

한국 여성의 Lactadherin 유전자 Cloning과 발현 연구

염 행 철*

호서대학교 자연대학 생명과학과

Cloning and Expression of Lactadherin Gene from Korean Women

Heng-Cherl Yom[†]

Dept. of Life Sciences, College of Natural Sciences, Hoseo University, Chungnam 336-795, Korea

ABSTRACT : Lactadherin is a glycoprotein of human milk fat globule membrane that binds to mucin and butyrophilin forming the protein complex. Especially, mucin and lactadherin in human milk efficiently protect infants with poor immune functions right after birth from infections by microorganisms and play important roles for their early survival, growth and development. Lactadherin inhibits the propagation and growth of rotavirus that is a global pathogen causing infants' diarrhea. Recently this protein was known to promote neovascularization and its deficiency related to develop Alzheimer's disease. In this study, the basic biochemical and physiological aspects of lactadherin were investigated. Messenger RNAs were isolated from mammary tissues from Korean women patients to clone a 1.2 kb cDNA and sequenced its DNA to determine its amino acid sequences. The cDNA was cloned to express its 43 kD protein in *E. coli*, which was confirmed by Western blot. The recombinant protein was purified and injected to 2 rabbits to raise antibodies against it. The semi-purified milk fat globule membrane proteins from Korean women was analyzed by Western blot using the rabbit antibody to give 70, 55, 46, 30 kD bands. Also several polymorphism and SNPs of lactadherin gene from Korean women were observed compared with those of Caucasian women.

Key words : Lactadherin, Rotavirus, SNP, Human milk, Fat globule membrane protein.

요 약 : Lactadherin은 모유의 유지방구막의 당단백질의 하나로 mucin, butyrophilin과 결합된 복합체이다. 특히 모유중의 mucin과 lactadherin은 출생 직후 면역력이 약한 유아를 평균의 침입으로부터 효율적으로 방어하여 초기 유아의 생존과 성장 및 발달에 매우 중요한 역할을 수행한다. Lactadherin은 유아 설사의 원인이 되는 rotavirus의 번식과 성장을 억제한다. 아울러 이 단백질은 새로운 혈관의 형성을 촉진하는 주요한 단백질로 알려져 있으며, 이 단백질의 결핍이 치매의 발생과 관련되는 것으로 보고되고 있다. 본 연구는 이처럼 중요성이 강조되는 lactadherin에 대한 생화학적 및 생리학적인 연구를 하기 위한 기초연구를 진행하였다. 한국 여성의 유선조직에서 mRNA를 분리하였고, 1.2 kb lactadherin cDNA 유전자를 cloning하여 염기서열과 아미노산 배열을 결정하였다. 이 cDNA를 pET vector에 삽입하여 *E. coli*에서 43 kD 단백질을 발현시켰으며 Western blot으로 확인하였으며, 이 단백질을 정제하여 토끼에서 항체를 생산하여, 한국 여성의 모유에서 발현되는 70, 55, 46, 30 kD의 band를 확인하였다. 아울러 백인 여성의 lactadherin 유전자와 한국 여성의 정상 및 유방암 조직의 유전자 비교에서 다양한 SNP가 관찰되었고 변이의 다형성이 관찰되었다.

서 론

Lactadherin은 인간의 유선에서 분만 직후 비유의 개시와

동시에 발현하는 유지방구 막단백질의 한 종류인데 mucin과 결합되어 있으며, 특히 이 mucin 복합체는 rotavirus에 특이적으로 결합하고 항바이러스 활동을 보여준다(Yolken et al., 1992). Rotavirus는 유아나 어린 아이들에게 가장 일반적으로 나타나는 위장염의 원인자이며, 설사로 인한 심한 탈수 증세를 일으켜 성장하는 유아의 균형적인 영양 공급을 방해

* 교신저자: 충남 아산시 배방면 세출리, 호서대학교 생명과학과, (우) 336-795, (전) +82-41-540-5625, (팩) +82-41-548-6231, E-mail: yomhc@hoseo.edu

하고, 유아들의 발육과 성장 그리고 심하면 생명에 커다란 영향을 미친다(Ananthan & Saravanan, 1998; Palombo et al., 1998; Nakajima et al., 2001; Simonsen et al., 2001). 그러나 모유로 키운 유아들은 설사병의 발병률이 낮고, 이들에게는 rotavirus에 감염이 되기는 하지만 증상이 쉽게 호전된다(Newburg et al., 1998). 따라서 유아 설사는 rotavirus에 특이적으로 결합하는 모유속의 lactadherin에 의해 예방할 수 있다. 우리나라에서 봄철에 산후조리원 등에서 많이 발생하는 바이러스성 유아 설사의 원인이 바로 이 rotavirus에 의한 것으로 추정된다. 우유의 lactadherin은 rotavirus 감염을 막지 못하지만, 모유 속에 함유된 단백질은 감염을 막고 증상을 호전시키는 것으로 알려지고 있다(Kvistgaard et al., 2004). 최근에는 lactadherin은 새로운 혈관의 형성을 촉진하는 주요한 단백질로 알려졌으며(Silvestre et al., 2005), 이 단백질의 결핍이 치매와 관련되는 것으로 보고되었다(Boddaert et al., 2007).

