한우 등심부위 근육 내 조지방함량에 따른 *inducible cAMP early repressor (ICER)* 유전자발현 분석

이승환¹ · 김남국 · 김성곤 · 조용민 · 윤두학 · 오성종 · 임석기 · 박응우*

농촌진흥청 축산과학원 동물유전체과, ¹호주 뉴잉글랜드대학

Received April 24, 2008 / Accepted July 17, 2008

Gene Expression Analysis of Inducible cAMP Early Repressor (ICER) Gene in Longissimus dorsi of High- and Low Marbled Hanwoo Steers. Seung Hwan Lee¹, Nam Kuk Kim, Sung Kon Kim, Yong Min Cho, Duhak Yoon, Sung Jong Oh, Seok Ki Im and Eung Woo Park*. *Animal Genomics & Bioinformatics Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration (RDA), Suwon 441-706, Korea, ¹School of Environmental and Rural Science, The University of New England, Armidale, NSW 2351, Australia* - Marbling (intramuscular fat) is an important factor in determining meat quality in Korean beef market. A grain based finishing system for improving marbling leads to inefficient meat production due to an excessive fat production. Identification of intramuscular fat-specific gene might be achieved more targeted meat production through alternative genetic improvement program such as marker assisted selection (MAS). We carried out ddRT-PCR in 12 and 27 month old Hanwoo steers and detected 300 bp PCR product of the *inducible cAMP early repressor (ICER)* gene, showing highly gene expression in 27 months old. A 1.5 kb sequence was re-sequenced using primer designed base on the Hanwoo EST sequence. We then predicted the open reading frame (ORF) of ICER gene in ORF finder web program. Tissue distribution of ICER gene expression was analysed in eight Hanwoo tissue using realtime PCR analysis. The highest ICER gene expression showed in *Small intestine* followed by *Longissimus dorsi*. Interestingly, the ICER gene expressed 2.5 time higher in *longissimus dorsi* than in same muscle type, *Rump*. For gene expression analysis in high- and low marbled individuals, we selected 4 and 3 animal based on the muscle crude fat contents (high is 17-32%, low is 6-7% of crude fat contents). The ICER gene expression was analysed using ANOVA model. Marbling (muscle crude fat contents) was affected by ICER gene ($P=0.012$). Particularly, the ICER gene expression was 4 times higher in high group ($n=4$) than low group ($n=3$). Therefore, ICER gene might be a functional candidate gene related to marbling in Hanwoo.

Key words : *Inducible cAMP early repressor (ICER)*, Marbling (intramuscular fat), differential display RT-PCR (DDRT-PCR) and Analysis of Variance (ANOVA)

서 론

쇠고기의 육질은 육색, 지방색, 조직감 및 마블링(근내지방도)에 의해서 결정되며, 이들 요인 중 근육 내 지방축적정도(근내지방도)는 쇠고기의 다즙성 및 연도에 영향을 미칠 뿐 아니라, 미국[14], 일본[6] 및 한국에서 쇠고기의 등급을 결정하는 매우 중요한 요인 중 하나이다. 현재, 쇠고기의 근내지방 향상을 위하여 곡물사료 급여를 통한 비육기간 연장 과 같은 비육 프로그램이 비육농장을 중심으로 진행되고 있다. 그러나 이러한 방법으로 근내지방은 향상되지만, 등지방 및 내장지방의 증가로 비가식 지방량의 증가와 정육율 감소와 같은 비효율적인 결과를 초래하고 있다[2]. 따라서 근육 내 지방을 조절하는 유전자 및 근육 내 지방축적에 대한 생리·생화학적 메커니즘을 규명할 수 있다면, marker as-

sisted selection (MAS)과 같은 동물육종프로그램을 통하여 보다 효과적인 쇠고기 생산에 이용할 수 있을 것이다.

최근까지, 소의 근내지방 축적을 조절하는 원인 유전자를 찾기 위하여 QTL 및 유전자 발현분석 등 많은 유전체 연구가 진행되고 있으며[15,8], Hu 등[4]은 과거 10년간의 소 QTL 결과를 통합하여 QTL 데이터베이스를 확립하였고, 이를 통하여 형질관련 위치적·기능적 후보유전자 발굴이 한층 수월하게 되었다.

