

# 한우 Glucose Transporter 4 유전자의 분자생물학적 해석

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

전남대학교 농업생명과학대학 농업과학기술연구소 동물자원학부\*

농촌진흥청 축산연구소\*\*

상지대학교 생명자원과학대학 생명공학과\*\*\*

## Molecular Characterization of Hanwoo Glucose Transporter 4 Gene

S. M. Lee\*, Y. H. Jeong\*, H. M. Kim\*, 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

The uptake of glucose for metabolism and growth is essential to most animal cells and is mediated by glucose transport protein. In the glucose transport protein family, GLUT4 plays a key role in cellular glucose uptake stimulated by insulin in skeletal muscles and adipose tissue in rodents and human. In this studies, we reported the identification, characterization, and expression of Hanwoo GLUT4 gene. The Hanwoo GLUT4 cDNA includes a 1527 bp open reading frame encoding a protein of 509 amino acids. The GLUT4 amino acid sequences of the Hanwoo show strong conservation with the corresponding sequences reported in other species. The highest mRNA expression of GLUT4 was detected in heart and lower expression was detected in rib meat, sirloin, and colon. We confirmed the expression of GLUT4 in the subcutaneous and small intestinal adipose tissue using RT-PCR. To investigate the expression of GLUT4 in the bovine intramuscular adipose differentiation, fibroblast-like cells were isolated from the sirloin of Hanwoo bull aged 12 months by collagenase digestion of minced tissue and cultured with activators of PPAR gamma. We identified that GLUT4 mRNA expression decreased during differentiation of preadipocytes into adipocyte in Korean cattle. These results indicated that function of GLUT4 in bovine adipose tissue was different from that of mouse and human.

(**Key words** : Adipocyte differentiation, Bovine, Intramuscular preadipocyte)

### I. 서 론

Glucose는 단백질과 지질합성의 기질로서 뿐만 아니라 동물세포의 중요 에너지원으로 이용

된다. 세포의 원형질막을 가로지르는 glucose의 이동은 특정한 수송체에 의하여 이루어지며 이러한 glucose 수송체는 sodium-glucose co-transporter (SGLT)와 facilitative glucose transporter(GLUT)로

Corresponding Author : Man-Jong Kang, 300 Yongbong-Dong, Puk-Gu, Gwangju 500-757, Korea

Tel : 062-530-2113, E-mail : mj kang@chonnam.ac.kr

크게 두 그룹으로 분류되어 있다. SGLT는 소장  
의 상피세포와 신장근위뇨관에 위치하고 sodium  
의존적으로 소장과 신장 nephron의 내강으로부터  
glucose를 흡수하는 기능을 수행한다. GLUT  
는 12개의 막관통 영역을 가지고 있으며 지금까  
지 약 13개 이상의 family가 보고되고 있고 조  
직과 연령에 따라 특이적으로 각각 기능을 수행  
하는 것으로 알려져 있다(Gould and Holman,  
1993). 이들 중 GLUT1은 거의 모든 조직에 존  
재하며 세포의 기본적인 glucose 흡수에 관여하  
고 있으며 반대로 GLUT4는 근육과 지방조직에  
서 발현하고 인슐린 의존적으로 glucose를 수송  
하는 중요한 수송체로 알려져 있다(Gould and  
Holman, 1993; Watson 등, 2004).

소에 있어서 골격근에 필요한 에너지의 약  
30~60%와 근내 지방조직에서 필요한 에너지  
의 약 50~75%를 glucose가 공급하는 것으로  
보고되어 있다(Smith and Crouse, 1984). 근육과  
지방조직은 인슐린 의존적 glucose 도입의 중요  
장소이며 지방세포의 성숙은 인슐린 자극에 의  
하여 일어나는 것으로 알려져 있다. GLUT4는  
지방세포에 있어서 인슐린에 의한 신호전달을  
받아 세포내 소포로부터 원형질막으로 전위되  
어 glucose의 도입을 촉진하는 기능을 수행하는  
것으로 보고되고 있다(Holman and Kasuga, 1997).  
반추 동물인 소의 지방조직에 있어서 지방산합  
성에 대한 중요 전구체는 glucose 보다 acetate인  
것으로 보고되고 있으며(Whitehurst 등, 1978)  
이와 같은 것은 지방조직에 있어서 GLUT4의  
기능이 다를 가능성을 나타내고 있다. 소의  
GLUT4 유전자는 Abe 등 (1997)에 의하여 509  
개의 아미노산으로 구성되어 있으며 심장, 횡  
경막, 근육(최장근, 네갈래근)에서 높은 mRNA  
의 발현을 나타내고 지방에서는 약한 발현을  
보고하고 있다(Abe 등, 1997).

