

Yorkshire종 돼지에서 PCR-RFLP을 이용한 Estrogen Receptor의 유전적 다형과 산자수간의 관련성

김지은**, 송원철*, 최봉도*, 고 용*, 박성수***, 홍기창*

고려대학교 생명환경과학대학 생명유전공학부*, Dept. of Animal Science Faculty of Agricultural Sciences University of British Columbia 2357 Main Mall, Vancouver, BC Canada V6T 1Z4**, 고려대학교 생명공학원***

Association of Genetic Polymorphisms of Estrogen Receptor with Litter Size using PCR-RFLP in Yorkshire Swine

J. E. Kim**, W. C. Song*, B. D. Choi*, Y. Kho, S. S. Park*** and K. C. Hong*

Division of Biotechnology and Genetic Engineering, College of Life and Environmental Sciences Korea University*, Dept. of Animal Science Faculty of Agricultural Sciences University of British Columbia 2357 Main Mall, Vancouver, BC Canada V6T 1Z4**, Graduate School of Biotechnology, Korea university***

ABSTRACT

This study was performed to investigate a possible association of the porcine estrogen receptor(ER) locus with the total number of born(TNB) and number of born alive(NBA) in Yorkshire pigs. Using DNAs extracted from 242 Yorkshire pigs, the ER genotype was determined by *Pvu* II PCR-RFLP. The ER allele frequencies of two types of A and B were 0.39 and 0.61, respectively. The least squares means of the litter size by ER genotype was evaluated. The TNB and NBA were found to be associated with an specific ER allele. The genotype at the porcine ER locus has an application potential for marker-assisted selection for litter size in pigs.

(Key words : Estrogen receptor locus, RFLP, Litter size, Yorkshire pig)

I. 서 론

최근 가축의 경제형질 개량에 있어서 게놈상의 염기서열 변이에 근거한 유전적 표지(DNA marker)를 이용한 분자유전학적 기법이 도입됨으로써 경제형질에 영향을 미치는 유전자에 대한 분리와 genome상에서의 정확한 위치에 대한

연구들이 시행되어지고 있다. 이러한 시도들은 기존의 통계유전학적 방법에 의한 개량이 어려웠던 유전력이 낮은 번식형질과 한성유전을 하는 형질의 개량에 있어서 새로운 방법을 제시하게 되었다 (Fries 등, 1993; Ellegren 등, 1994; Burt 등, 1995; Davis 등, 1998). 면양에서는 *FecB*라는 유전자의 변이와 산자수 간의 관

본 연구는 2001년도 고려대학교 교내특별연구비로 수행되어진 연구결과임
Corresponding author : Prof. K. C. Hong, Division of Biotechnology and Genetic Engineering College of Life and Environmental Sciences Korea University, Seoul 139-701, Korea.

런성이 보고 된 바 있고 (Montgomery 등, 1992), 돼지에서는 estrogen receptor (ER) 유전자 (Rothschild 등, 1996)와 follicle stimulation hormone (FSH) 유전자 (Zhao 등, 1998), 그리고 prolactin receptor(PRLR) 유전자 (Vincent 등, 1998)이 번식형질과 관련이 있다고 보고 된 바 있다. 돼지에서 번식형질과 관련하여 처음으로 연구가 시도 되었던 ER 유전자는 스테로이드 호르몬인 estrogen의 결합에 의하여 활성화되어 전사인자로 작용하고 대상 유전자들의 전사수준을 높임으로서 estrogen의 번식을 비롯한 광범위한 생리현상을 매개한다는 점에 관심의 대상이 되었다. 이러한 현상들을 바탕으로 ER 유전자가 돼지의 산자수 증진에 영향을 줄 수 있는 후보 유전자 (candidate gene)로서 연구가 이루어졌는데, ER 유전자 좌위에서 *PvuII* PCR-RFLP의 다형현상을 이용하여 다산종인 중국의 Meishan 종과 Yorkshire 종간의 교잡종 그리고 Yorkshire 종의 개체와 가계에서 ER 좌위의 유전자 다형 현상에 대한 분석이 이루어졌다(Rothschild 등, 1996; Short 등, 1997). 분석 결과 ER 유전자 다형성은 AA, AB 그리고 BB의 세 가지 유전자형이 나타났으며, Meishan 종에서 나타나는 B유전자가 Yorkshire 종의 다산인 개체와 그 가계에서 일관되게 출현하였다. 이러한 연구결과를 바탕으로 본 연구진에 의해 수행되었던 선행연구에서도 61두의 Yorkshire 종빈돈에 대한 ER 유전자 좌위의 다형성과 번식형질과의 관련성 분석을 통하여 B유전자가 다산의 개체와 연관성이 있음을 입증하였다(박 등, 2000). 그러나 이러한 연구결과를 돼지육종의 현장에서 실용화하기 위해서는 반복 및 규모화 된 실험을 통해서 적용가능성을 확인해야 한다. 따라서 본 연구에서는 보다 많은 표본수를 확보하여 산자수와 관련된 형질에 대한 ER 유전자 좌위 변이간의 관련성을 분석하고, 이를 이용한 돈군에서 표지 유전자를 이용한 산자수 개량의 기초자료를 제시하고자 본 연구를 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시돈

