

한우 비육 전·후기의 등심조직에 있어서 지방합성 유전자 발현

이승환* · 박응우* · 조용민* · 김경훈* · 오영균* · 이지혜* · 이창수** · 오성종* · 윤두학*
 농촌진흥청 축산연구소*, 건국대학교 응용생화학과**

Lipogenesis Gene Expression Profiling in *Longissimus dorsi* on the Early and Late Fattening Stage of Hanwoo

S. H. Lee*, E. W. Park*, Y. M. Cho*, K. H. Kim*, Y. K. Oh*, J. H. Lee*, C. S. Lee**,
 S. J. Oh* and D. H. Yoon*

National Livestock Research Institute, Suwon, R.D.A.*,
 Department of Applied Biochemistry, Konkuk University**

ABSTRACT

Korean native cattle (Hanwoo) have a good capacity to produce heavily marbled meat of high value. The intramuscular fat in Hanwoo is known to be deposit from 12 months of age by degree of slightly visible and significantly developed in 28 months of age. Lipogenesis gene expression profiling in *longissimus dorsi* at early and late fattening stage will be helpful to understand the mechanism of intramuscular fat deposition in skeletal muscle. Therefore, we analysed the gene expression patterns of six genes related lipid metabolism (FABP4, GLUT4, LPL, ACC, ACL and SCD) between early and late fattening stage. The mRNA expression of FABP4 at late fattening stage (27 months old) was higher about 3.0 fold than at early fattening stage (12 months old) in each three individuals of Hanwoo. However, GLUT4 mRNA expression was not different at late fattening stage compared with at early fattening stage. On the other hand, The expression patterns of LPL, ACC, ACL and SCD genes related lipid metabolism were significantly over-expressed about 3.5 fold, 2.7 fold, 3.7 fold and 7.5 fold at late fattening stage, respectively. Thus, these results suggested that lipogenesis in skeletal muscle at late fattening stage is due to increasing uptake of fatty acid by FABP4 and lipogenesis gene expression such as LPL, ACC, ACL and SCD.

(Key words : *Longissimus dorsi*, Early and late fattening stage, Lipid metabolism, Gene expression)

I. 서론

쇠고기의 육질을 좌우하는 요인은 육색, 지방색, 조직감 및 상강도(마블링, 근내지방도) 등이 있으며, 이들 요인중 근육내 지방축적정도(근내지방도)는 쇠고기의 다즙성 및 연도에 영향을 미칠 뿐 아니라, 미국(USDA, 1989), 일본(JMGA, 1988) 및 한국에서 쇠고기의 등급을 결정하는 매우 중요한 요인중 하나이다. 따라서, 쇠고기의 근내지방도를 향상시키기 위하여 소

의 비육기간 연장 및 고에너지 사료급여프로그램과 같은 다양한 연구가 진행되고 있다(김 등, 2005). 그러나 이러한 방법으로 근내지방은 향상되었지만, 등지방 및 내장지방의 증가로 쇠고기 생산에 있어서 비효율적인 결과를 초래하고 있다. 따라서 근육내 지방특이적인 유전자 및 근육내 지방축적에 대한 생리·생화학적 메커니즘을 규명하기 위하여 Wang 등 (2005)은 육우중 근내지방축적능력이 가장 우수하다고 알려진 일본 흑모화우와 유우인 홀스타인종의 등심조직

Corresponding author : D. H. Yoon, Animal Genomics and Bioinformatics Division, National Livestock Research Institute, R.D.A., 564 Omokchun-dong Suwon 441-350, KOREA
 TEL : 031-290-1593, Fax : 031-290-1602, E-Mail : dhyoon@rda.go.kr

으로부터 근육내 지방합성에 특이적으로 차등 발현하는 유전자를 찾기 위하여 9.6K muscle/fat cDNA microarray를 이용하여 유전자 발현 profiling을 작성하였고, Childs 등(2002)은 앵거스와 헤어포드 교잡종을 대상으로 곡물사료(cereal grain)와 같은 고에너지 사료급여에 따른 근내지방 축적량을 3그룹으로 나누어 근내지방 조절인자(regulator)를 ddRT-PCR을 이용하여 탐색하였다. 이러한 근내지방특이적인 차등발현 유전자 탐색은 근육내 지방합성에 대한 생리·생화학적인 기작을 규명하는 것 외에 그 유전자내에 존재하는 SNP (single nucleotide polymorphism) 탐색을 통한 DNA marker 개발과 같은 산업화에 직접적으로 적용할 수 있다는 장점이 있다.

