

한우 c-fos 유전자의 염기서열 및 발현분석

유성란* · 정행진* · 정기철* · 이준현* · 조규완** · 최재관*** · 나기준*** · 상병찬*

충남대학교 동물자원학부*, 수의학과**, 농촌진흥청 축산기술연구소***

Sequence and Expression Analysis of c-fos Proto-oncogene in Korean Cattle (HANWOO)

S. L. Yu*, H. J. Chung*, K. C. Jung*, J. H. Lee*, K. W. Cho**, J. G. Choi***,
K. J. Na*** and B. C. Sang*

Division of Animal Science and Resources,*

Department of Veterinary Medicine**, Chungnam National University, Daejeon 305-704, Korea
Daekwanryong Branch, National Livestock Research Institute, R.D.A., Phyeongchang 232-952, Korea***

ABSTRACT

Cellular FOS(c-fos) protein is a transcription factor that forms heterodimers mostly with c-jun family and stimulates the transcription of genes containing AP-1 regulatory elements. This c-fos expression can control growth and differentiation of various precursor cells including myoblasts. The controls by c-fos gene have been identified for affecting skeletal muscle fiber traits which are the key determinants of meat quality in pigs. As a first step for identifying the relationship between c-fos gene and meat quality traits in cattle, we fully sequenced 1,443 bp of Hanwoo c-fos mRNA and analyzed expression patterns from various organs and muscle tissues. The sequence identities of Hanwoo c-fos with that of human, pig and mouse showed 89.8%, 93.3% and 87%, respectively. Analyses of the northern blot showed high c-fos expressions were obtained in spleen and rib muscle from 7 organs and 9 different parts of muscles investigated. These results presented here can be used as a valuable marker for meat quality related traits in cattle with further verification.

(Key words : Bovine, c-fos, Sequence homology, Expression pattern, Meat quality)

I 서 론

Cellular Fos(c-fos) 유전자는 생쥐에 전이되어 골수 암을 유발시키는 FBJ murine osteosarcoma virus의 연구에 의해 처음 밝혀졌으며(Finkel 등, 1966), 일반적으로 c-jun family와 결합하여 전사조절인자(transcription factor)로써 역할을 하는 핵내 인단백질중 하나이다. 특히 이 유전자는 주로 activating factor-1(AP-1) regulatory element를 가진 유전자들의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다(Glover 등, 1995). 또한, c-fos 유전

자는 수정란의 성장과 분화, 혈구 형성, 신경계, 근육, 골모세포의 통제에 중요한 역할을 한다는 것이 *in vitro* 실험에 의해 밝혀졌으며, *in vivo* 실험결과에서는 c-fos 유전자를 과발현시킬 경우 생쥐에서 뼈, 연골, 혈구형성 세포발달에 영향을 주었다고 보고한 바 있다(Wang 등, 1991). c-fos 유전자를 knockout시킨 생쥐에서는 성장이 둔화되고, 뼈의 재생산 및 치아의 맹출이 결핍되며 혈구생성에 변화가 일어났고(Wang 등, 1992; Johnson 등, 1992), 돌연변이(mutant) 생쥐에서는 과골 세포와 대식세포의

Corresponding author : B. C. Sang, Division of Animal Science and Resources, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-704, Korea. Tel : 042-821-5788, Fax : 042-823-2766, E-mail : bcsang@cnu.ac.kr

관계가 변화하였고(Grigoriadis 등, 1995), 신경계의 흥분성과 생존을 조절하는 세포의 메커니즘을 조절하는 등의 다양한 역할에 c-fos 유전자가 관여하는 것으로 보고되어 있다(Zhang 등, 2002).

이 c-fos 유전자는 myogenesis와도 관계가 있는 것으로 알려져 있는데 특히, 근육세포가 근육으로 발달하는 과정에서 근육세포의 terminal differentiation에 중요한 요인으로 작용하는 myogenin과 myoD 유전자가 c-fos promoter의 E-box에 결합하여 c-fos 유전자의 발현을 억제시킨다는 보고가 있다(Trouche 등, 1995). 또한 c-fos 유전자의 down regulation이 transcription factor AP-1을 조절하여 myocyte의 terminal differentiation과 myotube의 형성에 필수적인 역할을 한다고 알려졌다(Lehtinen 등, 1996). 최근 돼지에서 c-fos 유전자의 염기서열상의 변이가 백색섬유의 양을 증가시켰으나 백색섬유의 직경이 감소하였다는 결과로 c-fos 유전자는 육질의 향상에 영향을 미치는 것으로 추측되어졌다(Reiner 등, 2002).

이와 같이 c-fos 유전자는 골격 근육(skeletal muscle)의 발달에 있어서 차이를 나타내는 것으로 알 수 있는데, 현재까지 소에서 c-fos 유전자의 연구는 전무한 실정이며 한국 재래종인 한우를 이용해 소에서 c-fos 유전자의 발현양상과 mRNA 염기서열을 알아보기 위하여 본 연구를 수행하였다.

