

한우 경제형질에 미치는 Mitochondrial DNA D-loop 영역의 염기서열 변이효과

오재돈* · 윤두학** · 공홍식* · 임현진* · 이학교* · 조병욱*** · 홍기창**** · 전광주*
국립한경대학교 유전정보연구소*, 축산기술연구소**, 밀양대학교 동물자원학과***,
고려대학교 생명유전공학부****

Effect of Sequence Variation in Bovine Mitochondrial DNA D-loop Region on Economic Traits for Hanwoo.

J. D. Oh*, D. H. Yoon**, H. S. Kong*, H. J. Lim*, H. K. Lee*, B. W. Cho***,
K. C. Hong****, and G. J. Jeon*

Genomic Informatics Center, Hankyong National University*,
National Livestock research Institute**,
Department of Animal Science, Miryang National University***, and
College of Life & Environmental Science, Korea University****

ABSTRACT

This study was performed to analyse the sequences of variations of mtDNA D-loop and their effects on carcass traits in Hanwoo(Korean cattle). The resulting sequences were compared with previously published sequences for other cattle breeds(GenBank J01394). The PCR was used to amplify a total of 964 bp between nucleotide 15758 and 383 within D-loop region of mtDNA using specific primers. Twenty five polymorphic sites by nucleotide substitution were found in mtDNA of Hanwoo. The frequencies of positions at 169, 16042, 16093, 16119, 16255 and 16302 nt with high levels of sequence polymorphism were 0.891, 0.117, 0.109, 0.182, 0.197 and 0.117, respectively. The substitution effect at 169 and 16119 nt was found significant on marbling score. Also substitution effect at 169 and 16042 nt was highly significant($p < 0.01$) on backfat thickness. Polymorphism of mtDNA sequence in D-loop region could be useful for the analysis of cytoplasmic genetic variation and associations with the other economically important traits and maternal lineage analysis in Hanwoo.

(Key words : mtDNA, D-loop region, Sequence variation, Hanwoo)

I 서 론

Mitochondrial DNA(mtDNA)는 핵 DNA 보다 염기치환의 진화 속도가 빠르고(Brown 등, 1979), 핵 DNA의 유전방식과는 다른 모계 유전을 한다는 특성이 보고(Hutchison 등, 1974)되어 인류를 비롯한 많은 포유동물에서 종내 및

근연종 사이의 유전학적 관계를 연구하는데 매우 유용한 도구로 활용되고 있다.

포유동물의 미토콘드리아 DNA는 약 16.5 kb 크기를 가지는 이중 환상 구조의 분자로서 모계 유전되며, 핵 DNA와는 독립적으로 복제하는 genome이다(Anderson 등, 1981; Bibb 등, 1981).

Corresponding author : G. J. Jeon, Department of Genomic Engineering, Genomic Informatics Center, Hankyong National University, Ansong 456-749, Korea Tel:+82-31-670-5330, Fax:+82-31-675-5331 E-mail: gjjeon@hnu.hankyong.ac.kr

최근에 와서는 mtDNA D-loop 영역의 염기서열 차이를 분석하여 종 및 품종간 진화와 계통분류 연구(Bradley 등, 1996; Mannen 등, 1998b; Kim 등 1999), 그리고 산유량과 유 조성분 등 경제형질(Ron 등, 1993; Schutz 등, 1994; Boettcher 등, 1996)과 관련된 새로운 유전정보로서 활용이 시도되고 있다. 특히, 세포질 유전 효과는 재조합(recombination) 현상 없이 모성 유전하기 때문에 mtDNA D-loop 변이에 따라 모계를 분류하기 쉽고 핵과 세포질 효과에서 바람직한 유전적 잠재능력을 갖는 모계계통의 검색이 가능하다(Mannen 등, 1998a). 그동안 세포질 유전효과에 관한 연구결과에 의하면 젖소에서 우유와 유지방 생산변이의 2~10%가 모성 영향에 의해 결정되고(Ron 등, 1993) 육우의 경우 mtDNA D-loop 염기변이가 도체형질에 유의적인 영향을 미친다고 보고 되었다(Mannen 등, 1998a). 그러나 소의 경우 지금까지 D-loop 영역의 다형성 및 변이성 검출은 주로 PCR을 이용한 RFLP marker가 폭 넓게 이용되어 왔으나 RFLP marker는 각종 제한효소 인지부위에 따른 개체간의 변이성이 상대적으로 낮기 때문에 염기서열을 직접 분석하여 비교하는 것이 보다 상세하고 유용한 정보를 얻을 수 있다.

