동성을 나타내었다. 또한 한우 C/EBP α 아미노산의 염기서열은 사람과 93.6%, 흰쥐와 91.1%, 생쥐와 92.2%의 상동성을 나타내어 중간 매우 잘 보존 되었음을 알 수 있다. C/EBP α 의 3' 말단에 61개의 아미노산으로 구성되어 있는 leucine zipper domain은 이량체 형성과 전사활성을 위한 DNA 결합 영역으로 작용하는 매우 중요한 부분으로 보고 되고 있다(Landschulz 등, 1988b). 본 연구에서 leucine zipper domain은 일본화우, 사람, 흰쥐, 생쥐에서 100%의 상동성을 나타내고 있지만 한우에서는 307번째 루신과 336번째 트레오닌으로 치환된 아미노산을 가지고 있었다. 또한 leucine zipper domain은 전사활성을 위한 DNA 결합 영역으로 작용함으로 한우에 있어서는 두 군데 아미노산의 차이를 나타내는 것은 한우 C/EBP α 에 의한 전사에 있어서 target DNA가 다른 종과 다를 가능성도 있을 것으로 생각된다. 그러므로 이와 같은 것은 한우 특이적이라고 할 수 있으며 한우에 있어서 이 부분에 대하여 polymorphism의 차이를 보일 가능성이 있으며 이러한 문제는 앞으로 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다. 그리고 polymorphism의 차이를 나타낸다면 한우의 기능과 polymorphism에 의한 genotype과의 관계가 분자 유전학적으로 해석되어야 할 것으로 사료된다.

```

      ggcacaaaccggtataaatgctggggcccgccgggctggccattcggcaccgggagctgagcgggagcgagcgagta
1  ggggctctgagtgggcggtggcagtagcggcgccccggcaggtggaggccgagggctcgccatgcccgggagactttagtcccc
   atggagtcggccgacttctacgagcggagcggccccggccccgactcagagccccacacgcccagcagcgccgct
   M E S A D I S A Y I D P A A F N D E F L A D L F Q H S R Q Q E K 30
91  ttggctttccccggggcgccggccccctcgacgcccccccgccccacctgcccgggagctctggcgccatctgcaaacacgagacg
   F G F P R G A G P S Q P P A P P A A P E P L G G I C E H E T 60
181 tccatcgacatcagcggcctacatcgaccggcgcccttcaacgacgagttctctggcagcctgttccaaacacagccggcagcaggagaag
   S I D I S A Y I D P A A F N D E F L A D L F Q H S R Q Q E K 90
271 gccaaaggcgccggcccccgaggaggcgcaacgactttgactaccggggcgcccccgctgggccccggcgccgctcatgcccggg
   A K A A A A P A G G G N D F D Y P G A P V G P G G A V M P G 120
361 gggacgcaagctccccctctgcttacggctgcccggcagccggctacctggacagcaggctgggagcctctgtacgagcgggtcgggggcg
   G T H G P P P G Y G C A A A G Y L D S R L E P L Y E R V G A 150
451 ccggcctgcccggcctggtgatcaagcaggagccgcccggaggagacgaagcgaagcagctggcgctggcggcctcttccctaccag
   P A L R P L V I K Q E P R E E D E A K Q L A L A G L F P Y Q 180
541 ccggcctgcccggcctggtgatcaagcaggagccgcccggaggagcagctggcagcctggcagcttccagatcgacacactgcccgc
   P P P P P P P P P H S H P P P A H L A A P H L Q F Q I A H C G 210
631 cagaccaccatgacactgcagcccggcaccgcccgcccgccaccgctgctagcccggcaccagcggcggcctgcccggcct
   Q T T M H K L Q P P G H P A P P P T P V P S P H P A P A L G A A 240
721 ggccctgcccaggccccggggcgctcaaggggctggccgcccaccgacccctcctgctggggcgccggcgccggggcgaagccaag
   G L P G P G G A L K G L A A T H P D L R A G G G G G G G K A K 270
811 aagtcctgggacaagaacagcagctaccgggctggggcgagcgaacaacatcgcggtgcgcaagaccgggacaagccaagcag
   K S V D K N S N E Y R V R R N N I A V R K S R D K A K A Q 300
901 cgcaacgctggagacgagctgaaggtgctggagctgaccagtgacaatgaccgctgcgcaagcgggtggaacaactgagcccggaactg
   R N V E T Q L K V L E L T S D N D R L R K R V E Q L S R E L 330
991 gacacgctgcccggcacccttcctcagctgcccggagactcctctcaaggccatgggcaactgcccgtgag
   D T L R G T F R Q L P E S S L V K A M G N C A * 353