II 재료 및 방법

1. 공시재료

본 연구에 사용된 공시재료는 축산기술연구소에서 도축된 12개월령 한우 1두의 9개 근육 부위(안심, 갈비, 등심, 목심, 채끝, 우둔, 설도, 사태, 양지) 및 7개의 장기 조직(좌심방, 우심방, 간, 비장, 신장, 우심실, 좌심실)을 이용하였다. RT-PCR 및 Northern blotting을 위한 신선한 시료를 얻기위해 도축한 후 30분 이내에 모든 조직이 채취되었으며, 채취된 조직은 바로 액체질소에 넣어 실험실로 옮겨졌다.

2. Total RNA 추출

한우의 각 조직 1.5 g를 15 ml의 Tri Reagent (Molecular Research Center, INC.) 용액으로 분쇄한 다음 chloroform 7.5 ml을 첨가하여 혼합한 후 4°C 서 12,000 rpm으로 원심분리하여 RNA 층을 얻었다. RNA 층을 새로운 튜브에 옮긴 후, 0.7 volume의 isopropanol로 RNA를 완전히 침전시킨 다음 75% ethanol-DEPC(diethylpyrocarbonate)로 씻어 낸 후 DEPC 처리된 RNase-free H₂O에 RNA를 용해시켰다. 추출된 RNA의 농도는 Spectrophotometer(Ultrospec2000, Pharmacia, U.S.A.)를 이용하여 260 nm 파장에서 측정 한 후, -70°C 저장하여 실험에 사용하였다.

3. 한우의 c-fos 유전자 증폭을 위한 database search

소에서 밝혀진 c-fos 유전자의 염기서열의 존재 유무를 알아보기 위하여 먼저 GenBank 및 TIGR database를 돼지의 c-fos mRNA coding sequence(GenBank accession number:AJ132510)를 이용하여 BLAST search를 실시하였다. BLAST search 결과 GenBank에는 소의 c-fos 유전자 중 일부분인 381 bp만이 밝혀졌음을 확인할 수 있었으며(GenBank accession number:AF069515), TIGR에는 assembled된 EST가 존재함을 확인하였다. 돼지 mRNA와 소의 TIGR EST sequence를 alignment해 본 결과 두 염기서열 간의 homology가 매우 높아(6.7×10^{-16}) 이 TIGR EST sequence (TC126632)는 소의 c-fos 유전자 임이 확인이 되었으며(Fig. 1), 또한 돼지의 c-fos 유전자 구성과 비교하여 볼 때 이 염기서열은 소의 c-fos 유전자 exon 1부터 exon 4의 일부분까지 확인이 되었다. 최근에 보완된 TIGR database에는 이 염기서열에 6개의 EST가 첨가되어 exon 1부터 exon 4의 전 부분의 염기서열이 새롭게 보고되어 있었다(TC153785). 이 결과로 미루어 볼 때 최근에 많은 연구가 된 EST들은 새로운 유전자의 염기서열을 얻는데 중요한 수단이 될 수 있으며 이 방법은 소에서 알려지지 않은 유전자를 PCR 증폭하기 위하여

Pig : 2639 GAGACAGACCAGCTAGAAAGACGAGAAGTCTGCTTTGCAGACTGAGATCGCCAACCTGCTG 2698
 (AJ132510)
 BOVINE : 652 GAGACAGACCAACTAGAAAGATGAGAAGTCGGCTTTGCAGACAGAGATTGCCAATCTGCTG 711
 (TC126632)
 Pig : 2699 AAGGAGAAGGAAAAACTCGAGTTCATCCTGGCAGCTCACCGACCTGCCTGCAAGATCCCT 2758
 BOVINE : 712 AAGGAGAAGGAAAAACTCGAGTTCATCCTAGCGGCTCACCGACCTGCCTGCAAGATCCCC 771
 Pig : 2759 GATGACCTGGGCTTCCCTGAAGAGATGTCTGTGGCTTCCCTTGATCTGAGTGGGGGCCTG 2818
 BOVINE : 772 GATGACCTGGGCTTCCAGAAGAGATGTCTGTGGCTTCTCTTGATCTGAGTGGGGGCCTG 831
 Pig : 2819 CCTGAGGCTGCCACCCCGAATCTGAGGAGGCCTTACCCTGCCCTCCTCAATGACCCG 2878
 BOVINE : 832 CCTGAGGCTGCCACCCCTGAATCTGAGGAGGCCTTACCCTGCCACTCCTCAATGACCCCT 891
 Pig : 2879 GAGCCCAAGCCCTCCGTGGAGCCAGTCAAGAACGTCAGCAGCATGGAGCTGAAGGCCGAG 2938
 BOVINE : 892 GAGCCCAAGCCCTCAGTGGAGCCCGTCAAGAGCGTCGGCAGCATGGAGCTGAAGGCTGAG 951
 Pig : 2939 CCCTTTGATGACTTCCCTGTTCCAGCATCGTCCAGGCCCGGGGCTCTGAGACAGCCCGC 2998
 BOVINE : 952 CCCTTTGATGACTACATGTTCCAGCATCATCCAGGCCAGCGGCTCGGAGACCCCGC 1011
 Pig : 2999 TCTGTGCCGGACATGGACCTGTCTGGTTCCTTCTATGCAGCAGACTGGGAGCCCTGCAT 3058
 BOVINE : 1012 TCTGTGCCAGACATGGACCTGTCTGGTTCCTTCTATGCAGCAGACTGGGAGCCCTGCAT 1071
 Pig : 3059 GGTGGCTCCCTGGGGATGGGGCCATGGCCACAGAGCTGGAGCCCCTGTGTACCCCGGTG 3118
 BOVINE : 1072 GGTGGCTCCCTGGGGATGGGGCCATGGCCACGGAGCTGGAGCCCCTGTGCACCCCGGTG 1131
 Pig : 3119 GTCACCTGCACCCAGCTGCACTACTTACACGTCTTCTTCGTTTACCTACCCGAG 3178
 BOVINE : 1132 GTCACCTGTACTCCAGCTGCACTACTTACACGTCTTCTTCGTTTACCTACCCGAG 1191
 Pig : 3179 GCTGACTCCTTCCCCAGCTGTGCGGCTGCCACCGCAAGGGCAGCAGC 3226
 BOVINE : 1192 GCTGACTCCTTCCCCAGCTGTGCGGCTGCCACCGCAAGGGCAGCAGC 1239

