

한우와 흑한우 CCAAT/Enhancer Binding Protein β (C/EBP β)

유전자의 발현과 다형분석

김혜민* · 이상미* · 박효영* · 윤슬기* · 윤두학** · 이성수*** · 고문석*** · 문승주* · 강만중*

전남대학교 동물자원학부 농업과학기술연구소*, 축산과학원**, 난지농업연구소***

Polymorphism Analysis and Expression of the CCAAT/Enhancer Binding Protein β (C/EBP β) in the Korean Native Cattle and Black Cattle

Hey-Min Kim*, Sang Mi Lee*, Hyo Young Pack*, Seul Ki Yoon*, Duhak Yoon**, Seung Soo Lee***, Moon Suck Ko***, Seung Ju Moon* and Man Jong Kang*

Department of Animal Science, Insti. of Ag. Sci. and Tech., College of Agriculture & Life Science, Chonnam National University*, National Institute of Animal Science**, National Institute of Subtropical Agriculture***

ABSTRACT

The CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBP β), a member of the leucine zipper DNA-binding protein of transcription factor, plays a crucial role in the control of early phases of adipocyte differentiation. In this studies, we report the identification, characterization, and expression of the Korean native cattle C/EBP β gene. The Korean native cattle and black cattle C/EBP β cDNA includes a 1047bp open reading frame encoding a protein of 348 amino acids. The C/EBP β cDNA sequence of the Korean native cattle and black cattle shows high conservation with the corresponding amino acid sequences reported in other species. The distribution of C/EBP β mRNA in various tissues of Korean native cattle aged 26 months was investigated using Northern Blot analysis. The C/EBP β expression was detected in adipose tissue, lung, sirloin while expression was not detected in heart, kidney, small intestine, colon, and liver. However, we are analyzed polymorphism of bZIP domain in the C/EBP β gene. A polymorphism was not identified at this position.

(Key words : Adipocyte differentiation, C/EBP β , Korean native cattle)

I. 서 론

CCAAT/enhancer binding protein은 세포의 증식과 분화에 관련된 유전자의 전사를 조절하는 전사인자로서 DNA-binding protein의 leucine zipper class에 속한다(Lekstrom-Himes J 등, 1998). C/EBP는 N-말단에 transactivation domain

과 C-말단에 DNA-binding domain, leucine-rich dimerization domain을 가지고 있어 ligand의 작용 없이 homodimer 또는 heterodimer를 형성하여 활성화된다(Loftus TM 등, 1997; Mandrup S 등, 1997). 현재까지 6개의 C/EBP 유전자가 동정되었는데, C/EBP α , C/EBP β , C/EBP γ , C/EBP δ , C/EBP ϵ , C/EBP ζ 가 이에 속한다(Lekstrom-Himes

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

J 등, 1998). 그 중에서 C/EBP α , β , δ 가 지방세포 분화에 관련되어 있는 것으로 보고되고 있다 (Paul A 등, 2001).

지방세포는 에너지 조절과 항상성에 중요한 역할을 수행하는 매우 특별한 세포로, 성숙한 지방세포로의 분화는 C/EBP와 PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ)와 같은 전사인자에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다 (Brun 등, 1996). C/EBP β 와 δ 는 glucocorticoid, insulin과 cAMP signaling pathway의 stimulator와 같은 hormonal stimulant의 효과로 세포의 mitotic clonal expansion을 조절함으로써, 초기 지방세포 분화에 중요한 역할을 수행한다 (Tang 등, 2003; Zhang 등, 2004). 특히 C/EBP β 는 지질대사에 관련된 유전자의 전사를 조절하는 전사인자인 PPAR γ 의 발현과 활성을 조절할 뿐만 아니라, PPAR γ ligand의 합성에 관여하는 것으로 보고되고 있다 (Hamm JK 등, 2001). C/EBP α 는 PPAR γ 의 활성화에 의해 지방세포의 terminal differentiation에 관여하는데, 이 또한 C/EBP β 에 의해 조절된다 (Christy 등, 1991; Tang 등, 1999). C/EBP β 는 N-terminal의 transactivation domain과 C-terminal의 DNA binding-leucine zipper region 사이에 존재하는 Repressor domain의 인산화로 인해서 활성을 갖게 된다. Repressor domain에는 여러 개의 serine, threonine 잔기가 존재하는데, 생쥐 C/EBP β 에서 188번째 threonine 잔기의 인산화는 지방세포 분화 초기 단계에서 일어나 C/EBP α 와 지방세포에서 분비되는 대표적인 호르몬인 adiponectin의 발현을 유도하는 것으로 보고되고 있다 (Park 등, 2004).