자연 상태에서 lactadherin은 mucin의 몇몇 작은 분자들과 복합적으로 연합되어 있다. 즉, 70 kD의 당단백질인 butyrophilin과 당화된 lactadherin이 포함되어 있다. Rotavirus에 가장 높은 결합력과 항바이러스 활동을 나타내는 lactadherin은 분자량이 46 kD의 당단백질로, 지방구막 속에 연합되어 있으며, 유단백질의 하나인 mucin과 결합되어 분비된다(Shimizu et al., 1986; Duwe & Cenani, 1989). Lactadherin은 인간의 유선과 유방암 세포에서도 발견되며, 한때 BA₄₆으로 불려졌으며, EGF1-EGF2-C1-C2의 구조적 영역을 갖고 있다. 이 중 EGF는 EGF-like domain을 가리키고 C domain은 응혈효소 VIII와 V의 lipid-binding C domain을 포함하고 있다(Stubbs et al., 1990; Couto et al., 1995a; Couto et al., 1995b; Shi & Gilbert, 2003). 또한, EGF2 domain의 Arg-Gly-Asp(RGD) motif는 인간, 소, 그리고 쥐의 lactadherin의 아미노산 배열들을 비교 분석한 결과, 진화과정에서 종간에 잘 보존되어 있음을 보여주고 있으며, C2 domain은 phospholipid와 결합한다(Andersen et al., 2000). 백인 여성의 경우 lactadherin은 387개의 아미노산 배열과 1.2 kb의 cDNA sequence가 알려져 있으나(Aoki et al., 1995; Couto et al., 1996; Shi & Gilbert, 2003), 동양 여성이나 한국 여성에 관한 연구는 아직 보고되지 않았다.

Lactadherin과 mucin은 분만 직후부터 15일까지의 초유

에서 그 함량이 15일부터 90일까지의 모유에서 보다 현저히 높는데(40~93 $\mu\text{g/mL}$), 발현 정도는 개인차가 크다. 또한, pH 4 이하의 위산에서 변성되지 않고 자연 상태를 유지하며, 항바이러스 활동은 모유 거대분자의 산성 부분과 연관되어 있다(Yolken et al., 1992). 즉, 이것에 결합된 sialic acid를 제거하면 rotavirus에 더 이상 결합하지 않는다(Yolken et al., 1992). 모유에서 lactadherin의 발현이 비유의 개시와 동시에 이루어지는 것은 분만 전후에 급격히 상승하는 prolactin과 glucocorticoid와 같은 hormone의 작용에 의해 발현이 조절되는 것으로 추정된다. 이 단백질의 발현은 면역력이 약한 영아를 설사로부터 보호하여 자손의 생존율을 높이려는 본능이다. 이와 같은 생리적 특성을 갖는 lactadherin 단백질은 유전공학적인 방법으로 형질 전환 동물에서 대량 생산할 경우, 그 정제가 유지방을 분리함으로써 시작되기 때문에 기술적으로 간편하고 다른 단백질들과 달리 이유식이나 분유에 혼합하여 간편하게 복용시켜서 그 효과를 유지시킬 수 있다는 장점이 있다.

본 연구에서는 lactadherin에 대한 생화학적 및 생리학적인 기초 연구로써 한국 여성의 lactadherin cDNA 유전자를 cloning하고, *E. coli*에서 발현시켰으며, 단백질을 정제하여 항체를 생산하였고, 이를 사용하여 한국 여성의 모유에서 발현되는 lactadherin 단백질의 특성을 조사하였고, 한국 여성의 lactadherin 유전자 다형성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. RNA의 분리

유방암 환자의 동의를 얻어 절개한 시료로부터 정상 조직과 암 조직을 분리하고 액화 질소로 얼린 상태의 조직에서 각각의 total RNA를 분리하였다. 시료 조직에 TRIZOL (GibcoBRL, USA)을 첨가하고 tissue tearer로 조직을 잘게 부수었고, chloroform을 첨가한 후, 12,000 \times g/15 min/4 $^{\circ}$ C에서 원심분리를 하여 RNA를 포함하는 상등액을 분리하였다. RNA pellet은 DEPC(Diethylpyrocarbonate)를 처리한 H₂O로 용해시키고, RNA를 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

2. cDNA의 합성

cDNA library 형성은 1st strand cDNA Synthesis Kit(Life

science, USA)을 사용하였다. RNA 용액과 oligo-dT primer를 섞어 70°C에서 annealing을 시킨 후 RNase-free H₂O를 첨가하였다. 여기에 0.25 M DTT, RNase inhibitor, dNTP를 포함하는 5X buffer 그리고 AMV RTase를 섞어 41°C에서 1시간 동안 반응시켰다.

3. Primer Design

Lactadherin의 full sequence에서 coding region인 61~1224 base에서 Primer designer(Scientific & Educational software, ver. 2.0)를 사용하여 GC 함량과 Tm 값을 기준으로 제작하였다(Takara Korea Biomedical Inc.). Cloning의 효율을 높이기 위하여 sequence를 929번 염기를 기준으로 두 조각으로 나누었다. 31~966번 염기를 포함하는 A set (sense-TGC CCA TTC CAG CGC C Tm=74°C, GC 함량 68%, anti sense-GAT GCC TGT CAC CTC CTT CG Tm=73°C, GC 함량 60%)와 909~1518번 염기를 포함하는 B set (sense-CGG TAA CGA TCA GTG GCT GC Tm=74°C, GC 함량 60%, anti sense-ACA CGC CCT ACT TTG CCC TT Tm=74°C, GC 함량 55%)로 제작하였다.

