

한우 Lipoprotein Lipase 유전자 Intron 5번의 Polymorphism과 경제 형질과의 관련성 분석

이한주*** · 이승환* · 조용민* · 김호백* · 전봉균* · 오성종* · 권무식** · 윤두학*
농촌진흥청 축산연구소*, 성균관대학교 유전공학과**

Association Between the Polymorphism on Intron 5 of the Lipoprotein Lipase Gene and Carcass Traits in Hanwoo (Korean cattle)

H. J. Lee***, S. H. Lee*, Y. M. Cho*, H. B. Yoon*, B. K. Jeon*, S. J. Oh*, M. S. Kwon** and
D. H. Yoon*

National Livestock Research Institute, RDA* and Genetic Engineering Laboratory,
Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University**

ABSTRACT

The primary role of lipoprotein lipase(LPL) is the hydrolysis of triglycerides(TG) from the core of triglyceride-rich lipoproteins such as chylomicrons and very low density lipoproteins in plasma. Fatty acids liberated by LPL on capillary endothelial surfaces are available for tissues as energy sources especially in muscles or for storage in the form of TG in adipose tissues. Therefore, as the candidate gene related to the carcass traits of the beef cattle, we have directly sequenced the exon 5-exon 6 region in the bovine LPL gene for discovery of single nucleotide polymorphism(SNP) with 24 unrelated Hanwoo(Korean cattle). Novel eight sequence variants were detected: three loci on exon 5, three on intron 5 and two on exon 6. All SNPs identified were strongly linked each other, and one hundred twenty eight Hanwoo samples were genotyped one SNP on intron 5 using PCR-restriction fragment length polymorphism method by digestion with *Hae* III restriction enzyme. The allele frequency of the polymorphism was 0.76 and 0.24. The effects of this polymorphism on the breeding values of the carcass weight, loin muscle area, back fat thickness and marbling score were analyzed using least square methods of SAS GLM. The marbling score of BB genotype was significantly higher than those of AA and AB genotypes($P < 0.05$). This result indicates that this polymorphism may be associated with the variation of marbling score. Further study is warranted to investigate the phenotypic association in Hanwoo.

(Key words : Lipoprotein lipase, Hanwoo, PCR-RFLP, Carcass traits)

I 서 론

Lipoprotein Lipase(LPL; triacylglycero-protein acylhydrolase, EC 3.1.1.34)는 체내 주된 저장형태인 중성지질(triacylglycerol)과, cholesterol 및 인지질의 apoprotein과 결합하여 형성된 지방단백질복합체인 유세미립(chylomicron)을 mono-

acylglycerol과 유리지방산으로 가수분해하는 주된 효소이며, 유미미립(Chylomicron)과 초저비중지질단백질(Very low density lipoprotein, VLDL) 및 저비중지질단백질(Low density lipoprotein; LDL)의 주요 구성성분인 Apolipoprotein C-II에 의해 활성화된다(Havel 등 1970; Larosa 등, 1970). LPL에 의해 가수분해되어 생성된 유리

Corresponding author : D. H. Yoon, National Livestock Research Institute, R.D.A., 564 Omokchun-dong Suwon 441-350, Korea. Tel : 031-290-1593, Fax : 031-290-1602, E-mail : dhyoon@rda.go.kr

지방산은 지방세포로 흡수되어 지방합성을 위해 사용되어지거나, 지방세포에 들어온 후 re-esterification되어 중성지방형태로 저장되고 심장이나 근육으로 흡수되어 에너지원으로도 이용되어진다(Eckel, 1989). Transgenic mice와 rabbit을 이용한 동물실험에서 LPL은 대부분 지방 조직과 근육조직에서 발현되었으며, 비정상적인 발현정도에 따라 비만 또는 몸무게 감소와 같은 불균형이 일어남을 확인하였고(Greenwood 등 1985), *in vitro* 실험에서 흰쥐 지방 조직 내 LPL 활성도는 중성지방이 지방세포내로 들어오는 것과 매우 높은 관계임을 나타내므로 LPL이 지방 조직 내 지방축적을 조절하는 인자라고 하였다(Braun과 Severson, 1992; Cruz와 Willamson, 1992; Simwsolo 등, 1992). 최근 transgenic rabbit을 이용한 동물실험에서는 LPL 활성도가 높아지면 지방축적이 줄어드는 것이 확인되면서, LPL 유전자가 지방 과축적으로 인해 발생하는 비만 같은 질병 치료를 위한 유전자 치료법에 이용될 수 있음을 시사하였다(Koike 등, 2004). 인간 LPL 유전자의 경우 구조변이로 인해 LPL 활성도가 감소하여 중성지방(Triglyceride; TG) 농도가 높아지고 고비중지질단백질(High density lipoprotein; HDL) 농도가 줄어드는 것이 보고되었다(Saika 등, 2003). 이러한 결과들은 LPL 유전자가 지방대사에서 중요한 역할을 담당하고 있으며, 지방축적과 관련된 강력한 후보유전자라는 것을 뒷받침해주고 있다.

