

DNA Microarray 분석을 통한 한우 부위별 특이 마커 유전자의 발굴

이은주^{1,2} · 신유미² · 이현정³ · 윤두학³ · 전태훈⁴ · 이용석^{2,5} · 최인호^{1,2*}

¹영남대학교 생명공학부, ²소유전체은행, ³농촌진흥청 국립축산과학원, ⁴고려대학교 생명과학대학, ⁵인제대학교 의과대학 기생충학교실

Identification of Cuts-specific Myogenic Marker Genes in Hanwoo by DNA Microarray

Eun Ju Lee^{1,2}, Yu Mi Shin², Hyun-Jeong Lee³, Duhak Yoon³, Taehoon Chun⁴, Yong Seok Lee^{2,5}, Inho Choi^{1,2*}

¹School of Biotechnology, Yeungnam University, Gyeongsan, ²Bovine Genome Resources Bank, Yeungnam University,

³National Livestock Research Institute, ⁴School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University,

⁵Department of Parasitology, College of Medicine, Inje University Busan, Republic of Korea

ABSTRACT

Myogenic satellite cells (MSCs) are mononuclear, multipotent progenitors of adult skeletal muscle possessing a capacity of forming adipocyte-like cells (ALC). To identify the skeletal muscle type-specific myogenic and adipogenic genes during MSCs differentiation, total RNA was extracted from bovine MSCs, myotube-formed cell (MFC), and ALC from each of *Beef shank*, *Longissimus dorsi*, *Deep pectoral*, and *Semitendinosus*. DNA microarray analysis (24,000 oligo chip) comparing MSCs with MFC and ALC, respectively, revealed 135 differentially expressed genes (>4 fold) among four cuts. Real-time PCR confirmed expression of 29 genes. Furthermore, the whole tissue sample RNAs analysis showed 6 differentially expressed genes in *Beef shank*. Among which, 1 gene in MSCs, 4 in MFC, and 1 in ALCs were highly expressed. This study will provide an insight for better understanding the molecular mechanism of differentiation of skeletal muscle type-specific MSCs. The identified genes may be used as marker to distinguish skeletal muscle types.

(Key words) : Skeletal muscle type-specific myogenic and adipogenic genes, Hanwoo, DNA marker, Myogenic stem cell, Muscle cell

서 론

골격근의 유전자에 대한 연구는 양질의 고기 생산에 주요한 부분으로 작용하고 있기 때문에 육질 및 육량에 관련된 근육 구조 관련 유전자에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다(Eggert 등, 2002). 골격근은 다양한 근원섬유 단백질(myofibril protein)로 구성된 다양한 종류의 섬유들로(fibers) 구성되어 있으며, 4개의 MHC(myosin heavy-chain)와 3개의 MLC(myosin light chain)를 포함한다. 이 중 MHC의 경우 다양한 근육 섬유 유형을 분별하는데 주요한 역할을 하는 단백질이다(Schiaffino and Reggiani, 1996). 또한 TPM(tropomyosin) 중 TPM1과 TPM3의 경우 근육 부위와 기능에 따라 다양한 발현 양상을 보인다(Oe 등, 2007). 국내 쇠고기 부위별 상품은 대분할 10개 부위 및 소분할 29개 부위로 나누어져 있으며(농림부 고시 제2005-50호: 식육의 부위별·등급별 및 종류별 구분방법) 부위마다 근육 내 성분조성 및 조직 특성에 따라 다양한 육질특성을 가지고 있다. 본 연구에서 사용한 등심

(*Longissimus dorsi*)의 경우 결이 가늘고 육질 및 지방 침착이 우수하며 양지(*Deep pectoral*)의 경우 다소 거칠지만 지방을 함유하고 있어 육질이 부드럽다. 흉두께(*Semitendinosus*)의 경우 근육의 양이 많으며 지방함량이 거의 없어 질기며, 사태(*Beef shank*)의 경우 근막(myofascia)이 발달되어 있고 근육 결이 굵고 단단하다. 이처럼 조성과 유전자 발현에 따라 근육의 특성뿐만 아니라 가격도 다양하다. 근육부위에 대한 연구가 진행 중이나 현재까지 등심, 우둔과 같은 주요 부위의 육질특성에 대한 한정된 연구는 많았으나 다양한 부위에 대한 연구가 적었다(Cho 등, 2007). 근육 줄기세포(myogenic satellite cell)는 골격근의 근초(sarcolemma)와 기저막(basal lamina) 사이에 위치하며 근원섬유(myofiber)와는 뚜렷하게 구분되는 성체 줄기세포로서 근육의 성장과 재생에 관여하는 세포이다. 외부의 자극이 없을 때는 아무런 활동성을 가지지 않으며, 외부자극이 주어 졌을 때 세포는 증식 및 분화를 시작하며, 근섬유를 형성한다(Hawke와 Garry, 2001). 근육줄기세포는 지방세포, 뼈 세포로도 이행분화가 가능하다(Singh 등, 2007, Rachel 등,

* Corresponding author : Inho Choi, School of Biotechnology, Yeungnam University, 214-1 Dae-dong, Gyeongsanbuk-do, Gyeongsansi, 712-749. Tel: +82-53-810-3024, Fax: +82-53-810-4769, E-mail: inhochoi@ynu.ac.kr

2006). 근육 줄기세포에 대한 연구는 부위별 근육세포의 기원을 이해하는데 중요한 자료를 제공할 것으로 사료된다.