소의 mtDNA 염기서열 분석과 관련하여 Anderson 등(1982)이 최초로 소 mtDNA의 전체 염기서열을 규명하여 보고한 이후 Ron 등(1993)은 Holstein종의 유량에 따라 high와 low group으로 분류한 암소 모계 선발군 간에 D-loop 영역의 염기서열을 비교 분석하여 산유 능력에 차이를 발표하였고, Takeda 등(1997)은 mtDNA D-loop 영역내 고변이 부위를 대상으로 일본의 흑모화우종과 갈모화우종 및 Holstein 종에 대한 염기배열의 차이를 비교 검토하여 보고하였으며 또한, Mannen 등 (1998a, b)은 일본 흑모화우집단에서 mtDNA D-loop 염기서열 변이성 분석을 통하여 품종진화와 계통분류를 추정하였고 나아가 mtDNA 염기변이가 도체형질에 미치는 영향을 보고한 바 있다. 한편, 국내의 경우 도입우와 한우의 mtDNA D-loop 영역의 염기변이에 의한 유전적 다양성 연구가 보고(정 등, 1996, 2002; 이 등, 1998; Kim 등,

2003)된 바 있으나, 한우에서 mtDNA D-loop 영역의 염기변이와 경제형질과의 관련성 연구는 미진한 편이다(윤, 2002).

따라서 본 연구에서는 우리나라 고유의 유전자원인 한우를 대상으로 mtDNA의 D-loop 영역의 염기서열을 결정하고 경제형질과의 연관관계를 분석하여 한우집단의 유전적 변이성 및 구조를 파악하여 한우의 유전자원 보존 및 개량을 위한 기초 자료를 얻고자 수행하였다.

II 재료 및 방법

1. 공시축

본 연구에서 이용한 공시 재료는 도체성적을 보유하고 있는 제32차 한우 후대검정축 집단 137두를 선발하여 5~) ml의 혈액을 EDTA가 함유된 tube에 채혈하였다.

2. Genomic DNA의 분리 및 정제

채취한 혈액으로부터 Genomic DNA의 분리 및 정제는 Miller 등(1988)의 방법을 일부 변형하여 분리 정제하였고, 분리된 DNA는 TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4; 1 mM EDTA)에 용해하여 분석에 사용하였다.

3. mtDNA D-loop 영역의 primer 합성 및 PCR 증폭

소 mtDNA의 D-loop 영역을 증폭 및 염기서열 결정을 위한 primer들은 Anderson 등(1982)의 보고를 토대로 하여 15758번과 383번 사이를 지정하는 염기서열 부위에서 Table 1과 같이 제작하였다.

PCR 증폭은 template DNA 약 200 ng, 10 pmol primer 각 0.5 μ l, dNTP 5 μ l, 10X PCR Buffer 2.5 μ l, Taq DNA polymerase(IBM) 1 unit의 조성에 D.W.를 첨가하여 총 부피를 25 μ l로 하였으며, GeneAmp PCR System 2700(Applied biosystems)을 이용하였다. PCR 조건은 최초 94 $^{\circ}$ C 서 5분간 denaturation을 실시하고, 94 $^{\circ}$ C

Table 1. Primer sequences and positions used for mtDNA D-loop analysis

Primer	Sequences	position*	Usage
mtU3	5'-CCCAAAGCTGAAGTTCTATT-3'	15758 ~ 15777	PCR
mtL1	5'-TTGGGTTAAGCTACATCAAC-3'	364 ~ 383	"
bDL1	5'-TCAACACAGAATTTGCACCC-3'	15863 ~ 15882	Sequencing
bDL2	5'-TAAATTATATGCCCCATGC-3'	16012 ~ 16030	"

* The nucleotide in positions based on Anderson et al. (1982).

