

636.211 -19
L2738

최 중
연구보고서

**한우 고급육 생산을 위한 지방대사 조절
유전자원의 개발**

Studies on Genes Involved in Lipid Metabolism of Adipose
Tissues of Hanwoo for Production of
High Quality Meat

연구기관
전남대학교

농림부

최 종 보 고 서

2001년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 한우 고급 육 생산을 위한 지방대사조절 유전자원의 개발에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

- 첨부 : 1. 최종보고서 10부
2. 최종보고서 디스켓 1매

2001년 10월 25일

주관 연구기관 : 전 남 대 학 교

총괄연구책임자 : 백 명 기 (인)

주관연구기관장 : 총장 정석종 직인

농 립 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “한우 고급육 생산을 위한 지방대사 조절 유전자원의 개발에 관한 연구” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2001년 10월 25일

주관연구기관명 : 전 남 대 학 교

총괄연구책임자 : 백 명 기

세부연구책임자 : 김 광 현

연 구 원 : 정 순 석

연 구 원 : 김 영 민

연 구 원 : 조 광 근

협동연구기관명 : 미국 하와이대

협동연구책임자 : 김 용 수

요 약 문

I. 제 목

한우 고급육 생산을 위한 지방대사 조절 유전자원의 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

우리 나라 축산에 있어서 한우의 국제경쟁력을 제고시키는 것은 중요한 과제이며 이를 위한 정치·경제적 측면에서뿐만 아니라 과학적·산업적 측면에서의 다각적인 협력과 지원이 절실히 요구되고 있다. 최근 수입쇠고기는 한우고기 보다 3 - 4배나 값싸게 들어오고 있어서, 국내산 쇠고기는 양적으로 증가해도 생산단가가 높아 가격 면에서는 수입쇠고기와 경쟁이 어려운 상태에 있다. 따라서 한우고기는 질적인 면에서 수입쇠고기보다 월등하게 우수하지 않으면 한우의 장래는 밝지 않다고 본다. 한우 중에는 유전적으로 육질이 좋은 특성을 타고난 개체가 있으므로, 효율적인 방법으로 고급육 생산 개체를 선발, 육종하여 발육특성에 따른 사양관리를 잘하면 고급육 생산이 가능하다.

한우 고급육이란 우리 나라 사람들이 좋아하는 풍미와 맛을 갖춘 품질이 좋은 고기인데, 이는 근내지방이 잘 침착되도록 하여 한우 고유의 맛을 내며, 객관적으로는 현 도체등급 판정결과 육질 1등급을 받은 쇠고기를 말한다. 한우 고급육 생산을 위해서는 일차적으로 근내지방 침착도를 증가시켜야 하며, 일부 국내 학자들은 생화학적, 면역학적인 방법으로 근내지방 축적을 조절하는 연구를 수행하고 있다. 근내지방 침착도를 증가시키고, 피하지방 축적을 감소시키기 위해서는 근내지방 축적 기작과 피하지방 축적 기작을 정

확하게 이해해야 한다. 사양 및 영양소 급여체계에 관한 연구 등의 방법으로는 이러한 기작을 정확하게 이해하기가 어렵다. 근내지방 축적과 피하지방 축적기작을 정확하게 이해하기 위해서는 지방대사조절에 관여하는 유전자를 개발하여, 개발한 유전자의 발현양상을 비교·분석하고, 지방대사조절 단백질에 대한 두 지방조직간의 기능적인 차이를 연구함으로써 가능하다. 하지만 아직까지 국내·외에서 유용유전자원을 개발, 활용하여 지방대사 조절방안을 개발하고자 하는 연구는 전무하다. 본 과제에서는 한우 지방조직에서 지방대사 조절에 관여하는 유전자원을 개발하고 특성을 규명하는 연구를 수행하였다. 일부 유전자에 대한 단백질을 미생물에서 생산, 정제하여 근내지방과 피하지방대사에 미치는 영향을 조사하였다.

β -adrenergic receptor(β -AR)는 세포막에 존재하는 단백질로 동물 생체내의 호르몬 epinephrine과 norepinephrine의 receptor로 작용한다. β -AR는 여러 종류의 세포에 분포하여 지방대사 및 탄수화물대사를 비롯한 에너지 대사를 조절한다. 지금까지는 이러한 β -AR의 생리적 특성을 이용하여 주로 고기생산에 있어서 지방조성을 낮추고 단백질 조성을 높이는 방향으로 연구가 이루어졌다. 이러한 이유는 서구의 경우 소비자들이 지방이 적은 고기를 선호하기 때문이다. 본 과제에서는 한우 지방조직에서 β -AR의 분포를 조사하고, β -AR 유전자를 cloning하고 지방조직에서 발현양상을 조사하여 지방축적에 어떻게 작용하는지를 규명하였다. 이러한 결과는 앞으로 근내지방 축적을 조절하는 방안을 개발하는 데 활용할 것이다.

한우 고급육 생산을 위해서는 근내지방도를 높이는 것뿐만 아니라 지방산의 조성도 매우 중요하다. Stearoyl-CoA desaturase(SCD)는 포화지방산을 oleic acid와 같은 불포화지방산으로 전환하는데 관여하는 효소이다. SCD 효소를 이용하여 oleic acid 함량이 증진시키면 소고기의 풍미를 향상시켜 고품질육을 생산할 수 있을 것으로 기대된다.

국내 소비자들이 한우육을 수입육보다 선호하는 이유는 수입육에 비해 한우 육의 육질이 더 좋다고 믿기 있기 때문이다. 그러나, 한우 고기의 우수성을 설명할 만한 한우 육질의 특징적인 요소들이 아직까지 제시되지 못하고있는 실정이다. 따라서, 한우육에 대한 육질을 분석하고 이를 외국 품종들과 비교하여 한우육의 우수성을 과학적으로 입증하는 연구가 필요하다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 과제에서는 한우 지방조직에서 지방대사 조절에 관여하는 유전자원을 개발하고 특성을 규명하는 연구를 수행하였다. 일부 유전자에 대한 단백질을 미생물에서 생산, 정제하여 근내지방과 피하지방 조직에서 지방대사에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위하여 한우 지방조직 cDNA library를 구축하였고, 지방분해가 활발하게 일어나는 절식시기와 지방축적이 일어나는 사료급여시에 발현이 유도되는 유전자원들을 선발하여 그 특성을 규명하였다. 근내지방과 피하지방에서 개발한 유전자원의 발현양상을 비교하였으며, 일부 유전자에 대한 단백질을 미생물에서 생산, 정제하여 근내지방과 피하지방대사에 미치는 영향을 비교·분석하였다.

β -AR을 근내지방 축적을 조절하는 방안 개발에 활용하기 위하여 한우 지방 조직에서 β -AR의 분포를 조사하였다. 한우 $\beta 1$ -, $\beta 2$ -, $\beta 3$ -AR 유전자들을 cloning하고, clone들의 염기서열 분석하였다. RT-PCR 방법을 이용하여 한우 지방조직에서 β -AR들의 발현 양상을 조사하였다.

SCD 효소 시스템을 이용하여 불포화지방산 함량을 증진시켜 한우육의 품질을 높이는 방안 개발에 활용하고자, SCD 효소의 특성을 규명하고 지방 조직 부위별로 SCD 효소 활성을 조사하였다. 또한 한우 SCD cDNA를 cloning하고 전체 coding region의 염기서열을 결정하였다. Northern 및 RT-PCR 방법으로 SCD 유전자의 발현양상을 조사하였다.

한우 수소와 거세우의 육질을 분석하였고, 일부의 육질에 대하여는 미국 하와이육의 특성과 비교하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 한우 고급육 생산을 위한 지방대사 조절 유전자원의 개발

한우 지방대사 조절에 관여하는 유전자원을 개발하기 위하여 한우 지방조직 cDNA library를 구축하였다. 제조한 한우 지방조직의 cDNA library의 recombinant 효율은 99%, unamplified library titer는 5.68×10^5 pfu/ml, amplified library titer는 3.67×10^9 pfu/ml, insert size는 평균 1.1kb로서 매우 우수하였다.

차별혼성화 방법을 이용하여 절식 및 정상급여시에 발현이 유도되는 clone들을 선발하였다. *In vivo excision*으로 선발한 cDNA clone의 λ DNA를 pBK-CMV plasmid로 전환하였다. 각 clone에 대한 부분적인 염기서열을 분석하여 GenBank database와 비교하여 이미 밝혀진 clone인지 새로운 clone인지를 조사하였다. 그 결과, bovine 종에서 알려진 clone 16개 (ATP synthase 8, osteonectin, fatty acid binding protein, cytochrome oxidase subunit 3, obese gene 등)와 다른 종에서 알려진 clone 14개 (human lactate dehydrogenase, rabbit aldolase A, mouse ubiquitin degradation protein, rat stearyl CoA desaturase gene 등)를 확인하였다. Human lactate dehydrogenase B와 높은 유사성을 보인 clone은 bovine 종에서는 아직 밝혀지지 않은 유전자이므로 clone 전체의 염기서열을 분석하였다. 한우 LDH cDNA clone은 1,319bp의 염기서열과 334개 아미노산으로 구성되어 있었으며, 한우 LDH의 아미노산 서열은 human 및 pig LDH와 97%의 identity를 보였다.

선발한 cDNA clone들이 지방조직의 분해 또는 축적시기에 발현이 유도되

는 가를 근내지방, 피하지방, 근간지방, 복부지방, 신지방 등을 pooling한 total RNA를 이용하여 조사하였다. 12개의 클론이 정상급여와 재급여시기보다 절식시기에 높은 발현양상을 보였다. 특히, cytochrome oxidase subunit 3, fatty acid binding protein, lactate dehydrogenase, osteonectin, ATP synthase protein 8, human ribosomal protein subunit 3와 유사성이 높은 clone, human voltage dependent anion channel와 유사성이 높은 clone 등의 유전자 발현이 정상 또는 재급여 시기보다 절식시기에 높았다. Bovine galactose binding lectin, human proto-oncogene tyrosine protein kinase와 유사성이 높은 clone, human ribosomal protein L23a와 유사성이 높은 clone 및 obese gene은 절식시기보다 정상급여나 재급여시기에 발현 수준이 높았다.

선발한 cDNA clone들에 대한 지방조직 부위별 발현양상을 정상급여시기 및 절식시의 여러 부위의 지방조직에서 total RNA를 추출하여 분석하였다. Fatty acid binding protein 및 osteonectin 유전자의 mRNA는 다른 조직에 비하여 절식시기의 신지방과 근간지방에서 높은 수준으로 발현되었다. ATP synthase protein 8 유전자의 mRNA는 다른 조직에 비하여 절식시기의 근간지방에서 높은 수준을 보였다. Human 40S ribosomal protein s3와 93%의 유사성을 보인 클론은 다른 조직에 비하여 절식시기의 근간지방에서 비교적 높은 발현 수준을 보였으며, 절식 신지방에서 현저하게 발현이 감소하였다. Lactate dehydrogenase B 유전자는 절식시기의 피하지방에서 비교적 높은 발현 수준을 보였다. 비만유전자는 신장과 복부지방에서 매우 높게 발현되었다. 절식시기에 비하여 정상급여시기에 발현증가는 피하지방과 근간지방에서 뚜렷하게 관찰되었다. 하지만 근내지방에서는 비만유전자의 발현수준이 매우 낮을 뿐만 아니라 정상급여와 절식시에 차이를 보이지 않았다. 본 실험을 통하여 비만유전자의 발현양상은 지방조직의 부위에 따라서 발현수준이 현격한 차이를 보이며, 사료급여후에 발현이 유도되는 조절기작도 지방조직의 부

위에 따라서 차이를 보인다는 사실을 발견하였다.

지방축적 조절에 관여하는 비만유전자 (obese gene)가 coding하는 leptin 단백질을 미생물에서 생산하는 연구를 수행하였다. Bovine obese gene인 leptin cDNA를 pGEX expression vector와 재조합하여 *E. coli* BL21 cell에 도입하였다. SDS-PAGE 결과, IPTG induction 두 시간 후부터 GST-leptin fusion protein (42kD)이 발현되는 것이 확인하였다. Glutathione sepharose 4B와 binding시킨 결과, 42kD의 GST-leptin protein이 정제된 것을 확인하였다. 정제된 GST-leptin protein을 thrombin으로 처리하여 26kD의 GST protein과 16kD의 leptin protein으로 절단하였다. Thrombin 처리한 용액을 dialysis하고 glutathione sepharose 4B resin과 재 binding시킨 후 상등액을 모아 Centricome으로 농축시켜서 leptin protein을 정제하였다.

정제한 leptin 단백질을 3T3-L1 adipocyte cell line의 배양액에 첨가하고 $1\text{-}^{14}\text{C}$) glucose을 이용하여 지방조직내 glucose 유입율을 조사하였다. 실험 결과, insulin은 지방세포내 glucose 유입율을 증가시켰지만 leptin은 glucose 유입율에 영향을 미치지 않았다.

한우 근내지방과 피하지방 explant slices에서 leptin이 glucose 및 acetate 유입율에 미치는 영향을 $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{-glucose}$ 와 $[\text{1-}^{14}\text{C}]\text{-acetic acid}$ 를 이용하여 조사하였다. 실험 결과, insulin은 피하지방과 근내지방에서 glucose와 acetate 유입율을 증가시켰지만, leptin은 피하지방과 근내지방에서 glucose와 acetate 유입율에 영향을 미치지 않았다.

결론적으로, 지방대사 조절에 관여하는 다수의 유전자원을 확보하였으며, 일부 유전자는 절식시와 사료급여시에 유전자 발현양상에 차이를 보였고, 근내지방과 피하지방에서 유전자 발현양상의 차이를 확인하였다. 근내지방과 피하지방에서 선발한 유전자의 발현양상 및 단백질의 지방대사 조절 기작을 계속 비교·분석하여 그 차이를 규명하면, 근내지방과 피하지방대사의 차이를 분자

생물학적인 측면에서 이해할 수 있을 것이다. 이러한 결과를 근내지방 축적 조절기술 개발에 활용함으로써 한우 고급육 생산에 기여할 수 있을 것이다.

2. 한우 고급육 생산을 위한 β -adrenoceptor에 대한 분자유전학적 연구

β -AR의 분포를 조사하기 위하여 한우지방조직 membrane fraction을 분리하여 [125 I]-cyanopindolol (ICYP)와 saturation binding 실험 후 그 결과를 scatchard plot으로 transformation하였다. 이러한 결과를 non-linear regressor를 이용하여 Kd와 Bmax를 구하였다. 한우 지방조직의 Kd값은 하와이우보다 낮았으며, Bmax값은 하와이우보다 높았다.

한우 $\beta 1$ -, $\beta 2$ -, $\beta 3$ -AR 유전자는 PCR을 이용하여 cloning하였다. $\beta 1$ -AR는 인트론이 없는 유전자이고 그 발현이 매우 낮을 것으로 생각되어 genomic DNA를 분리하여 $\beta 1$ -degenerative primer와 specific primer를 이용하여 cloning하였다. PCR product에 대한 염기서열을 결정한 결과, $\beta 1$ -AR clone은 1,462bp의 nucleotide와 467개의 아미노산으로 구성되어 있었다. 한우의 $\beta 2$ 와 $\beta 3$ -AR 유전자는 RT-PCR 방법으로 cloning하였다. RT-PCR product에 대한 염기서열 분석 결과, $\beta 2$ 와 $\beta 3$ -AR은 이미 밝혀진 다른 소들의 염기서열과 100% 일치함을 보였다.

Poly A RNA를 분리하여 northern 분석을 실시한 결과, 한우 $\beta 1$ -AR은 약 3.6kb의 transcript size를 보였다. 한우 지방조직에서 β -AR들의 발현양상은 RT-PCR 방법으로 조사하였다. β -AR들의 발현 수준은 β -actin의 상대적인 발현 차이를 고려하여 측정하였다. 한우 피하지방에서는 $\beta 1$ -AR은 정상급여나 절식시보다 재급여시에 발현 수준이 높았으며, $\beta 2$ -AR은 암컷에서만 정상급여시보다 절식 및 재급여시 발현 수준이 높았다. 반면 $\beta 3$ -AR은 사료급여구간에 발현 수준의 차이가 없었다. 수컷 신지방의 경우 $\beta 1$ -, $\beta 2$ -, $\beta 3$ -AR의 발현수준이 정상급여시에 비하여 재급여시에 매우 낮았으며, 암컷의

경우에는 $\beta 1$ -AR만이 절식시 매우 낮았다. 한우 근내지방과 피하지방에서 β -AR들의 발현 수준을 비교한 결과, $\beta 1$ -, $\beta 2$ -, $\beta 3$ -AR 모두 근내지방보다 피하지방에서 4배 이상의 높은 발현 수준을 보였다. 이러한 결과는 β -AR은 근내지방보다는 피하지방 대사조절에 더 영향을 미칠 것임을 시사하고 있으며, 일정기간 동안의 절식과 재급여를 통하여 지방대사를 조절할 수 있을 것으로 판단된다. 지방조직간에 발현수준의 차이를 보이고 있으므로 향후 연구를 통하여 지방조직 부위별 지방 축적과 방출 조절 기작의 차이를 규명하여 근내지방 축적기술 개발에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

3. 한우 지방조직에서 stearoyl-CoA desaturase에 대한 연구

본 과제에서는 SCD 효소의 특성을 규명하고, 한우에서 SCD cDNA를 cloning하고 발현양상을 조사하여 지방산 조성을 조절할 수 있는 방안 개발을 위한 기초 연구를 수행하였다. SCD는 세포내 microsome의 막에 존재하는 효소이므로 지방조직에서 microsomal fraction을 분리하여 SCD 효소활성 측정에 이용하였다. 지방조직은 다른 조직과는 다르게 세포의 대부분을 지방구가 차지하고 세포질은 매우 적어서 피하 지방조직 35g에서 약 2 ~ 2.5mg의 microsomal protein만을 얻을 수 있었다. Microsomal 단백질에 대한 SDS-PAGE 결과, 40kDa band가 SCD로 예측되었다. SCD kinetics parameter 분석 결과, K_m 값은 16~20 μM 이고 V_{max} 값은 40~80 nmol/min/mg 정도였다. 지방조직 부위별 SCD 활성을 측정한 결과, 피하지방과 근간지방은 유사한 활성을 보였고, 복부지방에서 제일 높은 활성을 나타낸 반면 신지방에서 제일 낮은 활성을 보였다. 피하지방에서는 한우가 외래종보다 높은 SCD 활성을 보였으나, 신지방에서는 외래종이 한우 보다 높은 활성을 보였다.

SCD 유전자의 염기서열은 쥐, 사람, 양, 돼지에서는 밝혀졌으나, 소에서는 아직 밝혀지지 않았다. Bovine 종에서 아직 밝혀지지 않은 SCD cDNA

clone은 다른 종의 염기서열을 바탕으로 제작한 primer와 total RNA를 이용, RT-PCR 방법으로 cloning하였다. 확보한 SCD cDNA clone은 1,080 bp nucleotide와 350개의 아미노산으로 구성되어 있었다. 한우 SCD 유전자의 아미노산 서열을 다른 종과 비교한 결과, 양의 SCD와 96.5%의 유사성을 보였고, 다른 포유동물의 SCD와 88%이상의 유사성을 보였다. 한우 SCD 유전자의 지방조직에서 발현 양상은 피하지방과 복부지방, 근내지방에서 total RNA를 분리하여 northern 방법으로 분석하였다. SCD mRNA는 4.9kb transcript size 발현되었다. 수컷 피하지방에서 정상급여구에 비해 재급여시 발현이 감소하였고, 암컷 피하지방에서는 거의 변화가 없었다. 수컷 복부지방에서는 피하지방과 같은 경향으로 정상급여구에 비해 재급여시 발현이 다소 감소하였으며 특히 암컷에 비해 수컷이 복부지방에서 SCD 유전자의 발현 수준이 낮은 것을 관찰하였다. 근내지방과 피하지방에서 SCD 유전자의 발현양상을 RT-PCR 방법으로 조사한 결과, 근내지방보다 피하지방에서 높은 수준을 보였다. 본 실험에서 지방조직 부위별로 SCD 유전자의 발현 양상이 다른 것을 관찰하였는데, 이러한 SCD 유전자의 발현 차이는 지방조직 부위별 지방산 조성의 차이를 유도할 것으로 사료된다. 수컷에 비해 암컷에서 SCD 유전자의 발현 수준이 높은 것으로 보아, 불포화지방산 함량이 수컷보다 암컷에서 높을 것으로 예측된다. 향후 연구를 통하여 SCD 유전자의 발현을 증진시키는 방법을 모색하면, 품질이 좋은 한우 고급육을 생산할 수 있을 것으로 기대된다.

4. 한우육의 육질 분석

약 550 kg의 한우 수소와 540kg의 한우 거세우를 도살 후 등심(*longissimus dorsi*; LD)과 안심(*psaos major*; PM)에서 육질의 특성을 조사하였다. 한우 수소의 안심 근육에서 pH 기울기는 등심보다 훨씬 급하게 나타났다. ATP의 소모는 등심보다 안심에서 더 빨랐다. 사후 첫 12시간 동안 안심에서

glucose-6-phosphate (G-6-P)의 상승은 등심보다 빨랐으나, 24시간에 G-6-P의 최종 농도는 두 근육간에 차이가 없었다. 등심과 안심의 수분, 지방, 단백질 및 회분 함량은 차이가 없었다. 등심 shear value는 사후 1일과 3일 사이에 안심보다 높았으나, 사후 7, 15, 21일에는 두 근육간에 차이가 없었다.

한우 거세우의 안심 pH 기울기는 등심보다 훨씬 급하게 나타났다. 안심 pH 기울기는 처음 12시간 동안은 빠르게 나타나지만, 등심 pH 기울기는 사후 24시간까지 완만하게 감소하였다. ATP의 소모는 등심보다 안심에서 더 빨랐다. 사후 24시간 동안 안심 G-6-P의 상승은 등심보다 빨랐다. Creatine phosphate는 도살 후 6시간 동안은 현저히 감소하였으나 12시간부터 두 근육에서 거의 고갈되어 사후 동안 주요한 변화는 없었다. 안심 glycogen 함량은 도살직후부터 등심보다 훨씬 높았고, 사후 24시간 동안 높은 수준을 보였다. 등심과 안심에서 수분, 지방, 단백질 및 회분 함량은 차이가 없었다. 그러나 두 근육간의 cholesterol 함량은 차이가 있었다($P < 0.05$). 사후 1일과 21일 사이에는 등심 shear value는 안심보다 높았다. 이런 결과는 안심이 등심보다 숙성 기간이 더 짧다는 것을 시사하고 있다. Drip loss는 사후 21일 동안 두 근육에서 점진적으로 감소하였고, 사후 7일, 14일에는 두 근육에서 차이가 있었으나($p < 0.05$), 21일에는 차이가 없었다. 안심이 등심에 비해 지방 산패도가 시간이 경과할수록 급격히 증가하였으며, 14일, 21일째에서 두 근육간에 차이가 있었다($p < 0.05$). 호기성 대사를 하는 muscle fiber type I은 등심보다 안심이 높았고, 혐기성 대사를 하는 type II 역시 안심에서 높았으나, 혐기성과 호기성을 동시에 하는 중간적 성질의 type IIB는 등심에서 약 2배 높았다.

한우 거세우의 1시간 시료의 pH는 6.69이고 하와이 거세우의 도살 직후 0시간 시료 pH는 6.9로 하와이 거세우가 높았으나, 12시간 시료의 하와이 거세우는 5.82이고 한우 거세우는 6.17로 한우 거세우가 높았다. 최종 pH는 한우 거세우가 5.85로 하와이 거세우의 5.6보다 높았다. ATP 함량은 한우 거세

우는 사후 1, 3시간에 증가하지만 하와이 거세우에서는 감소하는 경향을 보였고, 24시간까지 꾸준히 감소하였으나 한우 거세우는 증가하다 감소하고 다시 12시간부터는 증가하는 추세였다. G-6-P는 하와이 거세우와 한우 거세우에서 유사하게 증가하는 경향을 보였다. Glycogen 함량은 하와이 거세우와 한우 거세우가 유사하게 감소했으나, 첫 2시간과 마지막 24시간에는 한우 거세우보다 하와이 거세우가 낮았다. 등심 지방함량은 한우 거세우가 5.49로 하와이 거세우의 2.92보다 훨씬 높았다. 이러한 이유는 미국 거세우의 marbling score와 연관이 있기 때문인 것으로 판단된다. 연도는 한우 거세우 등심보다 하와이 거세우가 훨씬 낮았으며, cooking loss는 1일째 한우 거세우 등심 수치를 제외하고는 차이가 없었다. 한우 거세우 등심의 1일째 연도는 11.6이나 하와이 거세우 등심의 2일째 연도는 8.96으로 한우 거세우의 21일째인 7.46의 수치와 거의 비슷하게 나타났으며, 21일째인 한우 거세우의 7.46인 것과 비교해 하와이 거세우의 21일째는 5.65로서 매우 낮았다. 미국 하와이육의 지방산패도는 2일에 0.32로 한우육의 0.35와 차이가 없었으나, aging이 진행될수록 한우육은 3.75까지 높아졌으나 미국 하와이육에서는 2.13으로 한우육에 비해서는 낮게 나타났다. 지방침착도가 높은 한우육보다 지방침착도가 낮은 미국 하와이육에서 지방 산패도가 낮게 나타나는 것으로 사료된다.

결론적으로 한우 거세우와 미국 하와이 거세우의 육질 특성을 비교한 결과, 몇 가지 특징적인 차이를 확인하였다. 등심지방 함량이 하와이육보다 한우 거세우에서 훨씬 높았으며, 지방산패도는 aging이 진행될수록 한우 거세우에서 높았다. 이러한 결과는 한우육이 하와이육보다 근내지방도가 높아 고급육으로써의 가치가 높다는 긍정적인 측면도 있지만, 한우육에서 지방산패가 더 많이 일어난다는 부정적인 측면도 볼 수 있다. 연도가 한우 거세우 등심보다 하와이육에서 훨씬 낮음을 볼 때, 한우육의 육질을 향상시키기 위해서는 연도를 고려해야 함을 시사하는 결과이다.

SUMMARY

(영문 요약문)

I . Title

Studies on genes involved in lipid metabolism of adipose tissues of Hanwoo for production of high quality meat

II . Objectives and importance of the project

The deposition of intramuscular adipose tissue (marbling) is positively related to beef flavor and palatability, and it is an important factor for high quality beef, especially in Korean cattle (Hanwoo). Efforts have been made to produce high-marble beef using by nutritional program, castration, and immunological treatment. However, the molecular mechanism that regulates intramuscular fat deposition has not been well studied. To produce cattle with less external and seam fat without sacrificing the quality dependent on the amount of marbling present, a study is required to understand the differential mechanism that regulates the deposition of fat between intramuscular tissues and external adipose tissues, especially subcutaneous adipose tissues.

This study was conducted to identify candidate genes involved in the deposition of fat and its release in adipose tissues of Hanwoo; examine expression patterns of the genes, and to examine the effect of recombinant leptin on lipid metabolism in intramuscular and subcutaneous adipose tissues.

β -adrenergic receptors (β -AR) exist on the cell membrane and acts as receptors of epinephrine and norepinephrine. The β -ARs regulate energy metabolism such as lipid and carbohydrate metabolism. Heifer as livestock is sensitive to the response by β -adrenergic agonist injection; 19% increase in protein composition and 14% reduction in fat content. The research regarding β -AR physiological traits has been mainly focused on reducing fat and increasing protein composition because customers prefer lean meat. This study was performed to examine subtype of β -ARs, to clone β -AR genes and to examine expression patterns of β -AR genes by feeding methods and in various adipose depots of Hanwoo in order to develop a method of regulating lipid metabolism in adipose tissues.

Stearoyl-CoA desaturase (SCD) is an enzyme involved in the desaturation of saturated fatty acids to monounsaturated fatty acids. Palmitoyl- and stearoyl-CoA are the major substrates which are converted to palmitoleoyl- and oleoyl-CoA, respectively. Current customers prefer unsaturated fatty acids to saturated fatty acids. In addition, oleic acid can increase taste. The SCD may be used for increasing taste of beef by the increase of oleic acid contents in intramuscular adipose tissues, producing high quality Hanwoo meat. This study was performed to characterize SCD enzyme, to clone SCD cDNA in Hanwoo and to examine its expression patterns in adipose tissues. This approach will help to develop method(s) for regulating fatty acid contents in intramuscular adipose tissues.

A survey reports that 64% of Korean consumers prefer Hanwoo beef to imported beef because they believe that Hanwoo beef has better quality than imported beef. Scientific data is not enough to explain factors affecting palatability and quality characteristics of Hanwoo beef. This study was performed

to analyze meat quality characteristics of Hanwoo (bulls and steers) and to compare those of foreign meat (Hereford and Angus hybrid steers grown in Hawaii under forage-finished conditions).

III. Contents and ranges of the project

To find genes involved in lipid metabolism, adipose tissue cDNA library of Hanwoo was constructed in λ ZAP express vector using poly A RNA extracted from the pooled total RNAs of several adipose tissues (abdominal, perirenal, subcutaneous, intermuscular and intramuscular) from both fed- and 48h-fasted animals. Differential screening method was used to isolate fasting- and feeding-induced clones. Partial sequencing and northern analysis was performed to characterize the clones and to examine expression pattern of the genes. The cDNA clone that was not reported in bovine species was subjected to sequencing of the full-coding region. To examine function of bovine leptin in the regulation of lipid metabolism, leptin protein was produced in *E. coli* cells and effect of recombinant leptin on glucose and acetate transport was examined in intramuscular and subcutaneous adipose tissues.

The Kd and Bmax values of β -AR were calculated in Hanwoo adipocytes. β 2- and β 3-AR genes were cloned by RT-PCR method using total RNA, and β 1-AR gene was amplified by PCR using genomic DNA. The expression levels of β -ARs were determined in the various adipose tissues by RT-PCR method.

The SCD enzyme characteristics were analyzed, and the SCD activities was determined in various adipose tissues. The SCD cDNA was cloned by RT-PCR method using total RNA and primers designed by SCD sequences of other

species. By sequence analysis of PCR products, we obtained full-coding SCD cDNA clone. The expression of SCD gene was determined by northern and RT-PCR analyses in the various adipose tissues of Hanwoo.

Hanwoo bulls and steers weighing about 540~550 kg were slaughtered to analyze postmortem glycolysis, and histochemical and meat quality characteristics of *longissimus dorsi* (LD) and *psoas major* (PM) muscles. Some meat quality characteristics of Hanwoo steers were compared with those of foreign meat (Hereford and Angus hybrid steers grown in Hawaii under forage-finished conditions)

IV. Research results and suggestions for application of results

1. Studies on genes involved in lipid metabolism of adipose tissues of Hanwoo for production of high quality meat

To identify genes involved in the deposition of fat and its release in adipose tissues, adipose tissue cDNA library of Hanwoo was successfully constructed in λ ZAP express vector. Differential screening method was used to isolate fasting-and feeding-induced clones. Partial sequencing and nucleotide database comparison revealed 16 known genes in bovine species (ATP synthase 8, osteonectin, fatty acid binding protein, cytochrome oxidase subunit 3, obese gene, etc), 14 known genes in other species (clones that showed high similarity with human lactate dehydrogenase, rabbit aldolase A, mouse ubiquitin degradation protein, rat stearoyl CoA desaturase gene, etc) and 20 unknown clones. One clone that revealed a homologue of lactate dehydrogenase H chain (LDH-B) of

other species was subjected to sequencing of full-coding region. The clone had a total length of 1,319 nucleotides coding for 334 amino acids of bovine LDH-B. Comparison of the deduced amino acid sequences of bovine LDH-B with those of pig, human, rat, and mouse showed 98%, 98%, 97%, and 96% identity, respectively.

Northern analysis revealed that expression of cytochrome oxidase subunit 3, fatty acid binding protein, lactate dehydrogenase, osteonectin, ATP synthase protein 8, clone that showed high similarity with human ribosomal protein subunit 3, and the clone that showed high similarity with human voltage dependent anion channel was induced in fasted animals at the pooled adipose tissues compared to fed animals. In contrast, expression of galactose binding lectin, the clone that showed high similarity with human proto-oncogene tyrosine protein kinase, the clone that showed high similarity with human ribosomal protein L23a, and obese (3.1kb) gene was induced in the fed animals compared to the fasted animals.

We also examined whether there was a regional difference in gene expression among several adipose tissue sites in response to fasting and feeding. Our study demonstrates that major induction of LDH-B gene expression by fasting was observed only in subcutaneous tissues, but not in abdominal, perirenal and intramuscular adipose tissues. This is the first report showing regional differences of LDH-B gene expression by fasting among several fat depots. Reason for the different responses to fasting among several adipose tissues is not clear. The differential expression of the LDH-B gene may be dependent on different hormonal sensitivity between subcutaneous and intramuscular fat. Fasting has increased levels of glucagon, epinephrine and

norepinephrine, inducing a predominant catabolic state. Further studies are required to assess the physiological importance in the regional differences of LDH-B gene expression in response to fasting.

Obese gene was highly expressed in perirenal adipose tissues, although fasting did not affect the expression of the obese gene in this tissue. Moderate levels were observed in the abdominal, subcutaneous, and intermuscular adipose tissues; the starvation-induced decrease in obese mRNA level was distinct in the subcutaneous and intermuscular tissues, but fasting did not influence the expression in the abdominal tissues. The expression level was very low in intramuscular tissue, there being no difference in the level of obese mRNA between fed- and fasted-tissues. High levels of fatty acid binding protein and osteonectin gene mRNA were detected in perirenal and intermuscular adipose tissues of fasted animal compared to other region of adipose tissues.

The reason for the differential expression of the obese gene among various adipose tissues and for the different responses to fasting is not clear. The differential expression of the obese gene may be dependent on different insulin and/or catecholamine sensitivity between subcutaneous and intramuscular fat. Leptin has been shown to reduce the food intake and increase energy expenditure through the direct action of insulin. This result may suggest that increasing intramuscular fat instead of subcutaneous fat would have a favorable effect in that a lower leptin level could result in greater food intake and further marbling. Further studies are required to assess the physiological importance in the regional differences of obese gene expression.

To examine role of leptin on glucose transport and lipid metabolism in adipose tissues of Hanwoo, we have produced bovine leptin in *E. coli* cells. The

leptin expression vector was constructed in pGEX-4T-3 vector and transformed into *E. coli* BL21 cells. Expression of the GST-leptin fusion protein was induced with IPTG. The fusion protein was purified using glutathione sepharose 4B batch method, and the recombinant leptin was eluted after thrombin protease digestion. Effect of leptin on glucose transport was examined in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were allowed to differentiate using dexamethasone, isobutyl dimethylxanthine and insulin. The differentiated cells were treated with either 10 nM insulin or 100 nM leptin, and glucose transport was determined using U-¹⁴C-glucose. Leptin had no effect on basal and insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes.

Leptin effect on glucose and acetate transport was examined in Hanwoo adipose tissues. Subcutaneous and intramuscular adipose tissues were isolated from Hanwoo bull. The 200mg of explant slices were treated with either 2 ug/ml insulin or 100 nM leptin, and glucose transport was determined using U-¹⁴C-glucose. Insulin stimulated glucose transport in both subcutaneous and intramuscular adipose tissues, but leptin did not affect glucose transport in both adipose tissues. Leptin effect on acetate transport determined using [1-¹⁴C]-acetic acid in Hanwoo adipose tissues was similar to results of glucose transport: insulin stimulated acetate transport in both subcutaneous and intramuscular adipose tissues, but leptin did not affect acetate transport in both adipose tissues.

Further studies regarding differential mechanisms that regulate fat deposition and its release between subcutaneous and intramuscular adipose tissues will lead to develop methods to produce high quality Hanwoo meat.

2. Molecular study of β -adrenoceptor for the production of high quality Hanwoo beef

Membrane fraction of Hanwoo adipocytes were prepared and analyzed by [¹²⁵I]-cyanopindolol (ICYP) saturation binding experiment. Results of radioligand binding were transformed into scatchard plot. By using non-linear regressor, values of Kd and Bmax were calculated. Kd values were higher in Hanwoo adipocytes than in adipocytes of Hawaii bulls, while Bmax values were lower in adipocytes of Hanwoo than in adipocytes of Hawaii bulls.

Total RNA and genomic DNA was isolated from adipose tissues and used for cloning of β -ARs and examination of the expression patterns. It has been known that β 1-AR genes of the several species have no intron and we speculate that its expression would be low. Therefore, we cloned the bovine β 1-AR from genomic DNA using β 1-degenerative primer and specific primer. After genomic PCR and sequencing, we obtained 1,462bp clone containing full-coding region, coding for 467 amino acids. We performed northern blot analysis with purified mRNA and the size of the β 1-AR transcript was approximately 3.6 kb. For cloning of β 2- and β 3-AR coding region sequences, we performed RT-PCR with total RNA of adipocytes. After RT-PCR and sequence analysis, we have found that β 2- and β 3-AR coding sequences of Hanwoo were 100% identical to those of the published bovine cDNA sequences. To examine the expression of β -AR subtypes, we isolated total RNA and carried out RT-PCR with abdominal, subcutaneous, and perirenal adipose tissues of Hanwoo. The β -AR mRNA levels were normalized with those of corresponding β -actin mRNA levels. In the subcutaneous adipose tissue, the

expression levels of $\beta 1$ -AR were higher in the refeeding group than in the feeding and fasting groups and the those of $\beta 2$ -AR were higher in the fasted- and refeed- animals than in the female control animals. On the contrary, the expression levels of $\beta 3$ -AR were similar in the all samples. In the perirenal adipose tissue, the expression levels of β -ARs were lower in the fasting group than in the feeding and refeeding group of male and the those of only $\beta 1$ -AR were lower in the fasted- and refeed- animals than in the fed- female animals. The expression levels of $\beta 1$ -, $\beta 2$ -, and $\beta 3$ -AR genes were over 4 fold higher in the subcutaneous than in intramuscular adipose tissues of Hanwoo bulls.

These results demonstrate that the regulation of lipid metabolism by β -AR may be more suitable in the subcutaneous than in the intramuscular adipose tissues and that expression of β -AR gene expression could be regulated through fasting and refeeding. Further study for β -AR may lead to develop method to regulate lipid metabolism of various adipose tissues in the Hanwoo, because of the differential expression of β -AR genes in different adipose tissues.

3. Studies on stearyl-CoA desaturase in adipose tissues of Hanwoo

To examine SCD enzyme characteristics, microsomal fraction was separated from adipose tissues since the SCD is located in the microsomal membrane. From SDS-PAGE of microsomal protein fractions, 40kDa band was assumed as a SCD protein. The SCD kinetics parameter was determined, and K_m values were 16 ~ 20 μ M, and V_{max} values were 40 ~ 80 nmol/min/mg. The SCD enzyme activities showed similar values in between subcutaneous and intermuscular adipose tissues, highest values in abdominal, while lowest values in

perirenal fat depots.

The SCD cDNAs have been cloned in several mammalian species including rat, human, sheep, and pig. However, cDNA for the bovine homologue has not been cloned. For cloning of bovine SCD gene, we isolated total RNA in the Hanwoo adipose tissues and performed RT-PCR. Two different sets of primers were used for amplification of SCD gene by RT-PCR and we obtained two fragment of SCD gene. Sequence analysis showed that the two cDNA clones had an overlap of 44bp and the combined sequence of the two clones was 1,080bp in length, coding 350 amino acids. Comparison of the deduced amino acid sequences of the clones to those in GenBank data showed 96.5% similarity to those of sheep SCD and more than 88% similarities to the known mammalian SCDs.

The size of the SCD transcript determined by northern method was about 4.9kb in adipose tissues. The expression of SCD gene was determined by northern method in several adipose tissues of Hanwoo. In the subcutaneous adipose tissue, the expression levels of SCD were lower in the refeeding group than in the normal feeding group of male animal and were similar in the female animal. In the abdominal adipose tissue, the expression levels of SCD were lower in the refeeding group than in the normal feeding group and female animals showed higher SCD mRNA levels than male animals. We also performed RT-PCR to examine the expression levels of SCD mRNA in subcutaneous and intramuscular adipose tissues. The expression levels of SCD were higher in the subcutaneous than in intramuscular adipose tissue.

These results demonstrate that the difference of lipid compositions may be derived from differential SCD expression levels among various adipose depots.

Female animals showed higher SCD mRNA levels than male animals. These may indicate that female animals have higher unsaturated fatty acid than male animals. Further studies regarding regulation of SCD gene expression may lead to develop method(s) to produce high quality Hanwoo meat.

4. Meat quality characteristics of Hanwoo

Postmortem changes in ATP, glucose-6-phosphate, and pH of Hanwoo bulls demonstrated that the rate of postmortem glycolysis in the PM was significantly faster than that in the LD. The shear force to cut cooked PM was significantly lower than that of LD in 1 and 3 day aged-samples, but no difference was observed between the two muscles in 7, 15 and 21 day aged-samples. During the 21 days of aging, the rate of lipid oxidation, as measured by TBA value, was significantly faster in the PM than that in the LD.

Postmortem changes in ATP, glucose-6-phosphate and pH of Hanwoo steers demonstrated that the rate of postmortem glycolysis in the PM was significantly faster than that in the LD. The shear force to cut cooked PM was lower than that of LD in 1, 3, 7 and 14 day aged-samples, but no difference was observed between the two muscles in 28 day aged-samples. During the 28 days of aging, the rate of lipid oxidation was significantly faster in the PM than that in the LD. The results suggest that PM muscle needs less aging time than LD muscle for optimum meat quality.

Some meat quality characteristics of Hanwoo steers were compared with those of Hawaiian steers. Lipid contents were higher in the LM of Hanwoo steers than in the LM of Hawaiian steers, and the rate of lipid oxidation was

also higher in the LM of Hanwoo steers than in the LM of Hawaiian steers. These comparisons demonstrate that Hanwoo beef contains higher marbling score than Hawaiian steers, while high rate of lipid oxidation may be a negative parameter of Hanwoo beef. The shear force values were also higher in the LM of Hanwoo steers than in the LM of Hawaiian steers. This indicates that shear force values should be considered as an important parameter in order to produce high quality Hanwoo beef.

CONTENTS

(영문목차)

Chapter 1 Introduction	37
Section 1 Research background and importance	37
1) Research background and importance	37
2) Research background	39
3) Research objectives	41
Chapter 2 Studies on genes involved in lipid metabolism of adipose tissues of Hanwoo for production of high quality meat	44
Section 1 Introduction	44
Section 2 Materials and methods	46
1) Construction of cDNA library of Hanwoo adipose tissues	46
a) Sampling of Hanwoo adipose tissues	46
b) Total RNA isolation and poly A RNA purification	47
c) Construction of cDNA library	47
d) Characterization of cDNA library	48
2) Screening of fasting- and feeding-induced cDNA clones	48
a) Identification of fasting- and feeding-induced cDNA clones by differential screening	48
b) Identification of fasting- and feeding-induced cDNA clones by PCR-southern differential screening	50
c) Conversion of λ DNA into pBK-CMV plasmid by in vivo excision	50

d) Plasmid isolation and cDNA insert identification	51
3) Characterization of fasting- and feeding-induced cDNA clones	52
a) Sequencing of the clones and comparison of nucleotide sequences with database	52
b) Restriction enzyme mapping and full sequencing of the selected clone	53
c) Examination of gene expression pattern by northern analysis	53
4) Production of leptin protein in <i>E. coli</i> and its effect on lipid metabolism	55
a) Construction of leptin expression vector and transformation of expression vector into host cells	55
b) Production of leptin protein in <i>E. coli</i> and its purification	56
c) Leptin effect on glucose transport in 3T3-L1 adipocytes	57
d) Leptin effect on glucose and acetate transport in Hanwoo adipose tissues	59
 Section 3 Results and discussion	 60
1) Construction of cDNA library of Hanwoo adipose tissues	60
a) Sampling of Hanwoo adipose tissues	60
b) Total RNA isolation and poly A RNA purification	61
c) Construction of cDNA library and its characterization	62
2) Screening of fasting- and feeding-induced cDNA clones	66
a) Identification of fasting- and feeding-induced cDNA clones by differential screening	66
b) Identification of fasting- and feeding-induced cDNA clones by PCR-southern differential screening	67
c) Conversion of λ DNA into pBK-CMV plasmid by in vivo excision	67
d) Plasmid isolation and cDNA insert identification	69
3) Characterization of fasting- and feeding-induced cDNA clones	70
a) Sequencing of the clones and comparison of nucleotide sequences with database	70
b) Restriction enzyme mapping and full sequencing of the selected clone	74

c) Examination of gene expression pattern by northern analysis	77
4) Production of leptin protein in <i>E. coli</i> and its effect on lipid metabolism	86
a) Construction of leptin expression vector and transformation of expression vector into host cells	86
b) Production of leptin protein in <i>E. coli</i> and its purification	88
c) Leptin effect on glucose transport in 3T3-L1 adipocytes	91
d) Leptin effect on glucose and acetate transport in Hanwoo adipose tissues	91
 Section 4 Abstract	 95
 Section 5 References	 98
 Chapter 3 Molecular study of β -adrenoceptor for the production of high quality Hanwoo beef	 104
 Section 1 Introduction	 104
 Section 2 Materials and methods	 105
1) Subtype analysis of β -adrenoceptor	105
a) Separation of adipocyte membrane fraction	105
b) Radio ligand binding assay	105
2) Cloning of β -adrenoceptor genes	106
a) Cloning and sequencing of β 1-adrenoceptor gene	106
b) Cloning and sequencing of β 2-adrenoceptor gene	108
c) Cloning and sequencing of β 3-adrenoceptor gene	109
3) Expression patterns of β -adrenoceptor genes	111
a) Northern analysis of β 1-adrenoceptor gene	111
b) RT-PCR analysis of β 1- and β 2-adrenoceptor genes	111
c) RT-PCR analysis of β -adrenoceptor genes in adipose tissues	112

Section 3 Results and discussion	113
1) Subtype analysis of β -adrenoceptor	113
a) Separation of adipocyte membrane fraction	113
b) Radio ligand binding assay	114
2) Cloning of β -adrenoceptor genes	117
a) Cloning and sequencing of β 1-adrenoceptor gene	117
b) Cloning and sequencing of β 2-adrenoceptor gene	121
c) Cloning and sequencing of β 3-adrenoceptor gene	124
3) Expression patterns of β -adrenoceptor genes	127
a) Northern analysis of β 1-adrenoceptor gene	127
b) RT-PCR analysis of β 1- and β 2-adrenoceptor genes	127
c) RT-PCR analysis of β -adrenoceptor genes in adipose tissues	130
Section 4 Abstract	131
Section 5 References	133
Chapter 4 Studies on stearoyl-CoA desaturase in adipose tissues of Hanwoo	136
Section 1 Introduction	136
Section 2 Materials and methods	137
1) Stearoyl-CoA desaturase (SCD) enzyme characteristics	137
a) Animals and preparation of adipocyte microsomal fractions	137
b) SCD enzyme assay	138
2) SCD cDNA cloning and nucleotide sequencing	139
a) SCD cDNA cloning	139
b) SCD cDNA nucleotide sequencing	141
3) Expression patterns of SCD gene	141
a) Northern analysis of SCD gene	141

b) RT-PCR analysis of SCD gene	142
Section 3 Results and discussion	144
1) Stearoyl-CoA desaturase (SCD) enzyme characteristics	144
a) Animals and preparation of adipocyte microsomal fractions	144
b) SCD enzyme assay	148
2) SCD cDNA cloning and nucleotide sequencing	155
a) SCD cDNA cloning	155
b) SCD cDNA nucleotide sequencing	157
3) Expression patterns of SCD gene	157
a) Northern analysis of SCD gene	157
b) RT-PCR analysis of SCD gene	160
Section 4 Abstract	162
Section 5 References	163
Chapter 5 Meat quality characteristics of Hanwoo	166
Section 1 Introduction	166
Section 2 Materials and methods	166
1) Meat quality characteristics of Hanwoo bulls	166
a) Animals and sample collection	166
b) Muscle metabolites and pH measurements	167
c) Proximate analysis and cholesterol assay	169
d) Shear force measurement	169
e) TBA test	169
f) Histology	170
g) Muscle protein gel electrophoresis	171
h) Statistical analyses	172

2) Meat quality characteristics of Hanwoo steers	172
3) Meat quality characteristics of Hawaii steers	173
Section 3 Results and discussion	174
1) Meat quality characteristics of Hanwoo bulls	174
a) Muscle metabolites and pH measurements	174
b) Proximate analysis and cholesterol assay	176
c) Shear force measurement	177
d) Histology	178
2) Meat quality characteristics of Hanwoo steers	179
a) Muscle metabolites and pH measurements	179
b) Proximate analysis and cholesterol assay	182
c) Shear force measurement	182
d) TBA test	183
e) Histology	184
f) Muscle protein gel electrophoresis	185
3) Meat quality characteristics of Hawaii steers	187
a) Muscle metabolites and pH measurements	187
b) Proximate analysis and cholesterol assay	189
c) Shear force measurement	190
d) TBA test	190
Section 4 Abstract	191
Section 5 References	194

목 차

제 1 장 서 론	37
제 1절 연구개발의 목적과 범위	37
1. 연구개발의 필요성	37
가. 기술적 측면	37
나. 경제·산업적 측면	38
다. 사회·문화적 측면	39
2. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점	39
3. 연구개발의 목표 및 내용	41
가. 연구개발목표와 내용	41
나. 연차별 연구개발 목표와 내용	42
제 2 장 한우 고급육 생산을 위한 지방대사조절 유전자원의 개발	44
제 1절 서 설	44
제 2절 재료 및 방법	46
1. 한우 지방조직 cDNA library 구축	46
가. 지방조직 채취	46
나. Total RNA 분리 및 poly A RNA 정제	47
다. cDNA library 구축	47
라. cDNA library 특성 규명	48
2. 지방대사 조절 유전자원의 탐색	48
가. 차별혼성화 방법에 의한 절식 및 급여 유도 cDNA clone의 선발	48
나. PCR/Southern 방법에 의한 절식 및 급여 유도 cDNA clone의 선발	50
다. Lambda DNA를 plasmid로 전이와 insert 확인	50
라. Plasmid 분리 및 insert 확인	51
3. 지방대사 조절 유전자원의 개발	52

가. 선발한 cDNA clone의 부분적인 염기서열 결정 및 database와 비교 ...	52
나. 신규 cDNA clone의 제한효소 지도를 작성 및 전체 염기서열 분석 ...	53
다. Northern 분석에 의한 유전자 발현양상 조사	53
4. 지방대사 조절 물질의 생산 및 지방대사 조절 효과 검정	55
가. Bovine leptin 발현벡터 제조 및 <i>E. coli</i> 내 도입	55
나. <i>E. coli</i> 에서 leptin 단백질 생산 및 정제	56
다. 지방세포주에서 leptin의 지방대사 조절 효과 검정	57
라. 한우 지방조직에서 leptin의 지방대사 조절 효과 검정	59
 제 3절 결과 및 고찰	 60
1. 한우 지방조직 cDNA library 구축	60
가. 지방조직 채취	60
나. Total RNA 분리 및 poly A RNA 정제	61
다. cDNA library 구축 및 cDNA library 특성 규명	62
2. 지방대사 조절 유전자원의 탐색	66
가. 차별혼성화 방법에 의한 절식 및 급여 유도 cDNA clone의 선발	66
나. PCR/Southern 방법에 의한 절식 및 사료 급여 유도 cDNA clone의 재선발	67
다. Lambda DNA를 plasmid로 전이	67
라. Plasmid 분리 및 insert 확인	69
3. 지방대사 조절 유전자원의 개발	70
가. 선발한 cDNA clone의 부분적인 염기서열 결정 및 database와 비교 ...	70
나. 신규 cDNA clone의 제한효소 지도작성 및 전체 염기서열 분석	74
다. Northern 분석에 의한 유전자 발현양상 조사	77
4. 지방대사 조절 물질의 생산 및 지방대사 조절 효과 검정	86
가. Bovine leptin 발현벡터 제조 및 <i>E. coli</i> 내 도입	86
나. <i>E. coli</i> 에서 leptin 단백질 생산 및 정제	88
다. 지방세포주에서 leptin의 지방대사 조절 효과 검정	91
라. 한우 지방조직에서 leptin의 지방대사 조절 효과 검정	91
 제 4절 적 요	 95
 제 5절 인용문헌	 98

제 3 장 한우 고급육 생산을 위한 β -adrenoceptor에 대한 분자유전학적 연구	104
제 1절 서 설	104
제 2절 재료 및 방법	105
1. β -adrenoceptor 분포 조사	105
가. 지방세포 membrane fraction 분리	105
나. Radio ligand binding assay	105
2. β -adrenoceptor 유전자 cloning	106
가. β 1-adrenoceptor 유전자 cloning 및 염기서열 분석	106
나. β 2-adrenoceptor 유전자 cloning 및 염기서열 분석	108
다. β 3-adrenoceptor 유전자 cloning 및 염기서열 분석	109
3. β -adrenoceptor 유전자 발현양상 분석	111
가. β 1-adrenoceptor의 northern 분석	111
나. RT-PCR에 의한 한우 β 1- and β 2-adrenoceptor 발현양상 검정	111
다. RT-PCR에 의한 근내지방과 피하지방에서 β -adrenoceptor 발현양상 검정	112
제 3 절 결과 및 고찰	113
1. β -adrenoceptor subtype 분포 조사	113
가. 지방세포 membrane fraction 분리	113
나. Radio ligand binding assay	114
2. β -adrenoceptor 유전자 cloning	117
가. β 1-adrenoceptor 유전자 cloning 및 염기서열 분석	117
나. β 2-adrenoceptor 유전자 cloning 및 염기서열 분석	121
다. β 3-adrenoceptor 유전자 cloning 및 염기서열 분석	124
3. β -adrenoceptor 유전자 발현양상 분석	127
가. β 1-adrenoceptor의 northern 분석	127
나. RT-PCR에 의한 한우 β 1- and β 2-AR 발현양상 검정	127
다. RT-PCR에 의한 근내지방과 피하지방에서 β -AR 발현양상 검정	130

제 4절 적 요	131
제 5절 인용문헌	133
제 4 장 한우 지방조직에서 stearoyl-CoA desaturase에 대한 연구	136
제 1절 서 설	136
제 2절 재료 및 방법	137
1. Stearoyl-CoA desaturase (SCD) 효소 분석	137
가. 공사 한우 및 microsomal fraction 준비	137
나. SCD 효소 활성 측정	138
2. SCD cDNA cloning	139
가. SCD cDNA cloning	139
나. SCD cDNA 염기서열 분석	141
3. SCD 유전자 발현양상 분석	141
가. Northern에 의한 SCD 유전자 발현 양상 분석	141
나. RT-PCR에 의한 SCD 발현 양상 조사	142
제 3절 결과 및 고찰	144
1. Stearoyl-CoA desaturase (SCD) 효소 분석	144
가. Microsomal fraction 준비	144
나. SCD 효소 활성 분석	148
2. SCD cDNA cloning	155
가. SCD cDNA cloning	155
나. SCD cDNA 염기서열 분석	157
3. SCD 유전자 발현양상 분석	157
가. Northern에 의한 SCD 유전자 발현 양상 분석	157
나. RT-PCR에 의한 SCD 유전자 발현 양상 분석	160

제 4절 적 요	162
제 5절 인용문헌	163
제 5 장 한우육의 육질 분석	166
제 1절 서 설	166
제 2절 재료 및 방법	166
1. 한우수소의 육질 분석	166
가. 시료 준비	166
나. 근육대사물 분석 및 pH 측정	167
다. 일반성분 및 cholesterol 측정	169
라. 연도 측정	169
마. 지방산화 측정 (TBA Method)	169
바. Histology	170
사. Muscle protein gel electrophoresis	171
아. 통계처리	172
2. 한우 거세우의 육질 분석	172
3. 미국 하와이육의 육질 분석	173
제 3절 결과 및 고찰	174
1. 한우수소의 육질 분석	174
가. 근육대사물 분석 및 pH 측정	174
나. 일반성분 및 cholesterol 측정	176
다. 연도 측정	177
라. Histology	178
2. 한우 거세우의 육질 분석	179
가. 근육대사물 분석 및 pH 측정	179
나. 일반성분 및 cholesterol 측정	182
다. 연도 측정	182
라. 지방산화 측정	183

마. Histology	184
바. Muscle protein gel electrophoresis	185
3. 미국 하와이육의 육질 분석	187
가. 근육대사물 분석 및 pH 측정	187
나. 일반성분 및 cholesterol 측정	189
다. 연도 측정	190
라. 지방산화 측정	190
제 4절 적 요	191
제 5절 인용문헌	194

제 1 장 서 론

제 1절 연구개발의 목적과 범위

1. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

수입 쇠고기는 한우육보다 3 - 4배 값싸게 들어오고 있어서 한우 쇠고기는 양적으로 증가해도 생산단가가 높아 수입쇠고기와 경쟁이 어려운 상태에 있다. 한우고기는 질적인 면에서 수입 쇠고기보다 월등하게 우수하지 않으면 한우 산업의 장래는 밝지 않다고 본다. 한우 중에는 유전적으로 육질이 좋은 특성을 타고난 개체가 있으므로, 효율적인 방법으로 고급육 생산 개체를 선발, 육종하여 발육특성에 따른 사양관리를 잘하면 고급육 생산이 가능하다.

