# 소의 생리적 특성에 따른 세포내 텔로미어 함량과 텔로머레이스 활성도 분석

최덕순* · 조창연** · 손시환*
진주산업대학교 동물생명과학과*, 축산과학원 가축유전자원시험장**

# The Amount of Telomeric DNA and Telomerase Activity on Cattle Cells

Duk Soon Choi*, Chang Yeon Cho** and Sea Hwan Sohn*
Department of Animal Science and Biotechnology, Jinju National University*,
Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science**

**ABSTRACT**

Telomeres consist of TTAGGG tandem repeated DNA sequences with specific proteins and locate at chromosome ends. Telomeres are essential for chromosome stability and are related with cell senescence, apoptosis and cancer. Telomerase is a ribonucleoprotein which has a template for the synthesis of telomeric DNA. This study was carried out to analyze the amount of telomeric DNA and telomerase activity in cattle cells. Analysis of the quantity of telomere in lymphocytes was done at different ages, sex and among Korean cattle and Holstein breeds. The telomerase activity was also analyzed in liver, brain, heart, kidney, and testis tissues of fetal calf and of 18 month old cattle. The amount of telomeres in lymphocytes and other tissue cells was analyzed by Quantitative-Fluorescence in situ Hybridization (Q-FISH) technique using a telomeric DNA probe. Telomerase activity was analyzed by Telomeric Repeat Amplification Protocol assay (TRAP). The amount of telomeric DNA on the lymphocytes during the whole life span was decreased along with age. Quantity of telomeres in Korean cattle was significantly higher than that in Holstein breed. The amount of telomeric DNA in males was significantly higher than that in females. Telomerase activity was up-regulated in most bovine tissues during fetal stage, but was down-regulated in most tissues at mature 18 month age except the testis cells. This study indicates that the amount of telomeres and telomerase activity of cells can be used as an age marker or/and a physiological marker of cattle.

(**Key words :** Telomere, Telomerase, Q-FISH, TRAP, Cattle)

## Ⅰ. 서 론

텔로미어(telomere)는 진핵세포에 존재하는 DNA-단백질 복합체로서 염색체의 말단부에 임의반복염기서열 (tandem repeated DNA sequence)인 TTAGGG와 특정 단백질로 구성되어 있다. 텔로미어의 역할은 염색체의 안정성에 본질적으로 작용하여 세포의 노화와 직접적 관련이 있다고 알려져 있으며, 세포 분열시마다 짧아져 더 이상 세포 분열을 할 수 없을 만큼 짧아

Corresponding author : S. H. Sohn, Dept. of Animal Science & Biotechnology, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea.
Tel : +82-55-751-3264, E-mail:shsohn@jinju.ac.kr

지면 자연사적인 세포의 사망(apoptosis)을 유기한다(Robinson, 2000; Weng과 Hodes, 2000; Ahmed와 Tollefsbol, 2001; Gan 등, 2001; Sohn 등, 2002). 한편, 텔로머레이스(telomerase)는 텔로미어의 길이 유지를 위한 직접적인 효소로 염색체의 3'말단에 telomeric DNA를 부가시키는 역할을 하며, 이의 구조는 ribonucleoprotein으로서 RNA와 catalytic 기능을 가진 단백질 복합체이다(Greider와 Blackburn, 1985).

일반적으로 염색체 내 텔로미어의 길이는 생후 연령이 증가함에 따라 지속적 단축이 일어나 세포노화를 촉진시켜 궁극적으로 생체 노화를 일으킨다고 알려져 있고, 텔로머레이스 활성도는 줄기세포(stem cell) 및 생식세포를 제외한 대부분의 체세포들에서 출생 후 활성도가 없는 것으로 알려져 있다(Meeker와 Coffey, 1997; Ulaner와 Giudice, 1997; Cottliar와 Slavutsky, 2001). 따라서 텔로미어의 길이 단축 및 텔로머레이스의 활성도에 관한 연구는 생명현상의 기작을 밝히는데 매우 유용한 자료라 생각되어지며 세포의 노화와 관련하여 값진 정보를 제공해 줄 수 있을 것으로 사료된다. 지금까지 텔로미어 및 텔로머레이스에 대한 정보는 인간 및 일부 실험동물에 국한되어 있으며 다른 동물들에 대해서는 이에 대한 정보가 극히 제한된 실정이다. 특히 가축에 있어서는 개체의 발생, 성장, 노화에 대한 체계적인 텔로미어의 변화양상(telomere dynamics)이나 텔로머레이스의 조절 양상이 명확히 밝혀져 있지 못한 상태이고, 더욱이 생명 주기에 따른 세포 내 텔로미어의 분포 양상은 거의 보고된 바가 없다. 그러나 최근 소에 대해서 체세포복제 개체의 생산과 더불어 복제 개체의 노화와 관련하여 텔로미어의 연구가 활발히 진행되고 있는데 최초의 체세포 복제 동물인 Dolly(Wilmut 등, 1997)의 경우 공여 세포의 짧은 텔로미어가 개체 노화에 직접적 원인임을 제시한 이래 이에 대한 다양한 결과들이 보고되고 있다(Shiels 등, 1999; Tian 등, 2000; Betts 등, 2001; Miyashita 등, 2002). 또한 소의 생식세포 및 수정란에 대한 발생과정 중의 텔로머레이스 활성도에 관한 일련의 연구도 진행된 바 있는데 정자 및 난자의 생식세포 상태, 초기 배자 상태, 상실배(morula) 및 포배(blastocyst) 상태일 때 이들의 활성도를 분석하여 생식 세포 및 수정시 상대적으로 높다가 초기 배자시 낮아지고 이후 포배기 때 다시 급격히 증가되는 양상을 보고하였다(Betts와 King, 1999; Xu와 Yang, 2000, 2001). 그러나 소의 성장, 노화에 대한 텔로머레이스의 조절 양상이 명확하게 밝혀지지 않은 상태이고, 개체의 생리적 특성에 따른 세포 내 텔로미어의 분포 양상도 아직 보고 된 바가 없다.