서 1분, 56℃ 서 1분, 그리고 72℃ 서 2분간 총 30회 반복한 후 최종적으로 72℃ 서 10분간 반응시킨 후 종료하였다. PCR 증폭산물은 1% TBE agarose gel을 이용하여 전기영동한 결과 964 bp크기의 mtDNA D-loop 지역의 증폭산물을 확인하였다.

4. mt DNA D-loop 영역의 염기서열 분석

PCR product 5μl에 ExoSAP-IT(Amersham Biosciences, USA) 2μl을 첨가하여 총 부피를 7μl로 하여 37℃ 서 20분간 반응시켜 증폭된 산물 이외의 것들을 제거하여준 다음 E.T terminator dye(Amersham Biosciences, USA)을 제작사의 지침서에 따라 Table 1의 primer와 함께 GeneAmp PCR System 2700(Applied Biosystems)을 이용하여 재증폭 과정을 수행하였다.

전 처리 되어진 PCR product를 다시 한번 AutoSap(Amersham Biosciences, USA)을 이용하여 purification한 후 염기서열 결정은 MegaBACE DNA Analysis systems(Amersham Biosciences, USA)를 이용하여 수행하였으며, SeqMan™ II (DNASTAR Inc)을 이용하여 개체간의 DNA 염기서열 변이 여부를 분석하였다.

5. 통계 분석

검출된 mtDNA의 D-loop영역내 염기변이와 한우 경제형질과의 관련성을 검증하기 위하여 SAS(1999-2001)를 이용하여 아래의 다중 회귀식을 이용하여 분석하였다. 회귀식에서 mtDNA D-loop영역내 polymorphism site는 dummy 변수 (1=original, 2=mutation)로 이용하였다.

$$Y_{ijkl} = \mu + b_1LW_i + b_2CW_j + b_3SA_k + b_4G_1 + b_5G_2 + \dots + b_{16}G_{13} + e_{ijkl}$$

위 식에서,

- Y_{ijkl} = 경제형질;
- μ = 전체평균;
- LW_i = 생체중;
- CW_j = 도체중;
- SA_k = 도축일령;
- b's = 회귀계수;
- G_s = mtDNA의 D-loop 영역내 polymorphism site(dummy 변수; 1=original, 2=mutation); 그리고,
- e_{ijkl} = 임의 오차.

III 결과 및 고찰

소 mt DNA의 D-loop 영역을 포함하고 있는 15758번과 383번 사이를 지정하는 염기서열 부위의 964 bp 단편을 특정 염기서열을 갖고 있는 primer를 이용하여 PCR 증폭하여 PCR 산물을 1.5% agarose gel 전기영동법으로 확인한 결과 Fig. 1의 결과를 얻었다. 이는 예상했던 결과인

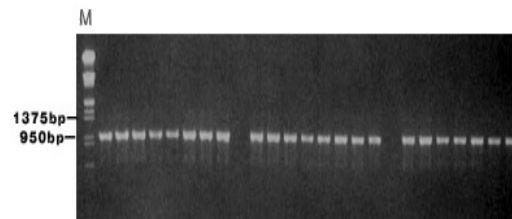


Fig. 1. Electrophoresis of PCR products of Bovine mtDNA D-loop region for Hanwoo. M : λDNA/EcoR I+Hind III size standard marker(Promega).

964 bp 크기의 band만이 Fig. 1에서와 같이 검출되었고 그 밖의 다른 band는 검출되지 않아 PCR 증폭이 성공적으로 수행되었음을 알 수 있었다.

mtDNA D-loop 영역내 염기서열 변이를 조사하고 관련성 분석을 실시하고자 32차 한우 후대검정축집단 137두의 정제된 PCR 증폭산물을 직접 염기서열 결정법을 이용하여 염기서열 변이를 조사하였다.