한우 고급육이란 우리 나라 사람들이 좋아하는 풍미와 맛을 갖춘 품질이 좋은 고기라고 할 수 있는데, 이는 근내지방이 잘 침착되도록 하여 한우 고유의 맛을 내며, 객관적으로는 현 도체등급 판정결과 육질 1등급을 받은 쇠고기를 말한다. 근내지방은 고기의 풍미와 맛을 좋게 하는 요인으로 알려져 있다 (Judge 등, 1989). 국내에서는 한우 고급육을 생산하기 위해서 여러 측면에서 연구가 수행되고 있다. 예를 들면, 소의 성장단계에 따라 육성기에는 조사료 중심으로 사육하여 골격과 소화기관을 발달시키고, 비육전기에는 배합사료 급여량을 늘려 근육을 발달시키며, 비육후기에는 배합사료의 무제한 급여로 근내지방도를 높여 생후 24개월령이후 체중 550kg이상에서 출하하여 근육내에 백색지방이 골고루 박힌 성숙된 쇠고기를 생산하도록 하는 성장단

계별 영양 및 사양측면에서의 방안이 제시되어 있다.

한우 고급육은 일차적으로 근내지방 침착도를 증가시키고, 피하지방축적은 감소시키는데 있다. 근내지방 침착도를 증가시키고, 피하지방축적을 감소시키기 위해서는 근내지방 축적 기작과 피하지방 축적 기작을 정확하게 이해해야 한다. 근내지방 축적과 피하지방 축적기작을 정확하게 이해하기 위해서는 지방대사 조절에 관여하는 유전자를 개발하여, 개발한 유전자의 발현양상을 비교분석하고, 지방대사조절 단백질의 두 지방조직간의 기능적인 차이를 연구함으로써 가능하다. 하지만 아직까지 국내는 물론 외국에서도 유용유전자원을 개발, 활용하여 지방대사 조절방안을 개발하고자 하는 연구는 거의 없다.

나. 경제·산업적 측면

우리 나라 농업에 있어서 한우는 특별히 중요한 의미를 지닌다. 한우는 한민족과 함께 유사이전부터 한반도에 정착하여 다른 품종과의 교잡 없이 동종번식되어온 우리 고유 품종의 소이다. 한우는 한민족에게 있어서 특히 우리 농민에 있어서 정신적, 경제적으로 중요한 지주적 역할을 해왔음은 물론 육류 단백질의 공급원으로써, 또한 노동력을 제공하는 역용으로써 농업에서 중요한 위치를 차지하여 왔다. 최근에는 쇠고기 수입개방이 현실화되어 우리가 잘못 대처하였을 경우 한우 생산 기반이 무너질 수 있다. 이러한 현실은 우리민족의 자긍심과 우리 농업의 상징인 한우에 대한 크나큰 위협이 되고 있다. 따라서 한우산업의 국제경쟁력을 제고시키기 위해서 정치적, 경제적 측면뿐만 아니라 과학적, 산업적 측면에서의 다각적인 협력과 지원이 절실히 요구되고 있다. 특히, 한우의 고품질, 고능력화를 통한 국제경쟁력 제고 방안 개발이 필수적이다.

다. 사회·문화적 측면

한우는 우리 민족과 더불어 애환을 함께 하면서 오랫동안 한반도에서 길러온 우리 고유의 소이다. 농경시대에는 없어서 안될 일 소로 사용되었고 농가의 주요한 자산이었으나, 70년대 이후에는 국민소득 증대로 늘어나는 쇠고기의 수요량을 충족하기 위해 한우의 사육방법은 자연히 농후사료를 다량 급여하여 짧은 기간 내에 빨리 비육시키는 방법으로 길러졌고 이로 인하여 한우의 고유한 맛과 품질을 중시하기보다는 양적으로 어떻게 많이 생산하느냐에 치중하여 한우고기의 참 맛을 찾을 수 없게 되었다.

쇠고기 시장 개방화에 한우가 살아남을 수 있는 방법은 한우고기 특유의 맛을 되찾기 위한 과학적인 방안을 마련하여 소비자가 즐겨 찾을 수 있는 고급육을 생산하는 길만이 최선이라 생각되며 이렇게 하여야만 한우가 농가의 주요한 소득원으로 계속 유지되고 한우산업도 살아 남을 수 있을 것이다.

2. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

한우 고급육 생산을 위해서 국내에서는 성장단계별 영양·사양관리, 거세에 의한 육질개선 등의 연구가 진행되고 있다. 여러 학자들에 의해 지방대사 조절을 위한 면역학적, 생화학적 방법이 시도되고 있다. 하지만 국내에서 아직까지 지방대사 조절을 위한 유전자원의 개발에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.

1993년도에는 인간의 비만과 관련된 획기적인 연구결과가 발표되었다. Zhang등 (1994)은 인간과 생쥐의 비만 유전자 (obese gene)를 발견하였고, 비만 유전자에 이상이 있는 변이체 생쥐 (ob/ob mouse)는 비만증세를 보여주었다. 그후 비만 유전자는 16kd의 비만단백질인 leptin을 coding함을 밝혀냈고, leptin은 비만증세를 나타내는 변이체 생쥐의 사료섭취량 감소와 지방축적의

감소효과를 나타냈다 (Halaas 등, 1995; Pelleymounter 등, 1995). 이러한 결과는 leptin은 체내 지방축적을 조절하는 내분비물질일 것이라는 것을 시사하고 있다. 사람비만유전자와 비만단백질의 발견으로 조만간에 사람의 비만문제를 치료할 수 있는 획기적인 방법이 개발될 것으로 기대된다.

아직까지 가축의 경우에 국내외에서 지방대사 조절 유전자에 대한 연구는 매우 미비하다. 특히 한우에서 지방대사조절 유전자와 단백질의 개발은 지방대사를 효율적으로 조절하여 고급육 생산을 위한 새로운 방안을 제시해 줄 것으로 사료된다.

지방 대사를 조절하는 유전자로 β -adrenergic receptor (β -AR)가 밝혀져 있다. β -AR은 α 와 β subtype이 존재하고 guanine-nucleotide-binding과 adenylyl-cyclase-coupled protein의 family로 지방대사와 관련성이 높다. β -AR은 $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ 의 3개 subtype로 나누어지며, 여러 종류의 세포에 분포하여 신경계, 순환계, 내분비계를 조절하는 기능을 수행한다. 또한 지방대사 및 탄수화물대사를 비롯한 에너지 대사도 β -AR에 의해서 조절이 된다 (Moloney 등, 1991; Kim 등, 1992). 가축에 있어서 소와 양은 돼지나 닭보다 β -adrenergic agonist의 투여에 반응을 잘하는 것으로 나타나는데, 소나 양에 있어서 도체의 단백질 조성은 18%까지 증가시키고 지방은 각각 14%와 47%까지 감소시키는 것으로 보고되었다 (Moloney 등, 1991). 이러한 단백질 축적은 이미 축적된 지방을 분해, 이용하여 에너지 공급을 보조함으로써 일어난 것으로 나타났다 (Choo 등, 1990). 지금까지의 이러한 β -AR의 생리적 특성을 이용한 연구는 주로 고기생산에 있어서 지방조성을 낮추고 단백질 조성을 높이는 방향으로 많이 이루어지고 있는데 이러한 이유는 많은 소비자들이 지방이 적은 고기를 선호하기 때문이다. 그러나, β -AR의 발현을 이용하여 지방축적 조절 방안을 개발하고자 하는 연구는 미진하다.

한우 고급육 생산을 위해서는 근내지방도를 높이는 것뿐만 아니라 지방

산의 조성도 매우 중요하다. 쇠고기의 독특한 풍미는 불포화지방산 함량이 영향을 미친다고 알려져 있는데 한우가 다른 품종과는 달리 불포화지방산, 특히 oleic acid 함량이 많은 것으로 알려져 있다. 한우육의 지방산 분석결과를 보면 대체로 불포화지방산의 함량이 높고, 포화지방산의 함량이 낮으며 고도불포화지방산/포화지방산의 비율이 높게 나타나며, 이러한 지방산의 조성이 한우육의 맛에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 쇠고기의 독특한 맛과 관련하여 단일불포화지방산인 oleic acid가 가장 중요한 요인으로 보고되고 있는데, 고기내 oleic acid의 증가는 고기의 기호성과 쇠고기에 대한 사람의 지각력에 영향을 미친다(Melton, 1982). 쇠고기 등심의 oleic acid 함량이 높으면 일반적으로 맛에 대한 관능평가에서 높은 점수를 얻는다. 인간에 있어 oleic acid의 섭취는 혈중 유해콜레스테롤로써 알려진 저밀도 단백콜레스테롤의 함량을 떨어뜨리거나 증가시키지 않는 것으로 알려져 있다. 이러한 사실은 건강을 위해 stearic acid와 같은 포화지방산보다는 oleic acid 함량이 높은 쇠고기가 더 건강에 좋다는 것을 의미하는 것이다. Stearoyl-CoA desaturase(SCD)는 포화지방산을 불포화지방산으로 전환하는데 관여하는 효소이다. SCD는 stearic acid, palmitic acid를 w-9계열의 단일불포화지방산으로 전환하는 Δ^9 -desaturase이다. SCD 유전자를 이용하여 불포화 지방산 함량이 높은 고품질의 한우고급육을 생산하고자 하는 연구는 전무한 실정이다.

3. 연구개발의 목표 및 내용

가. 연구개발목표와 내용

- 1) 지방대사조절 유전자원의 개발
- 2) 지방대사조절 유전자원의 발현양상 조사
- 3) 지방대사조절 단백질의 생산 및 지방대사조절 효과 검증

- 4) 한우 β -adrenergic receptor에 대한 분자유전학적 연구
- 5) 한우 stearyl-CoA desaturase에 연구
- 6) 한우육의 육질 분석

나. 연차별 연구개발 목표와 내용

구분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (1996)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 한우지방대사 조절 유전자원의 탐색 ○ 지방조직내 stearyl- CoA desaturase (SCD) 분석법 확립 ○ 지방조직내 β-adrenoceptor 분포 조사 	<ol style="list-style-type: none"> 1) 한우 지방조직 채취 2) Total RNA 분리 및 mRNA 정제 3) cDNA 합성 4) cDNA의 λvector에 ligation 5) In vitro packaging 6) cDNA library 특성 조사 <ol style="list-style-type: none"> 1) 지방조직내 SCD 분석법 확립 <ol style="list-style-type: none"> 1) 지방조직내 β-adrenoceptor 분포 조사
2차년도 (1997)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 한우 지방대사 조절 유전자원의 개발 ○ 한우 SCD 유전자 cloning ○ 지방조직내 β-adrenoceptor 조사 및 한우육의 육질 분석 	<ol style="list-style-type: none"> 1) 차별혼성화 방법에 의한 지방대사 조절 cDNA clone 선발 2) PCR/Southern 방법에 의한 지방대사 조절 cDNA clone 선발 3) Clone의 insert 분리 및 확인 4) λDNA내 insert를 plasmid로 전이 <ol style="list-style-type: none"> 1) 한우 SCD cDNA RT-PCR 2) SCD TA cloning <ol style="list-style-type: none"> 1) Beta-adrenoceptor 분포 조사 2) 한우육과 미국육 육질성상의 비교

구분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3차년도 (1998)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 지방대사 조절 유전자원의 특성 및 발현양상 규명 ○ β-adrenoceptor 유전자 cloning 및 특성 규명 ○ 한우육과 미국육 육질분석 	<ul style="list-style-type: none"> 1) cDNA clone의 부분적인 염기서열 결정 2) Clone의 발현양상 검정 3) Clone의 GenBank data와 비교 4) 신규 cDNA clone의 특성 규명 및 염기서열 분석 1) β-adrenoceptor cloning을 위한 primer 제작 2) β-adrenoceptor cloning을 위한 RT-PCR 3) β-adrenoceptor cDNA TA-cloning 4) β-adrenoceptor cDNA sequencing 1) 한우 거세우의 육질분석 2) 하와이 거세우의 육질분석
4차년도 (1999)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 지방대사 조절 단백질의 정제 및 특성 규명 ○ SCD 유전자 발현양상 검정 ○ β-adrenoceptor 유전자 특성 및 발현양상 검정 	<ul style="list-style-type: none"> 1) Leptin 단백질 발현벡터 제조 2) 발현벡터의 세포내 도입 3) Leptin 생산 및 정제 1) SCD 유전자 발현양상 검정 1) β3-adrenoceptor 유전자 cloning 2) β1- 및 β2-adrenoceptor 발현 양상 검정
5차년도 (2000)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Leptin의 생산 및 지방대사 조절기작 규명 ○ 지방부위별 SCD 유전자 발현 양상 비교 ○ β-adrenoceptor 유전자 발현 양상 비교 	<ul style="list-style-type: none"> 1) Leptin 단백질 생산 및 정제 2) Leptin의 지방대사 조절 효과 검정 3) Leptin의 지방부위별 지방대사 조절 효과 1) 지방부위별 SCD 유전자 발현양상 비교 1) 지방부위별 β-adrenoceptor 유전자 발현양상 비교

제 2 장 한우 고급육 생산을 위한 지방대사조절 유전자원의 개발

제 1절 서 설

우리 나라 농업에 있어서 한우는 특별히 중요한 의미를 지닌다. 한우는 한민족과 함께 유사이전부터 한반도에 정착하여 다른 품종과의 교잡 없이 동종번식되어온 우리 고유 품종의 소로써 한민족에게 있어서 특히 우리 농민에 있어서는 정신적, 경제적으로 중요한 지주적 역할을 해왔음은 물론 육류 단백질의 공급원으로써, 또한 노동력을 제공하는 역용우로써 농업에서 중요한 위치를 차지하여 왔다. 그러나 최근에 와서는 WTO 무역체제에 의해 쇠고기 수입개방이 현실화되었다. 이러한 현실은 우리민족의 자긍심과 우리 농업의 상징인 한우에 대한 크나큰 위협이 되고 있다.

우리 나라 축산에 있어서 한우의 국제경쟁력을 제고시키는 것은 중요한 과제이며 이를 위한 정치적, 경제적 측면에서뿐만 아니라 과학적, 산업적 측면에서의 다각적인 협력과 지원이 절실히 요구되고 있다. 위기에 처해있는 한우의 국제경쟁력을 높이기 위해서는 다각도의 연구와 노력이 절실하게 요구되고 있다. 그리고 이러한 노력 속에서 반드시 전제가 되어야 할 것은 한우가 가지고 있는 우수한 잠재적 유전형질을 효율적으로 개발하는 것이다. 이러한 목표에 이르기 위한 지금까지의 방법은 주로 후대검정방법에 의존하여 한우의 개량을 도모하는 것이었으나, 근래의 분자유전학의 발달에 힘입은 유전현상에 대한 이해와 유전자 조작기법을 이용하여 새로운 접근이 가능하게 되었다. 따라서 기존의 고전적인 후대검정 방법의 토대 위에 이들 최신

분자유전학적 방법을 적용시키면 한우의 우수한 형질을 효율적으로 개량시켜 나갈 수 있을 것으로 기대된다.

한우 고급육이란 우리 나라 사람들이 좋아하는 풍미와 맛을 갖춘 품질이 좋은 고기라고 할 수 있는데, 이는 근내지방이 잘 침착되도록 하여 한우 고유의 맛을 내며, 객관적으로는 현 도체등급 판정결과 육질 1등급을 받은 쇠고기를 말한다. 근내지방은 고기의 풍미와 맛을 좋게 하는 요인으로 알려져 있다 (Judge 등, 1989). 최근 수입쇠고기는 한우고기 보다 3 - 4배나 값싸게 들어오고 있어서, 국내산 쇠고기는 양적으로 증가해도 생산단가가 높아 가격면에서는 수입쇠고기와 경쟁이 어려운 상태에 있다. 따라서 한우고기는 질적인 면에서 수입쇠고기보다 월등하게 우수하지 않으면 한우의 장래는 밝지 않다고 본다. 한우 중에서는 유전적으로 육질이 좋은 특성을 타고난 개체가 있으므로, 효율적인 방법으로 고급육생산 개체를 선발, 육종하여 발육특성에 따른 사양관리만 잘하면 고급육 생산이 가능하다.

국내에서는 한우 고급육을 생산하기 위해서 여러 측면에서 연구가 수행되고 있다. 예를 들면, 소의 성장단계에 따라 육성기에는 조사료 중심으로 사육하여 골격과 소화기관을 발달시키고, 비육전기에는 배합사료 급여량을 늘려 근육을 발달시키며, 비육후기에는 배합사료의 무제한 급여로 근내지방도를 높여 생후 24개월령 이후 체중 550kg이상에서 출하하여 근육내에 백색지방이 골고루 박힌 성숙된 쇠고기를 생산하도록 하는 성장단계별 영양 및 사양측면에서의 방안이 제시되어 있다. 한우 고급육은 일차적으로 근내지방 침착도를 증가시키고, 피하지방축적은 감소시키는데 있다. 근내지방 침착도를 증가시키고, 피하지방축적을 감소시키기 위해서는 근내지방 축적 기작과 피하지방 축적 기작을 정확하게 이해해야 한다. 근내지방 축적과 피하지방 축적기작을 정확하게 이해하기 위해서는 지방대사조절에 관여하는 유전자를 개발하여, 개발한 유전자의 발현양상을 비교분석하고, 지방대사조절 단백질

의 두 지방조직간의 기능적인 차이를 연구함으로써 가능하다. 하지만 아직까지 국내는 물론 외국에서도 유용유전자원을 개발, 활용하여 지방대사 조절방안을 개발하고자 하는 연구는 전무하다.

본 과제에서는 한우 지방조직 cDNA library를 구축하여 지방분해가 활발하게 일어나는 절식시기와 지방축적이 일어나는 사료 급여시에 발현이 유도되는 유전자원들을 선별하고, 그 특성을 규명하는 연구를 수행하였다. 선별한 유전자에 대한 근내지방과 피하지방에서 발현양상의 차이를 규명하였으며, 일부 유전자에 대한 단백질을 미생물에서 생산, 정제하여 근내지방과 피하지방조직에서 지방대사에 미치는 영향을 분석하였다.

제 2절 재료 및 방법

1. 한우 지방조직 cDNA library 구축

가. 지방조직 채취

본 연구에서는 한우의 지방대사 조절 관련 유전자원을 확보하기 위해서 지방조직과 뇌 조직 및 기타 여러 조직이 필요하다. 성우 수컷한우를 도살하여 확보한 여러 조직은 부위별로 나누어 일부는 RNA분리 시약에서 분쇄시키고, 나머지는 액체질소에 보관하였다. 절식 (fasting)시에는 지방분해가 일어나고, 절식후 사료재급여 (refeeding)시에는 지방이 축적된다. 48시간 절식 한우 3두, 정상사료 급여 한우 3두 및 48시간 절식후 사료 재급여 6시간 한우 3두에서 각각 지방조직 및 기타 조직을 확보하여, 지방분해 및 지방축적 과정에 대한 연구에 이용하였다. 지방조직은 근내지방 (intramuscular adipose tissue), 근간지방 (intermuscular adipose tissue), 피하지방 (subcutaneous adipose

tissue), 신지방 (perirenal adipose tissue), 복부지방(abdominal adipose tissue) 등으로 구분하여 채취하였다.

나. Total RNA 분리 및 poly A RNA 정제

지방조직에서 total RNA를 acid guanidinium thiocyanate- phenol- chloroform 방법에 의해 추출하였다(Chomozenski와 Sacchi, 1987). 조직을 denaturing 용액 (guanidinium thiocyanate, Na citrate, 10% sarcosyl, 2-mecaptoethanol)에서 homogenization한 후 RNA가 함유되어 있는 denaturing 용액을 2M Na citrate, acidified phenol 및 chloroform과 혼합한 후 원심분리하였다. Aqueous phase를 다시 한번 phenol extraction한 후 2-propanol로 RNA를 침전시켰다. cDNA library제조 및 cDNA library screening에 필요한 Poly A RNA는 total RNA로부터 oligo (dT) cellulose 또는 poly A 분리 kit를 이용하여 정제하였다 (Sambrook 등, 1989).

다. cDNA library 구축

지방조직 cDNA library는 원래 Promega의 Riboclone synthesis system 및 EcoRI adaptor ligation system을 이용하여 제조하고자 계획하였으나, 최근 Strategene에서 개발된 더 효율적인 ZAP Express EcoRI/XhoI vector를 이용하여 아래와 같이 한우지방조직 cDNA library를 제조하였다. 이 방법은 기존의 방법보다 효율적으로 cDNA library가 합성되며, vector내에 cDNA가 CMV promoter에 높은 수준으로 발현될 수 있는 장점이 있다. First strand cDNA는 poly A RNA와 XhoI- d(T) primer를 상온에서 접합시키고 역전사효소로 42°C에서 40분간 반응하여 제조하였다. 이때 5-methyl-dCTP를 전구체로 첨가하여 hemimethylated cDNA가 합성되도록 하였다. Second strand cDNA는 위에서 만

들어진 RNA/DNA 병합체에 ribonuclease H와 DNA polymerase I을 처리하여 12℃와 22℃에서 각각 60분간 반응시켜 제조하고, 70℃에서 10분간 처리하여 효소를 불활성화시켰다. 여기에 다시 EcoRI adaptor를 첨가하고 T4 DNA polymerase를 37℃에서 10분간 처리후 XhoI으로 처리하여, vector에 ligation될 수 있도록 준비하였다. 합성한 cDNA는 EcoRI/XhoI digested-lambda ZAP express vector (Stratagene)에 T4 DNA ligase를 이용하여 ligation하였다. cDNA가 ligation된 vector를 Gigapack gold packaging mix (Stratagene)로 in vitro packaging하여 cDNA library를 합성하였다.

라. cDNA library 특성 규명

cDNA library의 recombinant효율은 X-gal과 IPTG를 이용하여 blue/white plaque의 비율로 결정하였다. cDNA library의 titer는 unamplified cDNA library를 serial dilution하여 plaque forming unit을 계산하여 결정하였으며, 이를 기초로 하여 independent clone의 숫자를 계산하였다. cDNA library내 insert의 크기는 lambda DNA를 in vivo excision으로 plasmid로 전환 후에 plasmid DNA를 제한효소로 절단하여 agarose gel 전기영동으로 결정하였다. cDNA library는 증폭한 후, titer를 결정하고 분주하여 -70℃에 보관하였다.

2. 지방대사 조절 유전자원의 탐색

가. 차별혼성화 방법에 의한 절식 및 굶여 유도 cDNA clone의 선발

원하는 cDNA clone을 선발하기 위해서는 연구 system에 적절한 방법을 이용하여야 한다. 차별혼성화 (differential hybridization) 방법은 T-cell에서만 발현되는 cDNA clones의 선발에 이용하여 성공적으로 원하는 cDNA clone을

탐색하였다(Cochran 등, 1984). 이 방법은 세포에 어떤 처리를 (예를 들면 growth factor를 처리하였을 때 발견되는 mRNA species) 하였을 때 특이적으로 발견되는 clones의 선발(Hedrick 등, 1984) 또는 똑같은 세포에서 특정 생리적 시기에만 발견되는 mRNA species의 선발에 이용할 수 있는 방법이다. 두 가지의 각기 다른 생리적 시기에 있는 세포에서는 같은 종류의 mRNA species가 대부분 발견되겠지만 특정 생리적 시기에서만 발견되는 mRNA species도 있다. 따라서 각각의 생리적 시기에 있는 세포에서 single strand cDNA를 제조하고, 이를 probes로 이용하여 특정 시기에 있는 cDNA library를 membrane에 duplication하여 differential hybridization 방법으로 screening할 경우, 특정 생리적 단계에서만 발견되는 clone을 선발할 수 있다. 본 과제에서도 지방대사 조절 관련 유전자원을 차별화 방법으로 선발하였다.

지방분해에 관련된 유전자는 절식 시에 발현이 유도될 가능성이 높고, 지방축적에 관련된 유전자들은 절식시보다 정상급여시에 발현이 많이 될 것이다. 절식시 지방조직의 mRNA를 이용하여 합성한 cDNA probe로 지방분해 관련 유전자들을 선발하고, 지방축적에 관련된 유전자는 정상급여 지방조직의 cDNA probe를 이용하여 선발하였다. 각각의 단일가닥의 cDNA probe는 처리 특이적인 poly A RNA를 정제하고, labeled first strand cDNA probe는 ³²P-CTP, oligo (dT) primer 및 reverse transcriptase를 이용하여 제조하였다. 지방조직 cDNA library의 recombinant bacteriophage plaques를 nylon membrane에 duplicate로 전이하였다. 각각의 nylon membrane은 절식 또는 정상급여시의 조직에서 제조한 labeled-first strand cDNA probe와 hybridization하여 절식 probe에만 hybridization되는 clone들 또는 signal이 더 강한 clone들을 선발하였다. 정상급여 probe에만 hybridization되는 clone들 또는 signal이 더 강한 clone들을 선발하였다.

나. PCR/Southern 방법에 의한 절식 및 급여 유도 cDNA clone의 선발

상기의 방법으로 primary screening하여 single plaque를 얻었을 경우에도 primary screening시 약간의 실수로 인해서 false plaque를 선발할 가능성이 있다. 선발한 clone이 올바르게 선발되었는지 재확인 과정을 거친 후 northern 또는 sequencing 과정을 진행해야 한다. 최근 PCR/Southern differential screening 방법으로 positive clone을 확인하는 방법이 개발되었다 (Luo 등, 1994). Primary screening에서 얻은 positive plaques를 freezing/thawing과정을 2-3회 반복하여 lambda DNA를 phage로부터 방출시켰다. Template lambda DNA와 T3/T7 primer를 이용하여 30 cycle의 PCR을 수행하였다. PCR product는 duplicate로 1.0% agarose gel에서 전기 영동을 하였다. Southern blotting으로 gel에 있는 DNA를 각각의 membrane에 전이한 후 membrane을 절식 및 사료 재급여 특이적 cDNA probe와 hybridization한 후 절식 또는 급여시기에 특이적으로 또는 더 강한 message를 보이는 clone들을 재 선발하였다. 이 방법은 신속하고 한번에 20개 정도의 clone을 조사할 수 있는 장점이 있다.

다. Lambda DNA를 plasmid로 전이와 insert 확인

선발된 cDNA clone은 lambda vector에 있으므로 in vivo excision방법을 이용하여 insert가 plasmid내에 삽입되도록 다음과 같이 유도하였다. ZAP Express vector에 fl bacteriophage protein이 binding 할 수 있는 "Origin of replication"으로 만든 후 *E. coli*에 ZAP Express vector와 "helper" phage (fl)을 infection시켜 자연적으로 fl protein에 의한 single stranded DNA (insert)를 합성시키고 분비시킨 후, *E. coli*는 열처리하며, 또 다른 *E. coli* {pBK-CMV}에 infection시켜 double stranded plasmid DNA를 만드는 원리를 이용하였다.

Agar plate에서 recombinant phage plaque를 picking한 후 500 μ l AM buffer

와 20 μ l chloroform이 든 tube에 넣었다. Page particles이 SM buffer에 방출되도록 vortexing해주고 상온에서 1 - 2 h정도 또는 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 보관한 후 2000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액만 새 tube에 옮겼다. 20 μ l OD₆₀₀=1.0 XL1-Blue MRF^r cells, 20 μ l phage stock, 1 μ l ExAssist helper phage를 섞어서 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 배양하였다. 2X NZY 배지 0.5ml를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 2 - 2.5 h 동안 배양한다. 20분간 70 $^{\circ}$ C에서 tube를 열처리한 후, 4000g에서 15분간 원심분리 한 후 상등액만 새 tube에 옮겼다 (이 stock은 filamentous phage particle로 packaged plasmid를 가지고 있으며, 4 $^{\circ}$ C에서 1-2개월 동안 보존할 수 있다). Phagemid를 배양하기 위해 XL0LR cells (OD₆₀₀=1.0) 200 μ l에 phage stock 50 μ l를 첨가하여, 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 배양하였다. LB-Kan. plate (50 μ l/ml)에서 하룻밤 배양시킨 후 colony를 얻었다. Plate에 생긴 colony는 cloned cDNA insert를 가진 pBK-CMV double stranded phagemid를 가지게 된다.

라. Plasmid 분리 및 insert 확인

LB/Kan. broth에서 overnight 배양한 cell에서 miniprep.을 이용하여 plasmid를 분리하였다. Incubation이 끝난 cell broth를 1.5ml씩 2개의 ET에 옮겨 3,400 rpm에서 5분간 cell을 침전시켜 pellet을 얻었다. Pellet에 100 μ l ice-cold Solution I을 첨가하고 강하게 vortexing 후 시험당일에 제조한 Solution II를 200 μ l 첨가하고 5회 정도 tube를 흔들어 주고 얼음 속에 저장하였다. Ice-cold Solution III 150 μ l를 첨가하고 tube를 5번 정도 흔들어주고 얼음 속에 5분 동안 tube를 저장후 4 $^{\circ}$ C, 15,000rpm, 5분간 원심분리하고 새로운 tube에 상등액을 옮겼다. 같은 volume의 phenol:chloroform을 첨가하고 vortexing후 4 $^{\circ}$ C, 15,000rpm, 2분간 원심분리하여 새로운 tube에 상등액을 옮겼다. 2 volume의

ethanol을 첨가하고 vortexing하여 실온에서 2분간 놓아둔 후 15,000rpm, 5분간 원심분리하고 plasmid pellet을 얻었다. Pellet을 70% ethanol로 세척하고 말린 후 TE buffer (pH 8.0) 50 μ l에 pellet을 녹여 OD (260 nm)를 측정하여 plasmid 양을 계산하였다. 일부의 plasmid DNA는 Qiagen plasmid purification column을 이용하여 분리하였다.

한우 지방조직 cDNA insert가 EcoRI과 XhoI내에 삽입되어 있으므로 plasmid를 EcoRI과 XhoI 제한효소로 처리하여 cDNA insert를 분리하였다. 제한효소처리한 plasmid solution을 0.5ul RNase (1 mg/ml, final 20 ug/ml)처리하여 RNA를 제거하였다. 반응후 1% agarose gel 전기영동을 실시하여 insert를 분리하였다. Insert가 확인된 plasmid는 다시 low melting agarose에서 전기영동한 후, insert부분의 gel을 잘라서 ET tube에 넣고 3 volume의 dH₂O를 첨가후 65 $^{\circ}$ C에서 15분간 가열하여 low melting agarose를 녹여 insert가 용액 내로 빠져나오도록 하였다. 분리한 insert는 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였고, northern 분석시 ³²P-labeled cDNA probe를 합성하는 template로 이용하였다.

3. 지방대사 조절 유전자원의 개발

가. 선발한 cDNA clone의 부분적인 염기서열 결정 및 database와 비교

상기 선발한 clone들을 ³⁵S-dATP, T3 primer, T7 primer, Cyclist Exo-Pfu DNA Sequencing Kit (Stratagene, USA)를 이용하여 double-stranded dideoxy chain termination 방법으로 partial sequencing하였다. 이 방법은 PCR을 응용한 염기서열 분석방법으로 plasmid 양이 매우 작은 10 fmol에서 500 fmol의 template DNA를 사용하는 장점이 있다. 보통의 PCR 반응과는 달리 sequencing 방법에서는 양쪽 primer를 사용하는 것이 아니라 읽고자 하는 strand에 맞는 단일 primer를 사용하는데, 5' primer로는 T3 primer를 이용하여,

3' primer는 T7 primer를 이용하여 각각 sequencing하였다. 약 500fmol의 template DNA와 1pmol의 primer, 10×sequencing buffer, 10 μ Ci ³⁵S-dATP, 2.5U Exo(-) Pfu DNA polymerase, 4 μ l DMSO와 멸균 증류수를 첨가하여 총 30 μ l의 반응 mixture를 만들어 각 ddNTP(ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) tube에 7 μ l의 반응 mixture를 분주하여 PCR sequencing을 수행하였다. PCR 반응시 denaturing 온도는 94 $^{\circ}$ C, 30초, annealing 온도는 47 $^{\circ}$ C에서 30초, extension은 72 $^{\circ}$ C에서 30초로 30회 정도 증폭시켰다. PCR 반응 후 5 μ l stop dye mix를 첨가하여 8% polyacrylamide gel에 전기영동하여 염기서열을 분석하였다. 각 clone들에 대하여 부분적인 염기서열을 GenBank database의 다른 유전자 또는 clone들과 유사성을 비교하였다.

나. 신규 cDNA clone의 제한효소 지도를 작성 및 전체 염기서열 분석

새로운 clone으로 판명되었을 경우에는 clone을 여러 가지 제한효소 (EcoRI, HindIII, KpnI, XbaI, Sall, XhoI, BamHI 등)로 처리 후 DNA 단편의 크기를 분석하여 제한효소 지도를 작성하였다. 또한 clone 전체의 염기서열을 분석하였다. Full-length clone인지는 sequences의 구성, 즉, 5' end, translation initiation site and termination site, poly A termination site, poly A tail 등을 조사하고 위에서 실시한 northern시 transcript의 size를 비교하여 결정하였다.

다. Northern 분석에 의한 유전자 발현양상 조사

1) 선발한 clone의 절식 및 사료급여 시기에 발현양상 검정

선발한 cDNA clone들이 지방조직의 분해 또는 축적시기에 발현이 유도되는 가는 northern 방법으로 조사하였다. 절식시, 사료재급여시 및 정상 급여시

기의 지방조직들 (복부지방, 신지방, 피하지방, 근간지방, 근내지방)에서 total RNA를 각각 추출한 후, 각 시기별로 다섯 개 부위의 total RNA를 혼합하였다. Total RNA 20ug을 1.0% formaldehyde agarose gel 전기영동으로 분리하였다. 전기영동 (100V, 1 - 2 시간)후 UV에서 28S와 18S band 확인하고 형광자와 함께 사진을 찍어서 나중에 mRNA band 크기를 결정하는데 이용하였다. Agarose gel상의 RNA는 capillary 반응으로 membrane에 전이하였다. 전이 후 membrane을 microwave oven에서 2.5분 baking하여 membrane에 RNA가 영구적으로 흡착되도록 하였다.

cDNA insert를 이용하여 hybridization에 필요한 ^{32}P -labeled probe를 random priming kit (Stratagene)를 사용하여 제조하였다. Membrane을 제조한 probe와 hybridization하여 clone의 발현양상을 다음과 같이 조사하였다. 0.5% SDS, 6X SSC, 10% dextran sulfate, 100 ug/ml sperm DNA로 구성된 hybridization용액을 이용하였다. 65°C에서 2시간 동안 prehybridization후 ^{32}P -labeled probe를 첨가하여 hybridization을 12시간 이상 실시하였다 (Thomas, 1980). Hybridization후에 membrane을 2X SSC/0.1 % SDS (상온에서 10분 2회), 2X SSC/0.1 % SDS (42°C에서 30분), 0.1X SSC/0.1 % SDS (42°C에서 30분), 0.1X SSC/0.1 % SDS (55°C에서 30분), 0.1X SSC/0.1 % SDS (65°C에서 30분)용액에서 각각 washing 하였다. Washing후에 membrane을 rap으로 싸서 X-ray film에 노출하여 2-4일 후에 현상하였다.

2) Clone의 근내지방과 피하지방에서 발현양상 검정

선발한 cDNA clone에 대한 근내지방과 피하지방에서의 발현양상을 northern 방법으로 조사하였다. 정상 급여시기 및 절식시의 근내지방과 피하지방에서 total RNA를 각각 추출하였다. 기타 여러 부위의 지방조직에서도 유전자의 발현양상을 조사하기 위하여 신지방, 복부지방, 근간지방에서도

total RNA를 각각 추출하여 northern 분석을 실시하였다.

4. 지방대사 조절 물질의 생산 및 지방대사 조절 효과 검증

가. Bovine leptin 발현벡터 제조 및 *E. coli*내 도입

본 연구에서는 지방축적 조절에 관여하는 비만유전자 (*obese gene*)가 coding하는 leptin 단백질을 미생물에서 발현시키는 연구를 수행하였다. pGEX vector를 이용하였는데, 이 벡터는 GST (glutathione S-transferase) gene fusion vector로서 IPTG에 의해서 유전자 발현이 유도되며, protein은 26kDa의 glutathione S-transferase(GST)를 지닌 fusion protein으로 발현된다. Fusion protein은 GST purification module을 사용하여 정제하였으며 thrombin에 의해 fusion protein의 GST carrier protein을 제거하였다.

pBluescript II vector내에 있는 *obese gene*은 vector와 insert를 EcoRI으로 양 말단을 절단시 reading frame이 pGEX-4T-3 vector의 reading frame과 일치함을 확인하고 vector와 *obese gene* insert를 각각 EcoRI 제한효소 처리 후 정제하였다. Vector를 calf intestinal alkaline phosphatase 효소로 처리하여 탈인산화시켰다. 탈인산화된 pGEX-4T-3 vector와 정제된 leptin을 T4 ligase로 ligation시켰다. Ligation product를 JM105 cell에 transformation후에 생성된 ampicillin resistant colony로부터 분리한 plasmid를 EcoRI으로 처리한 결과, ligation되었음을 확인하였다.

Leptin expression vector를 host BL21 *E. coli*에 도입하여 유전자가 도입된 colonies를 ampicillin 저항성으로 선발하고 plasmid를 분리하여 EcoRI 효소 처리하여, *obese cDNA*가 올바르게 도입되었음을 확인하였다.

나. *E. coli*에서 leptin 단백질 생산 및 정제

pGEX-4T-3-leptin expression vector가 도입된 BL21에서 GST-leptin fusion protein이 발현이 되는지 관찰하기 위하여 LB/amp. plate에서 single colony를 selection하여 5ml의 2×YTA broth에 접종한 후 37℃, 150rpm에서 12시간 동안 배양하였다. 배양된 cell 1ml를 10ml의 2×YTA broth에 접종하여 OD₆₀₀=0.6-0.8까지 30℃, 150rpm에서 2시간 배양하였다. 배양한 세포에 0.1mM IPTG를 첨가한 후 배양하여 2h, 4h, 6h에 1ml 씩 취하여 protein loading buffer와 혼합 후 SDS-PAGE를 수행하여 fusion protein의 발현을 관찰하거나, cell suspension을 1ml씩 취해서 15,000rpm에서 1~2분 centrifuge하여 상등액은 버리고 pellet을 -70℃에 보관하였다. -70℃에 저장해 놓은 50ml tube에 각각 2~3ml의 1×PBS로 resuspension시키고, 여기에 1mM PMSF와 100μg/ml lysozyme을 첨가한 후 ice에서 30분간 방치하였다. 여기에 0.2% Triton X-100과 0.1% SDS를 첨가한 후 ice하에서 sonication (80Amp, 4분)을 수행하였다. Sonication 후 1.5ml tube로 옮겨 담고 4℃, 15,000rpm, 15분간 centrifuge 시켜 상등액만 새로운 tube로 옮겨 담았다. 상등액을 SDS-PAGE로 확인한 결과, IPTG에 의해서 GST-leptin fusion protein (42kD)이 induction된 것을 확인하였다.

GST-leptin fusion protein을 glutathione sepharose 4B로 정제하기 위하여 single colony를 selection하여 5ml의 2×YTA broth에 접종한 후 37℃, 150rpm에서 12시간 동안 배양하였다. 배양된 cell 5ml을 500ml의 2×YTA broth에 접종하여 OD₆₀₀=2까지 30℃, 150rpm에서 4-6 시간 배양한 후, 0.1mM IPTG를 첨가하여 30℃, 150rpm에서 2 시간동안 배양하였다. 배양된 세포를 원심 분리한 cell pellet에 1×PBS, 1mM PMSF, 100ug/ml lysozyme을 첨가하고 ice에서 30분간 incubation하여 cell을 lysis하였다. 0.2% Triton X-100, 1% SDS를

첨가한 후 2분 동안 sonication한 후 원심분리하여 상등액을 분리하였다.

4 °C에 보관되어 있는 glutathione sepharose 4B resin의 ethanol을 제거하고 equilibrium시키기 위해 4개의 1.5ml tube에 각각 250 μ l씩 분주하여 1ml의 ice-cold 1 \times PBS를 넣어 잘 혼합한 후, 4°C, 15,000rpm, 1분간 centrifuge시킨 후 상등액을 제거하였고, 이러한 과정을 2~3회 더 수행하였다. 상기의 sonicated 상등액을 equilibrated glutathione sepharose 4B resin에 첨가하여 shaking water bath에서 ice하에서 1~2시간 반응시켰다. Resin에 결합한 leptin 이외의 상등액에 있는 protein은 원심분리하여 제거하였다. 10ml의 1 \times PBS를 첨가하여 ice에 유지상태로 shaking water bath에서 10분 동안 shaking시킨 후 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 1ml의 10mM reduced glutathione elution buffer를 첨가하고 상온 shaking water bath에서 3~12h 반응시킨 후, 3,000rpm, 2분 원심분리후 상등액만 새로운 tube로 옮겼다. 원심분리한 상등액 일부를 취하여 SDS-PAGE를 수행하여 fusion protein이 정제되었는 가를 확인하였다.

정제된 GST-leptin protein을 포함하고 있는 상등액 1ml에 thrombin (1unit/ μ l) 5 μ l를 첨가한 후 상온에서 12h 이상 shaking water bath에서 반응시켰다. 상등액 일부를 취하여 SDS-PAGE 수행하여 fusion protein이 절단되었는 가를 확인하였다. GST-leptin fusion protein에서 thrombin처리에 의해 잘려진 GST를 제거하기 위하여 thrombin 처리 후 PBS 2000 volume하에서 dialysis하였다. 그 후 상기와 같은 방법으로 500 μ l의 glutathione sepharose 4B resin을 첨가, 6h동안 반응시키고 3,000rpm, 2분간 centrifuge하여 상등액만 새로운 tube에 옮겼다. 상등액을 모아 Centricome으로 농축시킨 후 SDS-PAGE 전기영동으로 leptin protein의 정제를 확인하였다.

다. 지방세포주에서 leptin의 지방대사 조절 효과 검정

상기의 방법으로 leptin을 정제한 후, leptin 단백질을 지방세포 cell line의

배양액에 첨가하여 지방조직내 glucose 유입율을 아래와 같은 방법으로 조사하였다. Adipocyte 세포는 3T3-L1 cell line을 이용하였다. ATCC (CL-173)에서 구입한 3T3-L1 adipocyte cell vial (1.4×10^6 cells/ml, expected viability = 91~96%)을 37°C water bath에서 2분 이내에 재빨리 thawing하고 vial을 water bath에서 꺼내어 70% EtOH로 vial 뚜껑주변을 세척하였다. 75cm² culture flask에 15분전에 미리 growth media인 DMEM/10% FCS/Antibiotic 용액 20ml를 넣은 후 incubator에서 prewarming시켰다. Growth medium은 DMEM [DMEM (Sigma D6429, with 4.5g/L glucose, L-glutamine and sodium pyruvate) 용액 1 liter에 1.5g sodium bicarbonate 첨가, 녹인 후 filtration하여 사용함], 10% bovine calf serum과 50 µ/ml penicillin + 50 µg streptomycin (stock solution 5,000U penicillin and 5mg streptomycin/ml을 media 1ml당 10 µl 첨가함)으로 구성되어 있다. 24h culture 후에 세포부착을 확인하고 fresh media로 교체하였다. 이 세포는 confluency까지 배양하면 특성이 변하므로 80% confluent 상태에서 subculture를 하던가 또는 저장하였다. Subculture를 위해서 배양액을 제거하고 2.0~3.0 ml trypsin-EDTA를 첨가한 후 cell disaggregation을 확인하였다. 5분 정도 후에 cell이 detach되면 6.0~8.0ml growth media를 첨가하여 gentle pipetting으로 single cell population 만들었다. 75cm² flask에 4.0×10^5 cells을 seeding하고, 매 3일 마다 subculture를 실시하여 필요한 양의 세포를 증식시켰다. 세포 저장은 growth media + 5%(v/v) DMSO 용액을 이용하였다.

3T3-L1 세포를 분화시켜 leptin 첨가에 의한 glucose 유입율을 아래와 같이 조사하였다. Cell을 4×10^3 cells/cm² density로 6 well plate에 seeding하였다. Media(1.4ml)를 2~3일 간격으로 교체하면서 confluency까지 배양하였다. Confluency 도달 2일 후에 differentiation medium으로 교체하여 adipocyte로의 분화를 유도하였다. Differentiation media는 DMEM + 10% bovine calf serum + 0.5mM 3-isobutyl-methylxanthine (stock 5 µg/µl) + 0.25 µM dexamethasone + 1

$\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin (stock $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 을 $20\mu\text{l}$ 첨가)으로 구성되어 있다. 분화유도 배지에서 2일 배양후 분화배지를 제거하고, DMEM + 10% FCS + 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin이 포함되어 있는 배지에서 2일 배양하였다. 그후 DMEM + 10% FCS 배지에서 6일간 배양하여 cell의 분화를 유도하면서 2-3일 간격으로 배지를 교환하였다. Glucose transport assay를 위하여 분화된 세포에 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leptin을 첨가하고 24h 배양하였다. Glucose transport assay전에 serum-free DMEM에 4h preincubation한 후 세포를 Krebs-Ringer phosphate buffer (KRB)로 2회 세척하고, KRB 용액에서 30분 배양하였다. Insulin-stimulated glucose transport를 위하여 10 nM insulin을 첨가하고 30분을 더 배양하였다. 0.25 μCi [$1\text{-}^{14}\text{C}$] glucose를 첨가하고 상온에서 10분 배양하였다. 배지 교환과정에서 leptin은 추가로 첨가하였다. 배양후 배지를 제거하고 PBS로 3회 세척후 0.5 ml 0.2N NaOH로 세포를 녹였다. 10ml의 scintillation cocktail 용액에 resuspend시켜 LSC로 radioactivity를 측정하였다.