골격근(skeletal muscle)은 인슐린촉매에 의한 당(glucose) 소비 및 지방대사에 있어서 가장 중요한 조직이다. 최근, 사람에게 있어서 인슐린 유도 glucose 대사의 결함은 근육내 지방축적과 강한 상관관계가 있음이 보고되고 있다(Hegarty 등, 2003; Stannard와 Johnson, 2003). Randle 등 (1964)은 세포내 에너지원으로 사용되는 fatty acid와 glucose 사이의 관계를 설명하는 glucose-fatty acid cycle을 보고하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 glucose-fatty acid cycle에 따르

면, plasma fatty acid는 fatty acid binding protein (FABP)에 의해서 세포내로 유입이 되며, 이렇게 세포내로 유입된 유리지방산은 미토콘드리아에서 β -산화를 거치면서 acetyl-coA를 형성한다. 이 acetyl-coA는 근육내 citrate의 농도를 증가시키고, 증가된 citrate는 당대사의 중추인 해당과정을 조절하여 근육내 glucose-6-phosphate의 축적을 유도함으로써 Glucose transporter 4 (GLUT4)에 의한 glucose의 근육내 유입을 억제하게 된다 (Garland 등, 1964; Randle 등, 1963; 1964). 또한, 미토콘드리아내에서 β -산화를 거쳐 형성된 acetyl-coA는 근육내 지방합성의 전구물질로, acetyl-coA carboxylase에 의해서 malonyl-coA로 전환되며, fatty acid synthase에 의해서 긴 사슬 지방산형태의 palmitate를 합성한다. 이렇게 합성된 긴 사슬 지방산은 지방합성의 최종 단계인 stearoyl-CoA desaturase에 의해서 단일불포화 지방산으로 전환되어 중성지방형태로 근육 및 지방조직에 축적되어 진다(Sul과 Dong, 1998). 근육내 지방합성에 있어서, Fig. 1에서 보는 바와 같이, FABP4 (Gerbens 등, 1998), GLUT4 (Zorzano 등, 2005), Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) (Murray 등, 2000), ATP-citrate lyase (ACL) (Smith와 Prior, 1981), Lipoprotein lipase (LPL) (Eckel, 1989) 및 Stearoyl-CoA desaturase (SCD) (Taniguchi 등, 2004) 유전자는 지방합성의 주요 유전자로 지방축적의 표현형을 결정하는 매우 중요한 유전자들로 알려져 있다.

본 연구는 지방합성이 왕성하게 진행되는 비육후기의 근육내 지방산(fatty acid) 및 당(glucose)의 대사이용경로를 확인하고자 수행하였다. 특히, 이들 에너지원을 세포내로 전달하는 FABP4, GLUT4 및 근육내 지방합성의 주요 유전자 4개에 대하여 유전자 발현양상을 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시재료

본 연구에 사용된 조직시료는 축산연구소 영양생리과에서 2002년 4월부터 2004년 4월까지 사양 실험한 한우 중에서 선택하여, 도축 후

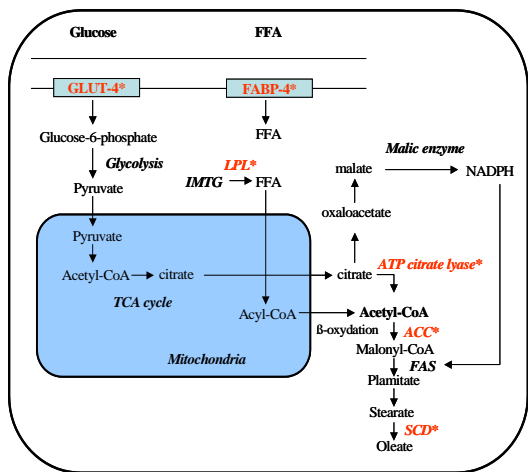


Fig. 1. Biochemical Lipogenesis Pathway for the potential mechanisms involved in the interaction between free fatty acid and carbohydrate metabolism (Sul과 Dong, 1998; Jeukendrup, 2002).

즉시 도체로부터 확보하였고, 확보된 조직은 곧바로 액체질소에서 동결하여 -70℃에 보관하면서 실험에 이용하였다.

