

소, 돼지 염색체의 telomeric DNA 분포 양상

손시환* · A. S. Multani** · S. Pathak** · 조은정* · 하해봉*

진주산업대학교 동물생명과학과 · 동물생명산업연구센터*, 텍사스주립대 MD Anderson 암 센터**

Chromosomal Localization and Distribution of the Telomeric DNA in Cattle and Pigs

S. H. Sohn*, A. S. Multani**, S. Pathak**, E. J. Cho* and H. B. Ha*

Department of Animal Science and Biotechnology & RAIRC, Jinju National University*,
The University of Texas, MD Anderson Cancer Center**

ABSTRACT

Telomeres are nucleoprotein structures at the ends of chromosomes consisting of tandem repeat sequences of (TTAGGG)_n. Telomeres serve as guardians of the genome, protect individual chromosomes within the nucleus, and help in meiotic pairing of homologous chromosomes. To investigate the telomere distributions of cattle and pig chromosomes, fluorescence *in situ* hybridization(FISH) was carried out on metaphase spreads of *in vitro* fibroblast cultures from Holstein and Landrace using a human telomeric DNA repeat probe. Results indicate that the distinct double spots on both ends of chromosomes of cattle and pigs were observed. In cattle, there was a random variation in the intensity of telomere signals among chromosomes. In pigs, an interstitial telomeric signal was observed on the chromosome 6q1 of all the cells examined. According to quantitative fluorescence *in situ* hybridization(Q-FISH) analysis, some chromosomes had consistently much more telomeres at one end of chromosomes. In general, both species had consistently much more telomeres at q-end than p-end on most of chromosomes. The relative amount of telomeres on bovine chromosomes was higher than that on pig chromosomes. In additions, Y chromosome had the highest relative amount of telomeres in cattle and pigs.

(Key words : Telomeres, Q-FISH, Chromosomes, Cattle, Pigs)

I 서 론

텔로미어(telomere)란 진핵세포에 존재하는 DNA-protein 복합체로서 염색체의 말단부에 tandem repeated DNA 서열(TTAGGG)과 특정 단백질로 구성되어 있으며 세포 분열이 진행함에 따라 이의 길이가 짧아지게 되고 일정 길이 이하가 되면 세포의 사망이 유도된다. 반면 텔로머레이스(telomerase)는 ribonucleoprotein으로서 telomeric DNA의 합성에 관여하여 염색체의 말단에 telomeric DNA의 소실을 보충하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

최근 많은 연구들에서 텔로미어의 역할은 염색체의 안정성에 본질적으로 작용하여 세포의 노화, 암의 발생과 직접적 관련이 있음을 보고하고 있다(Multani 등, 2000; Robinson, 2000; Ahmed와 Tollefsbol, 2001; Cottliar와 Slavutsky, 2001; Pathak 등, 2002; Sohn 등, 2002). 정상 세포의 경우 1 세포 주기 당 약 50~200 bp의 telomeric DNA의 유실이 있으므로 알려져 있고, 일정 길이 이하에 이르면 분열 중단으로 인한 자연사적 세포의 사망(apoptosis)이 유도된다(Greider와 Blackburn, 1985). 따라서 텔로미어의 길이와 텔로머레이스의 활성화 및 세포의 노화

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

간에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있으며 특히 사람과 설치류에 있어 많은 연구 결과들이 보고되고 있다. 사람에게 있어서 텔로머레이스의 발현은 태아조직에서는 왕성하나 신생자 이후 체세포들에서는 거의 작용하지 않는 것으로 나타난다(Meeker와 Coffey, 1997). 그러나 생식세포나 줄기세포(stem cell)와 같이 끊임없이 새로이 분열되는 세포와 무한정한 분열을 지속하는 암 세포의 경우 이의 발현이 지속적으로 나타난다(Ulaner와 Giudice, 1997). 정상적 인체 내 대부분의 기관에서는 연령이 증가함에 따라 텔로머레이스의 유의적 감소(down regulation) 양상을 보이지만 설치류(mouse, rat)와 같은 단명한 동물의 경우 사람과 달리 출생 후에도 텔로머레이스의 발현이 지속됨을 보고하고 있다(Yamaguchi 등, 1998). 이는 연령이 증가하면서 텔로머레이스의 영향 없이 텔로미어가 짧아짐을 나타내어 사람과는 또 다른 기전으로 작용하는 것을 의미한다.