사람의 LPL은 염색체 8p22에 위치하고 있고, 448개의 아미노산과 glycosaminoglycan들로 구성되며, 분자량은 50,394 Daltons의 당단백질이며, 활성형은 2개의 동일한 아단위(subunit)로 구성된 이합체(homodimer)의 형태이다(Eckel, 1989; Braun과 Severson, 1992; Simwsolo 등, 1992). 사람 LPL 유전자의 Genomic DNA상에서의 크기는 약 30kb로 10개의 exon과 9개의 intron으로 구성된다. 사람 LPL 유전자에서 exon 4~9번을 포함한 intron 3~9번까지 9.7kb에 걸쳐 coding 영역에서 7개 및 non-coding 영역에서 81개의 SNP (Single Nucleotide Polymorphism)들이 탐색되어졌으며(Nickerson 등, 1998), *Bam*H I, *Pvu* II (Fisher 등, 1987), *Hind* III (Heinzmann 등,

1987), *Bgl* II (Hegele 등 1989), 그리고 *Xba* I (Heinzmann 등, 1991) 등의 여러 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 양상들이 보고되었다. 이중 intron 8번 +496위치에서 thymine(T)이 guanine(G)로 치환됨을 검출하였고, 이 SNP의 H+ allele과 LPL의 활성, 높은 중성지방농도 및 낮은 HDL 농도(Heinzmann 등, 1987)와 비만(Vohl 등, 1995)과의 관련성이 보고되었다. Intron 6번의 *Pvu* II 제한효소를 인지하는 SNP도 높은 중성지방 농도 및 낮은 HDL 농도와 관련된다고 보고(Mattu 등, 1994)되는 등, coding 영역뿐만 아니라 non-coding 영역에서도 표현형질과의 관련성 있는 SNP들이 꾸준히 보고되어지고 있다.

소 LPL 유전자는 염색체 8번에 위치하고 (Threadgill와 Womack, 1991), cDNA는 450개의 아미노산(MW 50,548)을 암호화하며(Senda 등, 1987), 각 종간의 LPL cDNA와 비교하여 보았을 때 사람과 96%, 쥐 96%, 기니피그(guinea pig) 91.5%, 닭 85.7%의 높은 상동성을 가지고 있다(Hide 등, 1992). 아직 소 LPL의 전체 Genomic DNA의 염기서열은 보고되지 않았으며, 사람이나 다른 포유류에 비해 소 LPL 유전자의 구조변이 연구가 아직 미흡한 상태이다. Holstein과 Charolais의 두 품종을 이용한 실험에서 소 LPL의 mRNA 발현 양상이 체내 지방축적과 관련이 있음이 보고되었으며(Ren 등, 2002), 소 LPL 유전자의 intron 4번을 포함한 exon 4-exon 5 부위의 *Sau*96 I polymorphism (Tank와 Pomp, 1994)과 *Bsm*A I polymorphism (Lien 등, 1995)이 보고되었다. 이에 본 연구는 소 LPL 유전자에서 유전적 표지인자로서의 가능성을 살펴보기 위하여, 사람 등 기타 포유류에서 주요하다고 보고된 영역을 대상으로 SNP를 탐색하고 이들 SNP 유전자형과 경제 형질과의 관련성 분석을 실시하였고 그 결과를 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 공시 동물 및 DNA 시료의 준비

SNP를 탐색하기 위해 부모가 다른 한우 24

두를 이용하였으며, 검출된 SNP의 유전자형 결정은 혈통 및 표현형질 기록치를 보유하는 한우 33차 후대검정축 128두를 활용하였다.

소 혈액에서의 Genomic DNA 분리 및 정제는 Genomic DNA Purification kit인 MagExtractor (TOYOBO, Japan)을 이용하였다. 분리 정제된 DNA는 DNA/RNA Spectrophotometer인 GeneQuant II (Pharmacia Biotech, Ltd.)를 이용하여 OD₂₆₀ : OD₂₈₀의 비율이 1.5 ~ 1.8 범위의 것을 활용하였고, 0.8% agarose gel에 전기영동을 실시하여 농도 및 상태를 확인한 후 DNA 최종농도가 50 ng/μl이 되게 희석하였으며, 4 °C에 보관하면서 실험에 이용하였다.

2. PCR primer의 설계 및 증폭

한우 LPL 유전자의 intron 5번을 포함한 exon 5, exon 6번 영역에 대한 SNP의 탐색을 위해 Senda 등(1987)이 발표한 bovine LPL cDNA sequences (GenBank Accession no. M16966)를 근거로, 사람의 LPL 유전자 염기서열과 비교하면서 PrimerSelect™ (DNASTAR Inc.) Software를 이용하여 2쌍의 Primer를 제작하였다(Table 1). PCR 반응을 위해 10X PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH8.3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂) 2.5μl, dNTPs(2.5 mM) 2μl, primer(10 pmol) 1μl, 50 ng의 genomic DNA 그리고 0.5U의 Taq DNA polymerase (TaKaRa, Japan)을 넣고 최종 반응량이

25μl 되게 조정하였다.

PCR 수행은 PTC-225 (MJ Research, Inc.)의 peltier thermal cycler를 이용하여, 최초 95 °C에서 5분동안 예비변성을 시킨 후, 변성반응은 94 °C 45초, 중합반응은 62 °C 또는 66 °C의 적정온도 (Table 1)에서 1분, 그리고 합성반응은 72 °C에서 각 PCR 증폭산물의 크기를 고려하여 1~2분간으로 35회 반복 수행한 후 최종적으로 72 °C 10분간 반응시킨 후 종결하였다. PCR이 끝난 후 PCR 증폭산물의 3μl를 1.5~2% agarose gel에 전기영동하여 증폭여부 및 크기를 확인하였다.