그러나 한우에 있어서 GLUT4에 대한 유전자  
는 보고된 바가 없다. 그러므로 본 연구는 한  
우로부터 GLUT4의 coding region을 동정하여  
일차구조를 해석하고, 각 조직 및 지방세포에  
있어서 GLUT4 유전자의 발현을 확인하고자 실  
시하였다.

## II. 재료 및 방법

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

### 1. 한우 Glucose transporter4(GLUT4) 유전 자의 cloning

Glucose transporter4(GLUT4) 유전자의 cloning  
은 RT-PCR을 이용하였다. 심장, 갈비살 Total  
RNA 5 $\mu$ g을 사용하여 Superscript II RNaseH-  
reverse transcriptase(Invitrogen, USA)와 random  
primer를 이용하여 first strand cDNA를 합성  
하였다. PCR은 1 $\mu$ l first strand cDNA를 사용  
하여 NCBI에 보고된 bovine GLUT4 유전자  
(accession No. D63150)에 상응하는 20 pmole  
sense(5'-CCTAAGACAAGATGCCGTCG-3')와  
antisense(5'-CCCTCAGTCATGCTCATCTG-3')  
primer를 이용하여 1 $\times$ PCR-buffer, 0.5U ExTaq-  
polymerase(TaKaRa, Japan), 각 200  $\mu$ M dNTP조  
성으로 denaturation 94 $^{\circ}$ C 30초, annealing 55 $^{\circ}$ C  
30초, extension 72 $^{\circ}$ C 2분, 33cycle의 반응조건으로  
PCR을 수행하였다. PCR 산물은 0.8% agarose gel  
에서 전기영동하여 확인하였으며 염기서열 결정  
을 위하여 T-vector(Promega, USA)에 subcloning하  
였다. 염기서열 결정은 ABI PRISM 377 sequencer  
(Applied Biosystems)을 사용하여 결정하였다. 결  
정된 염기서열의 분석은 Genetyx-win (version  
4.0)을 이용하여 분석하였다.

### 2. Northern blotting에 의한 조직발현 분석

Northern blotting을 위한 Total RNA는 수컷 한  
우 12개월령의 뇌, 심장, 간, 대장, 폐, 신장, 소  
장, 갈비, 등심, 신장지방의 각 장기를 사용하여  
제조하였다. 먼저 1ml의 Trizol Reagent(Gibco  
BRL, USA)에 0.2g의 조직을 넣고 Homogenizer  
한 후 에탄올 침전을 수행하여 Total RNA를  
회수한 후 RNase-free water에 녹여 사용전 까  
지 -70 $^{\circ}$ C에 보존하였다.

Northern blotting을 위하여 각 조직 Total RNA  
15 $\mu$ g를 glyoxal에 의하여 변성시키고 1.5% 아가로

즈 겔에서 전기영동한 다음 zeta-probe membrane (Bio-Rad, USA)에 전이시켰다. membrane은 5×SSPE, 5×Denhardt's, 1% SDS(w/v), 50% formamide(w/v)을 포함하는 용액에서 42°C, 15시간 hybridization을 실시하였다. probe는 cloning된 약 1,500 bp의 GLUT4 DNA 단편을 random labelling kit(Amersham, USA)와 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (110TBq/mmol, Amersham, USA)를 이용하여 제조하였다. membrane은 hybridization 후 0.2% SSC, 0.1% SDS(w/v)에서 68°C, 30분, 3회 세척한 다음 autoradiography를 실시하였다.