이와 더불어 최근 핵이식을 이용한 체세포 복제동물 생산에 대한 많은 연구들이 진행되고 있고 잘 알려진 바와 같이 양(Wilmut 등, 1997)에 이어 소(Cibelli 등, 1998), 돼지(Onishi 등, 2000) 등 가축에서의 성공 사례들이 연이어 발표되고 있다. 그러나 애석하게도 최초의 체세포 복제 양인 Dolly의 경우 심각한 조로 현상에 기인된 합병증으로 인하여 지난 해 안락사가 이루어졌다. 이러한 예기치 않은 체세포 복제 개체의 노화는 세포내 텔로미어에 대한 관심을 집중하게 하였고, 특히 Dolly의 경우 공여 세포의 짧은 텔로미어가 개체 노화에 직접적 원인을 제시한 이래 이러한 이론에 대한 찬반의 논란과 여러 상반된 의견들이 활발히 논의되고 있는 실정이다(Shiels 등, 1999; Tian 등, 2000; Betts 등, 2001; Miyashita 등, 2002). 이와 같이 노화와 관련한 텔로미어와 텔로머레이스에 대한 다양한 연구들이 진행되고 있고 이들의 기능과 역할들이 하나씩 밝혀지고 있으나 가축들에 대한 텔로미어의 연구는 상대적으로 매우 미흡한 실정이다. 특히 염색체상 텔로미어의 분포 양상에 대한 분석은 거의 보고된 바가 없는데 이는 텔로미어의 길이가 종 간, 연령

간, 동일 개체 내 조직 간, 심지어 동일 세포 내 염색체 간에 달라질 수 있으므로 각 종에 대한 표준화된 분포 양상을 제시하기가 어렵기 때문이다(Hemann 등, 2001). 그러나 정상 성숙에 대한 텔로미어 핵형과 염색체상 분포 양상의 제시는 텔로미어와 텔로머레이스 연구에 가장 근간이 되는 기초 표지라 하겠다.

따라서 본 연구에서는 telomeric DNA probe를 이용한 양적형광접합보인법(quantitative fluorescence *in situ* hybridization; Q-FISH)으로서 소와 돼지의 성숙에 대한 텔로미어의 핵형과 각 염색체상 텔로미어의 양적 분포 양상을 제시하고자 한다.

II 재료 및 방법

1. 공시축 및 공시 재료

본 실험을 위한 공시축으로는 Texas A&M 대학교 실험농장에서 사육중인 32~36개월령 Holstein 수컷 10두와 18개월령 Landrace 종모돈 10두를 이용하였고, 염색체 분석을 위하여 각 개체로부터 귀 조직을 생검(biopsy)하고, 이들 조직들로부터 섬유아세포(fibroblast) 배양을 실시하였다.

2. 섬유아세포 배양을 이용한 염색체 분리

섬유아세포 배양은 Holstein 및 Landrace의 귀로부터 일부 조직을 떼어내어 PBS 용액으로 수차례 세척한 다음 무균상태에서 미세하게 세절 한 후 0.25% trypsin-EDTA(Gibco, Invitrogen Corp. Grand Island, N.Y, USA)를 처리한 후 Medium-199을 기본 배양액으로 하여 15% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin(이상 Gibco, Invitrogen Corp. Grand Island, NY, USA)을 첨가한 혼합배양액에 조직세포들을 넣어 37.5°C, 5% CO₂ 조건 하에 배양하였다. 세포들이 배양플라스크의 바닥면 전체에 monolayer를 형성하게 되면 0.25% trypsin-EDTA를 이용하여 세포들을 분리하고 일정량을 분주하여 3회 계대 배양 하였다. 증기상 유도를 위하여 배양종료

50분전에 배양표본에 colcemid 0.2 μ g/ml(Gibco, Invitrogen Corp. Grand Island, N.Y, USA)을 처리하고 50분간 재 배양 한 다음 scraper로 세포만을 회수 후 200 \times g로 원심분리하였다. 저장처리하는 0.4% potassium chloride 용액과 0.4% sodium citrate(이상 Sigma Chem, St Louis, MO, USA) 용액을 1:1로 하여 37 $^{\circ}$ C로 6분 처리하였고, 고정처리하는 Carnoy's용액(methanol 3: acetic acid 1)으로 3회 반복 실시하였으며, 표본제작은 냉장 보관된 슬라이드에 세포혼탁액 3~4방울을 떨어뜨렸다.