본 연구는 경기도 포천군 소재 GGP 농장의 무창 돈사에서 동일한 사양관리 프로그램 하에 사육 중인 Yorkshire 종돈군으로 부터 돼지 ER 유전자 좌위변이와 산자수간의 관련성을 분석하기 위해서 종빈돈 242두에 있어서 초산부터 7산차까지의 모든 번식성적기록을 이용하였다.

2. 조사항목

본 연구에서 조사된 번식형질은 복당 총산자수(total number born, TNB)와 복당 실산자수(number born alive, NBA)로서 산차 별로 조사 · 분석하였다. 종빈돈 242두의 ER 유전자형을 판별하기 위해 *PvuII* 제한효소로 PCR-RFLP 분석을 수행하였으며, 그 결과를 토대로 표본 돈군 내 ER 유전자 빈도를 추정하였다.

3. ER 유전자 좌위의 유전자형 검색

공시축의 경정맥에서 분리된 혈액에서 백혈구만을 분리하여 Sambrook 등(1989)이 보고한 방법에 따라 genome DNA를 분리하였다. PCR-RFLP 분석을 위해서는 Short 등(1997)이 보고한 ESRF(5'-CCT GTT TTT TAC AGT GAC TTT TAC AGA G-3')와 ESRR(5'-CAC TTC AG GGT CAG TCC AAT TAG-3')을 forward와 reverse primer로 각각 사용하여 ER 좌위의 120bp를 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물은 *PvuII*를 이용하여 절단하고 polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)를 통해서 AA, AB, BB 세 가지 type의 유전자형을 검색하였다. (박 등, 1999).

4. 통계분석

(1) 유전자 빈도의 추정

돼지 ER 유전자 좌위에 있어서 유전자 빈도의 추정은 최다우도추정법 (Maximum Likelihood Estimation, MLE)을 이용하여 다음과 같이 산출

하였다. (Weir, 1996)

$$\begin{aligned}
 P_{AA} &= \theta^2 \\
 P_{AB} &= 2\theta(1-\theta) \\
 P_{BB} &= (1-\theta)^2 \\
 L(\theta) &= [n!/n_{AA}!n_{AB}!n_{BB}!] \{(\theta)\}^{n_{AA}} \\
 &\quad \{2\theta(1-\theta)\}^{n_{AB}} \{(1-\theta)\}^{n_{BB}}
 \end{aligned}$$

여기서, θ = 표본집단내 A유전자 빈도의 추정치, P_{AA} , P_{AB} , P_{BB} = AA, AB, BB 유전자형의 기대 빈도 (predicted frequency), $L(\theta) = \theta$ 를 추정하기 위한 우도 함수 (likelihood function), n = 총 관측수, n_{AA} , n_{AB} , n_{BB} = 각 유전자형별 관측수이다.

(2) 관련성 분석

ER 좌위변이와 산자수와의 관련성을 분석하기 위해 Linear(모형1)을 설정하여 SAS/STAT 8.02 package를 이용하여 분석하였다. 산자수에 영향을 미치는 ER 유전자형과 산차의 효과를 살펴보기 위해서는 SAS/GLM procedure의 분석결과 제공되는 4가지 제곱합 중에서 불균형 자료에 적합한 Type III 제곱합을 이용하여 분산분석을 실시하였으며, 최소제곱법으로 각 요인들에 대한 최소제곱평균(least square means)을 구하였다. 분산분석 결과 통계적 유의성이 인정된 요인의 경우 최소제곱평균간의 차이에 대한 검정을 SAS/GLM에서 제공되는 다중비교법 (pairwise t-test)을 이용하여 실시하였다.