대가축인 소에 있어서 지방세포의 분화는 지방조직에서만 아니라 근육내 존재하는 줄기세포에 의해서도 나타난다 (Harper and Pethic, 2004). 근육내 지방 침착을 marbling이라 하는데, 육질을 평가하는 중요한 요인 중 하나이다. 이 marbling의 형성은 근육 사이에 있는 지방세포의 수와 크기에 밀접한 관계가 있다 (Cianzio 등, 1985; Harper and Pethic, 2004). 본 연구실에서는 지방세포의 분화에 결정적인 역할을 하는 PPAR γ 유전자를 한우에서 동정하여 보고하였다 (Jeoung 등, 2004). PPAR γ 의 발현을 조절하

는 것으로 보고되는 C/EBP β 는 Japanese black cattle, Angus beef cow에서 cloning 되었으나 (Yamaoka 등, 1997; Eleswarapu 등, 2005), 한우에서 C/EBP β 유전자는 보고된 바가 없다. 그러므로 본 연구에서는 한우와 흑한우에서 지방분화 초기단계에 중요한 역할을 수행하는 C/EBP β 유전자를 동정하였으며 한우 조직에서 유전자의 발현을 확인하였다. 또한 C/EBP β 유전자에서 polymorphism이 일어나는지를 확인하기 위하여 C/EBP β 의 functional region인 basic leucine zipper protein (bZIP) 영역으로부터 restriction fragment length polymorphism (RFLP) 분석을 수행하였다.

II. 재료 및 방법

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

1. Total RNA 정제

Total RNA는 축산연구원 및 난지농업연구소에서 제공 받은 한우와 흑한우 수컷 26개월령의 심장, 신장, 소장, 대장, 폐, 등심, 간, 지방조직 등의 장기를 사용하여 제조하였다. 먼저 1ml의 Trizol Reagent (Gibco BRL, USA)에 0.2g의 조직을 넣고 1분간 균질화한 후 200 μ l의 chloroform을 넣은 다음 강하게 흔들어서 혼합하였다. 그 다음 500 μ l의 isopropyl alcohol을 넣고 혼합한 다음 12,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C 조건에서 10분 원심하여 침전을 회수한 다음 70% 에탄올로 세정하여 Total RNA를 회수하였다. 사용 전까지 RNase-free water에 녹여 -70 $^{\circ}$ C에 보존하였다.

2. RT-PCR에 의한 한우 및 흑한우 C/EBP β cDNA cloning과 염기배열 결정

한우 및 흑한우 등심으로부터 제조된 Total RNA 5 μ g을 사용하여 Superscript II RNaseH-reverse transcriptase (Invitrogen, Netherlands)와 random primer를 이용하여 다음과 같이 first

strand cDNA를 합성하였다. 먼저 5 μ g의 total RNA와 240 ng random primer을 혼합하여 전체 12 μ l가 되도록 다음 70 $^{\circ}$ C에서 10분간 처리하였다. 여기에 4 μ l 5 \times 1st strand buffer, 2 μ l 0.1M DTT, 1 μ l 10mM dNTP mix (10mM each)을 넣고 25 $^{\circ}$ C 10분, 42 $^{\circ}$ C 2분 처리 후 1 μ l Super-script II을 넣고 42 $^{\circ}$ C 50분, 55 $^{\circ}$ C 30분 반응하여 first strand cDNA를 합성하였다. PCR은 1 μ l first strand cDNA를 사용하여 NCBI에 보고된 bovine C/EBP β 유전자 (accession No. NM_176788)에 상응하는 20 pmole sense (ATGCAACGCCTGGTGGTCTG)와 antisense (CTAGCAGTGGCCGGAGGAGG) primer를 이용하여 1 \times PCR buffer, 0.5U Ex Taq polymerase (TaKaRa, Japan), 각 2.5 mM dNTP 조성으로 denaturation 94 $^{\circ}$ C 30초, annealing 55 $^{\circ}$ C 30초, extension 72 $^{\circ}$ C 1분 30초, 35 cycle의 반응조건으로 PCR을 수행하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였으며 염기서열 결정을 위하여 T-vector (Promega, USA)에 subcloning 하였다. 염기서열 결정은 ABI PRISM 377 sequencer (Applied Biosystems, USA)를 사용하여 결정하였다. 결정된 염기서열의 분석은 Genetyx-win (version 4.0)을 이용하여 분석하였다.

