

유전자변형 배추를 섭취한 마우스 장기에서의 Housekeeping Gene의 발현 분석

이동엽 · 허진철 · 김경해 · 한송이 · 조현석¹ · 이상한[†]

경북대학교 식품공학과

¹농업생명공학연구원 생물안전성과

Analysis of Housekeeping Gene Expression in Mice Administered to GM and non-GM Cabbage

Dong-Youb Lee, Jin-Chul Heo, Kyung-Hae Kim, Song-Yi Han,
Hyun-Seok Cho¹ and Sang-Han Lee[†]

Department of Food Science & Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

¹National Institute of Agricultural Biotechnology, RDA, Suwon 441-707, Korea

Abstract

We used RT-PCR to measure housekeeping gene expression in mice fed GM and non-GM cabbage, in an effort to evaluate the risk of GM food to humans. After normalization of housekeeping gene levels, highly uniform expression may be seen in many organisms during various stages of development and under different environmental conditions. We assessed the expression of four genes in Chinese cabbage; these were Profilin, Tubulin-alpha (Tub-1), Heat-shock protein (Bchsp17.6), and Ubiquitin conjugating enzyme (UBE). We measured the expression of four well-known housekeeping genes in mice: β -actin (β -act), β -2-microglobulin (B2m), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and β -glucuronidase (Gus). Gene expression was measured in liver, stomach, small intestine, large intestine, kidney, and spleen of mice fed GM or non-GM cabbage. No significant expression differences were found.

Key words : genetically modified, cabbage, housekeeping gene, RT-PCR

서 론

유전자의 발현 패턴에 따른 변화는 세포의 기능을 결정하는 중요한 요소이다. 대부분의 경우 이러한 발현의 차이는 세포의 역할과 성격을 결정하게 되는 것으로 알려져 있다. 세포내 신호전달 과정 중에 많은 부분이 유전자의 발현에 의해 좌우되고 있는 것으로 판단하여 볼 때 유전자의 발현 패턴은 세포, 조직, 기관으로 구성되어지는 생물체에서 생존에 매우 중요한 요인이다. 특히 비정상적인 세포에서의 유전자의 발현의 차이는 많은 문제점을 야기하게 되는데 가장 대표적인 것 중의 하나가 oncogene에 의한 암이라고 할 수 있다(1, 2). 정상세포와 그렇지 않은 세포의 유전자의 발현에 대한 차이는 크게 내부적인 요인과 외부적인 요인으로 구분할 수 있다. 내부적으로는 유전적인 요인

을 들 수 있는데, 이미 프로그램 되어 있는 세포내에서 유전자의 발현이 비정상적으로 발현하는 경우를 볼 수 있는데 이는 많은 경우 개체의 다양성에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다. 외부적인 요인으로는 환경의 영향을 들 수 있다. 과거와 다른 환경 즉 대기, 수질, 음식 등에 의해 개체가 적응을 하는 과정에서의 변화에 의해 유전자의 발현에 영향을 받는 것인데, 유전자의 정상적인 발현패턴은 세포의 기능과 목적에 맞는 발현을 말하는 것이며, 내·외부적인 요인에 의해 발현에 변화를 가지게 되면 많은 경우 암과 같은 비정상적인 세포로 될 수 있는 가능성을 가지고 있다. 최근 생명공학기술의 발달은 이러한 유전자의 발현을 인위적으로 조절하여 그 목적에 맞게 사용하고자 하는데 있다(3).

GM 작물은 초기 생산량 증대라는 목적으로 많은 농산물을 획득하기 위하여 환경이나 병해충 등에 견딜 수 있는 작물을 개발하는 것으로 시작이 되었다(4, 5). 이들 작물의 가장 큰 특징은 외부자극에 대한 방어력을 기지기 위하여

[†]Corresponding author. E-mail : sang@knu.ac.kr,
Phone : 82-53-950-7754, Fax : 82-53-950-6772

동종 혹은 타종의 적절한 유전자를 인위적으로 발현함으로써 그 기능을 수행하게 된다. 하지만 많은 경우 유전자의 발현은 아주 복잡한 네트워크(network) 시스템을 가지고 있어서 하나의 유전자가 다른 유전자의 발현과 억제에 영향을 주는 경우가 많이 있다. GM 작물의 경우 도입된 유전자에 의해 다른 유전자의 발현에 영향을 받을 수 있게 됨으로 정상적이지 않은 유전자의 발현을 유도할 가능성을 가지게 된다. 이는 작물 뿐 아니라 이를 섭취하는 생물체에 있어서도 의도하지 않은 유전자의 발현을 유도 할 수 있는 것으로 알려져 있으며, 잠재적으로 안전성에 문제를 야기 할 수도 있다(6).