따라서, 본 연구에서는 소의 세포 분화 및 활성적 특이성과 개체의 성장, 노화에 따른 텔로미어의 분포 양상을 구명하기 위하여 한우(Korean Cattle)와 홀스타인(Holstein)종의 백혈구 세포 및 각종 조직을 대상으로 연령 별, 품종 별, 성 별 telomeric DNA 함량과 텔로머레이스 활성도를 분석 제시하고자 하였다.

## Ⅱ. 재료 및 방법

### 1. 공시재료 및 동물

소의 각 조직별 세포들의 텔로미어 양적 분석을 위하여 진주산업대학교 동물사육장에서 사육중인 Holstein 19두와 인근 농장에서 사육중인 Holstein 36두 및 남원 가축유전자원시험장에서 사육중인 한우 81두로 총 136두를 공시하였다. 텔로미어의 함량분석은 혈액, 간, 심장, 신장, 뇌 및 정소 세포를 대상으로 하였으며, 텔로머레이스 활성도는 태아 및 18개월령 성체의 상기 조직을 분석 대상으로 하였다.

### 2. 형광접합보인분석을 위한 표본 제작

텔로미어의 함량 분석을 위하여 채집된 조직들은 D-PBS(Gibco, Invitrogen Corp. Grand Island, N.Y, USA) 용액으로 세척 한 다음 세절하고 RPMI 1640(Gibco) 배양액이 들어있는 시험관으로 옮겨 200×g에서 10분간 원심 분리시

켰다. 침전된 세포에 0.9% sodium citrate (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 용액을 첨가하여 15분간 저장처리하고 이후 고정액을 10방울 정도 첨가하여 원심 분리시켰다. 고정처리는 methanol과 acetic acid가 3:1로 혼합된 고정액을 이용하고 이를 3회 반복 처리한 후 세포액을 3~5방울 정도 떨어뜨려 슬라이드 표본을 제작하였다.

백혈구세포 표본의 제작은 개체의 경 정맥으로부터 약 10 ml의 혈액을 채취하여 원심분리 후 백혈구만 분리하여 이용하였다. 분리된 세포는 0.06M KCl (Sigma-Aldrich)을 이용하여 실온에서 15분간 저장 처리하고 상기 방법과 동일하게 고정 처리 후 슬라이드 표본을 제작하였다.

### 3. 양적형광접합보인분석

조직별 세포들의 텔로미어 함량 분석을 위하여 양적형광접합보인법 (Quantitative Fluorescence in situ Hybridization; Q-FISH)을 이용한 바 본 분석 방법은 손 등(2004)이 제시한 방법을 일부 수정하여 실시하였다.

먼저 준비된 슬라이드 표본을 1 μg의 RNase A(Sigma-Aldrich)가 함유된 2×SSC(1x = 150mM NaCl과 15mM sodium citrate, pH 7.0) 용액에 넣고 37℃의 항온 수조에서 30분간 처리하였다. 이 후 초자수로 세척하고 80%, 90%, 100% 에탄올로 탈수 시켰다. Q-FISH를 위한 소의 telomeric DNA probe의 제작은 $(CCCTAA)_7$으로 구성된 42mers 단일 oligomers를 primer로 이용하여 PCR을 수행하고 이의 증폭된 산물을 PCR-DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Germany)로서 digoxigenin labeling을 하였다. 상기 제작된 probe를 이용하여 hybridization 용액 (40% 4x SSC, 50% formamide and 10% dextran sulfate; Roche)을 만든 후 슬라이드 표본에 떨어뜨리고 coverslip으로 밀봉하였다. 이를 72℃에서 10분간 처리하여 probe와 표본을 변성시키고 다시 38.5℃에서 1시간 동안 접합시킨 후 2×SSC, PN buffer (7 mM sodium phosphate, pH 8.0, containing 0.1% Nonidet 40; Roche)로 세척하였다. 접합 탐지를 위하여 슬라이드에 anti-dig-fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugate (10 ng/mL in PN buffer containing 5% non-fat dry milk; Roche)를 떨어뜨리고 coverslip을 덮은 후 38.5℃에서 10분간 배양하였다. 배경염색으로는 propidium iodide solution (PI)을 이용하였다. 형광접합 발현 양상은 PI와 FITC 파장대의 겸용 필터를 부착한 형광현미경 (Model AX-70 with WIB filter, Olympus, Tokyo, Japan)으로 검경하고 probe의 접합 양상을 분석하였다. 관찰한 각각의 상은 디지털 카메라 (Model DP-70, Olympus)로 촬영하여 컴퓨터에 저장하고 저장된 상은 이미지 분석 프로그램 (MetaMorph, UIC, Pennsylvania, USA)을 이용하여 telomeric DNA의 상대적 함량을 분석하였다. 분석 방법은 적색 (PI)의 핵 면적 대비 핵 내 telomeric DNA probe와 접합된 녹색 (FITC)의 형광 signal의 면적을 산출함으로서 genome당 telomeric DNA의 상대적 함유율을 계산하였다.

### 4. 텔로머레이스 활성도 분석

텔로머레이스 활성도의 분석은 Kim과 Wu (1997)가 제시한 telomeric repeat amplification protocol (TRAP) 방법을 이용하였다. TRAP의 수행은 Telomerase Detection Kit(Intergen Company, Purchase, NY, USA)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 다음과 같이 실시하였다.

채취한 각 조직들은 3-cholamidopropyl dimethylammonio-1-propane-sulfanate (CHAPS) lysis buffer를 이용하여 단백질을 분리하여 정량하고 (Bradford, 1976), 분리된 ribonucleoprotein을 대상으로 PCR을 수행하였다. 본 PCR의 조건은 30℃에서 30분간 TS-telomerase product를 신장시킨 다음 94℃ 30초, 59℃ 30초 및 72℃에서 30초간 3단계로 35 사이클을 실시하였다. 증폭된 텔로머레이스는 15% polyacrylamide gel (Promega, Madison, WI, USA) 전기영동을 통해 75V에 이어 100V에서 2시간동안 실시하고 ethidium bromide (EtBr, Sigma-Aldrich)로 염색한

후 발현된 층(ladder)을 확인하였다.