3. Northern blotting에 의한 발현 분석

Northern blotting을 위하여 20 μ g의 한우 각 장기의 Total RNA를 glyoxal (Sigma, USA)에 의하여 변성시키고 1.5% agarose gel에서 10mM sodium phosphate buffer를 이용하여 20V로 17시간 전기영동한 다음 zeta-probe membrane (Bio-Rad, USA)에 전이시켰다. membrane은 5 \times SSPE, 5 \times Denhardt's, 1% SDS (w/v), 50% formamide(w/v)을 포함하는 용액에서 42 $^{\circ}$ C, 15시간 hybridization을 실시하였다. probe는 cloning된 C/EBP β 1,047bp의 DNA 단편을 random labeling kit (Amersham, UK)와 [α - 32 P]dCTP (110TBq/mmol, Amersham, UK)를 이용하여 제조하였다. membrane은 hybridization 후 0.3% SSC, 0.1% SDS(w/v)에서 68 $^{\circ}$ C, 30분, 3회 세척한 다음 autoradiography를 실시하였다.

4. 한우 C/EBP β basic leucine zipper 영역에서의 PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism)

축산연구원으로부터 제공 받은 한우 10개체의 genomic DNA를 이용하여 C/EBP β basic leucine zipper (bZIP) 영역에 대한 PCR을 수행하였다. PCR은 100 ng genomic DNA를 사용하여 NCBI에 보고된 bovine C/EBP β 유전자 (accession No. NM_176788)에 상응하는 20 pmole sense (GCCCTCGCAGGTCAAGAGCA)와 antisense (CCTCTCCGGCCACTGCTAG) primer를 이용하여 10 \times PCR buffer II, 0.125U Super Taq PLUS polymerase (RexGene Biotech Co., Korea), 각 2.5 mM dNTP, 5 μ l DMSO 조성으로 denaturation 94 $^{\circ}$ C 20초, annealing 64 $^{\circ}$ C 15초, extension 72 $^{\circ}$ C 30초, 33 cycle의 반응조건으로 수행하였다. PCR product는 한우와 Japanese black cattle의 C/EBP β bZIP 영역간의 염기의 차이로 인해 나타난 Dde I (New England Biolabs, UK)과 Eco52 I (TaKaRa, Japan) 제한효소로 절단하고, 5% polyacrylamide gel에서 전기영동하여 확인하였다.

III. 결과 및 고찰

1. RT-PCR에 의한 한우와 흑한우 C/EBP β 유전자의 동정

지방분화 초기단계에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 보고되고 있는 C/EBP β 유전자를 한우 및 흑한우에서 동정하기 위해, 26개월령 수컷의 등심으로부터 total RNA를 추출하였다. Yamaoka (1997년)에 의하여 보고된 Japanese black cattle C/EBP β 로부터 제작된 sense primer와 antisense primer를 이용하여 RT-PCR을 수행한 후 전기영동을 실시한 결과, 증폭될 수 있는 DNA 크기와 일치하는 1,047bp의 밴드를 Fig. 1에 나타난 바와 같이 검출할 수 있었으며, 이를 T-vector에 subcloning하여 염기배열을 결정하였다.

본 연구에서 cloning된 한우 C/EBP β 유전자

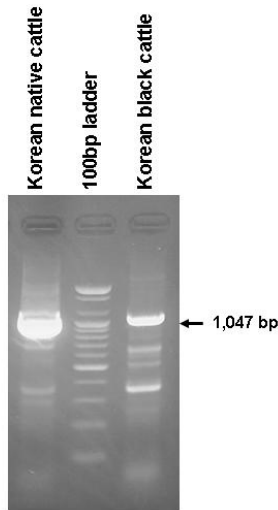


Fig. 1. RT-PCR of Korean native cattle and black cattle C/EBP β gene. Total RNA from Korean native cattle and black cattle sirloin aged 26 months was isolated using TRI-zol Reagent. Synthesis of first strand cDNA was performed using Superscript II RNase H-reverse transcriptase (Invitrogene) with random primer and 5 μ g of total RNA as template. PCR-amplification was carried out with C/EBP β specific primer. The band (1047bp) is C/EBP β gene amplified by RT-PCR.

는 그림 2에 제시된 바와 같이 1,047bp 염기서열과 348개의 아미노산으로 구성되어 있었으며 흑한우에서도 동일하였다. 또한 사람과 설치류에서 보고되어진 바와 같이 C/EBP β 내에 leucine

zipper domain이 존재함을 확인하였다. leucine zipper domain은 C/EBP family간의 dimerization이 일어나는 곳으로서, dimerization 후 DNA 결합 능력을 갖게 되어 전사인자로서 역할을 하

