

cis9 - cis11 CLA(Conjugated Linoleic Acid) Isomer가 지방대사 유전자 발현에 미치는 영향

이정수¹ · 조인희¹ · 소현경² · 오윤길² · 임희경² · 전광주² · 김관석³ ·
최영숙³ · 정정수³ · 최강덕²

¹한경대학교 유전정보연구소, ²한경대학교 생물정보통신전문대학원, ³충북대학교 축산학과

서 론

식생활과 건강에 대한 소비자들의 인식이 높아짐에 따라 식육의 소비형태도 변하여 양적 인 면보다는 건강 지향적 식육의 소비를 원하고 있다. 따라서 최근의 생체 기능성물질의 탐색과 이용에 관한 연구가 다양하게 진행되어지고 있는 바, 특히 conjugated linoleic acid (CLA)는 식품에 소량 존재하고 항암물질임이 밝혀지면서, 축산물을 이용한 CLA의 체내축적 축산물 개발 연구가 활발히 진행되고 있다.

그러나 최근에 동물성 지방의 섭취에 의한 성인병 발생의 우려 때문에 지방이 적은 육류의 생산이 중요 과제로 인식되고 있으며, 지방이 적은 축산물 생산은 사료효율 생산을 수반하기에 더욱 중요시되고 있다.

본 연구의 주 목적은 돼지 지방세포의 분화 억제 작용기작을 유전자 수준에서 규명하는 것인데, 이를 위해서 먼저 CLA가 돼지 지방전구세포의 분화억제 정도를 조사하고, CLA가 어떤 유전자에 영향을 줌으로써 지방세포의 분화를 억제하는지 DNA chip으로 규명하고, 나아가 DNA chip을 이용해서 지방세포 분화억제에 관여하는 유전자를 찾아내고, 이 유전자들은 지방세포 분화 조절과 비만관련 연구에 활용될 것이다.

지방전구세포의 분화 촉진관련 유전자를 탐색하기 위해서 본 논문에서는 돼지에서 분리 채취한 지방전구세포 (stroma-vascular cell)를 CO₂ 배양기에서 배양하는 중에 여러 CLA 이성체 중 분화를 촉진한 9c-11c를 첨가하여 DNACHIP을 제작하고 이로부터 CLA의 이성체중 하나인 지방 분화를 촉진한 9c-11c가 지방전구세포 분화의 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

본 연구의 지방전구세포의 분화 및 유전자 발현 변화를 조사하기 위한 실험으로 Yorkshire × Landrace × Duroc의 3원 교잡종 암태지를 이용하였으며 생후 10주령의 28kg의 돼지를 사용하였다.

각각의 Total RNA 1μg에 대조군에는 Cy3 Primer를, 실험군에는 Cy 5 primer를 각각 1μl씩 사용하고 5× SuperScript II First Strand Buffer 2μl, dNTP mix 0.5μl, Superase-In RNase