라. 한우 지방조직에서 leptin의 지방대사 조절 효과 검정

Leptin에 의한 근내지방과 피하지방으로의 glucose 및 acetate 유입을 아래와 같이 조사하였다. 도살 즉시 피하지방이 포함되어 있는 등심을 실험실로 운반한 후, 피하지방은 바깥쪽은 제거하고 오염되지 않은 안쪽 지방조직을 이용하였다. 피하지방을 petri dish에 모아서 잘게 자른 후 ET를 이용하여 0.2g을 정량하여 KRB 용액 3 ml가 들어있는 6 well plate에 옮긴 후, 가위로 잘게 잘라서 0.1 mm diameter explant를 준비하였다. 근내지방 조직도 knife와 scissor로 채취하여 petri dish에 모아서 세절하였다. ET를 이용하여 근내지방 0.2g을 정량하여 KRB 용액 3 ml가 들어있는 6 well plate에 옮긴 후, 가위로 잘게 잘라서 0.1 mm diameter explant를 준비하였다.

아래의 4 가지 처리에 대하여 처리당 3 반복 (3 wells) 이상을 수행하였다. 1) control: KRB 용액, 2) $2\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin 처리, 3) 100nM leptin 처리: $1.25\mu\text{g}/\mu\text{L}$ leptin $3.8\mu\text{L}$ 첨가/ 3mL , 4) insulin + leptin 처리. 각 well에 $1\mu\text{Ci}$ [^{14}C]-glucose를 첨가하고 37°C 에서 2시간 반응하였다. Acetate 유입을 조사도 glucose 유입을 조사와 같은 방법으로 처리후 각 well에 $1\mu\text{Ci}$ acetate [^{14}C]-acetic acid를 첨가하고 37°C 에서 2시간 반응하였다. 반응 후 5mL 5% trichloroacetic acid를 첨가하여 반응을 종료하였다. KRB buffer를 제거하고 KRB buffer로 1회, $1\times\text{PBS}$ 로 2회 세척하여 unincorporated substrate를 제거하였다. 0.5mL 0.2N NaOH로 지방조직을 lysis시킨 후 10mL 의 scintillation cocktail 용액에 희석하여 LSC를 이용하여 radioactivity를 측정하였다.

제 3절 결과 및 고찰

1. 한우 지방조직 cDNA library 구축

가. 지방조직 채취

한우의 지방대사 조절 관련 유전자원을 확보하기 위해서 지방조직 및 기타 여러 조직이 필요하다. 절식 (fasting)시에는 지방분해가 일어나고, 절식후 사료재급여 (refeeding)시에는 지방이 축적된다. 절식 지방조직과 정상급여 또는 사료 재급여 지방조직간의 유전자 발현양상을 비교·분석하면 지방분해 및 지방축적과 관련된 유전자원을 개발할 수 있을 것이다. 따라서, 본 연구에서는 48시간동안 절식시킨 숫한우 1두와 암한우 2두, 정상사육 숫한우 1두와 암한우 2두 및 48시간 절식후 사료재급여 숫한우 1두와 암한우 2두, 총 9

두의 한우를 도살하여 조직을 채취하였다. 사료를 급여한 한우는 사료급여 2 ~ 3시간 후에 도살하였다. 조직채취 시간을 고려하여 1회에 3마리씩 3회에 걸쳐서 조직을 채취하였다. 도살한 한우로부터 지방조직 및 기타 조직을 확보하였다. 각각의 한우에서 지방조직은 근내지방, 근간지방, 피하지방, 신지방, 고환지방, 복부지방 등으로 구분하여 채취하였다. 확보한 조직은 일부는 RNA 분리 시약에서 분쇄시키고, 나머지는 액체질소에 보관하였다.

나. Total RNA 분리 및 poly A RNA 정제

1) Total RNA 분리 및 전기영동

한우 지방조직에 대한 cDNA library를 합성하기 위해서는 우선 지방조직의 total RNA가 필요하다. 각각의 지방조직에서 total RNA를 acid guanidinium thiocyanate- phenol- chloroform 방법으로 추출하였다. 9 마리의 한우 지방조직들 (근내지방, 근간지방, 피하지방, 신지방, 복부지방, 또는 고환지방) 총 45 개 sample의 RNA를 분리하였다. 각각의 한우에서 지방조직 부위별로 분리한 total RNA의 양이 표 1에 요약되어 있다. Total RNA 약 10 μ g을 1.0% formaldehyde agarose gel에서 전기영동하여 RNA를 size별로 분리하였다. 그림 1에는 나타나 있듯이 28S와 18S ribosomal RNA band가 뚜렷하게 분리되었고 mRNA는 거의 분해되지 않고 정상적으로 분리되었다. 한가지 실험에 어려웠던 점은 지방조직에는 전체적으로 RNA양이 다른 조직 (예를 들어 간조직)보다 RNA 함량이 1/10정도로 적어서 total RNA 분리에 많은 조직과 시간이 소요되었다.

2) Poly A RNA의 정제

한우 지방조직 cDNA library제조에 필요한 poly A RNA는 표 1에 제시되

어 있는 각각의 조직에서 분리한 total RNA를 혼합하여 분리하였다. 표 1을 보면 조직간에 사용한 total RNA의 양에는 다소간의 차이는 있으나, 정상급 여우 total RNA 1,789ug, 절식우 total RNA 2,162ug 및 절식후 사료 재급여우 total RNA 2,106ug을 각각 사용하여 사료급여 방식간에 사용한 total RNA의 양은 큰 차이가 없었다. 여러 가지 조직의 total RNA를 혼합하여 poly A RNA를 분리하였는데 그 이유는 사용한 여러 가지 지방조직별로 특이적인 유전자가 발현될 경우 이러한 mRNA가 cDNA library에 포함되어 있어야 하고, 또한 절식, 정상급여 및 절식후 사료 재급여시 발현되는 모든 유전자들이 총체적으로 포함되어 있는 cDNA library를 만들어야 나중에 필요한 유전자를 찾아낼 수 있기 때문이다. Poly A RNA는 Stratagene poly A RNA purification column을 이용하여 분리하였다. 정제한 poly A RNA를 전기영동한 결과, 대부분의 28S 및 18S ribosomal RNA가 제거되고 mRNA가 enrich된 것을 확인하였다 (그림 2).

다. cDNA library 구축 및 cDNA library 특성 규명

지방조직 cDNA library는 ZAP Express EcoRI/XhoI vector를 이용하여 제조하였다. 제조한 cDNA library의 recombinant효율은 X-gal과 IPTG를 이용하여 blue/white plaque의 비율로 결정하였는데, 99%의 높은 recombinant율을 보여주었다. cDNA library의 titer는 unamplified cDNA library를 serial dilution하여 plaque forming unit을 계산하여 결정하였으며, unamplified library는 5.68×10^5 pfu/ml의 titer를 보여주었고, primary plaques는 1.64×10^6 pfu의 높은 titer를 나타냈다. cDNA library내 insert의 크기는 lambda DNA를 *in vivo* excision 후 plasmid DNA를 EcoRI/XhoI 또는 SpeI/KpnI으로 절단하여 agarose 전기영동으로 12개 random plaques의 insert size를 조사하였다. 12개의 plaques를 조사한

결과 0.4kb~1.9kb의 insert 크기를 보여주었으며, 평균 insert size는 1.1kb이었다 (그림 3). 그림에 나타나 있듯이 SpeI/KpnI 절단 insert는 vector 부분을 약간 포함하고 있어서 EcoRI/XhoI insert보다 약간 더 큰 band를 보인다. 10^6 recombinant에 해당하는 cDNA library를 증폭한 후, titer를 결정하고 분주하여 -70°C 에 보관하였다. 증폭한 library의 titer는 3.67×10^9 pfu/ml로 높았다. 이러한 한우 지방조직의 cDNA library의 특성을 볼 때, 매우 우수한 것으로 판단하여 지방대사조절 유전자원을 탐색·개발하는데 이용하였다.

Table 1. Amount of total RNA used for extraction of Poly A RNA

사료급여 방법	지방조직 부위	RNA 양, ug			
		숫한우	암한우1	암한우2	소 계
정상급여	피하지방	71	153	56	279
	복부지방	54	258	77	389
	근간지방	85	203	67	355
	근내지방		322	14	337
	신지방	54	189	42	285
	고환지방	144			143
	소계	408	1,125	256	1,789
절식	피하지방	87	226	100	413
	복부지방	95	375	51	521
	근간지방	92	210	55	356
	근내지방		154	33	187
	신지방	63	438	46	547
	고환지방	137			136
	소계	474	1,403	285	2,162
절식후 급여	피하지방	118	327	46	491
	복부지방	64	254	174	491
	근간지방	66	223	96	386
	근내지방		190	15	205
	신지방	63	201	129	392
	고환지방	140			140
	소계	451	1,195	460	2,106
계	1,333	3,723	1,001	6,057	

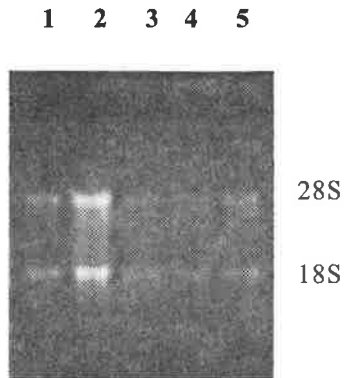


Figure 1. Electrophoresis of total RNA. The 10 ug of total RNA extracted from subcutaneous (lane 1), epididymal (lane 2), perirenal (lane 3), abdominal (lane 4), and intramuscular adipose tissues (lane 5) of Hanwoo were fractionated on 1.0% agarose gel containing formaldehyde.

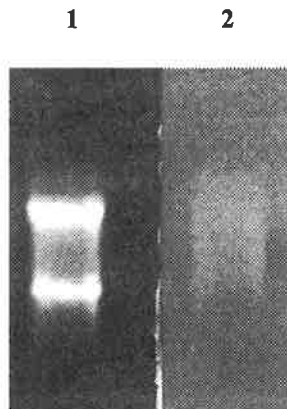


Figure 2. Electrophoresis of poly A RNA. The 10 ug of total RNA (lane 1) and 3 ug of poly A RNA (lane 2) purified from the pooled total RNAs of Hanwoo adipose tissues were fractionated on 1.0% agarose gel containing formaldehyde.

P 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 P

 M U C1 C2 U C1 C2 U C1 C2 U C1 C2 U C1 C2 U C1 C2 U C1 C2 C1 C2 U U C1 C2 U C1 C2 U C1 C2 C M

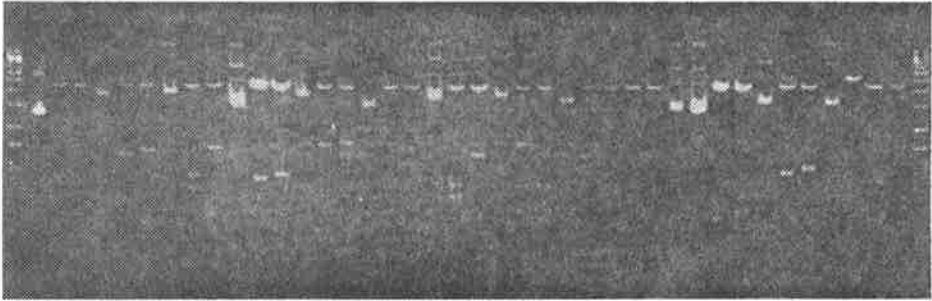


Figure 3. Determination of insert size of cDNA library from Hanwoo adipose tissues. cDNA library was constructed using the pooled poly A RNA extracted from various adipose tissues. Twelve clear plaques (1~12) were randomly picked and subjected to *in vivo* excision, generating pBK-CMV plasmid. The purified plasmid was digested with either EcoR I/Xho I (C1) or Spe I/Kpn I (C2). The digested plasmids were analysed on an 1.0% agarose gel along with uncut plasmid (U). Spe I/Kpn I-digested plasmid (C2) showed slightly larger size compared to EcoR I/Xho I-digested plasmid (C1) since C2 contains larger vector sequences than C1. Size of pBK-CMV vector is 4.5 kb. P, control pBluescript vector; M, 1 kb ladder.

2. 지방대사 조절 유전자원의 탐색

가. 차별혼성화 방법에 의한 절식 및 급여 유도 cDNA clone의 선발

지방분해에 관련된 유전자는 절식시에 발현이 유도될 가능성이 높고, 지방축적에 관련되는 유전자는 정상급여시에 발현이 유도될 가능성이 높다. 절식 지방조직 cDNA probe를 이용하여 지방분해 관련 유전자들을 선발하고, 지방축적에 관련된 유전자는 정상급여 지방조직 cDNA probe를 이용하여 선발하였으며, 그 예가 그림 4에 제시되어 있다. 총 8개의 150 mm petri dish를 이용하여 차별혼성화 실험을 실시한 결과, 74개의 절식시 signal이 강한 primary positive candidate plaques를 선발하였다. 또한 정상급여시에 signal이 강한 34개의 primary positive candidate plaques도 선발하였다. cDNA library를 plating시에 150 mm petri dish당 약 2,000 ~ 2,500개의 plaque가 형성되도록 한 결과, 대부분 (75%, 56/74)의 절식 clone에 대하여 single plaque를 취할 수 있었다.

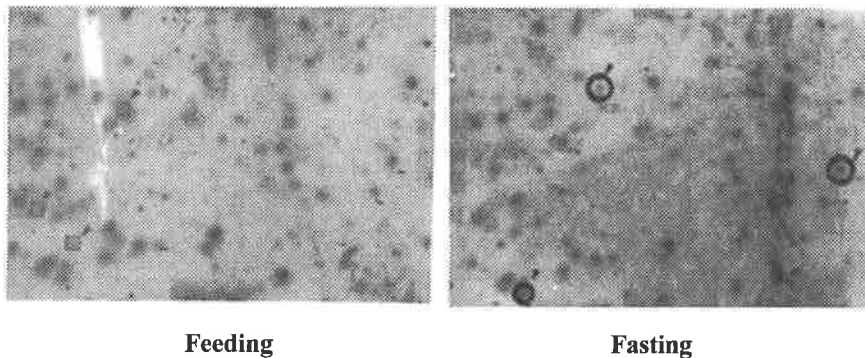


Figure 4. Differential screening of Hanwoo adipose tissue cDNA library. Approximately 2,500 pfu of phage solution were plated. Duplicate filters were prepared from the same plate and hybridized with cDNA probes prepared from either feeding mRNA or fasting mRNA. The spots indicated by a rectangle and by a circle represent examples of feeding- and fasting-induced cDNA clones, respectively.

나. PCR/Southern 방법에 의한 절식 및 사료 급여 유도 cDNA clone의 재선발

상기의 방법으로 primary screening하여 single plaque를 얻었을 경우에도 약간의 실수로 인해서 false plaque를 선발할 가능성이 있다. 선발된 clone이 올바르게 선발되었는지 재확인 과정을 거친 후 northern 또는 sequencing 과정을 진행해야 한다. 최근 PCR/Southern differential screening방법으로 positive clone을 확인하는 방법이 개발되었다. 이 방법은 신속하고 한번에 20개 정도의 clone을 조사할 수 있는 장점이 있다. Primary screening에서 얻은 positive plaques내에 lambda DNA template와 T3/T7 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR product는 duplicate로 agarose gel에서 전기영동하고 Southern blotting으로 gel에 있는 DNA를 각각의 membrane에 전이하였다. Membrane을 절식 및 정상급여 cDNA probe와 hybridization한 후 절식 또는 정상급여시에 더 강한 message를 보이는 clone들을 재선발하였다. 7개의 positive plaque를 template로 PCR을 수행한 결과가 그림 5의 상단에 나타나 있다. Duplicate membrane을 정상 mRNA (feeding) 및 절식 mRNA probe (fasting)로 hybridization한 결과, 7번 lane의 clone이 절식 probe에 더 강한 signal을 보이므로 positive clone으로 재선발하여 특성 규명 연구를 수행하였다.

다. Lambda DNA를 plasmid로 전이

선발한 cDNA clone은 lambda vector에 있으므로 *in vivo* excision 방법을 이용하여 insert가 plasmid내에 삽입되도록 유도하였다. *In vivo* excision에 의해 절식시기 positive plaque 74개 클론의 λ DNA를 pBK-CMV plasmid로 전환하였다. 정상급여 positive plaque도 34개 클론의 λ DNA를 pBK-CMV plasmid로 전환하였다.

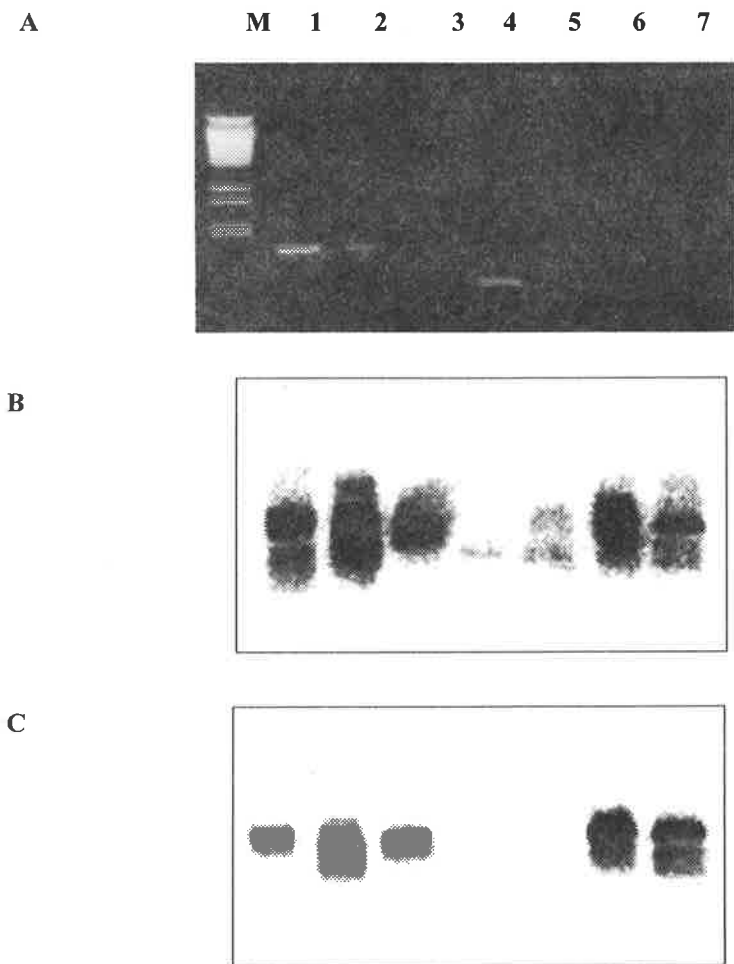


Figure 5. PCR/Southern differential screening of primary positive clones. Panel A: Inserts of positive plaques (lanes 1-7) identified from primary differential screening were amplified by PCR using 5'(T3)- and 3'(T7)-vector primers and analyzed on a 1.0% agarose gel. Marker, λ -BstE II digest. Panel B and panel C represents an autoradiogram hybridized with the cDNA probe prepared from the feeding cDNA probe and fasting probe, respectively.

라. Plasmid 분리 및 insert 확인

In vivo excision한 각 clone에 대한 *E. coli* cell을 배양하여 plasmid를 분리하였다. Plasmid를 EcoRI과 XhoI 제한효소로 처리하여 cDNA insert를 분리하고, 전기영동으로 insert size를 확인하였다 (그림 6). 대부분의 clone은 insert size범위가 0.5 ~ 1.0kb 사이였고, 작은 경우는 0.4 kb, 큰 경우는 3.0 kb이었다. Insert가 확인된 plasmid는 다시 low melting agarose에서 전기영동한 후, insert부분의 gel을 잘라서 65°C에서 가열하여 low melting agarose로부터 insert가 용액 내로 빠져 나오도록 한 후 northern 분석시 ³²P-labeled cDNA probe를 합성하는 template로 이용하였다.

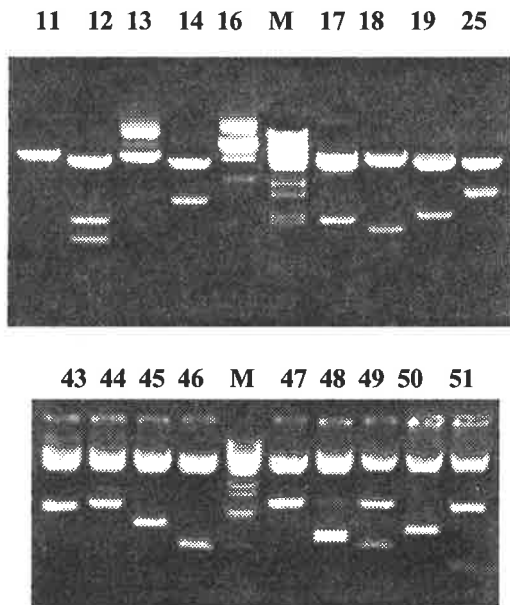


Figure 6. Electrophoresis of plasmid containing cDNA insert after *in vivo* excision and EcoRI/XhoI digestion. The plasmid was digested with EcoRI and XhoI, and the DNA fragments were analysed by a 1.0% agarose gel electrophoresis. M; λ DNA-Bst E II digest. Numerical number on each lane indicates clone number.

3. 지방대사 조절 유전자원의 개발

가. 선발한 cDNA clone의 부분적인 염기서열 결정 및 database와 비교

선발한 clone들을 partial sequencing하여 nucleotide sequences를 GenBank database에서 homology search하여 이미 밝혀진 clone인지 새로운 clone인지를 조사하였다. 그 결과, bovine 종에서 알려진 clone 16개 (ATP synthase 8, osteonectin, fatty acid binding protein, cytochrome oxidase subunit 3, obese gene 등)와 다른 종에서 알려진 clone 14개 (human lactate dehydrogenase, rabbit aldolase A, mouse ubiquitin degradation protein, rat stearyl CoA desaturase gene 등)의 clone을 확인하였다 (표 2, 3). 20개의 clone은 GenBank database와 유사성을 보이지 않은 unknown clone이었다. 표 4에 이들 clone에 대한 부분적인 염기서열이 제시되어 있다.

Table 2. Comparison of nucleotide sequences of the clones with GenBank database: known genes in bovine species

Clone Number	Gene Name
20	mitochondrial genome
26,53,62, 64	ATP synthase 8
37	S100 Ca BP
38	osteonectin
41, 46, 60	fatty acid BP
48, 55	cytochrome oxidase subunit 3
50	mitochondrial gene
59	aldehyde dehydrogenase
63	inositol polyphosphate 1-phosphatase
91	Obese gene

Table 3. Comparison of nucleotide sequences of the clones with GenBank database: known genes in other species

Clone Number	Reading nucleotide	Gene Name	match bases (% identity)
1	154	Human Lactate dehydrogenase B	80/121 (66)
4	200	Human homeobox protein CDX	71/109 (65)
7	82	Human voltage -dependent anion channel isoform1 (VDAC) mRNA	34/38 (89)
14	139	Human ribosomal protein L23a	31/33 (93)
39	124	Rabbit Aldolase A	53/84 (63)
49	163	Mouse heatshock pro65	56/66 (84)
52	179	Human fibroblast aldolase A	122/162 (75)
61	121	P. fluorescens dihydrolipoamide dehydrogenase	43/61 (70)
65	203	Mouse Ubiquitin fusion degradation protein	133/159 (83)
67	162	Human proto-oncogene tyrosine protein kinase	40/48 (83)
69	214	Human 40S ribosomal protein s3	197/211 (93)
70	173	C. elegans cosmid C43G2	33/44 (75)
71, 72	216, 216	Rat stearyl CoA desaturase	45/63 (71)

Table 4. Partial nucleotide sequences of the clones: unknown genes

Clone #	Reading nucleotide	Sequences
2	203	GGATCCATAGCATTTCACTGTTAGAAAGGTACTTGACCTTCACTG TCATAAGCACATAGTTTTACAGTAAGCTACAGTAATACGATCAG TACTGACGTACAGCTGACAGCTGTACAGTTCTGAACGCAACTG ACCTGACGACGTCAACGACGGCAGTGCAGCACTACTCCAGCAGA CATACGACCAAAGACTACTAGCCACC
3	192	TTGGACGGACGCGATCCAAGATCGGAGCGCGGGACAGGTGCAC GTCTTTCAGCTGCTAGCAGCTGCACGATGGCAGCAGGAGGAGGA TCGGTTCAGCGCATTGCTGGCCATGCCACAGGCACGAGGCCCTC AGAGGCTTACTACTTCTCAGCATCTCACCACAAGGTCTGAGAGA GTAGTGCATCGACGTAC
6	124	ATCACAGTTCTAAGGGTTCGAGCTCTCGTATGACACAGACTAGCT AATCACAGTTCTAAGCCGTGTCCGTGTAGCTCCTCGTATGACACG AGATCTGAGCTTAAAGATCCTCAATCTCACGTA CTAC
8	160	ACACAGTCTAGGGCCCTCGTGACGTGCGGACTCTCTACGCACGA GTGCAACACACAGTCTAGCGGCTCCTCGGTGACGTGCGAAGACT CTCTACGACACGAGGTGCTAACGATCGACGTGAACGTCTCTACGA GTGTCCGTA CTACGTATAGATCGATGTGA
9	143	ATCACATGTCTAGGTGTCGATCGCGACATGTAGACGCGTTCGAGA CACTACGCGAGCTCCTGCGCCGAGATCACTAGTTCTAGCGTCTGTC GATTCGCGACATGGTAGACGCGTCCGAGGACATACGCGAGCCTC CCCTGCGCGAGCGTAGTCTG
10	93	CCACATTAATAATCCTCCCCAAAAGAAAGAATTTTGAGGAGGC CAGATTTCAAACATAAACTATTATAAGCATGGGCTTGGTAATTG
11	131	TCCAAAGAATTCCACGAGGCAGNNTCCAAAGTGCCTCACTCAGA AGNTGCCCCAGCCCCTGGAGGAGCCAGGTGTACCCAAGACCTTA CTAGGCTTAAATTAGATCATAACTTTCTAACAGTTCTCTTAC
12	116	GCTGATCTATACCATGACCCTACACAAGGCTGGATGGTGTCTTG GCCAGGGTACTGTACTTGTGTAGGTGGTGTACTAGTAGATGACT TAGCTAGACTATAGTCGATATGACAC
15	140	TTGATATTTGTATAGGCACGAGGCAAGACCTTGACTGACTGACG AGCTTAGGATGTAGATGCATGAACTTTGCTGAACAGTGTCTCTGC TAGACTAACAGATCACACACAGTTAGGAAGTAGTGAGGTTGGAA TGTTTTAGTTGGA
17	164	AAAACGAAAAGCGCTCTGAGATCACATTGCTGGAGGGCGCAGTT CAGAACGAGCTCTGAGCTTGGACGTGAGAGTGTTCGTGTAGCGTG CTCGTCGCATGGATATGGAAGCTAGGTTATACAAACAAGTTAGA TGTAGGGGTTTCATTTCATGAATTCAACGTTG
18	114	TAGAAGAGCTGTGTGGGTCCTAGAGGCGGGNAGAAGAGCGGAG GCTGTGTCCCACAGACACTAGCATCATAATATATTCATCGGAGN NACTTCATCACTTCNNAATTNNACATACCCC

Table 4 (continued). Partial nucleotide sequences of the clones: unknown genes

Clone #	Reading nucleotide	Sequences
21	160	GCCGTCTTACTGGTATAAGCTGCCTACCCTGTATGTTTCATGTGT CTCCCAGCGGACAGTGTGCGAGGCTTGCAGAAGCAGGGGGCGCC TAGCTTCACTGGGAAGCACAAGAAGCTAAGGCAGGTTTAAAGT GCCTCACTCAGAAGGTGCCAGCCCCCTGAGG
45	127	CGGTGGAGACTTAGTGATGGGAACAGAGATTTAAAATNACNAT GCCAGTNGNGGTTGATGCTGCTGGGGGAAAGTCAAAGTCTGCTGG TGACCACTGTTGGGAGAGAAATACANCTGTTNNATGATATG
47	125	GCCAACTTAATCAGAGGAACAGATTATGTGGTGGGAATAAAAAT GTGGATACCTAGTTAAACAATTGCAAATACATTTAAATATGG TTCNNAAAATTGCTTCAAATATGATNCATAGGAACAATC
54	183	GCCAGCCATGGAGCAAAGAGGATTTGTTTTAGTCTCCTCTGT CTGGGTCAGAACCAGAGAGCATGCTGGATGCCCCCGCTTCTG GATAAGCTGCCTACCCTGAGTCAGTGCTCCAGCGTGACAGTG CTGAGGCTTGCAGAAGCAGGGGGTGTCTAGCCTTCACTGGGA AGCACAAGAA
56	180	AAGTCGGAAACTGTATATTGAAATTGTAATTATGAGGTTNNAA AACTNGGAAGTATCTAAGATAGTGTAATTGCCACTATTTTATNA TAGNNGATTAAATACCGCTGCAATATTTGTGTTGTGGTTGAAA ATTATGTACAGTTNNTTTTCCATGGTATCCTTTTGTGTCCTTA AATAT
57	195	TAAAGGTTGAAAATATAACAATACCAAATGCTCTGACACTGTTG AGCTCCAAGGATGGAAAGGAGGAGAACATTTCTTCTGTATTA ATTGGATAGATGGAGGCTNCAGAGCTTAGGCTAAACTAAAGGC TCCTTCTCTTTTGAGTTGTTTCCTCTCAGTAGGAAAAAAAAAA AT
58	135	AGCTGGTGCTCTGAGGTGGTGGGTGACATCACAGGGCNCCTGAA GGGTGGTGGGGGAGGTTATGTTGGAGCAGACGATGGGGCTTT TTTGGACCTTAGCTACTACTTGGAGGAGT
66	121	GCATTTTGAGACTTCAAAAAGAGATACATTGGTGGTTTGGTGGT GAGCATAGTGCTCTCCAAAAAATGNAGAATTTTGGAGCCAGA GTTGGGTCAAACATAAAGCTGTGTATACATGGG
73	124	AAAACGTCCGGTCCGGTAGTTTTAGTGGGAAAATGCAGCCGGAA CTTGGTTTATGTGGTTTGTATGTGGTGGAAACTAAGAGATTTGAT ATGATTAGGAGTTTTAGAGAATTGGTATAGTAGATAA

나. 신규 cDNA clone의 제한효소 지도작성 및 전체 염기서열 분석

Human lactate dehydrogenase B와 높은 유사성을 보인 clone은 bovine 종에서 아직 밝혀지지 않은 유전자이므로 clone 전체의 염기서열을 분석하였다. 약 1.3kb insert의 양 말단에 대한 부분 염기서열 분석 결과 translation initiation site와 termination site를 확인할 수 있어서 coding 부위 전체를 포함하고 있는 clone이었다. Human 및 pig의 LDH restriction map과 비교하여 가능성이 있는 여러 제한효소로 절단여부를 확인하였다. 그 결과 BamHI, EcoRI, PstI, HpaI, Pvu, MboI, XhoI, HpaII 등의 restriction site가 있음을 확인하였다(그림 7). EcoRI, XhoI을 처리한 절편과 PstI을 처리한 절편을 각각 TA 벡터에 subcloning하여 전체 유전자의 염기서열을 분석하였다(그림 8). 한우 LDH cDNA clone은 1,319bp의 nucleotide와 334개 아미노산으로 구성되어 있었다. 한우 LDH의 아미노산 서열을 pig (Tsuji 등, 1994), human (Sakai 등, 1987), rat (Tsuji 등, 1994), mouse (Hiraoka 등, 1990)의 LDH와 비교시 각각 98%, 98%, 97%, 96%의 homology를 보였다(그림 9).

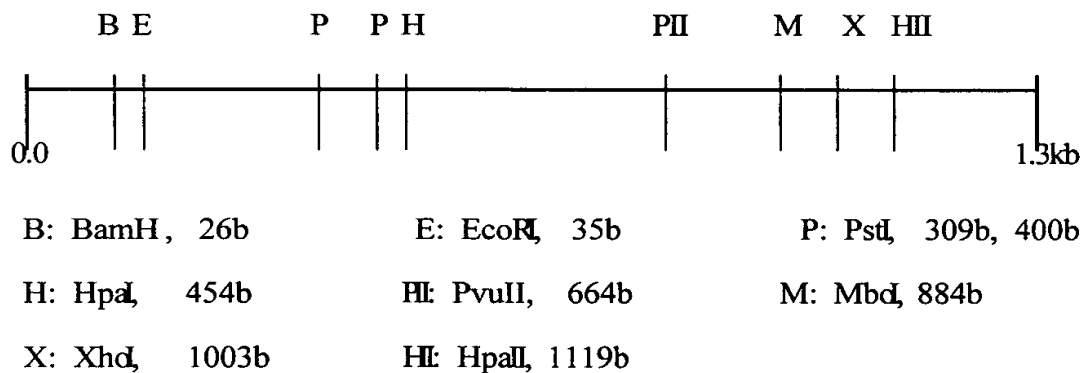


Figure 7. Restriction map of Hanwoo LDH cDNA clone. Restriction map was constructed based on nucleotide sequences of the clone.

GOGGCGCTGCAGGTGAC

ACTAGTGGATCCAAAGAATTOGGCAOGAGCTGACTTTGTCTTOGTGCAGOOCTTATCACTCTCTGGAGAACTTTCTCTOCCCTGGGCACA 108
ATGGCAACTCTTAAGGAAAAATTGATTGCACCCAGTTGCAGAAGAAGAGACAACGATCCCAAACAATAAGATCACTGTAGTGGGTGTGGGA 198
M A T L K E K L I A P V A E E E T T I P N N K I T V V G V G 30
CAAGTTGGTATGGCATGTGCCATCAGCAITCTGGGAAAGTCTCTGACTGACGAGCTTGCCTCTGTGGATGTTTGGGAAGATAAACTCAAA 288
Q V G M A C A I S I L G K S L T D E L A L V D V L E D K L K 60
GGAGAAATGATGGACCTGCAGCAOCCGAGCTTATTCCTTCAGACACCAAAAATTGTGGCAGACAAAGATTACTCTGTCACTGCCAATTC 378
G E M M D L Q H G S L F L Q T P K I V A D K D Y S V T A N S 90
AAGATCGTGGTGGTAACTGCAGGAGTTGOCAGCAAGAAGGGGAGAGTGOCTGAATTTGGTGCAAAGGAACGTTAACGTCTTCAAGTTC 468
K I V V V T A G V R Q Q E G E S R L N L V Q R N V N V F K F 120
ATCATTCTCAGATOGTCAAGTACAGTCTGCTGCATCATCATTGTGGTTTCCAACCCAGTGGATATTCTCACATATGTTACCTGGAAA 558
I I P Q I V K Y S P A C I I I V V S N P V D I L T Y V T W K 150
CTAAGTGGATTAOCCAAGCAOCCGTGTGATTGGGAGTGGATGTAACCTGGATTCTGCTAGATTTGCTAOCCTTATGGCTGAAAAACTTGGC 648
L S G L P K H R V I G S G C N L D S A R F R Y L M A E K L G 180
ATTCAATCCAGCAGCTGCCAOCGATGGATTTTGGGGGAACATGGGACTCAAGCGTGGCTGTGTGGAGTGGAGTGAATGTGGCAGGCGTT 738
I H P S S C H G W I L G E H G D S S V A V W S G V N V A G V 210
TCTCTOCAGGAACTGAATOCAGAAATGGGAACAGACAATGATAGTAAAATTGGAAGGAAGTGCATAAGATGGTGGTTGAGAGTGOCTAT 828
S L Q E L N P E M G T D N D S E N W K E V H K M V V E S A Y 240
GAAGTCATCAAGCTAAAAGGATATACCAACTGGGCTATTGGATTAAGTGTGGCTGATCTTATTGAATOCATGTTGAAAAATCTATGAGG 918
E V I K L K G Y T N W A I G L S V A D L I E S M L K N L S R 270
ATTCACCCAGTGTCAACAATGGTGAAGGGCATGTATGGCATTGAGAATGAAGTCTTCTGAGCCTTCOCTGTATOCCTGAATGCTCGAGGG 1008
I H P V S T M V K G M Y G I E N E V F L S L P C I L N A R G 300
TTAACCAGTGTATCAACCAGAAGCTGAAGGATGAAGAGTTGCTCAACTCAAGAAAAGTGCAGACACCCCTCTGGGCATCCAAAAGGAC 1098
L T S V I N Q K L K D E E V A Q L K K S A D T L W G I Q K D 330
CTGAAGGACCTGTGACTTCCGGCTGCAAGGCTGTAGACACTTAGCAACTACAGTGTGATTAACCACAAGCCTTTAGTTTGCATOCATGTA 1188
L K D L * 334
CATGGAGCACAGTTCGCTTTTGTCTTCTTAAGTCTGTGAATCTGGGCTCCAGAATCAAAGCCCATGCTTGCTTTAATGCTTGAAGAT 1278
GAGTCCTTGAACAAATCAAATAAACCACCTAGTGTAGTGTG 1319

Figure 8. Nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of bovine L-lactate dehydrogenase H chain cDNA. The amino acids are aligned with the second nucleotide of each codon. Asterisk (*) marks stop codon. The polyadenylation signal is underlined. The nucleotide sequence data are in the EMBL, GenBank, and DDBJ nucleotide sequence databases with the accession number AJ401268.

Bovine : MATLKEKLIAPVAEEETTIPNKKITWGVGQVGMACAISILGKSLTDELALVDMLEDKLKGEMDLQHGSLFLQTRKIVA 80
 Swine :
 Human : A.V..... A

Bovine : DKDYSVTANSKI VVVTAGVROEGESRLNLRNNMFKFIIPQIVKYSFACIIIVSNPVDILTYVTWKL SGLPKHRVI 160
 Swine : D.....
 Human : D.....

Bovine : GSGCNLDSARFRYLMAEKLG IHPSSCHGWILGEHGSSVAWVSGVNVAGVSLQELNPEMGTINDSENWKEVHKM VVESAY 240
 Swine : V.....
 Human :

Bovine : EVIKLKGYNWAIGLSVADLIESMLKNLSRIHPVSTMKMGYIENEVFLSLPCILNARGLT SVINQKUKDEEVAQLKKS 320
 Swine : Q..... V..... D..... N.
 Human : D.....

Bovine : ADTLWGIGKDKLKL 334
 Swine :
 Human : D.....

Figure 9. Comparison of the deduced amino acid sequences of bovine LDH-B with those of other species. Dot denotes the amino acid residue identical to that of bovine species.

다. Northern 분석에 의한 유전자 발현양상 조사

1) 절식 및 사료급여 시기에 clone의 발현 양상 검정

선발한 cDNA clone들이 지방조직의 분해 또는 축적시기에 발현이 유도되는 가는 northern 방법으로 조사하였다. 절식시, 사료재급여시 및 정상급여시의 지방조직들(복부지방, 신지방, 피하지방, 근간지방, 근내지방)에서 total RNA를 추출한 후, 각 시기별로 다섯 개 부위의 total RNA를 혼합하였다. Total RNA 40 ug을 전기영동하고 agarose gel상의 RNA를 membrane으로 이전하였다. 선발한 clone들의 insert를 이용하여 ³²P-labeled probe를 제조, hybridization하여 clone의 발현양상을 조사하였다. 12개의 클론이 정상급여와 재급여시기에 비해서 절식시기에 높은 발현양상을 보였다(그림 10). 특히, cytochrome oxidase subunit 3, fatty acid binding protein, lactate dehydrogenase, osteonectin, ATP synthase protein 8, human ribosomal protein subunit 3와 유사성이 높은 clone, human voltage dependent anion channel와 유사성이 높은 clone 등의 유전자 발현이 정상 또는 재급여 시기보다 절식시기에 높았다.

특히, 본 연구에서 LDH의 발현이 절식시에 뚜렷하게 높은 것을 확인하였다. LDH는 lactate-pyruvate의 reversible oxidation에 관여하는 효소로써, 척추동물에서는 5가지 LDH isozyme (A4, A3B, A2B2, AB3, B4)이 존재한다 (Holbrook 등, 1975). Bovine adipocyte에서는 주로 (97%) B chain (heart, H type)이 존재하는 것으로 알려져 있다 (Stock 등, 1997; Prior와 Jakobson, 1979). Mulhausen과 Moore (1969)는 rat adipocyte에서 절식시 LDH H subunit 합성이 증가됨을 보고하였으며, protein malnutrition 상태 또는 추위 등의 환경변화시에 LDH isozyme pattern의 변화가 관찰되었다 (Singh 등, 1980; Terblanche 등, 1998).

Bovine galactose binding lectin, human proto-oncogene tyrosine protein kinase

와 유사성이 높은 clone, human ribosomal protein L23a와 유사성이 높은 clone 등 4개의 유전자는 절식시기에 비해 정상급여나 재급여시기에 발현이 증가하였다(그림 11). 본 연구과정에서 절식시기에 비해서 정상 급여시기에 비만 유전자 (obese gene)의 발현이 증가하는 것을 RT-PCR과 northern 방법으로 확인하였다(그림 12). RT-PCR로 한우 비만유전자 (520bp)를 증폭한 후에 pBluscript vector에 sub-cloning하여 sequencing한 결과, 기 보고된 bovine obese gene의 아미노산 서열과 100% 일치하였다 (Tellam, 1996). 절식에 의한 비만 유전자 발현의 감소는 mouse (Frederich 등, 1995; Trayhurn 등, 1995), rat(Becker 등, 1995; Cusin 등, 1995; Saladin 등, 1995), human(Kolaczynski 등, 1996), Japanese black cattle (Tsuchiya 등, 1998)에서 보고된 바 있다. 절식시에는 insulin, glucagon 등의 호르몬 변화가 일어남을 볼 때 (Diaz-Munoz 등, 2000; Hojlund 등, 2001), 절식에 의한 비만유전자 발현수준의 감소가 이러한 호르몬들의 영향을 받을 것으로 사료된다.

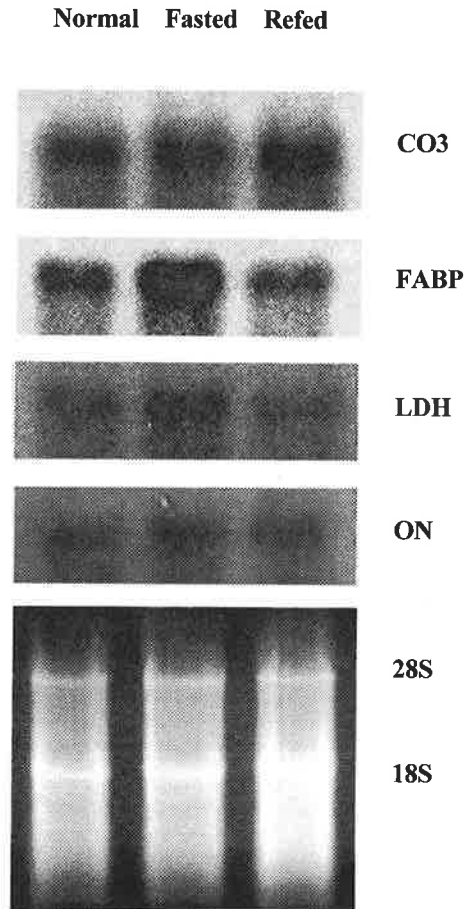


Figure 10. Northern analysis of fasting-induced clones in adipose tissues fed-, 48h fasted-, and 6h refed-Hanwoo. The 40 μg of pooled total RNA isolated from abdominal, perirenal, intramuscular and subcutaneous adipose tissues were separated on a 1% formaldehyde/agarose gel, and transferred onto the membrane by capillary reaction. The blot was hybridized with the ^{32}P -labeled cDNA clone. That similar amounts of RNA were present in each lane was checked by the intensities of 28S and 18S bands as shown. CO3: cytochrome oxidase subunit 3, FABP: fatty acid binding protein, LDH: lactate dehydrogenase, ON: osteonectin.

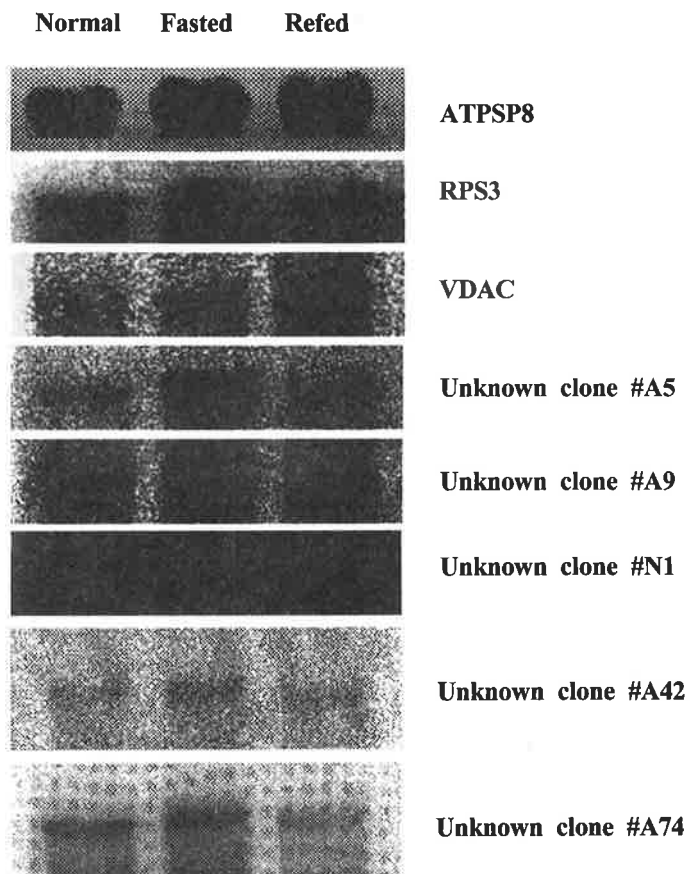


Figure 10 (continued). Northern analysis of fasting-induced clones in adipose tissues fed-, 48h fasted-, and 6h refed-Hanwoo. ATPSP8: ATP synthase protein 8, RPS3: a clone that showed high similarity with human ribosomal protein subunit 3, VDAC: a clone that showed high similarity with human voltage dependent anion channel.

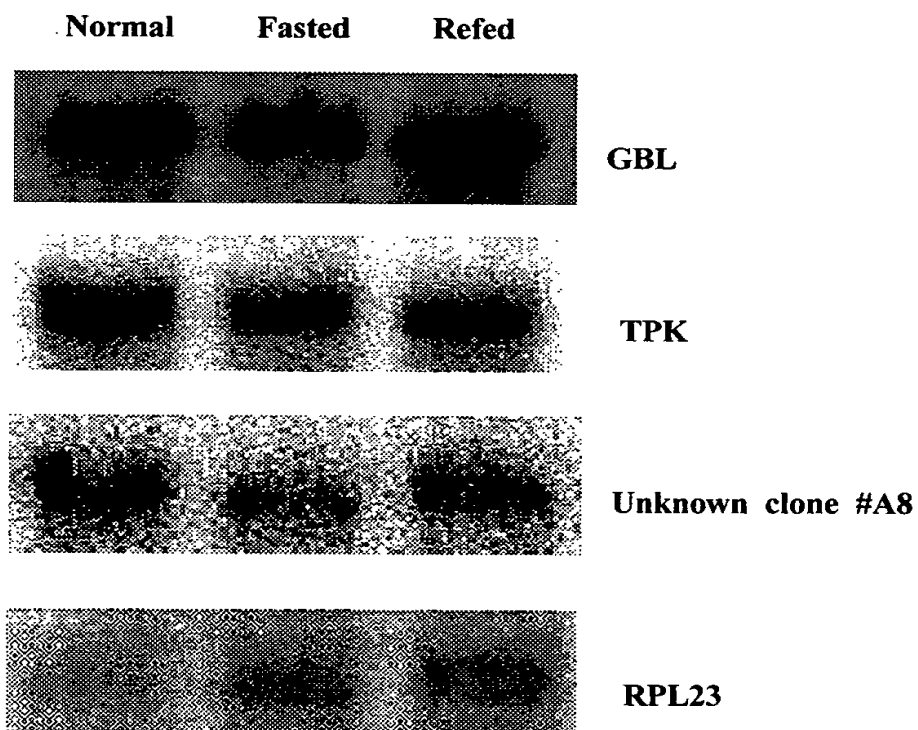
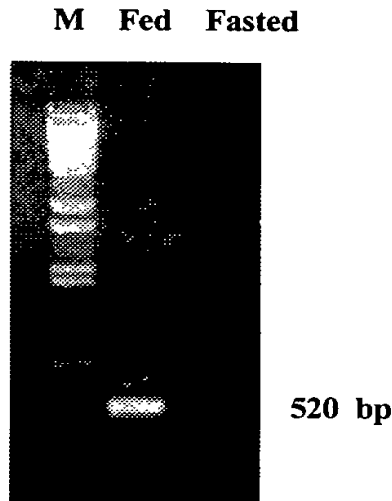


Figure 11. Northern analysis of feeding-induced clones in adipose tissues fed-, 48h fasted-, and 6h refed-Hanwoo. The 40 μg of pooled total RNA isolated from abdominal, perirenal, intramuscular and subcutaneous adipose tissues were analyzed by northern method as described in figure 10. GBL: bovine galactose binding lectin, TPK: a clone that showed high similarity with human proto-oncogene tyrosine protein kinase, RPL23: a clone that showed high similarity with human ribosomal protein L23a.

A



B

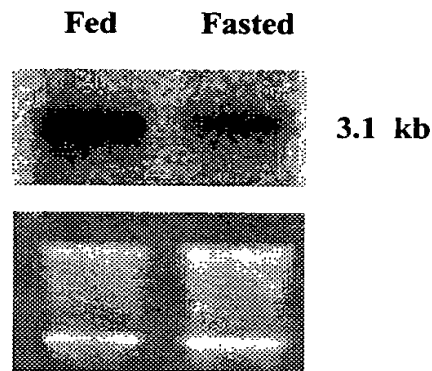


Figure 12. RT-PCR and northern analysis of the obese gene in bovine adipose tissues of fed and 48h-fasted animals. (A) Total RNA was reverse-transcribed and the cDNA template was amplified by PCR using primers specific to obese gene. PCR products were electrophoresed on a 1% agarose gel containing ethidium bromide. M, λ DNA BstE II digest marker. (B) A 40 μ g of pooled total RNA isolated from abdominal, perirenal, subcutaneous, intermuscular and intramuscular adipose tissues was analyzed by northern method as described in figure 10. That similar amounts of RNA were present in each lane was checked by the intensity of the 28S and 18S bands as shown.

2) 지방 조직 부위별 발현양상 검정

선발한 cDNA clone들의 지방조직 부위별 발현 양상은 정상 급여시기 및 절식시의 여러 가지 부위의 지방조직에서 total RNA를 각각 추출하여 northern 방법으로 조사하였다. Fatty acid binding protein 유전자는 다른 조직에 비하여 절식시기의 신지방과 근간지방에서 발현 수준이 높았다(그림 13). Osteonectin 유전자는 다른 조직에 비하여 절식시기의 신지방과 근간지방에서 비교적 높은 발현 수준을 보였다. ATP synthase protein 8 유전자는 다른 조직에 비하여 절식시기의 근간지방에서 발현 수준이 높았다. Human 40S ribosomal protein s3와 93% 유사성을 보인 클론 # A69는 다른 조직에 비하여 절식시기의 근간지방에서 비교적 높은 발현수준을 보였으며, 절식 신지방에서 현저하게 발현이 감소하였다. Lactate dehydrogenase B 유전자는 절식시기의 피하지방에서 높은 발현 수준을 보였다.