3. Single Nucleotide Polymorphism의 탐색 및 유전자형 결정

부모가 각기 다른 한우 24개체의 PCR 증폭산물들은 CONCERT™ Rapid PCR purification system (Life Technologies, USA)을 이용하여 순수하게 증폭산물만을 분리 회수하고, UV Spectrophotometer와 1.5% agarose gel을 이용하여 회수된 DNA의 농도 및 상태를 확인하였다. 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. 결정된 DNA 염기서열들은, NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)

Table 1. Primers characterization for SNP discovery and genotyping in Hanwoo LPL gene

Region	Primers ID	Primers sequence	Size (bp)	Annealing temperature (°C)
<i>Primers for SNP discovery</i>				
Exon 5-6	LPL-ex5U	5'-AAGTCGCCCTTTCTCCTGATGATG-3'	1,674	66
	LPL-ex6L	5'-GCTGCTTCTTTTGGCTCGTAC-3'		
	LPL-in5U	5'-CTTGAATACAGTGCAAAAC-3'		
	LPL-in5L	5'-GTCTTCGTAGATCTCCATAA-3'		
<i>Primers for PCR-RFLP</i>				
Intron 5	LPL-h1U	5'-CAAGATGAAACACTCATTGT-3'	759	62
	LPL-h1L	5'-GATAGAAGTTGATTTCCCCC-3'		

를 통해 상동성을 검색하였으며, SeqManII™ (DNASTAR, Inc.) 및 DNA Sequence Navigator™ (Applied Biosystems, U.S.A) program을 사용하여 개체간의 DNA 염기서열 변이 여부를 탐색하였다.

탐색된 SNPs중 제한효소 인식부위에 대해서 Table 1에 제시된 primers (LPL-h1U 및 LPL-h1L)를 이용하여 PCR-RFLP 방법으로 유전자형을 결정하였다. 각 PCR 증폭산물의 3μl를 취하여 제한효소 Hae III의 반응조건에 따라 반응액을 조성하였고, 37 °C에서 3시간이상 완전히 절단 반응시켰다. 절단된 DNA를 확인하기 위해 2% GTG 3:1 agarose gel (Promega, U.S.A.)에 전기영동을 실시하였으며, EtBr 염색법으로 DNA 절편을 검출하여 각 개체들의 유전자형을 결정하였다.

4. 통계 분석

본 연구에서 조사된 한우 도체형질의 성적은 아래의 모델식으로 국가단위평가에 의해 추정된 육종가(breeding value)을 이용하였다.

$$Y_{ijkl} = \mu + YS_i + S_j + L_k + bD_{ijkl} + A_{ijkl} + e_{ijkl}$$

여기에서, Y_{ij} : Observations

μ : Overall mean

YS_i : Fixed effect of ith year-season

S_j : Fixed effect of jth sex

L_k : Fixed effect of kth location

b : Linear regression coefficient of observations on age of days at slaughter

D_{ijkl} : Covariates for the age of days at slaughter

A_{ijkl} : Random direct additive genetic effect of individual, $N \sim (0, \sigma_a^2)$

e_{ijkl} : Random residual error, $N \sim (0, \sigma_e^2)$

도체형질의 육종가에 대한 유전자형 효과를 분석하기 위해 SAS/STAT@8.1 package를 이용하여 아래와 같은 일반선형모형으로 분산 분석을 실시하였으며, 유전자형에 따른 도체형질별 육종가의 최소제곱평균(least square means)과 표준오차를 추정하여 평균간 최소유의차 검정을

실시하였다.

$$Y_{ij} = \mu + G_i + e_{ij}$$

여기에서, Y_{ij} : 도체중, 배장근단면적, 근내지방도 및 등지방두께의 육종가

μ : 전체 평균

G_i : 유전자형 효과($i = AA, AB, BB$)

e_{ij} : 임의오차, $N \sim (0, \sigma_e^2)$

III 결과 및 고찰

1. PCR 증폭산물의 SNP 탐색

사람 및 다른 동물의 LPL 유전자에서 주요한 영역으로 알려져 있는 intron 5번을 포함한 exon 5, exon 6번에서 SNP를 탐색하고자 LPL-ex5U primer 및 LPL-ex6L primer를 이용하여 부모가 각기 다른 한우 24두의 DNA 시료를 PCR 방법으로 증폭하였고, PCR 증폭산물에 대해 Direct sequencing을 실시하여 개체별 DNA 염기서열을 결정하였다. 그 후, 결정되어진 PCR 증폭산물의 DNA 염기서열을 토대로 Table 1에 제시된 LPL-in5U 및 LPL-in5L의 internal primers를 다시 제작하였고, re-direct sequencing을 통하여 확보된 PCR 증폭산물의 전체크기에 대한 DNA 염기서열 결정을 완료할 수 있었다(Fig. 1). 이들의 DNA 염기서열과 기존에 보고되었던 Bovine LPL 유전자 염기서열과의 상동성 비교를 통하여 Bovine LPL 유전자의 exon 5번과 exon 6번 영역임을 확인하였다. 전체 증폭산물의 크기는 1,674 bp이었으며, 소에서는 아직 보고되지 않은 LPL 유전자의 intron 5번은 그 크기가 1,280 bp로 확인되었다. 그리고 exon-intron 경계부위도 GT-AG rule을 따르고 있었다.