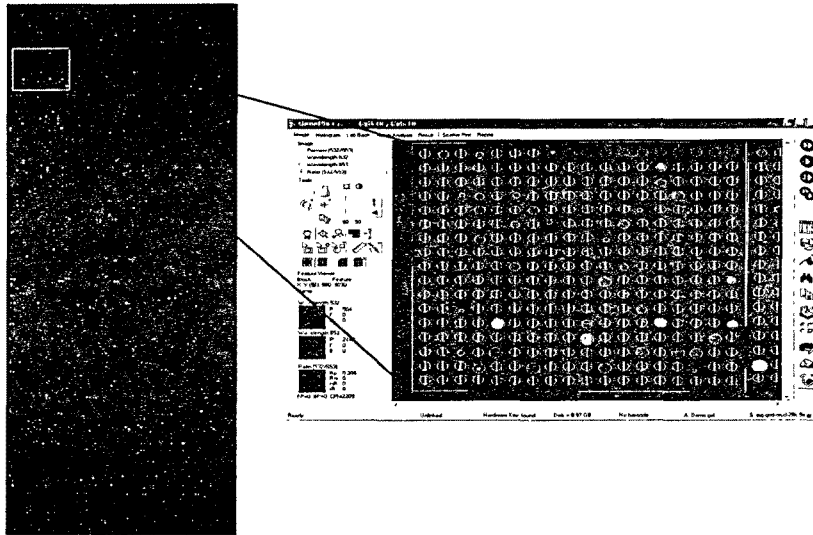


그림 1. 원본이미지

Inhibitor $0.5\mu\text{l}$ 및 reverse transcriptase $0.5\mu\text{l}$ 를 넣고 42°C 에서 2시간 동안 반응시켜 cDNA를 합성하고, 3DNA Array 900 Expression Array Detection Kit for Microarrays를 이용하여 암실에서 실험하였다.

ScanArray 4000(GSI Lumonics)을 이용하여 Cy3는 550nm의 파장에서 스캔하였고 Cy5는 650nm의 파장에서 스캔하여 fluorescent images를 얻었다. 결과 분석은 GenePix 6.0 software를 이용하여 돼지 지방 전구세포의 이미지 파일 2장(cy3, cy5)을 얻었다.

각 spot의 intensity는 background intensity를 제거한 median값으로 취하였고 Vector Xpression 3.0을 이용하여 M-A로 보정 후 다시 Lowess normalization을 통하여 M값이 1 이상의 값과 -1이하의 값이 되는 유전자들을 얻었다.

$$M_i = \log_2 \left(\frac{cy5_i}{cy3_i} \right) \quad (\text{where } 1 \leq i \leq 14688)$$

$$A_i = \sqrt{\log_2 (cy5_i \times cy3_i)} \quad (\text{where } 1 \leq i \leq 14688)$$

$$\begin{aligned} \text{Lowess normalization } \log_2(T_i)' &= \log_2(T_i) - y(x_i) \\ &\Rightarrow \log_2(T_i) - \log_2(2^{y(x_i)}) \\ &\Rightarrow \log_2 \left(\frac{T_i}{2^{y(x_i)}} \right) \\ &\Rightarrow \log_2 \left(T_i \times \frac{1}{2^{y(x_i)}} \right) \end{aligned}$$

$$\text{when } T_i = \frac{cy5_i}{cy3_i}$$

$y(x_i)$: the function of ratio on intensity

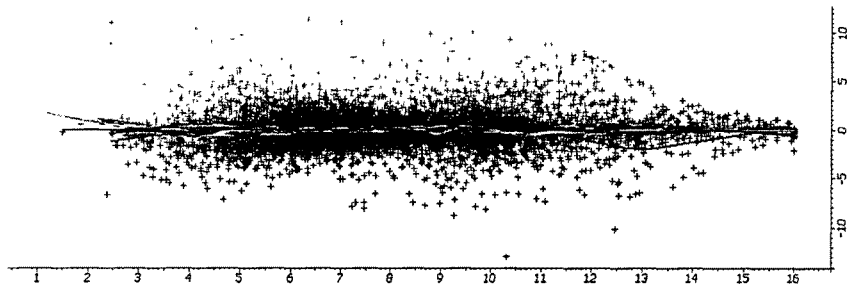


그림 2. Lowess MA plot.

결과 및 고찰

표 1. CLA(9c11c)에 의해 발현된 유전자중 M>1인 유전자

Gene	M
luteinizing hormone receptor precursor	11.051
Ig heavy chain variable VDJ region	7.633
PIR JC4950 JC4950 ADP-ribosylation factor 6 - mouse, partial (86%)	7.311
preproelastase 1 peptide [<i>Sus scrofa</i>]pancreatic preproelastase I [<i>Sus scrofa</i>]elastase 1 [<i>Sus scrofa</i>]	7.253
ATPase beta-subunit (AA 1-303) [<i>Sus scrofa</i>]ATPase beta-subunit (aa 1-303) [<i>Sus scrofa</i>]Na ⁺ , K ⁺ -ATPaseATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta-1 polypeptide [<i>Sus scrofa</i>]	7.019
rearranged T-cell receptor delta-chain/ Vdelta5.2-Ddeltas-Jdelta1 [<i>Sus scrofa</i>]rearranged T-cell receptor delta-chain/Vdelta5.1-Ddeltas-Jdelta1 [<i>Sus scrofa</i>]TCR delta-5 chain variable region [<i>Sus scrofa</i>]	6.615
GP 7022030 dbj BAA91467.1 unnamed protein product (<i>Homo sapiens</i>), partial (30%)	6.382
ciliary neurotrophic factor [<i>Sus scrofa</i>]	6.209
Interleukin 5 [<i>Sus scrofa</i>]interleukin-5 [<i>Sus scrofa</i>]	6.028
GP 3367701 emb CAA06248.1 cell cycle checkpoint protein (<i>Homo sapiens</i>), partial (73%)	6.024