해충에 대한 농작물의 손실을 줄이기 위하여 곤충저항성을 가지는 단백질인 *Bacillus thuringiensis* toxin이 작물로 도입되어 많이 쓰이고 있다. 이는 상품의 품질과 생산의 효율적인 증가를 기대할 수 있는데 이미 면화, 옥수수 등의 여러 종의 작물에 이용되어지고 있다. 작용기작으로는 곤충류의 중장상피에 대한 삼투압의 변화를 일으켜 결국에는 세포를 녹여 죽게 만드는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(7).

본 연구는 이러한 GM 작물의 안전성 측면에서 해충저항성 유전자를 도입한 배추(*Brassica campestris*)에서 저항성 유전자가 직간접으로 미치는 이외의 다른 유전자의 발현을 확인 해 보았으며, 이를 섭취한 마우스의 장기에서 housekeeping gene의 발현을 RT-PCR을 통하여 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

GM과 non-GM배추 입수

실험에 사용한 형질전환 된 배추(*Brassica campestris*)는 곤충저항성 유전자(cry1A)가 형질전환 되어있는 배추와 그렇지 않은 배추를 농촌진흥청 생물안전성연구실에서 입수 하여 실험에 사용하였다.

GM/non-GM 작물을 이용한 사료 제작 및 마우스 사육

수확된 배추는 분쇄기를 이용하여 곱게 같은 다음 마우스 사료와 1:1의 비율로 배합하여 물과 섞어 사료와 동일한 모양을 만들었다. 마우스 (3 mouse/cage)는 BALB/c 5-6주령을 사용 하였으며, 경북대학교 농과대학 마우스 사육시설에서 사육을 하였다. 배추를 이용하여 만든 사료는 일반사료와 구별하여 마우스에 섭취도록 하였으며, 30일간 사육하였다.

Gene expression 측정

작물에서의 RNA 분리과정은 유전자 도입한 배추와 그렇지 않은 배추를 각각 3개체를 실험실로 운반하여 이들의

있을 각각 액체질소를 이용하여 냉동상태에서 분쇄한 후, Tri-Reagent (MRC, USA)를 이용하여 RNA 추출 과정을 거쳤다. 마우스에서의 RNA 분리는 각 장기별로 housekeeping gene의 변화정도를 확인하였다. 장기 적출은 마취 후 복강을 절개 후 간, 위, 소장, 대장, 신장의 순으로 적출 하였다. 적출된 장기는 액체질소를 이용하여 급속 동결을 하였으며, 동결 후 -70°C에 보관 후 RNA 분리를 실시하였다. 동결된 조직을 막자사발을 이용하여 미세하게 분쇄한 후, Tri-Reagent (MRC, USA)를 이용하여 RNA를 획득하였다. 작물 및 마우스의 장기에서 획득된 RNA는 RT kit (Intron, Korea)을 이용하여 reverse transcription 반응을 실시하였으며, PCR 반응 조건은 94°C (30"), 55°C (30"), 72°C (30")의 조건으로 32 cycle을 실시하였다. PCR primer로는 배추의 경우 Profilin, Tubulin- α (Tub- α 1), Heat-shock protein (Bchsp17.6), Ubiquitin conjugating enzyme (UBE) 등 4 종을 사용하였다(Table 1). 마우스의 경우는 housekeeping gene을 이용하였는데 사용된 primer로는 β -actin (β -act), β -2-microglobulin (B2m), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), β -glucuronidase (Gus) 등 4 종을 사용하였다(Table 2). 유전자 발현 정도의 차이는 gel-doc program (Bio-rad, Italy)을 이용하여 band density를 측정하였으며, PCR이 안된 경우는 분석대상에서 제외하였으며, 통계는 엑셀 프로그램을 이용하여 분석 하였다.