따라서 본 연구는 이러한 근육의 부위에 따른 특징을 분자생물학적으로 규명하기 위해 사태, 등심, 양지, 홍두께 4개의 부위에서 근육줄기세포를 분리하고 근육세포 및 지방세포로 분화시킨 후 RNA를 추출하여 DNA microarray와 real-time PCR 분석을 통해 각각의 부위별 특이 유전자를 연구하고자 하였다. 이러한 연구결과는 부위별 근육 줄기세포의 기원, 고기 부위별 판별 및 근육의 육량 증가 및 육질 향상 관련 연구에 중요한 자료를 제공할 뿐만 아니라 RNA 정량 분석을 통해 보다 간편하고 정확한 부위별 구분이 가능하게 될 것으로 사료된다. 특히 본 연구는 부분육으로 발골 시 부위별로 구분방법이 매우 어려운 점을 해결할 수 있는 바이오 마커 개발을 통해 부분육 상태에서도 유전자 감식법을 이용할 수 있는 근거자료를 제시하였다.

재료 및 방법

1. 근육조직 채취

근육줄기세포의 추출을 위해 당일 도축한 소의 사태, 등심, 양지, 홍두께 각각의 부위에서 근육 부위를 적출 한 후 멸균된 플라스틱 비닐 백에 운반하였다. 근육은 24~26개월의 약 550~600 kg 정도의 거세우 적출 하였다.

2. 근육줄기세포 추출 및 배양

각 부위별 근육조직은 생리식염수(PBS: phosphate buffered saline)에서 헹군 후 잘게 자르고 trypsin-EDTA (GIBCO, Carlsbad, CA, USA)와 함께 2시간 동안 37°C에서 소화(digestion) 하였다. 소화를 마치고 90 g에서 3분 동안 원심분리를 진행한 후 40 μ m strainer에서 걸러낸 상층액을 2,500 rpm에서 20분 동안 원심분리를 하였다. 상층액을 버리고 배양 배지 10 ml 정도를 첨가한 뒤 2,500 rpm 에서 20분 동안 원심분리를 2번 반복하였다. 원심분리를 마친 후 세포층에 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; HyClone Laboratories, Logan, UT, USA)/10% FBS(Fetal bovine serum; HyClone Laboratories) / 1% P.S(Penicillin-streptomycin; invitrogen, Carlsbad, CA, USA)이 포함된 배지에 부유하고 100 mm 세포배양접시에 분주 후 배양기(37°C/5% CO₂)에 넣어 이틀 마다 한 번씩 배지를 교체하였다.

3. 근육줄기세포의 분화 및 이형분화 처리

각 부위별 근육줄기세포의 근육분화를 위해 줄기세포를 DMEM/10%FBS/1% P.S에서 14일 동안 배양하였다. 지방세포로의 분화를 위해서 세포가 약 90% 이상 배양 접시에 찻을 때 이형분화 유도에 필요한 용액(DMEM/10% FBS/1% P.S에 33 μ M biotin

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 17 μ M pantothenate (Sigma-Aldrich), 200 μ M ascorbic acid (Sigma-Aldrich), 1 mM carpylic acid (Sigma-Aldrich), 10 mM acetic acid (Sigma-Aldrich), 10 μ g/ml insulin (Sigma-Aldrich), 5 mM dexamethasone (Sigma-Aldrich), 0.5 mM 3-Isobutyl-1-methylsanthine (Sigma-Aldrich), 10 μ M thiazolidione (Merck, Hohenbrunn, Germany)을 첨가한 후 7일 동안 배양하였으며, 이틀에 한번 씩 이형분화 유도에 필요한 용액이 든 배지로 교체해 주었다.

4. RNA 분리

Trizol reagent (Invitrogen)를 이용하여 각 부위별 근육줄기세포 (배양 8일), 근육으로 분화된 세포 (배양 14일, 21일), 지방으로 분화된 세포 (지방분화처리 후 7일)에서 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC (Diethylpyrocarbonate, Sigma-Aldrich)가 처리된 용액에 녹인 후 분석 전까지 -80°C에 보관하였다. RNA의 농도는 ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA)를 이용하여 측정하였고, 순도는 Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)를 이용해 확인하였다. 각 부위별 조직에서도 세포와 동일한 방법을 이용하여 RAN를 추출 후 순도를 확인하였다.

5. Microarray 분석

24,000개의 oligo-nucleotide (70 mer)가 집적되어 있는 칩 (Texas A&M의 Christine Elisk 팀에서 디자인, Texas A&M, USA)을 이용하여 각각의 근육 부위마다 분화되기 전 근육줄기세포와 근육으로 분화된 세포, 근육줄기세포와 지방으로 분화된 세포에서 추출한 RNA의 조합을 이용하여 유전자 발현차이를 분석하였다. 각각의 조건마다 3반복 실험을 진행하였으며 전체 66장의 칩을 분석에 이용하였다. Microarray 분석 결과 중 각각의 근육 부위에서 4배 이상 발현되고 나머지 3개의 부위에서는 2배 이하로 발현되는 유전자 135개를 선별하여 분석에 이용하였다.

6. Real-time PCR 분석

Microarray 분석 결과를 검증하기 위해 microarray 분석에서 이용한 동일한 RNA를 real-time PCR 분석에 사용하였다 (세포, 조직 모두 3 반복). 1 μ g의 RNA와 oligo (dT)₂₀ 프라이머 (Bioneer, Daejeon, Korea) 그리고 Superscript-II reverse transcriptase (Invitrogen)를 이용하여 cDNA를 합성하였다 (42°C에서 50분, 72°C에서 15분). 합성된 cDNA는 10배로 희석 후 2 μ l를 power SYBR®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 10 pmole의 프라이머를 이용하여 real-time PCR (7500 real-time PCR, Applied Biosystems)을 하였다. PCR 분석을 위해 Predenaturation; 95°C에서 10분, denaturation; 95

℃에서 33초, annealing; 프라이머 최적 온도에서 33초, extension; 72 ℃에서 33초, 총 40회 반응의 프로그램을 이용하였으며 1.2% 아가로즈 겔에서 반응 여부를 확인하였다. Real-time PCR을 통한 c(t) 값 계산은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 이용 하였으며(Lay 등, 2002) 표준화(normalization)는 GAPDH 유전자 값을 이용하였다. PCR에 사용된 프라이머는 NCBI 염기서열 정보를 이용하여 Primer 3 software (<http://frodo.wi.mit.edu>)를 이용하여 디자인하였다(Table 4).