표 2. CLA(9c11c)에 의해 발현된 유전자중 M<-1인 유전자

Gene	M1
SP P53488 ARP2_CHICK Actin-like protein 2 (Actin-like protein ACTL). [Chicken] (<i>Gallus gallus</i>), partial (20%)	-4.868
complement cytolysis inhibitor	-4.311
prolactin receptor [<i>Sus scrofa</i>]	-3.24
poly-ubiquitin precursor	-2.973
SP Q9TUZ0 ST5B_PIG Signal transducer and activator of transcription 5B. [Pig] (<i>Sus scrofa</i>), partial (24%)	-2.707
SP P49368 TCPG_HUMAN T-complex protein 1 gamma subunit (TCP-1-gamma) (CCT-gamma). [Human] (<i>Homo sapiens</i>), partial (32%)	-2.375
SP P06366 RS14_HUMAN 40S ribosomal protein S14 (Protein PRO2640). [Chinese hamster] (<i>Cricetulus griseus</i>), complete	-2.271
type II collagen alpha1 [<i>Sus scrofa</i>]	-2.038
superoxide dismutase (Mn type) [<i>Sus scrofa</i>]superoxide dismutase 2 [<i>Sus scrofa</i>]	-1.866
PIR JC2234 JC2234 ribosomal protein S15a cytosolic [validated] - rat, complete	-1.836

M이 1이상 되는 유전자는 unknown 687개를 포함하여 Na⁺, K⁺-ATPase, ciliary neurotrophic factor 등을 비롯한 1785개였으며, -1 이하의 값을 가지는 유전자는 unknown 714개를 포함하여 complement cytolysis inhibitor, prolactin receptor, type II collagen alpha1 등 1754개를 얻었다. 이 유전자들은 지방세포 분화 조절과 비만관련 연구에 활용될 것이다.

요 약

식육의 소비형태가 변화함에 따라 생체 기능성물질의 탐색과 이용에 관한 연구가 활성화되어지고 있다. 식품에 소량 존재하며 지방세포분화를 촉진하는 물질로 밝혀진 conjugated linoleic acid (CLA)중 9c-11c(9c)가 3원 교잡종 암돼지(Yorkshire × Landrace × Duroc)의 어떤 유전자에 영향을 줌으로써 지방세포의 분화를 촉진하는지 DNA chip을 이용하여 분석하였다. 분석도구로는 Genepix 6.0과 Vector Xpression 3.0을 사용하였다. 분석결과 Na⁺, K⁺-ATPase, ciliary neurotrophic factor, complement cytolysis inhibitor, prolactin receptor, type II collagen alpha1 등 과 같은 분화 관련 유전자가 나타났다. 이 연구는 나

아가 DNA chip을 이용해서 지방세포 분화억제에 관여하는 유전자를 찾아내고, 이 유전자들은 지방세포 분화 조절과 비만관련 연구에 활용될 것이다.

참 고 문 헌

1. 이정수, 최강덕 et al., Conjugated Linoleic Acid가 돼지지방전구세포 분화조절에 미치는 영향, 2005, 한국동물자원과학회.
2. 박준철, Conjugated Linoleic Acid의 급여가 돼지의 생산성, 돈육의 품질 및 면역능력에 미치는 영향, 2003.2, 충북대학교.
3. 권소영, Conjugated Linoleic Acid와 Conjugated Nonadecadienoic Acid가 3T3-L1 지방전구세포 분화중 지방대사 유전자 발현에 미치는 영향, 2004.2, 덕성여자대학교.