1	ATGCAACGCCTGGTGGTCTGGGACCCAGCATGTCTCCCCCTGCCGCGCGCCGCGCCCGCC	
	M Q R L V V W D P A C L P L P P P P P A	20
61	TTTAAATCCATGGAAGTGGCCAATTCTACTACGAGGCGGACTGCTTGGCTGCTGCGTAC	
	F K S M E V A N F Y Y E A D C L A A A A Y	40
121	GGCGGCAAGGCGGCCCGCGCGCCCGCGGCGCCAGACCCGGGCGCGCCCGCCCGCC	
	G G K A A P A A P P A A R P G P R P P A	60
181	GGCGAGCTGGGTAGCATCGGAGAGCAGAGCGCGCCATCGACTTCAGCCCTACCTGGAG	
	G E L G S I G E H E R A I D F S P Y L E	80
241	CCGCTGGGCGCGCGCAGGCCCGCGCACCCACCACGGCCTCGGACACCTTCGAGGCGGCT	
	P L G A P Q A P A P T T A S D T F E A A	100
301	CCGCGCGCGCCCGCCCGCGCGCCCGCCTCCTCCGGGCAGCACCCAGACTTCCTCTCCGAC	
	P P A P A P A P A S S G Q H H D F L S D	120
361	CTCTTCTCCGACGACTACGGGGCAAGAAGTGCAGGAGGCGGCGGAGTACGGCTACGTG	
	L F S D D Y G G K N C K K A A E Y G Y V	140
421	AGCCTGGGCGCCTGGGGCCGCGCAAGGGAGCGCTGCACCCGGGCTGCTTCGCGCCCGCTG	
	S L G R L G A A K G A L H P G C F A P L	160
481	CACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGGCGGAGCTCAAGGCGGAGCCGGGCTTCGAG	
	H P P P P P P A E L K A E P G F E	180
541	CCCGCGGACTGCAAGCGGAAGGAGGAGGCGGAGCTCCGGGCGGCGGCGCGCGCGGCGATG	
	P A C K R K E E A G A P G G G A A G M	200
601	GCGGCGGCTTCCCGTACGCGCTGCGCGCCTACCTCGGCTACCAGGCGGTGCCGAGCGGC	
	A A G F P Y A L R A Y L G Y Q A V P S G	220
661	AGCAGCGGGAGCCTGTCCACGTCCTCGTCCAGCCCGCGCACGCCAAGCCCGCC	
	S S G S L S T S S S S S P P G T P S P A	240
721	GACGCCAAGGCGACCCCGCGCGCGCGCCTGTTACGCGGGGGCGGCGCGCGCGCCCTCG	
	D A K A T P A A A A C Y A G A A P A P S	260
781	CAGGTCAAGAGCAAGGCCAAGAAGACGGTGGACAAGCACAGCGACGAGTACAAGATCCGG	
	Q V K S K A K K T V D K H S D E Y K I R	280
841	CGGGAGCGCAACAACATCGCGGTGCGCAAGAGCGCGACAAGGCCAAGATGCGCAACCTG	
	R E R N N I A V R K S R D K A K M R N L	300
901	GAGACGCAGCACAAAGTCTTGGAGCTCACGGCCGAGAACGAGCGGCTCCAGAAGAAGGTG	
	E T Q H K V L E L T A E N E R L Q K K V	320
961	GAGCAACTGTGCGCGGAGCTCAGCACCCCTGCGGAACCTTGTTCAAAGCAGCTGCCCGAGCCT	
	E Q L S R E L S T L R N L F K Q L P E P	340
1021	CTGCTCGCCTCCTCCGGCCACTGCTAG	
	L L A S S G H C *	348

Fig. 2. Nucleotide and deduced amino acid sequences of Korean native cattle C/EBP β . Nucleotide residues are numbered on the left; amino acids are numbered on the right. Nucleotide 1 is the A of the initiator AUG codon of C/EBP β . The in-frame translation termination codon at 1,046 is indicated by asterisk. Leucine zipper domain is underlined. The C/EBP β cDNA includes a 1,044bp open reading frame encoding a protein of 348 amino acids.

게 된다. 한우 C/EBPβ의 leucine zipper domain은 272번째 아미노산인 lysine부터 335번째의 lysine까지 64개의 아미노산으로 구성되어 있었다.