### 5. 통계분석

소의 연령 간, 품종 간, 성별 간, 조직 간 세포내 telomeric DNA 함량을 비교 분석하기 위하여 SAS 통계 패키지(SAS Institute Inc, Cary, NC, USA)를 이용하여 ANOVA/Turkey 및 t-검정법으로 처리 평균값 간 비교 분석을 수행하였다.

## Ⅲ. 결 과

### 1. 소의 연령별 백혈구 세포내 텔로미어의 양적 분포

소의 성장, 발달, 노화단계 별 텔로미어의 양적분포 양상을 분석하기 위하여 연령별 각 개체의 백혈구 세포 표본을 제작하고 telomeric DNA probe를 이용하여 Q-FISH를 수행하였다. 본 시험에는 생후 1년 이하부터 5년 이상의 Holstein종과 한우 총 136두를 공시하고 각 연령별 백혈구 세포내 텔로미어의 함량을 비교분석하였다. 개체별 각 100개의 세포에 대하여 연령별 축우들의 텔로미어의 상대적 함유율을 분석한 바 이의 결과는 Table 1과 같다. 분석결과 136두를 대상으로 한 소 백혈구 세포 내 평균 텔로미어의 함유율은 1.88% 정도이며, 연령이 증가함에 따라 세포내 telomeric DNA의 함유량은 유의적으로 감소하였다. 특히, 생후 1년 이후 텔로미어의 상대적 함유율이 급격히 감소하였으며, 성체 시기인 4살까지는 큰 변화 양상이 없다가 노화 시점인 4살 이후부터 다시 두드러지는 감소 양상을 나타내었다. Telomeric DNA probe를 이용한 축우의 연령별 백혈구 간기 세포에 대한 대표적인 FISH 양상을 Fig. 1에 제시하였다.

### 2. 소의 품종별 텔로미어의 양적 분포

소의 품종별 텔로미어 함량을 Holstein과 한우의 동일 연령별 혈액을 이용하여 Q-FISH방법으로 비교분석 하였다. 각 세포별 표본을 제작하고 이들에 대하여 telomeric DNA probe를 이용하여 FISH를 수행한 후 연령별 1,800~7,000개의 상을 획득하고, 획득한 각각의 상은 Image analyzer program(MetaMorph, UIC, Pennsylvania, USA)을 이용하여 핵 대비 텔로미어의 상대적 양을 비교 분석하였다. Table 2에 동일 연령 대비 품종 간 telomeric DNA의 상대적 함량 값을 분석 제시하였다. 소의 품종별 텔로미어의 함유율을 12개월령 이하, 12~48개월령 및 48개월령 이상으로 나누어 분석한 바, 모든 연령대에서 한우가 Holstein에 비해 유의적으로 높은 텔

Table 1. The relative amount of telomeric DNA on cattle lymphocytes at different ages

| Age | Number of cattle | Number of analyzed cells | Amount of telomeric DNA(%) |
|---|---|---|---|
| 0-12 mo. | 48 | 4,800 | 2.13±0.27[a] |
| 12-24 mo. | 27 | 2,700 | 1.80±0.26[b] |
| 24-36 mo. | 31 | 3,100 | 1.90±0.27[b] |
| 36-48 mo. | 12 | 1,200 | 1.73±0.12[b] |
| 48-60 mo. | 13 | 1,300 | 1.48±0.13[c] |
| above 60 mo. | 5 | 500 | 1.14±0.22[d] |
| total | 136 | 13,600 | 1.88±0.35 |

The values are means ± standard deviation.
[a,b,c,d] Means with different superscripts in same column significantly differ at $p<0.01$.