7. 통계 분석

모든 값들은 평균±SEM 값을 이용하였으며, 이 값들은 SAS software package, ver. 9.0 (SAS, Cary, NC, USA)을 이용하여 Tukey’s Studentized Range (HSD) 분석을 통해 유의성을 확인하였다.

결 과

1. DNA microarray 분석

3마리의 소에서 사태, 등심, 양지, 홍두께 부위를 각각 채취한 후 이로부터 MSC(myogenic satellite cell, 근육줄기세포)를 분리하였다. 이렇게 분리한 사태, 등심, 양지, 홍두께의 MSC는 각각 MFC와 ALC로 분화 시켰다. Microarray 분석에 이용한 MSC의 RNA의 경우 각각의 근육에서 분리하여 약 10일간 배양한 후 RNA 를 추출하였다. 이 때 10일 간 배양한 MSC의 경우 분화 된 MSC에서 나타나는 특징인 근관(myotube)의 형성이 전혀 되지 않은 것을 확인한 후 사용하였다(Fig. 1A). MFC(myotube-formed cell, 근관이 형성된 세포)의 경우 MSC를 약 14일 간 배양하여 근관의 형성을 확인한 후 RNA 추출하였다(Fig. 1B). 또한 ALC(adipocyte-like cell, 지방세포와 같은 세포)의 경우 MSC가

배양접시에 90% 정도 찾을 때 이형분화(transdifferentiation) 유도에 필요한 시약들을 약 7일간 처리한 후 세포 내 많은 양의 지방이 축적된 것을 확인한 후 RNA를 추출하였다(Fig. 1C).

이렇게 3마리 소의 4개 부위 근육에서 각각 분리된 MSC와 MSC를 분화시켜 만든 MFC와 이형분화 시켜 만든 ALC로 부터 각각의 RNA를 추출한 후 Garbe 등에 의해 제작 된 microarray (24,000개의 bovine oligo-nucleotide (70 mer)가 집적 된 microarray)를 이용하여 각 세포에서 발현의 차이를 보이는 유전자를 스크리닝 하였다. MSC가 MFC로 분화되는 과정에서 발현이 증가되거나 또는 감소하는 유전자를 스크리닝하기 위해 MSC와 MFC에서 각각 추출한 RNA를 microarray에 혼성화(hybridization)시키고, MSC가 ALC로 이형분화 되는 과정에서 발현이 증가되거나 감소하는 유전자를 스크리닝하기 위해 MSC와 ALC로부터 각각 분리한 RNA를 microarray 혼성화(hybridization)에 사용하였다. Microarray 분석 결과에서 MSC가 MFC로 분화되는 과정과 ALC로 이형분화 되는 과정에서 각각 차이를 나타내는 유전자 중 한 근육 부위에서 유래한 세포를 이용한 실험 군에서는 4배 이상의 차이를 나타내나 나머지 3개의 근육 부위에서는 2배 미만의 차이를 나타내는 유전자를 선별하였다(P≤0.05). 이러한 방법을 통해 사태, 등심, 양지, 홍두께 부위 중 하나의 부위에서 만 MSC의 분화 또는 이형분화 되는 과정에서 특이하게 발현의 차이를 보이는 135개 유전자를 선별하였다(Table 1). 예를 들어 MFC와 비교했을 때 MSC에서 더 많이 발현되는 유전자(S>M) 중 사태 부위에서 유래한 세포에서는 4배 이상 발현의 차이를 보이고, 나머지 3개 근육 부위에서 유래한 세포에서는 2배 이하의 차이를 보인 유전자의 숫자는 총 59개였으나 나머지 세 부위에서 유래한 세포에서는 이러한 유전자가 발견되지 않았다. MSC와 비교했을 때 MFC에서 더 발현되는 유전자(S<M) 중 사태 부위에서 유래한 세포에서는 4배 이상의 차이를 보이며, 나머지 부위에서 유래한 세포에서는 2배 이하의 차이를 보인 유전자의 수는 40개였다. 등심, 양지, 홍두께 부위에서 유래한 세포에서는 4배 이상의 차이를 나타내며 나머지

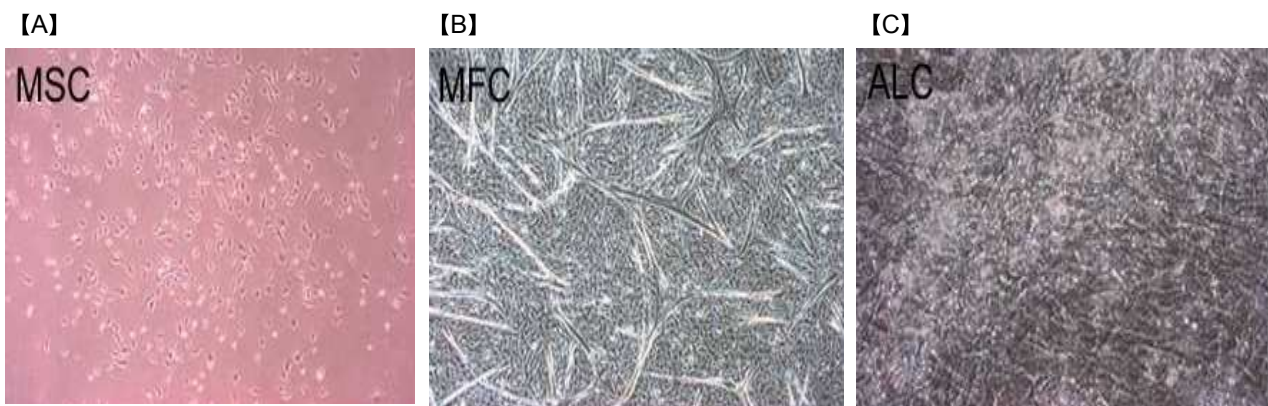


Fig. 1. MSC, MFC, ALC in Beef shank.