소의 근내지방은 12개월령부터 축적되기 시작하여 비육후기인 27개월령까지 증가한다고 보고되어 있다[11]. Lee 등[8]은 근내지방이 왕성하게 증가하는 한우의 비육전기 및 후기 기간에 차등적으로 발현하는 유전자를 differential display RT-PCR법으로 탐색하였으며, 이중 *inducible cAMP early repressor (ICER)* 유전자가 비육후기 및 근내지방유래 지방세포 분화에 따라 발현이 왕성하게 증가하는 것을 확인하였다[8].

ICER 유전자는 multi-exonic CREM (cAMP response element modulator) 유전자의 선택적인 스프라이싱(splicing)을

*Corresponding author

Tel : +82-31-290-1593, Fax : +82-31-290-1602

E-mail : pewkys@rda.go.kr

통하여 만들어진 유전자로서, 세포 내 cAMP에 의해 유도되는 유전자발현을 억제 또는 활성화하는 역할을 하는 유전자로 알려져 있다[9]. 특히, cAMP는 많은 지방합성유전자의 promoter 영역의 전사조절인자 결합영역인 cAMP response element (CRE)영역에 결합하여 유전자발현을 촉진 또는 억제시키는 주요 인자로 보고되어 있다[1]. 아울러, Zhou 등 [18] 등은 ICER 유전자는 고 포도당식이(high glucose diets)에 따라 발현이 증가한다고 보고하였다. 따라서, ICER 유전자는 근육 내 지방합성을 촉진하는 포도당(glucose)과 같은 영양물질에 의해서도 그 발현이 조절됨을 알 수 있다.

본 연구는 한우에서 근내지방 축적이 왕성한 비육전·후기 등심조직에서 차등발현을 보인 ICER 유전자의 유전적 특성구명을 위하여 *inducible cAMP early repressor* (ICER) 유전자의 클로닝, 조직별 발현, 마블링 수준(high 및 low)에 따른 유전자발현양상의 차이를 ANOVA (Analysis of Variance) 모델을 통하여 분석하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용된 조직시료는 2개의 한우집단으로부터 채취하였다. *Inducible cAMP Early Repressor* (ICER)유전자의 ddRT-PCR 재현성실험을 위한 성장단계 등심시료는 농촌진흥청 축산과학원 한우시험장 보유축군 도축시 12개월령 및 27개월령 각 3두로부터 채취하였고, ICER 유전자의 근내지방도에 따른 유전자발현분석을 위한 시료는 농촌진흥청 축산과학원에서 2002년 4월부터 2004년 4월까지 사양 실험한 한우 동기우 집단 90두로부터 마블링 성적 및 근육 내 조지방 함량에 따라 마블링 high- 및 low 군으로 각각 4두와 3두씩 선택하였다. 아울러, 조직별 ICER 유전자발현을 위한 7개 조직은 한우 동기우집단 90두 중 1마리의 도체로부터 조직을 확보 후, 액체질소에서 동결하여 -70°C에 보관하면서 실험에 이용하였다.

Total RNA 추출

한우 등심 및 7개 조직으로부터 total RNA분리는 Trizol (Life Science, Ltd. Co)을 이용하여 추출하였다. 즉, 0.2 g을 막자 사발에 액체질소와 함께 잘 분쇄한다. 분쇄한 조직을 Trizol 1 ml과 잘 혼합하여 500 µl씩을 1.5 ml 마이크로 튜브에 분주한 후 chloroform 100 µl를 첨가하여 5분간 교반한다. 그 후 12,000 rpm으로 10분간 원심분리 하여 생긴 상층액을 잘 분리하여 1.5 ml 튜브에 옮겨 동량의 isopropanol을 첨가하여 잘 섞어준 후 다시 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 pellet을 수집한다. 수집된 pellet을 70% 에탄올을 첨가하여 잘 세척하여 건조시킨 후 DEPC (0.1%)로 처리된 증류수 50 µl에 녹여 -70°C에 보관하였다.