2. total RNA 추출

한우 등심조직으로부터 total RNA분리는 Trizol (Life Science, Ltd. Co)을 이용하여 추출 하였다. 즉, 한우등심조직 0.2 g을 막자사발에 액체질소와 함께 잘 분쇄한다. 분쇄한 조직을 Trizol 1 ml 과 잘 혼합하여 500 µl씩을 1.5 ml microcentrifuge 튜브에 분주한 후 chloroform 100 µl를 첨가하여 5분간 교반한다. 그 후 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 생긴 상층액을 잘 분리하여 1.5 ml 튜브에 옮겨 동량의 isopropanol을 첨가하여 잘 섞어준 후 다시 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 pellet을 수집한다. 수집된 pellet을 70% 에탄올을 첨가하여 잘 세척하여 건조시킨 후 DEPC (0.1%)로 처리된 증류수 50 µl에 녹여 -70℃에 보관하였다.

3. 단일가닥 cDNA 합성

단일가닥 cDNA는 비육 전·후기의 한우 등심조직에서 추출한 total RNA를 이용하여 합성

하였다. 분리한 total RNA (5 µg)를 95℃에서 10분간 열변성시킨 후 즉시 얼음에서 급속 냉각하여, 5×완충용액(10 mM Tris-Cl, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂) 5 µl, 6 µg BSA, 10 mM DTT, random primer (400 pmol/µl) 1 µl와 Superscript II Reverse Transcriptase (100 U/µl) 1 µl를 첨가한 후, 전체의 양을 25 µl로 맞추어 42℃에서 1시간 동안 반응시킨 후 70℃에서 reverse transcriptase를 불활성화시킨 뒤 RT-PCR 반응에 사용하였다.

4. Real-time PCR용 primer 제작

Real-time PCR용 primer는 primer3 out program 을 이용하여 PCR 증폭산물이 150-250 bp가 되도록 제작하였으며, 대상유전자로는 FABP4(GenBank acc No NM 174314), GLUT4 (GenBank acc No AY458600), LPL (GenBank acc No XM 871618), ACC (GenBank acc No NM 174224), SCD (GenBank acc No NM173959), 및 ACL (GenBank acc No BC 108138)들의 유전자를 이용하였다. 이들 유전자의 염기서열은 NCBI GenBank 로부터 입수하였다. 또한 내부보정용 유전자로는 18S rRNA (GenBank acc No DQ222453)와 RPLP (GenBank acc No BC102074)를 사용하였다. Primer 서열은 표 1과 같다.

Table 1. Primer sequences of lipogenesis gene for the real-time PCR analysis

Primer Name	Primer Sequence (5' → 3')							
FABP4-F	CGT	GGG	CTT	TGC	TAC	CAG		
FABP4-R	TGG	TTG	ATT	TTC	CAT	CCC	AG	
GLUT4-F	GGT	GGC	ATG	ATC	TCA	TCC	TT	
GLUT4-R	AGG	AGG	AGT	GGC	CAT	AAG	GT	
ACC-F	ATG	GTC	TTT	GCC	AAC	TGG	AG	
ACC-R	TGA	TTT	CGA	CTG	TCC	CTT	CC	
LPL-F	TAC	CCT	GCC	TGA	AGT	TTC	CAC	
LPL-R	CCC	AGT	TTC	AGC	CAG	ACT	TTC	
ACL-F	CAG	GAC	ACT	GCA	GGA	GTC	AA	
ACL-R	CAA	ACA	CTC	CAG	CCT	CCT	TC	
SCD-F	CCA	GAG	GAG	GTA	CTA	CAA	ACC	TG
SCD-R	AGC	CAG	GTG	ACG	TTG	AGC		
RPLP-F	CAA	CCC	TGA	AGT	GCT	TGA	CAT	
RPLP-R	AGG	CAG	ATG	GAT	CAG	CCA		
18S-F	GTA	ACC	CGT	TGA	ACC	CCA	TT	
18S-R	CCA	TCC	AAT	CGG	TAG	TAG	CG	

5. 정량적 real-time PCR 분석

Real-time PCR은 QuantiTect SYBR Green primix (Qiagen) kit와 ABI 7500 system (ABI)을 이용하여 다음과 같이 수행하였다. 1st cDNA 5 µl (500 ng), 10 pmol/µl primer 각 1 µl, 2× QuantiTect SYBR Green 10 µl, 그리고 멸균 증류수로 전체 20 µl로 맞추어 반응을 수행하였다. PCR은 94 °C에서 15초, 중합반응은 58°C에서 25초, 그리고 합성반응은 72°C에서 20초간 하였고, 전체 40 cycle을 수행하였다. 유전자 발현의 상대적 정량은 ΔCt 값(시료의 Ct-18S RNA의 Ct값)을 계산하고, ΔΔCt 값(시료의 ΔCt 값-비교할 시료의 ΔCt 값)을 구하여 비교할 한우 비육전기 시료를 1로 보았을 때의 상대적 정량을 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 값으로 상대적 정량을 계산하였다. Ct 값은 threshold cycle로서 발현 peak가 형성되는 지점의 PCR cycle수로 나타낸다. 따라서 Ct 값이 클수록 발현량이 적음을 의미한다.