동정된 한우 및 흑한우 C/EBPβ의 아미노산 서열을 Japanese black cattle과 다른 동물에서의 C/EBPβ 아미노산 서열과 비교분석하여 유전정보의 보존여부를 확인하였다 (Fig. 3). Cloning된 한우 C/EBPβ 유전자를 NCBI에 등록된 Japanese black cattle C/EBPβ (NCBI accession No. NM_176788) 아미노산 서열과 비교한 결과 97.7%의 상동성을 나타내었다. 그러나 한우와 흑한우 간에는 상동성이 99.71%로 Japanese black cattle보다 높은 결과를 나타내었다. 특히, 한우 C/EBPβ 아미노산 서열 중 10번째 alanine, 52번째 alanine, 60번째 alanine, 102번째 proline, 107번째 alanine, 336번째 glutamine은 Japanese black

cattle에서 각각 valine, aspartic acid, threonine, serine, valine, threonine으로 치환된 상태를 보였다 (Fig. 3). 그리고 leucine zipper domain 내 311번째 alanine이 glycine으로, 327번째 leucine이 valine으로 바뀌는 것을 확인하였다. serine이나 threonine으로 변환된 60번째, 102번째, 336번째 아미노산들은 모두 C/EBPβ의 활성화를 일으키는 repressor domain에 위치하지 않는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 한우 C/EBPβ에 있어서 유전자 polymorphism의 존재 가능성을 나타내고 있다. 그리고 Park 등 (2004)에 의해서 생쥐 C/EBPβ의 repressor domain에 존재하는 188번째 아미노산인 threonine의 인산화가 지방분화 프로그램을 유도하는 것으로 보고되었는데, 한우 C/EBPβ에서는 상동성 검색에 의하여 생쥐의 188번째 아미노산과 일치하는 236번째 threonine

Korean native cattle	1	MQRLVVWDFP	CLPLPPPPPA	FKSMEVANFY	YEADCLAAAY	GGKAAPAAPP	AARPGPRPPA
Korean black cattle	1	-----	-----	-----G---	-----	-----	-----
Japanese black cattle	1	-----V	-----	-----	-----	-----	-D-----T
Human	1	-----A-	-----	-----	-----	-----	-----
Chicken	1	-----A--A-	-----IQ--	-----	-----	*****-ALNKL	HP-AAGGRSM
Mouse	1	-----	-----	-----	MHRLAWD-A	CLPPP--FR	PMEVANFYFE
Rat	1	-----	-----	-----	MHRLAWD-A	CLPPP--FR	PMEVANFYFE
	61	GELGSIGEHE	RAIDFSPLYE	PLGAPQAPAP	TTASDTFEAA	PPAPAPAPAS	SGQHDFLSD
	61	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	61	-----	-----	-----	-----	-S---V--	-----
	61	-----D-	-----	-----	A-T-----	-----	-----
	51	T--*TV-D--	-----D	--A-S-Q-Q	PPPP****--	AAGGNFE--C	-SGGQ----
	31	PDCLAY-AKA	ARAAPRAPAA	EPAIGEHERA	IDF-PYL-PL	A-*A-DFA-P	APA-----
	31	PDCLAY-AKA	ARAAPRAPAA	EPAIGEHERA	IDF-PYL-PL	A--A-DFA-P	APA-----
	121	LFSDDYGKGN	CKKAAEYGYV	SLGRLGAAKG	ALHPGCFAPL	HPPPPPPPPP	AELKAEPGFE
	121	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	121	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	121	-----	-----P	-----	-----	-----	-----
	106	--AE--K-SG	GG-KPD-T-I	--T-H-HPC-	***SQSHK-G	VL-GCF--QI	V-T-V--V--
	90	--A---A-P	S--P-D---	---A*-A-	*P-A-***	*****--	-A-----
	91	--A---A-P	S--PSD---	---A*-A-	*P-A-***	*****--	-A-----
	181	PAD*CK*RKE	EAGAPGGGAA	GMAAGFPYAL	RAYLGYQAVP	SGSSGSLSTS	SSSSPPGTPS
	181	-----*	-----	-----	-----	-----	-----
	181	-----*	-----	-----	-----	-----	-----
	181	-----*	-----	-----	-----	-----	-----
	163	TL-S--GPRK	-E-GA-P-PG	--SSPYGSTV	-S-----S-	-----N-	-----N
	140	---*--AD	D**-*P	A-----F-	-----T-	-----	-----
	141	---*--AD	D**-*P	A-----T-	-----	-----	-----
	239	PADAKATPAA	AACYAGAAPA	PSQVSKAKK	TVDKHSDEYK	IRRERNIAV	RKSRDKAKMR
	239	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	239	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	238	-----*PP	T-----G-	-----	-----	-----	-----
	223	-SESSKSA-G	-GG-S-****	-PAG-N-P-	C-----	-----	-----
	191	-----A**	--F--PPA-	-A*-A---	---L----	M-----	-----
	192	-----A**	--F--PPA-	-A*-A---	A--L----	M-----	-----
						identity (%)	
	299	NLETQHKVLE	LTAENRLLQK	KVEQLSRELS	TLRNLFKQLP	EPLLASSGHC	--
	299	-----	-----	-----	-----	-----	99.71
	299	-----	-----G-----	-----	-----V-	-----T-	97.70
	296	-----	-----	-----	-----	-----	96.55
	279	-----	-----	-----	-----	-----PR-	58.85
	247	-----	-----	-----	-----	-----A-	74.60
	248	-----	-----	-----	-----	-----A-	75.00