Table 1. Housekeeping genes in *Brassica campestris* and their primer sequences used for RT-PCR analysis

No	Gene Name	Expected size (bp)	Gene Symbol	Primer F/R	GenBank Accession #
1	Profilin	405	Profilin	CAT GAC GGT AGT GTT TGG GC TAT GCC TCC TGC TCC CTT CT	EF492988
2	Tubulin alpha	1630	Tub- α 1	GAT CCA CAT CGG TCA AGC TG CAA GAC CAG ACC CAG TCC CT	D0414688
3	Heat-shock protein	782	Bchsp1 7.6	ACA AAC GCG AAA GTG GAC TG ACC TCA GGC TTC CTC TCA GC	AF02217
4	Ubiquitin conjugating enzyme	459	UBE	ATG ATA CCC CTT GGG ATG GA TGT TCC ACA ACC TCA CGG AC	EF079956

Table 2. Expression of housekeeping genes in mice and their primer sequences used for RT-PCR analysis

No	Gene Name	Expected size (bp)	Gene Symbol	Primer F/R	GenBank Accession #
1	β -actin	334	β -act	ACT GGG ACG ACA TGG AGA AG TCT CAG CTG TGG TGA AG	NM_007393
2	β -2-microglobulin	330	B2m	TGG TGC TTG TCT CAC TGA CC ACA TGT CTC GAT CCC AGT AGA C	NM_009795
3	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	370	GAPDH	ACT CCA CTC ACG GCA AAT TC CCT TCC ACA ATG CCA AAG TT	NM_005084
4	β -glucuronidase	367	Gus	TCA GCT CTG TGA CCG ATA CG TTC AGC TGT GGC TGA ATC AC	NM_010368

결과 및 고찰

GM 작물을 섭취한 경우 혹은 이를 이용하는 사료를 먹은 가축들의 경우 도입된 유전자에 의하여 다른 유전자의 발현을 유도 혹은 감소시키는 등의 영향을 나타낼 수 있는데 이는 세포나 조직에 많은 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (6). 이는 GM 작물을 섭취한 가축에서의 각종 장기에서

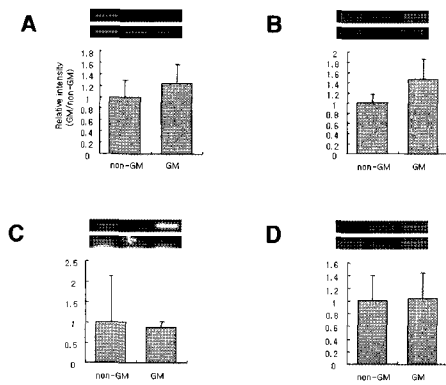


Fig. 1. Patterns of housekeeping gene expression in GM and non-GM chinese cabbage, and densitometric analysis by RT-PCR (A, Profillin; B, Tubulin- α ; C, Heat-shock protein; D, Ubiquitin conjugating enzyme).

이들의 발현 정도를 확인 하였으며, 또한 이를 섭취한 마우스의 주요 장기에서 housekeeping gene의 발현 정도를 RT-PCR을 통하여 알아보았다. 저항성 유전자를 이입한 GM 배추와 non-GM 배추의 Profillin, Tubulin α , Heat-shock protein, Ubiquitin conjugating enzyme 등 4종의 유전자 발현 패턴을 확인 해 본 결과 두 그룹 간의 발현의 차이는 크게 나타나지 않았다(Fig. 1).

GM 배추와 non-GM 배추를 사료로 만들어 이를 섭취한 마우스의 각 장기에서의 housekeeping gene의 발현 패턴을 알아보았다. Housekeeping gene인 β -actin (β -act), β -2-microglobulin (B2m), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), β -glucuronidase (Gus) 등 4종에 대한 각 장기별 발현을 알아본 결과 간(liver), 대장(large intestine)의 경우