### 3. Intramuscular preadipocyte 세포의 분화 및 GLUT4 발현 확인

한우 Intramuscular preadipocyte 세포의 분리는 축산연구소에서 사육된 12개월령 한우 수컷의 등심 조직으로부터 Aso 등(1995)의 방법을 약간 변형하여 제조하였다. Intramuscular preadipocyte의 지방세포분화는 intramuscular preadipocyte를 4×10<sup>4</sup> cell/ml로 6cm dish에 접종하고 confluent하게 자라면 48시간 후에 33 μM biotin, 17 μM pantothenate, 1 mM carpylic acid, 200 μM ascorbic acid, 10 μg/ml insulin, 0.25 μM dexametason, 10 mM acetic acid, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methyl-antine을 포함하는 분화배지에서 12~18일간 배양하여 지방세포로 분화 유도하였으며, 분화배지는 2일 간격으로 새로운 배지로 교환하였다.

GLUT4의 발현을 확인하기 위하여 분화유도시킨 5×10<sup>6</sup>의 세포에 1ml의 Trizol Reagent (Gibco BRL, USA)을 넣고 Homogenizer한 후 사용설명서에 따라 Total RNA를 회수한 후 RNase-free water에 녹여 사용 전 까지 -70°C에 보존하였다. RT-PCR은 앞에서 설명한 GLUT4 cloning과 동일한 방법을 사용하여 수행하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 한우 GLUT4 유전자의 cloning

근육과 지방에 있어서 glucose의 세포내 수송

에 중요한 역할 수행하는 한우 GLUT4 유전자를 동정하기 위하여 12개월령 수컷 한우의 심장과 갈비살을 이용하여 total RNA를 제조하고 RT-PCR를 수행한 결과 그림 1에 나타난 바와 같이 약 1.5 kb의 band를 검출할 수 있었다. 이러한 결과는 Abe 등(1997)에 의하여 보고된 Holstein의 GLUT4(NCBI accession No. D63150)로부터 제조한 primer를 이용하여 RT-PCR를 수행한 결과 증폭될 수 있는 DNA 크기와 일치하였다. 본 연구에서 cloning된 한우 GLUT4 유전자의 염기배열을 결정한 결과 coding 영역은

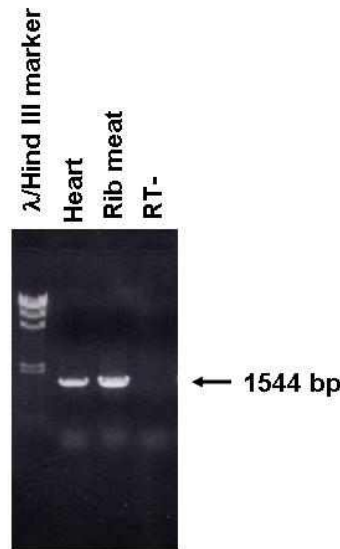


Fig. 1. RT-PCR of Hanwoo GLUT4 gene. Total RNA from Hanwoo tissues aged 12 months was isolated using TRI-zol Reagent. Synthesis of first strand cDNA was performed using Superscript II RNase H- reverse transcriptase (Invitrogen) with random primer and 5 μg of total RNA as template. PCR amplification was carried out with GLUT4 specific primer and Ex Taq polymerase (Takara). To ensure that PCR signals were not the result of contaminating genomic DNA, control samples (RT-) containing RNA, in which the reverse trascriptase was omitted from the step of cDNA synthesis, were run in parallel.

1527 bp 였으며, 509 개의 아미노산으로 구성되어 있었고 Holstein의 GLUT4와 99%의 상동성을 나타내었다(Fig. 2). Fig. 3은 한우 GLUT4 아미노산 염기서열을 Holstein, 사람, 생쥐와 비교한 결과를 나타내고 있다. 한우 GLUT4 아미노산 서열은 Holstein의 115번째 세린이 아스파라긴, 272번째 세린이 프롤린, 293번째 발린이 메티오닌, 349번째 히스티딘이 아르기닌, 362번째 알라닌이 글리신, 404번째 시스테인이 트립토판으로 차이를 보여 전체 98.2%의 상동성을 나타내었다. 그러나 이들 아미노산 중 사람과 설치류인 생쥐를 같이 비교하면 한우 특이적인 아미노산의 변이는 293번째 메티오닌으로 사람, 설치류, Holstein 모두에서는 발린이었다. 그리고 70번째의 글리신을 시작으로 114번째 페닐알라닌, 117번째 알라닌, 124번째 트레오닌, 130번째 리신, 144번째 페닐알라닌, 182번째 트레오닌, 208번째 이소류신, 217번째 메티오닌,