3. 양적형광접합보인법(Q-FISH)

하루정도 건조된 표본에 제작 시판되는 Cy-3 conjugated peptide nucleic acid human telomere probe(DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA)를 이용하여 형광접합보인법 (fluorescence *in situ* hybridization; FISH)을 시행하였다. FISH 과정은 제조사의 지침서에 따라 수행하였으며 이를 간략히 기술하면 준비된 슬라이드 표본을 RNase A로 전 처리를 한 후 hybridization 용액을 슬라이드에 떨어뜨리고 커버 슬립으로 덮은 후 고무풀(rubber cement)로 밀봉하였다. 이를 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 처리하여 프로브(probe)와 표본을 변성시키고 다시 38.5 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 hybridization 시킨 후 2 \times SSC, PN buffer로서 세척하였다. 배경 염색으로는 2,4-diamidine-2-phenylindole

(DAPI)을 이용하였다. 형광 접합 발현양상은 triple-band pass filter가 부착된 형광현미경 (Microphot-FAX, Nikon, Tokyo, Japan)으로 관찰하고, 최소 50여 개의 중기상을 디지털 이미지로 획득하였다. 저장된 각 상은 이미지 분석 프로그램(MetaMorph Imaging System, Universal Imaging Co, PA, USA)을 이용하여 개개 염색체에 대한 telomeric DNA의 함량을 분석하였다.

III 결 과

소 및 돼지 염색체의 텔로미어 분포 양상을 제시하기 위하여 각 개체의 귀 조직을 생검하고 이들로부터 섬유아세포배양을 통한 중기상을 획득하였다. 개체별 10여 개의 중기상 표본에 대하여 telomeric DNA probe를 이용한 FISH를 수행하였고 텔로미어의 표지가 접합된 중기상으로서 핵형 분석을 실시하였다. 한편 염색체상 텔로미어의 함유율 분석을 위하여 접합된 각 중기상의 화상을 디지털 이미지로 저장하고 MetaMorph Imaging System(Universal Imaging Co, PA, USA)의 소프트웨어를 이용하여 청색 대비 적색의 발광율(Red/Blue intensity ratio)을 측정하였다. 즉, 염색체 전체의 배경염색은 DAPI(청색)로 처리하고 텔로미어의 접합프로브에 Cy-3(적색)를 부착함으로써 이의 색광도의 비를 분석하여 텔로미어의 상대적 함유율을 계산하는 것이다.

FISH 결과 Fig. 1에 제시된 바와 같이 소의

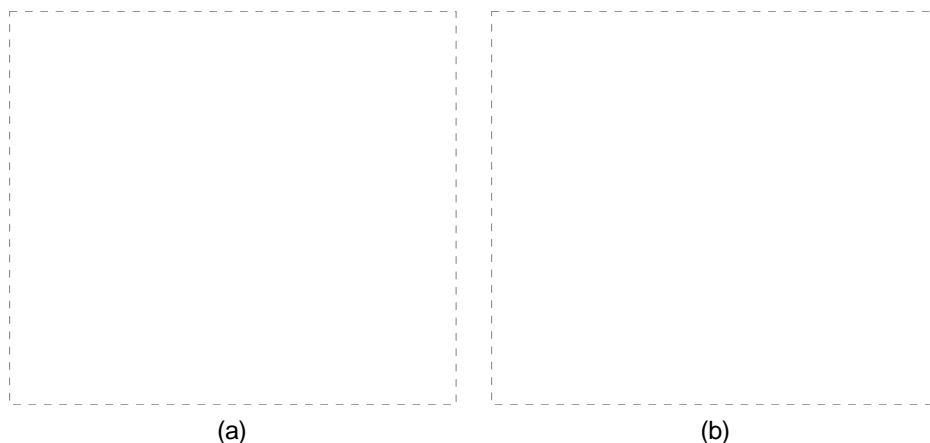


Fig. 1. FISH on metaphase spread of bovine chromosomes (a) and its karyotype (b) using telomeric DNA probe.

모든 염색체의 말단부에 뚜렷한 텔로미어 프로브의 접합 양상을 발견할 수 있었으며 또한 각 말단부에 명확한 두 개의 점의 형태인 접합 양상이 나타남에 따라 p-arm의 존재 유무도 명확하게 확인 할 수 있었다. Q-FISH 결과 소의 전체 염색체상 텔로미어 함유율은 33.8%로 분석되었다. 또한, 각 염색체 별 텔로미어의 함유율은 염색체들 간에 유의적 차이가 있었고($p < 0.01$),

