

제주마의 mitochondrial DNA 多型的 分析

韓邦根 · 張德支* · 土田修一** · 池本叩典**

全南大學校 獸醫科大學

濟州專門大學*

日本自治醫科大學**

(1994년 3월 23일 접수)

Mitochondrial DNA polymorphism in the Cheju horses

Bang-keun Han, Deuk-jee Chang*

Suichi Tsuchida**, Shigenori Ikemoto**

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University

Cheju Vocational Junior College*

Department of legal Medicine and Human Genetics, Jichi Medical School, Japan**

(Received March 23, 1994)

Abstract : As a result of the detection of mitochondrial DNA(mtDNA) polymorphism to Thoroughbred and Percheron using 14 restriction enzymes, mtDNA polymorphism of Cheju horse observed in the Bam HI and Sac I. Only in both restriction enzymes two types were classified as of A type, which is high expression frequency and B type, which is low expression frequency. In the other 12 restriction enzymes mtDNA polymorphism was not detected. On the basis of this information mtDNA polymorphism of Cheju horse was examined but was not observed the polymorphism and only A type was expressed both Bam HI and Sac I restriction enzymes. Through this study Cheju horse was demonstrated that lower genetic variation was expressed from the detection of mtDNA polymorphism.

Key words : mitochondrial DNA, polymorphism, restriction enzymes, genetic variation

緒 論

近來에 와서 사람을 비롯하여 各種動物에 있어서 종래의 적혈구형, 혈청단백질형, 적혈구효소형, 혈소판등에다 分子生物學의 技法을 이용하여 DNA 多型的의 개발이 급속히 이루어지고 있다. 특히 mitochondrial DNA (mtDNA)의 DNA 鹽基配列의 進化速度는 核DNA에 비교해서 약 10배 빠르고^{1,2} 遺傳標識으로서 유용성이 인정되어 있다. 또 mtDNA 多型은 雌性遺傳을 나타내

며 雌性과는 관계가 없다고 한다. 集團遺傳에 있어서는 雄性集團間의 이동을 雌性의 이동과 비교해서 遺傳子浮動에 대해서 강하게 영향을 주고 있다. 따라서 양친으로 부터 전해 받은 核 DNA 상의 遺傳標識은 遺傳子浮動에 강하게 영향을 받는다.^{3,7} 한편 mtDNA는 자성 유전을 하기 때문에 외부로부터의 遺傳子流入에 대해서 강하게 저항성을 나타내고 있기 때문에 집단 본래의 유전자의 분포를 강하게 보유하고 있다고 고려된다. 따라서 mtDNA 多型은 집단유전학상 유용한 유전표식이

*이 논문은 한국학술진흥재단의 1992년도 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

될 것으로 믿어진다.

哺乳動物의 mtDNA는 약 16 kilobase(Kb)의 環狀 DNA로서 母性遺傳을 나타낸다.^{8,9} mtDNA의 全 DNA鹽基配列은 이미 사람¹⁰, 소¹¹, 마우스¹², 랫트¹³에서 보고되고 있으며 2개의 rRNA, 22개의 tRNA, cytochrome C oxidase subunits I, II, III, ATPase subunit 6, cytochrome b 및 6개의 同定되어 있지 않은 蛋白을 code하고 있다.¹⁰⁻¹² mtDNA의 遺傳子構成은 동물종을 초월해서 잘 보존되어 있음에도 불구하고 염기 배열의 置換速度는 핵의 single copy 유전자의 약 5-10배로 생각되어지고 있다.¹² 또 이들의 빠른 진화속도나 비교적 적은 환상 DNA로서 취급하기 쉬운 것과 copy수가 많은 것 등에 의해 널리 연구가 진행되고 있어서 현재 遺傳進化學상 유용한 정보를 제공하고 있는 실정이다. 이와같이 mtDNA多型은 사람을 비롯하여 各種動物에서 보고되고 있다.^{1,14-26} 그러나 말에 대해서는 그의 報告가 적고 制限酵素 Bam HI에 의한 多型性 이 보고되어 있을뿐이다. 때문에 저자들은 Thoroughbred와 Percheron에 대해서 14種類의 制限酵素를 이용하여 mtDNA의 다형성을 검토하였으며 Bam HI과 Sac I로서 다형을 검출하였다. 그리고 다시 Thoroughbred와 Percheron에서 다형이 인정된 2개의 제한효소를 이용하여 濟州道馬의 mtDNA다형을 檢索 하였다.