MSCs after 10 days of primary culture (A), MFCs after 14 (B), and transdifferentiated ALCs after 7 days of culture in an adipogenic medium (C).

Table 1. Results of DNA microarray analysis of bovine MSC, MFC, and ALC in *Beef shank*, *Longissimus dorsi*, *Deep pectoral*, and *Semitendinosus*

| Skeletal muscle part | S > M ¹⁾ | S < M ²⁾ | S > A ³⁾ | S < A ⁴⁾ |
|--------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <i>Beef shank</i> | 59 | 40 | 7 | 19 |
| <i>Longissimus dorsi</i> | 0 | 4 | 2 | 0 |
| <i>Deep pectoral</i> | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Semitendinosus</i> | 0 | 1 | 2 | 0 |

S = myogenic satellite cell, M = myotube-formed cell, A = adipocyte-like cell

¹⁾ S > M = Genes highly expressed in MSC compared to MFC

²⁾ S < M = Genes highly expressed in MFC compared to MSC

³⁾ S > A = Genes highly expressed in MSC compared to ALC

⁴⁾ S < A = Genes highly expressed in ALC compared to MSC.

부위에서 유래한 세포에서는 2배 이하의 차이를 보인 유전자의 개수는 각각 4개, 1개, 1개로 나타났다.

1의 microarray 분석결과에서 등심부위에서 유래한 근육에서 ALC와 비교해서 SMC가 4배 이상의 유전자 발현을 보이고 나머지 3부위에서는 2배 미만의 차이를 나타낸 유전자(S>T)가 2개 인 반면에 real-time PCR 분석결과에서는 이 2개의 유전자가 유사한 결과를 나타내지 않았다.

2. Real-time PCR 분석 (세포)

Microarray 분석결과에서 확보한 135개의 유전자에 대해 real-time PCR 분석법을 이용해 검증작업을 진행하였다. 위에서 언급한 microarray 분석에 이용한 동일한 RNA로부터 1st strand cDNA를 합성한 후 각 135개의 유전자를 특이적으로 증폭할 수 있는 PCR 프라이머를 이용해 real-time PCR 분석을 실시하였다. Microarray 분석결과에서 부위 특이적으로 유전자 발현의 차이를 나타낸 135개의 유전자 중 29개의 유전자만이 한 부위에서 유래한 세포에서만 4배 이상의 유전자 발현이 증가되고 나머지 3개 부위에서는 2배 미만의 차이를 나타내었다(Table 2). 예를 들어 Table

3. Real-time PCR 분석 (조직)

위에서 선발된 29개의 유전자에 대해 실제 사태, 등심, 양지, 흉두께 부위 근육조직에서 추출한 RNA를 이용해 부위별 유전자 발현의 차이를 관찰하였다. 이 경우 4개의 근육 부위 중 1개의 부위가 나머지 3개의 조직 부위에 비해 4배 이상의 유전자 발현의 차이를 보인 것만 선발하였다(Table 3). 그 결과 29개 유전자 중 실제 부위별 근육 조직에서 유전자의 발현에 차이를 나타낸 것으로

Table 2. Results of real-time PCR analysis of bovine MSC, MFC, and ALC in *Beef shank*, *Longissimus dorsi*, *Deep pectoral*, and *Semitendinosus*

| Skeletal muscle part | S > M ¹⁾ | S < M ²⁾ | S > A ³⁾ | S < A ⁴⁾ |
|--------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <i>Beef shank</i> | 7 | 16 | 0 | 5 |
| <i>Longissimus dorsi</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Deep pectoral</i> | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Semitendinosus</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |

S = myogenic satellite cell, M = myotube-formed cell, A = adipocyte-like cell

¹⁾ S > M = Genes highly expressed in MSC compared to MFC

²⁾ S < M = Genes highly expressed in MFC compared to MSC

³⁾ S > A = Genes highly expressed in MSC compared to ALC

⁴⁾ S < A = Genes highly expressed in ALC compared to MSC.

Table 3. Results of real-time PCR analysis of four skeletal muscle, *Beef shank*, *Longissimus dorsi*, *Deep pectoral*, and *Semitendinosus*

| Skeletal muscle part | S > M ¹⁾ | S < M ²⁾ | S > A ³⁾ | S < A ⁴⁾ |
|--------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <i>Beef shank</i> | 1 | 4 | 0 | 1 |
| <i>Longissimus dorsi</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Deep pectoral</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Semitendinosus</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |

S = myogenic satellite cell, M = myotube-formed cell, A = adipocyte-like cell

¹⁾ S > M = Genes highly expressed in MSC compared to MFC

²⁾ S < M = Genes highly expressed in MFC compared to MSC

³⁾ S > A = Genes highly expressed in MSC compared to ALC

⁴⁾ S < A = Genes highly expressed in ALC compared to MSC.