6. 통계분석

한우의 비육전·후기 등심조직의 유전자발현 양상에 대한 결과는 각 3회 반복을 실시하여 도출된 결과를 SAS program (V8.1)의 *t-test*를 이용하여 두 group 간의 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 값의 유의성을 검증하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 한우 비육 전·후기 지방산 및 당 운반관련 유전자 발현양상 분석

한우의 근내지방 축적에 따른 지방산 및 당의 이용성을 유전자 발현수준에서 확인하기 위해서 비육전기인 12개월령 한우 3두, 비육후기인 27개월령의 한우 3두씩으로부터 total RNA를 추출하여 근육내 지방합성에 있어서 주요 후보유전자로 알려진 6개의 유전자들의 발현양상을 real-time PCR로 분석하였다(Table 2, 3, Fig. 2). 먼저, 지방이 왕성하게 축적되는 비육후기에 있어서, 간으로부터 합성 및 사료로부터 흡수한 유리지방산을 근육 및 지방세포내로 이동시키는 adipocyte fatty acid binding protein (FABP4)과 glucose를 세포내로 이동시키는 glucose transporter 4 (GLUT4)의 유전자 발현양상을 분석하므로, 비육후기 에너지원 이용성을 분석하였다. Table 2 및 Table 3에서 보는바와 같이 FABP4 유전자는 비육전기에 비해 비육후기에 있어서, 3배 이상 유전자 발현이 증가함을 확인할 수 있었고, GLUT4 유전자는 비육전기 및 비육후기에 있어서 큰 차이를 보이지 않았다. 이는 비육후기에 양질의 고 에너지 농후사료를 급여함에도 근육 내 glucose 이용성에 있어서는 큰 차이를 보이지 않는 결과이다. 이러한 이유

Table 2. Quantification of lipogenesis gene expression using ΔΔCt relative quantification method

Gene Name	Group					
	Early Fattening Stage (n=3)			Late Fattening Stage (n=3)		
	Ct	ΔCt	ΔΔCt	Ct	ΔCt	ΔΔCt
FABP4	21.83 ± 1.16	7.48 ± 0.65	0	19.10 ± 1.6	5.95 ± 1.12	-1.53*
LPL	21.28 ± 0.93	6.93 ± 0.7	0	18.71 ± 0.77	5.56 ± 0.1	-1.37*
SCD	20.18 ± 1.17	5.83 ± 0.79	0	16.06 ± 0.7	2.91 ± 0.26	-2.92*
ACC	22.65 ± 1.1	8.3 ± 0.7	0	21.21 ± 0.89	7.02 ± 0.21	-1.28*
18S RNA	14.35 ± 0.64	-	-	13.15 ± 0.88	-	-

Data are shown as mean ± SD of three individual samples. The relative quantification of gene expression was performed using the ΔΔCt method. The Ct value is the threshold cycle number. The ΔCt value = target gene Ct-18S ribosomal Ct; the ΔΔCt value = ΔCt value of a 27-month-old steer-ΔCt value of a 12-month-old steer. The fold difference in the relative gene expression of the target was calculated as the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ value.

* indicates significantly different from the respectively early fattening stage at P<0.05.

Table 3. Quantification of GLUT4 and ACL gene expression using $\Delta\Delta Ct$ relative quantification method

Gene Name	Group					
	Early Fattening Stage (n=3)			Late Fattening Stage (n=3)		
	Ct	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	Ct	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$
GLUT4	21.3 ± 1.2	1.4 ± 0.72	0	21.7 ± 0.47	1.45±0.39	0.05
ACL	25.98 ± 0.9	6.08 ± 0.36	0	24.41 ± 1.2	4.16±0.38	-1.92*
RPLP	19.9 ± 0.58	-	-	20.25 ± 0.37	-	-

Data are shown as mean±SD of three individual samples. The relative quantification of gene expression was performed using the $\Delta\Delta Ct$ method. The Ct value is the threshold cycle number. The ΔCt value = target gene Ct - 18S ribosomal Ct; the $\Delta\Delta Ct$ value = ΔCt value of a 27-month-old steer - ΔCt value of a 12-month-old steer. The fold difference in the relative gene expression of the target was calculated as the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ value.