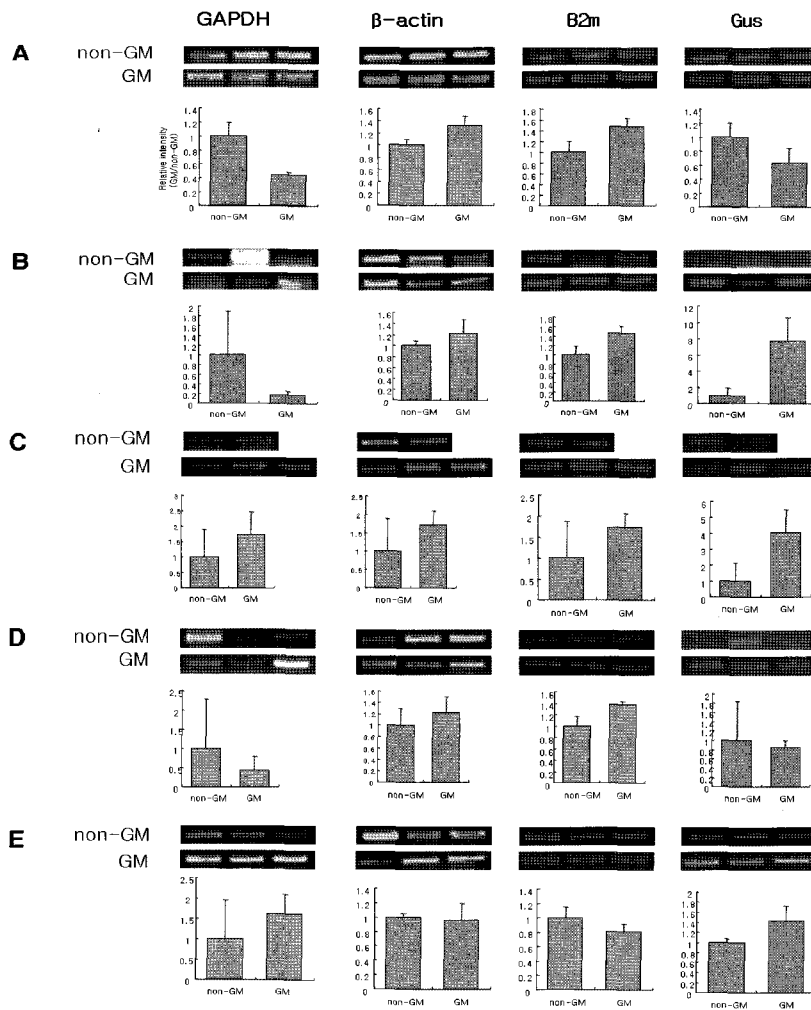


Fig. 2. Profile of housekeeping gene expression in mice. The mice liver (A), stomach (B), Small intestine (C), Large intestine (D), kidney (E) and spleen (F) were checked to administration of GM and non-GM chinese cabbage by densitometric analysis of RT-PCR.

GM 작물의 유전자들이 나타나는 것을 통해 알 수 있다. 본 연구에서는 GM 작물에서의 4종의 유전자를 선별 하여

유전자간의 발현의 차이는 큰 차이를 보이지 않았다. 반면 위(stomach)의 경우 GM 배추를 섭취한 군에서 GAPDH의

발현이 감소하였으며, Gus의 발현이 높게 나타나는 것을 알 수 있었다. 소장(small intestine)에서는 GM 작물을 섭취한 마우스에서 Gus의 발현이 증가하는 것으로 나타났다.

Housekeeping gene의 발현은 많은 경우 외부의 영향에 큰 차이를 받지 않는 것으로 알려져 있다(8). 본 연구에서 또한 부분적으로 유전자의 발현에 차이를 보였지만 전체적으로는 큰 차이를 나타내지 않는 것을 알 수 있었다. 이는 GM 작물의 섭취가 housekeeping gene의 발현에 큰 영향을 주지 않는다는 것을 알 수 있다. 하지만 세포내 유전자의 발현 과정은 매우 복잡한 네트워크를 구성하기 때문에 보다 많은 연구가 필요한 것으로 사료 된다.