材料 및 方法

Total DNA의 精製 : Total DNA는 末梢血液에서 抽出精製하였다. 血緣關係가 없는 Thoroughbred 6頭, Percheron 6頭 및 濟州道馬 23頭에서 혈액을 채취하였다. 혈액은 10배량의 lysis buffer(0.32M sucrose, 5mM MgCl₂, 10mM tris-HCl pH 7.5, 1% tritonX-100)에 溶解시킨후 1000xg 4℃로 10분간 遠心分離하여 白血球를 회수한 백혈구는 24mM EDTA, 75mM NaCl용액에 浮游시킨 후 SDS 및 proteinase K를 最終濃度 0.5% 및 5μg/ml되도록 添加하여 37℃로 하룻밤 반응시켰다. 반응후 phenol chloroform/isoamyl alcohol(25:24:1)를 同等量 첨가하여 충분히 攪拌한 후 8000rpm 20℃ 10분간 원심분리하여 上層의 水層을 회수하였다. 이같은 造作을 3回 施行한 후 chloroform/isoamyl alcohol(24:1)로 1回 抽出하여 ethanol沈澱으로 DNA를 회수하였다. 또 試料의 일부는 다시 CsCl密度 勾配 遠心法에 의해 精製를 행하였다. 精製 DNA는 TE buffer로 용해하여 OD260値를 측정한 다음 그 濃

도와 精度를 확인하였다.

制限酵素 切斷과 Southern transfer : 정제 total DNA 2μg을 制限酵素 Apa I, Bam HI, Bg I, Dra I, Eco RI, HindIII, Kpn I, Pst I, Pvu II, Sal I, Sac I, Sma I, Xba I 및 Xho I로 각각 절단하였다. 절단한 DNA는 0.8-1.2% agarose gel을 支持體로 하여 電氣泳動하였다. 분리된 DNA斷片은 0.4M NaOH를 이용하여 nylon membran(Hybond N⁺, Amersham com)에 Southern transfer로 소 轉寫하였다.

말 mtDNA 精製 : 말 腎臟에서 이전에 보고한 方法^{27,28}을 이용하여 말 mtDNA를 정제하였다.

말 mtDNA의 ³²P 標識 : 精製 말 mtDNA는 multi-prime labelling system(Amersham com)을 이용하여³²P dCTP로 표식하여 probe로 이용하였다.

Hybridization 및 autoradiography : Southern tranfer에 의해 DNA 斷片을 轉寫한 nylon membran은³²P標識 말 mtDNA와 hybridization을 행하였다. 즉 nylon membran을 prehybridization 溶液(5xSSPE, 5xDenhardt 용액, 0.5% SDS, 變性 herring sperm DNA 20μg/ml)중에 65℃ 1시간 이상 반응시켰다. Prehybridization후 prehybridization-용액에 ³²P 標識 probe를 가하여 65℃ 18시간 반응시켰다. 반응후 2xSSPE-0.1% SDS, 1xSSPE-0.1% SDS 다시 0.1xSSPE-0.1% SDS 溶液으로 洗淨하고 autoradiography를 -80℃에서 3-5일 실시하였다.

結 果

처음에 말 mtDNA의 多型性을 Thoroughbred 및 Percheron에 대해서 14種類의 制限酵素를 사용하여 檢定하였다. 그 結果는 Fig 1과 같이 Bam HI과 Sac I에서 多型이 檢出되었다. 즉 Bam HI에서는 2개의 형으로 분류되었으며, 出現頻도가 높은 것을 A형, 낮은 것을 B형으로 하여 A형에서는 4개의 band가 B형에서는 5개의 band가 인정되었다.

A형의 10.3Kb의 band중에 새로이 Bam HI site가 생기고 그 결과 8.2Kb와 2.1Kb의 2개 band가 검출되었다. Sac I에 의한 切斷에서는 2개의 형으로 분류되었고 出現頻도가 높은 것을 A형, 낮은 것을 B형으로 하였다. 기타 12種類의 制限酵素에서는 多型을 검출할 수 없었다.

이 情報를 根據로 Table 1과 같이 Bam HI 및 Sac I을 사용하여 濟州島馬의 mtDNA에 대해 다형성을 검토하였다. 그 결과 濟州道馬의 mtDNA는 다형성이 인정되지 않고 Bam HI 및 Sac I 모두가 全例에서 A형을

나타냈다. 때문에 제주말은 生育環境에 따라 유전적으로 현저히 균일성이 保有된 집단으로 추정되었다.

본 연구는 그것을 유전적인 다형성이 풍부하다고 생각되는 mtDNA 다형을 이용하여 입증했다고 생각하는 바이다.

考 察

哺乳動物의 mtDNA는 대략 16Kb로된 環型 DNA로서 母系에서 遺傳이 되는데 이것이 인간¹⁵과 다른 동물^{21,32}에서도 證明이 되었다. 그리고 Anderson et al¹⁰과 다른 학자 등¹¹⁻¹³에 의해 이 mitochondrial gene의 배열은 특히 哺乳動物間에 높이 保有되고 있는 것이 밝혀졌다. 그러나 이러한 保有特徵에도 불구하고 Brown et al¹²에 의하면 mtDNA의 nucleotide 配列이 빠르게 진화되는 것으로 나타났다.