4. PCR

PCR 반응 용액은 dNTP(2.5 mM), 10X buffer(1.5 mM MgCl₂), primer(100 pM), template(10 ng), 1,000 IU의 GL taq(Taq DNA Polymerase) 2.5 IU를 혼합하여 수행하였다. PCR은 Gene CyclerTM(Biorad, USA)를 사용하였고, 총 30 cycle을 94°C에서 30초, 58°C에서 3분, 72°C에서 2분을 실시하였다.

5. Cloning of Lactadherin Gene

PCR을 통하여 얻은 A와 B cDNA 절편을 pGEM-T easy vector(Promega, USA)에 각각 삽입하였다. 그 후 B 절편이 삽입된 pGEM-T-B vector를 PstI으로 자르고, 여기에 pGEM-T -A vector를 역시 PstI으로 자른 A 절편을 다시 삽입하여, A와 B 절편이 연결된 full length의 lactadherin cDNA가 clone되었음을 restriction enzyme analysis로 확인하였다. Clone된 부분의 염기서열을 capillary 방식의 MegaBACE 1000과 slab gel 방식의 ABI PRISM model 377 DNA sequencer(Takara Korea Biomedical)를 사용하여 염기서열을 확인하였다.

6. Lactadherin 발현

pGEM-T에 삽입된 lactadherin cDNA를 NotI으로 절단하여 insert를 만들고, 발현 vector인 pET-32B(Invitrogen, USA)를 NotI으로 자른 후 연결하여 발현 벡터를 완성하였다. 그 후 host cell(BL₂₁-DE₃)에 electroporator(Invitrogen, USA)를 사용하여 전이시켰다. 여기서 얻은 cell을 배양하여, 0.1 mM IPTG(isopropyl thiogalactoside)로 단백질의 발현을 유도하고, 원심분리로 수확한 cell에 Triton X-100 (Sigma, USA)을 첨가한 후(1%, v/v), sonication으로 세포를 분쇄시키고, 상등액을 취하였다. 이것으로 전기영동을 실시하여, nitrocellulose에 transfer하고, S-protein conjugate (1/5,000)와 반응시키고, nitro blue tetrazolium(NBT)와 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate(BCIP)(Promega, USA)를 기질로 사용하여 fusion 단백질의 발현을 확인하였다.

7. 항원 생산

Gel상의 band를 잘라서 균질화시키고, buffer(50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 0.1% SDS)로 4°C에서 교반하고 원심분리한 후 상등액을 취하였다. 여기에 acetone을 첨가하여 -20°C에서 침전시키고, 원심분리한 후 PBS에 용해하여 -70°C에 보관하였다.

8. 항체 생산

정제된 lactadherin을 complete Freund's adjuvant(Sigma, USA)와 혼합시키고, 두 마리의 토끼에 각각 0.3 mg의 항원을 주사하였다. 그리고 2주와 4주 후에 0.1 mg의 항원을 추가로 접종하였고, 매 1주일의 간격으로 10주 동안 혈액을 채취하였다. 항체의 titer는 dot blot으로 측정하였는데 혈청을 희석하여 nitrocellulose membrane에 고정시킨 후 goat anti-rabbit 항체와 alkaline phosphatase의 결합체가 사용되었고, 발색은 NBT와 BCIP(Promega, USA)를 사용하였다.

9. 모유의 Western Blotting

비유 개시 7일째인 한국 여성의 초유 샘플을 수집하여, 원심분리하고 상등액을 취하여 10% SDS-PAGE에 전기영동을 실시하였다. Western blotting은 토끼의 1차 항체와 2차 항체인 goat anti-rabbit 항체와 alkaline phosphatase가 사용되었고 발색은 NBT와 BCIP를 사용하였다.

결 과

1. Lactadherin cDNA Cloning

RNA를 cDNA 합성 kit를 이용하여 첫 가닥 cDNA를 합성한 다음 PCR을 실시하여 lactadherin cDNA의 A와 B 절편을 각각 증폭하였다(Fig. 1). 935 bp의 cDNA A 절편(Fig. 1A)과 609 bp cDNA의 B 절편(Fig. 1B)을 얻었다. 두 절편들을 연결하기 위하여 pGEM-T-A vector를 PstI으로 자르고 A절편 926 bp를 분리하고(Fig. 2A), pGEM-T-B vector도 역시 PstI으로 자르고, B 절편과 vector를 포함하는 3,576 bp를 분리하였다(Fig. 2B). 두 절편을 연결시켜서 full length의 lactadherin cDNA가 pGEM-T vector에 clone되었다(Fig. 2C). 그리고 정확한 분석을 위해서 EcoRI(Fig. 3A)과 PstI(Fig. 3B)으로 절단하여 절편들의 길이와 삽입 방향을 확인하였다.