Fig. 1. Sequence search result of pig c-fos exon 4 sequence (GenBank accession number AJ132510) against TIGR BtGI (Bos taurus Gene Index) for easily extract cattle c-fos sequence which was not investigated before. High sequence homology (94.4%) between the two sequences indicates that the bovine c-fos sequence is genuine.

인간과 쥐 등 알려진 염기서열을 alignment하여 primer를 제작해 온 기존의 방법과 더불어 원하는 유전자를 쉽게 찾아낼 수 있는 방법이라고 생각한다.

4. RT-PCR 및 Cloning

RT(reverse transcription)는 total RNA 1µg을 이용하여 실시하였다. RNA 1µg에 1×enzyme buffer, 50 ng oligo dT, 0.25 mM dNTPs, 1 Unit

reverse transcriptase(Promega, U.S.A.), 0.5 Unit recombinant RNasin ribonuclease inhibitor(Promega, U.S.A.) 조성으로 42℃ 서 1시간 반응한 결과 생성된 1st cDNA를 이용하여 PTC-200(MJ Research, U.S.A.)에서 PCR를 실시하여 c-fos 유전자를 증폭하였다. PCR 혼합액에는 1st cDNA, 0.2 mM dNTPs, forward와 reverse의 2 pmol primer, 0.1 Unit *Taq* polymerase(Bioneer, KOREA), 1×buffer 조성으로 증폭시켰다. 사용한 primer는 Table 1에서 보는 것과 같이 TIGR(The Insti-

Table 1. Primers used for amplifying bovine c-fos gene in this study

Primer name	Primer sequence (5' -3')	Locations ¹⁾	Anneal. temp. (°C)
c-Fos #1	CTTAAGGAGCTGACACAGAG	11-30(TC126632)	58
c-Fos #2	ATCTTGACAGCAGGTCGGTG	748-767(TC126632)	
c-Fos #3	GATTGCCAATCTGCTGAAGG	696-715(TC126632)	58
c-Fos #4	TTCAAGTCCTTGAGGCCAC	3423-3442(AJ132510)	

¹⁾ Locations are based on the TIGR assembled bovine EST sequence for TC126632 and the porcine c-fos GenBank sequence for AJ132510.

tute for Gene Research, <http://www.tigr.org/>)의 소의 EST(Expressed Sequence Tag)와 NCBI(National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에 보고되어 있는 돼지의 c-fos 유전자에서 primer를 제작하여 PCR에 이용하였다. 각 primer의 염기서열 및 정보는 Table 1에 제시되어 있다. 1, 2번의 primer는 c-fos 유전자의 5'쪽을, 3, 4번의 primers는 c-fos 유전자의 3'쪽을 증폭하는데 이용이 되었다. PCR의 반응조건은 94°C 서 5분으로 1회 실시한 후, 94°C 서 30초, 58°C 서 30초, 72°C 서 30초씩 총 35회를 증폭시키고, 마지막으로 72°C 서 10분간 더 반응시켰다. PCR이 끝난 후 5µl의 증폭산물을 1.2%의 agarose gel에 전기영동하여 증폭여부 및 크기를 확인하였다. 이 증폭산물들은 pGEM-T easy vector(Promega, U.S.A.)에 ligation시켜 cloning한 후 제한효소인 *EcoRI*의 처리로 insert의 유무 및 정확한 insert size를 확인하였다.

5. c-fos 유전자의 염기서열 결정 및 분석

각 clone들의 염기서열을 결정하기 위하여 재조합된 Plasmid DNA 200 ng을 Bigdye terminator(PE Applied Biosystems, U.S.A.)를 사용하여 cycle sequencing reaction을 실시하였다. PCR 반응은 PE 9600(PE Applied Biosystems, U.S.A.)을 이용하여 96°C 서 1초, 50°C 서 5초, 60°C 서 4분간의 조건으로 25회 실시하였고, 반응이 끝난 PCR 산물은 ethanol로 정제한 후, ABI 377 자동염기서열 분석장치(PE Applied Biosystems, U.S.A.)를 사용하여 염기서열을 결정하고 분석하였다. 결정된 염기서열을 NCBI(National Center for Biotechnology Information,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)의 open reading frame finder에서 아미노산으로 예측하고 이를 GeneDoc(<http://www.psc.edu/blomed/genedoc/>) 프로그램에서 종간의 아미노산 상동성을 조사하였다.