Table 2은 32차 한우 후대검정축 집단에 대한 개체별 mtDNA D-loop 영역의 염기서열을 분석하여 각 변이지역별 변이빈도를 산출하여 제시하였다. mtDNA D-loop 영역내 염기서열 분석

Table 2. Type and frequency of sequence polymorphic site of mt DNA D-loop region in herd of Hanwoo

Location in D-loop*	Polymorphic event	Frequency
8	G → A	0.058
106	T → C	0.058
169	A → G	0.891
15910	T → C	0.015
16042	T → C	0.117
16049	C → T	0.022
16050	C → T	0.051
16051	T → C	0.036
16055	T → C	0.043
16057	G → C	0.088
16074	T → C	0.007
16085	T → C	0.007
16086	G → A	0.015
16093	G → A	0.109
16119	T → C	0.182
16122	T → C	0.051
16141	T → C	0.007
16143	A → T	0.007
16185	G → A	0.036
16209	C → T	0.051
16231	C → T	0.044
16242	T → C	0.029
16247	C → T	0.051
16255	T → C	0.197
16302	G → A	0.117

* The nucleotide in position based on Anderson et al(1982).

결과 총 25개의 site에서 변이가 검출되었다. 젖소의 mtDNA D-loop 지역내의 염기치환 빈도 (Anderson 등, 1981)와 비교할 때 본 연구에서는 169, 16042, 16093, 16255 및 16302번째 위치에서 높은 빈도의 염기치환이 검출되었으며 그 빈도는 0.891, 0.117, 0.109, 0.182, 0.197 및 0.117로 나타났다. 또한 8, 106, 16050, 16057, 16122, 16209 및 16247번째 위치에서도 비교적 높은 빈도의 염기치환이 일어났으며 그 빈도는 0.058, 0.058, 0.051, 0.088, 0.051, 0.051 및 0.051로 나타났다.

Table 3에서는 실험대상 축군의 경제형질들의 평균과 표준편차를 제시 하였으며 이 각각의 성적들을 이용하여 mtDNA D-loop 영역내 염기변이와 경제형질간의 연관성을 분석하였다.

Table 4에서는 mtDNA D-loop 영역내 염기변이를 조사한 결과를 토대로 하여 32차 후대검정축 집단의 표현형과 주요 변이부위들과의 관계를 통계 분석을 통하여 관련성을 분석하여 제시하였다. 도체 형질에 대한 염기치환 효과 중 169, 16042, 16119번째 위치에서 고도의 유의성을 나타내었다.

169번째 위치에서 A가 G로 치환된 빈도는 0.891로 나타났고 이 위치에서의 염기치환에 의한 MS의 효과는 $-1.08(t < 0.05)$ 로 나타났다. 16119번째 위치에서는 T가 C로 치환된 빈도가 0.182로 검출되었으며, 이 위치에서의 염기치환에 의한 MS에 대한 효과는 $1.29(t < 0.01)$ 로 나타났다. 169번째 위치와 16042번째 위치에서의 염기치환에 의한 BF의 효과는 각각 $-0.31(t < 0.01)$ 과 $0.34(t < 0.01)$ 로 나타났으며 16042번째 위치에서는 T가 C로 치환된 빈도가 0.117로 나타났다.

Schutz 등(1993)은 젖소의 169번째 위치에서의 염기치환 효과가 유량과 유지율에서 유의한 결과가 나타난다고 보고하였다. 본 연구에서도 169번째 위치에서의 염기치환 효과가 상강도 ($t < 0.05$)와 등지방두께($t < 0.01$)에서 유의한 결과가 도출되었다. 젖소에서는 169번째 위치의 염기치환 빈도가 0.8로 높게 검출되었으며, 한우에서도 역시 0.891의 비교적 높은 염기치환 빈도가 검출되었다. 또한 한우의 도체형질에

Table 3. Simple statistics for economic traits of Hanwoo

	Body weight	Carcass weight	Longissimus muscle area	Backfat thickness	Marbling score
Mean	528.4	301.3	75.9	0.72	2.45
Standard deviation	± 48.94	± 30.44	± 8.07	± 0.29	± 1.48