```

Fig. 2. Nucleotide and deduced amino acid sequences of Hanwoo C/EBP α gene. Nucleotide residues are numbered on the left; amino acids are numbered on the right. Nuclotide 1 is the A of the initiator AUG codon of Hanwoo C/EBP α . The in-frame translation termination codon at 1060bp is indicated by asterisk. Leucine zipper domain(bZIP) is one underline. The Hanwoo C/EBP α cDNA includes a 1059 bp open reading frame encoding a protein of 353 amino acids.

Hanwoo	MESADFYEAEP R P M S S H L Q S P P H A P S S A A F G F P R G A G P S Q P P A P P A A P E P L G G I C E H E T S I D I S A Y I D P A A F N D E F L A D	80
Japanese cattle	MESADFYEAEP R P M S S H L Q S P P H A P S S A A F G F P R G A G P S Q P P A P P A A P E P L G G I C E H E T S I D I S A Y I D P A A F N D E F L A D	80
Human	MESADFYEAEP R P M S S H L Q S P P H A P S S A A F G F P R G A G P P K P P A P P A A P E P L G G I C E H E T S I D I S A Y I D P A A F N D E F L A D	80
Rat	MESADFYEAEP R P M S S H L Q S P P H A P S N A A F G F P R G A G P A P P P A P P A A P E P L G G I C E H E T S I D I S A Y I D P A A F N D E F L A D	80
Mouse	MESADFYEAEP R P M S S H L Q S P P H A P S N A A F G F P R G A G P A P P P A P P A A P E P L G G I C E H E T S I D I S A Y I D P A A F N D E F L A D	80

LFQHSRQQEKAKAAAAPAG--GGNDFDYPGAPVPGGAVMPGGTHGPPPGYGCAAAGYLDLSRLEPLYERVGAPALRPLVI	158
LFQHSRQQEKAKAAAAPAG--GGNDFDYPGAPVPGGAVMPGGTHGPPPGYGCAAAGYLDLSRLEPLYERVGAPALRPLVI	158
LFQHSRQQEKAKAAVGTGGGGGDFDYPGAPAGPFGGAVMPGGAHGGPPPGYGCAAAGYLDGRLEPLYERVGAPALRPLVI	160
LFQHSRQQEKAKAAAAPAGGGG--DFDYPGAPAGPFGGAVMSAGAHGGPPPGYGCAAAGYLDGRLEPLYERVGAPALRPLVI	158
LFQHSRQQEKAKAAAAPAGGGG--DFDYPGAPAGPFGGAVMSAGAHGGPPPGYGCAAAGYLDGRLEPLYERVGAPALRPLVI	158

KQEPREDEAKQLALAGLFYQPPPPPPPHSHP--PPAHLAAPHLQFQIAHCGQTTMHLQPGHPPTPPTVPVSPHPAPA	236
KQEPREDEAKQLALAGLFYQPPPPPPPHSHP--PPAHLAAPHLQFQIAHCGQTTMHLQPGHPPTPPTVPVSPHPAPA	236
KQEPREDEAKQLALAGLFYQPPPPPPSHPHPHPPAHLAAPHLQFQIAHCGQTTMHLQPGHPPTPPTVPVSPHPAPA	240
KQEPREDEAKQLALAGLFYQPPPPPPPHPHAS--PAHLAAPHLQFQIAHCGQTTMHLQPGHPPTPPTVPVSPHPAPA	236
KQEPREDEAKQLALAGLFYQPPPPPPPHAS--PAHLAAPHLQFQIAHCGQTTMHLQPGHPPTPPTVPVSPHPAPA	236