동일 염색체 내 p-arm과 q-arm간 텔로미어의 분포율에는 9번 염색체를 제외하고는 거의 차이가 없는 것으로 나타났으나 전체적으로 q-arm 말단부의 함유율이 p-arm 말단부에 비해 높은 것으로 분석되었다(Table 1). 9번 염색체의 경우 q-arm 말단부가 p-arm에 비해 특이적으로 많은 텔로미어의 함유율을 보이며 3배 이상의 차이를 나타내었다. 텔로미어의 상대적 함유율이 가장

Table 1. Relative amount of telomeric DNA on cattle chromosomes

Chromosome No.	Relative amounts of telomeric DNA on			The ratio of q/p	P values ^a
	Chromosomes	p-arm	q-arm		
1	14.57 ± 7.27	6.5 ± 3.14	8.07 ± 4.13	1.22 ± 0.07	0.478
2	17.88 ± 6.54	7.58 ± 3.55	10.31 ± 3.13	1.46 ± 0.36	0.188
3	21.58 ± 6.99	8.41 ± 3.00	13.17 ± 4.67	1.61 ± 0.50	0.067
4	21.11 ± 9.11	8.95 ± 3.36	12.17 ± 5.81	1.32 ± 0.23	0.273
5	21.63 ± 5.42	9.45 ± 3.07	11.91 ± 2.93	1.33 ± 0.43	0.187
6	23.52 ± 6.62	9.51 ± 2.06	14.01 ± 4.58	1.45 ± 0.17	0.064
7	20.95 ± 6.54	9.12 ± 4.13	12.83 ± 2.46	1.43 ± 0.40	0.204
8	24.72 ± 10.93	11.26 ± 4.45	13.47 ± 6.53	1.17 ± 0.16	0.510
9	50.10 ± 30.73	11.05 ± 7.35	3.05 ± 23.68	3.91 ± 1.19	0.033*
10	22.30 ± 10.17	9.62 ± 3.88	12.67 ± 6.35	1.29 ± 0.16	0.344
11	29.74 ± 18.69	11.45 ± 7.05	18.29 ± 11.82	1.62 ± 0.55	0.258
12	23.53 ± 17.50	10.90 ± 10.10	12.63 ± 7.66	1.56 ± 0.70	0.745
13	30.05 ± 18.57	13.48 ± 8.92	16.52 ± 10.17	1.46 ± 0.63	0.588
14	35.06 ± 19.17	15.67 ± 8.09	19.39 ± 11.20	1.23 ± 0.17	0.526
15	32.15 ± 20.03	13.27 ± 7.35	18.88 ± 12.72	1.36 ± 0.20	0.377
16	29.60 ± 19.60	13.91 ± 10.00	15.69 ± 9.71	1.20 ± 0.25	0.761
17	33.07 ± 9.22	13.84 ± 4.00	19.23 ± 5.26	1.40 ± 0.21	0.082
18	49.20 ± 24.29	18.76 ± 8.41	30.44 ± 17.80	1.63 ± 0.81	0.189
19	40.98 ± 20.03	17.87 ± 9.90	20.91 ± 10.31	1.35 ± 0.25	0.407
20	36.71 ± 12.49	16.78 ± 6.37	19.93 ± 0.31	1.22 ± 0.19	0.410
21	37.20 ± 10.21	16.34 ± 5.03	20.85 ± 5.72	1.36 ± 0.22	0.178
22	40.50 ± 14.40	17.79 ± 5.17	22.71 ± 10.11	1.26 ± 0.31	0.322
23	43.12 ± 19.77	19.13 ± 9.41	23.99 ± 10.51	1.29 ± 0.18	0.419
24	49.66 ± 18.89	19.68 ± 11.11	29.98 ± 8.50	1.81 ± 0.75	0.104
25	47.38 ± 20.49	18.79 ± 9.54	28.60 ± 13.18	1.64 ± 0.71	0.174
26	44.74 ± 16.81	20.61 ± 7.46	24.13 ± 9.62	1.17 ± 0.18	0.450
27	44.08 ± 23.62	18.38 ± 11.09	25.70 ± 13.00	1.56 ± 0.65	0.320
28	42.75 ± 15.75	18.57 ± 8.74	24.18 ± 7.67	1.41 ± 0.43	0.266
29	50.33 ± 18.77	22.04 ± 8.43	28.30 ± 10.76	1.31 ± 0.26	0.290
X	15.67 ± 7.18	10.01 ± 5.75	5.66 ± 1.97	0.65 ± 0.23	0.324
Y	57.94 ± 9.26	27.32 ± 3.67	30.62 ± 5.60	1.11 ± 0.06	0.450
Total	33.82 ± 10.73	14.25 ± 8.07	19.57 ± 11.67	1.46 ± 0.65	0.001**

Values are means±standard deviations.