6. Northern blot analysis

각 조직에서 추출한 total RNA 40µg을 3.3 volume의 sample buffer(1.3×MOPS[3-(N-morpholino)propane sulfonic acid] running buffer, 8.1% formaldehyde, 65% formamide)에 넣고 65°C 서 5분간 반응시켜 denaturation 후, 0.7 volume의 loading dye(50% glycerol, 0.4% Bromophenol Blue, 0.1% Xylene Cyanol)와 섞어 formaldehyde-agarose gel(1% agarose, 1×MOPS, 6.2% formaldehyde)에서 80 volt로 3시간동안 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하였다. 추출된 mRNA의 상태는 18s, 28s ribosomal RNA의 순도를 보고 결정을 하였다.

이 gel로부터 RNA를 20×SSC를 이용하여 Nylon-membrane에 삼투압작용으로 20시간 transfer한 다음 U.V. crosslinker(Upland, U.S.A.)로 RNA를 membrane에 완전히 고정시켰다. Membrane은 42°C 서 pre-hybridization solution(5×SSC, 5×Denhart's solution, 100µg/ml Herring sperm DNA, 50% formamide)에 넣고 1시간 동안 반응시킨 후, Redi Prome II kit(Amersham, U.S.A.)를 이용해 실온에서 1시간동안[α-³²P] dCTP 방사성 동위원소로 labelling한 c-fos cDNA중 약 760 bp를 probe로 이용하여 22시간 정도 hybridization을 실시하였다. Hybridization한 것을 2×SSC, 0.1% SDS 용액으로 한번 세정한 후, 같은 용액으로 42°C 서 10분간 세정 후에 1×SSC,

0.1% SDS용액으로 42℃ 서 10분간 세정한 다음 원하는 정도의 signal이 나타내면 X-ray film 을 넣고 -70℃ 서 3일간 감광시킨 후 현상하였다.

III 결과 및 고찰

1. 한우 c-fos 유전자의 PCR 및 cloning

한우의 c-fos 유전자 coding sequence를 알아 내기 위하여 추출한 mRNA를 이용하여 Table 1 의 primer로 RT-PCR을 하였다. 원하고자 하는 증폭산물의 크기인 약 760 bp의 5'쪽 c-fos 유전자 증폭산물과 약 760 bp의 3'쪽의 증폭산물이 얻어 이를 pGEM-T vector(Promega, U.S.A.)에 ligation시켜 Fig. 2에서 보는 것과 같이 c-fos 유

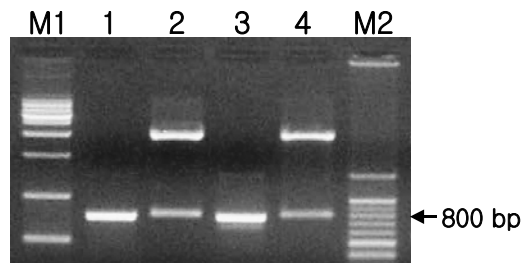


Fig. 2. A 1.2% agarose gel showing cloned bovine c-fos RT-PCR products. Lane 1: 5' rt of bovine c-fos gene, lane 2: A c-fos 5' clone digested with *EcoRI* restriction enzyme, lane 3: 3' rt of bovine c-fos gene, lane 4: A c-fos 3' clone digested with *EcoRI* restriction enzyme, M1 and M2: 1kb and 100 bp size standards, respectively(ELPIS, KOREA).

전자의 5' 3' 치가 삽입된 clone들을 얻을 수 있었다. 이 두 clone은 약 70 bp 정도가 겹쳐지도록 만들었다.

2. c-fos 유전자의 mRNA 염기서열 및 아미노산 서열의 비교분석

c-fos 유전자는 Van Straaten 등에 의해 사람의 경우 mRNA가 2.2 kb의 길이를 가지고 4개의 exon으로 구성되어 있는 것으로 보고되었고(GenBank accession number: V01512), 돼지의 경우 Reiner 등(2000)에 의해 genomic DNA 4.2 kb로 4개의 exon을 가지고 있음을 보고(GenBank accession number: AJ132510)한 바에 비해 소에 대한 c-fos 유전자의 염기서열은 mRNA의 381 bp만이 보고되어 있는 상태이다(GenBank accession number: AF069515). 이 연구에서 처음 밝혀진 소의 c-fos 유전자 전체 coding sequence를 다른 종에서 밝혀진 genomic organization과 비교하여 살펴 본 결과 소도 다른 종과 마찬가지로 4개의 exon으로 구성되어 있으며(Fig. 3), 종간에 높은 상동성을 보이는 것을 알 수 있었다(Table 2). 특히 돼지와 소 간의 상동성이 93.5%로 가장 높게 나타난 것으로 보아 돼지의

Table 2. Sequence homology for the c-fos mRNAs among species

Species	(unit:%)		
	Pig	Human	Mouse
Hanwoo	93.5	89.8	87.0
Pig	-	91.8	89.3
Human	91.8	-	88.5

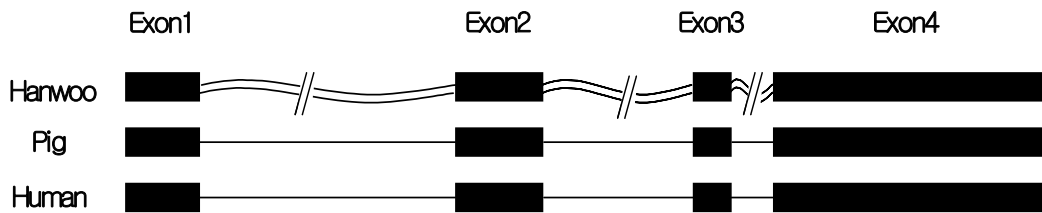


Fig. 3. Genomic organization of the c-fos gene among species. The intron sizes among species are also highly conserved. based on human and pig sequence information.