2. Lactadherin 유전자의 발현과 항원의 분리

IPTG로 발현이 유도된 *E. coli* 세포를 분쇄하여 얻은 supernatant와 pellet에서 약 43 kD의 fusion 단백질이 확인되었다(Fig. 4A). Western blot에서 43 kD의 lactadherin band가 확인되었다(Fig. 4B). SDS-PAGE gel(16 cm×20 cm)에서 43 kD band들을 잘라 추출하여 항원으로 사용하였다.

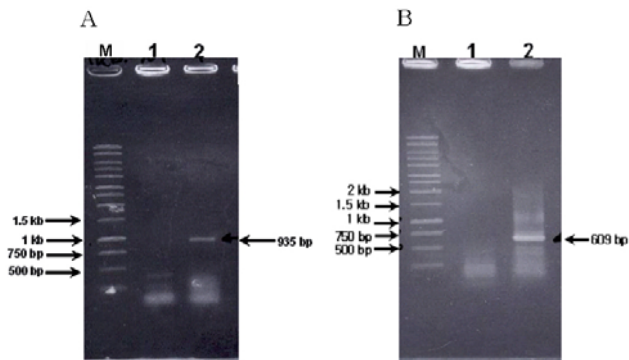


Fig. 1. Amplification of the lactadherin cDNA fragment by PCR on agarose gels. A: A fragment with 935 bp(arrow). B: B fragment with 609 bp(arrow). A: M, DNA size marker; lane 1, no template with A set primers; lane 2, 1st strand cDNA with A set primers. B: M, DNA size marker; lane 1, no template with B set primers; lane 2, 1st strand cDNA with B set primers.

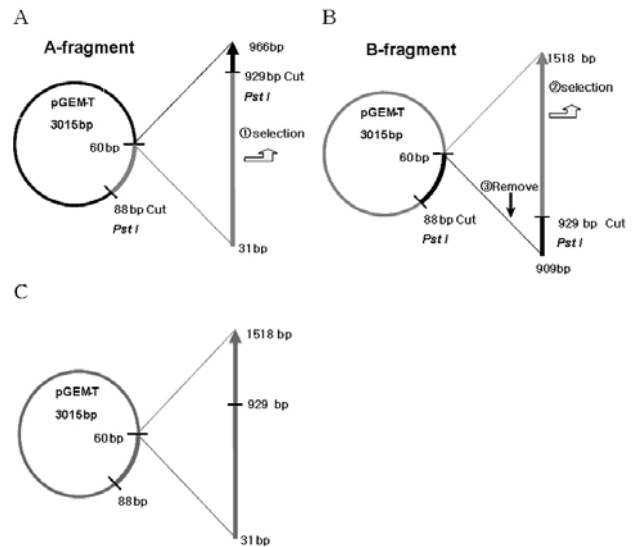


Fig. 2. Ligation of A fragment to B fragment in pGEM-T vector.

A: The pGEM-T-A was cut with PstI and 926 bp fragment in gray line was selected. B: The pGEM-T-B was cut with PstI and 3,576 bp fragment in gray line was selected. C: The selected fragments were ligated to give the full lactadherin cDNA in pGEM-T vector.

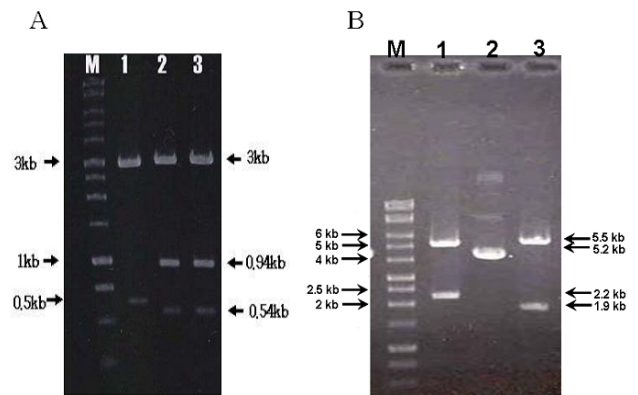


Fig. 3. Restriction enzyme analysis of lactadherin full cDNA inserted in a cloning vector pGEM-T by EcoRI(A) and in an expression vector pET32 by PstI(B) digestion on 1.0% agarose gels. A: M, size marker; lane 1, vector DNA; lane 2~3, vector DNA with the full lactadherin cDNA insert. B: M, Size marker; lane 1, forward insert; lane 2, uncut vector; lane 3, backward insert.

3. Lactadherin 항체의 Titer

토끼의 혈청에서 lactadherin 항체의 titer를 측정하기 위하여 dot blot을 실시하였다(Fig. 5B). 이 blot들을 각각 scan하

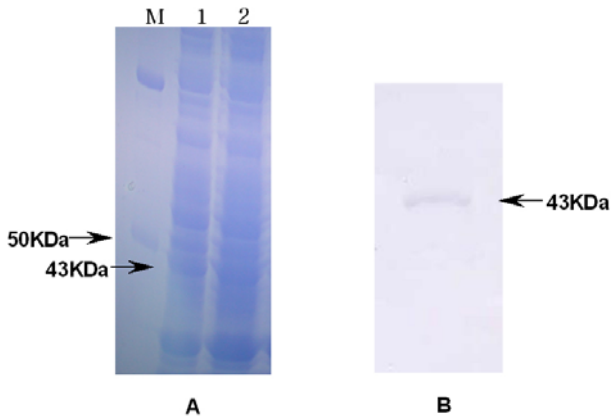


Fig. 4. Expression of lactadherin in *E. coli* on 10% SDS-PAGE (A) and Western blot of lactadherin(B). A: M, molecular weight marker(note 50 K marker); lane 1, supernatant of *E. coli* cell extract; lane 2, *E. coli* pellet. Lane 1~2 show 43 K bands. B: Western blot of *E. coli* pellet by S-tag method.