비만유전자의 지방조직 부위별 발현양상이 그림 14에 제시되어 있다. 비만유전자는 신지방과 복부지방에서 매우 높게 발현되었다. 절식시기에 비하여 정상급여시기에 발현증가는 피하지방과 근간지방에서 뚜렷하게 관찰되었다. 하지만 근내지방에서는 비만유전자의 발현수준이 매우 낮을 뿐만 아니라 정상급여와 절식시에 차이를 보이지 않았다. Rat에서는 피하지방보다 신지방에서 비만유전자의 발현이 높은 것으로 보고된 바 있으나 (Zheng 등, 1996), bovine에서는 지방조직 부위별로 비만유전자의 발현수준에 차이가 없는 것으로 보고된 바 있다 (Ji 등, 1998).

본 실험을 통하여 비만유전자는 지방조직 부위에 따라서 발현수준이 현격한 차이를 보이며, 사료급여후에 발현이 유도되는 조절기작도 지방조직 부위에 따라서 차이를 보인다는 사실을 발견하였다. 이러한 차이에 대한 이유가 분명하지는 않으나, leptin의 작용은 insulin을 경유하는 것으로 알려져 있으므로 (Saladin 등, 1995), insulin, catecholamine 등의 호르몬에 대한 지방조

직 부위별 민감도 (sensitivity) 차이에서 기인할 가능성이 있다. Catecholamine에 의해서 활성화되는 β -adrenergic receptor도 비만유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Li 등, 1997; Trayhurn 등, 1995). Hube 등 (1996)은 fat cell size가 비만유전자의 발현에 영향을 미친다고 주장하였다. 본 실험 결과에서 피하지방에서는 사료급여에 의하여 비만유전자의 발현이 증가한 반면, 근내지방에서는 발현수준이 매우 낮을 뿐만 아니라 사료급여가 비만유전자의 발현에 영향을 미치지 않았다는 사실은 주목할 만하다. 왜냐하면, 소에서 leptin 수준을 낮출 경우에 사료 섭취량이 증가함으로써 근내지방 축적도가 증가될 가능성이 있기 때문이다.

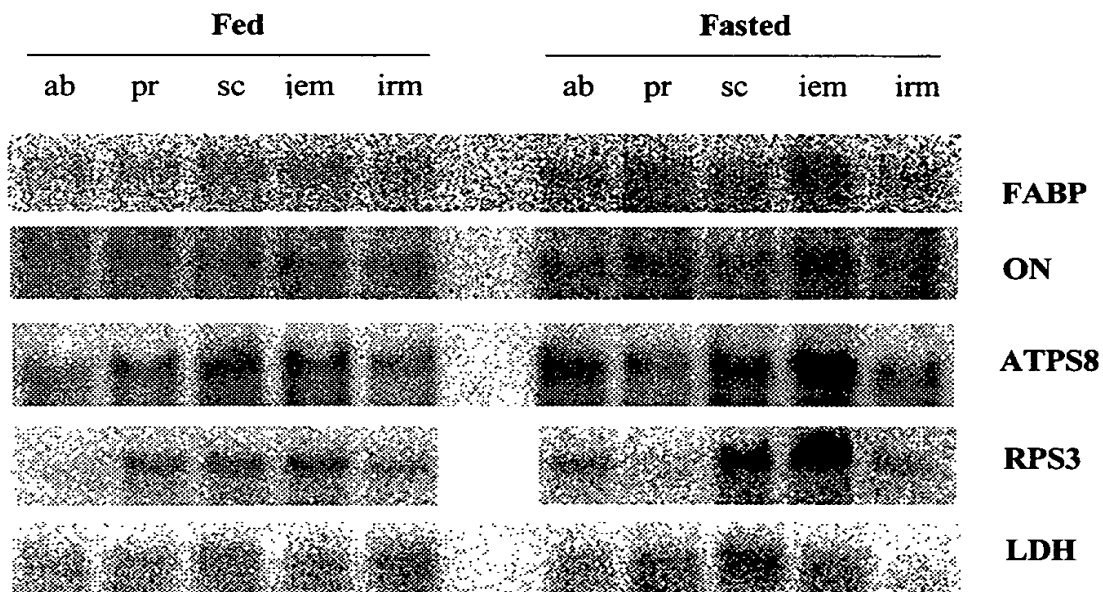
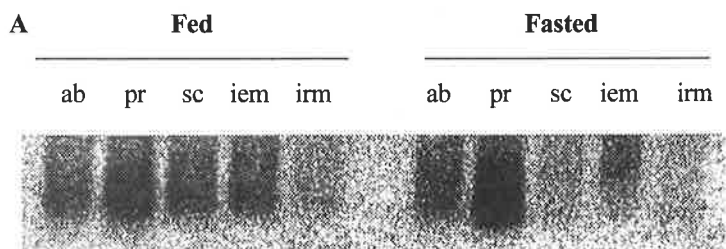


Figure 13. Northern analysis of the fasting-induced clones in various adipose tissues of fed- and fasted-animals. Total RNA (40 ug) isolated from abdominal (ab), perirenal (pr), subcutaneous (sc), intermuscular (iem) and intramuscular (irm) adipose tissues was analyzed by the northern method. FABP: fatty acid binding protein, ON: osteonectin, ATPSP8: ATP synthase protein 8, RPS3: a clone that showed high similarity with human 40S ribosomal protein s3, LDH: lactate dehydrogenase B.



B

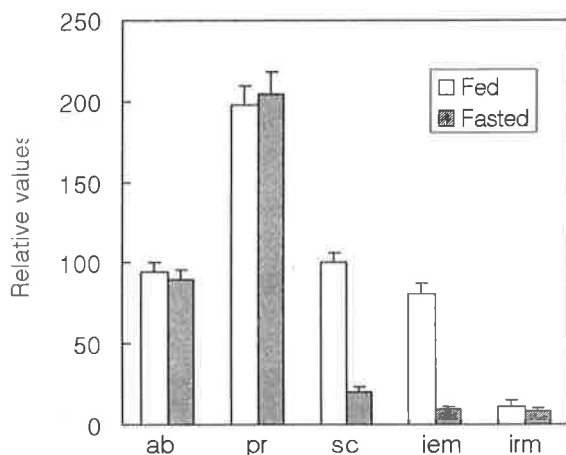


Figure 14. Northern analysis of the obese gene in various adipose tissues of fed and fasted animals. A. Total RNA (40 ug) isolated from abdominal (ab), perirenal (pr), subcutaneous (sc), intermuscular (iem) and intramuscular (irm) adipose tissues was analyzed by the northern method. B. The mRNA levels were quantified by scanning densitometry, and relative values were normalized to 100 for the mRNA levels of the subcutaneous tissues in fed animals. Bars indicate SEM (n=3).

4. 지방대사 조절 물질의 생산 및 지방대사 조절 효과 검증

가. Bovine leptin 발현벡터 제조 및 *E. coli*내 도입

지방축적 조절에 관여하는 비만유전자 (*obese gene*)가 coding하는 leptin 단백질을 미생물에서 발현시키기 위하여 발현벡터를 작성하였다. 재조합유전자를 작성하기 위하여 bovine leptin insert (0.46kb)를 pBluescript vector에서 EcoR I 제한효소로 양 말단을 절단하고 전기영동을 수행한 후 gel extraction kit를 사용하여 정제하였다. pGEX-4T-3 vector (4.9kb)도 EcoRI site를 제한효소 처리하여 전기영동한 후 gel extraction kit를 사용하여 정제한 후 size를 확인하였다 (그림 15). EcoRI-digested leptin과 vector를 ligation시켜 JM105 cell에 transformation하고, 생성된 ampicillin resistant colony로부터 분리한 plasmid를 EcoRI으로 처리한 결과, 4.9kb의 pGEX-4T-3 vector와 0.46kb의 *obese gene* insert가 ligation되었음을 확인하였다 (그림 16A). JM105 cells에서 분리한 leptin expression vector plasmid를 host BL21 *E. coli*에 도입하여 유전자가 도입된 colonies를 ampicillin 저항성으로 선발하고 plasmid를 분리하여 EcoRI 효소 처리 결과, 그림 16B와 같이 *obese cDNA*가 올바르게 도입되었음을 확인하였다.

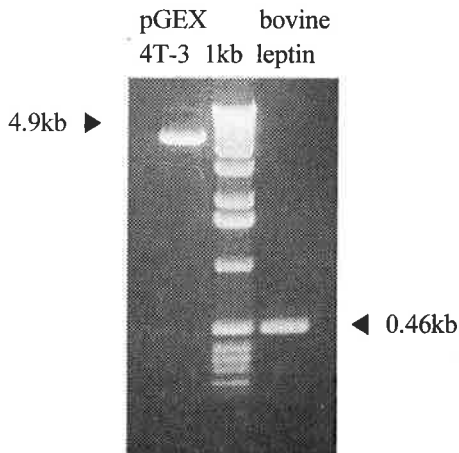


Figure 15. Preparation of pGEX-4T-3 vector and bovine leptin insert. pGEX-4T-3 vector and leptin insert were digested by EcoRI, purified using gel extraction kit and electrophoresed on 1% agarose gel.

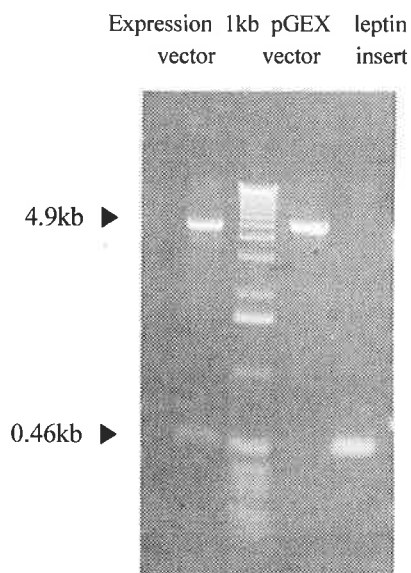


Figure 16A. Identification of bovine leptin expression recombinant DNA. Plasmid DNA isolated from an ampicillin-resistant colony after transformation of ligation product into JM105 cells was digested with EcoRI and the digests were electrophoresed on 1% agarose gel.

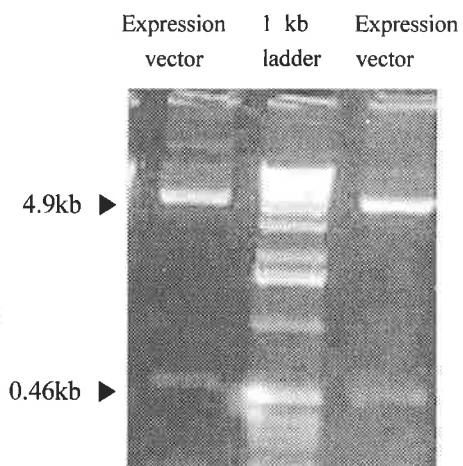


Figure 16B. Identification of leptin expression vector in BL21 cells. Plasmid DNA isolated from ampicillin-resistant colonies after transformation of leptin expression vector into BL21 cells was digested with EcoRI and the digests were electrophoresed on 1% agarose gel.

나. *E. coli*에서 leptin 단백질 생산 및 정제

pGEX-4T-3-leptin expression vector가 도입된 BL21 cell에서 GST-leptin fusion protein이 발현이 되는 가를 0.1mM IPTG를 첨가하고 0, 2, 4, 6시간에 SDS-PAGE 전기영동으로 확인하였다 (그림 17). IPTG induction 두 시간 후부터 GST-leptin fusion protein (43kD)이 발현되는 것을 확인하였으며, 두 시간 이상의 induction에서는 발현 양이 크게 증가하지 않았다.

GST-leptin fusion protein을 glutathione sepharose 4B로 정제한 결과, 42kD의 GST-leptin protein이 정제된 것을 확인하였다 (그림 18).

정제된 GST-leptin protein을 thrombin으로 절단한 결과, 42kD의 GST-leptin protein이 26kD의 GST protein과 16kD의 leptin protein으로 잘리어졌음을 확인하였다 (그림 19). GST-leptin fusion protein에서 thrombin 처리에 의해 잘려진 GST를 제거하기 위하여 thrombin 처리 후 PBS 2000 volume하에서 dialysis하여 buffer를 equilibration시켰다. 여기에 다시 glutathione sepharose 4B resin을 첨가하여 반응시킨 후 상등액을 모아 Centricome으로 농축시키고 SDS-PAGE 전기영동한 결과, leptin protein이 정제된 것을 확인하였다 (그림 20).

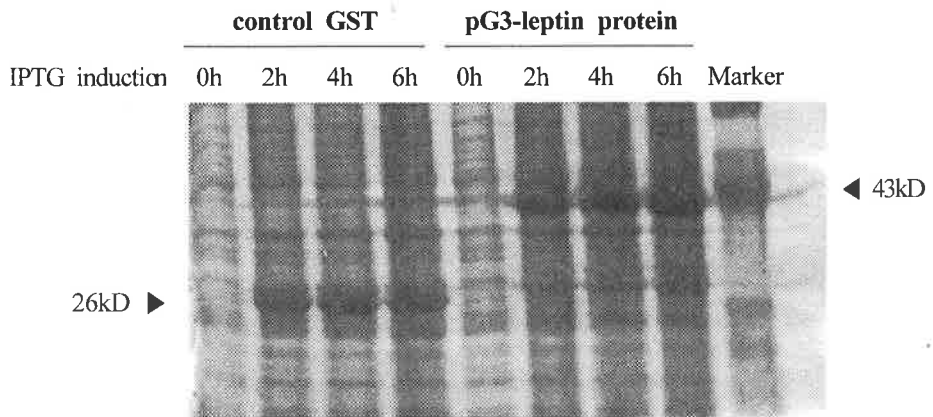


Figure 17. Expression of GST-leptin fusion protein in BL21 cells. BL21 cells containing either control vector or pG3-leptin expression vector were collected at 0, 2, 4, and 6h after 0.1 mM IPTG induction and lysed by boiling method containing loading buffer. Cell lysates were subjected to 10% SDS-PAGE.

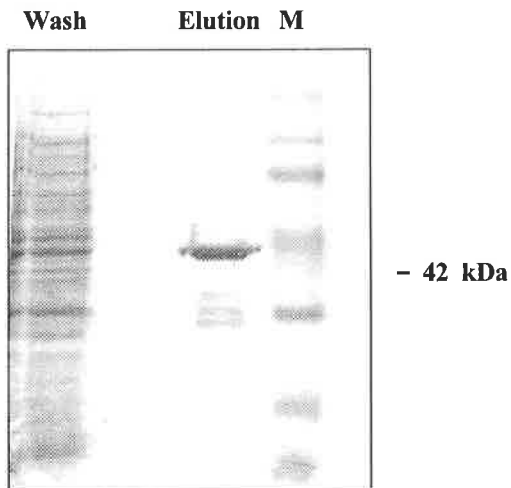


Figure 18. Purification of GST-leptin protein with glutathione sepharose resin. BL21 cells containing pG3-leptin expression vector were collected after 0.1 mM IPTG induction for 2h and sonicated. The sonicated solution was mixed with glutathione sepharose resin and eluted with buffer containing 10mM reduced glutathione. The eluate was subjected to SDS-PAGE.

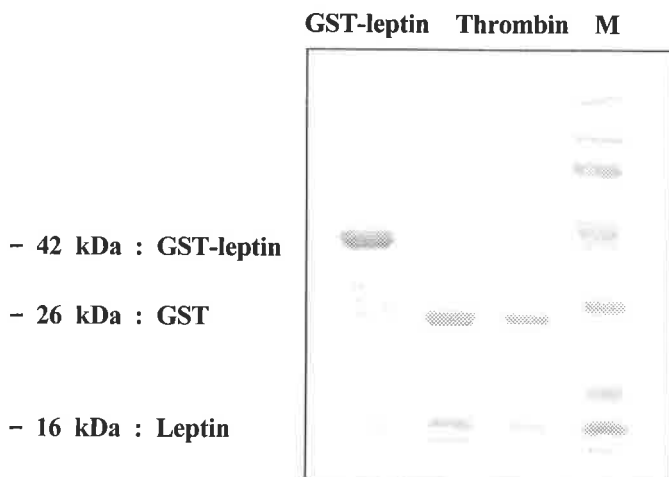


Figure 19. Cleavage of GST-leptin fusion protein with thrombin. Eluted GST-leptin fusion protein was digested with thrombin protease and subjected to SDS-PAGE.

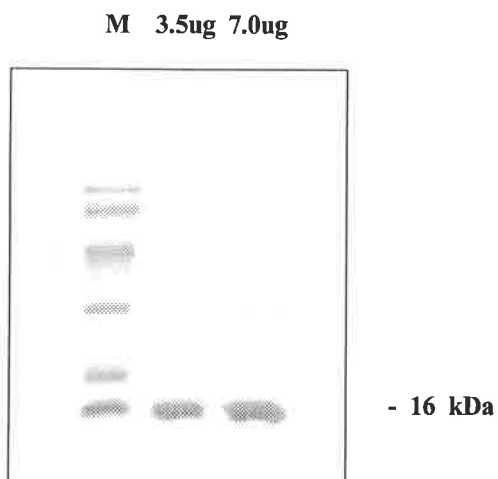


Figure 20. SDS-PAGE of purified leptin protein. Solution containing thrombin-digested fusion protein was dialyzed against 2000 volume of 1X PBS, equilibrating buffer. The resulting solution was mixed with Glutathione Sepharose resin and supernatant was concentrated using Centricome. The purified leptin protein was subjected to SDS-PAGE.

다. 지방세포주에서 leptin의 지방대사 조절 효과 검정

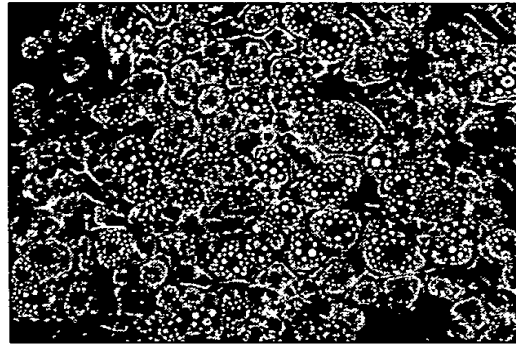
상기의 방법으로 leptin을 정제한 후, leptin 단백질을 지방세포 3T3-L1 cell line의 배양액에 첨가하여 지방조직내 glucose 유입율을 조사하였다. 3T3 cell 을 growth media에서 80% confluency 상태까지 배양하고, 4×10^3 cells/cm² density로 6 well plate에 seeding하고, confluency 도달 2일 후에 differentiation medium (DMEM, 10% BCA, 3-isobutyl-methylxanthine, dexamethasone, insulin으로 구성되어 있음)으로 교체하여 adipocyte로의 분화를 유도하였다 (그림 21). 분화된 세포를 이용하여 leptin과 insulin이 glucose 유입율에 미치는 영향을 $1\text{-}^{14}\text{C}$ glucose를 이용하여 측정하였다. 실험 결과, insulin은 지방세포내 glucose 유입율을 증가시켰지만, leptin은 지방세포내 glucose 유입율에 영향을 미치지 않았다 (그림 22).

라. 한우 지방조직에서 leptin의 지방대사 조절 효과 검정

근내지방과 피하지방에서 leptin에 의한 glucose 및 acetate 유입율을 분석하였다. 지방조직 0.1mm diameter pieces slice 200mg을 3ml KRB 용액이 들어 있는 6-well dishes에 담아서 37°C를 유지시켰다. Insulin ($2\mu\text{g}/\text{ml}$)과 leptin (100nM)을 처리하고 $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{-glucose}$ 를 첨가, 37°C에서 2시간 반응하였다. Acetate 유입율 조사도 glucose 유입율과 같은 방법으로 처리 후 $1\text{-}^{14}\text{C-acetic acid}$ 를 첨가, 37°C에서 2시간 반응하였다. 실험 결과, insulin은 피하지방과 근내지방에서 glucose와 acetate 유입율을 증가시켰다. 그러나 leptin은 피하지방과 근내지방에서 glucose와 acetate 유입율에 영향을 미치지 않았다 (그림 23, 그림 24).



3T3-L1 cells : preadipocytes



Differentiated 3T3-L1 adipocytes

Figure 21. Differentiation of 3T3-L1 cells. 3T3-L1 preadipocytes (70% confluency) were grown in DMEM with 10% FCS. Two days after confluency, differentiation was induced with dexamethasone, isobutyl dimethylxanthine and insulin for two days.

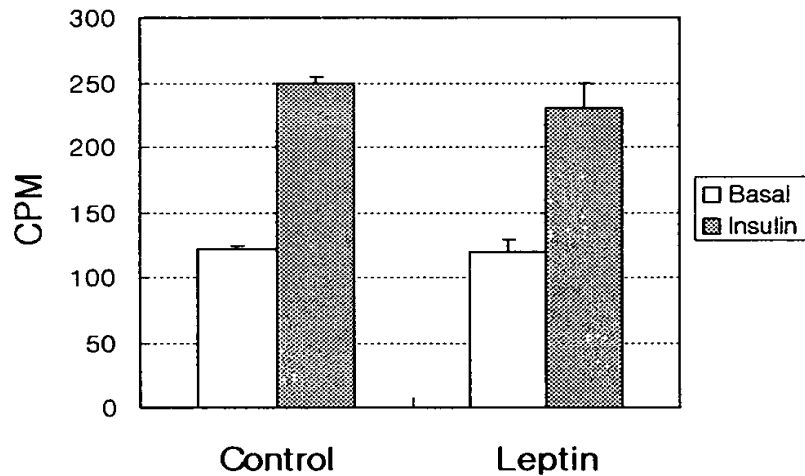


Figure 22. Leptin effect on glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. The differentiated cells were treated with either 10 nM insulin or 100 nM leptin, and glucose transport was determined using U-¹⁴C-glucose. Bar indicates SD (n=3).

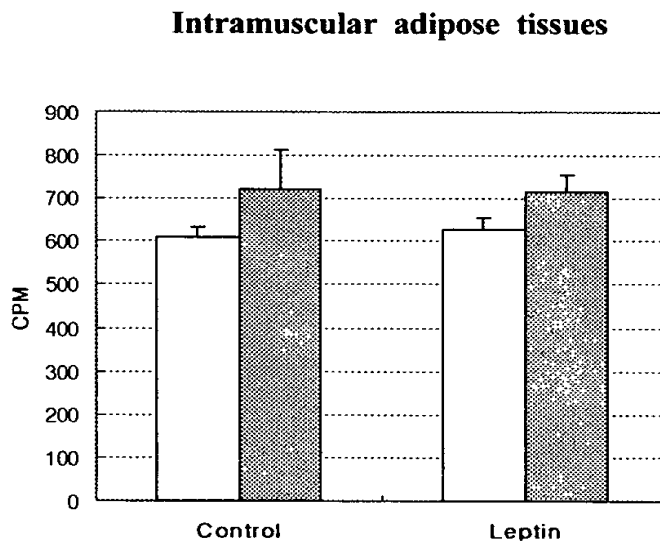
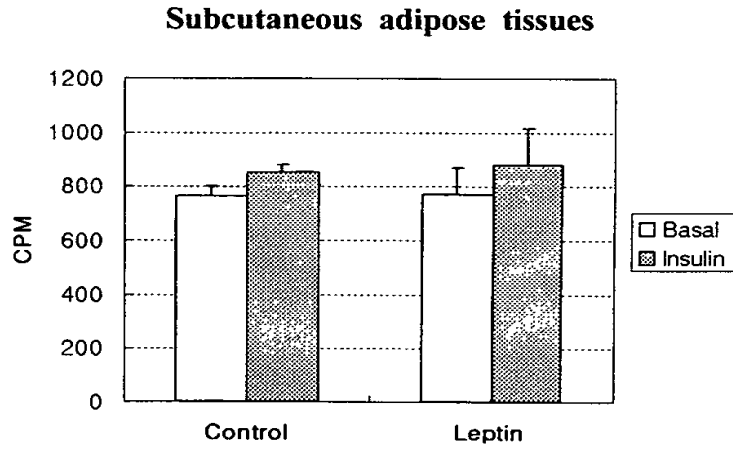


Figure 23. Leptin effect on glucose transport in Hanwoo adipose tissues. Subcutaneous and intramuscular adipose tissues were isolated from Hanwoo bull. The 200mg of explant slices were treated with either 2 ug/ml insulin or 100 nM leptin, and glucose transport was determined using U-¹⁴C-glucose. Bar indicates SD (n=3).

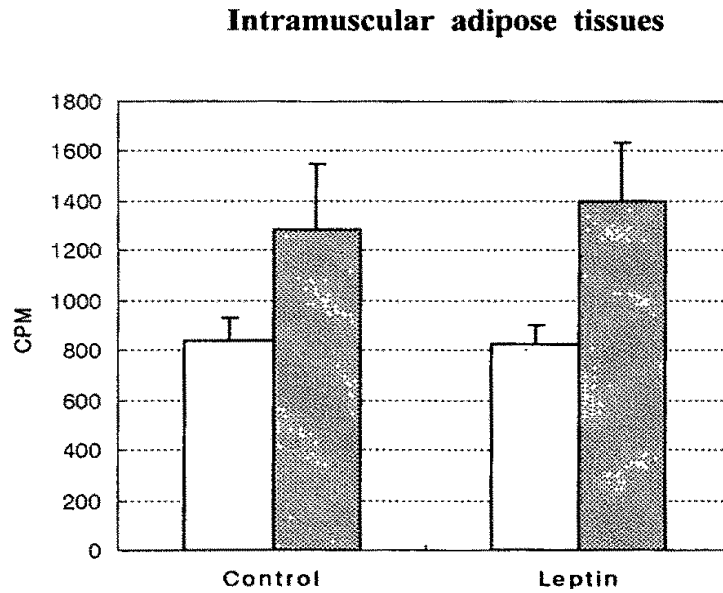
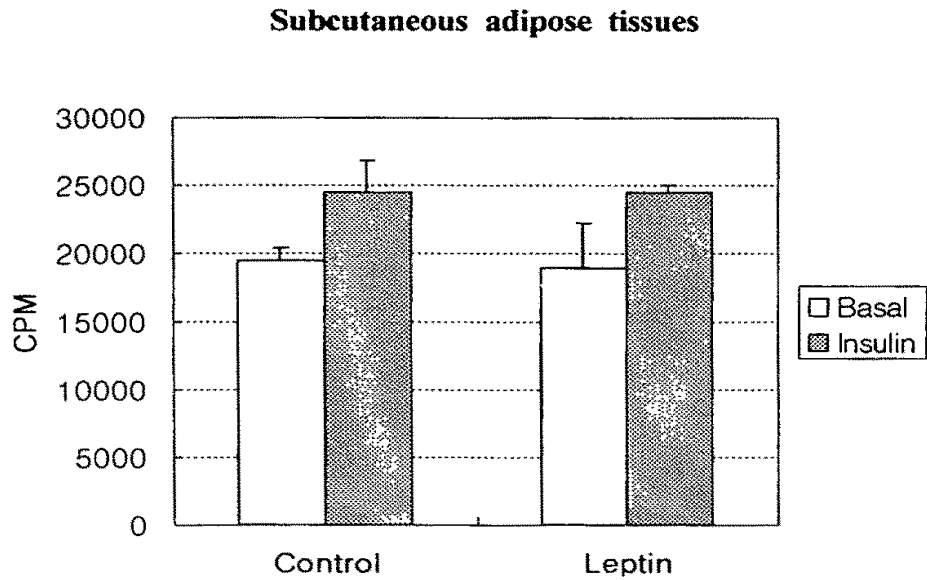


Figure 24. Leptin effect on acetate transport in Hanwoo adipose tissues. Subcutaneous and intramuscular adipose tissues were isolated from Hanwoo bull. The 200mg of explant slices were treated with either 2 ug/ml insulin or 100 nM leptin, and acetate transport was determined using [1-¹⁴C]-acetic acid. Bar indicates SD (n=3).

제 4절 적 요

본 과제에서는 한우 지방대사 조절에 관여하는 유전자원을 개발하기 위하여 한우 지방조직 cDNA library를 구축하였다. 제조한 한우 지방조직의 cDNA library의 특성을 요약하면 recombinant 효율은 99%, unamplified library의 titer는 5.68×10^5 pfu/ml, amplified library의 titer는 3.67×10^9 pfu/ml, insert size는 평균 1.1kb로서 매우 우수하였다.

차별혼성화 방법을 이용하여 절식 및 정상급여 probe에서 signal이 강한 primary positive candidate plaques를 각각 74개 및 34개를 선발하였다. 선발한 cDNA clone은 *in vivo* excision으로 lambda DNA 형태를 pBK-CMV plasmid로 전환하였다. 각 clone에 대한 plasmid를 분리하여 insert를 확인한 결과, 대부분의 clone은 insert size범위가 0.5 - 1.0 kb사이였고, 작은 경우는 0.4 kb, 큰 경우는 3.0 kb insert가 포함되어 있었다.

각 clone에 대한 부분적인 염기서열을 분석하여 nucleotide sequences GenBank database와 비교하여 이미 밝혀진 clone인지 새로운 clone인지를 조사하였다. 그 결과, bovine 종에서 알려진 clone 16개 (ATP synthase 8, osteonectin, fatty acid binding protein, cytochrome oxidase subunit 3, obese gene 등)와 다른 종에서 알려진 clone 14개 (human lactate dehydrogenase, rabbit aldolase A, mouse ubiquitin degradation protein, rat stearyl CoA desaturase gene 등의 유전자와 유사성이 높은 clone)의 clone을 확인하였다.

Human Lactate dehydrogenase B와 높은 유사성을 보인 clone은 bovine 종에서는 아직 밝혀지지 않은 유전자이므로 clone 전체의 염기서열을 분석하였다. 그 결과, translation initiation site와 termination site를 모두 포함하고 있는 1,319bp의 염기서열과 334개 아미노산으로 구성된 bovine LDH cDNA임을 확인하였다. 한우 LDH의 아미노산 서열은 human 및 pig LDH와 비교시, 97%

의 identity를 보였다.

선발한 cDNA clone들이 지방조직의 분해 또는 축적시기에 발현이 유도되는가를 조사하였다. 절식시, 사료재급여시 및 정상시기의 지방조직(복부지방, 신지방, 피하지방, 근간지방, 근내지방)에서 total RNA를 추출한 후, 각 시기별로 다섯 개 부위의 total RNA를 혼합하여 northern 분석을 실시하였다. 12개의 클론이 정상급여와 재급여시기보다 절식시기에 높은 발현양상을 보였다. 특히, cytochrome oxidase subunit 3, fatty acid binding protein, lactate dehydrogenase, osteonectin, ATP synthase protein 8, human ribosomal protein subunit 3와 유사성이 높은 clone, human voltage dependent anion channel와 유사성이 높은 clone 등의 유전자 발현이 정상 또는 재급여 시기보다 절식시기에 높았다. Bovine galactose binding lectin, human proto-oncogene tyrosine protein kinase와 유사성이 높은 clone, human ribosomal protein L23a와 유사성이 높은 clone 등 4개의 유전자는 절식시기보다 정상급여나 재급여시기에 발현 수준이 높았다. 또한, 비만유전자 (obese gene)의 발현이 절식시기보다 정상급여시기에 높은 것을 RT-PCR과 northern 방법으로 확인하였다. RT-PCR로 한우 비만유전자 (520bp)를 증폭한 후에 pBluscript vector에 sub-cloning하여 sequencing한 결과, 기 발표된 bovine obese gene의 아미노산 서열과 100% 일치하였다.

선발한 cDNA clone들의 지방조직 부위별 발현 양상도 조사하였다. 정상급여시기 및 절식시의 여러 가지 종류의 지방조직에서 total RNA를 각각 추출하여 northern 분석을 실시하였다. Fatty acid binding protein 유전자는 다른 조직에 비하여 절식시기의 신지방과 근간지방에서 높은 수준으로 발현되었다. Osteonectin 유전자의 mRNA는 다른 조직에 비하여 절식시기의 신지방과 근간지방에서 높은 수준을 보였다. ATP synthase protein 8 유전자의 mRNA는 다른 조직에 비하여 절식시기의 근간지방에서 발현 수준이 높았다. Human

40S ribosomal protein s3와 93%의 유사성을 보인 클론은 절식시기의 근간지방에서 높은 발현 수준을 보였으며, 절식 신지방에서는 현저하게 낮았다. Lactate dehydrogenase B 유전자는 절식시기의 피하지방에서 높은 발현 수준을 보였다. 비만유전자는 신장과 복부지방에서 매우 높게 발현되었다. 절식시기에 비하여 정상급여시기에 발현증가는 피하지방과 근내지방에서 뚜렷하게 관찰되었다. 하지만 근내지방에서는 비만유전자의 발현수준이 매우 낮을 뿐만 아니라 정상급여와 절식시에 차이를 보이지 않았다. 본 실험을 통하여 비만유전자의 발현양상은 지방조직의 부위에 따라서 발현수준이 현격한 차이를 보이며, 사료급여 후에 발현이 유도되는 조절기작도 지방조직의 부위에 따라서 차이를 보인다는 사실을 발견하였다. 본 실험 결과에서 피하지방에서는 사료급여시에 비만유전자의 발현이 증가한 반면, 근내지방에서는 발현수준이 매우 낮을 뿐만 아니라 사료급여가 비만유전자의 발현에 영향을 미치지 않았다는 사실은 주목할 만하다. 왜냐하면, 소에서 leptin 수준을 낮출 경우에 사료섭취량을 증가시켜서 근내지방 축적을 증진시킬 가능성이 있기 때문이다.

지방축적 조절에 관여하는 비만유전자 (obese gene)가 coding하는 leptin 단백질을 미생물에서 생산하는 연구를 수행하였다. Bovine obese gene인 leptin cDNA를 pGEX expression vector와 재조합하여 *E. coli* BL21 cell에 도입하였다. SDS-PAGE 결과, IPTG induction 두 시간 후부터 GST-leptin fusion protein (42kD)이 induction되는 것이 확인하였으며, 두 시간 이상의 induction에서는 발현양이 크게 증가하지 않았다. Glutathione sepharose 4B와 binding시킨 결과, 42kD의 GST-leptin protein이 정제된 것을 확인하였다. 정제된 GST-leptin protein에 thrombin을 처리하여 42kD의 GST-leptin protein을 26kD의 GST protein과 16kD의 leptin protein으로 절단하였다. Thrombin 처리후 PBS 2000 volume하에서 dialysis하고 glutathione sepharose 4B resin과 재결합시켜 GST를

결합시키고, 상등액을 모아 Centricome으로 농축하여 leptin protein을 정제하였다.

Leptin 단백질을 3T3-L1 cell line의 배양액에 첨가하여 지방조직내 glucose 유입율을 [$1-^{14}\text{C}$] glucose을 이용하여 조사하였다. 실험 결과, insulin은 지방세포내 glucose 유입율을 증가시켰지만, leptin은 지방세포내 glucose 유입율에 영향을 미치지 않았다. 한우 근내지방과 피하지방 explant slices에서 leptin이 glucose 및 acetate 유입율에 미치는 영향을 [$\text{U}-^{14}\text{C}$]-glucose와 [$1-^{14}\text{C}$]-acetic acid를 이용하여 조사하였다. 실험 결과, insulin은 피하지방과 근내지방에서 glucose와 acetate 유입율을 증가시켰다. 그러나 leptin은 피하지방과 근내지방에서 glucose와 acetate 유입율에 영향을 미치지 않았다.

결론적으로, 지방대사 조절에 관여하는 다수의 유전자원을 확보하였으며, 일부 유전자는 절식시와 사료급여시에 유전자 발현양상에 차이를 보였고 또한 근내지방과 피하지방에서 유전자 발현양상의 차이를 확인하였다. 근내지방과 피하지방에서 선발한 유전자의 발현양상 및 단백질의 지방대사 조절기작을 계속 비교·분석하여 그 차이를 규명하면, 근내지방과 피하지방 대사의 차이를 분자생물학적인 측면에서 이해할 수 있을 것이다. 이러한 결과를 근내지방 축적 조절기술 개발에 활용함으로써 한우 고급육 생산에 기여할 수 있을 것이다.

제 5절 인용문헌

- Becker, D. J., L. N. Ongemba, V. Brichard, J.-C. Henquin and S. M. Brichard. 1995. Diet- and diabetes-induced changes of ob gene expression in rat adipose tissue. FEBS Lett 371:324-328.

- Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 161:156-159.
- Choo, J. J., M. A. Horan, R. A. Little and N. J. Rothwell. 1990. Effects of the β 2-adrenoceptor agonist, clenbuterol, on muscle atrophy due to food deprivation in the rat. *Metabolism* 39:647-650.
- Cochran, B. H., J. Zullo, L. M. Verma and C. D. Stiles. 1984. Expression of the c-fos gene and fos-related gene is stimulated by platelet-derived growth factor. *Science* 226:1080-1082.
- Cusin, J., A. Sainsbury, P. Doyle, F. Rohner-Jeanrenaud and B. Jeanrenaud. 1995. The ob gene and insulin. A relationship leading to clues to the understanding of obesity. *Diabetes* 44:1467-1470.
- Diaz-Munoz, M., O. Vazquez-Martinez, R. Aguilar-Roblero and C. Escobar. 2000. Anticipatory changes in liver metabolism and entrainment of insulin, glucagon, and corticosterone in food-restricted rats. *Am. J. Physiol.-Reg.* 279(6):R2048-R2056.
- Frederich, R.C., B. Lollmann, A. Hamann, A. Napolitano-Rosen, B. B. Kahn, B. B. Lowell and J. S. Flier. 1995. Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents. *J. Clin. Invest.* 96:1658-1663.
- Halaas, J. L., K. S. Gajiwala, M. Maffei, S. L. Cohen, B. T. Chait, D. Rabinowitz, R. L. Lallone, S. K. Burley and J. M. Friedman. 1995. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269:543-546.
- Hedrick, S. M., D.I. Cohen, E. A. Nielsen and M. M. Davis. 1984. Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature*

308:149-153.

- Hiraoka, B. Y., F. S. Sharief, Y. W. Yang, W. H. Li and S. S. Li. 1990. The cDNA and protein sequences of mouse lactate dehydrogenase B. Molecular evolution of vertebrate lactate dehydrogenase genes A (muscle), B (heart) and C (testis). *Eur. J. Biochem.* 189:215-220.
- Hojlund, K., M. Wildner-Christensen, O. Eshoj, C. Skjaerbaek, J. J. Holst, O. Koldkjaer, D. M. Jensen and H. Beck-Nielsen. 2001. Reference intervals for glucose, beta-cell polypeptides, and counterregulatory factors during prolonged fasting. *Am. J. Physiol.-Endo. Met.* 280(1):E50-E58.
- Holbrook, J. J., A. Liljias, S. J. Steindel and M. G. Rossman. 1975. In: *The enzymes* Vol. 11 (Ed. D. D. Boyer). Academic Press, New York 191-292.
- Hube, F., U. Lietz, M. Igel, P. B. Jensen, H. Tornqvist, H.-G. Joost and H. Hauner. 1996. Difference in leptin mRNA levels between omental and subcutaneous abdominal adipose tissue from obese humans. *Horm. Metab. Res.* 28:690-693.
- Ji, S., G. M. Willis, R. R. Scott and M.E. Spurlock. 1998. Partial cloning and expression of bovine leptin gene. *Anim. Biotechnol.* 9:1-14.
- Judge, M., E. Aberle, J. Forrest, H. Hedrick and R. Merkel. 1989. *Principles of Meat Science* (2nd ed.), Kendall/Hunt Publishing Co.
- Kim, Y. S., R. D. Sainz, P. Molenaar and R. J. Summers. 1991. Characterization of β_1 - and β_2 -adrenoceptors in rat skeletal muscles. *Biochem. Pharmacol.* 42:1783-1789.
- Kolaczynski, J. W., R. V. Considine, J. P. Ohannesian, C. Marco, I. Opentanova, M. R. Nyce, M. Myint and J. F. Caro. 1996. Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans. A link with ketogenesis but not

- ketones themselves. *Diabetes* 45:1511-1515.
- Li, H., M. Matheny and P. J. Scarpace. 1997. 3-adrenergic-mediated suppression of leptin gene expression in rats. *Am. J. Physiol.* 272:E1031-E1036.
- Luo, G., G. An and R. Wu. 1994. A PCR differential screening method for rapid isolation of clones from a cDNA library. *BioTechniques* 16:672-675.
- Melton, S. L., M. Amiri, G. w. Davis and W. R. Backus. 1982. Flavor and chemical characteristics of ground beef from grass, forage-grain-and grain-finished steers. *J. Anim. Sci.* 55:77-80.
- Moloney, A, P. Allen, R. Joseph and V. Tarrant. 1991. Influence of beta-adrenergic agonists and similar compounds on growth. In: A. M. Pearson and T. R. Dutson (Ed.) *Growth Regulation in Farm Animals*. pp. 455-514. Elsevier Applied Science, London and New York.
- Mulhausen, H. A. and R. O. Moore. 1969. Shift in vivo in the lactate dehydrogenase isozyme distribution pattern in rat epididymal adipose tissue. *Biochimica et Biophysica Acta* 177(3):544-552.
- Pelleymounter, M. A., M. J. Cullen, M. B. Baker, R. Hecht, D. Winters, T. Boone and F. Collins. 1995. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269:540-543.
- Prior, R. L. and J. J. Jacobson. 1979. Effects of fasting and refeeding and intravenous glucose infusion on in vitro lipogenesis in bovine adipose tissue. *J. Nutr.* 109:1279-1284.
- Sakai, I., F. S. Sharief, Y. C. Pan and S. S. Lee. 1987. The cDNA and protein sequences of human lactate dehydrogenase B. *Biochem. J.* 257:933-936.
- Saladin, R., D. De Vos, M. Guerre-Millo, A. Leturque, J. Girard, B. Staels and J. Auwerx. 1995. Transient increase in obese gene expression after food

- intake or insulin administration. *Nature* 377:527-529.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning. A Laboratory manual*. 2nd eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Singh, R. K. and S. K. Roy. 1980. Adaptive changes in uterine distribution of lactate dehydrogenase isozymes during protein malnutrition and steroid maintained pregnancy in rats. *Horm. Met. Res.* 12:697-701.
- Stock, D. W., J. M. Quattro, G. S. Whitt and D. A. Powers. 1997. Lactate dehydrogenase (LDH) gene duplication during chordate evolution: the cDNA sequence of the LDH of the tunicate *Styela plicata*. *Mol. Biol. Evol.* 14:1273-1284.
- Tellam, R. L. 1996. *Bos taurus* leptin (obese) gene, complete cds. Genbank Accession #BTU50365.
- Terblanche, S. E., T. C. Masondo and W. Nel. 1998. Effects of cold acclimation on the activity levels of creatine kinase, lactate dehydrogenase and lactate dehydrogenase isoenzymes in various tissues of rat. *Cell Biology International* 22:701-707.
- Thomas, P. S. 1980. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 77:5201-5205.
- Trayhurn, P., J. S. Duncan and D. V. Rayner. 1995. Acute cold-induced suppression of ob (obese) gene expression in white adipose tissue of mice: mediation by the sympathetic system. *Biochem. J.* 311:729-733.
- Trayhurn, P., Thomas, M. E. A., Duncan, J. S. and Rayner, D. V. 1995. Effects of fasting and refeeding on ob gene expression in white adipose tissue of lean and obese (ob/ob) mice. *FEBS Lett.* 368:488-490.

- Tsuchiya, T., Y. Nagao, A. Ozawa, M. Matsumoto, K. Sugahara, T. Kubo, H. and Kato. 1998. Decrease of the obese gene expression in bovine subcutaneous adipose tissue by fasting. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 2068-2069.
- Tsuji, S., M. A. Qureshi, E. W. Hou, W. M. Fitch and S. S. Li. 1994. Evolutionary relationships of lactate dehydrogenase (LDHs) from mammals, birds, amphibian, fish, barley, and bacteria: LDH cDNA sequences from *Xenopus*, pig, and rat. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 91:9392-9396.
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold and J. M. Friedman. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432.
- Zheng, D., J. P. Jones, S. J. Usala and G. L. Dohm. 1996. Differential expression of ob mRNA in rat adipose tissues in response to insulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218:434-437.

제 3 장 한우 고금육 생산을 위한 β - adrenoceptor에 대한 분자유전학적 연구

제 1절 서 설

지방 대사를 조절하는 유전자로 β -adrenergic receptor (β -adrenoceptor; β -AR)가 밝혀져 있다. β -AR은 α 와 β subtype이 존재하고 guanine-nucleotide-binding과 adenylyl-cyclase-coupled protein의 family에 속한다 (Stroberg, 1993). β -AR은 $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ 의 3개 subtype로 나누어지며, 여러 종류의 세포에 분포하여 신경계, 순환계, 내분비계를 조절하는 기능을 수행한다 (Galitzky 등, 1995; Padbury 등, 1995). 또한 지방대사 및 탄수화물대사를 비롯한 에너지 대사도 β -AR에 의해서 조절이 된다 (Atgie 등, 1997; Bousguet 등, 1995; Kim 등, 1991). 가축에 있어서 소와 양은 돼지나 닭보다 β -adrenergic agonist의 투여에 반응을 잘하는 것으로 알려져 있다. 소나 양에 있어서 도체의 단백질 조성은 18%까지 증가시키고 지방은 각각 14%와 47%까지 감소시키는 것으로 보고되었다 (Moloney 등, 1991). 이러한 단백질 축적은 이미 축적된 지방을 분해, 이용하여 에너지 공급을 보조함으로써 일어난 것으로 나타났다 (Choo 등, 1990). 지금까지의 이러한 β -AR에 대한 생리적 특성을 이용한 연구는 주로 고기생산에 있어서 지방조성을 낮추고 단백질 조성을 높이는 방향으로 많이 이루어지고 있다. 그 이유는 많은 소비자들이 지방이 적은 고기를 선호하기 때문이다.

본 연구의 목표는 한우 지방조직에서 β -AR의 분포를 조사하고, β -AR 유

전자를 cloning하며, 지방조직에서 발현양상을 조사함으로써 지방축적에 어떻게 작용하는지를 규명하고, 앞으로 근내 지방축적을 조절하는 방안을 개발하는 데 활용하고자 하는 것이다.

제 2절 재료 및 방법

1. β -adrenoceptor 분포 조사

가. 지방세포 membrane fraction 분리

지방조직에서 membrane fraction을 분리하는 방법은 당초 계획에는 돼지 지방세포에서 membrane fraction을 분리하는 방법을 사용하려 하였다. 이 방법은 지방세포를 다른 조직의 세포로부터 분리하기 때문에 다른 조직에서 유래한 membrane fraction이 오염되지 않은 순수한 지방 세포의 membrane fraction을 분리할 수 있는 장점이 있다. 본 연구 과정에서 소 지방세포는 돼지 지방세포에 비해 size가 크고, 지방산 분포가 주로 포화 지방산으로 구성되어 있어서 collagenase를 사용하여 지방세포를 분리하는 과정에서 지방세포가 깨지는 것을 발견하였다. 따라서, 지방세포 membrane fraction은 Bowen 등 (1992)이 사용한 지방조직을 직접 homogenization전에 liquid nitrogen에서 시료를 분쇄하였고, 신선 시료는 분쇄 과정을 거치지 않고 직접 homogenization하였다. 이 분쇄 차이로 인해서 filtering을 거치는 과정에서 많은 조직을 손실하였다.

나. Radio ligand binding assay

β -adrenoceptor subtype 분포는 (-)- [125 I] -cyanopindolol (ICYP)를 radioligand

로 사용하여 saturation과 competition binding 실험으로 조사하였다 (Kim 등, 1991). Saturation 실험은 0.1mM GTP, 1mM ascorbic acid와 0.1mM EDTA가 포함되어 있는 Krebs-phosphate buffer에 들어있는 adipocyte aliquots를 여러 농도 (5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 and 125 pM)의 ICYP와 37°C에서 70분에서 수행한 후 filtration하였다. Filter에 결합되어 있는 radioactivity는 gammer counter로 측정하였다. Non-specific binding은 total binding과 1 μ M propranolol하에서 binding과의 차이로 측정하였다. Saturation과 competition binding data는 scatchard를 위한 EBDA computer program과 LIGAND file 형성을 위한 Hill and Hofstee analyses program을 이용하여 분석하였다.

2. β -adrenoceptor 유전자 cloning

가. β 1-adrenoceptor 유전자 cloning 및 염기서열 분석

1) β 1-adrenoceptor 유전자 cloning

사람 (Frielle 등, 1987), 돼지 (Cao 등, 1998; Mcneel과 Mersmann, 1995), 생쥐, 흰쥐 (Shimonura와 Terada, 1990)의 sequence를 PCGENE을 이용하여 비교 분석 후 완전히 일치되는 coding region에서 β 1-adrenoceptor에 대한 primer를 아래와 같이 제작하였다.

β 1-1 : 5'-TGCAGACGCTCACCAACCTCTTC-3'

β 1-2 : 5'-GGCTGCGGCAGTAGATGATGGGG-3'

β 1-adrenoceptor는 genomic DNA의 coding region에 intron을 가지고 있지 않기에 직접 genomic DNA를 template로 사용하기 위하여 한우 지방조직에서 digestion buffer와 proteinase K를 이용하여 genomic DNA를 추출 후 PCR

mixture(template 150ng, dNTP (10mM), primer 1(10pmol), primer 2(10pmol), DMSO 4%, 10×Buffer 5 μ l, 25mM Mg²⁺, Taq 1 μ l)를 이용하여 PCR 반응 [94 $^{\circ}$ C 1min, \rightarrow 7 cycle (95 $^{\circ}$ C 15sec, 72 $^{\circ}$ C-66 $^{\circ}$ C 30sec, 72 $^{\circ}$ C 90sec) \rightarrow 25cycle (95 $^{\circ}$ C 15sec, 65 $^{\circ}$ C 30sec, 72 $^{\circ}$ C 90sec) \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 5min]을 수행하였다. 위와 같이 72 $^{\circ}$ C에서 66 $^{\circ}$ C로 온도를 1 $^{\circ}$ C씩 감소시키는 touchdown PCR 방법을 이용하여 예상되는 850bp의 band를 확인하였다.

얻어진 clone체를 직접 BigDye Terminator를 이용하여 sequencing reaction을 수행후 ABI 377을 이용한 automatic sequencing 수행하여 insert가 β 1의 coding region의 일부임을 확인하였다. 전체 coding region을 얻기 위해 생쥐, 흰쥐, 돼지, 사람, 양의 염기서열을 바탕으로 degenerative primer 아래와 같이 제작하였다.

β 1-51 : 5'-TYCCCRRCRCGGCCCARYYYYG-3'

β 1-31 : 5'-TCGGYATGGGCGCGGGGGYGCTC-3'

(R: A or G, S: G or C, Y: C or T)

한우에서 추출한 genomic DNA를 template로 이용하여 PCR을 수행하였다. 위의 조건에서처럼 72 $^{\circ}$ C에서 66 $^{\circ}$ C로 온도를 1.5 $^{\circ}$ C씩 감소시키는 touchdown PCR 방법을 이용하여 예상되는 약 1.4kb의 band를 확인하였다.