염기서열을 이용하여 제작된 primer 4가 성공적으로 PCR된 것은 두 종간의 높은 상동성에 기인한 것으로 사료된다.

또한, 이 연구를 통하여 한우에서 밝혀진 염기서열을 기존에 GenBank에 등록된 소의 염기서열과 비교하여 본 결과 278 bp 중 총 5개의 염기가 틀린 것을 알 수 있었다(Fig. 4). 또한 최근에 새롭게 assembled된 TIGR의 TC153785와 한우의 c-fos 유전자의 염기서열을 비교하여 본 결과 5개의 염기가 상이함이 밝혀졌다. 이 예상 돌연변이 염기들은 한우

특이적 SNP(single nucleotide polymorphism) marker일 가능성이 매우 높으며, 돼지에서 c-fos 유전자의 돌연변이가 육질의 향상에 영향을 준다는 보고가 있었으므로 이 SNP markers는 혈연관계가 없는 24마리의 한우개체를 이용하여 추가 분석함으로서 이 연구에서 밝혀진 SNP들이 sequencing이나 PCR에 의한 오류가 아니라 한우 고유의 marker임을 확인함과 동시에 한우의 육질향상에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

HANWOO	1	CTTAAGGAGCTGACACAGAGCCGGCGCGCAGCGAGCGAGCGAGCGAGCGAGCGACCCGCG	60
(AY322482)			
BOVINE	13	CTTAAGGAGCTGACACAGAGCCGGCGCGCAGCGAGCGAGCGAGCGAGCGAGCGACCCGCG	72
(TC153785)			
HANWOO	61	CACACCTACCCAGCTCTGCCCGGCAGCTCGCACCTGCCTCCGCCCTGCGCCCCTCGCCC	120
BOVINE	73	CACACCTACCCAGCTCTGCCCGGCAGCTCGCACCTGCCTCCGCCCTGCGCCCCTCGCCC	132
HANWOO	121	GGCTTTGACTGCTCGCGATCATGATGTTCTCTGGCTTCAACGCCGACTACGAGGCATCCT	180
BOVINE	133	GGCTTTGACTGCTCGCGATCATGATGTTCTCTGGCTTCAACGCCGACTACGAGGCATCCT	192
HANWOO	181	CCTCCCGCTGCAGCAGCGCCTCCCCGGCCGGGACAGTCTCTCCTACTACCACTCACCGG	240
BOVINE	193	CCTCCCGCTGCAGCAGCGCCTCCCCGGCCGGGACAGTCTCTCCTACTACCACTCACCGG	252
HANWOO	241	CCGACTCCTTCTCCAGCATGGGTTCTCCCGTCAATGCGCAGGACTACTGCACCGATCTGG	300
BOVINE	253	CCGACTCCTTCTCCAGCATGGGTTCTCCCGTCAATGCGCAGGACTACTGCACCGATCTGG	312
HANWOO	301	CCGTCTCCAGTGCCAACCTTCATCCCAACAGTGACTGCCATCTCGACCAGCCCGGACCTAC	360
BOVINE	313	CCGTCTCCAGTGCCAACCTTCATCCCAACAGTGACTGCCATCTCGACCAGCCCGGACCTAC	372
HANWOO	361	AATGGCTAGTACAGCCACCCTAGTCTCCTCCGTGGCCCCGTCCAGACCAGAGCCCCC	420
BOVINE	373	AATGGCTAGTACAGCCACCCTAGTCTCCTCCGTGGCCCCGTCCAGACCAGAGCCCCC	432
HANWOO	421	ACCCCTATGGAGTCCCTACTCCCTCAGCTGGGGCTTACTCCAGGGCTGGAGTCATGAAAA	480
BOVINE	433	ACCCCTATGGAGTCCCTACTCCCTCAGCTGGGGCTTACTCCAGGGCTGGAGTCATGAAAA	492
HANWOO	481	CCATGACAGGAGGCAGAGCTCAGAGCATTGGCCGAGGGGCAAGGTAGAACAGTTGTCCC	540
BOVINE	493	CCATGACAGGAGGCAGAGCTCAGAGCATTGGCCGAGGGGCAAGGTAGAACAGTTGTCCC	552
HANWOO	541	CAGAAGAAGAAGAGAAAAGGCGAATCCGAAGGGAAAGGAATAAGATGGCTGCAGCCAAAT	600
BOVINE	553	CAGAAGAAGAAGAGAAAAGGCGAATCCGAAGGGAAAGGAATAAGATGGCTGCAGCCAAAT	612
HANWOO	601	GCCGGAACCGGAGGAGGGAGCTGACTGACACCCTCCAAGCGGAGACAGACCAACTAGAAG	660
BOVINE	613	GCCGGAACCGGAGGAGGGAGCTGACTGACACCCTCCAAGCGGAGACAGACCAACTAGAAG	672