이러한 進化性質, 그 크기의 縮小, 많은 複製數와 유

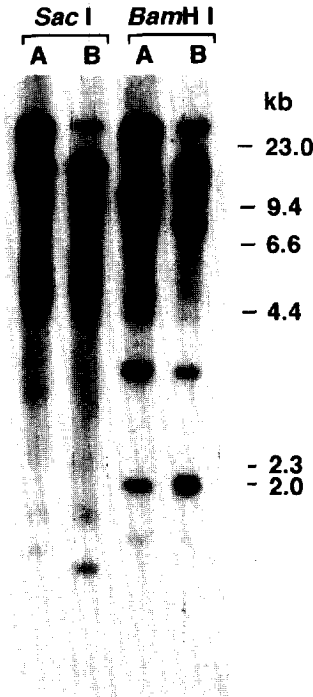


Fig 1. Detection of the polymorphism of mtDNA in both Bam HI and Sac I of endonuclease among 14 restriction enzymes. Classified A type, which is high expression frequency and B type, which is low expression frequency.

Table 1. Number and frequencies of mtDNA morphs in Cheju horses

Types	Restriction enzymes			
	Bam HI		Sac I	
A	23	(100%)	23	(100%)
B	0	(0%)	0	(0%)
Total	23	(100%)	23	(100%)

전의 非性的 樣式 때문에 mtDNA은 進化遺傳의 研究에 매우 有効한 수단이 되었다. 뿐 만 아니라 Potter et al¹⁴을 비롯하여 많은 학자 등¹⁵⁻²⁰에 의해 個體間의 組織配列의 다양성이 mtDNA에서 보고된 이래 mtDNA 다형은 제한 endonuclease를 사용해서뿐 만 아니라 nucleotide 配列을 결정함으로써 人間과 몇몇 동물에서 광범위하게 分析되었다.¹⁴⁻²⁶ Blanc et al³과 몇 학자 등⁴⁻⁶¹⁶에 의해서 몇가지의 제한 endonuclease를 사용한 분석으로부터 얻어진 결과는 mtDNA 型들과 인간의 起源 사이에 높은 聯關性을 보여주고 있다고 보고되었다.³ 또 Can et al²⁸과 Hertzberg et al²⁹은 mtDNA안의 制限된 部位의 변화를 가르키는 点部位와 더불어 깊이 변화가 또한 나타난다고 示唆하였다.

그 동안 Potter et al¹⁴과 몇 학자 등^{21,23,26,30-35}에 의해 몇가지 동물종에서 制限 endonuclease를 사용해서 mtDNA 型을 분석하였다. 그러나 특히 말에 대한 分析結果는 極小하여 著者들은 14종류의 制限酵素를 이용하여 檢定하였으나 濟州馬에 대한 mtDNA의 多型性은 검토되지 않았다.

結 論

濟州馬의 mtDNA의 多型性을 檢出하기 위하여 Thoroughbred와 Percheron에 대해서 14種類의 制限酵素를 이용하여 먼저 檢定을 한 結果 Bam HI과 Sac I에서 다형이 檢출되었다. 두 制限酵素에서만 A型和 B型 2個의 型으로 分類가 되었으며 出現頻도가 높은 것을 A型, 낮은 것을 B型으로 구별하였다. 기타 12種類의 制限酵素에서는 多型이 檢出되지 않았다. 이 情報를 根據로 Bam HI과 Sac I을 使用하여 濟州馬의 mtDNA에 대해 多型性을 檢討한 바 濟州馬의 mtDNA는 多型性이 認定되지 않고 Bam HI과 Sac I두 制限酵素에서 A型만을 나타냈다.

때문에 本 研究는 遺傳的 多型性이 풍부한 mtDNA 多型의 分析試驗을 통하여 濟州馬가 遺傳的으로 變異가 적어서 현저히 均一性을 保有한 集團이라는 것을 나타내준 結果라고 생각되었다.