Differential display RT-PCR을 통한 ICER 유전자 재현성 탐색

ICER 유전자의 ddRT-PCR 재현성실험을 위하여 한우 성장단계(12, 27개월령) 각 3두의 등심조직 total RNA를 pooling하여 ddRT-PCR 분석을 재차 실시하였다. 1st cDNA 합성은 GeneFishing DEG kit (SeeGene, Korea)의 dT-ACP1 primer를 이용하여 합성하였으며, ICER 유전자 증폭을 위하여, GeneFishing DEG kit 의 arbitrary GP14 primer와 dT-ACP2 primer 및 GeneFishing DEG kit로부터 제공된 PCR Master mix를 이용하였다. PCR 증폭 반응은 94°C에서 40초, 중합반응은 65°C에서 40초, 그리고 합성반응은 72°C에서 40초간 하였고, 전체 40 cycle을 수행하였다.

ICER 유전자 클로닝 및 Real-time PCR 분석용 primer 제작

ICER 유전자 클로닝을 위한 primer는 ACP-ddRT-PCR법으로 증폭된 3'-영역 300 bp의 염기서열을 한우 EST 클론과 BLAST 검색을 통하여 총 4개의 EST clone (*HW_Loin_1_G03*, *HW_Loin_5_G02*, *HW_Loin_11_0520_E11*, *HW_Loin_13_0520_C10*)의 cluster인 1.6 kb 염기서열 이용하여 1.5kb를 증폭할 수 있도록 primer를 제작하였다. 아울러, Realtime PCR 용 primer는 primer3 program (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>)을 이용하여 PCR 증폭산물 150 bp가 되도록 제작하였으며, 내부보정용 유전자로는 18S rRNA (GenBank acc No DQ222453)를 사용하였다. 본 연구에 사용된 모든 primer는 primer3 program을 이용하여 제작하였으며, primer 서열은 Table 1과 같다.

ICER 유전자 re-sequencing

ICER re-sequencing을 위하여 한우 등심조직에서 추출한 total RNA를 이용하여 1st cDNA를 합성하였다. 분리한 total RNA (5 µg)를 95°C에서 10분간 열변성시킨 후 즉시 얼음에서 급속 냉각하여, 5× 완충용액(10 mM Tris-Cl, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂) 5 µl, 6 µg BSA, 10 mM DTT, oligo-dT primer

Table 1. Primer sequences of ICER cloning and gene expression analysis

Primer name	Primer sequence (5'→3')
ICER cloning	
Cloning-F	5'- GATTCGATAGTTGAAAGA -3'
Cloning-R	5'- ACTAGTGATTAAGCCCATCA-3'
ICER gene expression	
ICER-F	5'- GGC ATT CAA GGA CAG CAA TA-3'
ICER-R	5'- GGG CAT CCA GCA GTA CAA TAA-3'
18S-F	5'- GAG AAA CGG CTA CCA CAT CC-3'
18S-R	5'- GAC ACT CAG CTA AGA GCA TC-3'

(10 $\mu\text{m}/\mu\text{l}$) 2 μl 와 Superscript II Reverse Transcriptase (100 U/ μl) 1 μl 를 첨가한 후, 전체의 양을 25 μl 로 맞추어 42°C에서 1시간동안 반응시킨 후 70°C에서 역전사 효소를 불활성화 시켰다. PCR 수행은 PTC-225 (MJ Reseach, Inc)의 peltier thermal cycler를 이용하여, 최초 95°C에서 5분간 예비변성을 시킨 후, 변성반응은 94°C 45초, 중합반응은 58°C에서 1분, 그리고 합성반응은 72°C에서 2분간으로 35회 반복 수행한 후 최종적으로 72°C 10분간 반응시킨 후 중결하였다. PCR 증폭이 끝난 후 PCR 증폭산물들은 CONCERTTM Rapid PCR purification system (Life Technologies, USA)을 이용하여 정제하였다. ICER 유전자의 re-sequencing은 BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)을 이용하여 반응을 실시하였고, 반응이 끝난 산물은 ABI 3730XL DNA Sequencer (Applied Biosystems, U.S.A)를 이용하여 염기서열을 결정하였다.