Table 4. The effect of mtDNA D-loop region variation on carcass traits of Hanwoo

Site	Polymorphic event	CW ¹	MS ²	LMA ³	BF ⁴
8	G → A	3.24	-0.54	-3.40	0.12
106	T → C	-3.46	0.01	6.27	-0.04
169	A → G	-3.34	-1.08*	3.37	-0.31**
16042	T → C	3.56	1.07	0.18	0.34**
16050	C → T	1.69	0.39	-5.20	-0.04
16057	G → C	-2.74	-0.68	3.20	0.13
16093	G → A	-1.30	-0.71	-5.92	0.04
16119	T → C	-1.35	1.29**	-0.88	0.10
16122	T → C	6.84	0.46	2.35	0.10
16209	C → T	-6.89	-0.08	1.11	-0.16
16247	C → T	-10.05	-0.88	1.74	-0.64
16255	T → C	1.98	0.78	-0.86	0.04
16302	G → A	-0.01	0.00	0.00	0.01

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

CW¹: Carcass Weight, MS²: Marbling Score, LMA³: Longissimus Muscle Area, BF⁴: Backfat Thickness

유의한 변이효과가 나타난 169, 16042 및 16119 bp지역에서의 압소 한우 축군의 변이 검출빈도는 정 등(2002)의 보고에 169 bp는 0.813, 16042 bp는 0.500, 16119 bp는 0.438로 높게 나타나고 있어 본 실험과 유사한 결과가 도출되었음을 알 수 있다. 그리고 106, 16050, 16057, 16093, 16122, 16209, 16255 및 16302 bp 지역에서 정 등(2002)의 보고와 본 실험 모두에서 높은 빈도의 변이가 검출된 것을 확인하였다.

본 연구에서 검출한 한우 mtDNA내 D-loop 영역의 염기서열 변이는 한우 품종집단의 유전적 변이성과 경제형질간의 연관성 분석에 있어 보다 더 정확히 밝히고 이해하는데 유용한 정보를 제공해 주고 한우의 기원 및 품종형성과 계통진화과정과 타 품종과의 계통분류적 상호관계 분석은 물론 나아가 모계유전 분석을 통한 경제적으로 중요한 보다 다양한 양적형질

또는 경제형질과의 연관성 분석에 기초 자료를 제공해 줄 수 있을 것으로 사료된다.

IV 요 약

본 연구는 한우 mt DNA D-loop 영역의 염기 변이 다형성과 경제형질간의 관련성을 분석하기 위하여 수행하였다. 한우의 mtDNA D-loop 영역에서 단일염기의 치환 의해 총 25개의 polymorphic site가 확인되었다. 그중 주요 Polymorphic site의 염기변이 빈도는 169, 16042, 16093, 16119, 16255 및 16302번째 위치에서 0.891, 0.117, 0.109, 0.182, 0.197 및 0.117로 검출되었다. 169 및 16119번째 위치에서의 염기치환에 의한 MS의 효과는 -1.08($P < 0.05$), 1.29($P < 0.01$)로 나타났으며, 169 및 16042번째 위치에서의 염기치환에 의한 BF의 효과는 -0.31($P <$

0.01)과 0.34($t < 0.01$)로 나타났다. 본 연구에서 검출한 한우 mtDNA내 D-loop 영역의 염기서열 변이 빈도 등은 한우집단의 유전적 변이성 추정과 좀 더 다양한 경제형질과의 관련성 분석은 물론 모계유전 양상 분석을 통한 한우의 형성과정과 타 품종과의 계통분류적 상호 관계 등의 분석에 유용하게 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

V 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 2003년도 과제인 “한우 경제형질 QTL 탐색 및 응용기술개발”의 일환으로 수행되었다. 농촌진흥청 바이오그린21사업단 관계자들과 시료를 제공한 한우개량사업부 관계자들에게 깊은 감사사를 드리는 바입니다.