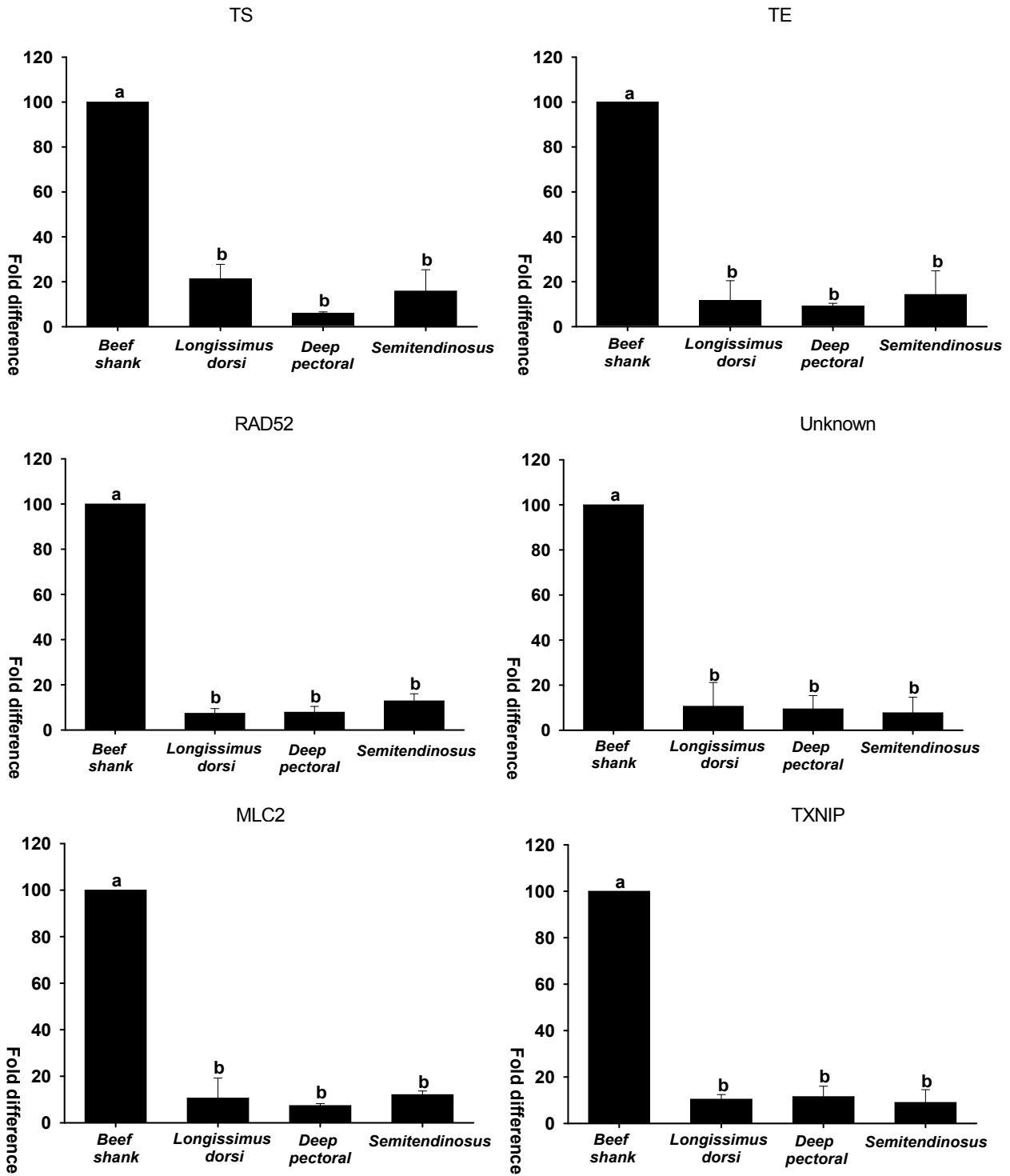


Fig. 2. Gene expression in different types of cut.

Real-time PCR analysis was performed for four skeletal muscle, *Beef shank*, *Longissimus dorsi*, *Deep pectoral*, and *Semitendinosus*. Fold difference was analyzed considering *beef shank* as control. Different letters indicate significant statistical difference (Tukey's test, $p > 0.05$). The data shown are normalized by GAPDH.

Table 4. PCR primers

| Gene Name | Abbreviation | Size (bp) | Forward | Reverse |
|--|--------------|-----------|-----------------------------|----------------------------|
| Thymidylate synthase | TS | 194 | 5'-ctactgtggtgaatggggagt-3' | 5'-tcagtggctcgtatgattc-3' |
| Tropoelastin | TE | 205 | 5'-caaaccaggacaaggatgga-3' | 5'-tccagttggtaccaagcat-3' |
| Similar to RAD52 motif-containing protein 1 | • | 207 | 5'-caggctttctcctgcaaac-3' | 5'-tgtaacctgggacccttgag-3' |
| Unknown (CV980409.1-A:r) | • | 201 | 5'-tcaggtgcttcacacaatg-3' | 5'-ccactacacctcacctgt-3' |
| Myosin, light chain 2, regulatory, cardiac, slow | MLC2 | 205 | 5'-gctgtgaactgaaaatg-3' | 5'-cgttgtagcatctccttga-3' |
| Thioredoxin-interacting protein | TXNIP | 182 | 5'-ccagaattgattgggttgg-3' | 5'-ttgccaacaggagaacacag-3' |

확인된 유전자는 총 6개이며, 모두 나머지 3 부위에 비해 사태부위에서 특이적으로 발현이 높게 나타나는 것으로 확인하였다. 예를 들어 Table 2의 real-time PCR 분석결과에서 사태 부위에서 유래한 ALC가 SMC에 비해 4배 이상의 유전자 발현의 차이를 보이고 나머지 3부위에서는 2배 미만의 차이를 나타낸 유전자(T>S)가 5개 인 반면에 조직을 이용한 real-time PCR 분석 결과에서는 단지 1개의 유전자가 사태 부위에서 다른 3개 부위 보다 4배 이상의 유전자 발현을 나타내었다.