정량적 real-time PCR 분석

ICER 유전자발현분석은 한우 7개 조직 및 근육 내 조지방 함량에 따른 발현의 차이를 보기 위하여 실시하였다. 한우 7개 조직은 동일개체의 조직을 채취하였으며, 마블링 high 그룹은 근육 내 조지방함량 17-32% 이내 4두를 선발하였고, low 그룹으로 조지방함량 6-7% 이내 3두를 선발하여 유전자 발현분석을 실시하였다. 실험의 정확도를 기하기 위하여 시료 당 3회씩을 반복하였다. Real-time PCR은 QuantiTect SYBR Green premix (Qiagen) kit와 ABI 7500 system (ABI)을 이용하여 다음과 같이 수행하였다. 1st cDNA 5 μl (500 ng), 10 pmol/ μl primer 각 1 μl , 2 $\times$ QuantiTect SYBR Green 10 μl 그리고 멸균 증류수로 전체 20 μl 로 맞추어 반응을 수행하였다. PCR은 94°C에서 15초, 중합반응은 58°C에서 25초 그리고 합성반응은 72°C에서 20초간 하였고, 전체 40 cycle을 수행하였다. Realtime PCR 종료 후 PCR 산물의 quality를 측정하기 위하여 95°C에서부터 50°C까지 melting temperature (TM) 값을 측정하였다. 유전자 발현의 상대적 정량은 ΔCt 값(ICER 유전자의 Ct - 18S rRNA의 Ct값)을 계산하여 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 값으로 치환하여 상대적 정량을 계산하였다. Ct 값은 threshold cycle로서 발현 peak가 형성되는 지점의 PCR cycle수로 나타낸다. 따라서 Ct 값이 클수록 발현량이 적음을 의미한다.

ICER 유전자 발현 분석을 위한 통계 분석

마블링 high- 및 low 그룹간 ICER유전자의 발현양상의 차이에 대해 ANOVA 모델을 이용하여 분석하였다. 근육내 조지방함량에 따라 선발된 7두의 한우 개체는 근육 내 조지방함량에 따른 마블링 high 그리고 low 그룹(FAT)_i 외에 total digestible nutrients (TDN) 수준에 따른 2개의 처리구(TR)_j 그리고, 도축 시 연령(D_{ijk})이 유전자발현에 영향하는 요인으

로 판단되어, 이들 효과를 고정 효과(fixed effect)로 포함시키고, 도축 시 연령은 공변이(covariate)효과로 처리하였다. 관측치로서 종속변수(y)에 해당하는 유전자발현량은 ICER 유전자의 Ct 값을 내부보정 18S rRNA 유전자의 Ct값으로 보정한 발현량(ΔCt 값)을 사용하였다. 따라서 분석에 적용된 일반선형모델(GLM)은 다음과 같다.

$$Y_{ijk} = \mu + TR_i + FAT_j + b \cdot D_{ijk} + e_{ijk}$$

마블링 high, low (FAT)_i에 따른 ICER 유전자의 발현차이를 검정하기 위하여 분석모형 내에 고정효과로 처리된 마블링 수준에 대한 최적선행불편추정치(BLUE)를 구한 후 두 그룹간 t-검정을 실시하였다. 최종 ICER 유전자의 발현량은 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 의 식에 의하여 계산하였으며, 통계분석은 R-statistical program을 이용하여 수행하였다(<http://www.R-project.org>).

결과 및 고찰

한우 ICER 유전자 서열 및 조직별 발현 양상 분석

한우에서 *inducible cAMP early repressor* (ICER) 유전자를 클로닝하기 위하여 비육 전·후기 한우 등심조직의 ddRT-PCR 산물 300 bp를 염기서열 결정하였다(Fig. 1). 이렇게 얻은 300 bp 염기서열을 한우 등심조직으로부터 도출된 한우 EST (expressed sequence tag)서열 분석 및 BLAST 검색을 통해 4개의 EST 서열의 cluster인 1.6 kb의 ICER 서열을 얻었다. 이 ICER 유전자 서열로부터 약 1.5 kb를 증폭할 수 있는 primer를 합성하여 ICER 유전자를 PCR-direct sequencing 하였다. ICER유전자의 단백질 코딩영역(coding region)은 NCBI의 ORF Finder 프로그램을 통하여 추정하였다. Fig. 2에서 보는바와 같이, ICER 유전자의 단백질 코딩영역은 약 800 bp로 추정되었으며, 255개의 아미노산을 코딩하고 있었다. 다른 유전자서열과는 달리, ICER 유전자서열에는 8개의