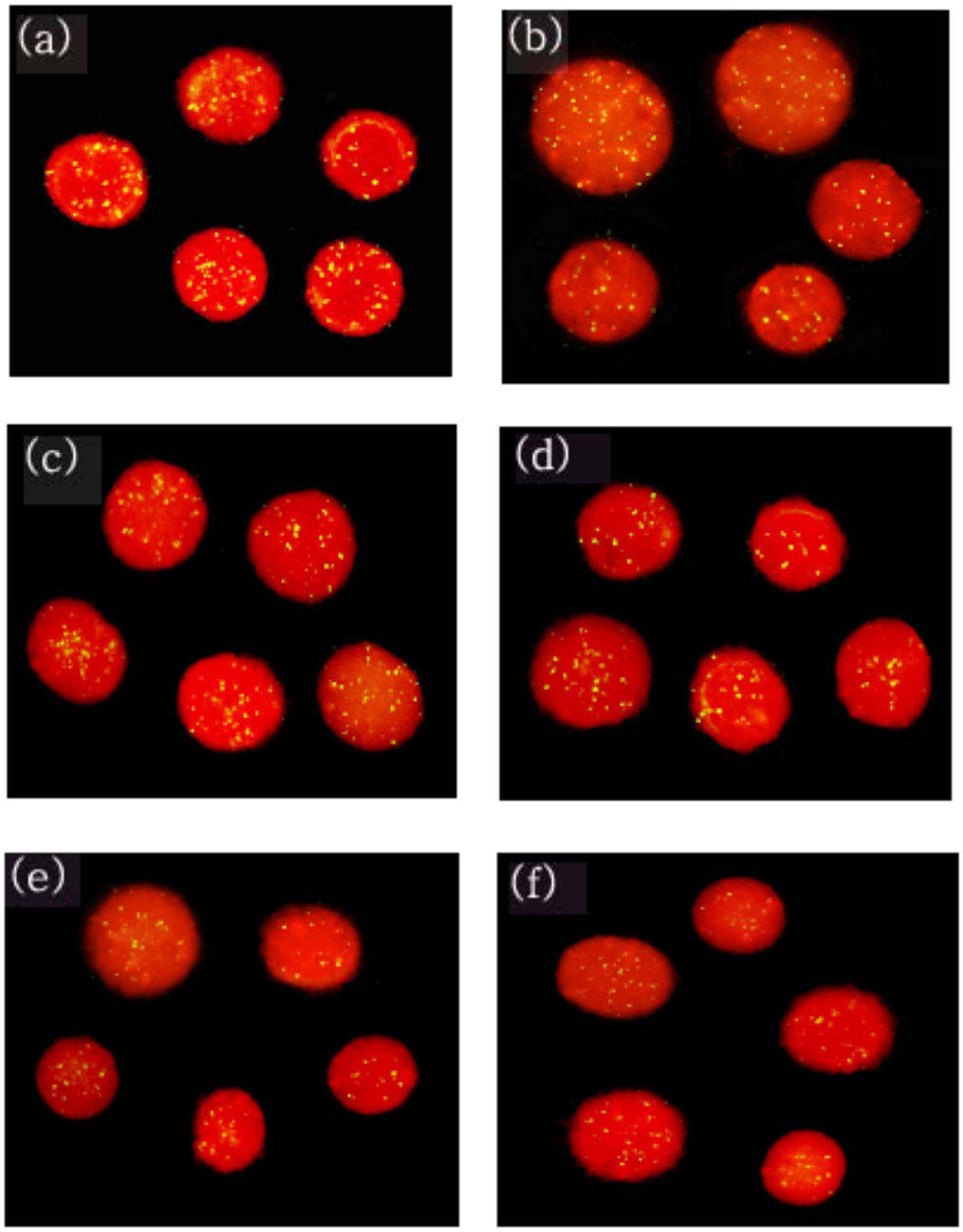


Fig. 1. The distribution of telomeres on interphase nuclei of cattle lymphocytes at different ages by FISH using telomeric DNA probe; lymphocytes at 1yr cattle containing with 2.13% telomeric DNA (a), at 2yr cattle containing with 1.80% telomeric DNA (b), at 3yr cattle containing with 1.90% telomeric DNA (c), at 4yr cattle containing with 1.73% telomeric DNA (d), at 5yr cattle containing with 1.48% telomeric DNA (e), at 6yr cattle containing with 1.14% telomeric DNA (f).

Table 2. The relative amount of telomeric DNA on cattle lymphocytes in Holstein and Korean Cattle

| Age | Holstein | | Korean cattle | | Prob. |
|---|---|---|---|---|---|
| | No. of heads | Telomeric DNA (%) | No. of heads | Telomeric DNA (%) | |
| 0-12 mo. | 27 | 1.98±0.21 | 21 | 2.31±0.23 | <.0001** |
| 12-48 mo. | 22 | 1.57±0.12 | 48 | 1.95±0.21 | <.0001** |
| above 48 mo. | 6 | 1.17±0.21 | 12 | 1.49±0.13 | 0.0118** |
| total | 55 | 1.73±0.33 | 81 | 1.98±0.32 | <.0001** |

The values are means ± standard deviation
Prob : P values by t-test for the means of telomeric DNA within a same row

로미어 함량을 나타내어 소 품종 간 함량의 차이가 있음을 알 수 있었다(p<.0001).

### 3. 소의 성별 텔로미어의 양적 분포

소의 성별 텔로미어 함량을 비교 분석하기 위하여 동일 연령 별 암소와 수소의 혈액을 이용하여 Q-FISH를 수행하였다. 한우 및 Holstein의 암수 간 동일 연령 대비 백혈구 세포내 telomeric DNA의 상대적 함량 분석 값을 Table 3에 제시하였다. 소의 성별 텔로미어의 함유율을 12개월령 이하 및 12~48개월령으로 나누어 비교 분석한 바 모든 연령에서 수컷이 암컷에 비해 유의적으로 높은 telomeric DNA 함량을 나타내었다 (p<.0001).

### 4. 소의 조직별 텔로미어의 양적 분포

소의 각 조직별 세포의 텔로미어 함량을 비교 분석하기 위하여 12~24개월령 한우를 이용하여 FISH 표본을 제작하였다. 각 조직 별 비교 분석 대상은 간, 심장, 신장, 폐 및 백혈구 세포로 하였으며 분석 방법은 telomeric DNA probe를 이용하여 Q-FISH 방법으로 텔로미어의 상대적 함량을 비교하였다.

분석결과, Table 4에 제시한 바와 같이 성축에 있어서 각 조직 별 세포내 텔로미어의 함유율은 1.4~1.8% 정도로 분석되었으며, 각 조직 별 세포내 텔로미어 함유율 간에는 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다.

Table 3. The relative amount of telomeric DNA of lymphocytes male and female cattle

| Age | Male | | Female | | Prob. |
|---|---|---|---|---|---|
| | No. of heads | Telomeric DNA (%) | No. of heads | Telomeric DNA (%) | |
| 0-12 mo. | 8 | 2.50±0.26 | 40 | 1.94±0.37 | 0.0041** |
| 12-48 mo. | 2 | 2.33±0.03 | 68 | 1.82±0.24 | 0.0002** |
| total | 10 | 2.47±0.24 | 108 | 1.90±0.25 | <.0001** |

The values are means ± standard deviation
Prob : P values by t-test for the means of telomeric DNA within a same row

Table 4. The relative amount of telomeric DNA on tissues of 2yr Korean Cattle

| Tissues | Number of cattle | Amount of telomeric DNA on nuclei(%) |
|---|---|---|
| Liver | 3 | 1.39±0.14 |
| Heart | 5 | 1.57±0.20 |
| Kidney | 5 | 1.44±0.17 |
| Lung | 5 | 1.51±0.23 |
| Blood | 27 | 1.80±0.26 |

The values are means ± standard deviation.