LPL 유전자는 사람의 경우 약 100개의 SNP들이 검출되었고 이들 중 아미노산까지 치환되는 61개 missense mutation들이 대부분 exon 5번 및 exon 6번 영역에 위치하고 있으며(Merkel 등, 2002), 또한 이 영역의 여러 SNP들은 LPL의 활성화, 중성지방(TG) 및 고비중지질단백질(HDL) 농도나 콜레스테롤, 인슐린 등에 영향을

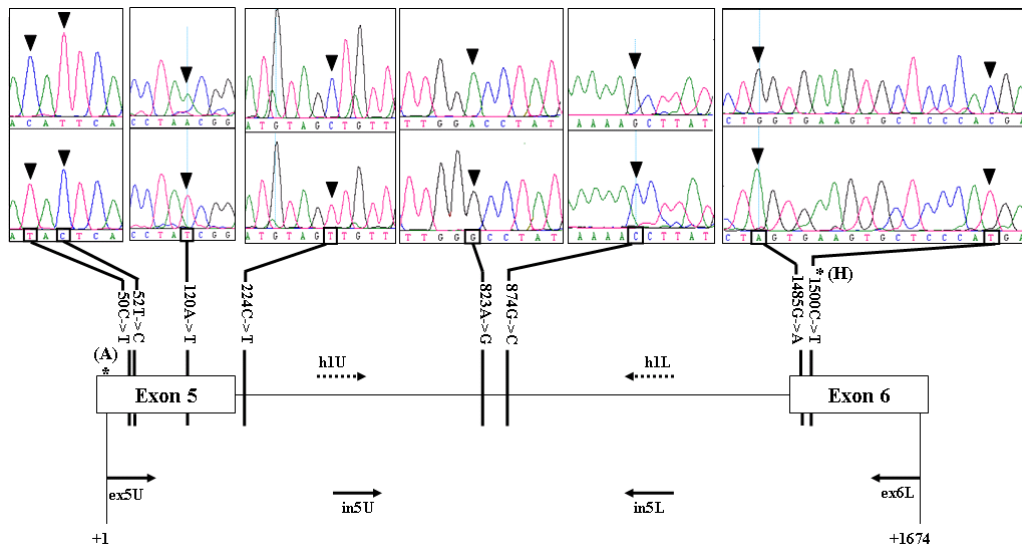


Fig. 1. Genetic variations identified within exon 5 and exon 6 of the bovine LPL genomic DNA. The amplified products were 1,674 bp in length and were found eight SNPs (indicated by black arrowhead) by the direct-cycle sequencing with 24 unrelated Hanwoo individuals. The bold arrows are the primers for PCR amplification and sequencing, dot arrows are the primers for PCR-RFLP and the asterisks are the locations of the three residues in the catalytic triad: serine(S: not shown), aspartic acid(A) and histidine(H).

좁으므로 비만, 심장병, 고지혈증, 동맥경화와 당뇨병 같은 질병과의 연관성이 있다고 보고되었다(Ma 등, 1992; Merkel 등, 2002). Exon 5번과 exon 6번 영역의 아미노산 서열은 사람과 소, 기니피그, 쥐, 그리고 닭 등과 서로 95% 이상 높은 상동성을 보이고 있고, Hepatic lipase (HL)나 Pancreatic lipase (PL) 같은 지방분해 효소에서 높은 상동성을 보이고 있다. 또한 이 부위는 Heparin과의 결합 부위이며, 효소의 촉매활성에 있어서 중요한 부위로 알려져 왔다 (Yang 등, 1989; Hide 등, 1992). Chilliard과 Robelin(1985)에 의해 LPL이 반추동물들의 지방 대사에 있어서 중요한 역할을 한다는 것이 증명되었으며, Waylan 등(2004)은 LPL이 소 근내 지방도와 같은 경체형질에 있어서 중요한 지표가 될 수 있음을 시사하였다.

LPL-ex5U primer에서 5'-방향의 첫 번째 DNA 염기를 +1로 보았을 때 exon 5번에서 50C → T (Thr186Ile), 52T → C(Phe187Leu), 120A → T(Asn210Ile)의 3개의 SNP가 검출되었고, 이들은 모

두 missense mutations로 분석되었다. Intron 5번에서는 224C → T, 823A → G, 874G → C의 3개 SNP, 그리고 exon 6번의 1485G → A, 1500C → T 등의 2개의 SNP로 총 8개의 SNPs가 탐색되었다(Fig. 1). 검출된 8개 부위가 모두 SNP로 규정할 수 있는 기준인 1% 이상(Kruglyak와 Nickerson, 2001)의 변이빈도를 보였으며, SNP 검출 비율을 평균값으로 계산해 보았을 때, 전체 1,674 bp 크기의 DNA 단편에서 평균 1 SNP/210 bp 검출빈도를 보였다. 이중 20% 이상 변이빈도를 보인 5부위의 SNP는 평균 1 SNP/335 bp의 비율로 검출되는 것으로 계산되었다. 이 결과는, 24개체를 공시하여 변이빈도가 20% 이상인 SNP가 약 1 SNP/960 bp 비율로 검출된다고 Kruglyak와 Nickerson(2001)에 의해 보고되었던 비율보다 높게 나타난 것이다. 이것은 LPL 유전자 exon 5~exon 6 영역의 SNP 검출빈도가 사람에서 보고되었던 평균 검출빈도보다 높게 나타나는 것으로 종간의 유전역학적 차이라고 사료된다. 이번 연구에서 검출된

8개의 SNP 중에서 20 % 이상 변이빈도를 보이고 있는 5 좌위의 SNP(224C → T - 823A → G - 874G → C - 1485G → A - 1500C → T) 들은 서로 연관(linkage)관계(95 % 이상)를 보여주었고, 나머지 exon 5번의 3개의 missense mutations 부위는 5 % 이하의 낮은 변이빈도로 분석되어졌고, 연관관계가 없었다.