^a P values are the probability by t-test for the means of p- and q-arm.

*, ** Means of p- and q-arm significantly differ at $p < 0.05^*$ and $p < 0.01^{**}$.

높은 염색체는 Y 염색체로 나타났다.

Fig. 2는 돼지의 중기상에 있어 텔로미어 프로브를 이용한 FISH 양상과 이의 핵형을 제시한

것이다. 돼지도 소와 같이 모든 염색체의 말단부에 텔로미어 프로브의 접합 양상이 나타났다. 그러나 본 종에서 특기할만한 사실은 6번 염색체의



Fig. 2. FISH on metaphase spread of pig chromosomes (a) and its karyotype (b) using telomeric DNA probe.

Table 2. Relative amount of telomeric DNA on pig chromosomes

Chromosome No.	Relative amounts of telomeric DNA on			The ratio of q/p	P values ^a
	Chromosomes	p-arm	q-arm		
1	13.75 ± 3.11	55.94 ± 1.69	7.81 ± 1.68	1.36 ± 0.29	0.022*
2	24.87 ± 6.23	11.17 ± 3.41	13.69 ± 2.98	1.27 ± 0.19	0.100
3	28.51 ± 9.60	11.51 ± 3.79	17.00 ± 6.40	1.52 ± 0.39	0.034*
4	26.02 ± 7.08	10.30 ± 3.58	15.71 ± 3.96	1.64 ± 0.44	0.005**
5	28.61 ± 8.26	12.38 ± 3.71	16.23 ± 5.90	1.32 ± 0.26	0.100
6 ^b	34.34 ± 6.68	13.29 ± 3.36	10.30 ± 2.30	0.84 ± 0.35	0.046*
7	24.31 ± 6.81	10.28 ± 2.59	14.03 ± 4.47	1.37 ± 0.21	0.037*
8	26.71 ± 2.89	11.96 ± 1.34	14.74 ± 1.99	1.24 ± 0.16	0.002**
9	28.65 ± 8.19	11.63 ± 3.83	17.03 ± 5.90	1.61 ± 0.94	0.028*
10	35.60 ± 8.28	16.17 ± 4.95	19.43 ± 5.35	1.36 ± 0.77	0.175
11	37.17 ± 13.58	16.64 ± 6.59	20.53 ± 7.18	1.26 ± 0.19	0.223
12	35.68 ± 15.37	15.22 ± 7.68	20.46 ± 9.60	1.48 ± 0.79	0.195
13	17.96 ± 4.30	7.67 ± 1.89	10.30 ± 2.77	1.36 ± 0.29	0.025*
14	33.47 ± 16.23	14.62 ± 7.89	18.85 ± 8.75	1.35 ± 0.35	0.270
15	32.60 ± 13.40	13.76 ± 6.02	18.84 ± 7.66	1.42 ± 0.28	0.118
16	45.51 ± 20.39	19.02 ± 9.83	26.49 ± 11.24	1.51 ± 0.50	0.132
17	52.31 ± 8.02	22.08 ± 2.67	30.23 ± 6.18	1.37 ± 0.22	0.002**
18	50.83 ± 5.59	21.96 ± 1.65	28.87 ± 8.37	1.32 ± 0.27	0.003**
X	32.85 ± 13.73	15.36 ± 6.67	17.49 ± 7.18	1.16 ± 0.18	0.641
Y	87.83 ± 4.15	41.92 ± 2.14	45.92 ± 2.25	1.10 ± 0.03	0.021**
Total	12.30 ± 9.33	14.15 ± 6.91	17.50 ± 8.77	1.35 ± 0.45	0.001**

Values are means±standard deviations.

^aP values are the probability by t-test for the means of p- and q-arm.

^bChromosome 6 has an interstitial telomeres which has 10.72 ± 2.12 relative amount.

*, ** Means of p- and q-arm significantly differ at p < 0.05* and p < 0.01**.

경우 동원체 하단부에 interstitial telomere의 양상을 나타내며 이의 분포가 분석된 모든 중기상의 6번 상동염색체에서 공히 관찰되었다. 돼지의 경우 염색체 별 텔로미어의 함유율의 차이가 있었을 뿐만 아니라 소와 달리 많은 염색체들에 있어 동일 염색체 내 p-arm과 q-arm간 텔로미어 분포율에도 차이가 있었다(Table 2). 전체 염색체 대비 텔로미어의 함유율은 12.3%로서 소에 비해 낮은 함유율을 나타내었다.