$$Y_{ijk} = \mu + g_i + p_j + (gp)_{ij} + \epsilon_{ijk} \dots\dots\dots \text{(모형 1)}$$

- Y_{ijk} = 각 번식형질의 측정치,
- μ = 전체 평균
- g_i = ER 유전자형의 효과 (i=1, 2, 3)
- p_j = 모돈 산차의 효과
- $(gp)_{ij}$ = ER 유전자형과 산차의 상호작용효과

ϵ_{ijk} = 각 개체의 고유한 임의오차

공시돈들은 무창돈사 내에서 동일한 사양관리 program하에 있기 때문에 온도, 습도, 광주기, 출생년도 등의 환경효과가 모든 대상군에 동일하게 적용되는 것으로 가정하고 모형에서 배제하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 돼지 ER의 유전자 및 유전자형 빈도

실험 축군으로부터 추출된 242마리의 종빈돈에서 PCR-RFLP 결과 얻어진 유전자형 빈도와 최다우도추정법(MLE)으로 산출한 돼지 ER의 유전자 빈도 및 유전자형 기대 빈도는 Table 1에 제시 하였다.

대상 모돈군내 유전자형의 분포는 AA형이 14%, AB형은 50%, 그리고 BB형은 36%의 비율로 관찰되었다. 종빈돈 표본 집단내 유전자 비율 추정치를 살펴보면 B유전자 빈도(0.61)가 A유전자 빈도(0.39) 보다 높았다. 이는 우리나라 대부분의 종돈장에서 산자수에 대하여 고능력 개체들의 선발을 실시함으로써 산자수에 대하여 고능력을 대변하는 유전자는 돈군 내에서 유지되고, 저능력을 대변하는 유전자는 제외되었기 때문으로 여겨진다. 이는 Short 등(1997)이 산자수에 대한 고능력돈을 선발한 Yorkshire 상업축군에서 ER 유전자 빈도를 조사한 결과 고능력으로 대별되는 B유전자 빈도가 A유전자 보다 높았다는 기존의 보고와 일치하였다.

2. 돼지 ER 좌위의 변이와 산자수 간의 관련성

(1) 분산 분석

본 연구에서 조사된 번식능력의 TNB와 NBA

Table 1. Distribution of genotype and gene frequency determined by PCR-RFLP

Number of animal	Genotypes			Gene frequency ^a		Genotype frequency		
	AA	AB	BB	p	q	p ²	2pq	q ²
Pigs 242	34 (0.14)	121 (0.50)	87 (0.36)	0.39	0.61	0.15	0.48	0.37

^a p = A gene frequency and q = B gene frequency.

에 대한 ER 유전자형과 산차의 효과를 분석하기 위하여 설정된 고정모형으로 분산 분석을 실시한 결과는 Table 2에 제시한 바와 같다. 각 요인에 대한 유의성 검정 결과를 보면, ER 유전자형의 효과와 산차의 효과 모두가 TNB와 NBA의 변이에 유의한 영향을 미쳤다($p < 0.05$).

그러나 ER 유전자형과 산차간의 상호작용 효과는 산자수에 대하여 통계적 유의성이 인정되지 않았다($p > 0.10$).

Table 2. Source of variation, degree of freedom, type III mean squares, tests of significance for sow litter size using fixed effect model

Source	df.	TNB	NBA
ER genotype	2	31.16*	22.33*
Parity	6	20.04*	21.32**
ER genotype × Parity	12	12.25 ^{N.S.}	8.13 ^{N.S.}
Error	765	8.59	7.38

* $p < 0.05$.

** $p < 0.01$. N.S. : non-significance ($p > 0.10$).

TNB와 NBA에 대한 산차의 효과는 정 등 (1998)이 모든의 자돈생산능력에 대한 산차의 효과가 통계적으로 유의성이 인정된다고 보고한 바와 부합되는 것이었다. 일반적으로 번식형질에 있어서 모든의 성숙 정도가 번식성적에 영향하기 때문에 초산차의 경우 경산돈 보다 낮은 기록을 나타내는 것으로 보고되고 있다(김 등, 1998).

(2) 산자수에 대한 ER 유전자 좌위변이의 효과

분산분석을 통하여 산자수에 영향을 미치는 것으로 판명된 ER 유전자형의 효과는 최소제곱평균을 이용하여 추정하였다. ER 유전자형별 최소제곱평균치와 표준오차는 Table 3에 제시한 바와 같다.