Fig. 1. (A) Differential display-reverse transcription (ddRT-PCR) of *longissimus dorsi* between 12 month and 27 month old of Hanwoo steers. The ddRT-PCR product was amplified by anchored primer and GP14 arbitrary primer. (B) The sequence indicates ICER gene sequence of 300 bp ddRT-PCR products.

Fig. 2. Schematic illustration of 1.5 kb bovine *inducible cAMP early repressor* cDNA. (A) The diagram of bovine ICER cDNA (B) The sequence analysis of cloned 1.5 kb Hanwoo ICER gene, the box indicate 300 bp ddRT-PCR product sequence (C) The predicted protein coding region of bovine ICER cDNA.

아미노산 개시코돈인 ATG 서열이 존재하였다.

한우 비육초기 및 후기 사이에서 차등유전자 발현패턴을 보인 ICER 유전자를 8개 조직에 대해서 유전자발현양상을 분석하였다(Fig. 3). ICER 유전자는 한우의 소장조직에서 가장 많이 발현하였고, 등심 및 폐 조직에서 역시 다른 조직보다 상대적으로 많은 유전자발현양상을 보였다. 소장조직은 음식물로부터 섭취된 유리 지방산들이 간이나 다른 조직으로 들어가는 통로로서 Zhou 등[18]이 보고한 대로, ICER 유전자가 유리지방산에 의해서 발현이 증가한다는 결과를 반영하는 결과로 사료된다. 특히, 같은 근육타입인 등심 및 우둔 조직을 비교하였을 때, ICER 유전자는 등심조직에서 1.5배

Fig. 3. Gene expression pattern of the ICER mRNA in various Hanwoo tissues in semi-quantitative RT-PCR (A) and real-time PCR (B) (①: liver, ②: longissimus dorsi, ③: rump, ④: back fat, ⑤: lung, ⑥: heart, ⑦: small intestine and ⑧: spleen).

이상 많은 유전자발현양상을 보인 반면, 등지방 조직에서 아주 낮은 발현양상을 보였다(Fig. 3). 이러한 결과는 Hocquette 등[3]이 보고한 결과와 같이, 포도당을 에너지원으로 빠르게 전환하는 해당과정(glycolytic pathway)이 상대적으로 낮은 등심(longissimus dorsi) 조직에서 해당과정(glycolytic pathway)이 빠른 우둔(*Semitendinosus*)에서 보다 높기 때문인 것으로 사료되며, ICER 유전자발현이 등지방에서 적은 이유는, *in vitro* lipogenesis에 있어서, 근내지방세포(intramuscular adipose tissue)는 50-75%의 포도당을 사용하는 반면, 등지방(subcutaneous adipose tissue)는 10% 내외의 포도당을 이용하기 때문인 것으로 사료된다[13]. 이러한 연구결과에 의해, ICER 유전자 발현은 근내지방이 상대적으로 많은 등심조직에서 높게 나타나는 것으로 판단된다.

아울러, Lee 등[8]의 결과에 따르면, ICER 유전자발현은 한우 12개월령의 등심조직에서보다 상대적으로 근내지방이 많이 축적된 27개월령의 등심조직에서 그 발현이 6배 이상 증가하는 양상을 보였으며, 아울러 한우 근내지방으로부터 분리한 지방전구세포의 분화가 진행됨에 따라서, ICER 유전자의 발현이 증가함을 확인하였다. 이러한 결과는 근내지방이 왕성하게 축적된 비육후기에서 ICER 유전자의 발현이 급격하게 증가한다는 것을 보여주는 결과이다.