2) β 1-adrenoceptor 유전자의 sequencing

PCR 결과로 나온 clone을 전기영동한 후 gel elution kit(Qiagen)을 이용하여 elution하고, pGEM-Teasy vector(Promega)에 ligation시켰다. 위의 ligation mixture를 *E. coli* Top 10F'에 electroporation 방법으로 transformation 수행 후 x-gal/IPTG LB agar plate에 갈아 blue-white screening을 수행하였다. White를

보이는 *E. coli*를 template로 사용하고, β 1-adrenoceptor cloning에 이용한 β 1 primer들을 이용하여 colony PCR 방법으로 vector내 insert의 insertion을 확인하였다. Insertion이 확인된 *E. coli*를 접종한 후 plasmid preparation kit(Qiagen)을 이용하여 plasmid를 분리하였다. BigDye Terminator를 이용하여 sequencing reaction을 수행후 ABI 377을 이용한 automatic sequencing을 수행하였다.

나. β 2-adrenoceptor 유전자 cloning 및 염기서열 분석

1) β 2-adrenoceptor 유전자 cloning

β 2-adrenoceptor cloning을 위하여 GenBank에 이미 등록된 소의 cDNA sequence를 바탕으로 전체 coding region을 cloning 할 수 있는 primer를 아래와 같이 제작하였다.

β 2-1 : 5'-CTGCCAGCCTGCGCGCCATG-3'

β 2-2 : 5'-GTAGAAAACCGGCATTACAGCAG-3'

β 2-adrenoceptor는 genomic DNA의 coding region에 intron을 가지고 있지 않기에 직접 genomic DNA를 template로 사용하기 위하여 한우 지방조직에서 digestion buffer와 proteinase K를 이용하여 genomic DNA를 추출 후 PCR 반응 [95°C 1min → 2 cycles (94°C 30sec, 66°C 90sec, 72°C 90sec) → 25cycle (94°C 30sec, 62°C 90sec, 72°C 90sec) → 72°C 5min]을 수행하였다. 이와 같은 조건에서 PCR 수행 결과 예상되는 1.2kb의 band를 확인할 수 있었다.

2) β 2-adrenoceptor 유전자 subcloning 및 염기서열 분석

분리한 plasmid를 여러 가지 제한효소(EcoRI, HindIII, KpnI, XbaI, Sall,

XhoI, BamHI)로 처리후 DNA 단편의 크기를 분석하여 제한효소지도를 작성하였다. 작성된 제한효소지도를 바탕으로 β -adrenoceptor임을 간접적으로 확인하였다.

PCR 결과로 나온 clone을 전기영동한 후 gel elution kit(Qiagen)을 이용하여 elution하고, pGEM-Teasy vector(Promega)에 ligation시켰다. 위의 ligation mixture를 *E. coli* Top 10F'에 electroporation 방법으로 transformation 수행 후 x-gal/IPTG LB agar plate에 갈아 blue-white screening을 수행하였다. White로 보이는 *E. coli*를 template로 사용하고 β -adrenoceptor cloning에 이용한 $\beta 2$ primer를 이용하여 colony PCR 방법으로 vector내 insert의 insertion을 확인하였다. Insertion이 확인된 *E. coli*를 접종한 후 plasmid preparation kit(Qiagen)을 이용하여 plasmid를 분리하였다.

BigDye Terminator를 이용하여 sequencing reaction을 수행후 ABI 377을 이용한 automatic sequencing 수행하여 insert가 $\beta 2$ 임을 확인하였다. 정확한 sequence를 알기 위하여 Kpn I/Apa I(Lane 2)과 Kpn I/Sac I(Lane 3)으로 절단 후 각각을 pBluescript로 subcloning하였다. 상기와 동일한 방법으로 sequencing을 수행 후 GenBank data와 비교하였다.

다. $\beta 3$ -adrenoceptor 유전자 cloning 및 염기서열 분석

1) $\beta 3$ -adrenoceptor 유전자 cloning

$\beta 3$ -adrenoceptor의 coding region은 2개의 exon과 1개의 intron으로 되어있어 coding region의 대부분을 차지하는 exon 1을 cloning하기 위하여 GenBank에 등록된 소의 cDNA sequence를 바탕으로 exon 1의 coding region에서 primer를 아래와 같이 제작하였다.

$\beta 3-1$: 5'-AGACCCTTTCCCTCATTCTTCCCGCCCCA-3'

$\beta 3-2$: 5'-CGGCAGTAGATGAGCGGGTTGAAGGCAGAG-3'

$\beta 3$ -adrenoceptor exon 1의 크기는 약 1kb이고, exon 2의 크기는 약 0.2kb이다. Genomic DNA를 template로 사용하여 coding region의 대부분을 차지하는 exon 1을 증폭하기 위하여 한우 지방조직에서 digestion buffer와 proteinase K를 이용하여 genomic DNA를 추출 후 PCR 반응 [95°C 1min → 27 cycles (95°C 15 sec, 94°C 30sec, 68°C 3 min) → 68°C 5min]을 수행하였다. PCR 수행 결과 예상되는 약 1kb의 exon 1 band를 확인하였다.

분리한 plasmid를 여러 가지 제한효소(ApaI, BamHI, EcoRV, PvuII) 처리후 DNA단편의 크기를 분석하여 제한효소지도를 작성하였다. 작성된 제한효소 지도를 바탕으로 $\beta 3$ -adrenoceptor임을 간접적으로 확인하였다.

2) $\beta 3$ -adrenoceptor 유전자 subcloning 및 염기서열 분석

PCR clone을 전기영동한 후 gel elution kit(Qiagen)을 이용하여 elution하고, pGEM-Teasy vector(Promega)에 ligation시켰다. 위의 ligation mixture를 *E. coli* Top 10F'에 electroporation 방법으로 transformation한 후 x-gal/IPTG LB agar plate에 깔아 blue-white screening을 수행하였다. White로 보이는 *E. coli*를 template로 사용하고 β -adrenoceptor cloning에 이용한 $\beta 3$ primer를 이용하여 colony PCR 방법으로 vector내 insert의 insertion을 확인하였다. Insertion이 확인된 *E. coli*를 접종한 후 plasmid preparation kit(Qiagen)을 이용하여 plasmid를 분리하였다.

BigDye Terminator를 이용하여 sequencing reaction을 수행한 후 ABI 377을 이용한 automatic sequencing 수행하여 insert가 $\beta 3$ 의 exon 1 부분임을 확인하였다 (Pietri-Rouxel 등, 1995).

3. β -adrenoceptor 유전자 발현양상 분석

가. β 1-adrenoceptor의 northern 분석

β 1-adrenoceptor의 발현 수준이 미약하여 한우 지방에서 guanidine isothiocyanate 방법 (Chomczynski와 Sacchi, 1987)을 이용하여 total RNA를 추출한 후 Poly A Track mRNA Isolation Systems(Promega)를 이용하여 mRNA를 추출하였다. Formaldehyde- denaturing 1% agarose gel 상에서 5 μ g의 mRNA를 size 별로 분리한 후 모세관 법에 의해 agarose gel 상의 RNA를 나일론 membrane에 전이시킨 다음 UV-crosslinker를 사용하여 RNA를 나일론 membrane에 영구적으로 부착시켰다. Cloning된 β 1-adrenoceptor cDNA를 template로 이용하고, Ladderman DNA labelling kit(Takara)를 이용하여 P-32로 표식시킨 후 DNA내로 들어가지 않은 nucleotide를 nucleotide removal kit (Qiagen, Germany)로 제거한 뒤 사용하였다. 나일론 membrane을 42 °C에서 2시간 이상 pre-hybridization후 42 °C에서 16시간 hybridization하였다. Membrane상의 RNA에 비특이적으로 결합한 probe를 제거하기 위해서는 high-stringency 용액인 2 x SSC/0.1% SDS와 1 x SSC/0.1% SDS로 60 °C에서 30분씩 헹구었다. 위에서 헹구어진 나일론 membrane을 건조시킨 후 X-ray 필름을 얹어 -70 °C에서 3일 방치한 다음 X-ray 필름을 현상하였다.

나. RT-PCR에 의한 한우 β 1- and β 2-adrenoceptor 발현양상 검정

β 1- 과 β 2-adrenoceptor mRNA의 발현 양이 미약할 것으로 판단되어 northern 방법보다 민감한 방법인 RT-PCR로 발현 양을 비교하였다. Cloning한 β 1- 과 β 2-adrenoceptor의 염기서열을 바탕으로 RT-PCR에 필요한 primer를 제작하였다. PCR 증폭에 대한 정량을 위하여 control로 β -actin을 이용하였

다. 각각의 primer 서열은 아래와 같다.

β 1F : 5'-CCAGAAGCAGGTGAAGAAGATCG-3'

β 1R : 5'-CAGTTGAAGAAGACGAAGAGGC-3'

β 2F : 5'-TGGTCATGGTCTTCGTCTACTCC-3'

β 2R : 5'-CAGTCCTGTCATTGCTGTTGCTG-3'

actinF: 5'-GGCACCACACCTTCTACAACGAG-3'

actinR: 5'-GCTTCTCCTTGATGTCACAGACG-3'

한우 지방조직에서 guanidine isothiocyanate method를 이용하여 total RNA를 추출하고 이를 template로 사용하여 reverse transcriptase (RT) 반응 (total RNA 3 μ g, primer 2 μ l, DEPC water 6 μ l, 5 \times buffer 2 μ l, dNTP (10mM) 1 μ l, MMLV 1 μ l)을 수행하였다. RT 반응 후 PCR을 (β 1 42 cycles, β 2 33 cycles, β actin 38 cycles)을 수행하여 발현 양상을 조사하였다. PCR 결과는 정상급여 시의 β -adrenoceptor의 발현양을 100%로 보고, β -actin 양으로 normalize하여 절식 및 재급여시의 발현 양을 비교하였다.

다. RT-PCR에 의한 근내지방과 피하지방에서 β -adrenoceptor 발현양상 검정

한우 5두에서 근내지방과 피하지방에서 total RNA를 template로 RT 반응을 수행하여 single strand cDNA를 합성하였다. 합성한 single stand cDNA를 template로 사용하고, 이미 제작된 β 1-, β 2-, β 3-adrenoceptor와 β -actin primer를 이용하여 근내지방과 피하지방 각각 5 sample에 대한 PCR을 수행

하였다. PCR mixture [template $3\mu\text{l}$, $10\times$ buffer $1\mu\text{l}$, dNTP (10pmol) $1.6\mu\text{l}$, DMSO $1\mu\text{l}$, primer 1(10pmol) $0.5\mu\text{l}$, primer 2(10pmol) $0.5\mu\text{l}$, Ex Taq $0.1\mu\text{l}$, H₂O $11.3\mu\text{l}$]를 준비하여 94°C 1min \rightarrow 95°C 15 sec \rightarrow 72°C 1min, 61°C 30 sec, 72°C 1 min하에서 β 1은 42 cycles, β 2는 34 cycles, β 3는 39 cycles, β actin은 39 cycle을 수행하였다. 각각의 β actin 발현을 internal standard로 정량한 후 근내지방의 발현을 100%로 보고 상대적인 발현 양을 비교하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. β -adrenoceptor subtype 분포 조사

가. 지방세포 membrane fraction 분리

한우지방세포 membrane fraction을 분리하여 [¹²⁵I]-cyanopindolol (ICYP)와 saturation binding 실험으로 β -AR의 분포를 조사하였다. 먼저 sample의 BAR 분석에 들어가기 전에 multi screen system의 도입이 BAR binding assay를 할 수 있는지의 여부를 시험하는 것이 필요하였으며, 적절한 protein 양과 radio-ligand 양의 비율을 결정할 필요가 있었다. 본 실험의 결과는 적절한 protein의 양은 각 reaction당 $150\mu\text{l}$ 에 $3\mu\text{g}$ 으로 나타났다. Binding assay 조건이 표 1에 제시되어 있다. 상기에서 분리한 cell을 radioligand로 이용하고 표 1에 제시되어 있는 여러 가지 농도 (1.12, 2.19, 4.31, 7.79, 11.5, 17.8, 41.8pM)의 [¹²⁵I]-cyanopindolol (ICYP)와 반응하였다. Filter와 결합한 radioactivity는 gamma counter로 측정하였다.

나. Radio ligand binding assay

표 2와 그림 1은 multi screen system을 사용하여 Hawaii에서 기른 젖소 지방세포에서 BAR의 saturation binding 실험 결과이다. 표 3과 그림 2는 위의 saturation binding 결과를 scatchard plot으로 transformation한 것이다. 위의 두 결과는 multi screen system은 BAR radioligand binding assay에 성공적으로 도입될 수 있음을 보여 준다. 위의 test에서는 2개의 시료를 사용하였으며, 위의 결과를 non-linear regression을 이용하여 마지막 parameter (Kd와 Bmax)를 결정 (estimation)하는 ligand program(Munson과 Rodbard, 1980)을 사용하여 Kd와 Bmax를 구한 결과는 표 4에 나타나 있다. 실험 결과, 한우 지방조직의 Kd 값은 하와이우보다 낮았으며, Bmax 값은 하와이우보다 높았다.

Table 1. Tube contents of saturation analysis of ¹²⁵I-CYB binding to adipocyte ghost

Well No.	ICY PPM added	GTP (20 ul)	Prop'ol (30 ul)	Kreb's (30 ul)	ICYP (50 ul)	Homogenate (150 ul)
1-3	1.12 pM	+	-	+	+	+
4-6	1.12 pM	+	+	-	+	+
7-9	2.19 pM	+	-	+	+	+
10-12	2.19 pM	+	+	-	+	+
13-15	4.31 pM	+	-	+	+	+
16-18	4.31 pM	+	+	-	+	+
19-21	7.79 pM	+	-	+	+	+
22-24	7.79 pM	+	+	-	+	+
25-27	11.5 pM	+	-	+	+	+
28-30	11.5 pM	+	+	-	+	+
31-33	17.8 pM	+	-	+	+	+
34-36	17.8 pM	+	+	-	+	+
37-39	41.8 pM	+	-	+	+	+
40-42	41.8 pM	+	+	-	+	+

Table 2. Saturation binding results

pM added	fmol/mg p Total binding	fmol/mg p Specific binding	fmol/mg p Non-specific binding
1.12	20.3	18.9	1.49
2.19	29.5	27.3	2.19
4.31	55.5	52.3	3.20
7.79	77.4	72.8	4.77
11.5	94.2	88.4	5.80
17.8	112.8	104	8.80
41.8	200.6	184	16.6

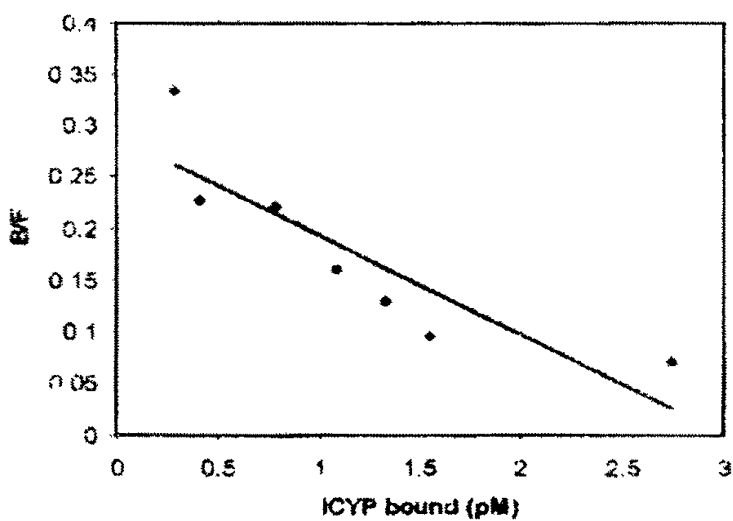


Figure 1. Plot of saturation binding results

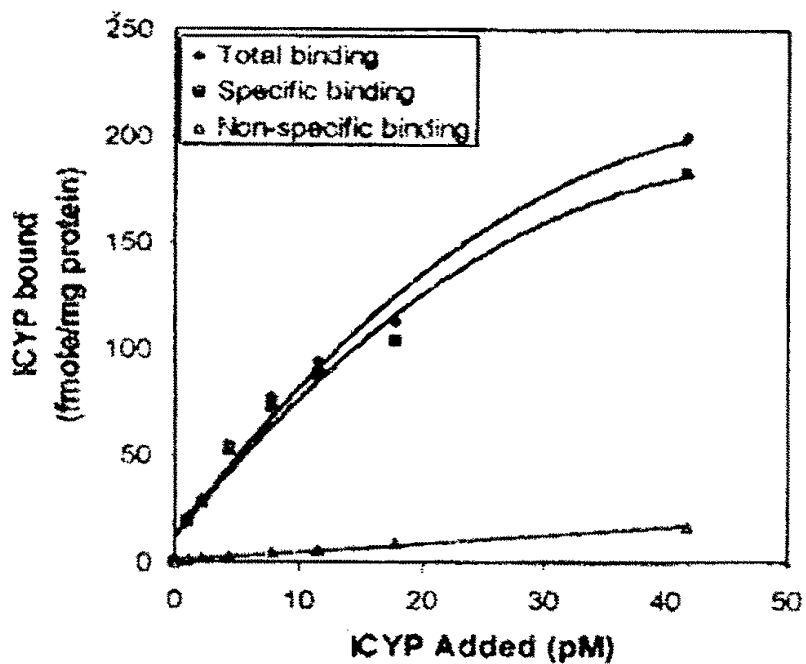


Figure 2. Scatchard plot of saturation binding

Table 3. Data of bound (B)/Free (F)

ICPY bound (pM)	B/F
0.28	0.335
0.41	0.228
0.78	0.221
1.08	0.162
1.32	0.130
1.55	0.095
2.74	0.070

Table 4. BAR radioligand assay of β -adrenoceptor

Sample	K _D (pM)	Bmax(fmol/ μ g protein)	nH
Hawaii #1	10.0	220.7	1.10
Hawaii #2	20.3	199.9	1.00
Subcutaneous*	90.0	16.3	nd
Abdominal*	69.5	29.7	nd

*Hanwoo

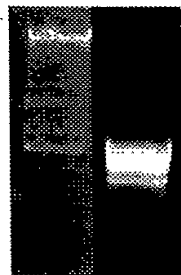
nd : not determined

2. β -adrenoceptor 유전자 cloning

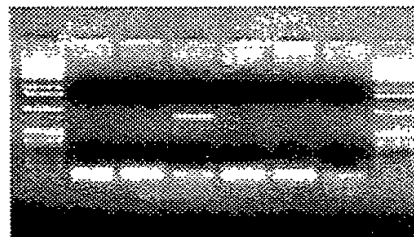
가. β 1-adrenoceptor 유전자 cloning 및 염기서열 분석

1) β 1-adrenoceptor 유전자 cloning

사람, 돼지, 생쥐, 흰쥐의 sequence를 PCGENE을 이용하여 비교 분석후 완전히 일치되는 coding region에서 β 1-adrenoceptor에 대한 primer를 제작하여 touchdown PCR 방법으로 예상되는 850bp의 band를 증폭하였다 (그림 3A). 얻어진 clone을 sequencing하여 insert가 β 1의 coding region의 일부임을 확인하였다. 전체 coding region을 얻기 위해 생쥐, 흰쥐, 돼지, 사람, 양의 염기서열을 바탕으로 degenerative primer 제작하여 touchdown PCR 방법으로 약 1.4kb의 band를 증폭하였다 (그림 3B).



A



B

Figure 3. Amplification of partial- (left, A) and full- coding region (right, B) of β 1 adrenoceptor gene by PCR

2) β 1-adrenoceptor 유전자의 sequencing

PCR 결과로 나온 clone을 전기영동한 후 gel elution kit로 이용하여 elution 하고, pGEM-Teasy vector에 ligation시켰다. Ligation mixture를 *E. coli*에 transformation후 white colony를 β 1-adrenoceptor cloning에 이용한 β 1 primer 들을 이용하여 colony PCR 방법으로 vector내에 insert가 존재하는 것을 확인 하고, plasmid를 분리하였다. Automatic sequencing으로 염기서열을 분석한 결과, 기 발표된 β 1-adrenoceptor의 전체 full-coding region임을 확인하였다 (그림 4). β 1-adrenoceptor 유전자는 1,458bp nucleotide와 486개의 아미노산으로 구성되어 있었다. 돼지, 양, 사람, 소의 아미노산 서열과 alignment 결과, 77.3%의 Identity를 보였고, 특히 양과 비교시 93.4%의 높은 identity를 보였다 (그림 5).

```

CCGAGCGCGGCCAGTTCTGCCACACCCCTCTCCCCAGGCCTCCGCAGCTCGGCATGGGC      60
                                     M G
GCGGGGGTGCTCGCCCTGGGCGCCTCCGAGCCCTGCAACCTGTCATCGGCCGCGCCGGTC      120
A G V L A L G A S E P C N L S S A A P V
CCCGACGGCGCGGCCACGGCGGCGGGCTGCTAGTTCCCGCGTCCGCGCCCGCCTCGCTG      180
P D G A A T A A R L L V P A S P P A S L
CTGACCTCGGCCAGCGAGGGACCCCCACTGCCGTGCGAGCAGTGGACGGCCGGCATGGGC      240
L T S A S E G P P L P S Q Q W T A G M G
CTGCTGATGGCATTATCGTGCTACTCATCGTGGTGGGCAACGTGCTGGTGGTGGTGGCC      300
L L M A F I V L L I V V G N V L V L V A
ATCGCCAAGACACCGCGGCTGCAGACGCTCACCAACCTCTTCATCATGTCGCTGGCCAGC      360
I A K T P R L Q T L T N L F I M S L A S
GCAGATCTGGTCATGGGTCTGCTGGTAGTGCCGTTTGGAGCCACCATCGTGGTGTGGGAC      420
A D L V M G L L V V P F G A T I V V W D
CGCTGGGAGTATGGCTCCTTCTTCTGCGAGCTCTGGACCTCGGTGGACGTACTGTGCGTG      480
R W E Y G S F F C E L W T S V D V L C V
ACGGCCAGCATTGAGACCCTGTGTGTCATCGCCCTGGACCACTACCTCGCCATCACGTGCG      540
T A S I E T L C V I A L D H Y L A I T S

```

CCCTTCGCTACCAGAGCCTGCTGACCCGCGCGCGGGCGCGGGCCCTCGTGTGCACCGTG	600
P F R Y Q S L L T R A R A R A L V C T V	
TGGGCCATCTCGGCGCTGGTGTCTTCTGCCCATCTTCATGCAGTGGTGGCGGGACAAG	660
W A I S A L V S F L P I F M Q W W R D K	
GACGCCAAGGCGAGCGGATGCTACAACGACCCCGAGTGCTGCGACTTCATCATCAACGAG	720
D A K A S G C Y N D P E C C D F I I N E	
GGCTACGCGATCACCTCTTCCGTCTCTCTTCTACGCGCCCCTGTGCATCATGGCCTTC	780
G Y A I T S S V V S F Y A P L C I M A F	
GTGTACCTGCGGGTGTTCGCGAGGCCAGAAAGCAGGTGAAGAAGATCGACAGCTGCGAG	840
V Y L R V F R E A Q K Q V K K I D S C E	
CGCCGCTTCTCAGCGGGCCCCGCGGGCTGCCCTCGCCCGCGCCCTCGCCCGGGCCCCCG	900
R R F L S G P A R L P S P A P S P G P P	
CTCCCTGCGCCACGGTGGCCAACGGGCGCGCCAACAAGCGGGCGCCCTCGCGCCTCGTG	960
L P A A T V A N G R A N K R R P S R L V	
GCCCTGCGGAGCAGAAGGCACTCAAGACGCTGGGCATCATATGGGCGTGTTCACGCTC	1020
A L R E Q K A L K T L G I I M G V F T L	
TGCTGGCTGCCTTTCTTCTAGCCAACGTGGTGAAGGCCTTCCACCGCGACCTGGTGCCC	1080
C W L P F F L A N V V K A F H R D L V P	
GACCGCCTCTTCGTCTTCTTCAACTGGTGGGCTACGCCAACTCGGCCTTCAACCCCATC	1140
D R L F V F F N W L G Y A N S A F N P I	
ATCTACTGCCGAGCCCCGACTTCCGCAAGGCCTTCCAGCGCCTGCTCTGCTGCGCGCGC	1200
I Y C R S P D F R K A F Q R L L C C A R	
CGGGCCGCTGTGGGAGCCACGGGCCCGGGGACCCGCGCGCCTTGGGCTGCCTG	1260
R A A C G S H A A A G D P P R A L G C L	
GCGGTGGCCCGGCCGTGCGCGTCTCCCGGGCCCGCCTCGGACGACGACGACGACGAC	1320
A V A R P S P S P G A A S D D D D D D D	
GAAGACGACGTCGGGGCCGCGCCCGCCGTGCGTCTGCTGGAGCCCTGGGCTGGCTACAAC	1380
E D D V G A A P P V R L L E P W A G Y N	
GGCGGGGCGGCGGAACAGCGACTCGAGCCCGGACGAGCCAAGCCGCGGGCTGCGCC	1420
G G A A A N S D S S P D E P S R A G C A	
TCCGAATCCAAGGTGTAG	1458
S E S K V -	

Figure 4. Nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of bovine β 1-adrenoceptor gene. The amino acids are aligned with the second nucleotide of each codon.

BOVINEB1	MGAGVLALGASEPCNLSSAAPVPDGAATAARLLVPASPPASLLTSASEGP	50
SHEEPB1P	MGAGALALGASEPCNLSFAAPVPDGAATAARLLVPXSPLRLAADLQQRGT	50
HUMANB1	MGAGVLVLGASEPGNLSSAAPLPDGAATAARLLVPASPPASLLPPASESP	50
PIGB1	MGAGALALGASEPCNLSSAAPLPDGAATAARLLVPASPPASLLTPASEGS	50
	****. *. ***** ** ***. ***** **	
BOVINEB1	PLPSQQWTAGMGLLMAFIVLLIVVGNVLVVAIAKTPRLQTLTNLFIMSL	100
SHEEPB1P	PLLSQQWTVGMGLLMAFIVLLIVAGNVLVI VAI AKTPRLQTLTNLFIMSL	100
HUMANB1	EPLSQQWTAGMGLLMALIVLLIVAGNVLVI VAI AKTPRLQTLTNLFIMSL	100
PIGB1	VQLSQQWTAGMGLLMALIVLLIVAGNVLVI VAI AKTPRLQTLTNLFIMSL	100
	*****. *****. *****. *****. *****	
BOVINEB1	ASADLMGLLVVPFGATIVVWDRWEYGSFFCELWTSVDVLCVTASIETLC	150
SHEEPB1P	ASADLMGLLVVPFGATIVVWGRWEYGSFFCELWTSVDVLCVTASIETLC	150
HUMANB1	ASADLMGLLVVPFGATIVVWGRWEYGSFFCELWTSVDVLCVTASIETLC	150
PIGB1	ASADLMGLLVVPFGATIVVWGRWEYGSFFCELWTSVDVLCVTASIETLC	150
	*****. *****. *****. *****. *****	
BOVINEB1	VIALDHYLAITSPFRYQSLLTRARARALVCTVWVAISALVSFLPIFMQWWR	200
SHEEPB1P	VIALDRYLAITSPFRYQSLLTRARARALVCTVWVAISALVSFLPIFMQWVG	200
HUMANB1	VIALDRYLAITSPFRYQSLLTRARARGLVCTVWVAISALVSFLPILMHWWR	200
PIGB1	VIALDRYLAITSPFRYQSLLTRARARALVCTVWVAISALVSFLPILMHWWR	199
	*****. *****. ***** ***. *****. *****. *. **	
BOVINEB1	DKDAKASGCYNDPECCDFIINEGYAITSSVVSFYAPLCIMAFVYLRVFRE	250
SHEEPB1P	DKDAKASRCYNDPECCDFIINEGYAITSSVVSFYVPLCIMAFVYLRVFRE	250
HUMANB1	AESDEARRCYNDPKCCDFVTNRAYAIASSVVSFYVPLCIMAFVYLRVFRE	250
PIGB1	DKGAEARRCYNDPKCCDFVTNRAYAIASSVVSFYVPLCIMAFVYLRVFRE	249
 *. *****. *****. *. *****. *****. *****	
BOVINEB1	AQKQVKKIDSCERRFLSGPAR-----LPSPAPSPGPPLPAAT-----	287
SHEEPB1P	AQKQVKKIDSCERRFLSGPAR-----LPSPALSPGAPLPAAA-----	287
HUMANB1	AQKQVKKIDSCERRFLGGPARPPSPSPSPVPAPAPPPGPPRPAAAAATAP	300
PIGB1	AQKQVKKIDSCERRFLSGPARPPSPAP-----SPGSPLPAAAAA-AP	290
	*****. *****. *****. *****. *****. *****	
BOVINEB1	VANGRANKRRPSRLVALREQKALKTLGIIMGVFTLCWLPFFLANVVKAFH	337
SHEEPB1P	VANGRANKRRPSRLVALREQKALKTLGIIMGVFTLCWLPFFLANVVKAFH	337
HUMANB1	LANGRAGKRRPSRLVALREQKALKTLGIIMGVFTLCWLPFFLANVVKAFH	350
PIGB1	VANGRTSKRRPSRLVALREQKALKTLGIIMGVFTLCWLPFFLANVVKAFH	340
	****. *****. *****. *****. *****. *****	

BOVINEB1	RDLVPDRLFVFFNWLGYSANSAFNPIIYCRSPDFRKAFQRLCCARRAACG	387
SHEEPB1P	RDLVPDRLFVFFNWLGYSANSAFNPIIYCRSPDFRKAFQRLCCARRAACG	387
HUMANB1	RELVPDRLFVFFNWLGYSANSAFNPIIYCRSPDFRKAFQGLCCARRAARR	400
PIGB1	RDLVPDRLFVFFNWLGYSANSAFNPIIYCRSPDFRKAFQRLCCARRVARG	390
	*.*****.*	
BOVINEB1	SHAAAGDPPRALGCLAVARPSPSPGAASDDDDDDDEDDVGAAPPVRLLEP	437
SHEEPB1P	SHGAAGDPPRAAGCLAVARPSPSPGAASDDDDDDDEDDVGAAPPVRLQLP	437
HUMANB1	RHATHGDRPRASGCLARPGPPSPGAASDDDDDDV---VGATPPARLLEP	447
PIGB1	SCAAAGDGPRASGCLAVARPPSPGAASDDDDD--EEDVGAAPPAPLLEP	438
	. . . ** *** **** . *.*****.***.***.***.*	
BOVINEB1	WAGYNGGAAANS DSSPDEPSRAGCASESKV	467
SHEEPB1P	WAGYNGGAAANS DSSPDEPSRPGCGSESKV	467
HUMANB1	WAGCNGGAAANS DSSLDEPCRPGFASESKV	477
PIGB1	WAGYNGGAARDS DSSL DERTPGGRASESKV	468
	.**.**** **. . *.*****	

Figure 5. Comparison of the deduced amino acid sequences of bovine β 1-adrenoceptor gene with those of other species. Star (*) denotes the amino acid residue identical in all species. Dot (.) denotes the amino acid residue similar to that of bovine species.

나. β 2-adrenoceptor 유전자 cloning 및 염기서열 분석

1) β 2-adrenoceptor 유전자 cloning

β 2-adrenoceptor cloning을 위하여 GenBank에 이미 등록된 소의 cDNA sequence를 바탕으로 전체 coding region을 cloning 할 수 있는 primer를 제작하였다. β 2-adrenoceptor는 genomic DNA의 coding region에 intron을 가지고 있지 않으므로 genomic DNA를 template로 사용하여 clone을 확보할 수 있다. 한우 지방조직에서 genomic DNA를 추출한 template를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 결과, 예상되는 1.2kb의 band를 확인하였다 (그림 6).

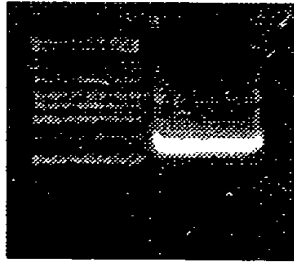


Figure 6. PCR amplification of $\beta 2$ -adrenoceptor coding region

2) $\beta 2$ -adrenoceptor 유전자 subcloning 및 염기서열 분석

PCR product를 elution하여 pGEM-Teasy vector ligation하고, *E. coli*에 transformation 후 white colony를 template로 사용하고 $\beta 2$ primer를 이용하여 colony PCR 방법으로 vector내 insert의 존재를 확인하였다. Plasmid를 분리하여 automatic sequencing으로 insert가 $\beta 2$ 임을 확인하였다. 전체 clone을 sequencing하기 위하여 KpnI/ApaI(lane 2)과 KpnI/SacI(lane 3)으로 절단 후 각각을 pBluescript로 subcloning하였다 (그림 7). Subclone을 sequencing을 후 GenBank data와 비교한 결과, 기 밝혀진 bovine의 sequence와 coding region에서 100% 일치함을 확인하였다 (그림 8).

1 2 3

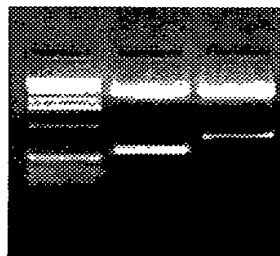


Figure 7. Subcloning of $\beta 2$ -adrenoceptor coding region

CTGCCAGCCTGCGCGCCATGGGGCAGCCCGGGAACCGCAGCGTCTTTTTGCTGGCGCCCA 60
M G Q P G N R S V F L L A P
ACGCAAGCCACGCGCCGGACCAAAACGTCACGCTGGAACGGGACGAGGCCTGGGTTGTGG 120
N A S H A P D Q N V T L E R D E A W V V
GCATGGGCATCCTCATGTGCGTTATTGTCTGGCCATCGTGTTTGGAAACGTGCTAGTCA 180
G M G I L M S L I V L A I V F G N V L V
TCACAGCCATTGCCAAGTTTGAGCGTCTCCAGACGGTCACCAACTACTTCATCACCTCCC 240
I T A I A K F E R L Q T V T N Y F I T S
TGGCCTGTGCTGACCTGGTCATGGGCCTGGCAGTGGTGCCCTTTGGGGCCTGCCACATCC 300
L A C A D L V M G L A V V P F G A C H I
TCATGAAAATGTGGACTTTTGGCAACTTCTGGTGTGAGTTTTGGACTTCCATTGACGTGT 360
L M K M W T F G N F W C E F W T S I D V
TATGCGTCACGGCCAGCATTGAGACCTTGTGCGTGATCGCTGTGGATCGCTACTTAGCCA 420
L C V T A S I E T L C V I A V D R Y L A
TCACGTCACCCTTCAAGTATCAGTGCCTGCTGACCAAGAATAAGGCCCGGGTGGTCATTT 480
I T S P F K Y Q C L L T K N K A R V V I
TGATGGTGTGGATCGTGTCTGGCCTTACCTCCTTCTTACCCATTGAGTGCCTGGTACC 540
L M V W I V S G L T S F L P I Q M H W Y
GGGCCAGCCACAAGGAAGCCATCAACTGCTATGCTAAGGAAACCTGCTGTGACTTCTTCA 600
R A S H K E A I N C Y A K E T C C D F F
CGAACCAACCCTATGCCATTGCCCTCCTCATTGTGTCCTTCTACCTTCCCCTGGTGGTCA 660
T N Q P Y A I A S S I V S F Y L P L V V
TGGTCTTCGTCTACTCCAGGGTGTCCAGGTGGCCAAAAGGCAGCTCCAGAAGATCGACA 720
M V F V Y S R V F Q V A K R Q L Q K I D
AATCTGAGGGCCGCTTCCATGCCAAAACGTCAGTCAAGTGGAGCAGGATGGGCCGGAGCG 780
K S E G R F H A Q N V S Q V E Q D G R S
GTCTAGGACAACCGCAGGACCTCCAAGTCTACTTGAAGGAACACAAAGCCCTCAAGACTT 840
G L G Q R R T S K F Y L K E H K A L K T
TAGGCATTATCATGGGCACCTTACCCTGTGCTGGCTGCCCTTCTTCATTGTCAACATTG 900
L G I I M G T F T L C W L P F F I V N I
TGCACGTGATCAAGGATAACCTCATCCGTAAGGAAATATACATCCTTCTAAACTGGTGG 960
V H V I K D N L I R K E I Y I L L N W L
GCTACATCAACTCCGCTTTCAATCCCCTTATCTACTGCCGGAGCCCAGATTTTCAGGATTG 1020
G Y I N S A F N P L I Y C R S P D F R I
CCTTCCAGGAGCTTCTCTGCCTGGCAGGTCTTCATTGAAGGCCTATGGGAATGGCTGCT 1080
A F Q E L L C L R R S S L K A Y G N G C
CCAGCAACAGCAATGACAGGACTGACTACACAGGGGAACAGAGTGGATATCACCTGGGGG 1140
S S N S N D R T D Y T G E Q S G Y H L G
AGGAGAAAGACAGTGAACCTTCTGTGTGAAGACCCCCAGGCACCGAAAACCTTTGTGAACC 1200
E E K D S E L L C E D P P G T E N F V N
AGCAAGGTACTGTGCCAGTGATAGCATTGATTCACAAGGGAGGAATTGTAGTACAAATG 1260
Q Q G T V P S D S I D S Q G R N C S T N
ACTCACTGCTGTAATGCCGGTTTTCTAC 1288
D S L L -

Figure 8. Nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of bovine β 2-adrenoceptor gene. The primer sequences for PCR are underlined.

다. $\beta 3$ -adrenoceptor 유전자 cloning 및 염기서열 분석

1) $\beta 3$ -adrenoceptor 유전자 cloning

$\beta 3$ -adrenoceptor의 coding region은 2개의 exon과 1개의 intron으로 되어있어, coding region의 대부분을 차지하는 exon 1을 cloning하기 위하여 GenBank에 등록된 소의 cDNA sequence를 바탕으로 exon 1의 coding region에서 primer를 제작하였다. Exon 1의 크기는 약 1kb이고, exon 2의 크기는 약 0.2kb이기에 직접 genomic DNA를 template로 사용하여 coding region의 대부분을 차지하는 exon 1을 증폭하기 위하여 한우 지방조직에서 genomic DNA를 추출 후 PCR을 수행하였다. PCR 결과, 예상되는 약 1kb의 exon 1 band를 확인하였다 (그림 9).

분리한 plasmid를 여러 가지 제한효소(ApaI, BamHI, EcoRV, PvuII)로 처리 후 DNA단편의 크기를 분석하여 제한효소지도를 작성하였다. 작성된 제한효소지도를 바탕으로 $\beta 3$ -adrenoceptor임을 간접적으로 확인하였다 (그림 10).



Figure 9. PCR amplification of $\beta 3$ -adrenoceptor gene

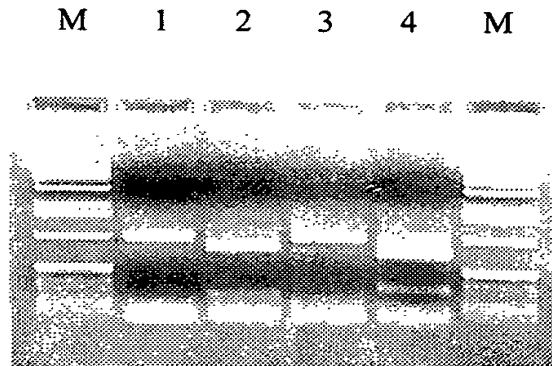


Figure 10. Restriction map of $\beta 3$ -adrenoceptor gene. M: Marker, Lane 1: Apa I, Lane 2: BamH I, Lane 3: EcoR V, Lane 4: Pvu II.

2) $\beta 3$ -adrenoceptor 유전자 subcloning 및 염기서열 분석

PCR product를 elution하여 pGEM-Teasy vector에 ligation하였다. *E. coli*에 transformation 후 생성된 white를 template로 사용하고 $\beta 3$ primer를 이용하여 colony PCR 방법으로 vector내 insert의 존재를 확인하였다. Plasmid를 분리하여 automatic sequencing을 수행한 결과, 기 밝혀진 bovine exon 1의 sequence와 100% 일치함을 확인하였다 (그림 11).

1 AGACCCTTTC CCTCATTCTT TCCCGCCCCA CGCGCGACGC GGGGATGGCT CCGTGGCCTC
M A P W P
61 CTGGGAACAG CTCTCTGACC CCGTGGCCAG ATATCCCCAC CCTGGCACCC AATACTGCCA
P G N S S L T P W P D I P T L A P N T A
121 ACGCGAGTGG GCTGCCAGGG GTGCCCTGGG CCGTGGCGCT GGCGGGGGCG CTGTTGGCGC
N A S G L P G V P W A V A L A G A L L A
181 TAGCGGTGCT GGCCACCGTG GGAGGCAACC TGCTGGTAAT CGTGGCCATC GCCCGGACGC
L A V L A T V G G N L L V I V A I A R T
241 CGAGACTCCA GACCATGACC AACGTGTTCTG TGACTIONGCT GGCCACAGCC GACCTGGTGG
P R L Q T M T N V F V T S L A T A D L V
301 TGGGGCTCCT GGTTCGTGCC CCGGGGGCCA CGTTGGCGCT GACCGGCCAC TGGCCCCTGG
V G L L V V P P G A T L A L T G H W P L
361 GCGTCACCGG TTGCGAGCTG TGGACCTCAG TGGACGTGCT GTGTGTGACC GCCAGCATCG
G V T G C E L W T S V D V L C V T A S I
421 AAACCCTGTG CGCCCTGGCG GTGGACCGCT ACCTGGCCGT GACCAACCCG CTGCGCTACG
E T L C A L A V D R Y L A V T N P L R Y
481 GCGCGCTGGT CACCAAACGC CGCGCCCTAG CAGCCGTGGT CCTGGTGTGG GTGGTGTCCG
G A L V T K R R A L A A V V L V W V V S
541 CCGCGGTGTC GTTTGCGCCC ATCATGAGCA AATGGTGGCG CATCGGGGCC GATGCCGAGG
A A V S F A P I M S K W W R I G A D A E
601 CGCAGCGTTG CCACTCCAAC CCGCGCTGCT GCACCTTCGC CTCCAACATG CCCTACGCGC
A Q R C H S N P R C C T F A S N M P Y A
661 TGCTCTCCTC CTCGGTCTCG TTCTATCTTC CGCTCCTGGT GATGCTCTTC GTCTACGCAC
L L S S S V S F Y L P L L V M L F V Y A
721 GAGTTTTCTG GGTGGCCACG CGCCAGCTGC GCTTGCTGCG CCGGGAGCTG GGTCGCTTCC
R V F V V A T R Q L R L L R R E L G R F
781 CGCCAGAGGA GTCTCCGCCG GCTCCTTCTC GCTCCGGATC CCCTGGCCTG GCGGGGCCGT
P P E E S P P A P S R S G S P G L A G P
841 GCGCCTCGCC CGCGGGGGTG CCCTCCTACG GCCGGCGGCC GGCGGCGCTT CTGCCTCTGC
C A S P A G V P S Y G R R P A R L L P L
901 GGGAACACCG CGCCCTGCGC ACCTTGGGGC TCATCATGGG AACCTTCACT CTCTGCTGGT
R E H R A L R T L G L I M G T F T L C W
961 TGCCTTTCTT TGTGGTCAAC GTGGTGGCGG CCCTCGGGGG CCCCTCTCTG GTGTCCGGCC
L P F F V V N V V R A L G G P S L V S G
1021 CCACTTTCTT CGCCCTTAAC TGGCTGGGCT ATGCCAACTC TGCCTTCAAC CCGCTCATCT
P T F L A L N W L G Y A N S A F N P L I
1081 ACTGCCG
Y C

Figure 10. Nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of bovine β 3-adrenoceptor exon 1

3. β -adrenoceptor 유전자 발현양상 분석

가. β 1-adrenoceptor의 northern 분석

β 1-adrenoceptor의 발현 수준이 미약하여 한우 지방에서 total RNA를 추출한 후 poly A RNA를 분리하여 northern 방법으로 β 1-adrenoceptor 유전자 발현을 분석한 결과, transcription size는 약 3.6kb를 나타냈다 (그림 11).

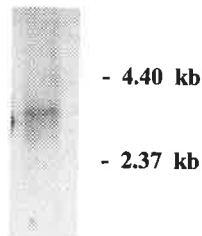


Figure 11. Northern analysis of β 1-adrenoceptor cDNA using poly A RNA in bovine adipose tissue

나. RT-PCR에 의한 한우 β 1- and β 2-AR 발현양상 검정

β 1- 과 β 2-adrenoceptor mRNA의 발현양이 미약할 것으로 판단되어 northern 방법보다 민감한 RT-PCR 방법으로 발현 양을 비교하였다. Cloning된 β 1-과 β 2-adrenoceptor의 염기서열을 바탕으로 RT-PCR에 필요한 primer를 제작하였다. PCR 증폭에 대한 정량을 위하여 control로 β -actin을 이용하였다. RT 반응 후 β 1은 42 cycles, β 2는 33 cycles, β 은 actin 38 cycles의 PCR 반응을 각각 수행하여 발현 양상을 조사하였다. PCR 결과는 정상급여시의 β -adrenoceptor의 발현양을 100%로 보고, β -actin 양으로 normalize하여 절식 및 재급여시의 발현 양을 비교하였다. RT-PCR 결과, 피하지방에서 β 1의 발현이 재급여시 약간 높았고, β 2의 발현은 암컷에서 절식과 재급여시 약간

높았다 (그림 12).

신지방조직에서 $\beta 1$ 의 발현수준이 수컷에서는 정상급여와 절식시보다 재급여시에 현저하게 낮았으나, 암컷에서는 절식시에 발현수준이 낮았다. $\beta 2$ 의 발현은 수컷에서 $\beta 1$ 과 유사하게 정상급여와 절식시보다 재급여시에 낮았으나, 암컷에서 $\beta 2$ 는 정상, 절식 및 재급여시에 발현수준이 유사하였다 (그림 13).

복부지방에서는 정상급여시보다 절식 및 재급여시에 $\beta 1$ 의 발현수준이 약간 낮았으나, $\beta 2$ 에서는 모두 유사한 수준을 보였다 (그림 14).

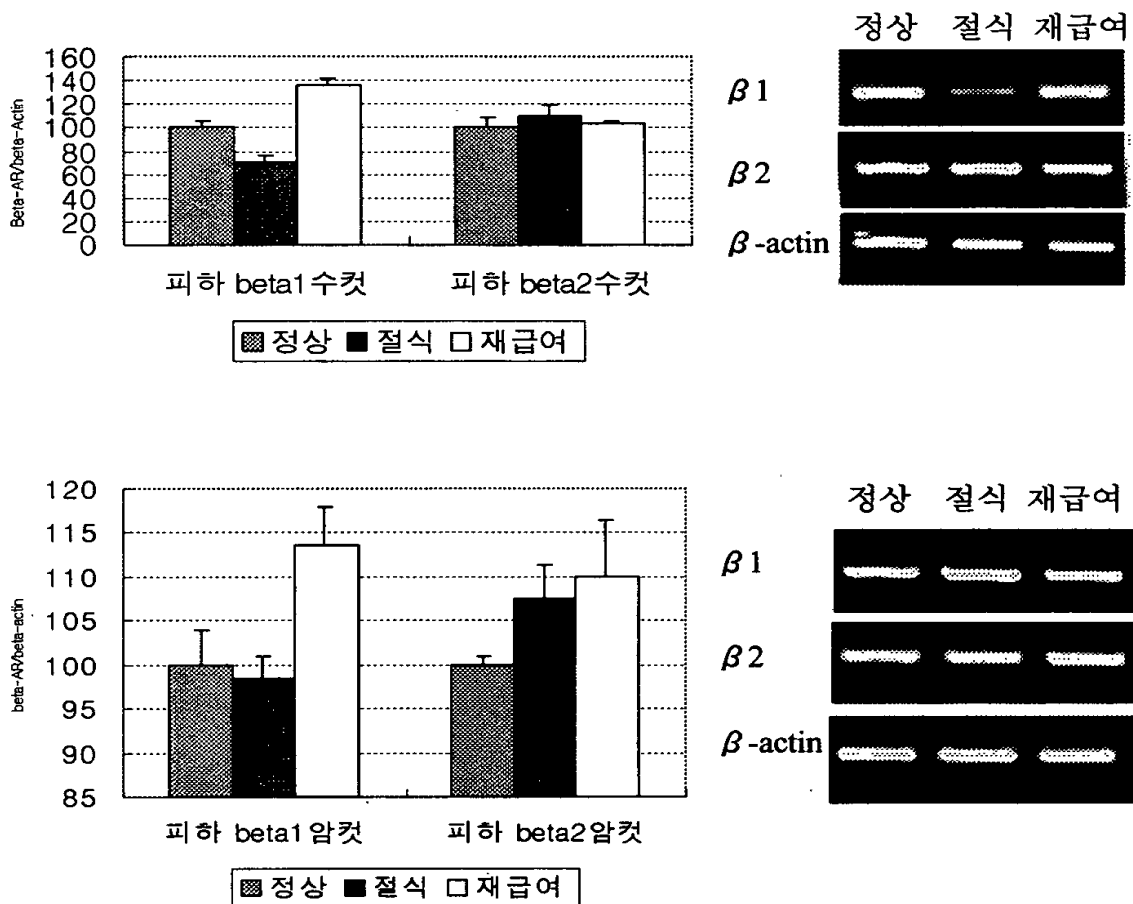


Figure 12. RT-PCR of $\beta 1$ - and $\beta 2$ -adrenoceptor gene expression in subcutaneous adipose tissues of fed-, 48h fasted-, and 6h re-fed-

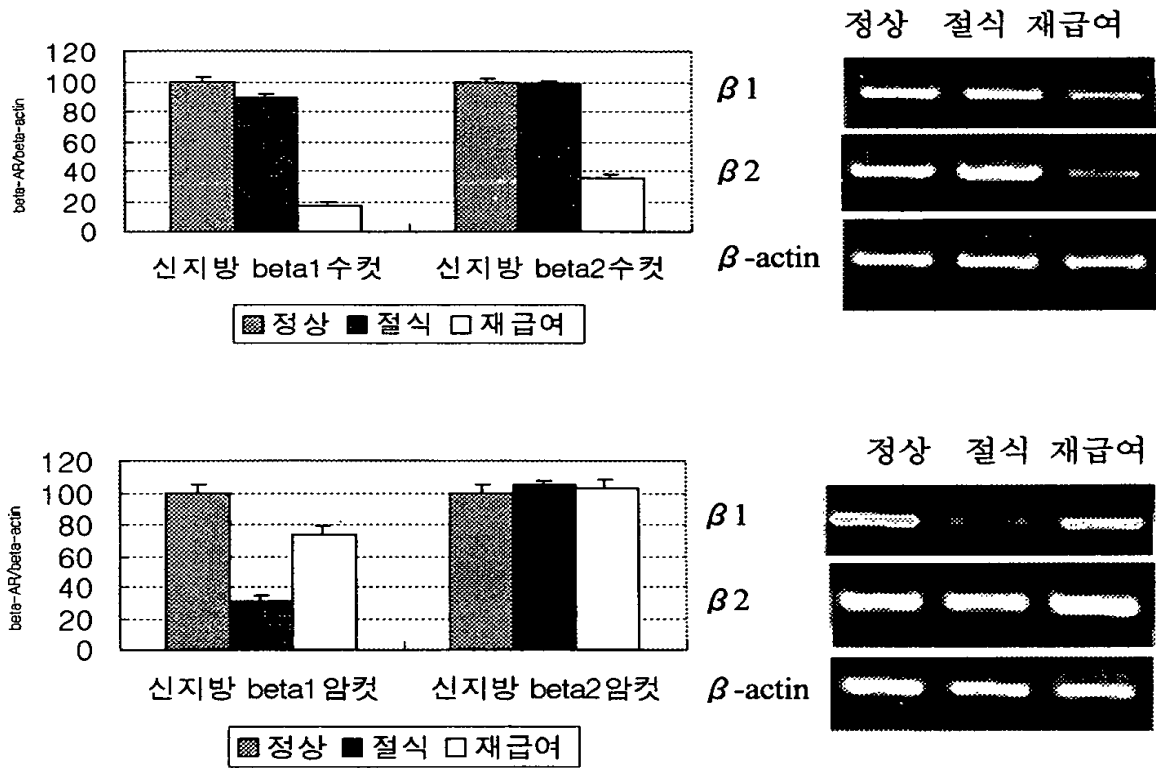


Figure 13. RT-PCR of $\beta 1$ - and $\beta 2$ -adrenoceptor gene expression in perirenal adipose tissues of fed-, 48h fasted-, and 6h re-fed- Hanwoo

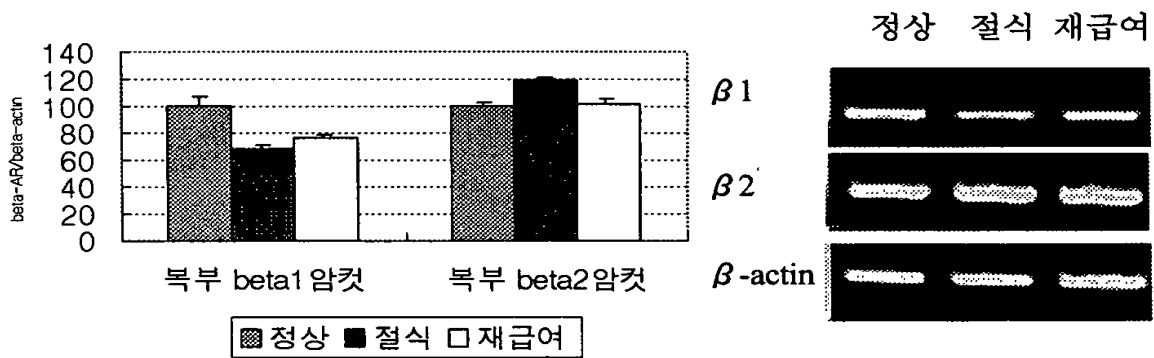


Figure 14. RT-PCR of $\beta 1$ - and $\beta 2$ -adrenoceptor gene expression in abdominal adipose tissues of fed-, 48h fasted-, and 6h re-fed- Hanwoo

다. RT-PCR에 의한 근내지방과 피하지방에서 β -AR 발현양상 검정

한우 5두에서 분리한 근내지방과 피하지방에서 total RNA를 추출하여 (그림 15), RT-PCR로 근내지방과 피하지방에서 β -adrenoceptor 발현양상을 분석하였다.