LGAAGLPGPGALKGLAATHPDLRAGGGG-----GKAKKSVDKNSNEYVRRERNNIAVRKSRDKAKQRNVETQKVL	310
LGAAGLPGPGALKGLVATHPDLRAGGGG-----GKAKKSVDKNSNEYVRRERNNIAVRKSRDKAKQRNVETQKVL	310
LGAAGLPGPGSALKGLGAHPDLRAGGGT-----GAGKAKKSVDKNSNEYVRRERNNIAVRKSRDKAKQRNVETQKVL	315
MGAAGLPGPGSLKGLAGHPDLRAGGGG-----GAGAGKAKKSVDKNSNEYVRRERNNIAVRKSRDKAKQRNVETQKVL	315
LGAAGLPGPGSALKGLAGHPDLRAGGGGSGAGAGKAKKSVDKNSNEYVRRERNNIAVRKSRDKAKQRNVETQKVL	316

<u>ELTSDNDRLRKRVEQLSRELDTLRGIFRQLPESSLVKAMGNCA</u>	353
<u>ELTSDNDRLRKRVEQLSRELDTLRGIFRQLPESSLVKAMGNCA</u>	353
<u>ELTSDNDRLRKRVEQLSRELDTLRGIFRQLPESSLVKAMGNCA</u>	358
<u>ELTSDNDRLRKRVEQLSRELDTLRGIFRQLPESSLVKAMGNCA</u>	358
<u>ELTSDNDRLRKRVEQLSRELDTLRGIFRQLPESSLVKAMGNCA</u>	359

Fig. 3. Alignment of the amino acids among bovine, human, mouse, and rat C/EBP α gene orthologs: human (NCBI Acession NO. U34070), Rat (NCBI Acession NO. X12751), Mouse (NCBI Acession NO. M62362), and Japanese black cattle C/EBP α (NCBI Acession No. O18971). Leucine zipper domain (bZIP) is one underline.

2. 한우 C/EBP α 유전자의 조직발현양상 분석

C/EBP α 는 생쥐에 있어서 지방과 콜레스테롤 대사관련 조직인 간장, 지방, 폐, 부신, 태반 등에서 발현하는 것으로 보고되고 있으며 성장단계에 따라서 호르몬의 영향에 의하여 그 발현이 조절될 가능성을 제시하고 있다(Birkenmeier 등, 1989). 한우에 있어서 12개월령 비거세우에서 C/EBP α 유전자의 조직발현을 northern blotting에 의하여 분석한 결과는 Fig. 4에 나타낸 바와 같이 지방조직에서 가장 높은 발현을 나타내었으며 대장과 폐에서 약간의 발현을 보였다.

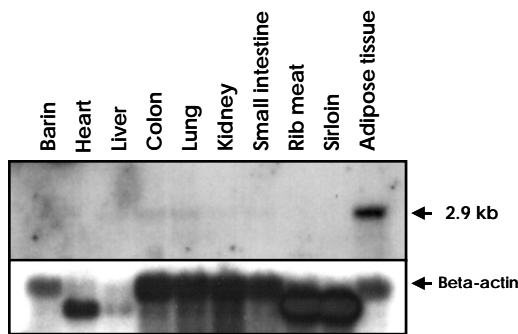


Fig. 4. Northern blot analysis of Hanwoo PPAR γ mRNA in various bovine tissues.