* indicates significantly different from the respectively early fattening stage at $P < 0.05$.

로 사람에게 있어서, Kraegen과 Cooney (1999)는 세포내 유리지방산의 농도가 높아지면 인슐린유도 glucose 흡수율이 떨어진다고 보고하였다. 이와 반대로, Kiens (1998)와 Coyle 등(2001)은 고에너지 탄수화물 식이가 근육내 intramuscular fat의 축적을 억제하는 효과가 있다고 보고하고 있다. 이러한 결과를 통하여 볼 때, 한우에 있어서 비육후기 근육 내 지방합성의 주요에너지 원으로는 glucose 보다는 지방산을 주로 이용하는 것을 알 수 있으며, 지방산 및 당은 에너지 대사에 있어서 서로 상호 억제의 효과를 가지고 있는 것으로 사료된다.

2. 한우 비육 전·후기 근육내 지방합성관련 유전자 발현양상 분석

FABP4 및 GLUT4에 의해서 세포내로 유입된 지방산 및 당을 이용하여 acetyl-CoA를 합성하고, 이를 이용하여 긴 사슬 지방산을 합성하는데 관여하는 ATP-citrate lyase (ACL), acetyl-CoA carboxylase (ACC), lipoprotein lipase (LPL) 및 stearoyl-CoA desaturase (SCD) 유전자에 대해서, 비육 전·후기 유전자발현차이를 분석한 결과, ACL 유전자는 비육전기에 비해, 비육후기에 있어서 3.7배 증가하였고, LPL 유전자는 3.5배, ACC 유전자는 2.7배 그리고, SCD 유전자는 7.5배 정도 발현양이 증가하였다(Fig 2).

ATP-citrate lyase (ACL)는 콜레스테롤이나 중성지방합성에 있어서 중요한 building block인

acetyl-CoA를 합성하는 매우 중요한 효소이며, 최근 이 유전자는 hyperglycemia 및 비만치료에 있어서 집중적으로 연구가 진행되고 있다(Beigneux 등, 2004). Childs 등(2002)은 ATP-citrate lyase 유전자는 더 어리고, 지방이 없는 개체보다 연령이 들고, 지방이 많이 있는 개체에서 발현량이 증가함을 보고하였고, Smith 등 (1984)은 고에너지 급여 및 연령이 증가하면서 ACL 유전자의 효소활성이 10배 이상 증가하였다고 보고하였다. 따라서, 본 연구에서 ACL 유전자 발현양상의 증가는 고에너지 급여 및 성장에 따른 효과임을 알 수 있었고, ACL 유전자의 발현량증가로 인한, 세포내 acetyl-CoA 량의 증가가, 전

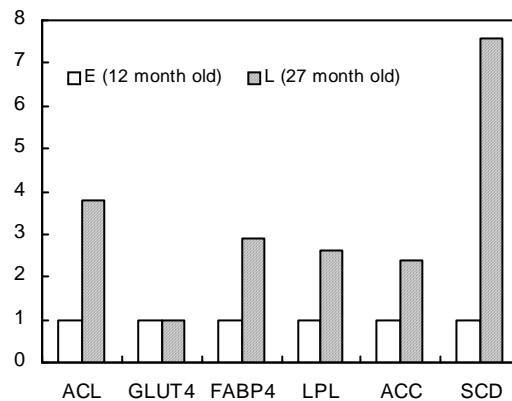


Fig. 2. Quantification of mRNA level for lipogenesis in Longissimus dorsi. The expression of lipogenesis gene was quantified by the $\Delta\Delta Ct$ relative quantification method.

체 지방생합성을 촉진함으로써 비육후기 지방량의 증가에 직접적으로 연관이 있는 주요 유전자임을 알 수 있었다.