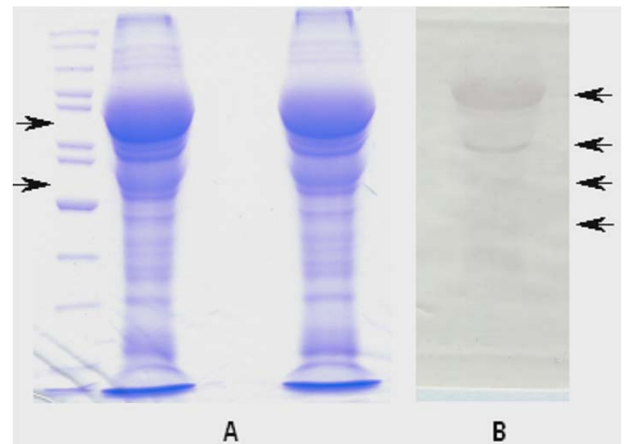


Fig. 6. Milk fat globule membrane proteins of Korean women on 10% SDS-PAGE(A) and the Western blot with rabbit lactadherin antibody(B). A: The arrows on the left indicate 70 kD and 55 kD(from the top). B: The arrows on the right indicate 70, 55, 46 and 30 kD(from the top) indicating the multiple forms of lactadherin.

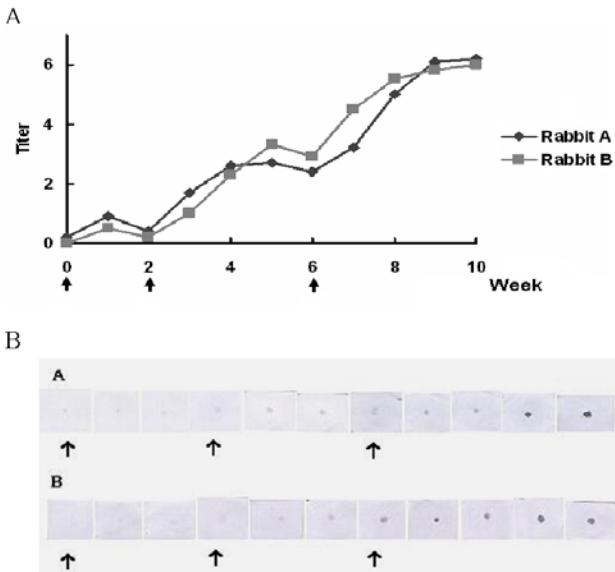


Fig. 5. Titer of rabbit anti-lactadherin(A) and dot blots of titration(B). The arrows on both figures indicate the times of antigen injection and booster shots.

여 얻은 pixel의 면적과 밀도에서 얻은 임의의 숫자를 1~5 점으로 변환한 다음 4번의 평균치를 그래프로 표시한 것이다 (Fig. 5A). 두 마리의 토끼에서 항체의 titer가 두 차례의 추가 접종 후에 상승하였는데, 특히 2차 추가 접종 후 8~10주 사이에 정점을 이루었다.

4. 모유의 Lactadherin 동정

Fig. 6A는 한국 여성의 모유에 존재하는 전체 지방구막 단백질 패턴이다. 왼쪽 화살표는 위로부터 70 kD와 55 kD의 크기를 나타내고 있는데, 70 kD band는 지방구막 단백질 가운데 가장 많이 존재하는 MUC1 mucin이며, 55 kD band는 신원을 알 수 없다. Fig. 6B는 모유 지방구막 단백질의 Western blot이다. 오른쪽 화살표는 위로부터 70, 55, 46, 30 kD band를 나타내고 있는데, Cavaletto et al.(1999)이 보고한 형태의 lactadherin으로 추정된다. 특히 희미한 세 번째 46 kD band는 lactadherin으로, 네 번째 30 kD band는 잘려진 lactadherin의 절편으로 생각된다. 이들이 희미한 이유는 membrane 단백질들의 특징인 hydrophobic한 특성 때문으로 생각된다. 즉 이 단백질의 hydrophobic한 특성이 역시 hydrophobic한 nitrocellulose membrane에 transfer할 때 효율적으로 결합하지 않기 때문으로 추정된다.