HANWOO	661	ATGAGAAGTCGGCTTTGCAGACAGAGATTGCCAATCTGCTGAAGGAGAAGGAAAAACTCG	720
BOVINE	673	ATGAGAAGTCGGCTTTGCAGACAGAGATTGCCAATCTGCTGAAGGAGAAGGAAAAACTCG	732
HANWOO	721	AGTTCATCCTAGCGGCTCACCGACCTGCCTGCAAGATCCCCGATGACCTGGGCTTCCCAG	780
BOVINE	733	AGTTCATCCTAGCGGCTCACCGACCTGCCTGCAAGATCCCCGATGACCTGGGCTTCCCAG	792
HANWOO	781	AAGAGATGTCTGTGGCTTCTCTTGATCTGAGTGGGGCCTGCCTGAGGCTGCCACCCCTG	840
BOVINE	793	AAGAGATGTCTGTGGCTTCTCTTGATCTGAGTGGGGCCTGCCTGAGGCTGCCACCCCTG	852
HANWOO	841	AATCTGAGGAGGCCTTACCCTGCCACTCCTCAATGACCCTGAGCCCAAGCCCTCAGTGG	900
BOVINE	853	AATCTGAGGAGGCCTTACCCTGCCACTCCTCAATGACCCTGAGCCCAAGCCCTCAGTGG	912
HANWOO	901	AGCCCGTCAAGAGCGTCGGCAGCATGGAGCTGAAGGCTGAGCCCTTTGATGACTACATGT	960
BOVINE	913	AGCCCGTCAAGAGCGTCGGCAGCATGGAGCTGAAGGCTGAGCCCTTTGATGACTACATGT	972
HANWOO	961	TCCAGCATCATCCAGGCCAGCGGCTCGGAGACCGCCCGCTCTGTGCCAGACATGGACC	1020
BOVINE	973	TCCAGCATCATCCAGGCCAGCGGCTCGGAGACCGCCCGCTCTGTGCCAGACATGGACC	1032
HANWOO	1021	TGCTGGTTCTTCTATGCAGCAGACTGGGAGCCCTGCATGGTGGCTCCCTGGGGATGG	1080
BOVINE	1033	TGCTGGTTCTTCTATGCAGCAGACTGGGAGCCCTGCATGGTGGCTCCCTGGGGATGG	1092
HANWOO	1081	GGCCTATGGCCACGGAGCTGGAGCCCCTGTGCACCCCGTGGTACCTGTACTCCCAGCT	1140
BOVINE	1093	GGCCTATGGCCACGGAGCTGGAGCCCCTGTGCACCCCGTGGTACCTGTACTCCCAGCT	1152
HANWOO	1141	GCACTACTTACACGTCTTCTTCGTCTTACCTACCCTGAGGCTGACTCCTTCCCAGCT	1200
BOVINE	1153	GCACTACTTACACGTCTTCTTCGTCTTACCTACCCTGAGGCTGACTCCTTCCCAGCT	1212
HANWOO	1201	GTGCGGCTGCCACCACGCAAGGGCAGCAGCAGCAACGAGCCTTCTCTGACTCGCTCAGCT	1260
BOVINE	1213	GTGCGGCTGCCACCACGCAAGGGCAGCAGCAGCAACGAGCCTTCTCTGACTCGCTCAGCT	1272
HANWOO	1261	CACCCACGCTGCTGGCCCTGTGAGCGGGCAGAGAGGGGAGGCAGTGGGCGTGCACGTGGC	1320
BOVINE	1273	CACCCACGCTGCTGGCCCTGTGAGCGGGCAGAGAGGGGATGCAGTGGGCGTGCACGTGGC	1332
HANWOO	1321	CACTGCCTGAGTTGGCGCATTACAGAGAGGAGAAACACGTCTTCCCTCGAGGGTTCCCAT	1380
BOVINE	1333	CACTGCCTGAGTTGGCGCATTACAGAGAGGAGAAACACGTCTTCCCTCGAGGGTTCCCAT	1392
HANWOO	1381	AGACCTAGGGAGGACCTTATCTGTGCGTGAAACACACCAGGCTGTGGGCCTCAAGGACTT	1440
BOVINE	1393	AGACCTAGGGAGGACCTTATCTGAGCGTGAAACACACCATGCTGAGGGCCTCAAGGACTT	1452
HANWOO	1441	GAA	1443
BOVINE	1453	GCA	1455

Fig. 4. Alignment of c-fos mRNA sequences of Hanwoo (generated in this study) and the bovine c-fos sequences downloaded from the TIGR (accession number 153785). The mismatch sequences are bold.