222번째 류신, 255번째 글루탐산, 262번째 글루탐산, 282번째 히스티딘, 289번째 발린, 291번째 이소류신, 320번째 글루탐산, 321번째 리신, 342번째 페닐알라닌, 482번째 발린, 508번째 히스티딘은 한우와 Hostein에서 동일하고 사람과 생쥐와는 차이를 보이는 아미노산으로 소 특이적이라고 할 수 있다. 그리고 한우 GLUT4는 아미노산에서 사람과 94.3%의 상동성을, 생쥐와는 93.5%의 상동성을 나타내었으며 이와 같은 차이는 사람과 생쥐의 상동성 95.2%와 별 차이가 없이 높은 상동성을 나타내었다. 이와 같은 결과는 이들 아미노산은 진화론적으로 매우 잘 보존되어왔다는 것을 나타내고 있다. 특히 한우 특이적인 차이를 보이는 293번째 메티오닌에 대한 부분은 polymorphism 차이를 보일 가능성이 있으므로 앞으로 개체 간 SNP 조사와 같은 연구가 진행되어야 할 부분으로 생각된다.

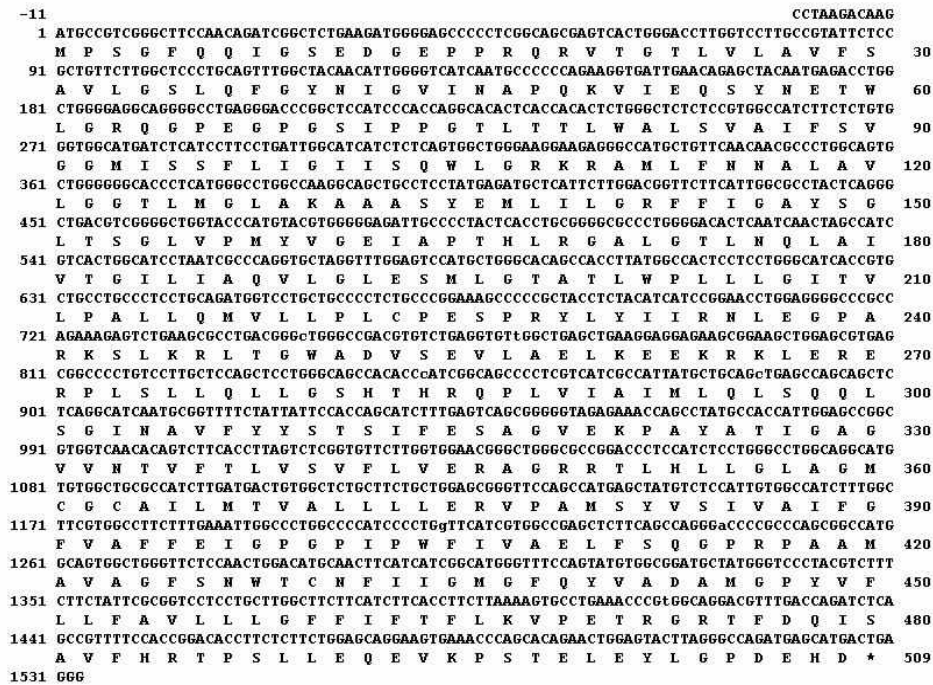


Fig. 2. Nucleotide and deduced amino acid sequences of Hanwoo GLUT4. Nucleotide residues are numbered on the left and amino acids are numbered on the right. Nuclotide 1 is the A of the initiator AUG codon of GLUT4. The in-frame translation termination codon at 1528 is indicated by asterisk. The Hanwoo GLUT4 cDNA includes a 1527-bp open reading frame encoding a protein of 509 amino acids.