5. 한국 여성의 Lactadherin cDNA 염기서열과 Gene Polymorphism

총 9개의 유방암 조직을 임상적 조직검사에 따라서 정상 조직과 암 조직으로 구별하여 lactadherin cDNA를 각각 cloning하였다. Fig. 7은 한국 여성의 lactadherin cDNA 염기서열과 해당하는 아미노산 서열이다. 이 서열을 UniProt(Uni-

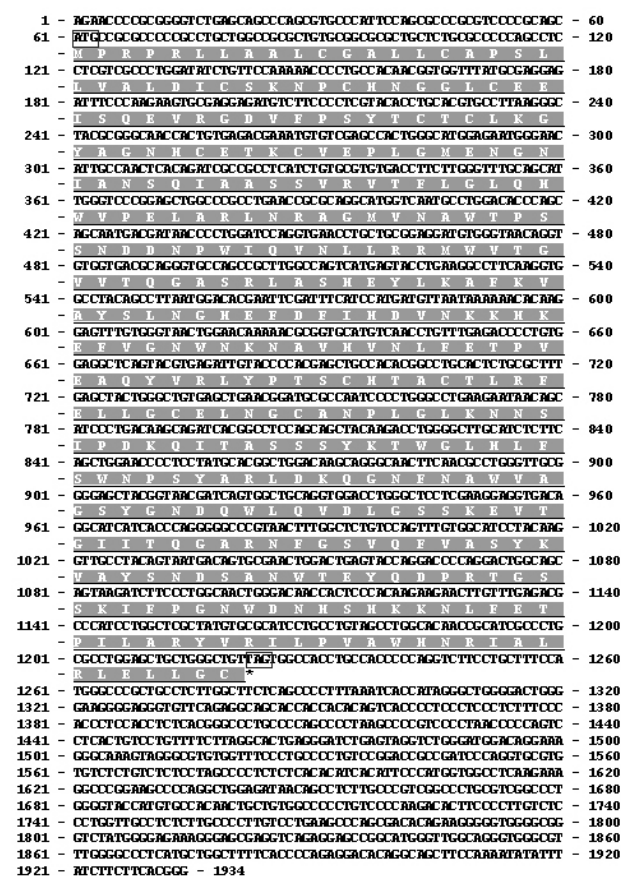


Fig. 7. Lactadherin cDNA gene sequence and its amino acid of a Korean woman. The start codon is at 61~63 bases and the stop codon at 1,222~1,224 bases as indicated in boxes.

versal Protein Resource, <http://beta.uniprot.org>)에 의해 분석하면 아미노산 1~23은 signal peptide, 24~387은 lactadherin, 202~387은 lactadherin의 절편, 268~317은 medin이다. 또한 아미노산 24~67은 EGF-like domain, 70~225는 F5/8 type C1 domain, 230~387은 F5/8 type C2 domain, 46~48은 세포에 접착하는 motif이다. 또한, DNA의 염기서열을 문헌상에 나타난 백인 여성의 lactadherin 유전자의 염기서열(Couto et al., 1996)과 비교, 분석한 결과 single nucleotide polymorphism(SNP)이 여러 곳에서 발견되었다(Table 1). 정상조직에서는 9곳(67, 346, 444, 454, 543, 755, 1354, 1418, 1466 base)의 SNP가 확인되었고, 그 중 5곳(67, 755, 1354, 1418, 1466 base)은 아미노산의 변화를 가져오는 변이를 보였고(55.5%), 4곳(346, 444, 454, 543 base)은 silent mutation으로 아미노산의 변화가 없었다. 암

조직에서는 25개(286, 291, 299, 327, 366, 416, 435, 444, 447, 454, 535, 537, 623, 664, 665, 967, 998, 1126, 1148, 1330, 1404, 1405, 1417, 1418, 1461 base)의 SNP를 보이고 있다. 이것은 정상 조직보다 거의 3배에 해당되는 변이를 보이고 있으며, 17곳(286, 299, 416, 435, 535, 537, 623, 664, 665, 967, 998, 1126, 1148, 1330, 1405, 1417, 1418 base)에서 아미노산이 바뀌는 변이를 보이고 있으며(68%), 8곳(291, 327, 366, 444, 447, 454, 1404, 1461 base)에서는 silent mutation으로 아미노산의 변화가 없었다. 또한, 같은 조직(Table 1의 4번 sample)을 비교, 분석한 결과 정상 조직에서 2곳의 silent mutation이 있었고, 암 조직에서 2곳의 mutation과 1곳의 silent mutation을 발견하였다. 특히 정상적인 조직에는 있지만 암 조직에 없는 2개의 silent mutation은 임상적 조직검사의 부정확성을 보이는 것으로 정상적으로 판정된 조직도 이미 변이가 시작된 것을 의미한다. Table 1의 암 조직의 변이에서 알 수 있는 공통점은 몇 염기서열에서 변이가 자주 일어난 것을 알 수 있다. 즉, 286번(A>C)과 1418번(G>C)은 아미노산의 변이를 주는 mutation이었고, 327번(A>G)과 454번(C>T)은 silent mutation이었다. 이러한 변이가 coding region 안에 위치하면 아미노산의 조성이 변화되고, 그 결과 단백질 사슬에 변화가 생겨서 원래의 단백질의 구조와 기능이 크게 바뀌게 된다.

고 찰

Lactadherin은 모유 지방구 막단백질의 하나로 mucin, butyrophilin과 결합하여(Peterson et al., 1998a; Peterson et al., 1998b; Cavaletto et al., 1999), 면역력이 약한 유아를 병균으로부터 비면역적으로 방어한다. 특히 rotavirus의 번식을 특이적으로 억제하고(Newburg et al., 1998), 혈관의 형성을 촉진하며(Silvestre et al., 2005), 치매 발생과 관련이 보고되고 있다(Boddaert et al., 2007). 본 연구에서는 이 같이 다양한 기능을 가진 lactadherin에 대한 기초 연구를 수행하는데 필요한 단백질과 항체를 확보하기 위하여 유전공학적인 방법으로 접근하였다.