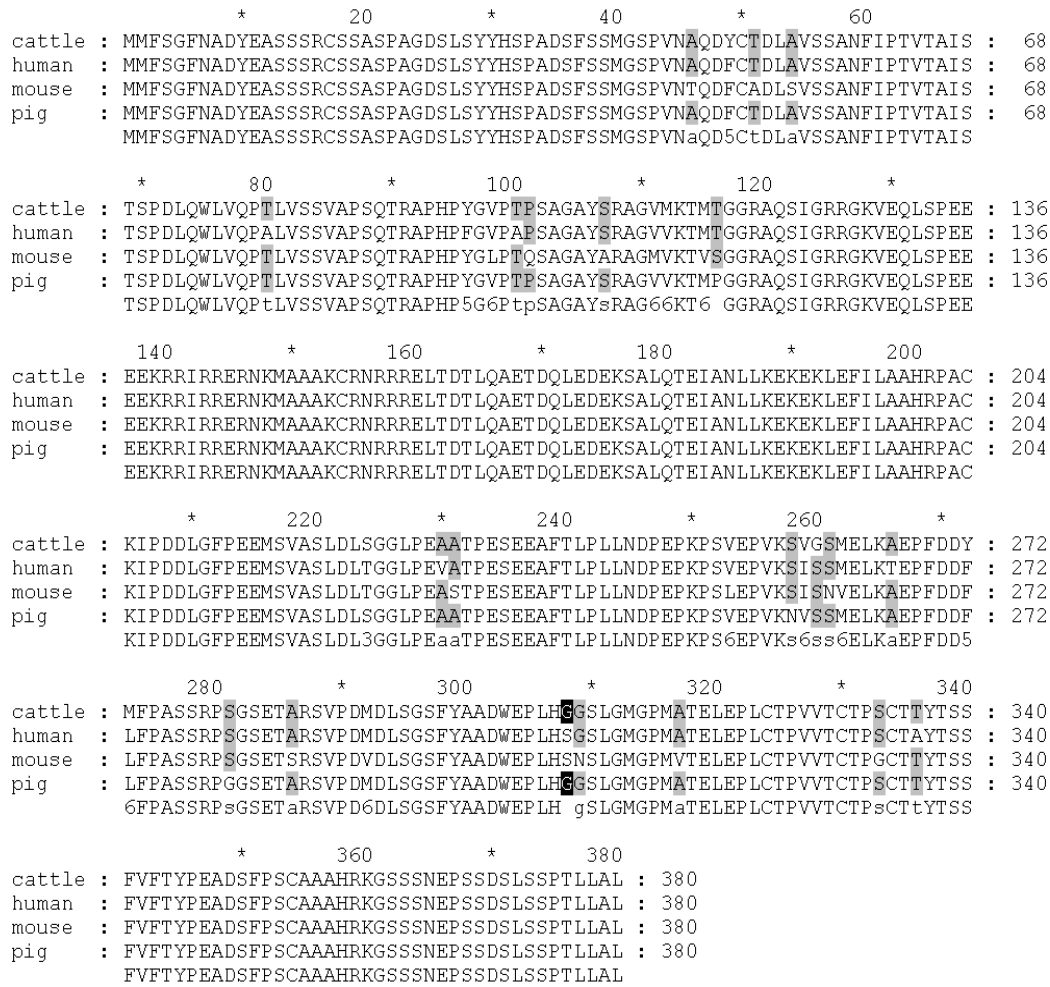


Fig. 5. Comparisons of c-fos amino acid sequences of cattle, human, mouse, and pig showing similarities among species. Totally conserved amino acids are no shaded, and highly conserved sequences are shaded at different degrees.

한우 c-fos 유전자의 염기서열을 기초로 아미노산 염기서열을 예측하여 사람, 쥐, 돼지의 FOS 단백질과 비교해 차이를 본 결과 Fig. 5에서 보는 것과 같이 비교된 4개의 종간에 높은 상동성이 존재함을 확인할 수 있었다. 이와같이 c-fos 유전자는 서로 다른 종이랄 할지라도 아미노산에 있어서의 차이는 적게 나타남을 알 수 있었다.

3. 한우 조직내 c-fos 유전자의 발현 분석

한우의 안심, 갈비, 등심, 목심, 채끝, 우둔,

설도, 사태, 양지, 좌심방, 우심방, 간, 비장, 신장, 우심실, 좌심실 조직들에서 c-fos 유전자의 발현 양상의 정도를 알아보기 위해서 c-fos mRNA중 5'의 약 760 bp를 probe로 이용하여 Northern hybridization을 실시한 결과 Fig. 6에서 보는 것과 같이 9종류의 근육 중에서는 갈비에서 가장 많은 발현량을 보였고, 4종류의 조직 중에서는 비장이 가장 많은 발현양상을 보였다. Korneva 등(2000)에 의하면 비장의 lymphocyte에 자극을 주면 비장내의 c-fos 단백질이 interleukin(IL)-2의 생성을 증가시켜 면역 반응을 증가시킴을 보고하였다. 또한, 비장의

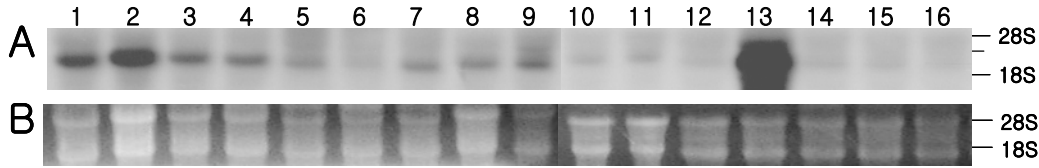


Fig. 6. Northern hybridization results of the c-fos gene in various muscles and organs. A: Results from 32P-labelled c-fos probe, B: Extracted total RNA on 1% agarose gel. Lane 1: lean meat of short ribs, lane 2: the ribs, lane 3: sirloin, lanes 4-9: different parts of muscles, lane 10: left atrium, lane 11: right atrium, lane 12: liver, lane 13: spleen, lane 14: kidney, lane 15: right ventricle, and lane 16: left ventricle.

c-fos 유전자가 lymphocyte의 증식에 관련이 있다는 보고(Zhang et al. 1999)가 있는 것으로 보아 c-fos 유전자가 다른 조직에 비해 비장조직에서 많은 발현량을 보이는 것으로 추측된다.