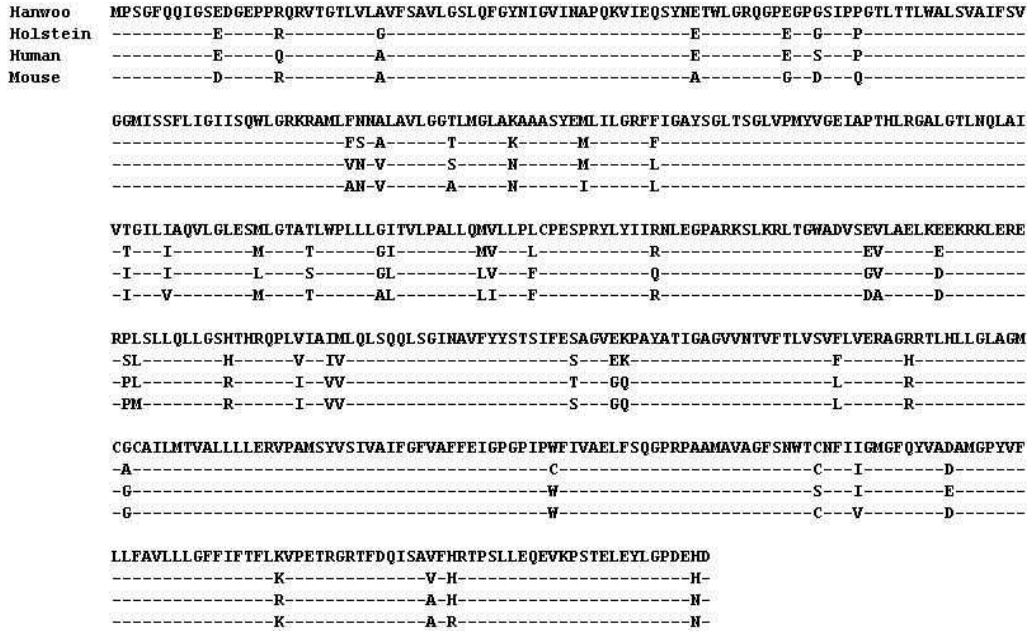


Fig. 3. The deduced amino acid sequence of Hanwoo GLUT4 was compared three mammalian species: Holstein (GenBank Accession NO. D63150), Human (GenBank Accession NO. M20747), and Mouse (GenBank Accession NO. AB008453). Identical amino acid residues are indicated by dashes.

2. 한우 GLUT4 유전자의 발현

한우 GLUT4 cDNA를 probe로 이용하여 12 개월령 수컷의 뇌, 심장, 간, 대장, 폐, 신장, 소장, 갈비, 등심, 신장지방에 있어서 mRNA의 발현을 northern blotting으로 분석하였다. 그 결과 그림 4에 나타낸바와 같이 한우에 있어서 GLUT4는 심장에서 높은 발현을 나타내었으며, 갈비, 등심, 대장에서 약한 발현을 확인할 수 있었다.

Kaestner 등(1989)은 생쥐에서 GLUT4는 골격근, 지방조직, 심장에서 발현하는 것으로 보고하였으며, 사람에서도 Fukumoto 등(1989)은 골격근과 피하지방에서 GLUT4 mRNA는 높게 발현하고 있는 것으로 보고하고 있다. Abe 등(1997)은 소의 GLUT4 유전자를 Holstein에서 동정하고 그 mRNA는 최장근, 네갈래근, 횡경막, 심장에서 높은 발현을 보이고 지방에서는 매우 미약한 발현을 보고하였다. 본 연구의 결과를 직접 비교하기는 어렵지만 본 연구에서는

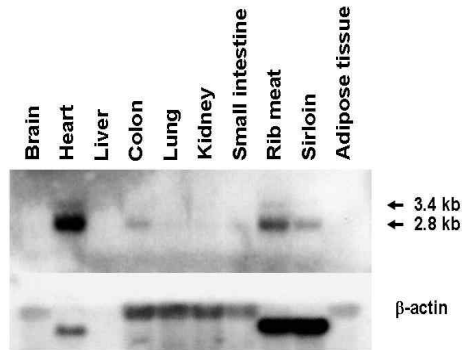


Fig. 4. Northern blot analysis of Hanwoo GLUT4 mRNA in various bovine tissues. Total RNA(20µg) prepared from the indicated bovine tissues was subjected to electrophoresis on a 1.5% agarose gel, blotted onto a zeta-probe membrane, and then hybridized with the <sup>32</sup>P-labeled 1.2kb fragment of Hanwoo GLUT4 cDNA. Control hybridization with a bovine beta-actin probe is shown in the lower portion.