한국 여성의 유전조직으로부터 이 유전자의 cDNA를 cloning하여 *E. coli*에서의 발현 vector를 구축하였고, 43 kD lactadherin을 생산하였다. 또 토끼에 주사하여 항체를 만들었으며, 이것을 사용하여 모유에서 lactadherin을 동정하는데

Table 1. Summary of polymorphism or mutation of lactadherin gene of Korean women

No.	Bp	67~	286~	291~	299~	327~	346~	366~	416~	435~	444~	447~	454~	535~	537~	543~	623~
		C(Arg)	A(Met)	G(Glu)	A(Asn)	A(Ser)	T(Leu)	C(Val)	C(Pro)	C(Asn)	C(Ile)	G(Gln)	C(Leu)	A(Lys)	G(Lys)	C(Ala)	A(Lvs)
Normal tissue	1	A(Ser)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-
	3	A(Ser)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-
	4A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	T	-
Cancer tissue	4B	-	C(Leu)	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	C(Leu)	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	A	G(Ser)	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	G(Arg)
	7	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	T	C(Gln)	A(Gln)	-	-
	8	-	C(Leu)	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	C(Leu)	-	-	G	-	-	G(Arg)	A(Lys)	T	A	-	-	-	-	-	
No.	Bp	664~	665~	755~	967~	998~	1126~	1148~	1330~	1354~	1404~	1405~	1417~	1418~	1461~	1466~	
		G(Ala)	C(Ala)	A(Asn)	A(Ile)	T(Val)	A(Asn)	T(Leu)	G(Gly)	A(Thr)	G(Leu)	C(Pro)	A(Ser)	G(Ser)	G(Stop)	A(Arg)	
Normal tissue	1	-	-	T(Ile)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G(Gly)	
	2	-	-	-	-	-	-	-	G(Ala)	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C(Thr)	-	-	-	
	4A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cancer tissue	4B	-	-	-	-	-	-	-	A(Ser)	-	-	-	-	-	-	-	
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C(Thr)	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	C(Pro)	-	-	T	G(Ala)	-	C(Thr)	-	-	
	7	C(Leu)	T(Leu)	-	-	C(Ala)	G(Asp)	-	-	-	-	-	-	C(Thr)	-	-	
	8	-	-	-	G(Val)	-	-	-	-	-	-	-	G(Gly)	-	A	-	
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

Bp: base position, No.: sample number.

사용하였다. 모유 지방구막 단백질에 대한 Western blot의 결과에서 다양한 형태의 lactadherin으로 추정되는 4개의 band들을 확인하였다(Newburg et al., 1998; Cavaletto et al., 1999). 이 중 밝혀지지 않는 55 kD 단백질에 대한 추가 연구가 필요하다. 아울러 Western blot에서 hydrophobic한 막단백질을 효율적으로 동정하기 위한 연구도 필요하다.

본 연구에서 다양한 인체 조직 sample로부터 이 유전자의 SNP를 확인하였다(Brookes, 1999; Cargill et al., 1999). 이 연구에서 알려진 SNP는 한국 사람 집단이 가지는 lactadherin gene의 SNP 일부일 것으로 추정한다. 그러나 어느 정도가 한국 여성 집단에 분포하고 있는지를 알기 위해서는 sample 규모가 커져야 한다. 또한, 시료가 암환자의 정상조직이므로 어느 정도가 한국 여성 집단에 분포된 진정한 SNP인지 여부는 판단하기 곤란하였다. 또한, 정상조직보다 암조직일

수록 변이가 3배나 많이 존재하는 것이 확인되었다. 백인 여성의 경우, 아미노산 3번과 76번의 변이가 발견되었지만 한국 여성의 lactadherin 단백질의 subtype이 있는지는 아직 알려지지 않았다. 또한, 변이가 존재한다면 단백질 수준에서 어떤 의미를 갖고 있는지, 즉 여러 형태의 변이가 rotavirus의 증식 억제에 어떠한 영향을 주는 지에 대한 것도 면밀히 검토되어야 한다. 본 연구에서 밝혀진 SNP가 유방암의 진행을 모니터링할 수 있는 gene marker 또는 physical mapping 및 genetic mapping을 위한 marker로 사용될 수 있는지의 여부는 더 연구되어야 할 것이다.