등심, 양지, 흉두께 부위에 비해 사태 부위에서 mRNA의 발현이 4배 이상 차이를 보인 6개의 유전자 중 MFC에 비해 MSC에서 유전자의 발현이 4배 이상 더 많은 것으로 나타난 유전자(S>M)는 TE (thymidylate synthase) 하나 이었으며, MSC에 비해 MFC에서 유전자 발현이 더 많은 것으로 나타난 유전자는 기능이 밝혀진 3개의 유전자 TE (tropoelastin), RAD52 (similar to RAD52 motif-containing protein 1), MLC2 (myosin, light chain 2, regulatory, cardiac, slow)와 기능이 밝혀지지 않은 1개의 유전자 이었다. 또한 TXNIP 유전자는 MSC에 비해 ALC에서 발현이 증가되는 것을 확인하였다.

고 찰

근육의 특징은 부위에 따라 다양하며 이러한 특징들은 근섬유의 구성, 영양 상태, 유전자의 발현 등 다양한 부분들이 영향을 미치며 (Maltin 등, 2003), 이는 고기에서 질감의 결정에 중요한 요소로 작용한다. Kim 등 (2008)의 연구 결과에 따르면 등심 부위에서 alpha-actin 유전자의 발현이 높을 수록 우수한 육질을 가지며, T-complex protein 1 (TCP-1), heat shock protein beta-1 (HSP27), and inositol 1,4,5-triphosphate receptor type1 (IP3R1)의 발현이 증가할 수록 육질이 떨어진다고 보고하였다. 결국 각 근육 부위별 세포 마다 특정 유전자의 발현 정도가 다르며, 이는 육질에 중요한 영향을 미치는 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 DNA microarray 분석 기술을 이용해 소의 4개 근육 부위에서 특이하게 발현 되는 유전자를 발굴하여 소고기의 부위를 식별할 수 있는 DNA 마커를 개발할 뿐만 아니라 각 부위별 근육세포에 존재하는 근육줄기(위성) 세포의 생물학적 기원과 작용을 연구할 수 있는 기

초자료를 얻고자 실시하였다.

부위별 근육조직의 특이한 유전자의 발굴을 위해 전체 근육조직을 microarray 분석기술에 이용할 경우 근육조직 외 지방세포, 신경세포, 혈관세포, 면역세포 등 다양한 세포들이 섞여있기 때문에 근육세포와 관련된 유전자의 발현의 차이를 규명하고 발굴하는 것이 어렵다. 따라서 본 연구에서는 먼저 사태 (*beef shank*), 등심 (*Longissimus dorsi*), 양지 (*Deep pectoral*), 흉두께 (*Semitendinosus*) 4개의 조직에서 MSC (myogenic satellite cell, 근육줄기세포)를 순수 분리 한 후 이 세포를 세포배양을 통해 MFC (myotube-formed cell, 근관이 형성된 세포)로 분화시키거나, ALC (adipocyte-like cell; 지방세포와 유사한 세포)로 이형분화 시킨 후 각 세포로부터 RNA를 분리하여 MSC와 MFC, MSC와 ALC에서 mRNA 발현의 차이를 보이는 유전자를 스크리닝하였다. 이 방법을 통해 총 135개의 유전자를 확인하였으며 이 중 사태, 등심, 양지, 흉두께에서 유래한 유전자가 각각 125개, 6개, 1, 3개로 나타났다 (Table 1). 그러나 microarray 분석 결과에서 사용한 동일한 RNA를 이용하여 135개의 유전자에 대해 real-time-PCR 기술로 확인한 결과 135개 유전자 중 29개만이 microarray 분석결과와 유사한 결과를 나타냈으며 (Table 2), 부위별 생체 조직에서 추출한 RNA를 이용한 검증 실험에서는 최종적으로 6개의 유전자만이 부위별 차이를 나타내었다.

6개의 유전자 중 TS (thymidylate synthase)는 DNA 합성에 필요한 thymidine-5'-monophosphate를 합성하는데 관여하는 효소로 세포 증식에 필수적인 것으로 알려져 있으며 (Derenzini 등, 2002) 사태의 DNA 합성 및 세포 증식에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다. 본 연구에서 세포를 이용한 실험결과에서 TS는 MSC에서 상대적으로 높은 mRNA의 발현을 보이다가 MFC로 분화되는 과정에서 그 발현량이 감소하는 것으로 나타났다. TE (tropoelastin), RAD52 (similar to RAD52 motif-containing protein 1), MLC2 (myosin, light chain 2, regulatory, cardiac, slow), 기능이 알려지지 않은 유전자(unknown gene)는 모두 MSC가 MFC로 분화되는 과정에서 mRNA의 발현이 증가하는 것으로 나타났다.