TNB와 NBA 두 형질 모두에서 AB와 BB형이 AA형에 비하여 우수한 결과를 나타내었으며, AB와 BB간에는 통계적인 유의차가

없었다. 이러한 결과는 ER 유전자형 중에서 TNB의 경우 AB형이 1.65두, BB형이 1.24두가 AA형인 경우보다 많았으며, NBA의 경우 AB형이 1.39두, BB형이 1.31두가 AA형인 경우보다 많은 것으로 나타나 최소 1두 이상의 복당 산자수의 증가효과가 있다는 것을 보여주는 것으로서 Rothschild 등(1996), Short 등(1997), 박 등(2000)이 *PvuII* 에 의한 ER 유전자의 다형현상 분석에서 보고한 바와 일치함을 알 수 있다.

Table 3. Least square means and standard errors ER genotypes

Genotype	N ¹⁾	TNB(SE ²⁾)	NBA(SE)
AA	34	9.71(0.57) ^a	8.91(0.52) ^a
AB	121	11.36(0.25) ^b	10.30(0.24) ^b
BB	87	10.95(0.22) ^b	10.22(0.21) ^b

¹⁾ N : Number of records.

²⁾ SE : Standard Error.

^{a,b} means in the same column with different superscript significantly differ at $p < 0.05$.

본 연구에서 얻어진 ER 유전자 좌위의 변이와 산자수 간의 관련성 분석결과를 종합해 보면, TNB와 NBA에 영향을 미치는 ER의 유전자형 효과에 대한 통계적 유의성이 인정되었고, ER 유전자형 중 B유전자가 증가함에 따라 산자수 역시 증가하는 경향이 관찰되어 AA보다는 AB, BB에서 산자수가 더 많은 것으로 나타나 ER 유전자 좌위변이와 Yorkshire종의 산자수 간에는 통계적 관련성이 존재하는 것으로 사료된다.

현재 돼지의 ER 유전자는 1번 염색체의 단완 말단에 존재하는 것(1p23-25)으로 알려져 있으며, *Pvu II*에 의한 다형을 인지하는 부위가 Intron인 것으로 나타나, ER 유전자 좌위에서의 다형현상은 이 부위에서의 변이가 직접적으로 번식형질에 영향을 주는 것보다 산자수에 직접적으로 영향을 미치는 다른 주유전자(major gene)가 ER 유전자와 유전적으로 연관되어 존재하고 있기 때문이

거나 ER 유전자의 전사조절 변화에 기인하는 것으로 사료된다.

본 연구를 통하여 Yorkshire 종돈군에서 산자수 증진과 관련된 marker-assisted selection 실시를 위한 기초 자료로써 가치가 있다고 생각되기는 하나, 본 연구 분석에 이용된 자료의 크기는 충분한 것이 아니므로, 앞으로 좀더 정확한 결론을 내리기 위해서는 같은 농장에서의 기록 축적은 물론, 다른 농장의 종빈돈에 대한 기록을 확보하여 이에 대한 분석이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

IV. 요약

본 연구는 *Pvu* II PCR-RFLP를 이용하여 Yorkshire종 돼지에서 Estrogen Receptor의 유전적 다형과 산자수간의 관련성을 분석하기 위하여 수행되었다. 무창 돈사에서 사육중인 242두의 종빈돈으로부터 혈액을 채취하여 *Pvu* II PCR-RFLP로 ER 유전자형을 결정하였다. ER 유전자 좌위에서 유전자 빈도는 각각 0.39(A)와 0.61(B)였다. ER 유전자형별 산자수에 대한 효과는 최소제곱평균을 설명하는 고정모형을 설정하여 추정하였다. 분석결과 복당 총산자수와 실산자수에서 특정 ER 대립유전자(B)에서 산자수 증진효과가 관찰되었다. 따라서 돼지 ER 좌위의 유전적 변이는 번식돈의 산자수 증대와 관련된 marker-assisted selection(MAS)에 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 인용 문헌