세포에서 유전자의 발현 패턴을 연구할 경우 internal control로서 housekeeping gene를 주로 사용하는데 이는 세포의 생존에 항상 발현을 요구하는 유전자로서 이의 발현에 대한 차이는 여러 종류의 발현에 기본적인 control이 되기 때문이다. 유전자 발현에 영향을 미치는 것으로는 각종 호르몬, 성장 정도, 세포의 구조와 기능 등 많은 요인들이 있다(8, 9, 10). 본 연구에 사용된 저항성 유전자인 Cry1Aa toxin에 대한 마우스를 이용한 사이토카인의 profile을 연구한 보고서에서는 Cry1Aa에 immunization된 마우스에서 이들의 spleen cell을 다시 Cry1Aa로 자극하면 이에 대한 면역의 활성이 증가하는 것으로 나타났다(11,12). 이는 2차적으로 혹은 지속적으로 노출 될 경우 사이토카인 등에 영향을 줄 수 있음을 시사하고 있다. 하지만 GM 작물은 생산량 증대와 고품질의 작물을 수확할 수 있다는 것이 가장 큰 장점으로 경제성 또한 많은 부분에서 증명되어 있다. 앞으로 GM 작물에 대한 안전성 측면에 대한 많은 연구를 요하는 것이라 할 수 있다.

요 약

유전자 변형 작물은 생산성 측면에서 많은 장점이 있지만 이를 섭취할 경우 잠재적인 위험 요소들에 의해 많은 문제가 대두되고 있다. 본 연구는 저항성유전자를 이입한 배추에서 Profillin, Tubulin- α (Tub- α 1), Heat-shock protein (Bchsp17.6) and Ubiquitin conjugating enzyme (UBE)의 발현과 이를 30일간 섭취한 마우스에서 β -actin (β -act), β -2-microglobulin (B2m), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and β -glucuronidase (Gus)의 발현 정도를 RT-PCR을 통해 알아보았다. 실험 결과 저항성유전자를 이입한 배추와 그렇지 않은 배추의 유전자 발현 패턴은 큰 차이를 보이지 않았으며, 이를 섭취한 마우스 장기에서도 발현에 따른 큰 차이는 나타나지 않았다.

감사의 글

본 연구는 바이오그린21사업(20050601-034-857)의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

참고문헌

1. Blanco-Aparicio, C., Renner, O., Leal, J.F. and Carnero, A. (2007) PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis*, 28, 1379-1386
2. Tüting, T., DeLeo, A.B., Lotze, M.T. and Storkus, W.J. (1997) Genetically modified bone marrow-derived dendritic cells expressing tumor-associated viral or "self" antigens induce antitumor immunity in vivo. *Eur. J. Immunol.*, 27, 2702-2707
3. Jank, B., Rath, J. and Gaugitsch, H. (2006) Co-existence of agricultural production systems. *Trends Biotechnol.*, 24, 198-200
4. Reis, L.F., Van Sluys, M.A., Garratt, R.C., Pereira, H.M. and Teixeira, M.M. (2006) GMOs: building the future on the basis of past experience. *Ann. Acad. Bras. Cienc.*, 78, 667-686
5. Monastra, G. and Rossi, L. (2003) Transgenic foods as a tool for malnutrition elimination and their impact on agricultural systems. *Riv. Biol.*, 96, 363-384
6. Deaville, E.R. and Maddison, B.C. (2005) Detection of transgenic and endogenous plant DNA fragments in the blood, tissues, and digesta of broilers. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 10268-10275
7. Gujar, G.T., Kalia, V., Kumari, A., Singh, B.P., Mittal, A., Nair, R. and Mohan, M. (2007) Helicoverpa armigera baseline susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins and resistance management for Bt cotton in India. *J. Invertebr. Pathol.*, 95, 214-249
8. Jain, M., Nijhawan, A., Tyagi, A.K. and Khurana, J.P. (2006) Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 345, 646-651
9. Filby, A.L. and Tyler, C.R. (2007) Appropriate 'housekeeping' genes for use in expression profiling the effects of environmental estrogens in fish. *BMC Mol. Biol.*, 8, 10-15
10. Rodriguez-Mulero, S. and Montanya, E. (2005) Selection of a suitable internal control gene for expression studies in pancreatic islet grafts. *Transplantation*, 80, 650-652
11. Mazza, R., Soave, M., Morlacchini, M., Piva, G. and Marocco, A. (2005) Assessing the transfer of genetically modified DNA from feed to animal tissues. *Transgenic Res.*, 14, 775-784
12. Guerrero, G.G., Russell, W.M. and Moreno-Fierros, L. (2007) Analysis of the cellular immune response induced by *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins in mice: effect of the hydrophobic motif from diphtheria toxin. *Mol. Immunol.*, 44, 1209-1217