근육의 재생은 근육 줄기세포와 성장 인자, 사이토카인, 염증 반응 관련 물질, 혈관, 세포 외 기질 등 여러 가지 물질들의 상호 작용이 요구되며, 특히 세포 외 기질은 신호전달을 위한 물질들의 상

호교환 작용에 중요한 역할을 한다(Goetsh 등, 2003). TE (tropoelastin)은 세포 외 기질의 주요 구성 물질 중의 하나로 물리적 변형을 반복적으로 겪는 조직에서 많이 발견되는 엘라스틴 단백질의 전구물질이다(Anthony 등, 2010). 미오신(myosin)은 골격근에서 가장 많이 존재하는 단백질로 근육의 수축에 관여한다. 미오신은 MHC(미오신 중쇄; myosin heavy chain)와 MLC(미오신 경쇄; myosin light chain)로 구성되어 있으며, MHC는 근육 수축 성상을 결정하는 중요한 요인이며, MLC는 MHC를 조율하는 기능을 가진다(Emerson 등, 1987). MLC는 칼슘결합단백질로써 MLCK(Myosin light chain kinase)에 의해 인산화 되며, 인산화된 MLC는 actin과 결합하게 되어 근 수축을 일으키며, MRLC(myosin regulatory light chain)와 MELC(Myosin essential light chain) 두 종류가 있다. MLC 중 MLC2(Myosin light 2, regulatory cardiac, slow)는 골격근에서 특징적으로 발견되는 유전자 중의 하나로(Lyons 등, 1990, Alexander 등, 1993), 돼지의 등심 부위 관련 다형성(polymorphism)에 대한 연구를 통해 고기의 pH, 육질 손실, 보수력, 등에 중요한 영향을 미친다고 보고 하였다(Xu 등, 2007). RAD52(similar RAD52 motif-containing protein 1)는 *Saccharomyces cerevisiae*(효모) 내에서 자외선에 의해 손상된 DNA의 재생(excision repair)과 관련 있는 RAD52 관련 유전자로, 세포의 생존에 중요한 역할을 한다(Bankmann 등, 1992, Park 등, 1992).

TXNIP(thioredoxin-interacting protein)는 세포 내 물질의 산화환원 반응과 물질대사에 관여하는 물질로 지방과 골격근의 글루코즈 흡수와 연관성을 가지며, 성숙한 지방세포의 글루코즈 흡수를 억제하며, 세포의 증식을 억제하는 기능을 한다고 보고 되었다(Parikh 등, 2007, Parth 등, 2006). 이는 txnip가 글루코즈의 항상성 유지를 통한 지방세포의 대사에 중요한 역할을 한다는 것을 의미하며, 본 연구에서도 사태의 근육줄기세포에서 지방으로 분화한 세포에서 높게 나타남을 확인하였다.

본 연구결과에서 찾은 6개의 부위 특이 유전자는 모두 사태 부위에서 특이하게 mRNA의 발현이 증가하는 것으로 관찰되었다. 이는 근육 중 사태 부위에 있는 근육세포가 등심, 양지, 흉두께에 있는 근육과 그 단백질 조성에서 차이를 나타내는 것을 의미한다. 특히 다른 근육조직에서 존재하는 MSC에 비해 사태에 있는 MSC가 상대적으로 더 많은 TS mRNA의 발현을 나타낸 것은 사태에 있는 MSC가 다른 나머지 세 부위에 있는 MSC와 그 기원이 다를 가능성을 나타낸다. 또한 MSC가 MFC로 분화되는 과정에서 그 발현이 증가되는 것으로 보인 4개의 유전자의 경우 실제로 근육의 단백질 조성에 차이를 나타내는 유전자로 사료되며 이러한 단백질의 조성이 소고기의 육질에 어떤 영향을 미치는지에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 위에서 발굴한 6개 유전자에 대한 단백질 수준에서의 연구결과가 추가적으로 필요할 것으로 사료된다. 결론적으로 본 연구를 통해 식육의 부위별 특이 마커를 개발할 수 있는 과학적인 연구 방법을 제시하였다.

요 약

본 연구는 소의 부위별 근육에 특이하게 발현하는 유전자 마커를 발굴하여 소고기의 부위를 과학적으로 판명할 수 있는 기술을 개발하고자 실시하였다. 이러한 연구 목표 아래 먼저 사태(*Beef shank*), 등심(*Longissimus dorsi*), 양지(*Deep pectoral*), 흉두께(*Semitendinosus*) 부위의 근육조직에서 MSC(myogenic satellite cell, 근육줄기세포)를 순수 분리하고 이를 MFC(myotube-formed cell; 근관이 형성된 세포)로 분화시키거나 ALC(adipocyte-like cell; 지방세포와 유사한 세포)로 이형분화 시킨 후 3가지의 세포로부터 각각의 RNA를 추출하였다. 이렇게 추출한 RNA는 24,000개의 bovine oligo-nucleotide (70 mer)가 집적된 microarray를 이용해 4개의 조직 중 1개의 조직에서만 MSC의 분화(MFC) 또는 이형분화 과정에서 mRNA의 발현이 증감을 보이는 유전자 135개를 먼저 발굴하였다. 135개의 유전자에 대해 microarray 분석에 사용한 동일한 RNA를 이용하여 real-time PCR 기술로 검증한 결과 총 29개의 유전자가 microarray 분석 결과와 유사함을 보였다. 29개의 유전자를 다시 4개 부위의 생체 조직에서 추출한 RNA를 이용해 real-time PCR 방법으로 분석한 결과 TS(thymidylate synthase), TE(tropoelastin), RAD52(similar RAD52 motif-containing protein 1), unknown gene), MLC2(myosin light 2, regulatory cardiac, slow), TXNIP(thioredoxin-interacting protein) 6개의 유전자만이 다른 부위에 비해 사태 부위에서 현저한 발현의 차이를 나타냈다. 결론적으로 본 연구를 통해 소 부위별 근육을 구분할 수 있는 과학적 기술의 토대를 확립하였다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 “어젠다 과제(과제번호: PJ006406)” 지원에 의하여 연구된 것으로 이에 감사 드립니다. 또한 분석에 이용한 DNA microarray를 제공해 주신 Dr. Jeremy Taylor께(University of Missouri) 감사 드립니다.