Zhou 등[18]은 ICER 유전자는 고농도의 포도당 및 지방산에 의해서 그의 발현이 증가한다고 보고 하였고, Hussain 등[5]은 ICER 유전자의 발현은 *in vitro* 상태에서 인슐린 유전자의 발현을 억제한다고 보고하였다. 특히, 인슐린은 포도당의 지방세포의 유입을 촉진하여 지방생합성을 촉진하나, ICER 유전자에 의한 인슐린 유전자의 발현 억제는 지방세포 내의 지방합성유전자들의 발현을 억제하는 효과를 나타낸다. 따라서, ICER 유전자는 근육조직 내 지방이 충분히 축적되면 그 발현이 증가되어 인슐린 유전자 억제제료를 거쳐 지방생합성 유전자의 발현을 억제함으로 지방축적을 조절하는 것으로 사료된다. 아울러, 근육 내 지방축적과 인슐린 유전자 억제에 의한 지방합성유전자의 발현억제와 관련된 연구 및 해당(glycolytic) 및 산화적인산화(oxidative pathway)과정을 대표하는 근육조직에서 ICER 유전자의 단백질 발현 등의 연구가 추후 수행되어야 할 것으로 사료된다.

마블링 수준에 따른 ICER 유전자 발현 분석

마블링 수준에 따른 ICER 유전자의 발현양상을 분석하기 위하여, 근육내 조지방함량 및 근내지방도 육증가를 근거로 마블링 high 그룹 4두, 마블링 low 그룹 3두를 각각 선발하여 등심조직으로부터 RNA를 추출하여 각 개체별 3반복씩 유전자발현양상을 분석하였다. 선발된 7두의 한우개체는 마블링수준 외에, TDN 함량에 따른 처리효과 및 각기 다른 도축일령이 존재하였다. 따라서, 이들 처리효과를 일반전형모형의 고정효과로 그리고 도축일령을 공변인으로 설정하여, 분

산분석을 통해 ICER 유전자발현량에 대한 각 요인 효과의 유의성을 검정하였다. 그 결과, 마블링수준($P=0.010$) 및 도축일령($P=0.00005$)은 ICER 유전자 발현량에 큰 영향을 주는 요소를 확인하였다(Table 2). 따라서, ICER 유전자는 한우 마블링수준에 따라 그 발현에 영향을 받음을 알 수 있었고, 근육내 조지방함량 두 그룹(high 및 low) 간 유전자 발현량 차이의 유의성을 검정하기 위해 두 그룹의 최소제곱평균(least square mean)에 대해 t -검정을 실시하였다. Table 3에서 보는 바와 같이, high 그룹과 low 그룹의 ICER 유전자의 ΔCt 값은 각각 $1.03 \pm 0.27 (2^{-\Delta Ct}; 0.4897)$ 및 $3.12 \pm 0.32 (2^{-\Delta Ct}; 0.1150)$ 으로 두 그룹의 유전자발현량의 차이는 통계적 유의하였다($p < 0.05$, $t=5.35$). 결론적으로, ICER 유전자는 마블링수준에 따라 그 발현이 영향을 받으며, 특히 근육 내 조지방함량 high 그룹에서 약 4배 이상 발현됨을 알 수 있었다.

ICER 유전자 realtime PCR 데이터의 통계적 분석에 대한 고찰

최근 마이크로어레이 및 realtime PCR을 이용한 유전자 발현양상 분석이 대중화되어 많은 결과들이 발표되고 있으며, 특히 가축을 이용한 유전자 발현양상 분석에서 접하는 문제점은 동물 집단이 가지고 있는 변이요인(variation source)을 적절하게 고려하지 않아 개체별 유전자 발현양상이 매우 편의(biased)되어 나타나는 것을 보게 된다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여, 최근 편의(biased)된 결과를 ANOVA 및 혼합모형(mixed model)을 이용하여 고정효과(fixed effects) 및 임의효과(random effects)에 대한 최적선행

Table 2. ANOVA table of ICER gene expression analysis

Source	df	Sum of Sq	Mean of Sq	F-statistics	Pr(>F)
¹ TR	1	2.52	2.52	2.93	0.10600
² FAT	1	6.89	6.89	8.27	0.01000*
Age	1	23.44	23.44	28.14	0.00005***
Residuals	17	14.10	0.83		