2. 한우 LPL유전자 intron 5번의 PCR-RFLP 분석

검출된 SNPs중 5개의 SNP(224C → T - 823A → G - 874G → C - 1485G → A - 1500C → T) 들은 서로 강한 연관관계를 보여주었고, 이들 5 SNPs 중 비교적 PCR 증폭이 용이하며 제한효소 인식부위를 가지는 823A → G(GACC → GGCC: *Hae* III)부위를 PCR-RFLP 방법으로 유전자형 결정을 수행하였다. Exon 5번에서 검출된 SNP(50C → T; Thr186Ile, 52T → C; Phe187Leu, 120A → T; Asn210Ile)들은 상호간 연관되지는 않았지만 변이빈도가 낮아(5 % 이하) 유전자형

결정에서 제외하였다.

Intron 5번의 823A → G 부위가 포함되며, 759 bp의 크기로 증폭되도록 1쌍의 primer (Table 1의 LPL-h1U 및 LPL-h1L, Fig. 1)를 다시 제작하여 PCR 증폭반응을 수행하였다. 증폭 산물에 대해 제한효소 *Hae* III로 처리 후 전기영동을 수행했을 때 제한효소 인식부위 수에 따라 전기영동 양상이 다르게 나타났다. 1개의 *Hae* III 인식부위를 갖는 BB형(cut)은 386 bp과 373 bp의 두 개의 단편을, 인식부위를 갖지 않는 AA형(uncut)은 759 bp의 하나의 단편을 가지는 것으로 나타났다(Fig. 2). 이로써 DNA 염기가 치환됨을 확증할 수가 있었다.

3. *Hae* III polymorphism 유전자형과 도체형질과의 관련성 분석

Table 2에서는 도체형질의 표현형치 및 그로부터 추정된 육종가들간의 상관관계를 분석하여 나타내었는데, 도체중(carcass weight)과 배장근단면적(eye muscle area)에서는 표현형치와 육

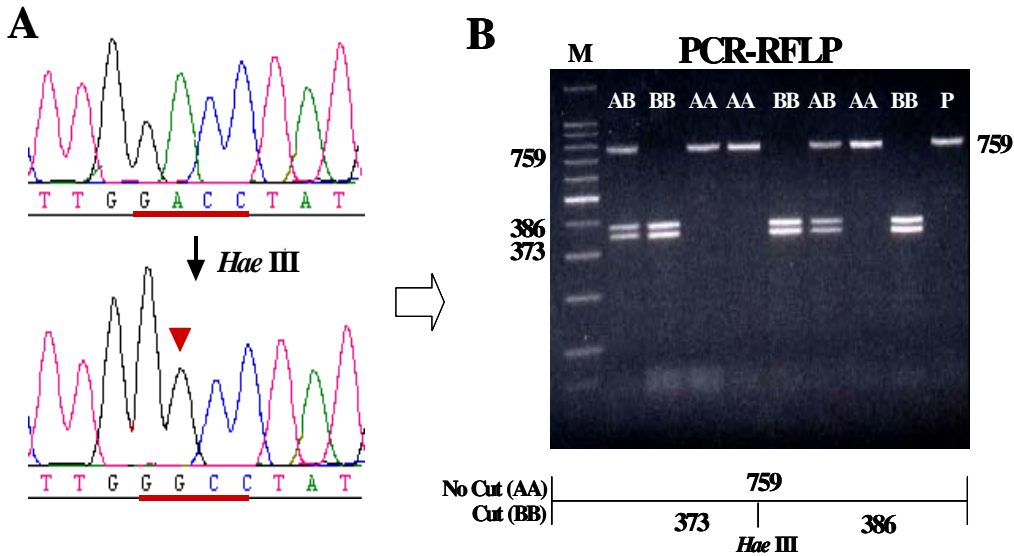


Fig. 2. Single Nucleotide Polymorphism found on intron 5 of Hanwoo LPL gene. A; the electropherogram of 823A → G SNP site recognized by *Hae* III B; PCR-RFLP patterns of the amplified products. AA genotype is produced 759 bp uncut by *Hae* III BB genotype is cut and produced 386 and 373 bp. M:100 bp DNA ladder marker (Promega) P: PCR product.

Table 2. Correlation coefficients among phenotype records and breeding values of carcass traits¹⁾

Trait	Carcass weight	Eye muscle area	Marbling score	Backfat thickness
Carcass weight	.915	.613	-.025	.079
Eye muscle area	.605	.911	-.344	.038
Marbling score	.156	.140	.084	.121
Backfat thickness	.232	-.100	-.084	.095

¹⁾ Upper diagonal includes correlation coefficients among breeding values. Diagonal cells include correlation coefficients between breeding values and phenotype records(bold); and Lower diagonal includes correlation coefficients among phenotype records.

종가간의 상관계수가 0.9 이상으로 높게 나타난 반면, 근내지방도(marbling score)와 등지방두께(backfat thickness)에서는 0.1 이하의 낮은 상관계수를 보여주고 있다.