인 용 문 헌

- Alexander, F. and Moshe, S. 1993. The expression of the regulatory myosin light chain 2 gene during mouse embryogenesis. *Development* 118:919-929.
- Anthony, S., Justine, D., Frédéric, T., Gareth A. P., Annabelle Z. C., Miguel A. A. and Guillaume G. 2010. Transcriptional profiling of skeletal muscle reveals factors that are necessary to maintain satellite cell integrity during ageing. *Mech Ageing Dev.* 131:9-20.
- Bankmann, M., Prakash, L. and Prakash, S. 1992. Yeast RAD14 and human xeroderma pigmentosum group a DNA-repair genes encode homologous proteins. *Nature* 355:555-558.

- Cho, S. H., Kim, J. H., Seong, P. N., Lee, Y. J., In, T. S., Kim, S. C. and Kim, Y. K. 2007. Cholesterol, free amino acid, nucleotide related compounds, and fatty acid composition of Korean Hanwoo bull beef. *Korean J. Food Sci Ani. Resour.* 15:440-449.
- Derenzini, M., Montanaro, L., Treré, D., Chillà, A., Tazzari, P. L., Dall'Olio F. and Öfner, D. 2002. Thymidylate synthase protein expression and activity are related to the cell proliferation rate in human cancer cell lines. *Mol Path.* 55:310-314.
- Eggert, J. M., Depreux, FFS., Schinckel, A. P., Grant, A. L. and Gerrard, D. E. 2002. Myosin heavy chain isoforms account for variation in pork quality. *Meat Sci.* 61:117-126.
- Emerson, C. P. and Bernstein, S. I. 1987. Molecular genetics of myosin. *Annu Rev Biochem.* 56:695-726.
- Garbe, J. R., Elsik, C. G., Antoniou, E., Reecy, J. M., Clark, K. J., Venkatraman, V., Kim, J. W., Schnabel, R. D., Dickens, M. C., Wolfinger, R. D., Fahrenkrug, S. C. and Taylor, JF. 2010. Development and application of bovine and porcine oligonucleotide arrays with protein based annotation. *Anim Genet* (manuscript submitted).
- Goetsch, S. C., Hawke, T. J., Gallardo, T. D., Richardson, J. A. and Garry, D. J. 2003. Transcriptional profiling and regulation of the extracellular matrix during muscle regeneration. *Physiol Genomics* 14:261-71.
- Hawke, T. J. and Garry, D. J. 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol.* 91:534-551.
- Kim, N. K., Cho, S., Lee, S. H., Park, H. R., Lee, C. S., Cho, Y. M., Choy, Y. H., Yoon, D., Im, S. K. and Park, E. W. 2008. Proteins in *longissimus* muscle of Korean native cattle and their relationship to meat quality. *Meat Science* 80:1068-1073.
- Lay, S. L., Lefrere, C., Trautwein, I. Dugail and Krief, S. 2002. Insulin and sterol-regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1C) regulation of gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 277:35625-35634.
- Lyons, G. E., Ontell, M., Cox, R., Sassoon, D. and Buckingham, M. 1990. The expression of myosin genes in developing skeletal muscle in the mouse embryo. *The Journal of Cell Biology* 111:1465-1476.
- Maltin, C., Balcerzak, D., Tilley, R. and Delday, M. 2003. Determinants of meat quality: tenderness. *Proceedings of the Nutrition Society* 62:337-347.
- Oe, M., Ohnishi, Kameyama, M., Nakajima, I., Muroya, S. and Chikuni, K. 2007. Muscle type specific expression of tropomyosin isoforms in bovine skeletal muscles *Meat Science* 75: 558-563.
- Park, E., Guzder S. N., Koken, M. H., Jaspers, D. I., Weeda, G., Hoeijmakers, J. H., Prakash, S. and Prakash, L. 1992. RAD25 (SSL2), the yeast homolog of the human xeroderma pigmentosum group B DNA repair gene, is essential for viability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:11416-11420.
- Parikh, H., Carlsson, E., Chutkow, W. A., Johansson, L. E., Storgaard, H., Poulsen, P., Saxena, R., Ladd, C., Schulze, P. C., Mazzini, M. J., Jensen, C. B., Krook, A., Björnholm, M., Tornqvist, H., Zierath, J. R., Ridderstråle, M., Altshuler, D., Lee, R. T., Vaag, A., Groop, L. C. and Mootha, V. K. 2007. TXNIP regulates peripheral glucose metabolism in humans. *PLoS Med.* 4:e158.
- Parth, P., Luke, J., William, A. C., Jun, Y. and Richard, T. 2006. The interaction of thioredoxin with txnip: evidence for formation of a mixed disulfide by disulfide exchange. *J Biol Chem.* 281: 21884-21891.
- Rachel, S., Zadok, B., Ora, F., Uri, N. and David, Y. 2006. Regeneration and transdifferentiation potential of muscle-derived stem cells propagated as myospheres. *Stem cells* 24: 1769- 1778.
- Schiaffino, S. and Reggiani, C. 1996. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiological Reviews* 76:371-423.
- Singh, N. K., Chae, H. S., Hwang, I. H., Yoo, Y. M., Ahn, C. N., Lee, S. H., Lee, H. J., Park, H. J. and Chung, H. Y. 2007. Transdifferentiation of porcine satellite cells to adipoblasts with ciglitizone. *J. Anim Sci.* 85:1126-1135.
- Xu, D. Q., Liu, M., Xiong, Y. Z., Deng, C. Y., Jiang, S. W., Li, J. L., Zuo B., Lei, M. G., Li, F. E. and Zheng, R. 2007. Identification of polymorphisms and association analysis with meat quality traits in the porcine KIAA1717 and HUMMLC2B. *Livestock Science* 106:96-101.

(접수일자 : 2010. 5. 19 / 수정일자 : 2010. 7. 26 / 채택일자 : 2010. 8. 4)