IV 고 찰

대부분 고등생물의 염색체 말단부는 TTAGGG의 반복 염기서열로 구성되어있으며 이들이 몇몇 단백질과 결합한 형태를 텔로미어라 하고, 텔로머레이스는 telomeric DNA 합성에 직접 관여하는 ribonucleoprotein으로 알려져 있다.

최근 텔로미어의 역할이 염색체의 안정성에 작용하여 세포의 생명현상을 본질적으로 좌우함이 밝혀진 이래 텔로미어의 분포와 변화 양상의 연구는 생명현상을 세포적 차원에서 구명할 수 있는 또 다른 하나의 좋은 연구 과제로 부각되었다. 특히 체세포 복제 동물 생산에 있어 복제 개체(clone animal)들의 세포 노화라는 문제점이 대두되면서 텔로미어의 양적 변화 양상에 대한 연구들이 주목받게 된다(Shiels 등, 1999). 텔로미어의 양적 분석 방법으로 Southern blot을 이용한 telomeric restriction fragment(TRF)의 길이를 측정하여 분석하는 방법이 소개되고(Gan 등, 2001), 복제 개체를 포함한 대부분의 동물의 조직 및 세포들의 텔로미어 함량을 TRF 분석법으로 분석 제시하고 있다(Miyashita 등, 2002; Fradiani 등, 2004). 그러나 TRF 분석법의 경우 blotting하는 동안 DNA의 소실이 일어날 수 있고, 마우스와 같이 텔로미어 길이가 극단적으로 길 경우 측정하는데 오차가 생길 수 있을 뿐만 아니라 이는 세포내 전체 함량의 측정만이 가능한 것으로 개개 염색체내 분포 양상 등의 분석은 불가하다. 또 다른 텔로미어의 양적 분석법으로 FISH법과 Flow cytometry를 적용한 기법이 소개되고 있는데(Hultdin 등, 1998), 특히 FISH법을 이용하여 텔로미어의 상대적 길

이를 측정하는 방법을 Q-FISH라 한다(Poon 등, 1999; Slijepcevic, 2001). Q-FISH는 peptide nucleic acid(PNA) telomere oligonucleotides를 프로브로 이용하여 형광 표지(signal)된 양을 디지털 화상 분석시스템으로 분석하는 방법으로서 간기 세포뿐만 아니라 전체 염색체의 텔로미어의 상대적 길이 측정이 가능하며 각 염색체별 텔로미어 분포양상 제시는 물론이고 장완(long-arm)과 단완(short-arm)의 텔로미어 분포까지 분석이 가능하다.

본 연구에서는 Q-FISH법을 이용하여 소와 돼지의 성숙에 대한 텔로미어의 핵형과 각 염색체상 텔로미어의 양적 분포 양상을 제시하였다. 이미 언급한 바와 같이 염색체상 텔로미어의 상대적 함유율은 종 간, 연령 간, 동일 개체 내 조직 간, 심지어 동일 세포 내 염색체 간에도 달라질 수 있기 때문에 표준화된 분포 양상을 제시함에는 다소 어려움이 있다(Hemann 등, 2001). 그러나 정상 성숙에 대한 염색체상 텔로미어의 분포 양상의 제시는 이들 연구를 위한 가장 기본적 표지임으로 본 연구에서는 36개월령 Holstein과 18개월령 Landrace의 섬유아세포를 대상으로 소, 돼지 염색체의 텔로미어의 핵형 분석을 실시하였다. 소의 경우 익히 알려진 대로 염색체상 텔로미어는 모든 염색체의 양 말단에 제한 분포되어 있고, interstitial telomeres는 존재하지 않으며, 양 말단의 함유량에는 거의 차이가 없는 것으로 보여진다. 특이할만한 사실은 세포유전학적 연구에서 나타나는 소 염색체의 형태적 양상은 상 염색체의 경우 모든 염색체가 p-arm이 거의 존재하지 않는 말단 염색체(telocentric chromosome)로 나타나고 국제표준핵형위원회에서도 이의 명명 체계에 p-arm의 핵형도(idogram)를 생략하고 있다(ISCNDA, 1990; 손과 이, 1998). 그러나 본 연구의 텔로미어 핵형 분석 결과 소의 모든 상 염색체의 p-arm 말단부에서도 뚜렷한 2개의 형광 접합이 형성됨에 따라 미미한 p-arm의 존재가 확인되어 모든 상 염색체가 말단 염색체가 아닌 아단 염색체(acrocentric chromosome)로 입증되었다. 또한 본 결과에서 나타난 텔로미어의 분포 양상과 분포량은 한우의 백혈구 배양으로부터 획득한 염색