Acetyl-CoA carboxylase (ACC) 유전자는 근육내 지방생합성(*de novo lipogenesis*)에 있어서 중간대사산물인 acetyl-CoA를 카르복실화 시켜 malonyl-CoA로 전환시키며, 지방합성율을 조절하는 주요 효소로 알려지고 있다(Murray 등, 2000). ACC 유전자는 동물의 영양섭취에 따라 매우 민감하게 반응하는 것으로 알려지고 있다. 특히, 마우스를 이용한 실험에서 절식 후 고당질식으로 지방합성을 유도하였을 때 ACC 효소 활성도가 높아진다고 보고하고 있다(Evans와 Witters, 1988). 그러나 다중불포화지방산의 경우 ACC를 포함한 지방합성유전자의 발현을 감소한다고 보고되고 있다(Cheema와 Clandinin, 1996). 따라서, ACC 유전자는 영양물질에 의해서 mRNA 발현양상이 촉진 혹은 저해됨을 알 수 있었다. 본 연구결과에 있어서, 비육후기 FABP4에 의해 세포내로 유입된 유리지방산이 미토콘드리아에서 β -산화를 거치면서 생성된 acetyl-CoA가 ACC mRNA의 발현을 증가하는 것으로 사료된다.

Stearoyl-CoA desaturase (SCD) 유전자는 고등동물에서 불포화지방산의 합성과정을 조절하는 주요 효소이다. SCD 효소는 palmitic acid (16:0)와 stearic acid (18:0)를 기질로 하여 palmitoleic acid (16:1)와 oleic acid (18:1)를 합성한다. Palmitoleic acid (16:1)와 oleic acid (18:1)는 대표적인 저장형태의 지방인 triglyceride의 주요 구성성분으로 전체 불포화지방산 중 58%를 차지하는 중요한 지방산이다(Kaestner 등, 1989). 따라서 한우 비육후기에서 비육전기에 비해 7.5배 SCD 유전자의 발현이 증가한 것은, 비육후기에 급격하게 지방축적이 증가하였기 때문임을 알 수 있었다. Lee 등 (2005)은 한우성장단계별 지방산 조성 및 SCD mRNA 발현양상과의 관련성분석 연구에서 SCD mRNA 발현량은 근내지방이 축적되기 시작하는 12개월령부터 증가하기 시작하여 18, 24개월령까지 꾸준히 증가하며, 이에 따라서 oleic acid와 같은 단일불포화지방산도 함께 증가하는 양상을 보고하였다. 따라서

비육후기 SCD 유전자의 발현은 근육내 축적되는 중성지방(triglyceride)을 구성하는 전체 지방산의 60% 정도가 SCD 유전자에 의해 합성되는 불포화지방산이기 때문임을 알 수 있었다. 쇠고기내의 oleic acid (18:1)는 품종에 따라 차이가 확연하고 지방 품질 및 쇠고기의 기호성을 결정하는 주요한 요인이 된다고 보고되고 있다(Yoshimura와 Namikawa, 1983). 또한, Taniguchi 등 (2004)은 일본흑모화우에서 SCD 유전자의 엑손 5번에 위치한 SNP가 아미노산의 변이(발린 → 알라닌)를 일으키며, 알라닌형과 발린형을 지방산 조성과의 관련성 분석을 실시한 결과, 알라닌형이 단일불포화지방산의 조성과의 밀접한 관련이 있음을 보고하였다. 이러한 결과를 통하여 볼 때 SCD 유전자는 근내지방축적 뿐 아니라, 축적된 지방의 품질을 결정하는 지방산 조성에도 밀접한 관련이 있음을 알 수 있다.

Lipoprotein Lipase (LPL) 유전자는 지단백질 복합체인 chylomicron을 monoacylglycerol과 유리지방산으로 가수분해하는 주된 효소이며, LPL에 의해 가수분해되어 생성된 유리지방산은 지방세포로 흡수되어 지방합성을 위해 사용되어 지거나, 지방세포에 들어온 후 re-esterification 되어 중성지방형태로 저장되고 심장이나 근육으로 흡수되어 에너지원으로도 이용되어진다(Eckel, 1989). 즉, 간조직으로부터 합성된 지방산들이 지단백질복합체를 형성하여 혈액을 통하여 순환하다가 LPL에 의해서 가수분해되어 표적조직으로 흡수되어 이용되어진다. 최근 한우에 있어서, 이 등(2004)은 한우 lipoprotein lipase 유전자의 전 영역으로부터 SNP를 탐색하였으며, 이중 Intron 5번에 위치한 SNP가 한우 근내지방도와 통계적 유의차를 가지고 있음을 보고하였다. 따라서 본 연구를 통해, 비육후기 LPL 유전자의 발현량의 증가는 혈중 지단백질복합체로부터 유리지방산 분해를 촉진하고, 이들 유리지방산은 FABP4에 의해서 세포내로 유입된다고 사료된다.