Accession number

한우 c-fos 유전자의 GenBank Accession number는 AY322482이다.

IV 요약

c-fos 유전자는 전사조절인자로서 주로 c-jun family와 결합하여 heterodimers를 형성하며 AP-1 조절 부위를 가지는 유전자들의 전사를 조절하는 것으로 알려져 있다. 이 유전자의 발현은 myoblasts를 비롯한 여러 세포의 분화와 성장을 조절하며 최근 돼지에서 육질에 영향을 미치는 근섬유와 관련된다는 보고가 있다. 본 연구는 소에서 육질과 c-fos 유전자와의 관계를 알아보기 위한 기초자료로서 총 1,443 bp의 mRNA 염기서열을 최초로 소에서 밝혔으며 여러 조직과 기관에서의 발현양상도 살펴보았다. 한우의 c-fos 유전자의 염기서열을 사람, 돼지 및 쥐와 비교하여 본 결과 각각 89.8%, 93.5%와 87.0%의 높은 상동성을 보였다. 이 유전자의 발현은 근육중 갈비에서 가장 많은 발현량을 보였고, 조직에서는 비장에서 가장 많은 발현량을 보이는 것을 알 수 있었다. 이 연구에서 밝혀진 c-fos 유전자는 SNP의 추가분석에 의해 한우에서 육질의 향상과 관련이 있는 후보유전자로 쓰일 수 있을 것으로 사료된다.

V 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 지원에 의해 이루어진 연구결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

VI 인용 문헌

1. Finkel, M. P., Biskis, B. O. and Jenkins, P. B. 1966. Virus induction of osteosarcomas in mice. *Science* 11;151(711):698-701.
2. Glover, J. N. M. and Harrison, S. C. 1995. Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature* 373(6511): 257-261.
3. Grigoriadis, A. E., Wang, Z. Q. and Wagner, E. F. 1995. Fos and bone cell development: lessons from a nuclear oncogene. *Trends. Genet.* 11(11):436-441.
4. Johnson, R. S., Spiegelman, B. M. and Papaioannou, V. 1992. Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene. *Cell* 71(4):577-586.
5. Korneva, E. A., Barabanova, S. V., Golovko, O. I., Nosov, M. A., Novikova, N. S. and Kazakova, T. B. 2000. C-fos and IL-2 gene expression in rat brain cells and splenic lymphocytes after nonantigenic and antigenic stimuli. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 917:197-209.
6. Lehtinen, S. K., Rahkila, P., Helenius, M., Korhonen, P. and Salminen, A. 1996. Down-Regulation of Transcription Factors AP-1, Sp-1, and NF-B Precedes Myocyte Differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Communi.* 299(1):36-43.
7. Reiner, G., Heinrich, L., Brenig, B., Geldermann, H. and Dzapo, V. 2000. Cloning, structural organization, and chromosomal assignment of the porcine c-fos proto-oncogene, FOS. *Cytogenet. Cell. Genet.* 89(1-2):59-61.

8. Reiner, G., Heinrich, L., Muller, E., Geldermann, H. and Dzapo, V. 2002. Indications of associations of the porcine FOS proto-oncogene with skeletal muscle fibre traits. *Anim. Genet.* 33(1):49-55.
 9. Trouche, D., Masutani, H., Groisman, R. and Robin, P., Lenormand, J. L. and Annick, H. B. 1995. Myogenin binds to and represses c-fos promoter. *FEBS Letters* 361(2):140-144.
 10. Van Straaten, F., Muller, R., Curran, T., Van Beveren, C. and Verma, I. M. 1983. Complete nucleotide sequence of a human c-onc gene: deduced amino acid sequence of the human c-fos protein. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 80(11):3183-3187.
 11. Wang, Z. Q., Grigoriadis, A. E., Mohle-Steinlein, U. and Wagner, E. F. 1991. A novel target cell for c-fos-induced oncogenesis: development of chondrogenic tumours in embryonic stem cell chimeras. *EMBO J.* 10(9):2437-2450.
 12. Wang, Z. Q., Ovitt, C., Grigoriadis, A. E., Mohle-Steinlein, U., Ruther, U. and Wagner, E. F. 1992. Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature* 360(6406):741-745.
 13. Zhang, H., Hu, P., Wen, X. L. and Huang, B. 1999. The effect of simulated weightlessness on the function of spleen lymphocytes and the expression of c-fos proto-oncogene in tail-suspended mice. *Space. Med. Med. Eng. (Beijing)*. 12(6):423-425.
 14. Zhang, J., Zhang, D., McQuade, J. S., Behbehani, M., Tsien, J. Z. and Xu, X. 2002. c-fos regulates neuronal excitability and survival. *Nat. Genet.* 30(4):416-420.
- (접수일자 : 2003. 6. 23. / 채택일자 : 2003. 10. 1.)