Total RNA(20 μ g) prepared from the indicated bovine tissues was subjected to electrophoresis on a 1.5% agarose gel, blotted onto a zeta-probe membrane, and then hybridized with the ³²P-labeled 1.2kb fragment of Hanwoo C/EBP α gene. The filter was washed in 0.1 \times SSC containing 0.1%(W/V) SDS at 68 $^{\circ}$ C for 30 min and then exposed to Kodak XAR-5 film with an intensifying screen at -80 $^{\circ}$ C for 78 h. Control hybridization with a bovine beta-actin probe is shown in the lower portion.

C/EBP α 는 사람과 생쥐 등에서 지방세포 특이적 유전자의 발현과 지방세포로의 분화에 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다(Grimaldi, 2001). 그러므로 한우 12개월, 26개월, 30개월에

서의 지방과 등심에 있어서 C/EBP α 의 발현을 real-time RT-PCR에 의하여 분석하였다(Fig. 5). 12개월 등심에서의 발현을 1로 보았을 때 상대적 발현 양은 전체적으로 지방조직에서 각 개월별 높은 발현을 나타내었다. 등심 간에 있어서 발현율은 26개월에서가 12개월의 약 6.4배로 유의적인 차이를 나타내었다(P<0.05). 그리고 30개월에서는 12개월의 약 2.1배의 발현을 보였으나 유의적인 차이가 없었고 26개월과는 유의적 차이를 보였다(P<0.05). 전체적으로 등심에서는 지방침착이 매우 왕성한 26개월에서 높은 발현을 보였고 비육 후기라고 할 수 있는 30개월에서는 발현이 26개월 보다 줄어드는 경향이 있었다. 지방조직에 있어서는 지방형성이 왕성한 12개월령에서부터 높은 발현을 나타내어 26개월까지 유지되었으나 30개월에서는 낮은 발현으로 26개월과 유의적 차이를 보였다(P<0.05). 지방조직과 등심에 있어서 C/EBP α 의 발현 양상이 다른 것은 지방조직에서 등심조직보다 먼저 지방분화와 형성이 시작되어 12개월 지방에서 높은 발현 양상을 나타낸 것으로 생각되고 등심에서는 지방조직보다 차후에 지방

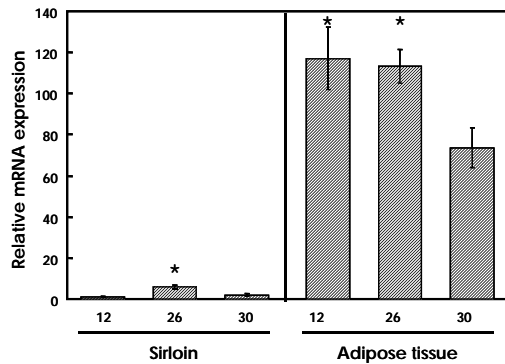


Fig. 5. Expression of C/EBP α mRNA at 12, 26, and 30 months aged Hanwoo sirloin and adipose tissues using real-time RT-PCR.

The 500ng of total RNA was analyzed by QuantiTect SYBR Green RT-PCR(Qiagen) kit for expression of C/EBP α mRNA. Data are presented as the means \pm S.E. of three individuals mRNA levels for each tissue. Statistical significance:*, p < 0.05.

분화가 이루어지므로 12개월에서가 26개월보다 낮은 것으로 사료된다.

또한 이러한 결과는 C/EBP α 유전자의 발현에 의해 한우 등심에서의 지방 침착은 다른 장기의 지방 분화와 같은 양상으로 조절 되는 것으로 생각되며 C/EBP α 는 사람과 설치류에서와 같이 한우에 있어서도 지방분화과정에 중요한 역할을 수행하는 것으로 사료된다.