Intron 5번 내에서 검출된 *Hae III*(823A → G) polymorphism의 유전자형과 표현형 기록을 보유하고 있는 33차 후대검정축 128두를 대상으로 앞서 제시한 통계분석 모형에 근거하여 각 형질의 육종가에 대해 유전자형의 효과를 분석하였으며, 그 결과들을 Table 3에 제시하였다. 제한효소 *Hae III*로 처리한 intron 5 영역의 823A → G 부위는 근내지방도에 대한 유전자형

의 효과가 유의적인 것으로 나타났다($p < 0.05$). Table 4에는 표현형 기록치를 보유하고 있는 33차 후대검정축 128두에 대한 *Hae III*를 이용한 PCR-RFLP로 얻어진 유전자형 빈도와 823A → G 부위의 유전자형에 따른 각 형질별 육종가의 최소제곱평균과 표준오차를 제시하였다. 여기에서 유전자형 빈도는 AA형(uncut)은 0.58, AB형은 0.35, 그리고 BB형(cut)은 0.07 비율로 관찰되었으며, 대립유전자 빈도는 A형이 0.76으로, B형이 0.24보다 높게 나타났다. 유전자형에 따른 평균간 최소유치차 검정결과, intron 5번 823A → G 부위의 유전자형에 따라 분석된 모

Table 3. Least squares ANOVA for the breeding values based on *Hae III* polymorphism in Hanwoo Lipoprotein Lipase gene

SNP site	df	MS			
		Carcass weight	Eye muscle area	Marbling score	Backfat thickness
823A → G(<i>Hae III</i>)	2	74.109	2.6365	0.0545*	0.7805
Residual error	126	102.695	11.6964	0.0166	0.3381

*: $p < 0.05$.

Table 4. Genotype frequency and least square means with their standard errors of the breeding values on *Hae III* polymorphism in Hanwoo Lipoprotein Lipase gene

SNP site	Genotype	N (Frequency)	Traits (BV)			
			Carcass weight	Eye muscle area	Marbling score*	Backfat thickness
Total		128				
823A → G (<i>Hae III</i>)	AA	74 (0.58)	14.326 ± 7.444	0.109 ± 2.512	-0.187 ± 0.095 ^b	-0.856 ± 0.427
	AB	45 (0.35)	3.464 ± 4.451	0.389 ± 1.502	-0.111 ± 0.057 ^b	0.393 ± 0.255
	BB	9 (0.07)	-0.614 ± 6.011	2.038 ± 2.028	0.121 ± 0.076 ^a	0.497 ± 0.345

*: Means with different letter in the same column are statistically different($p < 0.05$).

든 도체형질의 평균치에서 뚜렷한 차이를 보여주었으며, 특히 BB형이 근내지방도의 육종가에 통계적으로 유의하게 분석되어졌다($p < 0.05$).

사람, 쥐 그리고 토끼 등에서 LPL 유전자 구조변이로 인하여 LPL의 활성이 증가 또는 저하되었을 때 TG와 HDL 농도변화의 높은 상관관계가 있음이 증명되었고, 인간 LPL 유전자 coding 부위의 SNP 뿐만 아니라 non-coding 부위의 SNP들 또한 표현형질에 대해 영향을 준다는 것이 intron 8번의 *Hind* III나 intron 6번 *Pvu* II RFLP 양상을 통해 보고되었다(Heinzmann 등, 1987; Vohl 등, 1995; Mattu 등, 1994). Non-coding 영역의 SNP들이 어떤 기작으로 기능에 직접적인 영향을 주는지에 대한 명백한 증명은 아직 미흡한 상태지만, 사람 LPL 유전자에서 유전적 표지인자로 잘 알려져 있는 intron 8번의 *Hind* III polymorphism과 Ser447Stop (S447X) polymorphism과의 강한 linkage disequilibrium을 보여줌으로써 non-coding 부위의 SNP들 중에는 LPL 기능에 직접적인 영향을 주는 coding 부위의 SNP와 강한 연관(linkage) 관계의 가능성을 제시하였고(Ukkola 등, 2002), 또한 exon과 intron을 연결하는 splice site에서의 SNP는 splicing 과정에 영향을 줌으로써 mRNA의 발현에 영향을 주는 것이 실험에 의해 증명되었다(Holz 등, 1994).

이번 연구로 발견된 823A → G SNP는 비록 non-coding 부위이지만 본 실험에서 검출되었던 coding 영역의 SNP(1485A → G, 1500C → T)들과 95% 이상 강한 연관(linkage) 관계에 있음을 확인할 수 있었다. Exon 6번의 1500C → T (CAC^{His} → CAT^{His}) SNP는 소 243^{His} codon을 암호화하는 부위이며, 사람이나 기니피그, 쥐, 그리고 닭 등의 아미노산 염기와 높은 상동성을 보인다(Yang 등, 1989; Hide 등 1992). 243^{His} codon은 효소 촉매활성에 있어 주요한 세 부위(138^{Ser}, 158^{Asp}, 243^{His}) 중 하나로 LPL 가수분해 활성의 필수적인 부위로 알려져 있으며(Emmerich 등, 1992), 인간 LPL 유전자의 경우 촉매활성 부위들의 변이가 LPL의 활성이나 기능에 영향을 주는 것이 밝혀져 있다(Ma 등, 1992).