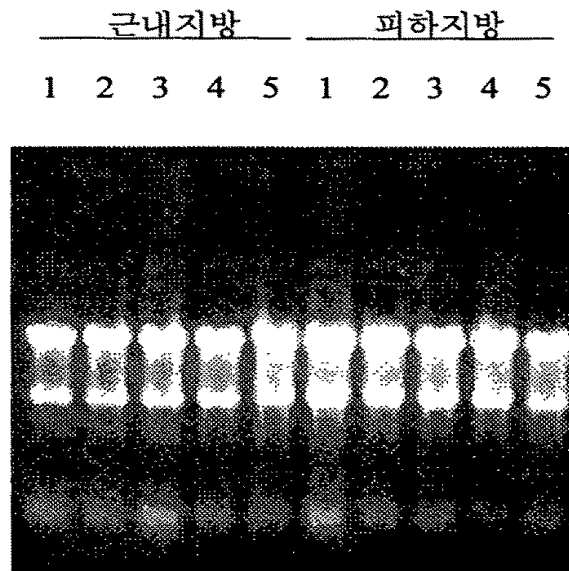


Figure 15. Total RNA electrophoresis

Total RNA 5 μ g을 전기영동한 결과, total RNA는 degradation이 없이 잘 분리되었음을 확인하였다. RT 반응으로 합성한 single stand cDNA를 template로 사용하고, 이미 제작된 β 1-, β 2-, β 3-adrenoceptor와 β -actin primer를 이용하여 근내지방과 피하지방 각각 5 sample들에 대하여 β 1은 42 cycles, β 2는 34 cycles, β 3는 39 cycles, β actin은 39 cycles의 PCR 반응을 수행하였다. 각각의 β actin의 발현을 internal standard로 정량한 후 근내지방의 발현을 100%로 보고 상대적인 발현양을 비교하였다 (그림 16). 오른쪽의 사진은 근내지방과 피하지방에서 adrenoceptor의 발현양상을 전기영동상에서 확인한 사

진이며, 왼쪽 그림은 각각 5 sample들의 발현양상을 분석한 결과의 평균을 보여 주고 있다. $\beta 1$ -, $\beta 2$ -, $\beta 3$ - adrenoceptor의 발현은 근내지방에 비해 피하지방에서 높은 수준을 보였으며, 특히 $\beta 1$ - adrenoceptor의 발현은 근내지방에 비해 피하지방에서 4배 이상 높은 수준을 보였다.

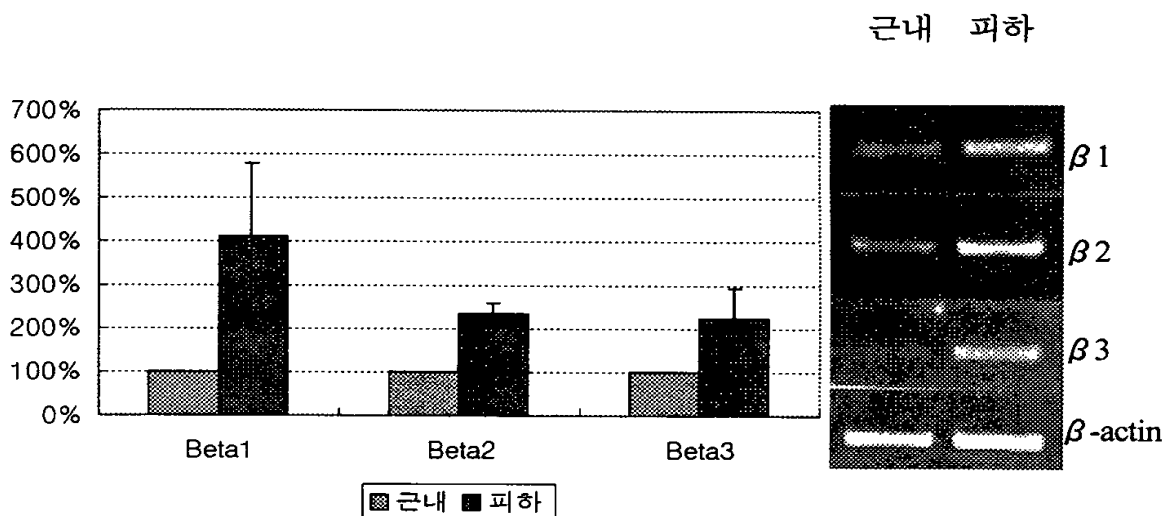


Figure 16. RT-PCR of $\beta 1$ -, $\beta 2$ -, 및 $\beta 3$ -adrenoceptor gene expression in subcutaneous and intramuscular adipose tissues of Hanwoo bulls

제 4절 적 요

본 연구의 목표는 한우 지방조직에서 β -adrenergic receptor (β -AR)의 분포를 조사하고, β -AR 유전자를 cloning하며, 지방조직에서 발현양상을 조사함으로써 향후 근내 지방축적을 조절하는 방안을 개발하는 데 활용하고자 하는 것이다. 이를 위하여 본 연구에서는 한우 지방 조직에서 β -AR의 subtype 분포도를 조사하였다. 한우 β -AR 유전자들은 RT-PCR로 cloning하였

다. 또한 RT-PCR 방법을 이용하여 한우 지방조직에서 β -AR들의 발현양상을 분석하였다.

한우지방세포 membrane fraction을 분리하여 [125 I]-cyanopindolol (ICYP)와 saturation binding 실험 후 그 결과를 scatchard plot으로 transformation하였다. 이러한 결과를 non-linear regressor를 이용하여 Kd와 Bmax를 구하였다. 한우 지방조직의 Kd 값은 하와이우보다 낮았으며, Bmax 값은 하와이우보다 높았다.

β -AR receptor를 cloning하기 위하여 한우 지방조직으로부터 genomic DNA와 total RNA를 분리하였다. 분리한 genomic DNA와 total RNA를 PCR 또는 RT-PCR의 template로 사용하여 β -AR들을 cloning하였다. β 1-AR은 인트론이 없는 유전자이기에 genomic DNA를 이용하여 PCR cloning한 결과, 1,462bp nucleotide와 467개의 아미노산으로 구성된 clone을 확보하였고, 약 3.6kb의 transcript의 크기로 발현되는 것을 확인하였다. 한우의 β 2와 β 3-AR 유전자를 RT-PCR 방법으로 cloning한 결과, 이미 밝혀진 다른 소들의 염기서열과 100% 일치함을 보였다.

한우에서 β -AR들의 발현양상을 조사하기 위하여 피하, 복부, 신지방의 total RNA를 분리하고 RT-PCR을 수행하였다. β -AR들의 발현 수준은 β -actin의 상대적인 발현의 차이로 측정하였다. 피하지방에서 β 1-AR은 정상급여나 절식시보다 재급여시에 발현 수준이 높았으며, β 2-AR은 암컷에서만 정상급여시보다 절식 및 재급여시 발현 수준이 높았다. 반면, β 3-AR은 사료급여구간에 발현 수준의 차이가 없었다. 수컷 신지방의 경우 β 1, β 2, β 3-AR의 발현수준이 사료급여구에 비하여 재급여시에 매우 낮았으며, 암컷의 경우에는 β 1-AR만이 절식시 매우 낮았다. 한우 근내지방과 피하지방에서 β -AR들의 발현을 조사해 본 결과 β 1, β 2, β 3-AR 모두 근내지방보다 피하지방에서 4배 이상의 높은 발현 수준을 보였다. 이러한 결과는 β -AR은

근내지방보다는 피하지방 대사조절에 더 영향을 미칠 것임을 시사하고 있다. 지방조직간에 발현 수준의 차이를 보이고 있으므로 향후 연구를 통하여 지방조직 부위별 지방 축적과 방출 조절 기작의 차이를 규명하여 근내지방 축적기술 개발에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

제 5절 인용문헌

- Atgie, C., F. D. Allaire and L. J. Bukowiecki. 1997. Role of β 1- and β 3-adrenoceptors in the regulation of lipolysis and thermogenesis in rat brown adipocytes. *Am. J. Physiol.* 273:1136-1142.
- Bousquet-Melou, A., J. Galitzky, M. Lafontan and M. berlan. 1995. Control of lipolysis in intra-abdominal fat cells of nonhuman primates: Comparison with human. *J. Lipid. Res.* 36:451-461.
- Bowen, W. P., D. J. Flint and R. G. Vernon. 1992. Regional and interspecific differences in the ligand binding properties of beta-adrenergic receptors of individual white adipose tissue depots in the sheep and rat. *Pharmacol.* 44:681-686.
- Cao, H., C. A. Bidwell, S. K. Williams, W. Liang and S. E. Mills. 1998. Nucleotide sequence of the coding region for the porcine 1-adrenergic receptor gene. *J. Anim. Sci.* 76:1720-1721.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 161:156-159.

- Choo, J. J., M. A. Horan, R. A. Little and N. J. Rothwell. 1990. Effects of the β 2-adrenoceptor agonist, clenbuterol, on muscle atrophy due to food deprivation in the rat. *Metabolism* 39:647-650.
- Frielle, T., S. Lollins, K. W. Daniel, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz and B. K. Kobilka. 1987. Cloning of the cDNA for the human β 1-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:7920-7924.
- Galitzky, J., C. Carpene, A. Bousquet-Melou, M. Berlan and M. Lafontan. 1995. Differential activation of β 1-, β 2- and β 3-adrenoceptors by catecholamines, in white and brown adipocytes. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 9:324-331.
- Kim, Y. S., R. D. Sainz, P. Molenaar and R. J. Summers. 1991. Characterization of β 1- and β 2-adrenoceptors in rat skeletal muscles. *Biochem. Pharmacol.* 42:1783-1789.
- Mcneel, R. L. and H. J. Mersmann. 1995. β -adrenergic receptor subtype transcripts in porcine adipose tissue. *J. Anim. Sci.* 73:1962-1971.
- Moloney, A. P. R. J. Allen and V. Tarrat. 1991. Influence of β -adrenergic agonists and similar compounds on growth. In: A. M. Pearson and T. R. Dutson (Ed.) *Growth Regulation in Farm Animals.* Elsevier Applied Science, London and New York. 455-514.
- Padbury, J. F., Y. Tseng and J. A. Waschek. 1995. Transcription initiation is localized to a TATA less region in the ovine 1 adrenergic receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 211:254-261.
- Pietri-Rouxel, F., G. Lenzen, A. Kapoor, M. F. Drumare, P. Archimbault, A. D. Strosberg and B. S. Manning. 1995. Molecular cloning and pharmacological characterization of the bovine β 3-adrenergic receptor. *Eur. J. Biochem.*

230:350-358.

- Portillo, M. P., A. S. Del Barrio, M. A. Garcia-Calonge and J. A. Martinez. 1996. Desensitization effect of in vivo treatment with metaproterenol on $\beta 1$, $\beta 2$ and $\beta 3$ -adrenergic responsiveness in rat adipocytes. *Life Sci.* 58:405-414.
- Shimonura, H. and A. Terada. 1990. Primary structure of the rat $\beta 1$ - adrenergic receptor gene. *Nucleic Acids Res.* 18:4591.
- Stroberg, A. D. 1993. Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. *Prot. Sci.* 2:1198-1209.

제 4 장 한우 지방조직에서 stearoyl-CoA desaturase 에 대한 연구

제 1절 서 설

한우 고급육 생산을 위해서는 근내지방도가 높은 것뿐만 아니라 지방산의 조성도 매우 중요하다. 쇠고기의 독특한 풍미는 불포화지방산 함량이 영향을 미친다고 알려져 있는데 한우가 다른 품종과는 달리 불포화지방산, 특히 oleic acid 함량이 많은 것으로 알려져 있다. 한우육의 지방산 분석결과를 보면 대체로 불포화지방산의 함량이 높고, 포화지방산의 함량이 낮으며 고도 불포화지방산/포화지방산의 비율이 높게 나타나며, 이러한 지방산의 조성이 한우육의 맛에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 쇠고기의 독특한 맛과 관련하여 단일불포화지방산인 oleic acid가 가장 중요한 요인으로 보고되고 있는데, 고기내 oleic acid의 증가는 고기의 기호성과 쇠고기에 대한 사람의 지각력에 영향을 미친다 (Chang 등, 1992; Melton, 1982). 쇠고기 등심의 oleic acid 함량이 높으면 일반적으로 맛에 대한 관능평가에서 높은 점수를 얻으며, 등심의 다즙성 점수에서도 myristic acid, palmitic acid의 함량과는 부의 상관성이 있고, 포화지방산에 대한 불포화지방산의 비율과는 정의 상관성이 있는 것으로 보고되고 있다(Terrell 등, 1969; Waldman 등, 1970, 1986). 쇠고기의 기호성도 oleic acid 함량증가에 의해서 개선될 수 있으며 인간에 있어 oleic acid의 섭취는 혈액내 유해콜레스테롤로써 알려진 저밀도 단백콜레스테롤의 함량을 떨어뜨리거나 증가시키지 않는 것으로 알려져 있다. 이러한 사실은 건강을 위해 stearic acid와 같은 포화지방산보다는 oleic acid 함량이 높은 쇠

고기가 더 건강에 좋다는 것을 의미하는 것이다. Stearoyl-CoA desaturase (SCD)는 포화지방산을 불포화지방산으로 전환하는데 관여하는 효소이다. SCD는 stearic acid, palmitic acid를 w-9계열의 단일불포화지방산으로 전환하는 Δ^9 -desaturase이다 (Enoch 등, 1976; Lee 등, 1996; Shimakata 등, 1972; Strittmater 등, 1974).

지방조직에서 SCD 유전자의 발현양상을 정확히 이해하고 활용한다면 불포화 지방산 함량이 높은 고품질의 한우고급육을 생산하는데 이용할 수 있을 것이다. 본 과제는 한우 지방조직에서 SCD 효소 특성을 규명하고, 아직 밝혀지지 않은 한우 SCD 유전자를 cloning하며, 여러 지방조직에서 SCD 유전자의 발현양상을 조사함으로써 고급육 생산을 위한 기초 자료를 확보하기 위하여 수행하였다.

제 2절 재료 및 방법

1. Stearoyl-CoA desaturase (SCD) 효소 분석

가. 공시 한우 및 microsomal fraction 준비

실험에 사용된 한우들은 도축 시까지 사료를 정상적으로 공급한 개체 (정상급여), 도축 전 48시간동안 절식시킨 개체 (절식), 그리고 48시간 절식후 도살 전 6시간에 사료를 재급여한 개체 (재급여)의 3가지 사료 급여구에서 각각 수컷 1두, 암컷 2두를 이용하였다. 외래종은 Hawaii 대학교에서 제공하였다.

이들의 지방조직은 LG Mixer M-804로 homogenization하였다. Microsome을 분리하기 위한 원심분리는 HANIL Supra21K centrifuge와 BACKMAN XL-90 ultracentrifuge를 이용하였다. 단백질과 NADH solution 정량 및 stearoyl-CoA

desaturase의 assay는 Shimadzu UV-1601 UV/vis spectrophotometer를 사용하였다. SDS-PAGE는 Mini Trans Blot Module (BioRad)를 사용하였다. NADH와 tris 등 분석에 사용된 화합물은 Sigma에서 구입하였다.

지방조직의 microsomal fraction은 Cameron 등 (1994)의 방법으로 아래와 같이 준비하였다. 도살후 지방세포를 즉시 분리하여 3 volume의 homogenization buffer (0.25M Sucrose, 0.01M potassium phosphate, 1mM EDTA와 1mM DTT, pH 7.4)에서 homogenization시킨 후, 5,000g에서 15분간 원심분리하고 상등액을 다시 30분동안 7,3000xg에서 원심분리하였다. Microsomal fraction은 위의 상등액을 104,000xg에서 60분동안 원심분리한 후 pellet을 취해 준비하였다. Microsomal pellet은 3ml의 homogenization buffer에서 suspension을 만든 후 액체 질소에서 냉동시킨 후, -70℃에 보관 후 추후 효소활성 측정에 이용하였다.

나. SCD 효소 활성 측정

1) NADH의 extinction coefficient 측정

NADH를 8mg을 1ml의 100mM tris-HCl (pH7.4)에 녹인 후 UV/vis spectrometer로 340nm에서의 흡광도(absorbance)를 재고, extinction coefficient ($\epsilon_{340} = 6,200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)를 이용해서 10mM 용액을 만들었다. NADH는 340nm에서 extinction coefficient(ϵ_{340})가 $6,200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 이지만, microsomal protein을 함유한 assay 조건에서의 값을 확인하기 위해 측정하였다. 효소 반응이 미량의 NADH($4 \mu\text{M}$) 고갈로 종료되도록 하여, 그때까지 변화된 340nm에서 흡광도(absorbance)를 측정하고 Beer-Lambert의 법칙을 이용하여 효소반응조건에서의 ϵ_{340} 을 구하였다.

2) Enzyme kinetics parameter (K_m 과 V_{max}) 측정

Buffer는 100mM tris-HCl (pH7.4)를 사용했다. 전체 반응물은 1ml을 사용하였다. 정상, 절식, 재급여에 대한 비교를 위해 buffer에 0.2mM NADH와 일정량의 피하지방조직 microsomal protein을 첨가하고 마지막으로 기질인 stearyl-CoA를 5~67 μ M내에서 첨가한 후 잘 섞은 뒤에 340nm에서 처음 1분간 OD값의 차이를 읽었다. 일단 개봉한 전체 stearyl-CoA(5mg)를 1ml의 100mM tris-HCl (pH7.4)에 녹여서 5mM batch solution을 만든 후 enzyme assay를 위해서 같은 buffer를 사용해서 1mM solution으로 만들었다. 각 농도에서 2반복을 했고 그때의 initial velocity를 Michaelis-Menten equation에 대입하여 kinetics parameter(K_m 과 V_{max})를 구하였다. 이를 위해서 컴퓨터용 PC 프로그램인 GraFit을 사용하였다. 부위별 비교를 위해 buffer에 0.2mM NADH와 20 μ l의 부위별 microsomal protein을 첨가하고 마지막으로 기질인 stearyl-CoA를 20 μ M 첨가한 후 잘 섞은 뒤에 340nm에서 처음 1분간 OD값의 차이를 읽었다. 모두 2반복을 했다. 각 농도에서 구한 initial velocity를 Michaelis-Menten 식에 대입하여 kinetics parameter (K_m 과 V_{max})를 계산하였다.

3) 지방조직 부위별 desaturase 효소 활성 측정

각 부위별 microsomal protein 1mg이 1분당 몇 μ mole의 stearate를 oleate로 불포화시키는가를 기준으로 SCD의 활성을 측정하였다.

2. SCD cDNA cloning

가. SCD cDNA cloning

1) 한우 SCD cDNA cloning을 위한 RT-PCR

한우 SCD cDNA는 RT-PCR을 이용하여 아래와 같이 cloning하였다. 흰쥐

(Thielde 등, 1986)와 사람 (Li 등, 1994)의 SCD cDNA sequence를 PCGENE 프로그램을 이용하여 homology를 비교한 후 100% identity를 보이는 부분에서 primer를 아래와 같이 제작하였다(그림 1).

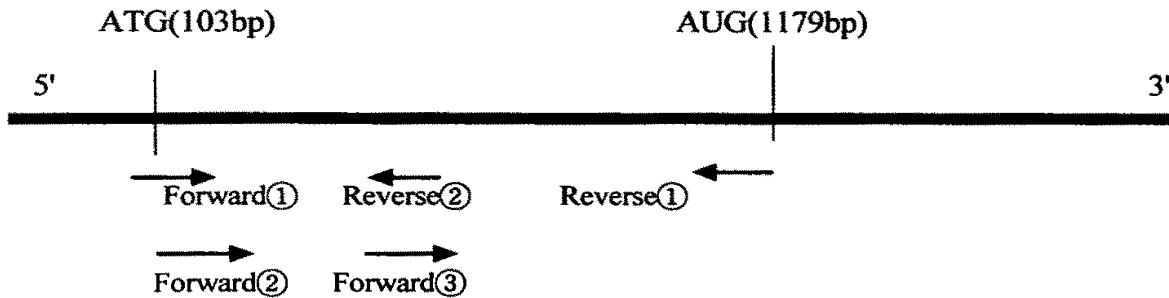


Figure 1. Primer design for RT-PCR of Hanwoo SCD cDNA

Forward① : 5'-CCACATGCTCCAAGAGATC-3'

Forward② : 5'-ATGCCGGCCCACATGCTCCAA-3'

Forward③ : 5'-CCACAATTCCCGACGTGGCT-3'

Reverse① : 5'-TCAGCTACTCTTGTGGCTC-3'

Reverse② : 5'-CGCACAAGCCAACCCACGT-3'

Reverse① primer를 이용하여 한우 근간지방 및 피하지방의 total RNA를 template로 하여 reverse transcription 반응을 수행하였다. Reverse transcriptase 로는 SuperscriptII Pharmacia)를 사용하고 37°C에서 2시간 동안 반응하였다. a primer set (forward①/reverse②)와 b primer set(forward②/reverse②)를 이용, PCR 반응 (95°C, 5min; 95°C 45sec, 50°C 45sec, 72°C 1min 30 cycles; 72°C, 7min)을 수행하였다. PCR 결과 예상했던 600bp짜리 PCR product를 확인하였다. 5'쪽의 나머지 부분의 클로닝을 위하여 위와 동일한 방법으로 RT 반응을

수행한 후 c primer set (forward③/reverse①)를 이용, PCR을 수행하여 예상한 550bp PCR product를 얻었다.

2) 한우 SCD cDNA TA-cloning 및 plasmid 분리

염기서열 분석을 위하여 PCR clone들을 각각 TA cloning하였다. 1% agarose gel에서 600bp와 550bp짜리 clone들을 각각 gel elution kit(Qiagen)을 이용하여 elution한 다음 pGEM-Teasy vector(Promega)에 ligation시킨 후 *E. coli* Top 10F'에 electroporation 방법으로 transformation하였다. 이를 X-gal/IPTG LB agar plate에 깔아 blue-white screening을 수행하여 white colony를 선발한 후 plasmid miniprep kit(Qiagen)을 사용하여 plasmid를 추출하고 이를 pKC로 명명하였다. Insert 삽입 여부를 확인하기 위하여 5개의 white colony에서 추출한 plasmid를 EcoRI으로 digestion하였다.

나. SCD cDNA 염기서열 분석

Cloning한 한우 SCD cDNA를 ABI Prism™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(PE Applied Biosystems)를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 염기서열 분석 결과를 GenBank data와 homology 비교하여 한우 SCD cDNA임을 확인하였다. Nucleotide sequence를 아미노산으로 translation한 후, 아미노산 서열을 사람, 생쥐, 흰쥐 및 돼지 SCD의 아미노산 서열과 비교하였다.

3. SCD 유전자 발현양상 분석

가. Northern에 의한 SCD 유전자 발현 양상 분석

정상, 절식, 및 재급여한 암컷과 수컷 한우로부터 지방조직을 채취하고

total RNA를 분리하여 SCD mRNA의 발현양상을 northern 방법으로 조사하였다. Total RNA는 guanidium thiocyanate/ phenol/chloroform 방법 (Chomczynski와 Sacchi, 1989)으로 추출하였다. Formaldehyde-denaturing 1% agarose gel을 이용하여 total RNA를 size별로 분리하였다. 모세관 법에 의해 agarose gel 상의 RNA를 나일론 membrane에 전이시킨 다음 UV-crosslinker을 사용하여 RNA를 나일론 membrane에 영구적으로 부착시켰다. 한우 SCD cDNA를 random-priming 법에 의하여 ^{32}P 로 표식시킨 후 DNA내로 들어가지 않은 nucleotide를 nucleotide removal kit (Qiagen, Germany)로 제거한 뒤 사용하였다. 나일론 membrane을 6x SSC 용액으로 적신 다음 hybridization bottle에 넣은 뒤 formamide pre-hybridization 용액 (5x SSC, 5x Denhardt용액, 50% formamide, 1% SDS, 100 ug/ml salmon sperm DNA)을 넣었다. 42°C에서 2시간 이상 반응 후 pre-hybridization 용액을 따라 버리고 hybridization 용액 (조성은 pre-hybridization용액과 동일)을 넣은 뒤 42°C에서 밤샘 반응하였다. Membrane에 결합한 과도의 방사선 원소를 제거하기 위해서 2x SSC/0.1% SDS로 두 번 실온에서 각각 20분씩 membrane을 행군 뒤 membrane 상의 RNA에 비특이적으로 결합한 probe를 제거하기 위해서 high-stringency 용액인 1x SSC/0.1% SDS로 60°C에서 두 번 30분씩 행구었다 (Sambrook 등, 1989; Thomas, 1980). 행구어진 나일론 membrane을 랩으로 싼 다음 X-ray 필름을 얹어 -70°C에서 밤샘 exposure한 다음 X-ray 필름을 현상하였다.

나. RT-PCR에 의한 SCD 발현 양상 조사

Cloning한 SCD 유전자의 염기서열을 바탕으로 RT-PCR을 위한 primer를 제작하였다. 각 primer의 염기서열은 아래와 같고 약 640bp의 증폭 산물을 얻을 수 있도록 제작하였다.

SCDF : 5'-TACACAACCACCACCACCATCAC-3'

SCDR : 5'-GAAGCACAACAACAGGACACCAG-3'

Total RNA를 template로 RT 반응 (total RNA 3 μ g, oligo dT primer 2 μ l, 5 \times buffer 2 μ l, dNTP (10mM) 1 μ l, MMLV RT 1 μ l)을 수행하여 single strand cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 이용하여 다양한 조건에서 PCR을 수행하여 가장 증폭이 잘 되는 PCR 조성 (cDNA template 3 μ l, 10 \times buffer 1 μ l, dNTP (10pmol) 1.6 μ l, DMSO 1 μ l, SCDF (10pmol) 0.5 μ l, SCDR (10pmol) 0.5 μ l, Ex Taq 0.1 μ l, H₂O 11.3 μ l)과 PCR 조건 (94 $^{\circ}$ C 1min \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 15sec \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 1min \rightarrow 58 $^{\circ}$ C 30sec \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 40sec)을 확립하였다. 위와 같은 조성과 조건에서 PCR을 수행한 결과, 약 640bp의 예상된 size의 band를 얻을 수 있었다. 약 31 cycle에서 증폭 효율이 낮아짐을 보이고 33 cycle 이상부터는 증폭 산물이 포화를 이루기 때문에, 적절한 cycle 숫자를 27 cycle로 결정하여 PCR을 수행하였다. 이러한 조건으로 RT-PCR을 수행하여 근내지방과 피하지방에서 SCD 유전자의 발현양상을 분석하였다.

PCR 결과로 나온 clone이 SCD cDNA임을 확인하기 위하여 PCR product를 elution하여 pGEM-Teasy vector에 ligation하였다. Ligation mixture를 *E. coli* Top 10F'에 electroporation 방법으로 transformation 후 x-gal/IPTG LB agar plate에 깔아 blue-white screening을 수행하였다. White로 보이는 *E. coli*를 template로 사용하고, SCD PCR에 이용한 primer를 이용하여 colony PCR 방법으로 vector내 insert의 insertion을 확인하였다. Insertion이 확인된 *E. coli*를 접종한 후 plasmid preparation kit(Qiagen)을 이용하여 plasmid를 분리하였다. BigDye Terminator를 이용하여 sequencing reaction을 수행후 ABI 377을 이용한 automatic sequencing 수행하여 insert가 SCD의 증폭산물임을 확인하였다.

제 3절 결과 및 고찰

1. Stearoyl-CoA desaturase (SCD) 효소 분석

SCD는 세포내 microsome의 막에 존재하는 복합체 효소로서 지방산 전환 (desaturation)은 복합체의 마지막 단계에서 일어난다 (그림 2). 따라서 이 효소의 활성(activity) 조사는 전체 복합체가 들어있는 microsome을 분리하여 수행해야 한다.

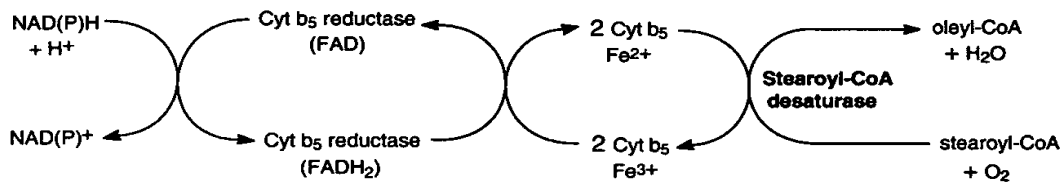


Figure 2. Electron transport pathway during desaturation of fatty acid by Stearoyl-CoA desaturase

가. Microsomal fraction 준비

한우 갈비 6번과 7번 사이에서 피하지방과 근간지방을 취했다. SCD는 돼지 등의 단위가축에서는 간에서 높은 활성도를 보이는 반면에 반추가축에서는 지방조직에서 높은 활성도를 보인다. 따라서 한우의 SCD 분석법을 확립하기 위해서 지방조직을 우선적으로 이용하였다.

Microsomal fraction은 St. John등(1991)의 방법으로 준비하였다. 일정량의 지방조직 (표 1, 2)을 50ml centrifuge tube에 homogenization buffer와 함께 넣고 tissue grinder로 13,500rpm에서 조직을 파쇄했다. 파쇄된 조직을 4,500xg에서 5분간 원심분리했다. 여기서 얻은 상등액을 17,300xg에서 30분간 초원심

분리했다. Microsomal fraction은 상등액을 다시 104,000xg (33K rpm)에서 60분간 초원심분리해서 얻은 pellet을 homogenization buffer에 suspension해서 얻었다. 남은 상등액은 105,000xg (35K rpm)에서 60분간 다시 한번 초원심분리해서 pellet을 얻었고, pellet을 homogenization buffer에 녹였다. 35K의 상등액 (S)과 두 suspension (33K와 35K)은 효소활성측정을 위해 -70℃에 저장했다.

Table 1. Amount of adipose tissues used for microsomal preparation

급여 구분	수 컷 (♂)	암 컷 1 (♀1)	암 컷 2 (♀2)
정 상	35 g	35 g	22 g
절 식	35 g	35 g	29 g
재 급여	35 g	35 g	14 g

Table 2. Amount of various adipose tissues used for microsomal preparation

구 분	피 하	근 간	복 부	신
암컷1 재급여	35 g	19 g	35 g	29 g
Hawaii 2	6.5 g	×	×	10.5 g

분리한 microsomal protein의 양을 Bradford method를 이용하여 조사했다. Bovine serum albumin (BSA) standard에 대한 595nm에서 OD값이 표 3에 나타나 있다. 또한 microsomal protein을 BSA 대신 2, 4 μ l씩 넣은 후 읽은 OD_{595nm}값이 표 3에 나타나 있다. BSA OD값과 protein양을 이용하여 standard curve를 얻었다 (그림 3). Standard curve로부터 분리한 microsomal protein의 2 μ l와 4 μ l가 595nm에서 흡수한 OD값을 그림 3의 직선에 대입해서 구한 각 조직의 단백질 양은 표 4, 5와 같다.

Table 3. Assay conditions for determination of microsomal protein contents

Protein, ug	0	2	4	6	8	10	?	?
BSA, ul (1ug/ul)	0	2	4	6	8	10	0	0
Microsomal protein, ul	0	0	0	0	0	0	2	4
H2O, ul	800	798	796	794	792	790	798	796
Dye, ul	200	200	200	200	200	200	200	200
OD595	0.447	0.541	0.633	0.720	0.874	0.920	0.543	0.617
net OD	0	0.094	0.186	0.273	0.427	0.473	0.096	0.170

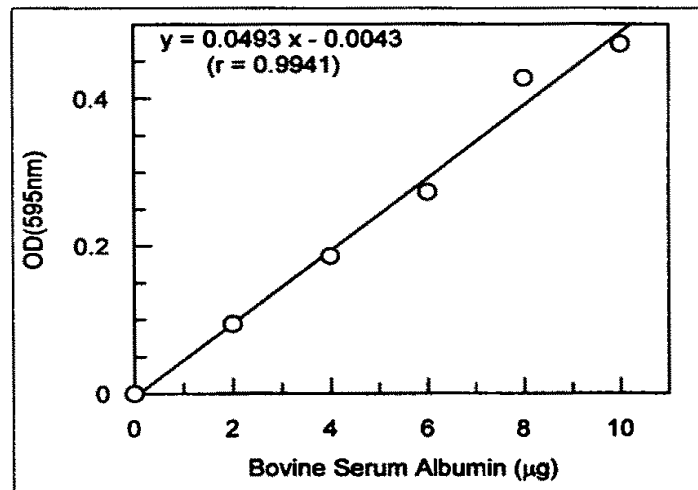


Figure 3. Standard curve of bovine serum albumin by Bradford method

Table 4. Microsomal protein contents prepared from adipose tissues

급여 구분	수컷 (♂)	암컷 1 (♀1)	암컷 2 (♀2)
정상	3.0 mg/ml	1.9 mg/ml	2.0 mg/ml
절식	0.96 mg/ml	2.5 mg/ml	2.1 mg/ml
재급여	2.5 mg/ml	1.7 mg/ml	1.5 mg/ml

Table 5. Microsomal protein contents prepared from various adipose tissues

구분	피하	근간	복부	신
암컷1 재급여	1.7 mg/ml	2.5 mg/ml	2.3 mg/ml	1.2 mg/ml
Hawaii 2	1.3 mg/ml	×	×	1.8 mg/ml

위에서 얻은 33K pellet suspension, 35K pellet suspension 및 35K supernatant (S) microsome protein 5ul (5ug)을 SDS-PAGE상에서 전기영동을 한 결과, 공통적인 여러 분자량의 band를 확인하였다 (그림 4). 그중 40kD band가 문헌조사에 의하면 stearyl-CoA desaturase (SCD)로 추정되며, 33K suspension에서 40kD band가 가장 짙게 나타났다. 정상, 절식, 재급여의 마취한 피하 지방 조직의 microsomal protein 5ul (5ug)을 SDS-PAGE상에서 전기영동을 한 결과, 공통적인 여러 분자량의 band를 확인하였다 (그림 5).

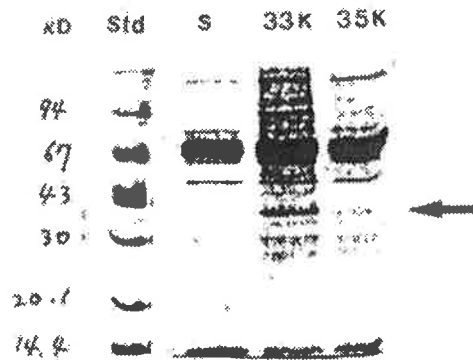


Figure 4. SDS-PAGE of microsome protein fractions isolated from adipose tissues of Hanwoo. Microsome protein fractions isolated from adipose tissues of Hanwoo by centrifugation (33,000 rpm; 33K or 35,000rpm; 35K) were dissolved in buffer and subjected to SDS-PAGE. The supernatant of 35K after centrifugation was also subjected to SDS-PAGE. Standard (Std): molecular weight marker.

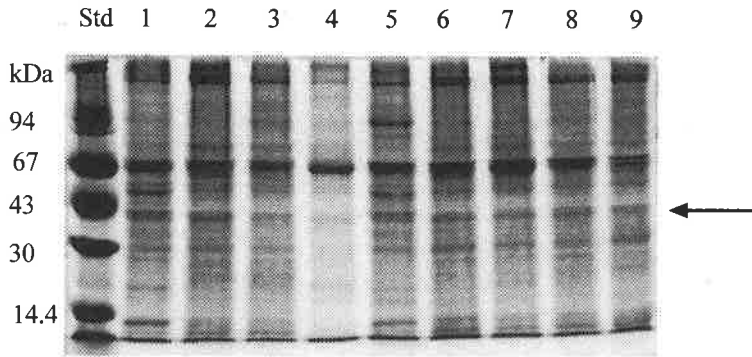


Figure 5. SDS-PAGE of microsome protein fractions isolated from adipose tissues of Hanwoo. Microsome protein fractions were subjected to SDS-PAGE. The expected location of SCD band was indicated by arrow. Standard (Std), molecular weight marker; 1, male normal상; 2, female1 normal; 3, female2 normal; 4, male fasted; 5, female1 fasted; 6, female2 fasted; 7, male refed; 8, female1 refed; 9, female2 refed.

나. SCD 효소 활성 분석

1) 분광기를 이용한 SCD 효소 존재 확인

SCD는 포화 지방산을 불포화시키는 multi enzyme system의 마지막 단계에서 작용하는 효소이며 microsome의 막에 존재하므로 activity를 측정하기 위해서는 전체 system이 들어있는 microsomal protein을 이용해야 한다. 그러나 이 효소의 기질인 stearyl-CoA와 생산물인 oleyl-CoA가 분광기를 이용해서는 확인되지 않으므로 multi enzyme system에서 한 단계 앞에 있는 cytochrome b₅의 산화 반응을 UV/vis 분광기를 이용하여 SCD의 존재를 간접적으로 확인했다. Cytochrome b₅는 415nm에서 가장 강하게 빛을 흡수하고 그 세기가 환원과 산화에 따라 크게 다르므로 3분간 OD_{415nm}의 감소로 반응의

진행을 관찰했다. 실험조건은 표 6에, 실험결과는 그림 6에 각각 제시되어 있다. Microsome fraction 33,000 rpm (33K) pellet, 35,000rpm (35K) pellet 및 35,000rpm의 상등액을 (S) 이용하였을 때, 33K의 fraction에서 가장 높은 SCD 활성이 나타났다. 그림 4와 그림 5에서 40kD band가 33K pellet에서 가장 뚜렷함을 고려할 때에, 40kD band가 SCD protein일 가능성이 높다. 33K pellet suspension양을 표 7의 조건으로 점진적으로 증가시키면서 SCD의 활성을 조사하였다. 반응시 33K solution의 양을 25ul, 50ul, 75ul로 증가시켰을 때, OD_{415nm} 감소가 증가함으로써 SCD의 활성이 점진적으로 높아진다는 것을 확인하였다 (그림 7).

Table 6. Assay of SCD activity with the addition of S, 33K, and 35K fractions

sample \ Item	S	33K	35K
100 mM Tris-HCl (pH 7.4), ul	830	830	830
10 mM NADH, ul	20	20	20
1 mM stearyl-CoA, ul	50	50	50
Microsomal protein, ul	100	100	100

Table 7. Assay of SCD activity with the increase of 33K amount

Item \ 33K volume, ul	25	50	75
100 mM Tris-HCl (pH 7.4), ul	905	880	855
10 mM NADH, ul	20	20	20
1 mM stearyl-CoA, ul	50	50	50
Microsomal protein, ul	25	50	75

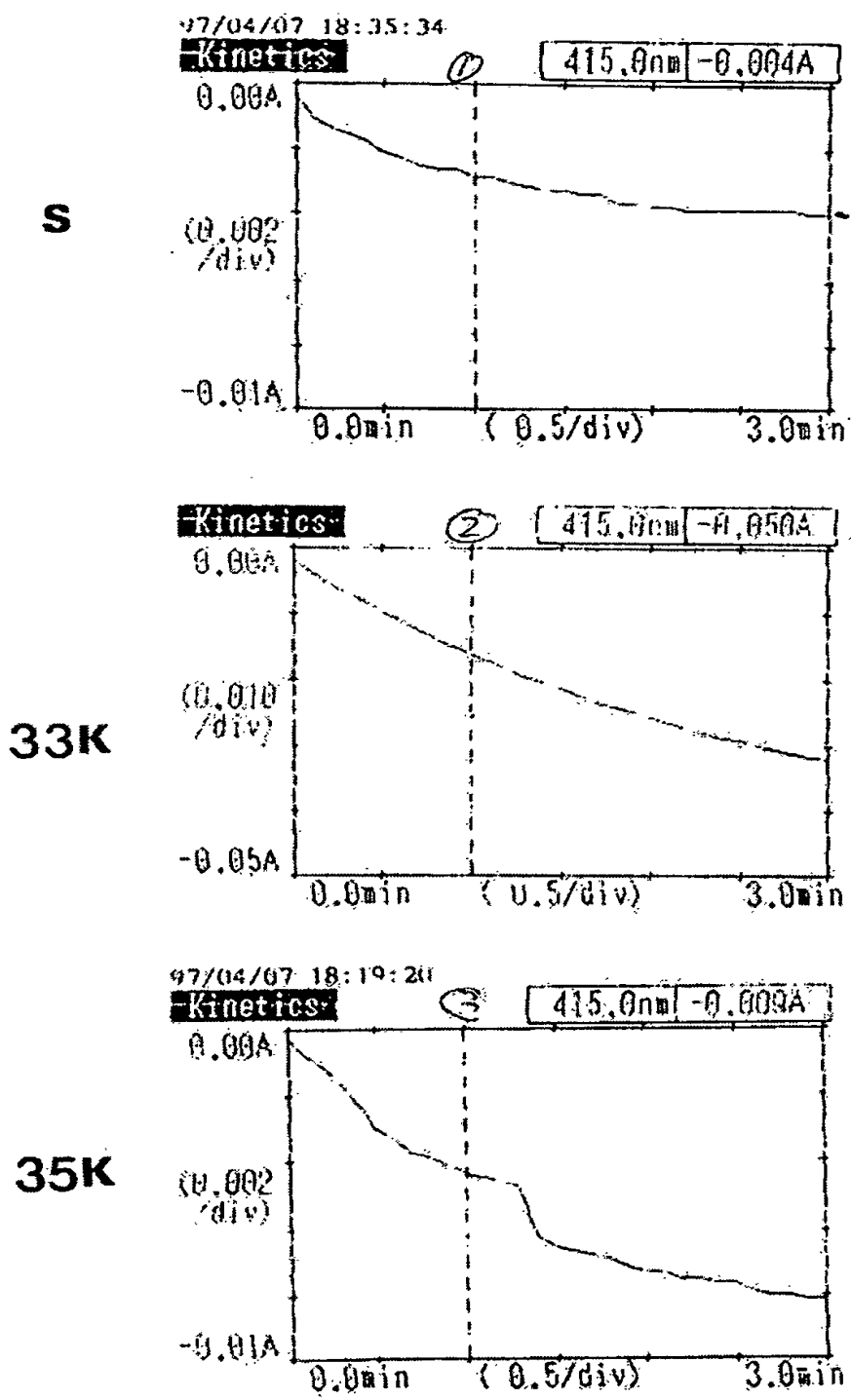


Figure 6. SCD activity in intermuscular adipose tissues of Hanwoo with the addition of S, 33K, and 35K fractions

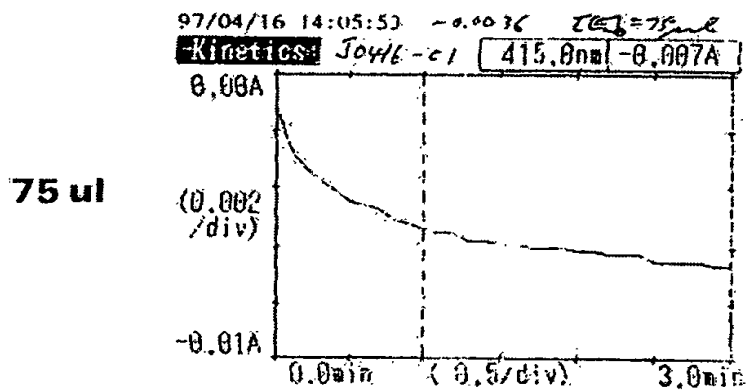
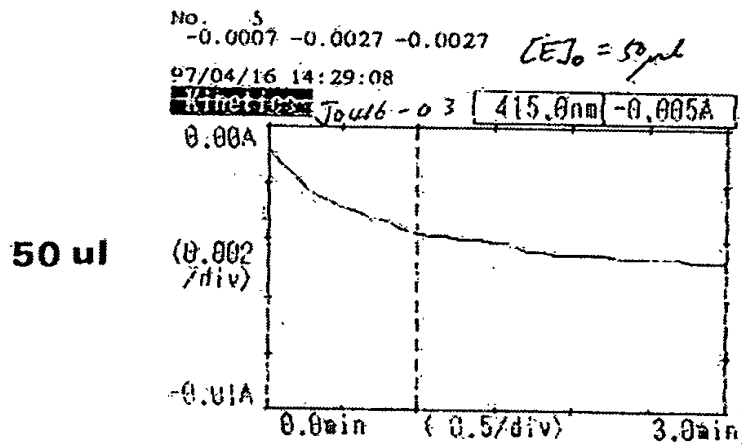
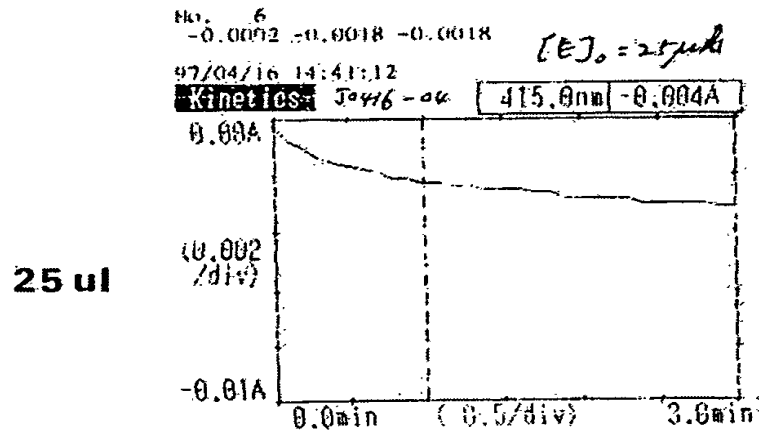


Figure 7. SCD activity with the increase of amount of 33K fractions. The rate of decrease of OD415nm was increased as the increase of 33K amount (25ul, 50ul, 75ul).

2) NADH의 extinction coefficient 측정

NADH를 8mg을 100mM tris-HCl (pH7.4)에 녹인 후 340nm에서 흡광도 (absorbance)를 재고, extinction coefficient($\epsilon_{340} = 6,200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)를 이용해서 10mM 용액을 만들었다. NADH는 340nm에서 extinction coefficient(ϵ_{340})가 $6,200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 이지만, microsomal protein을 함유한 assay 조건에서의 값을 확인하기 위해 측정하였다. 효소 반응이 미량의 NADH($4 \mu\text{M}$) 고갈로 종료되도록 하여, 그때까지 변화된 340nm에서 흡광도(absorbance)를 측정하고 Beer-Lambert의 법칙을 이용하여 효소 반응조건에서의 ϵ_{340} 을 구하였다(그림 8). 여기서 구한 extinction coefficient값은 $7250 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 였다.

Beer-Lambert의 법칙

$A = \epsilon \cdot c \cdot l$, 여기서 A는 흡광도, ϵ 는 extinction coefficient, c는 농도, l은 빛이 통과하는 cuvette의 길이이다.

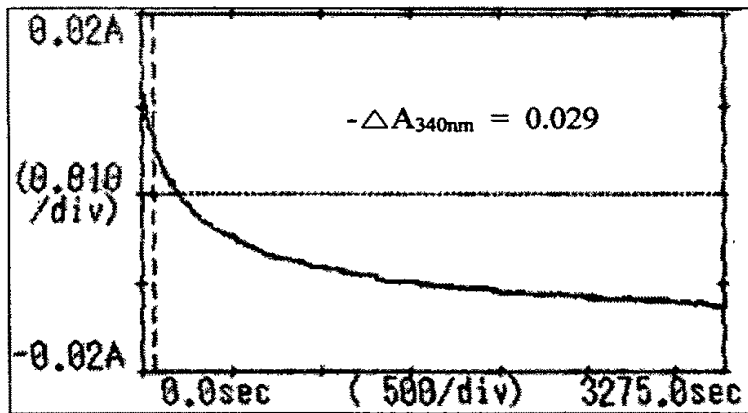


Figure 8. OD_{340nm} change by microsomal protein $20 \mu\text{l}$, stearyl-CoA $20 \mu\text{M}$ and NADH $4 \mu\text{M}$

3) Enzyme kinetics parameter (K_m 과 V_{max}) 측정

전체 반응물은 1ml을 사용하였다. 정상, 절식, 재급여구에 대한 비교를 위해 buffer에 0.2mM NADH와 일정량의 피하지방조직 microsomal protein을 첨가하고 마지막으로 기질인 stearyl-CoA를 5~67 μ M내에서 첨가하고 잘 섞은 뒤에 340nm에서 처음 1분간 OD값의 차이를 읽었다. 일단 개봉한 전체 stearyl-CoA(5mg)를 1ml의 100mM tris-HCl (pH7.4)에 녹여서 5mM batch solution을 만든 후 enzyme assay를 위해서 같은 buffer를 사용해서 1mM solution으로 만들었다. 각 농도에서 2반복을 했고 그때의 initial velocity를 Michaelis-Menten equation에 대입하여 kinetics parameter(K_m 과 V_{max})를 구하였다. 이를 위해서 컴퓨터용 PC 프로그램인 GraFit을 사용하였다.

$$v = \frac{V_{max} \cdot K_m}{K_m + [S]}$$

지방조직 부위별 비교를 위해 buffer에 0.2mM NADH와 20 μ l의 지방조직 부위별 microsomal protein을 첨가하고 마지막으로 기질인 stearyl-CoA를 20 μ M 첨가한 후 잘 섞은 뒤에 340nm에서 처음 1분간 OD값의 차이를 읽었다. 모두 2반복을 했다. 각 농도에서 구한 initial velocity를 Michaelis-Menten 식에 대입하여 구한 kinetics parameter(K_m 과 V_{max})는 표 8과 같다.