체상의 텔로미어 분포와 거의 동일한 양상으로 분석되어(미제시) 본 결과를 소 성숙에 대한 텔로미어의 기본 핵형으로 나타낼 수 있을 것으로 사료된다. 한편 돼지의 경우에도 모든 염색체의 양 말단에 텔로미어의 분포를 확인할 수 있었고 뿐만 아니라 6번 염색체의 동원체 부위에 interstitial telomere가 존재함을 확인하였다. 이러한 돼지의 interstitial telomere의 존재는 de la Sena 등(1995)과 Gu 등(1996)이 FISH 방법과 primed *in situ* labelling(PRINS) 방법으로 이미 확인한 바 있고 이의 위치를 6q21~q22로 제시하였다. 그러나 본 연구에서 나타난 이의 위치는 거의 모든 중기상에서 이들 보다 동원체 쪽으로 접근한 6q1 부위로 분석되어 이의 구체적인 위치에 대해서는 보다 깊은 연구가 있어야 할 것으로 생각된다. 이를 종합할 때 결국 돼지의 6번 염색체는 특정 두 말단 염색체 간의 로버트소니언 전좌(Robertsonian translocation) 현상에 의해 생성된 신생 염색체가 아닌가 사료되어 종의 계통 분화 관점에서 새로이 연구되어야 할 또 다른 과제이다.

V 요약

텔로미어란 진핵세포에 존재하는 DNA-protein 복합체로서 염색체의 말단부에 tandem repeated DNA 서열(TTAGGG)_n과 특정 단백질로 구성되어 있으며 세포 분열이 진행함에 따라 이의 길이가 짧아지게 되고 일정 길이 이하가 되면 세포의 사망이 유기된다. 텔로미어의 역할은 게놈의 보호자로서 염색체의 안정성에 본질적으로 작용하고 감수분열시 상동염색체간의 접합에 주된 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 소와 돼지의 성숙에 대한 텔로미어의 핵형과 각 염색체상 텔로미어의 양적 분포 양상을 제시하고자 Holstein과 Landrace를 공시하고 이들로부터 섬유아세포 배양으로 중기상을 획득한 다음 human telomeric DNA probe를 이용하여 형광접합보인법(FISH)으로 분석하였다. 실험 결과 소와 돼지의 모든 염색체의 양 말단부에 뚜렷한 텔로미어 프로브의 접합 양상을 발견할 수 있었다. 소의 경우 염색체들 간 텔

로미어의 양적 변이가 나타났으며 돼지의 경우는 모든 분석된 세포에서 특이적으로 6q1의 위치에 interstitial telomere가 존재하였다. 양적형광접합보인법(Q-FISH) 분석 결과 일부 염색체에서 한쪽 말단의 텔로미어 함량이 유의적으로 높은 것으로 분석되었고, 전체적으로 거의 모든 염색체에서 소, 돼지 공히 q-arm 말단부의 함유율이 p-arm 말단부에 비해 높은 것으로 나타났다. 또한, 염색체상 텔로미어의 상대적 함유율은 소가 돼지에 비해 높게 나타났으며, 전체 염색체 중 텔로미어의 상대적 함유율은 소, 돼지 모두 Y 염색체에서 가장 높았다.

VI 사 사

본 연구는 한국과학재단 지정 진주산업대학교 동물생명산업지역협력연구센터(RAIRC)의 연구비 지원에 의한 것입니다. 이에 감사드립니다.

VII 인용 문헌

- Ahmed, A. and Tollefsbol, T. 2001. Telomeres and telomerase: basic science implications for aging. J. Am. Geriatr. Soc. 49(8):1105-1109.
- Betts, D. H., Bordington, V., Hill, J. R., Winger, Q., Westhusin, M. E., Smith, L. C. and King, W. A. 2001. Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle. Proc. Natl. Sci. USA 98:1077-1082.
- Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F. A. and Robl, J. M. 1998. Cloned transgenic calves produced from non-quiescent fetal fibroblasts. Sci. 280:1256-1258.
- Cottliar, A. S. and Slavutsky, I. R. 2001. Telomeres and telomerase activity: their role in aging and neoplastic development. Medicina 61:335-342.
- de la Sena, C., Chowdhary, B. P. and Gustavsson, I. 1995. Localization of telomeric(TTAGGG)_n sequences in chromosomes of some domestic animals by fluorescence *in situ* hybridization. Hereditas 123: 269-274.
- Fradiani, P. A., Ascenzioni, F., Lavitrano, M. and Donini, P. 2004. Telomeres and telomerase activity in pig tissues. Biochimie. 86:7-12.
- Gan, Y., Engelke, K. J., Brown, C. A. and Au, J.