이로 미루어 보았을 때, LPL 가수분해 활성에 있어 중요한 촉매부위에서 검출된 SNP는 효소촉매 활성에 영향을 줄 것으로 추정되며, 기능에 직접적인 영향을 주는 다른 주요 SNP와의 연관관계 가능성도 고려해 봤을 때, 다른 주요 영역에서의 SNP의 정밀한 조사와 SNP들이 서로 결합되어 영향을 주는지 아니면 단독적으로 영향을 주는지 haplotype 분석 또한 병행되어야 할 것으로 사료된다. 그리고 변이빈도가 낮아서 유전자형 결정에서 제외되었던 missense mutations의 세 부위는 아미노산 염기까지 치환되는 부위로서 LPL 기능에 직접적인 영향을 줄 것으로 예상되며, 앞으로 추가적인 실험을 통해 아미노산 염기변이를 일으키는 세 부위가 LPL의 기능과 표현형질에 어떤 영향을 줄 수 있는지 규명하고, 또한 다른 LPL 주요영역의 SNP 탐색이 정밀하게 이루어져야 할 것으로 사료된다.

IV 요약

생물체의 체내 지방대사에 아주 중요하게 작용하는 LPL의 유전자 구조변이가 한우의 경제형질에 미치는 효과를 구명하고자, 사람 등 포유류에서 주요한 변이부위로 인식되어 온 LPL 유전자의 exon 5~exon 6 영역에서 구조변이를 탐색하였다. 부모가 각기 다른 한우 24두를 이용하여 PCR 증폭산물 1674 bp (exon 5~exon 6)에서 총 8 좌위의 SNP 검출하였는데, 이는 SNP 검출율이 약 1 SNP/210 bp로 기존 SNP 검출율보다 비교적 높은 비율이며, 검출된 SNP들 간에 95% 이상의 높은 연관(linkage) 관계를 보여 비교적 잘 보존되어 있는 영역으로 사료된다. 그리고 검출된 SNP를 PCR-RFLP 기법을 이용하여 표현형질 기록치를 확보한 한우 33차 후대검정축 129두의 유전자형을 결정하였다. 그 결과 intron 5번의 제한효소 *Hae* III로 처리한 823A → G 변이부위가 측정된 모든 도체형질에서 유전자형에 따라 뚜렷한 차이를 보였으며, 특히 근내지방도와 통계적 유의성이 인정되었다($p < 0.05$). 사람 및 생쥐에서 LPL의 촉매활성부위를 암호화하는 exon 5번 및 6번에서의

변이는 LPL의 활성도에 영향을 미치며, 이는 혈액내의 중성지방농도 및 지방대사에 작용한다는 보고가 있다. 이들 변이구조와 95% 이상 강한 연관성을 보이는 intron 5번의 구조변이는 근내지방도와 유의적으로 관찰되었다. 앞으로, intron 5번의 823A → G 변이가 어떤 근거로 근내지방도와 유의적으로 나타났는지 그 근거를 증명할 수 있는 추가적인 실험이 필요한 것으로 사료된다.

V 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업 지원의 일환으로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

VI 인 용 문 헌

- Braun, J. E. and Severson, D. L. 1992. Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem. J.* 287(2):337-347.
- Chilliard, Y. and Robelin, J. 1985. Activity of lipoprotein lipase in different adipose deposits and its relation to adipocyte size in the cow during fattening or early lactation. *Reprod. Nutr. Dev.* 25(1B):287-293.
- Cruz, M. L. and Williamson, D. H. 1992. Refeeding meal-fed rats increases lipoprotein lipase activity and deposition of dietary [¹⁴C] lipid in white adipose and decreases oxidation to ¹⁴CO₂. *Biochem. J.* 285:773-778.
- Eckel, R. H. 1989. Lipoprotein lipase. A Multifunctional Enzyme Relevant to Common Metabolic Diseases. *N. Eng. J. Med.* 320:1060-1068.
- Emmerich, J., Beg, O. U., Peterson, J., Previato, L., Brunzell, J. D., Brewer H. B. and Santamarina-Fojo, S. 1992. Human lipoprotein lipase. Analysis of the catalytic triad by site-directed mutagenesis of Ser-132, Asp-156, and His-241. *J. Biol. Chem.* 267(6):4161-4165.
- Fisher, K. L., FitzGerald, G. A. and Lawn, R. M. 1987. Two polymorphisms in the human lipoprotein lipase (LPL) gene. *Nucleic Acids Res.* 15(18):7657.
- Greenwood, M. R. 1985. The relationship of enzyme activity to feeding behavior in rats: lipoprotein lipase as the metabolic gatekeeper. *Int. J. Obesity.* 1:67-70.
- Havel, R., Shore, V. and Bier, D. 1970. Role of specific peptides of serum lipoproteins in the action of lipoprotein lipase. *Circul.* 41:111-116.
- Hegele, R. A., Nakamura, Y., Emi, M., Lalouel, J. M. and White, R. 1989. A Bgl II RFLP at the lipoprotein lipase gene. *Nucleic Acids Res.* 17(21):8899.
- Heinzmann, C., Ladias, J., Antonarakis, S., Kirchgessner, T., Schotz, M. and Lusi, A. J. 1987. RFLP for the human lipoprotein lipase (LPL) gene: Hind III. *Nucleic Acids Res.* 15:6763.
- Heinzmann, C., Kirchgessner, T., Kwiterovich, P. O., Ladias, J. A., Derby, C., Antonarakis, S. E. and Lusi, A. J. 1991. DNA polymorphism haplotype of the human lipoprotein gene: possible association with HDL level. *Human genet.* 86:578-584.
- Hide, W. A., Chan, L. and Li, W. H. 1992. Structure and evolution of the lipase superfamily. *J. Lipid Res.* 33:167-178.
- Hocquette, J. F., Graulet, B. and Olivecrona, T. 1998. Lipoprotein lipase activity and mRNA levels in bovine tissues. *Comp. Biochem. Physiol. B; Biochem. Mol. Biol.* 121:201-212.
- Holz, B., Huber, R., Paulweber, B., Patsch, J. R. and Sandhofer, F. 1994. Lipoprotein lipase deficiency due to a 3' splice site mutation in intron 6 of the lipoprotein lipase gene. *J. Lipid Res.* 35(12):2161-9.
- Koike, T., Liang, J., Wang, X., Ichikawa, T., Shiomi, M., Liu, G., Sun, H., Kitajima, S., Morimoto, M., Watanabe, T., Yamada, N. and Fan, J. 2004. Overexpression of lipoprotein lipase in transgenic Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits improves hyperlipidemia and obesity. *J. Biol. Chem.* 279(9):7521-7529.
- Kruglyak, L. and Nickerson, D. A. 2001. Variation is the spice of life. *Nat. Genet.* 27(3):234-236.
- Larosa, J. C., Levy, R. I., Herbert, P., Lux, S. E. and Fredrickson, D. S. 1970. A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 41:57.
- Lien, S., Gomez-Raya, L. and Vage, D. I., 1995. A BsmAI polymorphism in the bovine lipoprotein lipase gene. *Anim. Genet.* 26(4):283-284.
- Ma, Y. H., Bruin, T., Tuzgol, S., Wilson, B. I., Roederer, G., Liu, M. S., Davignon, J., Kastelein, J. J., Brunzell, J. D. and Hayden, M. R. 1992. Two missense mutations at the first and second base of codon Asp156 in the proposed catalytic triad of lipoprotein lipase. *In vivo* evidence that aspartic acid 156 is essential for catalysis. *J. Biol. Chem.* 267:1918-1923.

