

한국 재래닭의 Uncoupling Protein 유전자 Exon 3에서의 +1316 T/T 유전자형이 산란율에 미치는 효과 분석

오재돈¹ · 이제현¹ · 홍윤숙¹ · 이성진¹ · 이승규¹ · 공홍식² · 상병돈³ · 최철환³ · 조병욱⁴ · 전광주¹ · 이학교^{1,†}

¹한경대학교 유전정보연구소, ²축산물등급판정소, ³축산연구소, ⁴밀양대학교 동물자원학과

The +1316 T/T Genotype in the Exon 3 of Uncoupling Protein Gene is Associated with Daily Percent Lay in Korean Native Chicken

J. D. Oh¹, J. H. Lee¹, Y. S. Hong¹, S. J. Lee¹, S. G. Lee¹, H. S. Kong²,
B. D. Sang³, C. H. Choi³, B. W. Cho⁴, G. J. Jeon¹ and H. K. Lee^{1,†}

¹Genomic Informatics Center, Hankyong National University, ²Animal Products Grading Service,

³National Livestock Research Institute, RDA, ⁴Department of Animal Science, Miryang National University

ABSTRACT Uncoupling protein(UCP) is expressed exclusively in brown adipose tissue(BAT). It is known to uncouple phosphorylation from oxidation and hence to be involved in energy metabolism and heat production, especially under cold exposure. In the present study, we identified single nucleotide polymorphism(SNP) in exon 3 of avUCP gene in Korean native chicken(KNC) population. It was detected a SNP T+1316C in exon 3 of avUCP gene by sequence analysis in KNC population. For PCR-RFLP analysis of the SNP T+1316C, used by *Afl* III restriction enzyme. The result of PCR-RFLP analysis showed that allele T has two fragments of 255 bp and 86 bp, and allele C has only one fragment of 341 bp. The genotype frequencies were TT type, 0.7875; TC type, 0.1875 and CC type, 0.025; and, the frequencies of allele T and C were 0.881 and 0.119, respectively in KNC population. Next study was conducted to investigate the effect of the SNP in avUCP gene on economic traits in the KNC population. The TT genotype had a significant higher daily percent lay(84.61) than CC genotype($p<0.05$) in KNC population. This study may be useful for genetic studies of avUCP gene and selection on daily percent lay of KNC.

(Key words : uncoupling protein(UCP) gene, Korean native chickens, single nucleotide polymorphism(SNP), egg production)

서 론

Uncoupling protein(UCP)은 갈색 지방세포의 미토콘드리아 내막에 존재하며 uncoupling oxygen을 통해 ATP를 생산한다고 알려져 있으며, 세포내의 과다 에너지를 열로 발산시키는 기능을 가지고 있다. 갈색 지방세포는 세포내 에너지 소비의 조절에 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 알려져 있다(Garlid et al., 1996). 최근 동물의 갈색 지방조직에만 존재하고 있는 UCP와 유사성을 가진 아형(UCP2, UCP3)의 존재가 보고되었다(Fleury et al., 1997; Gimeno et al., 1997; Boss et al., 1997; Vidal-Puig et al., 1997). UCP2와 UCP3는 UCP1과 구조적인 상동성을 보이고 있으며 기능적인 면에서도 유사

성을 보이고 있다. UCP1은 갈색 지방세포에서만 특이적으로 발현하는 반면 UCP2는 갈색 지방세포를 포함한 흰 지방세포, 장, 비장, 간 등 어디에나 존재하고 있으며 (Fleury et al., 1997; Gimeno et al., 1997) UCP3의 경우 근육과 지방세포에서 주로 발현되고 있다(Boss et al., 1997; Vidal-Puig et al., 1997).

새들은 낮은 온도에 노출되었을 때 근육의 떨림 없이 열을 생산함으로써 체온을 조절한다고 알려져 있다(Duchamp et al., 1999). UCP는 특히 추위에 적응해 가는 오리과 수평아리에서 특이적으로 발현이 증가하는 것으로 보고되었다. 그러나 4시간 이상 추위에 노출된 닭의 집단에서 UCP 발현은 유의적이지 않다는 보고도 있다(Raimbault et al.,

[†] To whom correspondence should be addressed : lhkyu@hknu.ac.kr

2001).

인체에서 UCP1 유전자의 발현은 아드레날린을 통한 교감 신경계의 조절을 받고 있다(Cassard et al., 1990; Clement et al., 1996; Bouillaud et al., 2001; Shihara et al., 2001). 여러 보고에서 5'UTR 내 -3826지역의 다형성(A-3826G)이 체중의 증감과 체지방 증체량 등에서 유의적인 변이 효과를 가지고 있음을 연구를 통해 검증하였다(Oppert et al., 1994; Kogure et al., 1998; Bouillaud et al., 2001). 이 다형성은 저칼로리 다이어트를 통한 체중의 감소와도 연관이 있다고 보고된 바 있다(Fumeron et al., 1996). 또한 다른 여러 보고에 따르면 이 지역의 변이는 비만과 비만 관련 질병과도 연관이 있음을 검증하였다(Fogelholm et al., 1998; Pihlajamaki et al., 1998; Hayakawa et al., 1999; Sivenius et al., 2000; Heilbronn et al., 2000; Proenza et al., 2000; Herrmann et al., 2003).

