

아시아와 유럽의 여우 미토콘드리아 DNA 염기서열 변이

Mitochondrial DNA differentiation of the Red Fox (*Vulpes vulpes*) in Asia and Europe

유정남¹ · 한상훈² · 김방환³ · 김순옥¹ · 이병윤¹ · 곽명해¹

¹국립생물자원관 야생생물유전자원센터, ²국립생물자원관 척추동물연구과, ³남북환경교류협회

서론

여우는 분류학상 포유동물강 개과 여우속에 속하며, 우리나라를 포함해 유럽, 아시아, 북아프리카, 중앙아메리카 등 호주대륙을 제외한 거의 전 세계에 걸쳐 넓게 분포하고 있고 서식 현황도 매우 안정적인 것으로 알려져 있다 (IUCN/SSC Canid Specialist Group 2004). 그러나 한국에서는 1960년대부터 가축 피해를 방지하기 위한 포획과 살서제에 의한 2차 독극물 피해 및 농산촌지역의 서식환경 변화에 의해 그 수가 감소하기 시작하여, 1990년대 들어서는 야생 여우의 생존에 관한 서식 정보가 겨우 수 건에 불과하였다. 2004년 강원도 양구지역에서 여우의 사체가 발견되어 자연개체군의 생존이 재확인되면서 여우 증식·복원에 대한 정부(환경부)의 계획이 수립되고, 증식사업을 추진하는 지자체도 나타나기 시작했다.

최근 한국에서는 반달가슴곰 같이 멸종위기동물 복원사업이 활발히 진행 중이며, 여우 역시 복원사업 대상종으로 증식·복원을 위한 초기단계의 연구사업이 진행 중이다 (환경부 차세대과제 : 여우 증식·복원 기법 개발 연구 2006 - 2009). 그러나 멸종위기에 있는 한국산 야생 여우개체군의 원종확보가 사실상 불가능하여 자체 증식이 어렵기 때문에 우리나라 개체군과 유전 및 계통학적으로 가장 가까운 개체군을 확립하여 해당 개체군을 도입하여 복원하는 방법이 가장 현실적 방안이다. 그러기 위해서는 한국산 여우 원종의 유전적 특성에 대한 현황 파악이 시급하다.

최근 미토콘드리아 DNA 염기 서열 영역 가운데 Cytochrome b 와 Control region의 분자계통학적 연구를 통해 일본, 유럽, 아메리카, 캐나다 등에 분포 하고 있는

여우의 유전적 특징이 연구된 바 있다 (Inoue *et al.*, 2007; Aubry *et al.*, 2009). 그러나 한국에서는 자생 여우개체군의 생태 연구 및 유전적 연구 역시 미비한 실정이다. 그렇기 때문에 한국산 여우의 복원을 위해서는 우선 원종으로 확실한 개체에 대한 유전적 연구가 필수적이다.

미토콘드리아 유전체는 크기가 작고, 추출이 쉽고, 자체의 유전자 서열을 갖고 있기 때문에 분석이 용이하며, 핵 유전자에 비해 환경변화에 따라 빠른 속도로 진화하기 때문에 염기서열에 있어서 차이가 다양하게 나타난다. 또 모계 유전을 하므로 유전자 재조합 (gene recombination)이 일어나지 않아 종내, 종간의 일련의 점진적인 변화를 관찰할 수 있고, 미토콘드리아 DNA 변이양상은 genome 크기에 크게 영향을 미치지 않는 점돌연변이로 나타나기 때문에 분류군의 계통유전학적 연구자료로 널리 이용되고 있다 (Lansman *et al.*, 1983; Clayton 1982 ; Hayashi *et al.*, 1985; Brown *et al.*, 1979). 특히, 전자전달계에 관여하는 cytochrome b 유전자는 (Avice,1994; Hillis *et al.*, 1994), 어류 (Rocha-Olivares *et al.*,1999; Park *et al.*, 2000; Apostolidis *et al.*, 2001; Moller and Gravlund, 2003), 조류(Edwards and Wilson, 1990; Randi *et al.*, 2001), 포유류(Ma *et al.*, 1993)의 여러 분류군에서 계통간 유연관계 정립에 이용되었다.(Kondo *et al.*,1990; Zouros *et al.*, 1992).