參考文獻

1. Brown WM, George JM, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:1967.
2. Brown WM, Prager JM, Wilson AC. Mitochondrial DNA sequences of primates; Tempo and mode of evolution. *J Mol Evol* 1982; 18:225.
3. Blan CH, Chen KH, Diamore MA, et al. Amino acid change associated with the major polymorphic Hinc II site of oriental and caucasian mitochondrial DNAs. *Am J Hum Genet* 1983; 35:167.
4. Denaro M, Blanc H, Johnson MJ, et al. Ethnic variation in Hpa I endonucleases cleavage patterns of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:57-68.
5. Exoffier L, Langaney A. Origin and differentiation of human mitochondrial DNA. *Am J Hum Genet* 1989; 44:73.
6. Hanihara S, Saito N, Hirai M, et al. Mitochondrial DNA polymorphism among five asian population. *Am J Hum Genet* 1988; 43:134.
7. Johnson MJ, Wallace DC, Ferris SD, et al. Radiation of human mitochondrial DNA types analyzed by restriction endonuclease cleavage patterns. *J Mol Evol* 1983; 19:255.
8. Huchison III CA, Newbold JE, Potter SS, et al. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature* 1974; 251:536.
9. Watanabe T, Mizutani M, Wakana S, et al. Demonstration of maternal inheritance of avian mitochondrial DNA in chicken quail hybrids. *J Exp Zool* 1985; 236:245.
10. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 290:457.
11. Anderson S, De Bruijn MHC, Coulson AR, et al. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA conserved features mammalian mitochondrial genome. *J Mol Biol* 1982; 156:683.
12. Bibb MJ, Van Etten RA, Wright CT, et al. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell* 1981; 26:169.
13. Gadaleta G, Pepe G, De Candia G, et al. The complete nucleotide sequence of the rattus norvegicus mitochondrial genome; Cryptic signals revealed by comparative analysis between vertebrates. *J Mol Evol* 1989; 28:497.
14. Potter SS, Newbold JE, Hunchison III CA, et al. Specific cleavage analysis of mammalian mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72:44-96.
15. Brown WM. Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77:36-45.
16. Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 1987; 31:325.
17. Ferris SD, Brown WM, Davidson WS, et al. Extensive polymorphism in the mitochondrial DNA of apes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:63-79.
18. Horai S, Gojobori T, Matsunaga E. Mitochondrial DNA polymorphism in Japanese I. Analysis with restriction enzymes of six base pair recognition. *Hum Genet* 1984; 68:324.
19. Horai S, Matsunaga E. Mitochondrial DNA polymorphism in Japanese II. Analysis with restriction enzymes of four and five base pair recognition. *Hum Genet* 1986; 72:105.
20. Horai S, Hayasake K. Intraspecific nucleotide sequence differences in the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Am J Hum Genet* 1990; 46:828.
21. Tegelstrom H. Genetic variability in mitochondrial DNA in a regional population of the Great Tit (*Parus major*). *Biochem Genet* 1987; 25:95.
22. Vigilant L, Pennington R, Hapending H, et al. Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern african population. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:93.
23. Watanabe T, Hayashi Y, Ogasawara N, et al. Polymorphism mitochondrial DNA in pigs based on restriction endonuclease cleavage patterns. *Biochem Genet* 1985a; 23:947.
24. Watanabe T, Hayashi Y, Semba R, et al. Bovine mitochondrial DNA polymorphism in restriction endonuclease cleavage patterns and the location of the polymorphic site. *Biochem Genet* 1985b; 23:947.
25. Watanabe T, Hayashi Y, Kimura J, et al. Pig mitochondrial DNA : polymorphism in restriction map orientation and sequence data. *Biochem Genet* 1986; 24:385.

26. Yonekawa H, moriwaki K, Gotoh O et al.Origins of laboratory mice reduced from restriction patterns of mitochondrial DNA. *Differentiation* 1982; 22:222.
 27. Tsuchida S, Ikemoto S. Mitochondrial DNA polymorphism in dogs. *J Vet Med Sci* 1992 54; 3:417-424.
 28. Cann RL, Wilson AC. Length mutation in human mitochondrial DNA. *Genetics*. 1983; 104:699.
 29. Hertzberg M, Mickleson KNP, Sericantson SW, et al. An asianspecific 9-6p deletion of mitochondrial DNA is frequency found in polynesians. *Am J Hum Genet* 1989; 44:504.
 30. Bhat PP, Mishra BP, Bhat PN. Polymorphism of mitochondrial DNA(mt DNA) in cattle and buffaloes. *Biochem Genet* 1990; 28:311.
 31. Robert A, Lansman RA, Shade RO, et al. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural population III. Techniques and potential applications. *J Mol Evol* 1981; 17:214.
 32. Wesley M, Brown WM, George JM, et al. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:1967.
 33. Wesley M, Brown WM, Prager EM, et al. Mitochondrial DNA sequences of primates : Tempo and mode of evolution. *J Mol Evol* 1982; 18:225.
 34. Umenish F, Han BK, Ikemoto S. Mitochondrial DNA polymorphism in jindo dogs. *J Vet Med Sci* 1993 55; 2:313-317.
 35. Troyer D, Howard D, Leipold HW, et al. A human minisatellite sequence reveals DNA polymorphism in the equine species. *J Vet Med A* 1989 36:81-83.
-