- L. 2001. Telomere amount and length assay. *Pharma. Res.* 18(12):1655-1659.
8. Greider, C. W. and Blackburn, E. H. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43:405-413.
 9. Gu, F., Hindkjaer, J., Gustavsson, I. and Bolund, L. 1996. A signal of telomeric sequences on porcine chromosome 6q21~q22 detected by primed *in situ* labelling. *Chromosome Res.* 4:251-252.
 10. Hemann, M. T., Strong, M. A., Hao, L. Y. and Greider, C. W. 2001. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell* 107:67-77.
 11. Hultdin, M., Gronlund, E., Norrback, K., Erikasson-Lindstrom, E., Just, T. and Roos, G. 1998. Telomere analysis by fluorescence *in situ* hybridization and flow cytometry. *Nucleic Acids Res.* 26(16):3651-3656.
 12. ISCNDA. 1990. International system for cytogenetic nomenclature of domestic animals. *Cytogenet. Cell Genet.* 53:65-79.
 13. Meeker, A. K. and Coffey, D. S. 1997. Telomerase: a promising marker of biological immortality of germ, stem, and cancer cells. A review. *Biochemistry* 62(11):1323-1331.
 14. Miyashita, N., Shiga, K., Yonai, M., Kaneyama, K., Kobayashi, S., Kojima, T., Goto, Y., Kishi, M., Aso, H., Suzuki, T., Sakaguchi, M. and Nagai, T. 2002. Remarkable difference in telomere lengths among cloned cattle derived from different cell types. *Biol. Reprod.* 66:1649-1655.
 15. Multani, A. S., Ozen, M., Narayan, S., Kumar, V., Chandra, J., McConkey, D. J., Newman, R. A. and Pathak, S. 2000. Caspase-dependent apoptosis induced by telomere cleavage and TRF2 loss. *Neoplasia* 2(4):339-45.
 16. Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S., Takeda, K., Awata, T., Hanada, H. and Perry, A. C. 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Sci.* 289:1188-1190.
 17. Pathak, S., Mutani, A. S., Furlong, C. L. and Sohn, S. H. 2002. Telomere dynamics, aneuploidy, stem cells and cancer. *Int. J. Oncology* 20(3):637-641.
 18. Poon, S. S., Martens, U. M., Ward, R. K. and Lansdorp, P. M. 1999. Telomere length measurements using digital fluorescence microscopy. *Cytometry* 36:267-278.
 19. Robinson, M. O. 2000. Telomerase and cancer. *Genet. Eng.* 22:209-222.
 20. Shiels, P. G., Kind, A. J., Campbell, K. H., Waddington, D., Wilmut, I., Colman, A. and Schnieke, A. E. 1999. Analysis of telomere lengths in cloned sheep. *Nature* 399:316-317.
 21. Slijepcevic, P. 2001. Telomere length measurement by Q-FISH. *Cell Sci.* 23:17-22.
 22. Sohn, S. H., Multani, A. S., Gugnani, P. K. and Pathak, S. 2002. Telomere erosion-induced mitotic catastrophe in continuously grown Chinese hamster Don cells. *Exptl. Cell Res.* 279(2):271-276.
 23. Tian, X. C., Xu, J. and Yang, X. 2000. Normal telomere lengths found in cloned cattle. *Nat. Genet.* 26:272-273.
 24. Ulaner, G. A. and Giudice, L. C. 1997. Developmental regulation of telomerase activity in human fetal tissues during gestation. *Mol. Hum. Reprod.* 3(9):769-773.
 25. Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. and Campbell, K. H. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813.
 26. Yamaguchi, Y., Nozawa, K., Savoysky, E., Hayakawa, N., Nimura, Y. and Yoshida, S. 1998. Change in telomerase activity of rat organs during growth and aging. *Exptl. Cell Res.* 242:120-127.
 27. 손시환, 이재익. 1998. 고분염분석(High-resolution banding)에 의한 한우 염색체의 표준표지 설정. *한국축산학회지* 40(5):467-484.
- (접수일자 : 2004. 5. 24. / 채택일자 : 2004. 8. 17.)