¹TR (Treatment effect based on the TDN)

²FAT (Marbling high- and low based on muscle crude fat contents)

Table 3. Estimation of least square mean and t -statistics of ICER gene for the marbling high and low group

Gene	Estimation of least square mean		t -statistics*
	High (mean $\pm$ se)	Low (mean $\pm$ se)	
ICER Ct value	1.03 ± 0.27	3.12 ± 0.32	-5.35 ^{sig}
ICER $2^{-\Delta Ct}$	0.4897	0.1150	

* t -statistics: Mean difference/SE difference; Mean difference = Mean_{high} - Mean_{low};

$$SE \text{ diff} = \sqrt{\frac{V_{high}}{N_{high}} + \frac{V_{low}}{N_{low}}}$$

불편추정(best linear unbiased estimation, BLUE) 및 최적선행불편예측(best linear unbiased prediction, BLUP)을 통한 유전자 발현량 추정 결과들이 보고되고 있다[7,16]. 특히, Park 등[12]은 시계열(time-course) 마이크로어레이 데이터의 차등발현유전자를 탐색하기 위하여 분산분석(ANOVA) 모델을 이용하였고, Moser 등[10]은 *Actinobacillus pleuropneumoniae* 저항성 및 민감성 그룹 사이에 차등발현유전자 및 gene $\times$ immunological 상호작용을 임의효과로 BLUP 추정을 하였다. 최근에는 치료효과에 대한 realtime PCR 결과를 다중회귀모형(multiple regression model)에 적용하여 gene $\times$ treatment 효과에 대한 차등발현유전자를 탐색한 연구 논문이 보고 되었다[17]. 따라서, 본 연구에서 수행한 마블링 high 및 low 두 그룹 간 ICER 유전자에 대한 realtime PCR 결과의 일반선행모형 분석은 다양한 구조적 및 생물학적 변이요인(variation source)에 의해 영향을 받는 유전자발현 데이터에서 편의(bias)를 제거한 결과를 얻는데 유용한 통계적 기법인 것으로 사료된다.

결론적으로, inducible cAMP early repressor (ICER) 유전자는 근내지방이 왕성하게 축적되는 비육후기 및 high marbled 등심조직에서 그의 발현이 증가하였다. 따라서, ICER 유전자는 근내지방 관련 유용 후보유전자임이 판단된다.

요 약

근내지방 축적이 왕성하게 진행되는 12개월 및 27개월령 사이에 유전자발현이 증가하는 inducible cAMP early repressor (ICER) 유전자의 클로닝 및 유전자발현 특성을 규명하기 위하여 한우조직별, 근육 내 조지방 함량에 따라 마블링 high- 및 low 한우 각 4두와 3두씩을 공시하였다. ddRT-PCR 분석을 통하여 증폭된 300 bp PCR 산물 및 EST 서열을 중심으로 1.5 kb 한우 ICER cDNA를 염기서열 분석하였으며, 조직별 유전자발현분석결과, 식이지방이 흡수되는 소장 조직에서 ICER 유전자의 발현량이 가장 높았다. 아울러, 같은 근육타입인 등심 및 우둔조직 사이에서 ICER 유전자발현은 등심조직에서 2.5배 많이 발현하였다. 한우 마블링 high, low 두 그룹 간 유전자발현 분석 결과, high 그룹에서 ICER 유전자발현이 4배 이상 증가하는 것으로 분석되었다. 따라서, ICER 유전자는 가축의 마블링과 밀접한 관련이 있는 유전자임이 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 축산과학원과 호주 뉴잉글랜드대학(Beef CRC)간의 국제공동연구 프로그램(200712A01032083) 및 축산과학원 경상과제(20071390668000001)의 일환으로 수행되었다.