### 5. 소의 조직별 텔로머레이스 활성도 분석

본 연구에서는 태아와 18개월령 한우의 정소, 간, 심장, 신장, 뇌 세포에 대한 텔로머레이스 활성도를 분석하였다. 텔로머레이스 활성도의 분석은 TRAP 방법을 이용하였고, 이들의 분석 결과를 Fig. 2에 제시하였다. 본 그림에서 lane M은 size marker로 100bp ladder를 이용하였고, lane L은 간, lane H는 심장, lane K는 신장, lane B는 뇌, lane G는 정소 조직으로부터 분리한 단백질 추출물에 대한 텔로머레이스 활성도 양상이다. Lane N은 추출물을 넣지 않은 negative(−) 대조구이며, Lane TSR8은 control template 2㎕를 넣은 positive(+) 대조구로서 형성된 ladder를 통하여 PCR 생성물의 결과를 검정하였다. 여기에서 나타난 가장 아래의 ladder는 primer-dimer이고, 그 윗 ladder는 36bp (S-IC: substrate internal control), 다음은 50bp를 가리키며 한 ladder가 늘어날 때마다 6bp씩 증가하는 양상을 보이고 있다. 각 표본 추출물의 농도는 500ng으로 동일하게 하였다.

분석 결과 태아의 모든 조직에서 비교적 강한 텔로머레이스 활성을 보였지만 18개월령 성체의 경우 생식선조직을 제외한 다른 모든 조직에서 이의 활성도가 현저하게 떨어짐을 알 수 있었다.

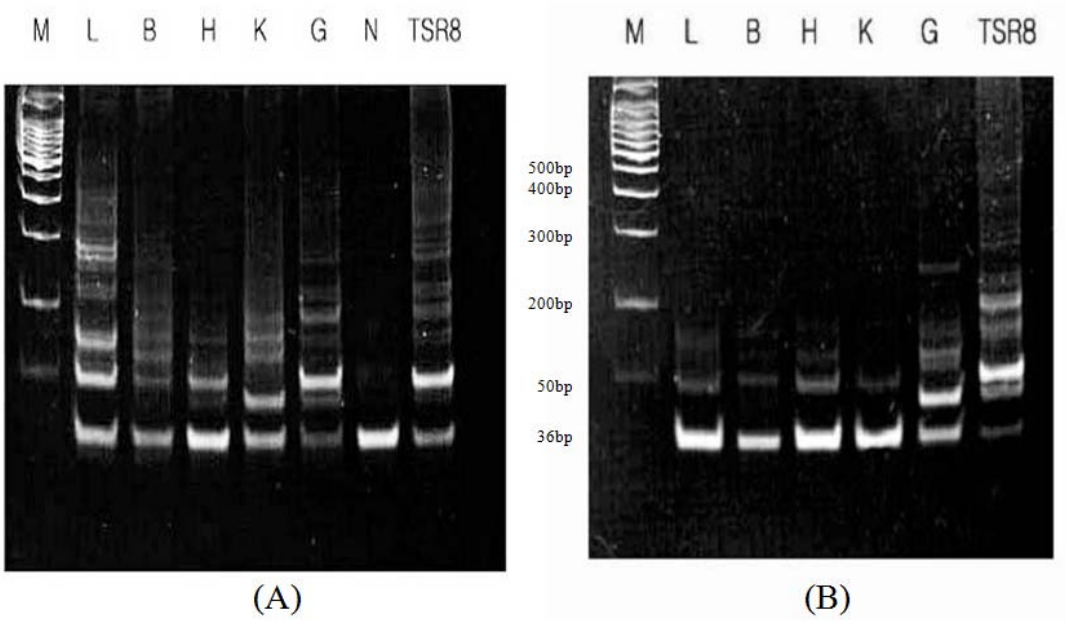


Fig. 2. Telomerase activity on several tissues of cattle at different ages; at fetal (A), and 18 mo. (B) of Korean cattle. M: 100bp size marker, L: liver , B: brain, H: heart, K: kidney, G: gonad, N: negative control, TSR8: positive control.

## Ⅳ. 고 찰

텔로미어가 고등생물의 생명 현상을 나타내는 bio-marker로서의 역할이 점차 밝혀지고 있으며, 많은 연구에서 텔로미어가 염색체의 guardian임을 입증하고 있다(Slijepcevic, 1998; Lustig, 1999; Hemann 등, 2001; Samper 등, 2001). 최근 텔로미어의 길이와 텔로머레이스 활성도, 세포의 노화 및 암에 관한 연구들이 인간을 중심으로 광범위하게 진행되면서 특히 텔로미어의 길이와 세포의 노화 간에 밀접한 관련성이 있음이 밝혀지면서 이에 대한 연구가 더욱 활발히 진행되고 있다(Robinson, 2000; Ahmed와 Tollefsbol, 2001; Cottliar와 Slavutsky, 2001; Pathak 등, 2002). 이들 중 세포의 노화와 관련하여 사람의 경우 백혈구 세포 내 텔로미어의 길이는 출생 후 4~5세 전후의 유년기까지 년간 1kb 이상씩 급진적 단축 양상을 보이다가 어느 정도 정체 상태로 성년까지 지속한 후 이후 다시 점진적 단축 양상을 보이는 것으로 나타났다(Frenck 등, 1998). 이러한 함량의 변화는 개인 간에 다소 차이가 있는 것으로 나타났으나 동일 개체 내 조직별 및 기관별 텔로미어의 길이 차이는 거의 없는 것으로 분석되었다(Okuda 등, 2002). 성 간에는 출생 때 거의 동일한 길이를 보이다가 연령이 진행되면서 여성의 텔로미어 길이가 남성보다 긴 양상을 나타내어 남성의 텔로미어 단축 속도가 여성보다 빠름을 제시하였다(Benetos 등, 2001). 한편, 텔로머레이스의 활성도에 있어서 사람을 포함한 포유동물의 경우 태아조직에서는 왕성하나 신생자 이후 체세포들에서는 거의 작용하지 않는 것으로 알려져있다(Meeker와 Coffey, 1997). 그러나 생식세포나 줄기세포와 같이 끊임없이 새로이 분열되는 세포와 무한정 분열을 지속하는 암 세포의 경우 이의 발현이 지속적으로 나타난다(Ulaner와 Giudice, 1997). 정상적 인체 내 대부분의 기관에서는 연령이 증가함에 따라 텔로머레이스의 점진적 감소(down regulation) 양상을 보이지만 설치류(mouse, rat)의 경우 사람과 달리 출생 후에도 텔로머레이스의 발현이 지속됨을 보고하고 있다(Yamaguchi 등, 1998). 이와 같이 텔로미어 길이와 텔로머레이스의 활성도에 대한 다양한 연구들이 사람이나 실험동물들을 대상으로 폭 넓게 진행되고 있으나 축우에 대해서는 이에 대한 연구가 상대적으로 미흡한 실정으로 성장 노화에 대한 텔로미어나 텔로머레이스의 조절 양상이 아직 밝혀 지지 않은 상태이고, 더욱이 생리적 특성에 따른 연령, 품종, 성별 및 조직별 세포 내 텔로미어의 분포 양상은 거의 보고 된 바가 없다.