VI 인용 문헌

- Anderson, S. Bamkier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijin, M. H., L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R. and Young, I. G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457-465.
- Anderson, S., De Bruijin, M. H. L. and Coulson, A. R. 1982. Complete sequence of Bovine Mitochondrial DNA. Conserved Features of the Mammalian Mitochondrial Genome. *J. Mol. Biol.* 156:683-717.
- Amano, T., Miyakoshi, Y., Tokada, T., Kikkawa, T. and Suzuki, M. 1994. Genetic variats of ribosomal DNA and mitochondrial DNA between swamp and river buffaloes. *Anim. Genet.* 25:29.
- Attardy, G. 1985. Animal mitochondrial DNA: An extreme example of genetic economy. *Int. Rev. Cytol.* 93:93-145.
- Boettcher, P. J., Freeman, A. E., Johnston, S. D., Smith, R. K., Beitz, D. C. and McDaniel, B. T. 1996. Relationships between polymorphism for mitochondrial deoxyribonucleic acid and yield traits of holstein cows. *J. Dairy Sci.* 79:647.
- Brown, W. M., Prager, E. M., Wang, A. and Wilson, A. C. 1982. Mitochondrial DNA sequeces of primates: tempo and mode of evolution. *J. Mol. Biol.* 18:225.
- Bradly, D. G., Machugh, D. E., Cunningham, P. and Loftus, R. T. 1996. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proe Natl Acad Sci USA.* 93:5131.
- Hutchison III C. A., Newbold, J. E., Potter, S. S. and Edgell, M. H. 1974. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature* 251:536-538.
- Kim, K. I., Yang, Y. H., Lee, S. S., Park, C., Ma, R., Bouzat, J. L. and Lewin, H. A. 1999. phylogenetic relationships of Cheju horses to other horse breeds as determined by mtDNA D-loop sequence polymorphism. *Anim Genet.* 30:102.
- Kim, K. I., Lee, J. H., Lee, S. S. and Yang, Y. H. 2003. Phylogenetic Relationships of Northeast Asian Cattle to Other Cattle Populations Determined Using Mitochondrial DNA D-Loop Sequence Polymorphism. *Biochemical Genetics,* 41(3/4):91.
- Mannen, H., Kojima, T., Oyama, K., Mukai, F., Ishida, T. and Tsuji, S. 1998a. Effect of mitochondrial DNA variation on carcass traits of Japanese black cattle. *J. Anim. Sci.* 76:36.
- Mannen, H., Tsuji, S., Loftus, R. T. and Bradley, D. G. 1998b. Mitochondrial DNA variation and evolution of Japanese black cattle(*Bos taurus*). *Genetics.* 150:1169.
- Mannen, H., Kawasaki, J., Ishidal, T., Mukai, F. and Tsuji, S. 2000. Mitochondrial DNA Diversity of Japanese Black Cattle. *Anim. Sci.* 71:1470.
- Ron, M., Yoffe, O. and Wellet, J. L. 1993. Sequece variation in D-loop DNA of cow lineages selected for high and low maternal effects on milk production. *Anim. Genet.* 24:186.
- Schutz, A. E. Freeman, G. L. and Lindberg, 1993. The effect of mitochondrial DNA on milk production and health Oh dairy cattle. *Livestock Production Science.* 37:283-295.
- Takeda, K. and Onishi, A. 1995. SSCP analysis of pig mitochondrial DNA D-loop region polymorphism. *Anim. Genet.* 26:321-326.
- Takada, K., Onishi, A. and Takahashi, S. 1997. Genetic variants of bovine mitochondrial DNA D-loop region in Japanese Black, Japanese brown and Holstein breeds. *Anim. Sci. Technol(Jpn).* 68:1161.
- Wilkinson, G. S. and Chapman, A. M. 1991. Length and sequence variation in evening bat D-loop mtDNA. *Genetics* 128:607-617.
- 윤두학. 2002. 한우의 분자유전학적 특성 구명을 위한 유전적 다양성 분석과 육질관련 표지유전자 개발. 고려대학교 박사학위 논문.
- 이성수, 고서봉, 오운용, 양영훈, 김규일, 조병욱. 1998. 미토콘드리아 DNA D-loop Region의 PCR-RFLP를 이용한 한우, 제주 재래한우와 타 품종과의 유전적 관계 분석. *한국축산학회지* 40:335.
- 정의룡, 박정준, 한상기, 1996. PCR 기법을 이용한 소 mtDNA의 RFLP 분석에 관한 연구. *한축지.* 38:307.
- 정의룡, 김우태, 김연수, 이정구, 한상기. 2002. 한우 Mitochondrial DNA D-loop 영역의 염기서열 및 유전변이. *한국동물자원과학지* 44:181.

(접수일자 : 2003. 9. 29. / 채택일자 : 2003. 12. 3.)