Lactadherin을 유전공학적으로 발현하여 응용하기 위하여 그 가공성과 열안정성에 대한 연구와 단백질의 생리적 활성이 영향을 받는 지에 대한 연구도 필요하다. 또한 이 단백질은 모유 지방구의 여러 가지 막단백질과 결합하여 작용하

로 이 단백질과의 상호 비면역적인 생체 방어 기작에 대한 추가 연구도 필요하다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Ananthan S, Saravanan P (1998) Analysis of human rotavirus serotypes in children with acute diarrhoea in Chennai by monoclonal antibody based ELISA. *Indian J Med Res* 108:58-61.
- Andersen MH, Graversen H, Fedosov SN, Petersen TE, Rasmussen JT (2000) Functional analyses of two cellular binding domains of bovine lactadherin. *Biochemistry* 39: 6200-6206.
- Aoki N, Kishi M, Taniguchi Y, Adachi T (1995) Molecular cloning of glycoprotein antigens MGP57/53 recognized by monoclonal antibodies raised against bovine milk fat globule membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* 1245:385-391.
- Boddaert J, Kinugawa K, Lambert JC, Boukhtouche F, Zoll J, Merval R, Blanc-Brude O, Mann D, Berr C, Vilar J, Garabedian B, Journiac N, Charue D, Silvestre JS, Duyckaerts C, Amouyel P, Mariani J, Tedgui A, Mallat Z (2007) Evidence of a role for lactadherin in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 170:921-929.
- Brookes A (1999) The essence of SNPs. *Gene* 234:177-186.
- Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, Lane CR, Lim EP, Kalyanaraman N, Nemesh J, Ziaugra L, Frieland L, Rolfe A, Warrington J, Lipshutz R, Daley GD, Lander ES (1999) Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* 22:231-238.
- Cavaletto M, Giuffrida MG, Giunta C, Vellano C, Fabris C, Bertino E, Godovac-Zimmermann J, Conti A (1999) Multiple forms of lactadherin (breast antigen BA46) and butyrophilin are secreted into human milk as major components of milk fat globule membrane. *J Dairy Res* 66:295-301.
- Couto JR, Blank EW, Peterson JA, Ceriani RL (1995a) Anti-BA46 monoclonal antibody MC3 - Humanization using a novel positional consensus and *in vivo* and *in vitro* characterization. *Cancer Res* 55:1717-1722.
- Couto JR, Christian RB, Peterson JA, Ceriani RL (1995b) Designing human consensus antibodies with minimal positional templates. *Cancer Res* 55:5973-5977.
- Couto JR, Taylor MR, Godwin SG, Ceriani RL, Peterson JA (1996) Cloning and sequence analysis of human breast epithelial antigen BA46 reveals an RGD cell adhesion sequence presented on an epidermal growth factor-like domain. *DNA Cell Biol* 15:281-286.
- Duwe AK, Cenani RL (1989) Human milk fat globule membrane derived mucin is a disulfide-linked heteromer. *Biochem Biophys Res Commun* 165:1305-1311.
- Kvistgaard AS, Pallesen LT, Arias CF, López S, Petersen TE, Heegaard CW, Rasmussen JT (2004) Inhibitory effects of human and bovine milk constituents on rotavirus infections. *J Dairy Sci* 87:4088-4096.
- Nakajima H, Nakagomi T, Kamisawa T, Saksaki N, Muramoto K, Mikami T, Nara H, Nakagomi O (2001) Winter seasonality and rotavirus diarrhea in adults. *Lancet* 357: 1950.
- Newburg DS, Peterson JA, Ruizpalacios GM, Matson DO, Morrow AL, Shults J, Guerrero MD, Chaturvedi P, Newburg SO, Scallan CD, Taylor MD, Ceriani RL, Pickering LK (1998) Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. *Lancet* 351:1160-1164.
- Palombo EA, Bugg HC, Bishop RF (1998) Characterisation of rearranged NSP5 gene of a human rotavirus. *Acta Virologica* 42:55-59.
- Peterson JA, Hamosh M, Scallan CD, Ceriani RL, Henderson TR, Mehta NR, Armand M, Hamosh P (1998a) Milk fat globule glycoproteins in human milk and in

- gastric aspirates of mother's milk-fed preterm infants. *Pediatr Res* 44:499-506.
- Peterson JA, Patton S, Hamosh M (1998b) Glycoproteins of the human milk fat globule in the protection of the breast-fed infant against infections. *Biol Neonate* 74: 143-62.
- Shi J, Gilbert GE (2003) Lactadherin inhibits enzyme complexes of blood coagulation by competing for phospholipid-binding sites. *Blood* 101:2628-2636.
- Shimizu MK, Yamauchi K, Miyauchi Y, Sakurai T, Tokugawa K, McIlbinney RAJ (1986) High-M, glycoprotein profiles in human milk serum and fat-globule membrane. *Biochem* 233:725-730.
- Silvestre JS, Théry C, Hamard G, Boddaert J, Aguilar B, Delcayre A, Houbron C, Tamarat R, Blanc-Brude O, Heeneman S, Clergue M, Duriez M, Merval R, Lévy B, Tedgui A, Amigorena S, Mallat Z (2005) Lactadherin promotes VEGF-dependent neovascularization. *Nat Med* 11:499-506.
- Simonsen L, Morens DM, Elixhauser A, Gerber M, Van Raden M, Blackwelder WC (2001) Effect of rotavirus vaccination programme on trends in admission of infants to hospital for intussusception. *Lancet* 358:1224-1229.
- Stubbs J, Lekutis C, Singer K (1990) cDNA cloning of a mouse mammary epithelial cell surface protein reveals the existence of epidermal growth factor-like domains linked to factor VII-like sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8417-8421.
- Yolken RH, Peterson JA, Vonderfecht SL, Fouts ET, Midthun K, Newburg DS (1992) Human milk mucin inhibits rotavirus replication and prevents experimental gastroenteritis. *Clin Invest* 90:1984-1991.