본 연구를 통하여 FABP4, ACL, ACC, LPL 및 SCD 유전자는 비육후기 근육내 지방량이 증가하는 시기에 발현이 증가함을 알 수 있었다. 향후, 이러한 유전자 발현을 촉진하는 전사

조절인자, 영양물질 등과의 상호작용 및 이들 유전자의 전사조절영역에 대한 구조변이 연구를 통하여 유전자발현 조절에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

IV. 요약

지방합성이 왕성하게 진행되는 비육후기의 근육내 지방합성에 있어서, 지방산 및 당의 이용경로 및 이에 따른 근육내 지방합성과정을 규명하기 위해서 지방산 및 당 운반 유전자인 FABP4, GLUT4와 근육내 지방대사 주요 유전자인 ACL, ACC, LPL 및 SCD 유전자의 mRNA 발현양상을 분석하였다. 한우 비육전기 및 후기 각 3두를 공시하여 total RNA 추출 및 1st cDNA 합성하여 SYBR green을 이용하여 real-time PCR 분석을 각 유전자별로 3반복씩 수행하였다. FABP4 유전자는 비육전기에 비해 비육후기에 있어서, 3배 이상 유전자 발현이 증가함을 확인할 수 있었고, GLUT4 유전자는 비육전기 및 비육후기에서 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 근육내 지방합성 주요유전자인 ACL, ACC, LPL 및 SCD 유전자의 발현량은 비육후기에서 ACL 유전자가 3.8배, ACC 유전자는 2.7배, LPL 유전자는 3.5배, 그리고 SCD 유전자는 7.5배 발현량이 증가하였다. 따라서 본 연구를 통하여 한우의 비육후기에서 근육내 지방합성은 FABP4에 의한 지방산 유입의 증가와 더불어 ACL 유전자에 의해서 지방산 합성의 중간대사물인 acetyl-CoA가 합성되고, 이 중간 대사물을 이용하여 ACC 및 SCD 유전자에 의해서 긴 사슬 지방산 합성이 왕성하게 일어남을 알 수 있었다.

V. 인용 문헌

1. Beigneux, A. P., Kosinski, C., Gavino, B., Horton, J. D., Skarnes, W. C. and Young, S. G. 2004. ATP-citrate lyase deficiency in the mouse. *J. Biol. Chem.* 279:9557-9564.
2. Cheema, S. K. and Clandinin, M. T. 1996. Fat alters expression of genes for enzymes of lipogenesis in lean and obese mice. *Biochim. Biophys. Acta.* 1299:284-288.
3. Childs, K. D., Goad, D. W., Allan, M. F., Pomp, D., Krehbiel, C., Geisert, R. D., Morgan, JB., and Malayer, JR. 2002. Differential expression of NAT1 translational repressor during development of bovine intramuscular adipocytes. *Physiol. Genomics.* 10:49-56.
4. Coyle, E. F., Jeukendrup, A. E., Oseto, M. C., Hodgkinson, B. J. and Zderic, T. W. 2001. Low-fat diet alters intramuscular substrates and reduces lipolysis and fat oxidation during exercise. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280: E391-E398.
5. Eckel, R. H. 1989. Lipoprotein lipase. A Multifunctional Enzyme Relevant to Common Metabolic Diseases. *New Eng. J. Med.* 320:1060-1068.
6. Evans, JL and Witters, LA. 1988. Quantitation by immunoblotting of the *in vivo* induction and subcellular distribution of hepatic acetyl-CoA carboxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 264:103-113.
7. Garland, P. B., Newsholme, E. A. and Randle, P. J. 1964. Regulation of glucose uptake by muscle: effect of fatty acid and ketone bodies, and of alloxan-diabetes and stavation, on pyruvate metabolism and on lactate/pyruvate and L-glycerol 3-phosphate/dihydroxyacetone phosphate concentration ratios in rat heart and rat diaphragm muscle. *Biochem. J.* 93:665-678.
8. Gerbens, F., Jansen, A., Anton, J. M., Harders, F., Meuwissen, T. H. E., Rettenberger, G., Veerkamp, J. H. and te Pas, M. F. W. 1998. The adipocyte fatty acid-binding protein locus: characterization and association with intramuscular fat content in pigs. *J. Anim. Sci.* 9:1022-1026.
9. Hegarty, B. D., Furler, S. M., Ye, J., Cooney, G. J. and Kraegen, E. W. 2003. The role of intramuscular lipid in insulin resistance. *Acta. Physiol. Scand.* 178:373-383.
10. Jeukendrup, A. E. 2002. Regulation of fat metabolism in skeletal muscle. *Ann. N Y Acad. Sci.* 967:217-235.
11. JMGA. 1988. New beef carcass grading standards.