지방조직에서 northern blotting으로 mRNA의 발현을 확인할 수 없었다. 그러나 지방조직에서의 GLUT4 발현은 사람보다 상대적으로 소에서 낮지만 발현하는 것으로 보고하고 있으므로 RT-PCR를 이용하여 한우 피하지방과 소장지방에서 그 발현을 확인하였다. 그 결과 그림 5에 나타낸바와 같이 피하지방과 소장지방에서 GLUT4 mRNA의 발현이 검출되었다. 이와 같은 결과는 northern blotting에 의하여 지방조직의 mRNA를 검출할 수 없었던 것은 그 발현이 미약하여 검출이 어려웠던 것으로 생각된다.

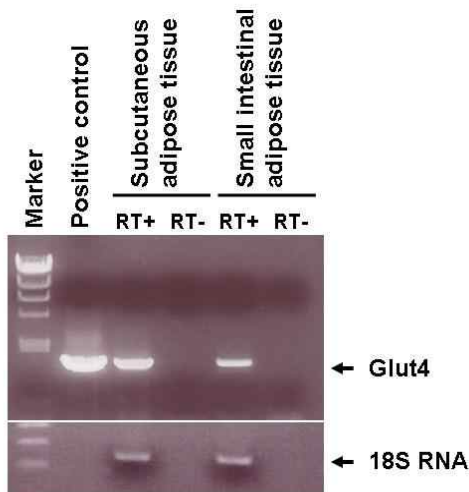


Fig. 5. Expression of Hanwoo GLUT4 in adipose tissues. The amounts of the Glut4 mRNAs were determined by RT-PCR in the Hanwoo subcutaneous and small intestinal adipose tissue. As controls, RT reaction minus the reverse transcriptase (RT-) were conducted for each mRNA sample, and PCR reaction using 18S RNA primers were performed on RT+ sample.

GLUT4의 중요한 기능은 인슐린 의존적으로 근육과 지방세포에서 세포막을 통해 포도당을 신속하게 운반하는 것이며(Watson 등, 2004) 이러한 GLUT4는 3T3-L1 지방전구세포가 지방세포로 분화하는 과정에 있어서 매우 급격하게 발현이 증가하는 것으로 보고하고 있다(Kaestner

등, 1989). 그러므로 한우 등심으로부터 제조한 intramuscular preadipocyte 세포가 insulin을 포함하는 지방세포 분화 배지에서 배양되었을 때 지방세포로 분화되는 과정에 있어서 GLUT4 mRNA의 발현을 RT-PCR로 확인하였다. 그 결과 그림 6에 나타낸 바와 같이 GLUT4 mRNA는 분화 전에는 높게 발현하고 있었으나 분화 유도 2일째부터 급격하게 발현이 줄어들었으며 분화가 진행됨에 따라 점차 줄어드는 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과는 설치류에서 GLUT4가 지방분화 과정에 있어서 그 발현이 증가한다는 것과는 반대적인 결과이다. 그러나 Aso 등 (1995)은 일본 화우로부터 제조한 intramuscular preadipocyte 세포를 이용하여 지방분화를 유도하고 GLUT4 단백질의 발현을 western blotting으로 분석한 결과 검출이 되지 않았다고 한다.

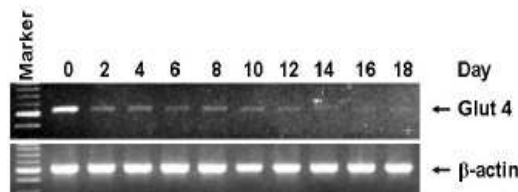


Fig. 6. Down-regulation of GLUT4 gene on intramuscular adipocyte differentiation. Total RNA was extracted from cells at the indicated times. RT-PCR was performed with a pair of bovine GLUT4 specific primers. PCR products were used for electrophoresis on 0.8% agarose gel to compare the relative signal intensity.

그리고 반대로 GLUT1의 발현은 지방분화 7일째에 13.5배의 발현 증가를 하였다고 보고하고 있으며 이와 같은 것은 반추동물과 비반추동물의 지방세포에 있어서 대사의 차이에 기인하는 것으로 보고하고 있다. 또한 반추 동물인 소의 지방조직에 있어서 지방산 합성에 대한 중요 전구체는 glucose보다 acetate인 것으로 보고되고 있으며(Whitehurst 등, 1978) 이와 같은 결과는 본 연구에서 지방분화 과정

에 있어서 GLUT4의 발현이 감소하는 것과 관계가 있을 가능성을 나타내고 있다. 최근 단위 동물인 돼지와 반추동물인 소의 골격근에 있어서 GLUT4의 기능을 연구한 Duhlmeier 등 (2005)은 GLUT1이 소의 골격근에 있어서는 당 수송체로서의 역할을 수행하며 인슐린 의존적 당수송체인 GLUT4의 기능은 결실되어 있는 것으로 보고하고 있다. 이와 같은 것은 반추동물과 비반추동물에 있어서 당수송에 대하여 다른 것을 추측할 수 있으며 앞으로 자세한 연구가 한우에서도 이루어져야 할 것으로 생각된다.