- Burt, D. W., Bumstead, N., Bitgood, J. J., DeLeon, F. A. P. and Crittenden, L. B. 1995. Chicken genome mapping : a new era in avian genetics. *Trend Genet.* 11:190-197.
- Davis, G. P. and Denise, S. K. 1998. The impact of genetic markers on selection. *J. Anim. Sci.* 76: 2331-2339.
- Ellegren, H. B., Chowdhary, P., Johansson, M., Markund, L., Feredholm, M., Gustavsson, I. and Andersson, L. 1994. A primary linkage map of the porcine genome reveals a low rate of genetic recombination. *Genetics.* 127:1089-1100.
- Fries, R., Eggen, A. and Womack, J. E. 1993. The bovine genome map. *Mamm. Gen.* 4:405-428.
- Gibson, J. P., Jiang, J. H., Robinson, J. A. B., Archibald, A. L. and Haley, C. S. 2002. No detectable association of the ESR *Pvu*II mutation with sow productivity in a Meishan × Large White F2 Population. *Anim. Genet.* 33:448-450.
- Montgomery, G. W., Penty, J. M., Sise, J. A. and Tou, H. M. 1992. Genes for the and chains for FSH are excluded as sites for the Booroola *FecB* mutation in sheep. *J. Reprod. Fertil.* 95:895-901.
- Rohrer, G., Ford, J. J., Wise, T. H., Vallet, J. L. and Christenson R. K. 1999. Identification of Quantitative Trait Loci Affecting Female Reproductive Traits in a Multigeneration Meishan-White Composite Swine Population. *J. Anim. Sci.* 77:1385-1391.
- Rothschild, M. F., Jacobso, C., Vaske, D., Tuggle, C., Wang, L., Short, T., Eckardt, G., Sasaki, M., Vincent, S., Maclaren, A. D, Southwood, O., Van Der Steen, H., Mileham, A. and Plastow, G. 1996. The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:201-205.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory Press.* USA.
- SAS. 1996. *SAS/STAT guide for personal computer*® 6.12. SAS institute Inc. Cary, NC., USA.
- Seo, D. S., Yang, S. H. Park, H. B., Park, S. S., Hong, K. C. and Ko, Y. 1999. Utilization of porcine clotted and dried blood for estrogen receptor gene PCR-RFLP. *Korean J. Anim. Reprod.* 23(2): 159-163.
- Short, T. H., Rothschild, M. F., Southwood, O. I., McLaren, D. G., de Veries, A., Van Der Steen, H., Eckardt, G. R., Tuggle, C. K., Helm, J., Vaske, D. A. Mileham, A. J. and Plastow, G. S. 1997. Effect of the Estrogen Receptor Locus on Reproduction and Production Trait in Four Commercial Pig Lines. *J. Anim. Sci.* 75:3138-3142.
- Vincent, A. L., Evans, G., Short, T. H., Southwood, O. I., Plastow, G. S., Tuggle, C. K. and Rothschild, M. F. 1998. The prolactin receptor gene is associated with increased litter size in pigs. In: *Proc. 6th World Cong. on Genet. Appl. to Livest. Prod.* 27:15-18.
- Weir, B. S. 1996. *Genetic Data Analysis II.* Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Zhao, Y., Ning, L., Lu, X., Gengsheng, C., Yizhen,

- C., Shun, Z., Yongfu, C., Changxin, W., Jiansheng, Z., Shiquan, S. and Xueqing, X. 1998. FSH β subunit gene is associated with major gene controlling litter size in commercial pig breeds. *Sci. China Ser. C Life Sci.* 41:664-668.
16. 김명직, 박병호, 김시동, 한성욱, 상병찬. 1998. 돼지의 복당자돈수와 복당체중에 미치는 품종 및 환경요인의 효과. *한국동물유전육종학회지.* 2(1):47-56.
17. 박희복, 조시영, 서동삼, 김기동, 고태혁, 고 용, 박성수, 홍기창. 1999. 돼지 에스트로겐 수용체 유전자 좌위의 다형 현상 검색에 관한 연구. *한국동물유전육종학회지.* 3(1):33-40.
18. 박희복, 양성호, 서동삼, 김기동, 고 용, 박성수, 홍기창. 2000. Yorkshire종 돼지에서 에스트로겐 수용체 유전자 조위 변이와 산자수간의 관련성. *한국동물자원과학회지.* 42(2):125-134.
19. 정홍우, Wang, L. and Rothschild, M. F. 1998. 모돈의 자돈 생산성에 영향을 미치는 요인 분석. *한국축산학회지.* 40(1):1-8.
- (접수일자 : 2003. 3. 31. / 채택일자 : 2003. 5. 19.)