20. Mattu, R. K., Needham, E. W., Morgan, R., Rees, A., Hackshaw, A. K., Stocks, J., Elwood, P. C. and Galton, D. J. 1994. DNA variants at the LPL gene locus associate with angiographically defined severity of atherosclerosis and serum lipoprotein levels in a Welsh population. *Arterioscler. Thromb.* 14(7):1090-1097.
 21. Merkel, M., Eckel, R. H. and Goldberg, I. J. 2002. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J. Lipid Res.* 43(12):1997-2006.
 22. Nickerson, D. A., Taylor, S. L., Weiss, K. M., Clark, A. G., Hutchinson, R. G., Stengard, J., Salomaa, V., Vartiainen, E., Boerwinkle, E. and Sing, C. F. 1998. DNA sequence diversity in a 9.7-kb region of the human lipoprotein lipase gene. *Nat. Genet.* 19(3):233-240.
 23. Ren, M. Q., Wegner, J., Bellmann, O., Brockmann, G. A., Schneider, F., Teuscher, F. and Ender, K. 2002. Comparing mRNA levels of genes encoding leptin, leptin receptor, and lipoprotein lipase between dairy and beef cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23(3):371-381.
 24. Saika, Y., Sakai, N., Takahashi, M., Maruyama, T., Kihara, S., Ouchi, N., Ishigami, M., Hiraoka, H., Nakamura, T., Yamashita, S. and Matsuzawa, Y. 2003. Novel LPL mutation(L303F) found in a patient associated with coronary artery disease and severe systemic atherosclerosis. *Eur. J. Clin. Invest.* 33(3):216-222.
 25. Senda, M., Oka, K., Brown, W. V., Qasba, K. and Furuichi, Y. 1987. Molecular cloning and sequence of a cDNA coding for bovine lipoprotein lipase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84(13):4369-4373.
 26. Simwsolo, R. B., Ong, J. M., Saffari, B. and Kern, P. 1992. Effect of improved diabetes control on the expression of lipoprotein lipase in human adipose tissue. *J. Lipid Res.* 33(1):89-95.
 27. Tank, P. A. and Pomp, D. 1994. PCR-Based *Sau961* Polymorphism in the Bovine Lipoprotein Lipase Gene. *J. Anim. Sci.* 72:3032.
 28. Threadgill, D. W. and Womack, J. E. 1991. Synteny mapping of human chromosome 8 loci in cattle. *Anim. Genet.* 22:117.
 29. Ukkola, O., Tremblay, A. and Bouchard, C. 2002. Lipoprotein lipase polymorphisms and responses to long-term overfeeding. *J. Intern. Med.* 251(5):429-436.
 30. Vohl, M. C., Lamarche, B., Moorjani, S., Prud'homme, D., Nadeau, A., Bouchard, C., Lupien, P. J. and Despres, J. P. 1995. The lipoprotein lipase Hind III polymorphism modulates plasma triglyceride levels in visceral obesity. *Arterioscler. Thromb.* 15:714-720.
 31. Waylan, A. T., Dunn, J. D., Johnson, B. J., Kayser, J. P. and Sissom, E. K. 2004. Effect of flax supplementation and growth promotants on lipoprotein lipase and glycogenin messenger RNA concentrations in finishing cattle. *J. Anim. Sci.* 82(6):1868-1875.
 32. Yang, C. Y., Gu, Z. W., Yang, H. X., Rohde, M. F., Gotto, A. M. and Pownall, H. J. 1989. Structure of bovine milk lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.* 264(28):16822-16827.
- (접수일자 : 2004. 10. 21. / 채택일자 : 2004. 12. 2.)