소의 텔로미어 분포는 인간에서와 같이 모든 염색체의 양 말단부에만 위치하고 있으며 조직 간에도 동일한 분포 양상을 나타낸다(de la Sena 등, 1995; King 등, 1998; 손 등, 2004). 뿐만 아니라 품종 간에도 염색체 상 텔로미어의 분포 양상은 거의 유사한 것으로 손 등(2004)이 제시한 Holstein 염색체에서 텔로미어의 분포 양상과 본 연구에서 분석된 한우 염색체에서의 텔로미어 분포 양상 간에는 거의 차이가 없는 것으로 나타났다(자료 미제시).

소의 성장 발달 단계별 세포내 텔로미어의 양적 분석을 위하여 한우 및 홀스타인종을 대상으로 연령별 각 개체의 백혈구 세포 내 telomeric DNA의 상대적 함량을 분석한 바 모든 종에서 연령이 증가함에 따라 세포내 telomeric DNA의 함량이 유의적으로 감소되는 양상을 보였고, 특히 생후 1년 및 4년 이후 시점에서 텔로미어의 함유율이 급격히 감소되는 양상을 나타내었다. 이러한 결과는 거의 모든 생물 종에서 연령이 증가함에 따라 텔로미어가 점진적으로 짧아진다는 이론과 일치하는 결과이다. Miyashita 등(2002)은 0~18년생의 Japanese Black Cattle 50마리의 백혈구를 이용하여 Telomeric Restrict Fragment 방법으로 텔로미어의 길이를 분석한 결과 연령이 증가함에 따라 이의 길이가 유의적으로 짧아짐을 보고하여 본 분석 결과와 거의 일치되는 양상을 나타내었다. 한편 조 등(2005)은 Q-FISH 방법으로 닭의 발생 과정 중 기관 형성 이후 발육 단계에 따라 각 조직 내 세포의 텔로미어 함유율이 발생 시점까지 점진적으로 감소된다고 보고하였고,

정 등(2006)은 부화 후 개체의 성장, 노화 단계에서도 모든 세포내 텔로미어 함유율이 유의적으로 감소 한다는 결과를 제시한 바 있다. 이와 같이 축우의 성장 발달 노화 단계별 세포내 telomeric DNA 함량 분석을 통하여 소에 있어서도 연령이 증가함에 따라 텔로미어가 점진적으로 감소한다는 이론을 재 확인 하였다.

소의 품종별 텔로미어 함량을 비교 분석 한 바 모든 동일 연령대에서 한우가 Holstein에 비해 유의적으로 높은 텔로미어 함량을 나타내어 품종 간에 telomeric DNA 함량의 차이가 있었다. 이러한 양상은 조 등(2004)이 재래 닭과 Leghorn종 간의 텔로미어 함량 비교 분석에서 재래 닭의 백혈구 세포 내 telomeric DNA 함량이 Leghorn종에 비해 높게 나타났다고 하여 품종 간 차이를 제시한 바 있다. 소의 품종 간 텔로미어의 함량 차이는 세포의 증식, 노화, 분화 현상을 품종 간에 비교할 수 있는 하나의 유전학적 종 특이적 표지로 생각된다. 따라서 이러한 품종 특이성에 대한 보다 명확한 이론적 제시를 위해서는 본 연구에서 공시한 품종 이외 여러 축우 품종에 대한 텔로미어 함량의 비교 분석이 이루어져야만 하겠다.

소의 성별 텔로미어 함량은 동일 연령 별 수소의 텔로미어 함유율이 암소에 비해 높게 나타났다. 이는 사람의 경우 남자와 여자의 염색체내 텔로미어 길이를 분석한 결과 여자가 남자에 비해 유의적으로 높았다고 하였고(Benetos 등, 2001; Perner 등 2003), 조 등(2004)은 재래 닭과 레그혼에서 암컷과 수컷의 백혈구 세포내 텔로미어의 함량을 비교 분석한 바 암컷이 수컷에 비하여 높게 나타났다고 하였다. 이와 같이 사람을 포함한 몇몇 가축들에 있어 동일 연령에서 성별 간 텔로미어 함량이 다름을 보고하고 있으며 소의 경우에 있어서도 성 간 텔로미어 함량 분포의 차이가 있는 것으로 분석되었다. 그러나 종에 따라 암수간 텔로미어의 분포 비율이 달리 나타남에 따라 성에 따른 텔로미어의 분포 양상을 일관성 있게 해석하기에는 어려움이 있다.