본 연구에서는 과거 야생에서 포획되어 대학 자연사박물관에서 소장보관중인 한국산 여우 3개체 (박제)를 포함하여 중국, 러시아, 북한, 그리고 Genbank에 등록된 일본과 유럽 개체군의 mtDNA Cytochrome b 염기서열을 비교분석하여 한국산여우의 유전적 위치를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 개체채집 및 Gnomonic DNA 추출

본 실험에 사용된 여우(*Vulpes vulpes*) 개체들은 한국산으로 추정되는 3개체, 북한산 2개체, 러시아 프리모스키지역 3개체, 중국동북부(중국여우농장) 6개체, 한국서울대공원 5개체의 총 19개체를 수집하였다. 각 개체의 혈액, 간조직, 모근으로부터 Genomic DNA를 추출하기 위해 DNeasy Blood & Tissue kit (QUIAGEN Co., USA)를 이용하였으며 공급자의 매뉴얼을 따라 수행하였다. 유럽 및 일본 개체의 염기서열 정보는 Genbank에 등록된 것을 발췌하여 이용하였다.

2. 미토콘드리아 DNA 분석

1) Polymerase chain reaction (PCR)

2007년 Inoue 등이 개발한 Cytochrome b 프라이머 세트를 이용하여 19개체를 증폭하였다. PCR 반응 조성액은 100ng의 genomic DNA, 10XPCR buffer 2ul, 25mM dNTP 0.5ul, 각각 20pmol primer, 적정 Tag polymerase를 혼합하여 총 20ul로 반응시켰다. PCR 조건은 먼저 95℃에서 5분간 가열하여 변성을 유도하고, 94℃에서 30초간 denaturation, 56℃에서 30초간 annealing 그리고 72℃에서 1분간 extension의 3단계로 35회 반복 하였으며 72℃에서 10분간 final extension 후 4℃에 보관하였다. PCR 후 DNA는 1.2% agarose gel에 전기영동한 후 ultraviolet transilluminator에 올려놓고 PCR 반응산물의 band를 확인하였다.

2) 염기서열결정 (Sequencing)

전기영동을 통하여 PCR 반응산물을 확인한 개체들은, PCR purification kit를 이용하여 정제하였다(QUIAGEN Co., USA). 염기서열 결정은 ABI3700 모델을 이용하여 big-dye termination method로 (주)바이오메딕에 의뢰하여 수행하였다.

3. 데이터 분석

sequencing을 통하여 연구대상종의 DNA 염기서열이 완전하게 확인 된 후 alignment 프로그램인 MEGA4.0을

사용하여 alignment 분석을 수행하였다. TCS프로그램을 이용하여 유전자형(Haplotype)간의 유연관계를 판독하기 위해 유전자형네트워크 (Haplotype net-work)를 작성하였다. 또한 개체들간의 유연관계를 파악하기 위해 MEGA4.0 프로그램을 이용하여 Neighbo-Joining Phylogram을 작성하였다.

결과 및 고찰

미토콘드리아 DNA Cytochrome b 338bp를 분석한 결과 총 19개체에서 8개의 유전자형(haplotype)이 관찰되었다. 9개의 변이사이트가 발견되었고, 7개는 전이(transition), 2개는 전환(transversion)에 의한 변이였다. NJ 계통수에 의한 개체들의 유연관계를 보면 한국산으로 추정되는 3개체, 북한산 2개체, 러시아 연해주지역 3개체, 중국동북부(중국여우농장) 6개체, 한국서울대공원 5개체는 각각의 지역이나 국가에 의한 Cluster는 보이지 않았고, 대부분의 개체들이 혼잡 되어 있는 형태를 나타내었다.

Genbank에서 유럽 및 일본 여우의 미토콘드리아 DNA Cytochrome b 338bp의 염기서열을 발췌해 본 연구의 19개체의 염기서열과 함께 분석하였다. 총 66개의 변이 사이트에서 50개의 유전자형(haplotype)이 관찰되었다. 유전자형(haplotype)간의 유연관계를 알아보기 위해 작성한 유전자형네트워크(haplotype net-work)에서 Aubry 등이 2009년에 발표한 논문의 결과와 비교해 크게 두 개의 Clade를 형성하였다. 그중 한국개체를 포함한 19개체에서 관찰된 8개의 유전자형(haplotype)과 2007년에 Inoue등에 의해 보고된 일본개체의 Hokkaido I a- I b, Honshyu/Russia의

유전자형(haplotype)들은 Eurasian/

Alaska Clade에 포함되었다. 그러나 일본개체의 Hokkaido II의 유전자형(haplotype)은 Canada/로키산맥 Clade에 포함되었다. NJ계통수 또한 유전자형네트워크(haplotype net-work)와 일치하는 결과를 나타내었다. 이상의 결과에서 한국산 여우는 북한, 중국 동북지역, 러시아 연해주지역 및 일본(Hokkaido II의 유전자형 제외)등의 동아시아 개체들을 포함하는 Eurasian 개체들과 유전적으로 구별되지 않으며, 이러한 유전적 결과는 향후 한국의 여우 복원사업을 위한 도입개체 결정에 중요하게 사용될 것이라고 사료된다.