Fig. 3. The deduced amino acid sequence of Korean native cattle C/EBPβ was compared mammalian species; Korean black cattle, Japanese black cattle (NCBI accession No. NM_176788), human (NCBI accession No. NM_005194), chicken (NCBI accession No. NM_205253), mouse (NCBI accession No. NM_009883), rat (NCBI accession No. NM_024125). Identical amino acid residues are indicated by dashes and one gap is indicated by asterisk(*).

이 C/EBP β 의 인산화에 관여할 것으로 사료된다. NCBI에 등록된 사람(NCBI accession No. NM_005194), 닭(NCBI accession No. NM_205253), 생쥐(NCBI accession No. NM_009883), 쥐(NCBI accession No. NM_024125)의 C/EBP β 아미노산 서열은 한우 C/EBP β 와 각각 96%, 58%, 74%, 75%의 상동성을 나타내었다. 각각의 상동성에 다소 차이가 나타나지만, leucine zipper domain이 존재하는 C-terminal 부분에서는 매우 높은 종간의 상동성을 보이고 있었다. 이와 같이 C/EBP β 의 기능에 중추적인 역할을 하는 leucine zipper domain이 종간에 높은 상동성을 나타낸다는 것은 C/EBP β 유전자가 동물에 있어서 매우 중요한 기능을 수행하는 것으로 사료되며 진화에 따라 잘 보존되어 있음을 알 수 있었다.

2. 한우 C/EBP β 유전자의 발현양상 분석

사람과 생쥐, 쥐에 있어서 C/EBP β 는 간, 소장, 폐, 지방조직에서 높게 발현되는 것으로 보고되고 있으며, 또한 생쥐에서는 신장, 심장, 비장에서도 검출됨을 확인하였다(Cao 등, 1991; Thomassin 등, 1992; Lekstrom-Himes 등, 1998). 그러나 소과에서는 Angus beef cow의 간 조직에서 C/EBP β 가 발현된다는 것 이외에 보고된 바가 없다(Eleswarapu 등, 2005). 그러므로 한우 C/EBP β 의 발현 양상을 26개월령 수컷 한우의 조직에서 northern blotting에 의하여 확인하였다. 그 결과 Fig. 4에 나타난 바와 같이 C/EBP β 는 폐, 등심, 피하지방 조직에서 발현을 보이고 있었다. Eleswarapu (2005) 등이 Angus beef cow의 간 조직에서 C/EBP β 가 발현된다는 보고가 있었지만 한우의 간 조직에서는 C/EBP β 가 발현되지 않음을 확인하였다. 이와 같은 차이는 보다 정확하게 real-time RT-PCR과 같은 방법에 의하여 확인되어야 할 것으로 사료된다. 비록 폐, 등심, 지방 조직에서 C/EBP β 의 발현 양이 모두 약하게 나타나지만, 지방조직이 다른 두 조직보다 좀 더 높은 발현을 보이고 있었다. 이러한 결과로 한우 C/EBP β 유전자가 지방분화에 관여할 것으로 사료되며, 앞으로 더 자세한 연구가 필요할 것이다.

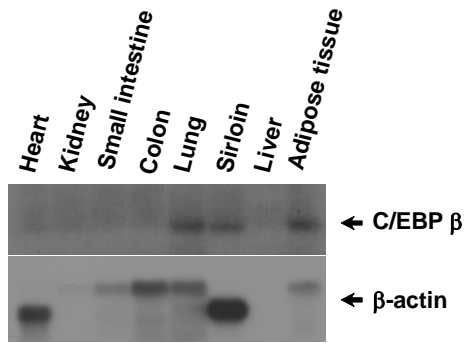


Fig. 4. Northern blot analysis of Korean native cattle C/EBP β mRNA in various tissues. Total RNA (20 μ g) prepared from the indicated Korean native cattle tissues was subjected to electrophoresis on a 1.5% agarose gel, blotted onto a zeta-probe membrane, and then hybridized with the 32 P-labeled 1,047bp fragment of Korean native cattle C/EBP β . The filter was washed in 0.3 \times SSC containing 0.1% SDS (w/v) at 68 $^{\circ}$ C for 30min and then exposed to Kodak XAR-5 film with an intensifying screen at -80 $^{\circ}$ C for 78h. Control hybridization with a bovine beta-actin probe is shown in the lower portion.