소의 간, 심장, 신장, 폐 및 백혈구 세포에 대한 각 조직별 텔로미어 함량을 비교 분석한 바 동일 개체 내 조직 간 세포내 텔로미어 함유율은 차이가 없는 것으로 나타나 비 증식성 세포들 간에 텔로미어 함유율은 동일 개체에서 거의 유사함을 시사한다. 그러나 사람을 포함한 일부 포유동물에서 생식세포와 체세포의 텔로미어 함유율 간에는 많은 차이가 있는 것으로 알려져 있고, 또한 조류의 경우에서도 증식성 세포인 정소내의 텔로미어 함유율이 비 증식성 세포인 간, 뇌, 심장 등에 비해 월등히 높은 함유율을 보고하였다(Wright 등, 1996; Venkatesan과 Price 1998; Taylor와 Delany, 2000; 정 등, 2006). 한편 소 태아 및 성체 각 조직에 대한 텔로머레이스 활성도를 분석한 바 태아의 모든 조직에서는 강한 활성 양상을 보였지만 성체의 경우 생식선 조직을 제외한 다른 모든 체 조직에서는 이의 활성이 거의 없는 것으로 나타났다. 이는 Wright 등(1996)이 보고한 포유동물의 수정란에서는 강한 텔로머레이스 활성도를 보이고 분화가 지속되는 동안 조직과 세포 특이성에 따라 활성도가 감소하고, 출생 후 텔로머레이스의 활성도를 보이지 않는다는 보고와 거의 일치되는 결과이다. 또한 소 체외수정란에서 텔로머레이스 활성도를 분석한 결과 초기 배 단계나 성숙난자는 미성숙 난자에 비해 활성도가 떨어지며, 상실배와 포배기 단계에는 다시 활성도를 나타낸다고 하여 소의 배 발생단계에서는 높은 텔로머레이스 활성도를 지니는 것으로 보고하여 성체의 체세포내 발현양상과는 매우 다름을 제시하였다(Betts과 King, 1999; Xu와 Yang, 2000). 닭에 있어서도 기관형성 이후 신생 개체의 체세포는 증식성이 강한 세포 및 생식세포를 제외하고는 출생 후 텔로머레이스 활성이 나타나지 않는다하여 본 결과와 거의 일치함을 알 수 있었다(Taylor와 Delany, 2000; 조, 2005; 정, 2006). 이상의 결과를 종합하면, 소의 경우 성장 발달 시 텔로머레이스 활성도는 연령 및 조직에 따라 각기 다른 활성 양상을 보이며, 증식성 세포는 지속적인 활성을 나타내었고, 비 증식성 세포는 성장이 진행됨에 따라 텔로머레이스 활성도가 떨어

지는 down-regulation 양상임을 알 수 있었다.

## Ⅴ. 요 약

텔로미어란 염색체 말단부에 TTAGGG의 반복 염기서열과 특정 단백질로 구성되어 있는 것으로 핵 내 염색체의 안정성에 작용을 하며 세포의 노화, 사멸 및 암의 발생과 관련이 있다. 텔로머레이스는 텔로미어의 길이를 일정하게 유지하기 위한 직접적 효소로서 telomeric DNA 합성에 관여하는 ribonucleoprotein이다. 본 연구에서는 한우와 Holstein종 136두를 대상으로 백혈구 세포를 이용하여 연령 별, 품종 별, 성 별 텔로미어 함량을 분석하였다. 또한 동일 연령에서 혈액, 간, 뇌, 심장, 신장 및 생식선 조직들의 텔로미어 함량과 텔로머레이스 활성도도 비교 분석하였다. Telomeric DNA의 양적 분석은 양적형광접합보인법(Q-FISH)을 이용하였고, 텔로머레이스 활성도의 분석은 TRAP방법을 이용하였다. 분석 결과, 소의 백혈구 세포들에 있어 개체의 연령이 증가함에 따라 텔로미어의 함유율이 점진적이며 유의적으로 감소되는 양상을 보였고, 한우가 Holstein에 비해 텔로미어 함유율이 높게 나타나 품종 간 유의적 차이가 있었으며, 성 간에도 수컷이 암컷에 비해 유의적으로 높은 텔로미어 함유율을 나타내었다. 반면 동일 연령의 간, 심장, 신장, 폐, 혈액 세포내 텔로미어의 함유율은 차이가 없는 것으로 나타났다. 텔로머레이스 활성도는 태아의 모든 조직에서 비교적 강한 활성을 보였지만, 성 성숙이 된 18개월령에서는 생식선 조직을 제외한 나머지 조직에서 텔로머레이스 활성도는 현저하게 떨어져 조직별 세포의 증식성 특이성과 텔로머레이스 활성도간에는 밀접한 연관성이 있는 것으로 나타났다. 이상의 결과로서 세포내 텔로미어 양적 분포 양상 및 텔로머레이스 활성도를 이용하여 개체의 연령 지표 또는 생리적 표지의 개발 가능성을 제시하고자 한다.

## Ⅵ. 사 사

본 연구는 산업자원부/한국산업기술평가원 지정 진주산업대학교 동물생명산업센터의 연구비 지원에 의한 것입니다.

## Ⅶ. 인 용 문 헌

1. Ahmed, A. and Tollefsbol, T. 2001. Telomeres and telomerase: basic science implications for aging. J. Am. Geriatr. Soc. 49(8):1105-1109.
2. Benetos, A., Okuda, K., Lajemi, M., Kimura, M., Thomas, F., Skurnick, J., Labat, C., Bean, K. and Aviv, A. 2001. Telomere length as an indicator of biological aging: The gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity. Hypertension 37(2):381-385.
3. Betts, D. H. and King, W. A. 1999. Telomerase activity and telomere detection during early bovin development. Dev Gent 25(4):397-403.
4. Betts, D. H., Bordingnon, V., Hill, J. R., Winger, Q., Westhusin, M. E., Smith, L. C. and King, W. A. 2001. Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle. Proc. Natl. Sci. USA 98:1077-1082.
5. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Animal Biochem 72:248-254.
6. Cottliar, A. S. and Slavutsky, I. R. 2001. Telomeres and telomerase activity: their role in aging and in neoplastic development. Medicina 61:335-342.
7. de la Sena, C., Chowdhary, B. P. and Gustavsson, I. 1995. Localization of telomeric (TTAGGG)n sequences in chromosomes of some domestic animals by fluorescence in situ hybridization. Hereditas 123:269-274.
8. Frenck, R. W. Jr., Blackburn, E. H. and Shannon, K. M. 1998. The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age. Proc Natl Acad Sci USA 95(10):5607-5610.