인용문헌

- 신남식, 윤희정, 유병호, 양병국, 권수완, 주승진, 용환율, 어경연 (2009) 환경부 차세대 핵심환경기술개발사업 보고서 (토종여우의 인공증식 및 자연생태계 복원기술 개발에 관한 연구)
- Aubry K.B., M.J. Statham, B.N. Sacks, J.D. Perrine, and S.M. Wisely (2009) Phylogeography of the North American red fox: vicariance in Pleistocene forest refugia. *Mole. Ecol.* 18 : 2668-2686
- Avise, J.C. (1994) Molecular markers, natural history and evolution. Chapman and Hall, New York, pp. 1-511. Hillis, D.M., J.P. Huelsenbeck and C.W. Cunningham. 1994. Application and accuracy of molecular phylogenies. *Science* 264: 671-677
- Apostolidis, A.P., Z. Mamuris and C. Triantaphyllidis. (2001) Phylogenetic relationships among four species of Mullidae (Perciformes) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome b and 16S rRNA genes. *Biochem. Syst. Ecol.* 29: 901-909.
- Boore J.L.(1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* Vol. 27 : 1767-1780
- Brown W.M., M.J. George, and A.C. Wilson (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 : 1967-1971
- Clayton. D.A. (1982) Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell.* 28:693-705
- Edwards, S.V. and A.C. Wilson. (1990) Phylogenetically informative length polymorphism and sequence variability in mitochondrial DNA of Australian songbirds (Pomatostomus). *Genetics* 126: 695-711.
- Ferguson-Lees J. and D.A. Christie (2001) Raptors of the world. Houghton niffin company, Boston, New York.
- Hayashi J-I, Y. Tagashira, and M.C. Yoshida (1985) Absence of extensive recombination between inter- and intraspecies mitochondrial DNA in mammalian cells. *Exp. Cell Res.*, 160:387-396
- IUCN (2004) Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs (Edited by Claudio Sillero-Zubiri, Michael Hoffmann and David W. Macdonald). 430pp.
- Inoue T., Nonak N, Mizuno A, Morishima Y., Sato H., Katakura K., and Oku Y. (2007) Mitochondrial DNA phylogeography of the Red Fox (*Vulpes vulpes*) in Northern Japan. *Zoological Science* 24 : 1178-1186
- Kondo, R., Y. Satta, E.T. Matsuura, H. Ishiwa and N. Takahata. (1990) Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Genetics* 126: 657-663.
- Lansman, R.A., J.C. Avise and M.D. Huettel (1983) Critical experimental test of the possibility of "paternal leakage" of mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80 ;1969-1971
- Ma, D.P., A. Zoharkikh, D. Graur, J.L. Vandeberg and W.H. Li. (1993) Structure and evolution of opossum, guinea pig and porcupine cytochrome b genes. *J. Mol. Evol.* 36: 327-334.
- Moller, P.R. and P. Gravlund. (2003) Phylogeny of the eelpout genus *Lycodes* (Pisces, Zoarcidae) as inferred from mitochondrial cytochrome b and 12S rDNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 26: 369-388
- Park, J.Y., H.J. Lee, W.J. Kim, J.H. Lee and K.S. Min (2000) Mitochondrial cytochrome b sequence variation in Korean salmonids. *J. Fish Biol.* 56: 1145-1154.
- Randi, E., V. Luccini, A. Hennache, R.T. Kimball, E.L. Braun and J.D. Ligon. (2001) The mitochondrial DNA control region and cytochrome b genes and the inference of phylogenetic relationships in the avian genus *Lophura* (Galliformes). *Mol. Phylogenet. Evol.* 19: 187-201.
- Rocha-Olivares, A., C.A. Kimbrell, B.J. Eitner and R.D. Vetter (1999) Evolution of a mitochondrial cytochrome b gene sequence in the species-rich genus *Sebastes* (Teleostei, Scorpaenidae) and its utility in testing the monophyly of the subgenus *Sebastes*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 11: 426-440.
- Zouros, E., K.R. Freeman, A.B. Ball and G.H. Pogson (1992) Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*. *Nature* 359: 412-414.