#### IV. 요약

세포 성장과 대사에 있어서 glucose의 세포내 도입은 대부분 동물세포에 필수적이며 이와 같은 도입은 glucose transport protein에 의하여 수행된다. glucose transport protein 중에 GLUT4는 사람과 설치류의 지방조직과 골격근에 있어서 인슐린 자극에 의하여 glucose를 세포내로 도입하는 중요한 역할을 수행한다. 본 연구에서는 한우로부터 이와 같은 GLUT4 유전자를 동정하고 그 발현을 조사하였다. 한우 GLUT4 유전자는 1527 bp의 open reading frame으로 구성되어 있으며 509개의 아미노산을 암호화하고 있었다. 그리고 한우 GLUT4 아미노산을 홀스타인, 사람, 생쥐와 비교한 결과 매우 높은 상동성을 나타내었다. 한우 각 조직에 있어서 GLUT4 mRNA의 발현을 확인한 결과 심장에서 가장 높은 발현을 나타내었으며 갈비, 등심, 대장에서는 낮은 발현을 보였다. 그리고 피하지방과 소장지방에서 GLUT4의 발현을 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행한 결과 지방조직에서도 발현을 확인할 수 있었다. 한우 intramuscular preadipocyte 세포가 지방세포로 분화하는 과정에 있어서 GLUT4의 발현을 RT-PCR로 확인한 결과 분화에 따라 점차 줄어드는 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과는 한우 지방조직에서의 GLUT4 기능은 사람과 생쥐에서의 기능과 다르다는 것을 나타낸다.

#### V. 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 지원에 의해 이루어진 것임.

Data deposition: The sequence reported in this paper has been deposited in the GenBank database(accession no. AY458600).

#### VI. 인용 문헌

1. Abe, H., Morimatsu, M., Nikami, H., Miyashige, T. and Saito, M. 1997. Molecular cloning and mRNA expression of the bovine insulin-responsive glucose transporter (GLUT4). *J. Anim. Sci.* 75:182-188.
2. Duhlmeier, R., Hacker, A., Widdel, A., von, Engelhardt, W. and Sallmann, H. P. 2005. Mechanisms of insulin-dependent glucose transport into porcine and bovine skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289: R187-197
3. Fukumoto, H., Kayano, T., Buse, J. B., Edwards, Y., Pilch, P. F., Bell, G. I. and Seino, S. 1989. Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues. *J. Biol. Chem.* 264:7776-7779.
4. Gould, G. W. and Holman, G. D. 1993. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem. J.* 295: 329-341.
5. Holman, G. D. and Kasuga, M. 1997. From receptor to transporter: insulin signalling to glucose transport. *Diabetologia.* 40:991-1003.
6. Kaestner, K. H., Christy, R. J., McLenithan, J. C., Braiterman, L. T., Cornelius, P., Pekala, P. H. and Lane, M. D. 1989. Sequence, tissue distribution, and differential expression of mRNA for a putative insulin-responsive glucose transporter in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86:3150-3154.
7. Smith, S. B. and Crouse, J. D. 1984. Relative contributions of acetate, lactate and glucose to lipogenesis in bovine intramuscular and subcutaneous adipose tissue. *J. Nutr.* 114:792-800.

8. Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. Molecular cloning: A Laboratory manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., U.S.A.
9. Whitehurst, G. B., Beitz, D. C., Pothoven, M. A., Ellison, W. R. and Crump, M. H. 1978. Lactate as a precursor of fatty acids in bovine adipose tissue. *J. Nutr.* 108:1806-1811.
10. Watson, R. T., Kanzaki, M. and Pessin, J. E. 2004. Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter 4 in adipocytes. *Endocr. Rev.* 25:177-204.  
(접수일자 : 2005. 8. 26. / 채택일자 : 2005. 11. 14.)