- Japan Meat Grading Association, Tokyo, Japan.
12. Kaestner, K. H., Ntambi, J. M., Kelly, T. J. and Lane, M. D. 1989. Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. A second differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase. *J. Biol. Chem.* 264:14755-14761.
 13. Kiens, B. 1998. Utilization of skeletal muscle triacylglycerol during postexercise recovery in human. *Am. J. Physiol.* 275:E332-E337.
 14. Kraegen, E. W. and Cooney, G. J. 1999. The role of free fatty acids in muscle insulin resistance. *Diabetes Ann.* 12:141-159.
 15. Lee, S. H., Yoon, D. H., Choi, N. J., Hwang, S. H., Cheong, E. Y., Oh, S. J., Cheong, L. C and Lee, C. S. 2005. Developmental Relationship of Unsaturated fatty acid composition and stearoyl-coA desaturase mRNA level in Hanwoo steers muscle. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 18:562-566.
 16. Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A and Rodwell, V. W. 2000. Biosynthesis of fatty acids. In Harper's Biochemistry 25ed. Prentice-Hall, NJ 230-237.
 17. Randle, P. J., Hales, C. N., Garland, P. B. and Newsholme, E. A. 1963. The glucose-fatty acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1:785-789.
 18. Randle, P. J., Newsholme, E. A. and Garland, P. B. 1964. Regulation of glucose uptake by muscle: 8. effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate and of alloxandibete and starvation on the uptake and metabolic fate of glucose in rat heart and diaphragm muscles. *Biochem. J.* 93:652-665.
 19. Smith, S. and Prior, R. 1981. Evidence for a functional ATP-citrate lyase:NADP-malate dehydrogenase pathway in bovine adipose tissue: enzyme and metabolite levels. *Arch Biochem. Biophys.* 211:192-201.
 20. Smith, S. B., Prior, R. L., Ferrell, C. L. and Mersmann, H. J. 1984. Interrelationships among diet, age, fat deposition and lipid metabolism in growing steers. *J. Nutr.* 114:153-162.
 21. Stannard, S. R. and Johnson, N. A. 2003. Insulin resistance and elevated triglyceride in muscle: more important for survival than thrifty genes ?. *J. Physiol.* 554:595-607.
 22. Sul, H. S. and Dong, W. 1998. Nutritional and hormonal regulation of enzymes in fat synthesis: studies of fatty acid synthase and mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase gene transcription. *Annu. Rev. Nutr.* 18:331-351.
 23. Taniguchi, M., Utsugi, T., Oyama, K., Mannen, H., Kobayashi, M., Tanabe, Y., Ogino, A. and Tsuji, S. 2004. Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acid composition in japanese black cattle. *Mamm. Genome* 14:142-148.
 24. USDA. 1989. Official united states standards for grades of beef carcasses. Agric. Marketing Serv. USDA, Washington, DC
 25. Wang, Y. H., Byrne, K. A., Reverter, A., Harper, G. S., Taniguchi, M., McWilliam, S. M., Mannen, H., Oyama, K. and Lehnert, S. A. 2005. Transcriptional profiling of skeletal muscle tissue from two breeds of cattle. *Mamm. Genome* 16: 201-210.
 26. Yoshimura, T. and Namikawa, K. 1983. Influence of breed, sex and anatomical location on lipid and fatty acid composition of bovine subcutaneous fat. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 54:97-100.
 27. Zorzano, A., Palacin, M. and Guma, A. 2005. Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. *Acta. Physiol. Scand.* 183:43-58.
 28. 김경훈, 이주환, 오영균, 강수원, 이상철, 박웅렬, 고영두. 2005. 거세한우에 있어서 배합사료의 적정 TDN 수준과 도축 월령. *한국동물자원과학회지.* 47(5) 731-744.
 29. 이한주, 이승환, 조용민, 윤호백, 전봉균, 오성중, 권무식, 윤두학. 2004. 한우 Lipoprotein lipase 유전자 intron 5번의 polymorphism과 경제 형질과의 관련성 분석. *한국동물자원과학회지.* 46(6) 947-956.
- (접수일자 : 2006. 3. 27. / 채택일자 : 2006. 6. 19.)