Table 8. Kinetics parameter of SCD in adipose tissues isolated from fed-, 48h fasted-, and refed animals

급여 구분		수컷 (♂)	암컷 1 (♀1)	암컷 2 (♀2)
정상	K_m	18.6 \pm 2.9 μ M	22.7 \pm 6.5 μ M	16.9 \pm 3.8 μ M
	V_{max}	78 \pm 7 nmol/min/mg	60 \pm 8 nmol/min/mg	49 \pm 5 nmol/min/mg
절식	K_m	6.3 \pm 2.1 μ M	21.0 \pm 9.0 μ M	21.3 \pm 7.5 μ M
	V_{max}	14 \pm 2 nmol/min/mg	40 \pm 8 nmol/min/mg	69 \pm 11 nmol/min/mg
재급여	K_m	20.9 \pm 3.4 μ M	45.6 \pm 15 μ M	7.8 \pm 2.3 μ M
	V_{max}	46 \pm 5 nmol/min/mg	103 \pm 23 nmol/min/mg	85 \pm 8 nmol/min/mg

4) 지방조직 부위별 SCD activity

지방조직 부위별 microsomal protein 1mg이 1분당 몇 μ mole의 stearate를 oleate로 불포화시키는 가로 나타냈다 (표 9).

Table 9. SCD activity in adipose tissues

구 분	desaturase activity (nmol/min/mg)			
	피 하	근 간	복 부	신
암컷1 재급여	55 \pm 2	53 \pm 1	65 \pm 5	48 \pm 11
Hawaii2	40 \pm 4	×	×	101 \pm 7

지방조직은 다른 조직과는 다르게 세포의 대부분을 지방구가 차지하고 세포질은 작은 일부로써 많은 양의 조직에서도 적은 양의 효소만이 분리되었다. 피하 지방조직 35g에서 약 2 ~ 2.5mg(1.5ml)의 microsomal protein만을 얻을 수 있었다 (표 4). 이들 단백질은 SDS-PAGE gel상에서 모두 거의 같은 수의 band를 보였다 (그림 4, 그림 5). 슷한우 절식에서 분리된 단백질 (그림 5의 lane 4)의 양이 적은 것은 지방조직에 결합조직이 특히 많고 제대로 추출이 되지 않아서 나타난 결과로 추측되었다. 각 lane에서 가장 우세한 단백질은 67kDa band였으나, microsomal protein 분리과정과 assay에서 나타난 결과와 다른 종에서 분리된 desaturase의 분자량과 비교해서 40kDa band가 stearoyl-CoA desaturase로 예측되었다. 이는 후에 이 효소의 cDNA를 구축하고 sequence를 비교함으로써 정확한 분자량을 얻을 수 있겠다.

표 8에 나타난 kinetics parameter를 보면 일반적으로 K_m 값은 16~20 μ M 이고 V_{max} 값은 40~80 nmol/min/mg정도였으나 슷한우 절식, 두 암한우의 재급여에서 차이가 나게 나타났다. 이는 일단 같은 대사경로에 관여하나 아미노산의 조성이 다른 isoenzyme일 수도 있겠다. 이 역시 cDNA구축 후 mRNA

의 polymorphism을 조사함으로써 정확해질 수 있겠다. 또한 각 조직의 실제 지방산 조성을 비교해봄으로써 이들의 역학관계를 더 연구해볼 수 있겠다.

표 9에 나타난 부위별 desaturase의 activity를 보면 부위별로 차이를 볼 수 있다. 같은 등심 쪽에서 채취한 피하와 근간에서 비슷한 값을 갖고, 복부에서 제일 높게 그리고 신 지방에서 제일 낮게 나타났다. 피하 지방에서는 한우가 외래종보다 높게 나왔으나, 신 지방에서는 외래종이 한우 보다 높았다. 또한 외래종에서 신 지방의 activity가 피하보다 높게 나와 한우와 다른 면을 보였다.

2. SCD cDNA cloning

가. SCD cDNA cloning

1) 한우 SCD cDNA cloning을 위한 RT-PCR

한우 SCD cDNA는 다른 종의 SCD cDNA 염기서열을 기초로 하여 제작한 primer를 이용하여 RT-PCR 방법으로 cloning하였다. 재료 및 방법에 제시된 primer set a (forward①/reverse②)와 primer set b (forward②/reverse②)를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 예상했던 600bp PCR band가 증폭되었다 (그림 9).

5'쪽의 나머지 부분의 클로닝을 위하여 위와 동일한 방법으로 RT-PCR을 수행한 후 c primer set (forward③/reverse①)를 이용, PCR을 수행하여 예상한 550bp PCR product를 얻었다 (그림 10).

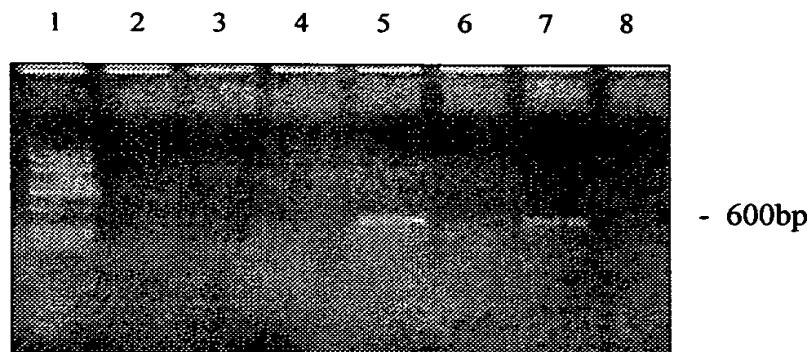


Figure 9. RT-PCR for SCD in subcutaneous(sc) and intermuscular(iem) adipose tissues of Hanwoo. Lane 1: 1kb marker, Lane 2: negative control(without RT product) for primer set a, lane 3: negative control(without RT product) for primer set b, lane 4: primer set a for iem, lane 5: primer set b for iem, lane 6: primer set a for sc, lane 7: primer set b for sc.

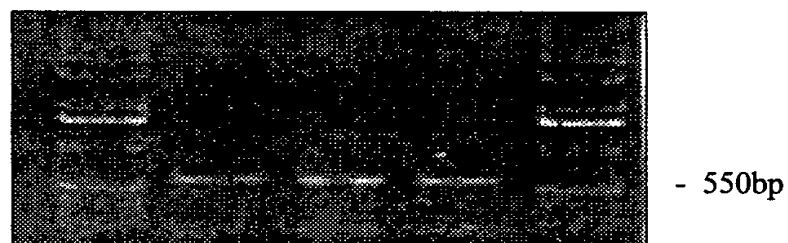


Figure 10. RT-PCR using primer set c for SCD (forward③/reverse①) in adipose tissues of Hanwoo

3) 한우 SCD cDNA TA-cloning 및 plasmid 분리

염기서열 분석을 위하여 PCR 결과 나온 clone들을 각각 TA cloning하였다. Plasmid를 EcoRI으로 digestion 하여 insert를 확인하였다 (그림 11).

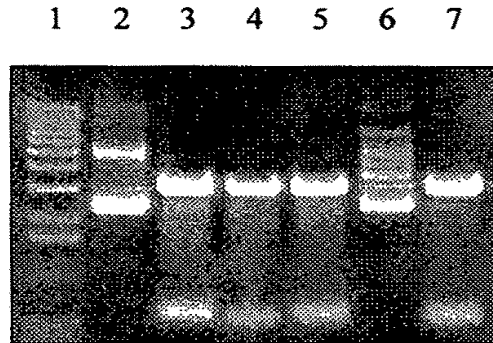


Figure 11. EcoR I digestion of SCD clone. Lane 1: 1kb marker, lane 2: uncut plasmid, lanes 3, 4, 5, 7: EcoRI digested plasmid.

나. SCD cDNA 염기서열 분석

Cloning한 한우 SCD cDNA clone에 대한 염기서열을 분석한 후 GenBank에서 homology 비교를 통하여 한우 SCD cDNA임을 확인하였다. 한우 SCD cDNA clone은 1,080bp nucleotide와 350개 아미노산으로 구성되어 있었다 (그림 12). 한우 SCD 유전자의 아미노산 서열을 다른 종과 비교한 결과, 양 (Ward 등, 1997)의 SCD와 96.5%의 유사성을 보였고, 다른 포유동물의 SCD와 88%이상의 유사성을 보였다 (그림 13).

3. SCD 유전자 발현양상 분석

가. Northern에 의한 SCD 유전자 발현 양상 분석

정상, 절식, 재급여한 암컷과 수컷 한우로부터 지방조직을 채취하여 SCD mRNA의 수준을 측정함으로써, 절식과 재급여에 따른 SCD유전자의 발현양상을 조사하였다. mRNA의 수준은 northern 방법으로 수행하였다. 그림 14와 같이 수컷 피하지방 조직에서는 재급여시 SCD의 발현 수준이 정상과 절식 시에 비해 낮았고, 정상급여와 절식 사이에는 SCD 발현 수준에 차이가 없었

다. 암컷에서도 재급여시 발현 수준이 낮았으나 정상급여와 절식시에 비해 큰 차이는 없었다. 수컷 복부지방에서도 재급여시 SCD 발현 수준이 정상급여와 절식시에 비해 낮았다. 그러나 암컷 복부지방에서는 정상급여에서 절식과 재급여시 보다 SCD 발현 수준이 낮았다.

```

ATGCCGGCCCACATGCTCCAAGAGGAGATCTCTAGCTCCTACACAACCACCACCACCATCACAGCACCTCCT 72
M P A H M L Q E E I S S S Y T T T T T I T A P P
TCCAGGGTCCTGCAGAAATGGAGGGGGCAAATTGGAGAAGACTCCCCTATACTTGAAGAAGACATCCGCCCT 144
S R V L Q N G G G K L E K T P L Y L E E D I R P
GAAATGAGAGATGACATCTATGACCCAACCTACCAGGATAAAGGAGGGCCCAAAGCCCAAGCTTGAGTATGTT 216
E M R D D I Y D P T Y Q D K E G P K P K L E Y V
TGGAGAAACATCATCCTCATGTCTCTGTTACACTTGGGAGCCCTATATGGGATCACATTGATCCCCACCTGC 288
W R N I I L M S L L H L G A L Y G I T L I P T C
AAGATATACACCTATATCTGGGTGTTATTCTACTATCTGATGGGTGCCCTGGGCATCACAGCAGGGGCCAT 360
K I Y T Y I W V L F Y Y L M G A L G I T A G A H
CGCTGTGGAGTCACCGAACCTACAAAGCTCGGCTGCCTCTGCGGGTCTTCTGATCATTGGCAACACCATG 432
R L W S H R T Y K A R L P L R V F L I I G N T M
GCGTTCAGAAATGACGTTTTTTGAATGGTCCCAGATCACCGTGCCCACCACAAGTTTTTCAGAAACGGATGCC 504
A F Q N D V F E W S R D H R A H H K F S E T D A
GACCCCCACAATTCCCGACGTGGCTTTTTTCTTCTCACGTGGGTTGGCTGCTTGTGCGCAAACACCCAGCT 576
D P H N S R R G F F F S H V G W L L V R K H P A
GTCAAAGAAAAGGGTCCACGCTAAATTTATCCGACCTAAGAGCCGAGAAGCTGGTGATGTTCCAGAGGAGG 648
V K E K G S T L N L S D L R A E K L V M F Q R R
TACTACAAACCTGGTGTCTGTGTTGTGCTTCATCCTGCCACACTCGTGCCGTGGTATCTGTGGGATGAA 720
Y Y K P G V L L L C F I L P T L V P W Y L W D E
ACGTTTCAAACAGCCTGTTTTTTGCCACCTTATCCGTTACGCCCTTGGGCTCAACGTACCTGGCTGGTG 792
T F Q N S L F F A T L F R Y A L G L N V T W L V
AATAGTGCTGCCATATGTATGGATACCGCCCTTATGACAAGACCATCAACCCCGAGAGAATATTCTGGTT 864
N S A A H M Y G Y R P Y D K T I N P R E N I L V
TCCCTGGGAGCTGTGGGTGAGGGCTTCCACAACCTACCACCACACCTTTCCTTATGACTACTCAGCCAGTGAG 936
S L G A V G E G F H N Y H H T F P Y D Y S A S E
TACCGCTGGCACATCAACTTACCACGTTCTTCATTGATTGCATGGCTGCCATCGGTCTGGCTTATGACCGG 1008
Y R W H I N F T T F F I D C M A A I G L A Y D R
AAGAAAGTATCCAAGGCTGCCATCTTGGCCAGGATAAAAAGAACTGGAGAGGAGAGCCACAAGAGTAGCTGA 1080
K K V S K A A I L A R I K R T G E E S H K S S -

```

Figure 12. Nucleotide sequences of Hanwoo stearoyl CoA desaturase cDNA and its deduced amino acids

HWSCDP	MPAHLQEEISSSYTTTTTITAPPSRVLQNGGGKLEKTPLYLEEDIRPEM	50
HOMOP	MPAHLQDDISSSYTTTTTITAPPPGVLQNGGDKLETMPLYLEDDIRPDI	50
MOUSP	MPAHLQE- I SGAYSATTTITAPPSGGQQNGGEKFEKSSHHWGADVPEL	49
RATSCDP	MPAHLQE- ISSSYTTTTTITEPPSGNLQNGREKMKKVPLYLEEDIRPEM	49
PIGSCDP	-----SSYTTTTTITAPSSRVLQNGGGKSEKTPQYVEEDIRPEM	39
	..*..*****.*.***.*.*.***.	
HWSCDP	RDDIYDPTYQDKEGPKKLEYVWRNIILMSLLHLGALYGITLIPTCKIYT	100
HOMOP	KDDIYDPTYKDKEGPPKVEYVWRNIILMSLLHLGALYGITLIPTCKFYT	100
MOUSP	KDDLIDPTYQDDEGPPPKEYVWRNIILMALLHLGALYGITLVPSCKLYT	99
RATSCDP	REDIHDPSYQDEEGPPPKEYVWRNIILMALLHVGALYGITLIPSSKVYT	99
PIGSCDP	KDDIYDPTYQDKEGPQKLEYVWRNIILMSLLHLGALYGIILIPTCKIYT	89
	..*..**.*.*.***.*.*****.***.*****.*.*.*.***	
HWSCDP	YIWLFFYYLMGALGITAGAHRLWSHRTYKARLPLRVFLIIGNTMAFQNDV	150
HOMOP	WLVGFVFFYSALGITAGAHRLWSHRSYKARLPLRFLIIANTMAFQNDV	150
MOUSP	CLFAYLYVVISALGITAGAHRLWSHRTYKARLPLRFLIIANTMAFQNDV	149
RATSCDP	LLWGFVFFYLSALGITAGAHRLWSHRTYKARLPLRIFLIIANTMAFQNDV	149
PIGSCDP	LLWAFAYLLSAVGVTAGAHRLWSHRTYKARLPLRVFLIIANTMAFQNDV	139
	..**.*.*.*****.*****.*****.*****.*****	
HWSCDP	FEWRDHRHHKFSETDADPHNSRRGFFSHVGVLLVRKHPAVKEKGSTL	200
HOMOP	YEWDRHRAHKKFSETHADPHNSRRGFFSHVGVLLVRKHPAVKEKGSTL	200
MOUSP	YEWDRHRAHKKFSETHADPHNSRRGFFSHVGVLLVRKHPAVKEKGGKL	199
RATSCDP	YEWDRHRAHKKFSETHADPHNSRRGFFSHVGVLLVRKHPAVKEKGGKL	199
PIGSCDP	YEWDRHRAHKKFSETDADPHNSRRGFFSHVGVLLVRKHPAVKEKGGLL	189
	..**.*.*****.*****.*****.*****.*	
HWSCDP	NLSDLRAEKLVMFQRRYKPGVLLLCF ILPTLVPWYLWDETQNSLFFAT	250
HOMOP	DLSDLEAEKLVMFQRRYKPGLLMCF ILPTLVPWYFWGETFQNSVVFAT	250
MOUSP	DMSDLKAEKLVMFQRRYKPDLLMCFVLPVLTPWYCWGETFVNSLCVST	249
RATSCDP	DMSDLKAEKLVMFQRRYKPGLLMCF ILPTLVPWYCWGETFLHSLFVST	249
PIGSCDP	NMSDLKAEKLVMFQRRYKPGILLMCF ILPTLVPWYCWGEAFQSLFVAT	239
	..***.*****.***.*.*.***.***.*.*.*.*.	
HWSCDP	LFRYALGLNVTWLVNSAAHMYGYRYPDKTINPRENILLVSLGAVGEGFHNY	300
HOMOP	FLRYAVVLNATWLVNSAAHLFGYRYPDKNISPRENILLVSLGAVGEGFHNY	300
MOUSP	FLRYAVVLNATWLVNSAAHLYGYRYPDKNISSRENILLVSMGAVGERFHNY	299
RATSCDP	FLRYTLVLNATWLVNSAAHLYGYRYPDKNIQSRENILLVSLGAVGEGFHNY	299
PIGSCDP	FLRYAIVLNATWLVNSAAHLYGYRYPDKTISPRENILLVSLGAVGEGFHNY	289
	..**.*.*.*****.*****.*.*****.*.***.***	
HWSCDP	HHTFPYDYSASEYRWHINFTTFFIDCMAAIGLAYDRKKVSKAAI LARIKR	350
HOMOP	HHSFPYDYSASEYRWHINFTTFFIDWMAALGLTYDRKKVSKAAI LARIKR	350
MOUSP	HHAFFPYDYSASEYRWHINFTTFFIDCMALLGLAYDRKRVSRAAV LARIKR	349
RATSCDP	HHAFFPYDYSASEYRWHINFTTFFIDCMAALGLAYDRKKVSKAAV LARIKR	349
PIGSCDP	HHTFPYDYSASEYRWHINLTTFIDCMAALGLAYDRKKVSKAAI L-----	334
	.*.***.*****.*.***.***.*.*.*.*.	

Figure 13. Comparison of the deduced amino acid sequences of Hanwoo SCD (HWSCDP) with those of other species (human; HOMPO, mouse; MOUSP, rat; RATSCDP, pig; PIGSCDP). Star (*) denotes the amino acid residue identical in all species. Dot (.) denotes the amino acid residue that is well conserved between species.

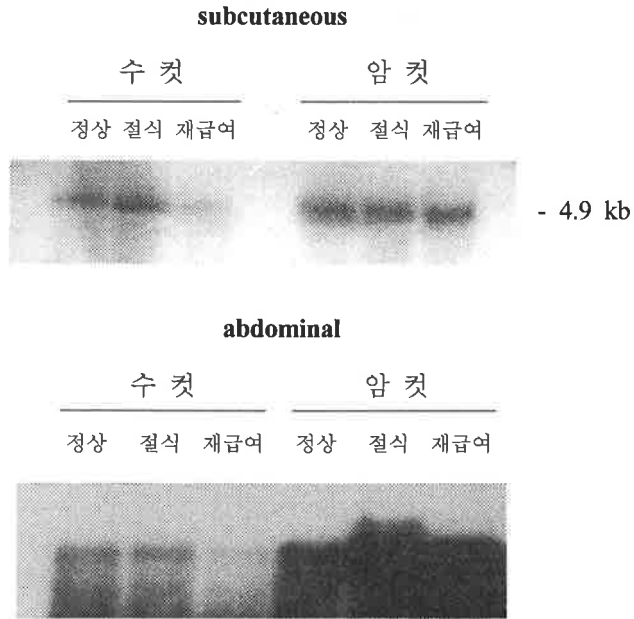


Figure 14. Northern analysis of SCD cDNA in subcutaneous (top) and abdominal (bottom) bovine adipose tissues of Hanwoo

나. RT-PCR에 의한 SCD 유전자 발현 양상 분석

Cloning한 SCD 유전자의 염기서열을 바탕으로 제작한 primer와 total RNA를 이용하여 RT-PCR 방법으로 SCD 발현양상을 조사하였다. RT-PCR을 수행한 결과, 640bp의 예상된 size의 band를 얻을 수 있었다 (그림 15). 약 31 cycle에서 증폭되는 효율이 낮아짐을 보이고 33 cycle 이상부터는 증폭산물이 포화를 이루기 때문에, 적절한 cycle 숫자를 27 cycle로 결정하여 RT-PCR을 수행하였다. 또한, PCR product는 정제하여 pGEM-Teasy vector에 ligation 후 plasmid를 분리하고 염기서열을 분석하여 SCD의 증폭산물임을 확인하였다.

근내지방과 피하지방에서 SCD 유전자의 발현양상을 RT-PCR (27 cycles) 방법으로 분석한 결과, SCD 유전자의 발현은 근내지방보다 피하지방에서 약 4배 이상 높은 것을 확인하였다 (그림 16).

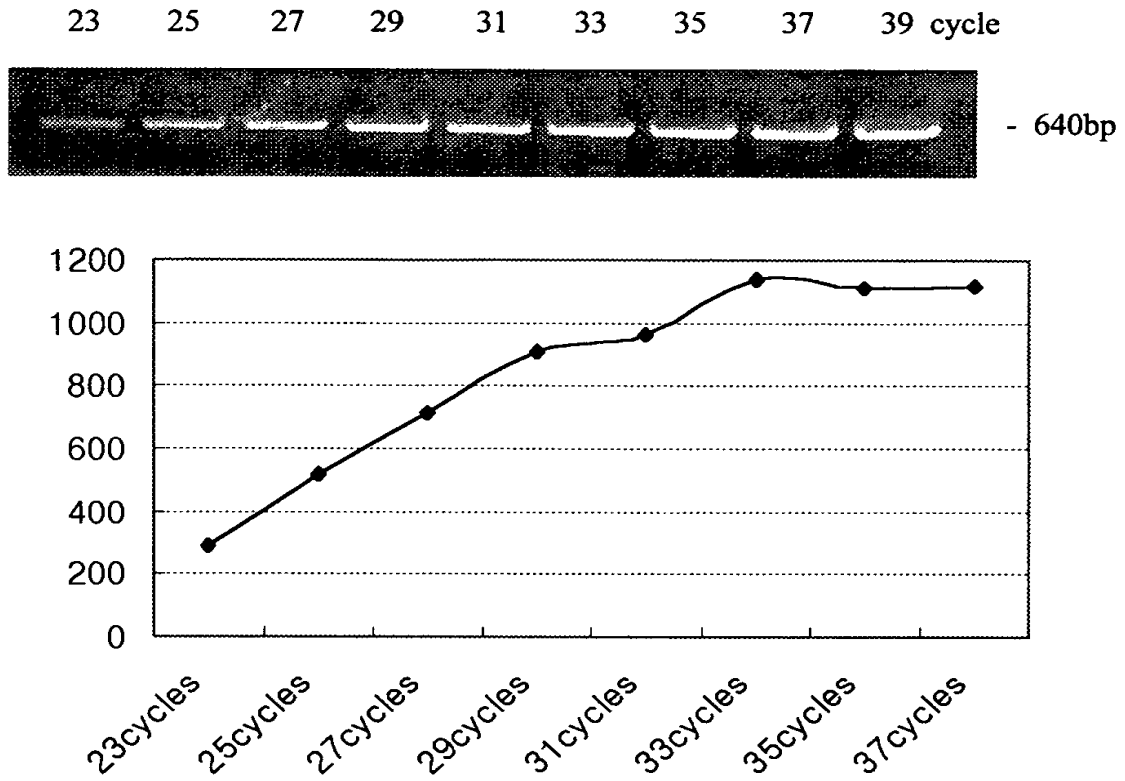


Figure 15. Cycle-dependent amplification of SCD cDNA by RT-PCR in Hanwoo adipose tissues

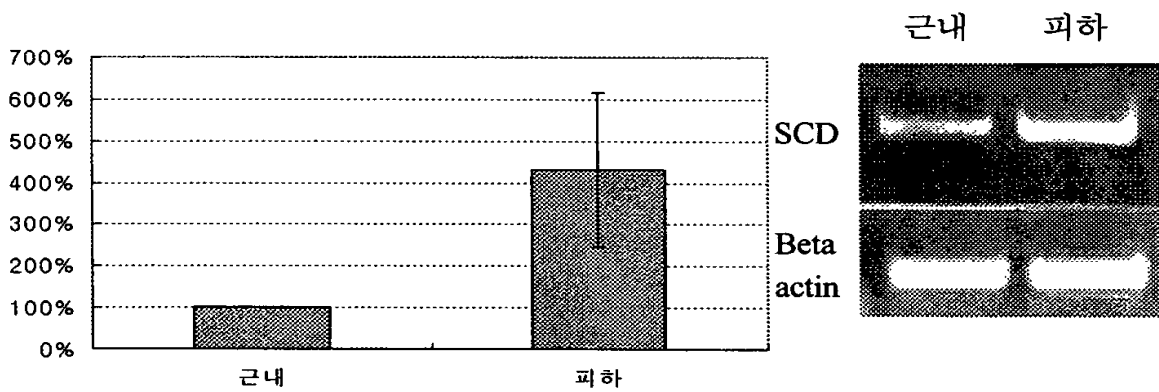


Figure 16. RT-PCR amplification of SCD cDNA in intramuscular and subcutaneous adipose tissues. Relative expression levels were normalized as 100% for those of intramuscular adipose tissues. Bar indicates sd (n=5).

제 4절 적 요

최근 소비자들은 포화 지방산보다 불포화 지방산의 섭취를 선호하는 경향이 있으며 고기내 불포화지방산인 oleic acid는 고기의 기호성을 증가시킬 수 있다. Stearoyl-CoA desaturase(SCD)는 포화지방산을 oleic acid와 같은 불포화지방산으로 전환하는데 관여하는 효소이다. SCD 효소를 이용하여 oleic acid 함량이 증진시키면 소고기의 풍미를 향상시켜 고급육을 생산할 수 있을 것으로 기대된다. 본 과제에서는 SCD 효소의 특성을 규명하고, 한우에서 SCD cDNA를 cloning하고 발현양상을 조사하여 지방산 조성을 조절할 수 있는 기반 조성을 위한 연구를 수행하였다.

SCD는 세포내 microsome의 막에 존재하는 효소이므로 지방조직에서 microsomal fraction을 분리하여 SCD 효소활성 측정에 이용하였다. 지방조직은 다른 조직과는 다르게 세포의 대부분을 지방구가 차지하고 세포질은 매우 적어서 피하 지방조직 35g에서 약 2 ~ 2.5mg의 microsomal protein만을 얻을 수 있었다. Microsomal 단백질에 대한 SDS-PAGE 결과, 40kDa band가 SCD로 예측되었다. SCD kinetics parameter 분석 결과, K_m 값은 16~20 μM 이고 V_{max} 값은 40~80 nmol/min/mg 정도였다. 지방조직 부위별 SCD 활성을 측정된 결과, 피하지방과 근간지방은 유사한 활성을 보였고, 복부지방에서 제일 높은 활성을 나타낸 반면 신지방에서 제일 낮은 활성을 보였다. 피하지방에서는 한우가 외래종보다 높은 SCD 활성을 보였으나, 신지방에서는 외래종이 한우 보다 높은 활성을 보였다.

Bovine 종에서 아직 밝혀지지 않은 SCD cDNA clone은 다른 종의 염기서열을 바탕으로 제작한 primer와 total RNA를 이용, RT-PCR 방법으로 cloning 하였다. 확보한 SCD cDNA clone은 1,080 bp nucleotide와 350개의 아미노산으로 구성되어 있었다. 한우 SCD 유전자의 지방조직에서 발현 양상은 피하

지방과 복부지방, 근내지방에서 total RNA를 분리하여 northern 방법으로 분석하였다. SCD mRNA는 4.9kb transcript size 발현되었다. 수컷 피하지방에서 정상급여구에 비해 재급여시 발현이 감소하였고, 암컷 피하지방에서는 거의 변화가 없었다. 수컷 복부지방에서는 피하지방과 같은 경향으로 정상급여구에 비해 재급여시 발현이 다소 감소하였으며 특히 암컷에 비해 수컷이 복부지방에서 SCD 유전자의 발현 수준이 낮은 것을 관찰하였다. 근내지방과 피하지방에서 SCD 유전자의 발현양상을 RT-PCR 방법으로 조사한 결과, 근내지방보다 피하지방에서 높은 수준을 보였다. 본 실험에서 지방조직 부위별로 SCD 유전자의 발현 양상이 다른 것을 관찰하였는데, 이러한 SCD 유전자의 발현 차이는 지방조직 부위별 지방산 조성의 차이를 유도할 것으로 사료된다. 불포화지방산 함량이 수컷보다 암컷에서 높은 이유는 수컷에 비해 암컷에서 SCD 유전자의 발현 수준이 높기 때문인 것으로 사료된다. 향후 연구를 통하여 SCD 유전자의 발현을 증진시키는 방법을 모색하면, 품질이 좋은 한우 고급육을 생산할 수 있을 것으로 기대된다.

제 5절 인용문헌

- Cameron, P. J., M. Rogers, J. Oman, S. G. May, D. K. Lunt and S. B. Smith. 1994, stearyl coenzyme A desaturase enzyme activity and American Wagyu steers. *J. Anim. Sci.* 72:2624-2628.
- Chang, J. P., D. K. Lunt and S. B. Smith. 1992. Fatty acid composition and fatty acid elongase and stearyl-CoA desaturase activities in tissues of steers fed high oleate sunflower seed. *J. Nutr.* 122:2074-2080.

- Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 161:156-159.
- Enoch, H. G., A. Catala and P. Strimatter. 1976. Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interaction, and the function of lipid. *J. Biol. Chem.* 251:5095-5103.
- Lee, K. N., M. W. Pariza and J. M. Ntambi. 1996. Stearyl-CoA desaturase gene1 in male and female mice. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1304:85-88.
- Li, J., S. F. Ding, N. A. Habib, B. F. Fermor, C. B. Wood and R. S. Gilmour. 1994. Partial characterization of a cDNA for human stearyl-CoA desaturase and changes in its mRNA expression in some normal and malignant tissues. *Int. J. Cancer* 57:348-352.
- Melton, S. L., M. Amiri, G. w. Davis and W. R. Backus. 1982. Flavor and Chemical Charaterics of Groud Beef from Grass, Forage-Grain-and Grain-Finished Steers. *J. Anim. Sci.* 55:77-80.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning. A Laboratory manual.* 2nd eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Shimakata, J., K. Mihara and R. Sato. 1972. Reconstitution of hepatic microsomal stearyl-coenzyme A desaturase system from solubilized components. *J. Biochem.* 72:1163-1174.
- St. John, L. C., D. K. Lunt and S. B. Smith. 1991. Fatty acid elongation and desaturation enzyme activities of bovine liver and subcutaneous adipose tissue microsomes. *J. Anim. Sci.* 69:1064-1073.

- Strittmater, P., L. Spatz, D. Corcoran, J. Rogers, B. Setlow and R. Redline. 1974. Purification and properties of rat liver microsomal stearyl coenzyme A desaturase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71:4565-4569.
- Terrell, R. N. and R. W. Bray. 1969. Influence of sex, liveweight and anatomical location on bovine lipids. III. Fatty acid composition of the neutral and phospholipid fractions from three muscles. *J. Anim. Sci.* 29:288-283.
- Thielde, M. A., J. Ozols and P. Strittmatter. 1986. Construction and sequence of cDNA for rat liver stearyl coenzyme A desaturase. *J. Biol. Chem.* 261:13230-13235.
- Thomas, P. S. 1980. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 77:5201-5205.
- Waldman, R. C., G. G. Suess and V. H. Brungardt. 1970. Fatty acids of certain bovine tissue and their association with growth, carcass and palatability traits. *J. Anim. Sci.* 27:632-635.
- Waldman, R. C., G. G. Suess and V. H. Brungardt. 1986. Fatty acid of certain bovine tissue and their association with growth, carcass and palatability trait. *J. Anim. Sci.* 48:1343-1347.
- Ward, R. J., M. T. Travers, R. G. Vernon, A. M. Salter, P. J. Buttery and M. C. Barber. 1997. The ovine stearyl-CoA desaturase gene: cloning and determination of gene number within the ovine genome. *Biochem. Soc. Trans.* 25:673.

제 5 장 한우육의 육질 분석

제 1절 서 설

쇠고기 수입이 자유화된 현 상황에서 수입 쇠고기와의 차별화를 위해서 한우육의 고급화가 필수적이다. 쇠고기 소비가 지난 18년 동안 약 3배 가량의 증가추세를 보이고 있으며, 수입 쇠고기 역시 전체 소비량의 60%에 달한다. 이러한 수입 쇠고기의 소비 증가 추세에도 불구하고 한우육을 수입육보다 선호하는 이유는 아직까지 국내 소비자들은 수입육에 비해 한우 고급육의 육질을 믿기 있기 때문이다. 국내 소비자들이 한우를 선호하는 것에 비해 이를 설명할 만한 한우 육질의 특징적인 요소들이 아직까지 제시되지 못하고있는 실정이다. 따라서, 한우육에 대한 육질을 분석하고 이를 외국 품종들과 비교하여 한우육의 우수성을 과학적으로 입증하는 연구가 필요하다.

본 과제에서는 한우 수소와 거세우의 육질을 분석하고, 일부의 육질에 대하여는 미국 하와이에서 forage-finished 조건에서 사육된 Hereford와 Angus 교잡 거세우육의 특성과 비교하였다.

제 2절 재료 및 방법

1. 한우수소의 육질 분석

가. 시료 준비

승주 근교의 목장에서 벗짚과 사료로 사육된 21개월령 한우 (체중 약 550

kg)를 나주에 있는 도살장에서 도살한 후 시료로 사용했다. Loin eye (LE)와 Tenderloin (TL) 근육시료 (약 20g)는 glycogen, creatine phosphate, glucose-6-phosphate, ATP, pH 농도를 측정하기 위해 도살후 11번째 갈비뼈에서 0, 2, 4, 6, 12, 24h 간격으로 채취하여 즉시 액체 질소에 얼려 생화학적 분석 시까지 dry-ice에 보관하였다. 일반분석과 cholesterol 함량 측정은 지방을 완전히 제거한 등심과 안심 근육의 정면에서 150g씩을 1.5cm 두께로 잘라 시료로 사용하였다. 연도측정을 위해 지방분포가 2mm이하가 되도록 8번째와 13번째 갈비뼈 사이에서 5개의 등심과 안심 (두께 2.54cm) 시료를 자른 후, 0.3% sodium azide 용액에 10초간 담근 후 sealing pack에 각각 진공 포장하여 분석 시까지 4℃의 냉장고에서 1, 3, 7, 14, 21일 간격으로 저장하여 사용하였다. 근섬유형 분류에 사용할 시료는 약 1cm 정육면체인 LE와 TL 시료들은 dry-ice acetone (-78℃)에서 얼린 후, -70℃ 냉동실에 저장하여 사용하였다.

나. 근육대사물 분석 및 pH 측정

1) 시료준비 및 근육 추출액 (muscle extracts) 준비

근육 시료를 액체질소가 들어있는 aluminum waring blender에 넣고 분쇄하였다. 분쇄 후 완전한 시료의 수거를 위해 소량의 액체질소를 첨가하였다. 가루상태로 분쇄된 시료는 plastic병에 넣어 dry ice내에서 보관하였다.

50ml centrifuge tube를 칭량한 다음, tube를 dry ice 온도와 동일하도록 보관하였다. Tube안에 2-3g의 냉동 분쇄한 근육시료를 넣고 tube를 재칭량하였다. Sample의 무게를 계산한 다음, 0.6N perchloric acid 용액 첨가량을 결정하고, 냉장된 0.6N perchloric acid를 넣은 다음 교반하였다. 40℃에서 15분간 12,000 g로 원심분리하고, 상등액을 유리섬유에 거른후 ice-cold test tube에 넣어 0.1% methyl orange로 salmon pink색이 나타날 때까지 중화하여 분석이 끝날 때까지 이 용액을 냉장고에 보관하였다.

2) Glucose-6-phosphate (G-6-P), ATP와 creatine phosphate 농도측정

Glucose-6-phosphate (G-6-P)는 위에 준비한 용액에서 효소적 방법을 이용하여 Lang과 Michael (1974), Lamprecht와 Trautschold (1974) 및 Lamprecht 등 (1974)이 기술한 대로 순서적으로 분석하였다. Cuvette에 2.0ml triethanolamine buffer (0.05M, pH7.6), 0.1ml H₂O, 0.175ml MgCl₂ 용액 (0.1 M), 0.5 mg NADP⁺와 위에 준비된 근육추출액 0.5 mg을 넣었다. 잘 섞은 후 340 nm에서 흡광도를 측정하고 0.02ml glucose-6-phosphate dehydrogenase 용액 (50 E.U./ml H₂O)을 넣은 후 4분 후 흡광도를 다시 측정하여 glucose-6-phosphate의 농도를 구하였다. 위의 cuvette 용액에 0.2ml glucose 용액 (0.5 M)을 넣어 잘 섞은 후 흡광도를 구하고, 0.025ml의 hexokinase 용액 (150 E.U./ml H₂O)을 넣고 5분 후 흡광도를 측정, ATP 농도를 구하였다. ATP 농도를 구한 후 동일 cuvette에 0.025ml ADP 용액 (5mg/ml H₂O)을 넣고 4분후 흡광도를 측정하고, 0.025ml creatine phosphokinase (4mg/1% BSA 용액)을 넣고 30분 후 흡광도를 측정하여 creatine phosphate의 농도를 결정하였다.

3) Glycogen 분석

Glycogen 분석은 Dalrymple 등 (1973)의 방법에 준하였다. Sample 1g에 10배의 0.6N perchloric acid를 가하여 polytron homogenizer에서 완전히 교반하였다. 교반한 시료에서 1ml를 취하고 1.5ml의 0.6N perchloric acid를 넣었다. 다시 0.2ml를 취해 1N potassium bicarbonate 0.15ml를 섞었다. 위 용액에 2ml의 amyloglucosidase 용액 (10mg/ml 0.2M acetate buffer, pH 4.8)을 넣고, 뚜껑을 닫은 후 40℃에서 60분간 흔들면서 배양하였다. 60분후 1.0ml의 0.6N perchloric acid를 넣어 반응을 정지시킨 후 20분간 1,000g에서 원심분리하였다. 상등액을 glucose 분석에 사용하여 glycogen 농도를 구하였다. Glucose 분석은 Sigma kit를 사용하였다.

4) pH 측정

pH는 Bendall (1973)의 방법에 의하여 측정하였다. 시료와 iodoacetate를 혼합, 균질한 후 pH meter를 이용하여 측정하였다.

다. 일반성분 및 cholesterol 측정

수분과 지방의 함량은 AOAC method(1980)에 준하였다. 회분의 함량은 6 시간동안 600℃에서 연소시킨 후에 중량의 차이에 의하여 결정하였다. 단백질은 전체 시료 무게에서 수분, 지방, 회분의 무게를 제한 값으로 결정하였다. Cholesterol은 효소분석법 (Boeringer Mannheim Procedure, Indianapolis)에 의하여 측정하였다.

라. 연도 측정

전단력 측정은 약 250g의 신선육 시료를 지퍼백에 진공포장하여 75℃ 항온수조에서 1시간 동안 가온한 후, 동일한 시료를 1.8cm의 core를 만들어 실온 상태에서 Texture analyzer로 Warner-Bratzer를 이용하여 측정하였다.

마. 지방산화 측정 (TBA Method)

Rancidity 측정은 Tarladgis 등 (1960)의 방법에 준하였다. 준비한 sample 10g에 50ml 5% TCA 용액을 가하여 blender에서 2분간 교반하였다. 시료를 kjeldahl flask에 옮기고 46.5ml의 증류수를 가하면서 kjeldahl flask 벽에 붙어 있는 시료를 씻어 내린 후, 2.5ml의 HCl (1:2) 용액과 1ml BHT 용액 (1mg/ml ethanol)을 kjeldahl flask에 넣어주었다. 다음 소량의 dow anti-form H-10을 kjeldahl flask에 넣고 몇 조각의 zinc (20 Mesh)을 bumping 방지를 위해 넣어준 후, 높은 온도로 flask를 가열하여 50ml의 증류액을 graduate cylinder에

수집하였다. 수집된 시료를 잘 섞어 50ml의 이 용액을 Watman number 1 filter paper로 거른 후, glass stoppered flask에 5ml를 취하고, TBA 시약 5ml (1.332g thiobarbituric acid/500ml 90% acetic acid)를 넣어 주었다. 그후 실온에서 19시간 동안 발색시켰다. 여기서 발색된 시료를 분광분석기로 538 nm에서 흡광도를 분석하였다. 결과는 mg of malonaldehyde/kg 시료로 표시하였다.

바. Histology

1) 조직절편의 준비

등심에서 채취한 등심근육시료를 1cm x 1cm x 1cm 정도 크기로 자른 후 dry-ice acetone 용액에서 냉동시켰다. 냉동된 근육시료를 cryostat을 이용하여 16 μ m 두께가 되게 cross-section을 한 후 현미경 slide에 부착한 후 조섬유 type을 분류하기 위해서 ATPase와 succinic dehydrogenase 염색을 하였다.

2) Hematoxylin과 eosin 염색

Hematoxylin 용액에 침지한 후, 흐르는 수돗물에서 세척하고 eosin 용액에 침지하였다. 그 다음 ethanol 용액과 xylene 용액을 차례로 거쳐 수분을 제거 후 permount 용액으로 살짝 덮은 후 cover slide를 위에 덮어서 보관하였다.

3) SDH 염색

SDH 염색은 Pearse (1960)의 방법에 준하였다. 조직절편을 염색용액 (50ml 0.05M Na phosphate buffer; 0.68g sodium succinate; 30mg tetranitro blue tetrazolium)에서 45분간 incubation한 후, deionized water로 세척후 acetone 용액에 담구었다 꺼낸후, ethanol 용액과 xylene 용액을 거쳐 H & E 염색처럼 cover slide를 덮어서 보관하였다.

4) ATPase 염색

ATPase 염색은 Guth 등 (1970)이 기술한 방법에 준하였다. 조직절편을 0.25N formic acid에 담근 후, deionized water로 세척하고 ATPase 용액 (20ml 0.1M sodium Barbital, 10ml 0.7M CaCl₂, 30ml H₂O, 0.2756g ATP, pH 9.5)에 20분간 배양하였다. 그 다음 꺼내어 CaCl₂ 용액에 3번 세척한 후, cobalt nitrate 용액에 담그고 deionized water로 세척하여 hood에서 ammonium sulfide 용액에 담근 후, 수돗물로 세척하였다. 세척한 염색조직을 eosine에서 침지한 후, ethanol 용액에서 xylene 용액을 거쳐 permount를 덮어서 보관하였다.

5) Collagen 분석

신선한 시료 5g을 갈아 50ml centrifuge tube에 넣은 후 1/4 strength Ringer 용액을 첨가하여 77°C에서 63분 동안 배양하였다. 항온수조에서 tube를 식힌 후 20분 동안 3000g에서 원심분리한 후 상등액을 수집하고 다시 tube에 8ml에 Ringer 용액을 넣고 원심분리한 후 상등액을 합하였다. 합쳐진 상등액 용액과 잔류물을 6N HCl로 138°C에서 3시간 동안 가수분해하였다. 1-5 μ g hydroxyproline가 함유된 2ml 시료를 16×150mm 크기의 시험관에 넣고 각각의 tube에 1ml chloramine-T용액을 첨가한 후 완전히 섞어지도록 여러 번 흔들었다. 다음 실온에서 20분 동안 방치한 후 1ml perchloric acid를 첨가하고 5분간 방치하였다. 1ml PAB 용액을 넣고 섞은 다음 20분 동안 60°C의 항온수조에서 배양한 후 5분간 수돗물로 식히고 흡광도 557 nm에서 측정하였다.

사. Muscle protein gel electrophoresis

시료를 100°C에서 20분간 끓인 후 변성된 단백질을 3000g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 전기영동에 사용하였다. Acrylamide gel은 Bio-Rad사의 read gel (4% stacking gel, 12% running gel)을 사용하였으며, tank buffer는

0.025M Tris, 0.192M Glycine, 0.1% SDS, pH 8.3을 사용하였다. 시료는 loading buffer (150mM Tris-HCl, 3% SDS, 30% glycerol, 0.03% bromophenol blue, pH8.0, 0.1배의 MCE)에 단백질 농도가 $4\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 되게 섞은 후, 100°C에서 90초간 가열하여 각 well당 $10\mu\text{l}$ 씩 걸었다. 전기영동은 12 mAmps에서 1시간 30분 동안 실시하고 gel은 coomassie brilliant blue 용액으로 염색하고, 탈색제 I (40% methanol, 7% acetic acid) 및 II(7% acetic acid, 5% methanol)로 탈색한 후 건조시켜 보관하였다.

아. 통계처리

Data는 MINITAB programing(1989)의 ANOVA에 의해 분석하였다.

2. 한우 거세우의 육질 분석

승주 근교의 목장에서 벗짚과 사료로 사육된 21개월령 한우 (체중 약 550 kg)를 나주에 있는 도살장에서 도살한 후 시료로 사용하였다. 등심과 안심 근육시료 (약 20g) 들은 glycogen, creatine phosphate, glucose-6-phosphate, ATP, pH 농도를 측정하기 위해 11번째 갈비뼈에서 도살 후 0, 2, 4, 6, 12, 24 시간 간격으로 채취하여 즉시 액체 질소에 얼려 생화학적 분석 시까지 dry-ice 에 보관하였다. 일반분석과 cholesterol 함량 측정은 지방을 완전히 제거한 등심과 안심 근육의 정면에서 150g씩을 1.5cm 두께로 잘라 시료로 사용하였다. 연도측정을 위해 지방분포가 2mm이하가 되도록 8번째와 13번째 갈비뼈 사이에서 5개의 등심과 안심 (두께 2.54cm) 시료를 자른 후, 0.3% sodium azide 용액에 10초간 담군 후 sealing pack에 각각 진공 포장하여 분석 시까지 4°C의 냉장고에서 1, 3, 7, 14, 21일 간격으로 저장하였다. 근섬유형의 분류에 사용할 시료는 약 1cm 정육면체인 등심과 안심 시료들은 dry-ice acetone (-78°C)

에서 얼린 후, -70℃ 냉동실에 저장하였다.

한우 거세우의 등심과 안심근육의 육질 (일반분석 및 cholesterol 함량, pH, metabolites 함량, tenderness와 cooking loss, muscle fiber type 분류, 지방산 화도, collagen 분석, muscle protein gel electrophoresis)을 위와 같은 방법으로 분석하였다.

3. 미국 하와이육의 육질 분석

미국 하와이 거세우 시료는 Hawaii Natural Meat and Kulana Foods Ltd.에서 채취하였으며, 공동연구원인 미국 하와이대 김용수 박사가 제공하였다. 시험우들은 농후사료 공급 없이 주로 Kikuyu and Pangola Grasses와 white clover가 있는 곳에서 방목되었다. Hereford와 Angus의 교잡종 거세우는 24개월에서 36개월령 사이에 도살되었다. 도살된 도체들은 cooler에 들어가기 전 2시간 동안에 채취하였다. 등심 근육 (longissimus dorsi; LD) 시료(약 20g)는 glycogen, creatine phosphate, glucose-6-phosphate, ATP, pH농도를 측정하기 위해 11번째 갈비뼈에서 도살 후 2, 3, 6, 12, 24 시간 간격으로 채취하여 즉시 액체 질소에 얼려 생화학적 분석시 까지 dry-ice에 보관하였다. 미국 하와이 거세우 (forage-finished beef)의 육질(근육대사물, pH, 일반성분, cholesterol, 연도 및 지방산화도)을 위와 같은 방법으로 분석하였다.

제 3절 결과 및 고찰

1. 한우수소의 육질 분석

가. 근육대사물 분석 및 pH 측정

육질은 사후 도체의 물리적 생화학적 과정에 따라 영향을 받는다. 그림 1은 등심과 안심 근육에서 사후 pH 변화를 보여주고 있다. 두 근육들 사이에서 최종 pH와 저하 정도에서는 유의적인 ($p < 0.05$) 차이가 있었다. 안심 pH 기울기는 등심보다 훨씬 급하게 나타났으며, 또한 안심에서 pH 기울기는 처음 12시간 동안은 빠르게 나타나지만 등심에서 pH 기울기는 사후 24시간까지 완만히 떨어지는 것을 관찰할 수 있었다. 사후 24 시간에서 등심의 최종 pH는 5.73으로 안심의 5.61보다 훨씬 높았다. 이는 등심이 안심보다 type IIb (fast glycolytic fiber)가 더 많아 안심보다 등심에서 최종 pH가 높은 것으로 보인다. 안심 근육의 기능은 내부 기관을 유지하고 등심 근육의 기능은 운동성을 가지고 있다. 그래서 만일 스트레스를 받은 동물이라면 축적된 glycogen이 안심보다 등심에서 훨씬 더 빨리 고갈될 것이다. 등심보다 안심에서 축적된 glycogen의 양이 훨씬 많다는 것을 본 연구 (그림 2)에서도 관찰할 수 있었다. 마찬가지로 사후 첫 2시간동안 등심보다 안심에서 glycogen 함량이 더 빠르게 고갈되었다고 볼 수 있다.

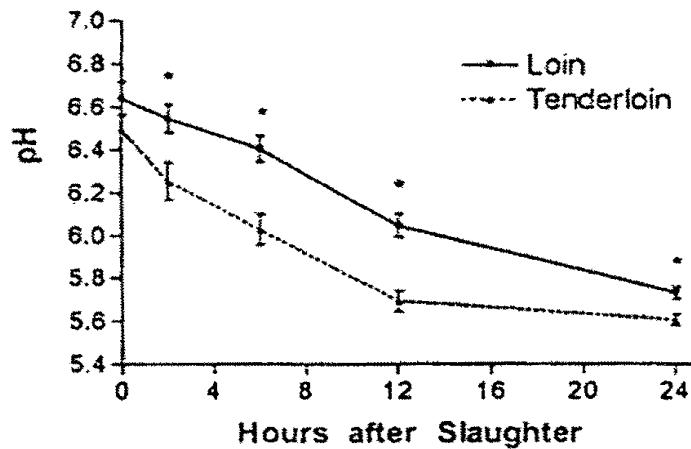


Figure 1. Change in postmortem muscle pH

그림 2는 사후 등심과 안심에서 ATP 농도, glucose-6-phosphate, creatine phosphate, glycogen의 변화를 관찰한 것이다. ATP의 소모는 등심보다 안심에서 더 빨랐다. 사후 첫 12시간 동안 안심에서 glucose-6-phosphate의 상승은 등심보다 빨랐으나 24시간의 glucose-6-phosphate의 최종 농도는 두 근육간에 차이가 없었다. Creatine phosphate는 도살되면서 부터 두 근육에서 거의 고갈되어 버려서 사후동안 주요한 변화는 없었다. 안심에서 glycogen 함량은 도살되면서 부터 등심보다 훨씬 높았고, 사후 24시간 동안은 높은 수준을 보였다. 사후 대사농도의 변화에 대한 결과에서 근육의 대사는 등심과 안심에서 각각 다르게 나타났음을 알 수 있었다.