IV 요약

CCAAT/enhancer binding protein(C/EBP)는 지방전구세포의 분화과정에서 발현하는 전사인자군에 속한다. 이러한 C/EBP 중에서 C/EBP α 는 지방세포의 분화와 지방침착에 있어 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 한우 C/EBP α 유전자를 분리 동정하고 그 발현을 조사하였다. 한우 C/EBP α 유전자는 1059bp의 open reading frame으로 구성되어 있으며 353개의 아미노산을 암호화하고 있었다. 그리고 한우 C/EBP α 아미노산을 다른 종과 비교하였을 때 매우 높은 상동성을 나타내었다. Northern blotting 분석에 의하여 12개월 한우에 있어서 C/EBP α mRNA의 분석을 실시한 결과 지방조직에서 가장 높은 발현을 나타내었으며 대장과 폐에서 매우 낮은 발현을 확인할 수 있었다. 또한 12개월, 26개월, 30개월 한우의 등심과 지방에 있어서 C/EBP α 유전자의 발현을 real-time RT-PCR로 분석한 결과 등심에서는 26개월에서 가장 높은 발현을 보였으며 지방에서는 12개월과 26개월에서 높은 발현을 나타내었다.

V 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21사업의 지원에 의해 이루어진 것임.

Data deposition: The sequence reported in this paper has been deposited in the GenBank database(accession no. AY458599).

VI 인용 문헌

1. Antonson, P. and Xanthopoulos, K. G. 1995. Molecular cloning, sequence, and expression patterns of the human gene encoding CCAAT/enhancer binding protein alpha(C/EBP alpha). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215:106.
2. Birkenmeier, E. H., Gwynn, B., Howard, S., Jerry, J., Gordon, J. I., Landschulz, W. H. and McKnight, S. L. 1989. Tissue-specific expression, developmental regulation, and genetic mapping of the gene encoding CCAAT/enhancer binding protein. *Genes Dev.* 3:1146.
3. Christy, R. J., Kaestner, K. H., Geiman, D. E. and Lane, M. D. 1991. CCAAT/enhancer binding protein gene promoter: binding of nuclear factors during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:2593.
4. Cao, Z., Umdk, R. M. and McKnight, S. L. 1991. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev.* 5:1538.
5. Cowherd, R. M., Lyle, R. E. and McGehee Jr, R. E. 1999. Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 10:3.
6. Grimaldi, P. A. 2001. The roles of PPARs in adipocyte differentiation. *Prog. Lipid. Res.* 40:269.
7. Ihara, N., Yamakuchi, H., Hirano, T., Takeda, H., Taniguchi, Y., Sasaki, Y., Davis, S. K., Taylor, J. F., Barendse, W. and Sugimoto, Y. 1997. Physical and genetic mapping of bovine CEBPA and PPARG genes. *Anim. Genet.* 29:398.
8. Landschulz, W. H., Johnson, P. F., Adashi, E. Y., Graves, B. J. and McKnight, S. L. 1988a. Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP. *Genes Dev.* 2:789.
9. Landschulz, W. H., Johnson, P. F. and McKnight, S. L. 1988b. The luciferase zipper: A hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science.* 240:1759.
10. Manchado, C., Yubero, P., Vinas, O., Iglesias, R., Villarroya, F., Mampel, T. and Giralt, M. 1994. CCAAT/binding proteins α and β in brown adipose tissue: evidence for a tissue-specific pattern of expression during development. *Biochem. J.* 302: 695.
11. Miller, S. A., Kykes, D. D. and Polesky, H. F. 1998. A simple salting out procedure for extracting

- DNA from human nucleated cells. Nucl. Acids. Reg. 16:1215.
12. Taniguchi, Y. and Sasaki, Y. 1996. Rapid communication: Nucleotide sequence of bovine C/EBP α gene. J. Anim. Sci. 74:2554.
13. Tchoukalova, Y. D., Hausman, D. B., Dean, R. G. and Hausman, G. J. 2000. Enhancing effect of troglitazone on porcine adipocyte differentiation in primary culture: A comparison with dexamethasone. Obes. Res. 8:83.
14. Yu, Z. K. and Hausman, G. J. 1998. Expression of CCAAT/enhancer binding protein during porcine preadipocyte differentiation. Exp. Cell. Res. 245: 343.
- (접수일자 : 2004. 9. 7. / 채택일자 : 2004. 11. 8.)