3. 한우 C/EBP β basic leucine zipper 영역의 polymorphism 분석

본 연구에서는 Cloning된 한우 C/EBP β 와 NCBI에 등록된 Japanese black cattle C/EBP β 의 basic leucine zipper protein(bZIP) 영역 내에서 932번째, 979번째 염기가 각각 cytosine에서 guanine으로 바뀌면서(Fig. 5-a), 아미노산 서열에서도 311번째 alanine이 glycine으로, 327번째 leucine이 valine으로 바뀌는 것을 확인하였다(Fig. 5-b). 이러한 아미노산 배열의 차이는 bZIP 영역내의 polymorphism의 가능성을 보여주고 있다. 하지만 한우와 흑한우간의 bZIP 영역에서 염기와 아미노산의 차이는 나타나지 않았다. C/EBP β 의 bZIP 영역에서 polymorphism을 분석하기 위해 축산연구소에서 제공된 한우 10개체의 genomic DNA를 이용하여 274bp의 bZIP 영역을 PCR로 증폭시켰다. Polymorphism은 restriction fragment length polymorphism (RFLP) 방법을 이용하여 검증하였으며, 932번째 염기

(a)

Korean native cattle	814	AAGCACAGCG	ACGAGTACAA	GATCCGGCGG	GAGCGCAACA	ACATCGCGGT	GCGCAAGAGC
Korean black cattle	814	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Japanese cattle	814	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	874	CGCGACAAGG	CCAAGATGCG	CAACCTGGAG	ACGCAGCACA	AGGTCCTGGA	GCTCACGGCC
	874	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	874	-----	-----	-----	-----	-----	-----G-
	934	GAGAACGAGC	GGCTCCAGAA	GAAGGTGGAG	CAACTGTGCG	GCGAGCTCAG	CACCCCTGCGG
	934	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	934	-----	-----	-----	-----	-----	-----G-----
	994	AACTGTTCA	AG				
	994	-----	--				
	994	-----	--				

(b)

Korean native cattle	272	KHSDEYKIRR	ERNNIAVRKS	RDKAKMRNLE	TQHKVLELTA	ENERLQKKVE	QLSRELSTLR
Korean black cattle	272	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Japanese cattle	272	-----	-----	-----	-----G	-----	-----V-----
	332	NLFK					
	332	----					
	332	----					

Fig. 5. Alignment of nucleotide (a) and amino acid (b) in the basic leucine zipper domain of Korean native cattle, Korean black cattle and Japanese black cattle C/EBP β . The cytosine of 932 and 979 nucleotide was replaced with guanine between Korean native cattle and Japanese black cattle. Restriction enzyme digestion pattern in the Korean native cattle C/EBP β bZIP domain digested with Eco52 I and Dde I restriction enzyme, but not digested in the Japanese black cattle.

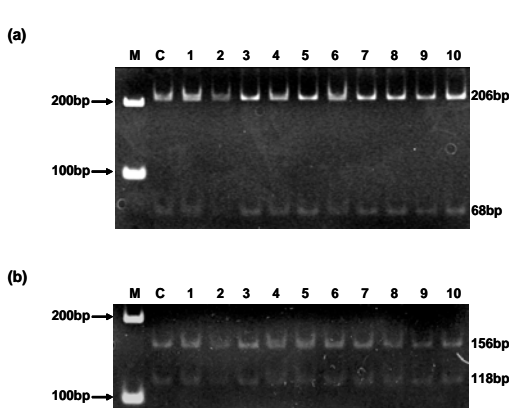


Fig. 6. PCR-RFLP of basic leucine zipper domain of Korean native cattle C/EBP β gene. The bZIP domain in C/EBP β was cloned by PCR using genomic DNA of Korean native cattle. PCR products of bZIP domain in C/EBP β were digested with Eco52 I (a) and Dde I (b). The C/EBP β bZIP domain were cut by enzyme reaction (lane 1~10).

는 Eco52 I, 979번째 염기는 Dde I 제한효소를 이용하여 염기변이를 확인하였다. 그 결과 모든 한우 개체에서 Eco52 I, Dde I 제한효소 반응이 일어났다(Fig 6). 본 연구에서 한우 10개

체에 대하여 조사한 결과 한우 C/EBP β 유전자의 bZIP 영역 내에서는 polymorphism이 일어나지 않음을 알 수 있었다.