9. Gan, Y., Engelke, K. J., Brown, C. A. and Au, J. L. 2001. Telomere amount and length assay. Pharma. Res. 18(12):1655-1659.
10. Greider, C. W. and Blackburn, E. H. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. Cell 43:405-413.
11. Hemann, M. T., Strong, M. A., Hao, L. Y. and Greider, C. W. 2001. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. Cell 107:67-77.
12. Kim, N. W. and Wu, F. 1997. Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). Nucleic Acids Research 25(13): 2595-2597.
13. King, W. A., Betts, D. H., Carter, R. F. and Hofstra, A. H. 1998. Telomeres and telomerase activity in bovine oocytes, embryos and fetuses. Theriogenology 49(1):182.
14. Lustig, A. J. 1999. Crisis intervention: the role of telomerase. Proc Natl Acad Sci USA 96(7): 3339-3341.
15. Meeker, A. K. and Coffey, D. S. 1997. Telomerase: a promising marker of biological immortality of germ, stem, and cancer cells. A review. Biochemistry 62(11):1323-1331.
16. Miyashita, N., Shiga, K., Yonai, M., Kaneyama, K., Kobayashi, S., Kojima, T., Goto, Y., Kishi, M., Aso, H., Suzuki, T., Sakaguchi, M. and Nagai, T. 2002. Remarkable difference in telomere lengths among cloned cattle derived from different cell types. Biol. Reprod. 66:1649-1655.
17. Okuda, K., Bardeguez, A., Gardner, J. P., Rodriguez, P., Ganesh, V., Kimura, M., Skurnick, J., Awad, G. and Aviv, A. 2002. Telomere length in the newborn. Pediatr Res. 52(3):377-381.
18. Pathak, S., Mutani, A. S., Furlong, C. L. and Sohn, S. H. 2002. Telomere dynamics, aneuploidy, stem cells and cancer. Int. J. Oncology 20(3): 637-641.
19. Perner, S., Bruderlein, S., Hasel, C., Waibel, I., Holdenried, A., Ciloglu, N., Chopurian, H., Nielsen, K. V., Plesch, A., Hogel, J. and Moller, P. 2003. Quantifying quantitative telomere lengths of human individual chromosome arms by centromere-calibrated fluorescence in situ hybridization and digital imaging. American Journal of Pathology 163(5):1751-1756.
20. Robinson, M. O. 2000. Telomerase and cancer. Genet. Eng. 22:209-222.
21. Samper, E., Flores, J. M. and Blasco, M. A. 2001. Restoration of telomerase activity rescues chromosomal instability and premature aging in Terc-/- mice with short telomeres. EMBO Rep. 2(9):800-807.
22. Shiels, P. G., Kind, A. J., Campbell, K. H., Waddington, D., Wilmut, I., Colman, A. and Schnieke, A. E. 1999. Analysis of telomere lengths in cloned sheep. Nature 399:316-317.
23. Slijepcevic, P. 1998. Telomere length regulation: a view from the individual chromosome perspective. Exp Cell Res. 244(1):268-274.
24. Sohn, S. H., Multani, A. S., Gugnani, P. K. and Pathak, S. 2002. Telomere erosion-induced mitotic catastrophe in continuously grown Chinese hamster Don cells. Exptl. Cell Res. 279(2):271-276.
25. Taylor, H. A. and Delany, M. E. 2000. Ontogeny of telomerase in chicken: impact of downregulation on pre- and postnatal telomere length *in vivo*. Dev Growth Differ. 42(6):613-621.
26. Tian, X. C., Xu, J. and Yang, X. 2000. Normal telomere lengths found in cloned cattle. Nat. Genet. 26:272-273.
27. Ulaner, G. A. and Giudice, L. C. 1997. Developmental regulation of telomerase activity in human fetal tissues during gestation. Mol. Hum. Reprod. 3(9):769-773.
28. Venkatesan, R. and Price, C. 1998. Telomerase expression in chickens: Constitutive activity in somatic tissues and down-regulation in culture. Proc. Natl Acad. Sci. USA 95:14763-14768.
29. Weng, N. P. and Hodes, R. J. 2000. The role of telomerase exprerssion and telomere length

maintenance in human and mouse. Journal of Clinical Immunology 20(4):257-267.

30. Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. and Campbell, K. H. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature 385:810-813.
31. Wright, W. E., Piatyszek, M. A., Rainey, W. E., Byrd, W. and Shay, J. W. 1996. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. Development Genetics 18(2):173-179.
32. Xu, J. and Yang, X. 2000. Telomerase activity in bovine embryos during early development. Biol Reprod 63(4):1124-1128.
33. Xu, J. and Yang, X. 2001. Telomerase activity in early bovine embryos derived from parthenogenetic activation and nuclear transfer. Biol Reprod 64(3): 770-774.
34. Yamaguchi, Y., Nozawa, K., Savoysky, E., Hayakawa, N., Nimura, Y. and Yoshida, S. 1998. Change in telomerase activity of rat organs during growth and aging. Exptl. Cell Res. 242:120-127.
35. 손시환, Multani, A. S., Pathak, S. 2004. 소, 돼지 염색체의 telomeric DNA 분포 양상. 동물자원학회지 46(4):547-554.
36. 정길선, 조은정, 최덕순, 이민정, 박철, 전익수, 손시환 2006. 한국재래닭의 주령별 각 조직의 텔로미어 양적분포 양상과 텔로머레이스 활성도 분석. 한국가금학회지 33(2):97-103.
37. 조은정, 최철환, 손시환. 2005. 닭의 발생 단계별 세포내 telomere의 양적 분포양상과 telomerase 활성도 분석. 한국동물자원과학회지 47(2):187-194.
38. 조은정, 최철환, 전인수, 박 철, 손시환. 2004. Telomere 양적 분석을 이용한 bio-marker 개발. 한국가금학회 제 21차 학술발표회 proceedings: 13-15.

(접수일자 : 2008. 4. 11. / 수정일자 : 2008. 7. 1. / 채택일자 : 2008. 7. 9.)