References

1. Casimir, D. A. and J. M. Ntambi. 1996. cAMP activates the expression of stearyl-CoA desaturase gene 1 during early preadipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* **270**, 29847-29853.
2. Childs, K. D., D. W. Goad, M. F. Allan, D. Pomp, C. Krehbiel, R. D. Geisert, J. B. Morgan and J. R. Malayer. 2002. Differential expression of NAT1 translational repressor during development of bovine intramuscular adipocytes. *Physiol Genomics* **10**, 49-56.
3. Hocquette, J. F., C. Jurie, Y. Ueda, P. Boulesteix, D. Bauchart and D. W. Pethick. 2003. The relationship between muscle metabolic pathways and marbling of beef. *Progress in Research on Energy and Protein Metabolism, Wageningen, The Netherlands* **1**, 513-516.
4. Hu, Z., E. R. Fritz and J. M. Reecy. 2007. AnimalQTLdb: a livestock QTL database tool set for positional QTL information mining and beyond. *Nucleic Acids Research* **35**, 604-609.
5. Hussain, M. A., P. B. Daniel and J. F. Habener. 2000. Glucagon stimulates expression of the inducible cAMP early repressor and suppresses insulin gene expression in pancreatic β -cells. *Diabetes* **49**, 1681-1690.
6. JMGA. 1988. New beef carcass grading standards. Japan Meat Grading Association, Tokyo, Japan.
7. Kerr, M. K and G. A. Churchill. 2001. Statistical design and the analysis of gene expression microarray data. *Genet. Res. Comb.* **77**, 123-128.
8. Lee, S. H., E. W. Park, Y. M. Cho, S. K. Kim, J. H. Lee, J. T. Jeon, C. S. Lee, S. K. Im, S. J. Oh, J. M. Thompson and D. Yoon. 2007. Identification of differentially expressed genes related to intramuscular fat development in the early and late fattening stages of Hanwoo steers. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **40**, 757-764.
9. Molina, C. A., N. S. Foulkes, E. Lalli and P. Sassone-Corsi. 1993. Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell* **75**, 875-886.
10. Moser, R. J., A. Reverter, C. A. Kerr, K. J. Beh and S. A. Lehnert. 2004. A mixed-model approach for the analysis of cDNA microarray gene expression data from extreme-performing pigs after infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Anim. Sci.* **82**, 1261-1271.
11. Nishimura, T., A. Hattori and K. Takahashi. 1999. Structural changes in intramuscular connective tissue during the fattening of Japanese black cattle: Effect of marbling on beef tenderization. *J. Anim. Sci.* **77**, 93-104.
12. Park, T. S., S. K. Yi, S. M. Lee, S. Y. Lee, D. H. Yoo, J. I. Ahn and Y. S. Lee. 2003. Statistical tests for identifying differentially expressed genes in time-course microarray experiments. *Bioinformatics* **19**, 694-703.
13. Smith, S. B. and J. D. Crouse. 1984. Relative contributions of acetate, lactate and glucose to lipogenesis in bovine intramuscular and subcutaneous adipose tissue. *J. Nutr.* **114**, 792-800.
14. USDA. 1989. Official united states standards for grades of beef carcasses. Agric. Marketing Serv. USDA, Washington, USA.
15. Wang, Y. H., K. A. Byrne, A. Reverter, G. S. Harper, M. Taniguchi, S. M. McWilliam, H. Mannen, K. Oyama and S. A. Lehnert. 2005. Transcriptional profiling of skeletal muscle tissue from two breeds of cattle. *Mamm Genome* **16**, 201-210.
16. Wolfinger, R. D., G. Gibson, E. D. Wolfinger, L. Bennett, H. Hamadeh, P. Bushel, C. Afshari and R. S. Paules. 2001. Assessing gene significance from cDNA microarray expression data via mixed models. *J. Comput. Biol.* **8**, 625-637.
17. Yuan, J. S., J. Burris, N. R. Stewart, A. Mentewab and C. N. Jr. Stewart. 2007. Statistical tools for transgene copy number estimation based on real-time PCR. *BMC Bioinformatics* **85**, 1-12.
18. Zhou, Y. P., K. Marlen, J. F. Palma, A. Schweitzer, L. Reilly, F. M. Gregoire, G. G. Xu, J. E. Blume and J. D. Johnson. 2003. Overexpression of repressive cAMP response element modulators in high glucose and fatty acid-treated rat islets. A common mechanism for glucose toxicity and lipotoxicity?. *J. Biol. Chem.* **278**, 51316-51323.