IV. 요약

지방세포분화 초기에 중요한 역할을 수행하는 것으로 보고되고 있는 C/EBP β 유전자를 cloning하기 위하여 한우 26개월령 등심조직을 이용하여 Total RNA를 추출하고 RT-PCR을 수행한 결과 한우 및 흑한우 C/EBP β 는 1047bp, 348 아미노산 서열을 가지고 있었다. 한우 및 흑한우 C/EBP β 의 아미노산 서열을 NCBI에 등록된 Japanese black cattle C/EBP β (NCBI accession No. NM_176788) 비교한 결과 약 97%의 상동성을 나타내었다. 또한 인간, 닭, 생쥐, 쥐의 C/EBP β 아미노산 서열을 비교한 결과 각각 96%, 58%, 74%, 75%의 상동성을 나타내었다. 그러나 각 종간의 leucine zipper domain간의 상동성은 매우 높게 나타났다. 한우 C/EBP β 의 발현은 폐, 등심, 지방조직에서 나타나고 있으나, 지방조직에서 좀 더 많은 발현을 보이고 있었다. 그리고 C/EBP β 유전자의 bZIP 영역에서

polymorphism이 나타나지 않음을 확인하였다.

V. 사 사

This work was supported by a grant(Code # 20050301034442) from the BioGreen 21 Program, Rural Development Administration, Republic of Korea.

1 BK21 장학금을 지급 받았으며 이에 감사드립니다.

Data deposition : The sequence reported in this paper has been deposited in the GenBank database(accession no. NM_176788).

VI. 인 용 문 헌

- Brun, R. P., Kim, J. B., Hu, E., Altioik, S. and Spiegelman, B. M. 1996. Adipocyte differentiation: a transcriptional regulatory cascade. *Curr Opin Cell Biol.* 8:826-832.
- Cao, Z., Umek, R. M. and McKnight, S. L. 1991. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes & Dev.* 5:1538-1552.
- 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* 88:2593-2597.
- Cianzio, D. S., Topel, D. G., Whitehurst, G. B., Beitz, D. C. and Self, H. L. 1985. Adipose tissue growth and cellularity: changes in bovine adipocyte size and number. *J Anim Sci.* 60:970-976.
- Eleswarapu, S. and Jiang, H. 2005. Growth hormone regulates the expression of hepatocyte nuclear factor-3 gamma and other liver-enriched transcription factors in the bovine liver. *J. Endocrinol.* 184:95-105.
- Hamm, J. K., Park, H. P. and Farmer, S. R. 2001. A role for C/EBP β in regulating peroxisome proliferator-activated receptor γ activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem.* 276:18464-18471.
- Harper, G. S. and Pethick, D. W. 2004. How might marbling begin? *Australian Journal of Experimental Agriculture.* 44:653-662.
- Jeoung, Y. H. and Lee, S. M. 2004. Molecular cloning and mRNA expression of the bovine peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ). *J. Anim. Sci. & Technol.(Kor.)* 46:23-30.
- Lekstrom-Himes, J. and Xanthopoulos, K. G. 1998. Biological role of the CCAAT/Enhancer-binding protein family of transcription factors. *J. Biol. Chem.* 273:285450-285458.
- Loftus, T. M. and Lane, M. D. 1997. Modulating the transcriptional control of adipogenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 7:603-608.
- Mandrup, S. and Lane, M. D. 1997. Regulating Adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 272:5367-5370.
- Park, B. H., Qiang, L. and Farmer, S. R. 2004. Phosphorylation of C/EBP β at a consensus extracellular signal-regulated kinase/glycogen synthase kinase 3 site is required for the induction of adiponectin gene expression during the differentiation of mouse fibroblasts into adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* 24:8671-8680.
- Grimaldi, P. A. 2001. The roles of PPARs in adipocyte differentiation. *Progress in Lipid Research.* 40:269-281.
- Tang, Q. -Q., Jiang, M.-S. and Lane, M. D. 1999. Repressive effect of Sp1 on the C/EBP α gene promoter: Role in adipocyte differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 19:4855-4865.
- Tang, Q. -Q., Otto, T. C. and Lane, M. D. 2003. CCAAT/enhancer-binding protein β is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 100:850-855.
- Thomassin, H., Hamel, D., Bernier, D., Guertin, M. and Belanger, L. 1992. Molecular cloning of two C/EBP-related proteins that bind to the promoter and the enhancer of the α 1-fetoprotein gene. Further analysis of C/EBP β and C/EBP γ . *Nucleic Acids Res.* 20:3091-3098.
- Yamaoka, I., Taniguchi, Y. and Sasaki, Y. 1997. Rapid communication: nucleotide sequence of bovine C/EBP beta gene. *J. Anim. Sci.* 75:587.
- Zhang, J. W., Tang, Q. Q., Vinson, C. and Lane, M. D. 2004. Dominant-negative C/EBP disrupts mitotic clonal expansion and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 101:43-47.

(접수일자 : 2007. 8. 6. / 채택일자 : 2008. 4. 18.)