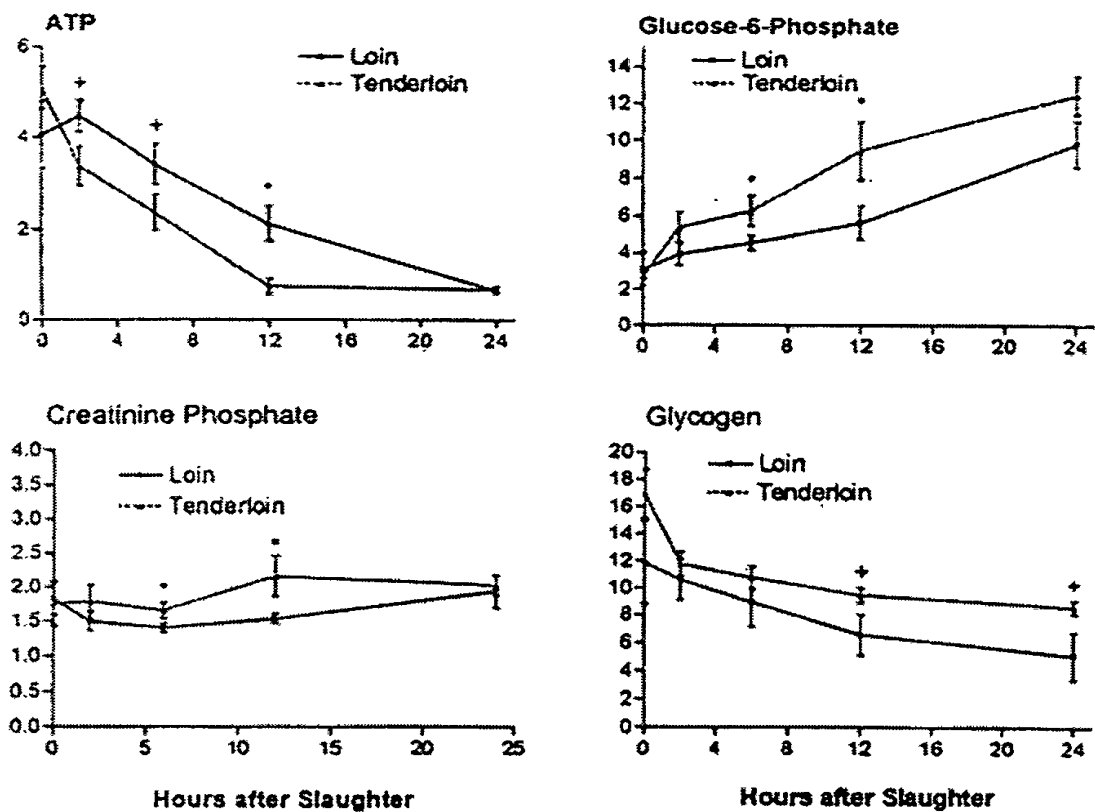


Figure 2. Change in metabolite concentrations during the 24hr postmortem period. The unit of metabolite concentration is μ moles/g muscle for ATP, glucose-6-phosphate, and creatine-phosphate, and mg/g muscle for glycogen.

나. 일반성분 및 cholesterol 측정

표 1은 한우 수소의 등심과 안심 근육의 일반 분석 결과이다. 등심과 안심에서 관찰된 수분, 지방, 단백질, 회분의 함량에는 차이가 없었다. 또한 두 근육간의 cholesterol 함량에도 차이는 없었다. 한우 수소의 등심과 안심에서 (44.0 mg/100g muscle) cholesterol 함량은 Christall과 Wese(1987)이 보고한 New Zealand육 (56 mg/100g muscle) 보다 낮았다. 이런 차이는 성 (sex)과 사

료의 영향에 의한 차이일 가능성이 있을 수 있고 품종에 따른 차이 일수도 있다고 추측되며, 이들 요인이 도체의 cholesterol 함량에 영향을 줄 수도 있다고 여겨진다. 쇠고기 100g 당 cholesterol 함량이 46mg~78mg 사이인 타 연구 결과 (Christall와 West, 1987; Hood와 Allen, 1971; Rhee 등, 1982; Terrell 등, 1969; Tu 등, 1967)와 비교하였을 때, 한우육의 cholesterol 함량은 아주 낮은 수준이었다. Cholesterol 분석치는 시료채취 과정과 반복수에 민감하다고 볼 때 본 시험에 사용된 공시축은 5두로 반복수가 적은 편으로 좀더 많은 시험축을 공시하여 분석해야될 것으로 여겨진다.

Table 1. Proximate Composition of Loin and Tenderloin Muscles of Male Korea Native Cattle

Item	Loin	Tenderloin
Moisture, %	74.2 ± 0.11	74.8 ± 0.46
Lipid, %	3.11 ± 0.15	3.08 ± 0.221
Protein, %	21.7 ± 0.19	21.0 ± 0.48
Ash, %	1.06 ± 0.015	1.12 ± 0.011
Cholesterol, (mg/100g muscle)	40.2 ± 0.80	44.0 ± 0.39

Data are expressed as mean ±SEM(n=5). Average body weight was 550 kg.

다. 연도 측정

전단력은 약 250g의 신선육 시료를 plastic bag에 진공포장하여 75℃ 항온 수조에서 1시간 동안 가온한 후, 동일한 시료를 1.8cm의 core를 만들어 실온 상태에서 측정하였다. 그림 3은 안심과 등심의 drip loss와 shear force에 대한 시험 결과이다. Shear force는 사후 21일 동안 두 근육의 연도 변화를 알아보

는 것으로 사후 1일과 3일 사이에는 등심의 shear value는 안심보다 높으나 사후 7, 15, 21 일에는 두 근육 사이에 shear value는 차이가 없었다. 이런 결과에 의하면 안심이 등심보다 숙성 기간이 더 짧다는 것을 알 수 있다. 한우 수소의 shear value를 미국의 다른 연구 결과와 비교해 보면 14일째의 등심은 조사료만으로 마무리 비육된 하와이육 (Hereford*Santa Gertrudis)의 shear value인 8.5 보다는 낮았고, Fukumoto 등 (1995)이 보고한 비육후기 농후사료를 급여한 비육우에서 조사된 shear value인 7.2와는 유사하였다. 따라서 연도에 영향을 미치는 인자로는 품종보다는 사양형태라고 할 수 있다. Drip loss는 사후 21일 동안 두 근육에서 점진적으로 감소했으나 사후 14일에는 두 근육에서 차이가 없었다.

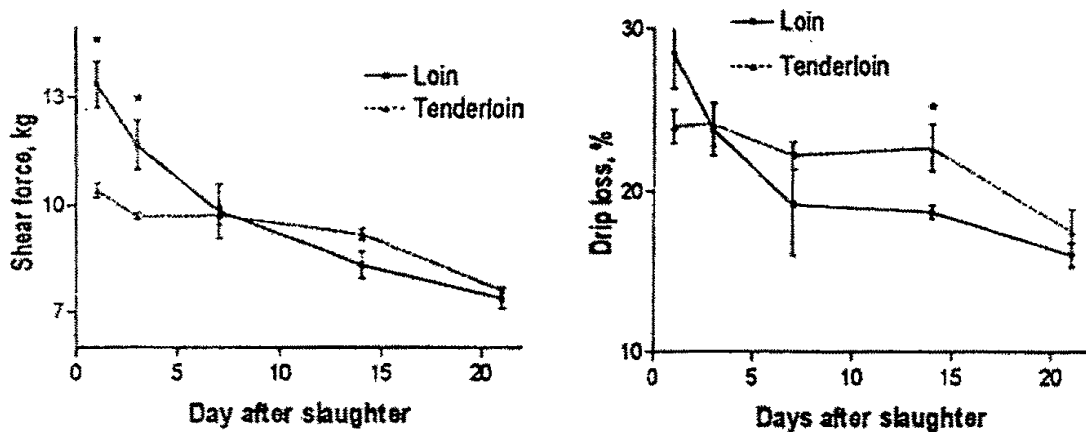


Figure 3. Changes in shear force and drip loss of Hanwoo bulls during 21 days aging period

라. Histology

그림 4에는 근섬유형의 분포비율이 나타나 있다. 근섬유형은 육생산에 있어서 육질에 중요한 요소이다. 안심은 등심 (15.9% vs 29.5%)보다 type IIb가

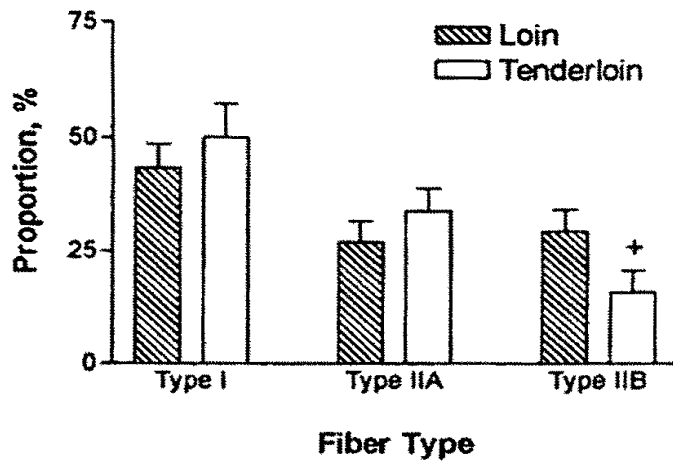


Figure 4. Muscle fiber type distribution in loin eye and tenderloin muscles

낮았다($p < 0.05$). Type I, IIA는 등심이 안심보다 많았으나 유의적 차이는 없었다. 이러한 결과에 의하면 등심보다 안심이 대사에 산소를 더 많이 사용하고 있음을 알 수 있었다. 한우의 등심내 type I 분포는 유럽종 보다 높았으나, type IIB는 더 낮았다 (Johnston 등, 1975, 1981; May 등, 1977; Ockerman 등, 1984).

2. 한우 거세우의 육질 분석

가. 근육대사물 분석 및 pH 측정

육질은 사후 도체의 물리적 생화학적 과정에 따라 영향을 받는다. 그림 5에는 등심과 안심 근육에서 사후 pH 변화를 나타냈다. 두 근육 사이에서 최종 pH와 저하 정도에서는 차이가 있었다($p < 0.05$). 안심에서 pH 기울기는 등심에서 보다 훨씬 급하게 나타났으며, 또한 안심에서 pH 기울기는 처음 12시간 동안은 빠르게 나타나지만 등심에서 pH 기울기는 사후 24시간까지 완만히 떨어지는 것을 관찰할 수 있었다. 사후 24시간에서 등심의 최종 pH는 5.73으로 안심의 5.61 보다 훨씬 높았다. 이는 등심이 안심보다 type IIB (fast

glycolytic fiber)가 더 많아 안심보다 등심에서는 최종 pH가 낮지 않은 것으로 사료된다. 안심의 기능은 내부 기관을 유지하고 등심의 기능은 운동성을 가지고 있으므로, 스트레스를 받은 동물이라면 축적된 glycogen이 안심보다 등심에서 훨씬 더 빨리 고갈될 것이다. 마찬가지로 사후 첫 2시간동안 등심보다 안심에서 glycogen 함량이 더 빠르게 고갈 됐다고 볼 수 있는데, 내적 요인에 의한 차이로 glycolysis율을 인정할 수 없는 것이라 볼 수 있다.

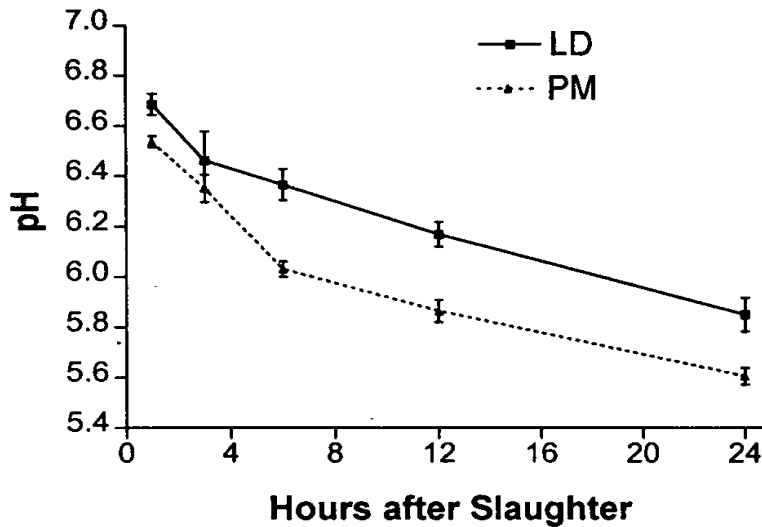


Figure 5. Change in postmortem muscle pH

그림 6은 사후 등심과 안심에서 ATP 농도, glucose-6-phosphate, creatine phosphate, glycogen의 변화를 관찰한 것이다. ATP의 소모는 등심에서보다 안심에서 더 빨랐다. 사후 24시간 동안 안심에서 glucose-6-phosphate의 상승은 등심에서 보다 빨랐다. Creatine phosphate는 도살 후 6시간동안은 현저히 감소하나 12시간부터 두 근육에서 거의 고갈되어서 사후 동안 주요한 변화는 없었다. 안심에서 glycogen 함량은 도살되면서부터 등심보다 훨씬 높았고 사후 24시간 동안은 높은 수준을 보였다. 사후 대사의 농도 변화에 대한 결

과는 사후 근육 변화에 대해 제시해 주었고 근육의 대사는 등심과 안심에서 각각 다르게 나타났다.

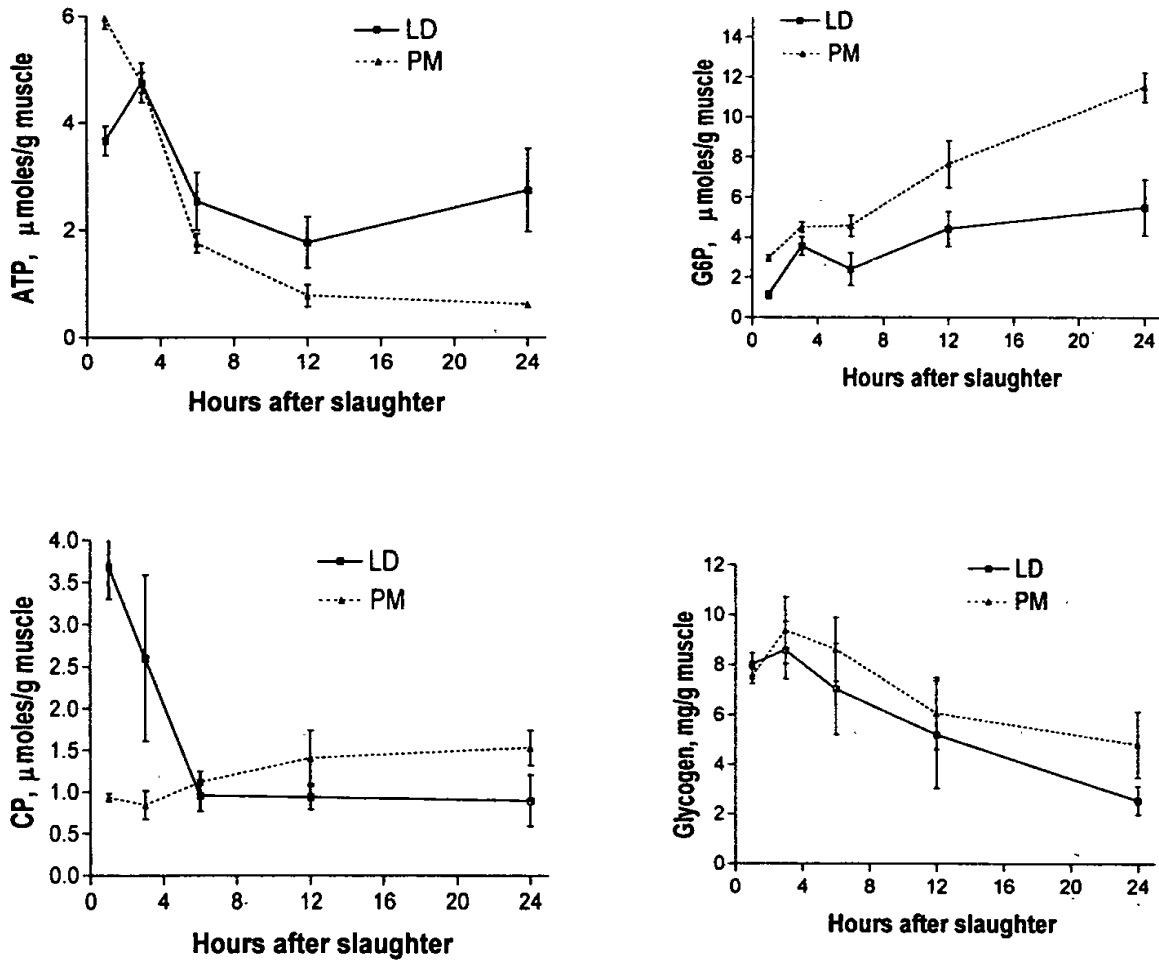


Figure 6. Change in metabolite concentrations during the 24hr postmortem period. The unit of metabolite concentration is μ moles/g muscle for ATP, glucose-6-phosphate, and creatine-phosphate, and mg/g muscle for glycogen.

나. 일반성분 및 cholesterol 측정

표 2는 한우 거세우의 등심과 안심 근육의 일반 분석 결과이다. 등심과 안심에서 관찰된 수분, 지방, 단백질, 회분의 함량에는 차이가 없었다. 그러나 두 근육간의 cholesterol 함량에는 차이가 있었다($P < 0.05$). 한우 거세우의 등심과 안심에서 cholesterol 함량(58.5 mg/100g muscle)은 하와이육의 cholesterol 함량 (59.0 mg/100g muscle) 보다 낮았으나 Christall과 Wese(1987) 이 보고한 New Zealand육 (56 mg/100g muscle) 보다는 높게 나타났다. 이런 차이는 성과 사료의 영향에 의한 차이일 가능성이 있을 수 있고 품종에 따른 차이일 수도 있다고 추측되며 이들 요인이 도체의 cholesterol 함량에 영향을 줄 수도 있다고 여겨진다.

Table 2. Proximate Composition of LD and PM Muscles of Korea Native Cattle Steers.

Item	Longissimus dorsi(LD)	Psoas major(PM)
Moisture %	70.9 ± 1.11	69.6 ± 1.07
Lipid %	5.49 ± 1.00	7.61 ± 1.04
Protein %	22.5 ± 0.46	21.4 ± 0.98
Ash %	1.16 ± 0.147	1.40 ± 0.107
Cholesterol (mg/100g muscle)	67.6 ± 1.84	58.5 ± 0.35

Data are expressed as mean ±SEM(n=8). Average body weight was 550kg.

다. 연도 측정

표 3은 안심과 등심의 drip loss와 shear force에 대한 결과이다. Shear force는 사후 21일 동안 두 근육의 연도 변화를 알아보는 것으로 사후 1일과 21일 사이에는 등심의 shear value는 안심보다 높았다. 이런 결과에 의하면

안심 이 등심보다 숙성 기간이 더 짧다는 것을 알 수 있다. 한우 수소의 shear value를 미국의 다른 연구 결과와 비교해 보면 21일째의 등심은 조사료만으로 마무리 비육된 Hawaii육(Hereford*Santa Gertrudis)의 shear value인 8.5보다 높았고, Fukumoto 등(1995) 비육후기 농후사료를 급여한 비육우에서 조사된 shear value인 7.2 보다도 높았다. Drip loss는 사후 21일 동안 두 근육에서 점진적으로 감소했으며, 사후 7일, 14일에는 두 근육에서 차이가 있었으나($p<0.05$) 21일에는 차이가 없었다.

Table 3. Changes in shear force and cooking loss of from Korean Native Cattle Steers

Day	Shear force, kg/core		Cooking loss, %	
	LD	PM	LD	PM
1	11.606±5.80	9.460±4.73	15.967± 7.98	19.538± 9.77
3	10.692±5.35	9.917±4.96	20.397±10.20	21.965±10.98
7	10.785±5.40	8.803±4.40	20.320±10.16	23.860±11.93
14	9.926±4.96	8.510±4.25	20.718±10.35	26.193±13.10
21	7.457±3.73	8.523±4.26	23.510±11.76	26.100±13.05

The values for shear force were measured from 1.8 cm diameter core samples taken 1 inch LD and PM steak cooked at 75°C water bath for 1h. The values are mean±SD (n=4).

라. 지방산화 측정

그림 7은 한우 거세우의 지방산화측정 (TBA method) 분석 결과이다. 지방산화 측정은 육질과 관련하여 중요한 요소이다. 안심이 등심에 비해 지방산패도가 시간이 경과할수록 급격히 증가하며, 14일, 21일째에서 두 근육간에 차이가 있었다($p<0.05$). 한우 거세우 역시 지방산화도의 측정은 다른 연구 결과들과 같이 안심 근육의 산패도가 높았다 (Faustman과 Cassens, 1991).

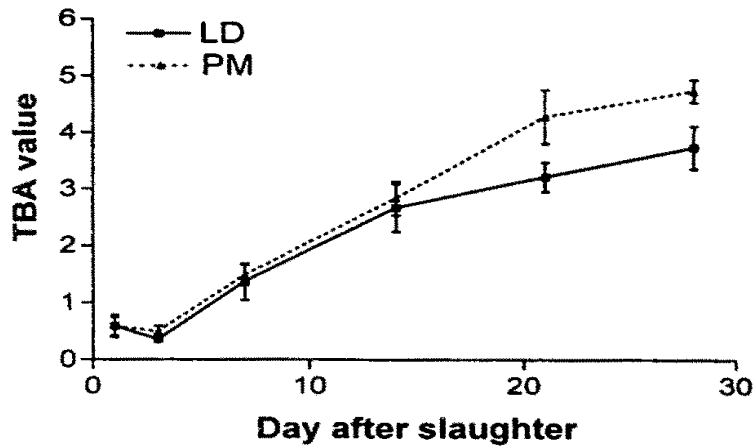


Figure 7. Changes in Postmortem Muscle TBA Values in Hanwoo steers

마. Histology

표 4는 한우 거세우의 등심과 안심에서 muscle fiber type의 함량에 대한 결과이다. 호기성 대사를 하는 type I을 보면 등심보다 안심의 수치가 높았고 혐기성 대사를 하는 type IIA 역시 안심에서 함량이 높았으나, 혐기성과 호기성을 동시에 하게되는 중간적 성질의 type IIB는 등심에서의 수치가 약 2배 높았다. 이러한 결과로 볼 때 사후 근육 대사와 근육 fiber type은 상호 연관을 가지고 나타나며, 이는 연도와도 연관하여 생각해 볼 수도 있다. 그러나, 품종간에는 근 섬유 type에 차이가 없는 것으로 알려져 있다 (Hunt와 Hedrick, 1977; Okerman 등, 1984).

Table 4. Fiber Type Distribution and Size in LD and PM Muscle of Intact Korean Native Cattle Steers

Item	Longissimus dorsi(LD)	Psoas major(PM)
Muscle fiber, %		
Type I	42.3 ± 5.65	51.3 ± 6.96
Type IIA	26.8 ± 4.62	35.2 ± 4.25
Type IIB	30.2 ± 4.70	16.2 ± 4.72

Data are expressed as mean ±SEM (n=4).

표 5는 한우 거세우육의 collagen 함량인데, LD에서 높았으나 유의적인 차이는 없었다.

Table 5. Collagen contents of LD and PM Muscle of Intact Korean Native Cattle Steers

Item	Longissimus dorsi(LD)	Psoas major(PM)
Collagen (g/100g)	0.6230 ± 1.30	0.4125 ± 1.49

Data are expressed as mean ±SEM (n=4).

바. Muscle protein gel electrophoresis

그림 8은 muscle protein gel electrophoresis (4% gel)의 결과로 titin과 nebulin의 degradation 분석을 위한 실험이었다. a가 titin이고 b가 nebulin이다. c는 titin degradation product로 추정하며, 숙성이 진행될수록 c의 band가 점점 증가하였고 동물의 시료에 따라 1주와 2주 및 3주에서 나타나는 것이 달라 이 band는 연도와 연관성이 있는 것으로 보였다. c, d band는 1주부터 나타나기 시작하고 a band는 2주부터 나타나기 시작하였다. 숙성이 진행됨에 따라 nebulin band인 b가 점점 사라지는 것을 볼 수가 있었다. LD와 PM의 차이를

보면 PM에서 b의 band가 훨씬 빨리 사라지는 것이 관찰되었고, LD에서는 a의 band가 거의 1주에서나 2주에서도 나타났는데 PM에서는 1주만 지나도 관찰하기 어려워졌다.

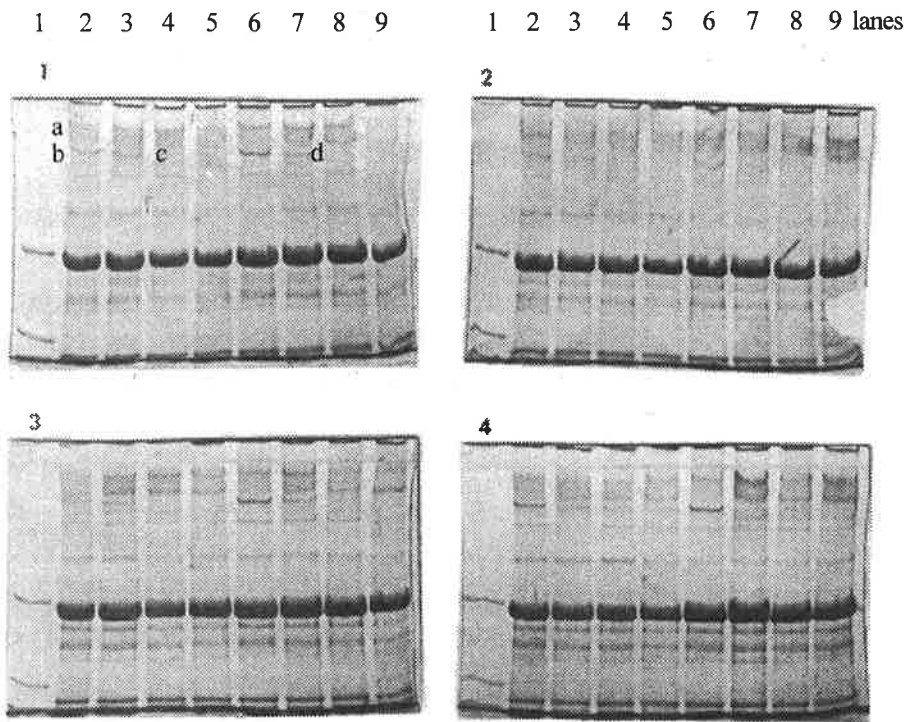


Figure 8. The SDS-PAGE analysis on a 4% polyacrylamide gel (acrylamide: N, N' -bis-methylene acrylamide = 37:1) of muscles from Korean Native cattle steers. Numbers indicate samples from different animals. Lane 1, standard; lanes 2-5, longissimus muscle; lanes 6-9, tenderloin muscle. Lanes 2 and 6, 3 day postmortem; lanes 3 and 7, 1 week postmortem; lanes 4 and 8, 2 week postmortem; lanes 5 and 9, 4 week postmortem. The standard (lane 1) contains myosin (200kD) and β -galactosidase (116kD).

3. 미국 하와이육의 육질 분석

가. 근육대사물 분석 및 pH 측정

그림 9는 미국 하와이 거세우의 사후 pH 변화를 나타낸 것이다. 한우 거세우의 1시간 시료의 pH는 6.69이고 하와이 거세우의 도살 직후 0시간 시료 pH는 6.90으로 하와이 거세우가 높게 나타났으며, 12시간 시료의 하와이 거세우는 5.82였으나 한우 거세우는 6.17로 한우 거세우가 높게 나타났다. 최종 pH는 한우 거세우가 5.85로 하와이 거세우의 5.60보다 높았다. 하와이 거세우는 12, 24시간에서 급격히 감소하였으나 한우 거세우는 완만히 감소하는 추세를 보였다.

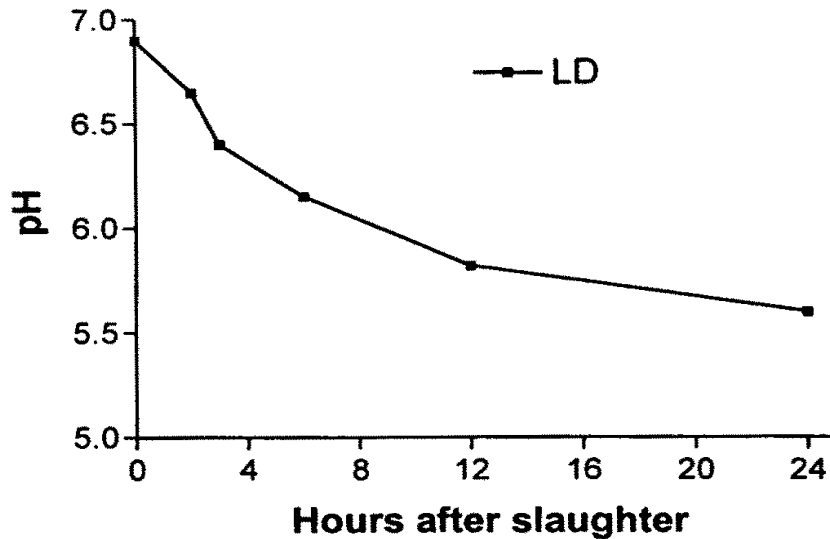


Figure 9. Change in postmortem muscle pH of Hawaiian steers

ATP 함량은 사후 12시간까지 급격히 감소하나 24시간까지는 서서히 감소했으며 glucose-6-phosphate는 사후 6시간에서 12시간까지 급속하게 증가했다 (그림 10). Creatine-phosphate는 사후 2, 3, 6, 12시간에는 빠르게 감소했으며, 그 이외의 시간에는 완만히 감소했으나 glycogen은 24시간까지 매우 빠른 속

도로 감소하였다.

한우 거세우는 사후 1, 3시간에 ATP 함량이 증가하지만, 하와이 거세우에서는 감소하는 경향을 보이고 24시간까지 꾸준히 감소하였으나 한우 거세우는 증가하다 감소하고 다시 12시간부터는 증가하는 추세였다. Glucose-6-phosphate는 하와이 거세우와 한우 거세우 비슷하게 증가하는 경향을 보였다. Creatine-phosphate는 하와이 거세우에서 특이할만한 점이 없이 감소하였으나 한우 거세우에서는 1, 3, 6시간에 걸쳐 급속히 감소하나 이후 24시간까지는

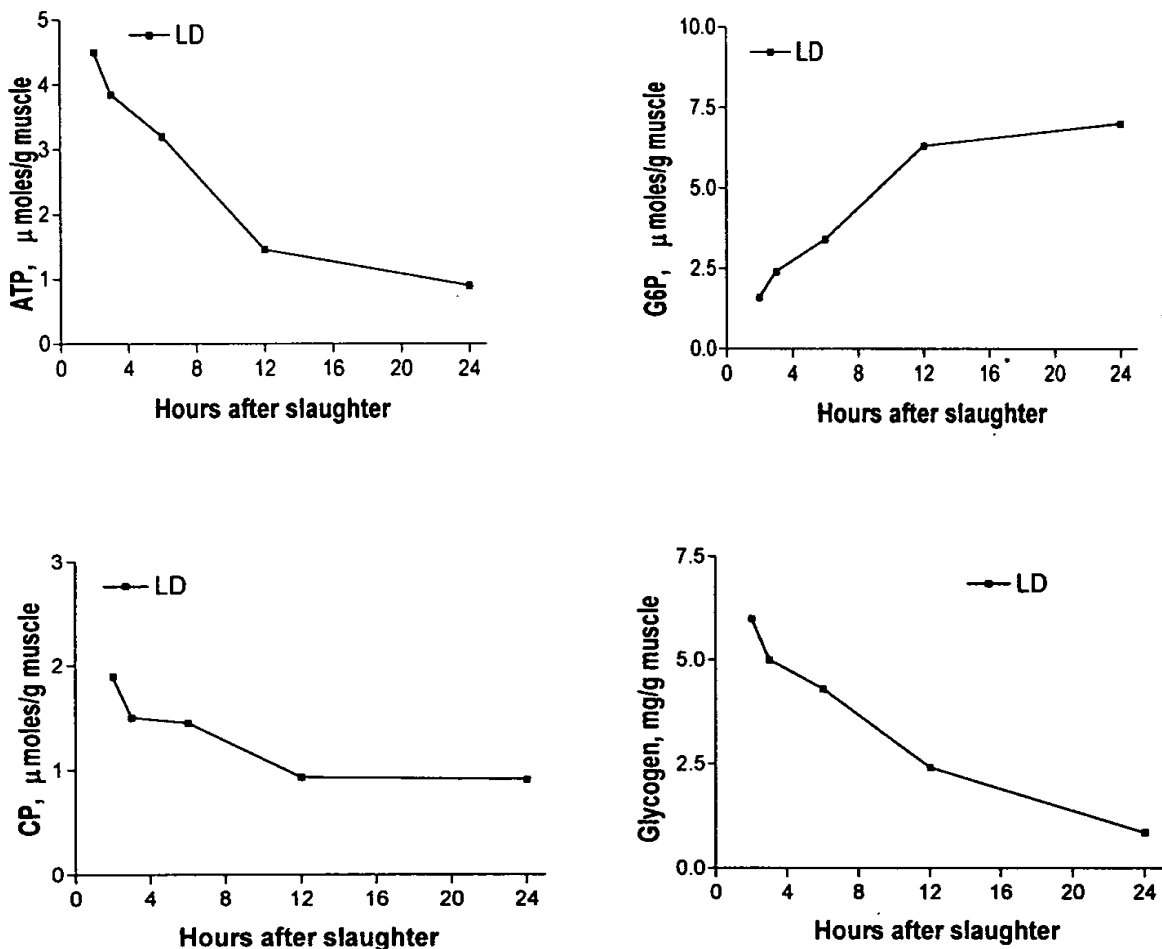


Figure 10. Change in metabolite concentrations during the 24hr postmortem period. The unit of metabolite concentration is μ moles/g muscle for ATP, glucose-6-phosphate, and creatine-phosphate, and mg/g muscle for glycogen.

유사하였다. Glycogen 함량의 경우 하와이 거세우와 한우 거세우가 특별히 다른 점 없이 비슷하게 감소했으나 첫 2시간과 마지막 24시간의 수치가 한우 거세우보다 하와이 거세우에서 낮았다.

나. 일반성분 및 cholesterol 측정

표 6은 미국 하와이 거세우 등심의 일반분석 결과이다. 한우 거세우의 등심 지방 함량은 5.49로써 하와이 거세우의 2.92보다 훨씬 높았다. 이는 미국 거세우의 marbling score와 관련되어 나타난 결과로 보여진다. 수분, 단백질, 회분의 함량 차이는 거의 없었다.

Table 6. Carcass Characteristics and Proximate Analysis of LD Muscle in Hawaii Steers

Item	Longissimus dorsi (LD)
Carcass wt (lb)	591.1 ± 18.7
Maturity	A
Backfat (in)	0.22 ± 0.021
Marbling ^a	3.6 ± 0.23
Quality ^b	3.9 ± 0.35
Color ^c	4.4 ± 0.14
Firmness ^d	4.5 ± 0.16
Final muscle pH	5.50 ± 0.015
<u>Proximate Analysis</u>	
Moisture (%)	73.1 ± 0.30
Lipid (%)	2.92 ± 0.305
Protein (%)	23.0 ± 0.12
Ash (%)	1.04 ± 0.035

^a9=abundant, 8=moderately abundant, 7=slightly abundant, 6=moderate, 5=modest, 4=small, 3=slight, 2=trace, 1=practically devoid.

^b8=prime, 7=choice⁺, 6=choice⁰, 5=choice⁻, 4=select⁺, 3=select⁰, 2=select⁻, 1=standard.

^c7=dark, 1=pale.

^d7=firm, 1=soft.

다. 연도 측정

표 7은 미국 하와이 거세우 등심의 cooking loss와 shear force에 대한 결과이다. 한우 거세우의 등심과 비교했을 때 미국 하와이 거세우의 연도가 훨씬 낮았으며, cooking loss는 1일째 한우 거세우의 등심 수치를 제외하고는 차이가 없었다. 한우 거세우 등심의 1일째 연도는 11.6이나 하와이 거세우 등심의 2일째 연도는 8.96으로 한우 거세우의 21일째인 7.46의 수치와 거의 비슷하게 나타났으며, 21일째는 한우 거세우가 7.46으로 하와이 거세우의 5.65보다 높았다. 연도는 품종에 따라 다른 것으로 알려져 있다 (Shackelford 등, 1995; Wheeler 등, 1990).

Table 7. Changes in Shear Force and Cooking Loss of LD Steaks from Hawaii Steers

Day	Shear force, kg/core	Cooking loss, %
2	8.96 ± 1.747	22.3 ± 1.58
7	6.78 ± 1.362	21.8 ± 2.45
14	6.50 ± 1.703	22.0 ± 2.71
21	5.65 ± 1.214	22.7 ± 2.76
28	4.92 ± 0.907	23.3 ± 1.52

The values for shear force were measured from 1.3 cm diameter core samples taken 1 inch LD steak cooked at 75°C water bath for 1 hr as described in the materials and methods section. The values are mean±SD (n=11).

라. 지방산화 측정

그림 11은 미국 하와이 거세우 등심의 지방산화 측정 결과이다. 미국 하와이육에서는 2일째는 0.32로써 0.35의 한우육과 차이가 없었으나, aging이 진행될수록 한우육은 3.75까지 증가하였으나 미국 하와이육에서는 2.13으로 한

우육보다 낮았다. 지방침착도가 높은 한우육에 비해 지방침착도가 낮은 미국 하와이육의 지방 산패도가 낮은 것으로 추정된다. 지방산패도는 meat discoloration 및 palatability와 관련이 있으므로 (Gray와 Pearson, 1987), 한우육과 외국육은 aging 시간을 달리 조절하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

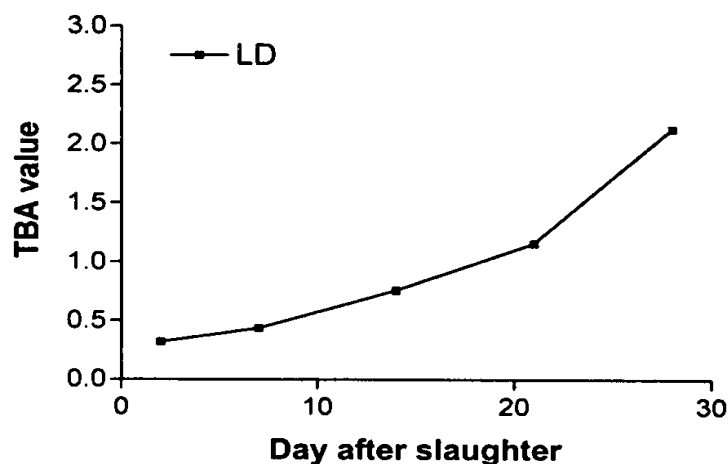


Figure 11. Changes in Postmortem Muscle TBA Values in Hawaii steers

제 4절 적 요

쇠고기 수입이 자유화된 현 상황에서 수입 쇠고기와 차별화를 위해서 한우육의 고급화가 필수적이다. 국내 소비자들이 한우를 선호하는 것에 비해 이를 설명할 만한 한우 육질의 특징적인 요소들이 아직까지 제시되지 못하고 있는 실정이다. 따라서, 한우육에 대한 육질을 분석하고 이를 외국 품종들과 비교하여 한우육의 우수성을 과학적으로 입증하는 연구가 필요하다.

본 과제에서는 한우 수소와 거세우의 육질 (일반성분, cholesterol 함량,

pH, metabolites 함량, tenderness와 cooking loss, muscle fiber type 분류, 지방산 화도, collagen, muscle protein 등)을 분석하고, 일부의 육질에 대하여는 미국 하와이에서 forage-finished 조건으로 사육된 Hereford와 Angus 교잡 거세우육의 특성과 비교하였다. 약 550kg의 한우 수소와 540kg의 한우 거세우를 도살 후 등심(*longissimus dorsi*; LD)과 안심(*psoas major*; PM)에서 육질의 특성을 조사하였다.

한우 수소의 안심 근육에서 pH 기울기는 등심보다 훨씬 급하게 나타났다. ATP의 소모는 등심보다 안심에서 더 빨랐다. 사후 첫 12시간 동안 안심에서 glucose-6-phosphate의 상승은 등심보다 빨랐으나, 24시간에는 두 근육간에 차이가 없었다. 등심과 안심의 수분, 지방, 단백질 및 회분 함량은 차이가 없었다. 등심 shear value는 사후 1일과 3일 사이에 안심보다 높았으나, 사후 7, 15, 21일에는 두 근육간에 차이가 없었다.

한우 거세우의 안심 pH 기울기는 등심보다 훨씬 급하게 나타났다. 안심 pH 기울기는 처음 12시간 동안은 빠르게 나타나지만, 등심 pH 기울기는 사후 24시간까지 완만하게 감소하였다. ATP의 소모는 등심보다 안심에서 더 빨랐다. 사후 24시간 동안 안심 glucose-6-phosphate의 상승은 등심보다 빨랐다. Creatine phosphate는 도살 후 6시간 동안은 현저히 감소하였으나 12시간 부터 두 근육에서 거의 고갈되어 사후 동안 주요한 변화는 없었다. 안심 glycogen 함량은 도살직후부터 등심보다 훨씬 높았고, 사후 24시간 동안 높은 수준을 보였다. 등심과 안심에서 수분, 지방, 단백질 및 회분 함량은 차이가 없었다. 사후 1일과 21일 사이에는 등심 shear value는 안심보다 높았다. 이런 결과는 안심이 등심보다 숙성 기간이 더 짧다는 것을 시사하고 있다. Drip loss는 사후 21일 동안 두 근육에서 점진적으로 감소하였고, 사후 7일, 14일에는 두 근육에서 차이가 있었으나($p < 0.05$), 21일에는 차이가 없었다. 안심이 등심에 비해 지방 산패도가 시간이 경과할수록 급격히 증가하였으며,

14일, 21일째에서 두 근육간에 차이가 있었다($p < 0.05$). 호기성 대사를 하는 muscle fiber type I은 등심보다 안심이 높았고, 혐기성 대사를 하는 type II 역시 안심에서 높았으나, 혐기성과 호기성을 동시에 하는 중간적 성질의 type IIB는 등심에서 약 2배 높았다.

한우 거세우의 1시간 시료의 pH는 6.69이고 하와이 거세우의 도살 직후 0시간 시료 pH는 6.90으로 하와이 거세우가 높게 나타났으나, 12시간 시료의 하와이 거세우는 5.82이고 한우 거세우는 6.17로 한우 거세우가 높았다. 최종 pH는 한우 거세우가 5.85로 하와이 거세우의 5.60보다 높았다. 하와이 거세우는 12, 24시간에서 급격히 pH가 감소하였으나 한우 거세우는 완만히 감소하는 추세를 보였다. ATP 함량은 한우 거세우는 사후 1, 3시간에 증가하지만 하와이 거세우에서는 감소하는 경향을 보였고, 24시간까지 꾸준히 감소하였으나 한우 거세우는 증가하다 감소하고 다시 12시간부터는 증가하는 추세를 보였다. Glucose-6-phosphate는 하와이 거세우와 한우 거세우에서 유사하게 증가하는 경향을 보였다. Creatine-phosphate는 하와이 거세우에서 특이할 만한 점이 없이 감소하였으나, 한우 거세우에서는 1, 3, 6 시간에 걸쳐 급속히 감소하였으나 이후 24시간까지는 거의 비슷한 수치를 보여 주었다. Glycogen 함량은 하와이 거세우와 한우 거세우가 유사하게 감소했으나, 첫 2시간과 마지막 24시간에는 한우 거세우보다 하와이 거세우가 낮았다. 등심 지방함량은 한우 거세우가 5.49로 하와이 거세우의 2.92보다 훨씬 높았다. 이는 미국 거세우의 marbling score와 연관이 있는 것으로 보여진다. 연도는 한우 거세우 등심보다 하와이 거세우가 훨씬 낮았으며, cooking loss는 1일째 한우 거세우 등심 수치를 제외하고는 차이가 없었다. 한우 거세우 등심의 1일째 연도는 11.6이나 하와이 거세우 등심의 2일째 연도는 8.96으로 한우 거세우의 21일째인 7.46의 수치와 거의 비슷하게 나타났으며, 21일째인 한우 거세우의 7.46인 것과 비교해 하와이 거세우의 21일째는 5.65로서 매우 낮았다. 미국 하와

이육의 지방산패도는 2일에 0.32로 한우육의 0.35와 차이가 없었으나, aging이 진행될수록 한우육은 3.75까지 높아졌으나 미국 하와이육에서는 2.13으로 한우육에 비해서는 낮게 나타났다. 지방침착도가 높은 한우육보다 지방침착도가 낮은 미국 하와이육에서 지방 산패도가 낮게 나타나는 것으로 사료된다.

결론적으로 한우 거세우와 미국 하와이 거세우의 육질 특성을 비교한 결과, 몇 가지 특징적인 차이를 확인하였다. 등심지방 함량이 하와이육보다 한우 거세우에서 훨씬 높았으며, 지방산패도는 aging이 진행될수록 한우 거세우에서 높았다. 이러한 결과는 한우육이 하와이육보다 근내지방도가 높아 고급육으로써의 가치가 높다는 긍정적인 측면도 있지만, 한우육에서 지방산패가 더 많이 일어난다는 부정적인 측면도 볼 수 있다. 연도는 한우 거세우 등심보다 하와이육에서 훨씬 낮음을 볼 때, 한우육의 육질을 향상시키기 위해서는 연도를 고려해야 함을 보여주는 결과이다.

제 5절 인용문헌

- AOAC. 1980. Official Methods of Analysis (13th Ed.). Washington, D.C.: Association of Official Analytical Chemists.
- Bendall, J. R. 1973. Postmortem changes in muscle. In G. H. Bourne (Eds.), The Structure and Function of Muscle (pp. 244-309). New York: Academic Press.
- Christall, B. B. and R. West. 1987. Composition of Selected New Zealand Beef Cuts. (MIRINZ 851), Hamilton: Meat Industry Research Institute of New Zealand.

- Dalrymple, R. H. and R. Hamm. 1973. A method for the extraction of glycogen and metabolites from a single muscle sample. *J. Food Technol.* 8:439.
- Faustman, C. and R. G. Cassens. 1991. The effect of cattle breed and muscle type on discoloration and various biochemical parameters in fresh beef. *Journal of Animal Science* 69:184-193.
- Fukumoto, G. K., Y. S. Kim, D. Okuda and H. Ako. 1995. Chemical Composition and Shear Force Requirement of Loin Eye Muscle of Young, Forage-fed Steers. (Research Extension Series 161). Honolulu: Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources.
- Gray, J. I. and A. M. Pearson. 1987. Rancidity and warmed-over flavor. In A. M. Pearson and T. R. Dutson (Eds.), *Advances in Meat Research* 221-269. New York: Van Nostrand Reinold Company Inc.
- Guth, Z., F. J. Samaha and R. W. Alberts. 1970. The neural regulation of some phenotypic difference between the fiber types of mammalian skeletal muscle. *Experimental Neurology* 26:126-135.
- Hood, R. L. and E. Allen. 1971. Influence of sex and postmortem aging on intramuscular and subcutaneous bovine lipids. *Journal of Food Science* 36:786-790.
- Hunt, M. C. and H. B. Hedrick. 1977. Profile of fiber types and related properties of five bovine muscles. *Journal of Food Science* 42:513-517.
- Johnston, D. M., D. F. Stewart, W. G. Moody, J. Boling and J. D. Kemp. 1975. Effect of breed and time on feed on the size and distribution of beef muscle fiber types. *Journal of Animal Science* 40:613-620.
- Johnston, D. M., W. G. Moody, J. Boling and N. W. Bradley. 1981. Influence

- of breed type, sex, feeding systems and muscle bundle size on bovine fiber type characteristics. *Journal of Food Science* 46:1760-1761.
- Lamprecht, W., P. Stein, F. Heinz and H. Weisser. 1974. Creatine phosphate. In "Methods of Enzymatic Analysis." 2nd ed. Vol. 4. pp. 1777. Academic Press, New York.
- Lamprecht, W. and I. Trautschold. 1974. Adenosine-5,-triphosphate. Determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In "Methods of Enzymatic Analysis." 2nd ed. Vol. 4. pp. 2101. Academic Press, New York.
- Lang, G. and G. Michael. 1974. D-glucose-6-phosphate and D-fructose-6-phosphate. In "Methods of Enzymatic Analysis." 2nd ed, Vol. 3, pp. 1238. Academic Press, New York.
- May, M. L., M. E. Dikeman and R. Schalles. 1977. Longissimus muscle histologic characteristics of Simmental x Angus, Hereford x Angus and Limousin x Angus crossbred steers as related to carcass composition and meat palatability traits. *Journal of Animal Science* 44:571-580.
- MINITAB. 1989. Statistical Software. State College, PA: Minitab Inc.
- Ockerman, H. W., D. Jaworek, B. VanStavern, N. Parrett and C. J. Pierson. 1984. Castration and sire effects on carcass traits, meat palatability and muscle fiber characteristics in Angus cattle. *Journal of Animal Science* 59: 981-990.
- Passonneau, J. V. and O. H. Lowry. 1993. *Enzymatic Analysis: A Practical Guide*. Totowa, NJ: Humana Press.
- Pearse, A. G. E. 1960. *Histochemistry, Theoretical and Applied*. London: Churchill.
- Rhee, K. S., T. D. Dutson, G. C. Smith, R. L. Hostetler and R. Reiser. 1982.

- Cholesterol content of raw and cooked beef longissimus muscles with different degrees of marbling. *Journal of Food Science* 47:716-719.
- Shackelford, S. D., T. L. Wheeler and M. Koochmaraie. 1995. Relationship between shear force and trained sensory panel tenderness ratings of 10 major muscles from *bos indicus* and *bos taurus* cattle. *Journal of Animal Science* 73:3333-3340.
- Tarladgis, B. G., B. M. Watts, M. T. Younathan and L. Jr. Duncan. 1960. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *Journal of American Oil Chemists Society* 37:44-48.
- Terrell, R. N., G. C. Suess, and R. W. Bray. 1969. Influence of sex, liveweight and anatomical location on bovine lipids. II. Lipid components and subjective scores of six muscles. *Journal of Animal Science* 28:454-458.
- Tu, C., W. D. Powrie and O. Fennema. 1967. Free and esterified cholesterol content of animal muscles and meat products. *Journal of Food Science* 32:30-34.
- Wheeler, T. L., J. W. Savell, H. R. Cross, D. K. Lunt and S. B. Smith. 1990. Mechanisms associated with the variation in tenderness of meat from Brahman and Hereford cattle. *Journal of Animal Science* 68:4206-4220.