본 연구에서는 UCP 유전자내 exon 3 지역의 염기 서열 분석을 통해 변이 지역을 검출하였다. 검출된 변이 지역의 다형성을 이용하여 한국 재래닭과 외래 품종간의 유전적 구조를 분석하였으며 한국 재래닭의 경제형질에 미치는 변이 효과를 분석하였다.

재료 및 방법

1. 공시축

본 연구에서 이용된 공시재료는 경제형질 관련 성적을 보유한 White Leghorn 40 수, Cornish 40 수, Rhode Island Red 40 수와 한국 재래닭 80 수를 선발 후 5~10mL의 혈액을 EDTA가 함유된 tube에 채혈하였다.

2. Genomic DNA의 분리 및 정제

공시축의 혈액으로부터 DNA의 분리 및 정제는 Genomic DNA Extraction Kit(Bioneer™)으로 지침서에 따라 분리 정제하였고, 분리된 DNA는 TE Buffer(10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA)에 용해하였다.

3. PCR Amplification

닭 UCP gene의 염기서열(GenBank Accession. No. AF433170)을 근거로 하여 primer를 제작하였다(Table 1). PCR (Polymerase Chain Reaction) 반응을 위하여 Template DNA 100 ng, 10 X PCR Buffer(100 mM Tris pH 8.9, 50 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.01 % gelatin, 0.1 % Triton X-100, 10 mg/mL BSA), 10 pmole of each primer, 40 uM of dNTPs and 0.5 unit TaqDNA polymerase (Promega, USA) 및 멸균수를 첨가하여 총 10 μL의 mixture를 준비하여 94°C에서 4분간 denaturation 후 94°C에서 40초, 두 좌위에 대한 annealing 온도 61.3°C에서 40초, 72°C에서 2분간 35회 반응시킨 후 72°C에서 10 분간 final-extension 하였다.

4. UCP Gene 영역의 염기서열 분석

PCR product 5 μL에 ExoSAP-IT (Amersham Biosciences, USA) 1 μL을 첨가하여 총 부피를 6 μL로 하여 37°C에서 30 분, 80°C에서 30분동안 반응시켜 증폭된 산물 이외의 것들을 제거하여 준 다음 E.T terminator dye (Amersham Biosciences, USA)을 제작사의 지침서에 따라 Table 1의 primer와 함께 peltier thermal cycler 200 (MJ Research, USA)을 이용하여 재 증폭 과정을 수행하였다. 전처리 과정을 통해 얻어진 산물을 MegaBace DNA Analysis Systems (Amersham Biosciences, USA)을 이용하여 염기서열을 결정하였다. 실험을 통해 결정된 염기서열은 seqMANII(DNA STAR Inc.) 프로그램을 이용하여 변이 지역 탐색에 활용하였다.

5. PCR-RFLP Genotyping

PCR-PFLP를 위해 제작된 primer를 사용하여 증폭시킨 산물을 다형성 지역인 T+1316C 부위에 특이적으로 반응하는 제한효소인 *Afl* III(A⁺CRYG_T)을 사용하여 개체별 유전자형을 분석하였다.

6. Statistical Analysis

통계분석은 아래의 식을 이용하였으며 SAS(SAS 9.2) 프

Table 1. Primer sequences and positions used for UCP gene analysis

Primer	Sequences	Position	Usage
avUCPe3F	5'-gtagggaccgactacctca-3'	1,097~1,115	PCR & Sequencing
avUCPe3R	5'-ggcatgagtgtagggatg-3'	1,540~1,557	PCR & Sequencing
avUCPe3F2	5'-gtctccaacacgctgcct-3'	1,231~1,248	PCR-RFLP
avUCPe3R2	5'-ggcatgagtgtagggatg-3'	1,540~1,557	PCR-RFLP

로그그램을 사용하여 분석하였다.

$$y_{ijk} = u + b_i + G_j + e_{ijk}$$

위 식에서 y_{ijk} = 관측치

u = 각 형질에 대한 평균 값

b_i = 회귀계수

G_j = 유전자형

e_{ijk} = 임의오차

결 과

닭 UCP gene의 exon 3을 포함하고 있는 primer를 제작하여 PCR 증폭을 실시한 결과 460 bp의 증폭산물을 확인하였고 이 증폭산물은 direct sequencing을 통해 염기서열을 결정하였다. 분석된 염기서열을 기존에 보고된 닭 UCP gene의 염기서열(1316 bp, Gene Bank accession no. AF433170)과 비교하여 상동성을 확인한 결과 1,097 bp~1,556 bp 지역임을 확인하였으며 exon3 지역은 1,255 bp~1,453 bp지역으로 확인되었다.

염기 변이 지역을 조사하기 위해 30수의 재래닭 DNA sample을 direct sequencing 하였다. 그 결과 exon 3 지역의 1316 bp에서 T가 C로 치환이 일어난 개체가 있음을 확인하였다.

PCR-RFLP 분석을 위해 T+1316C 지역에 특이적으로 반응하는 *Afl* III(A^CRYG_T)를 사용하였으며 분석의 편의를 위해 T+1316C 지역을 포함하여 *Afl* III 제한효소 좌위가 유일하게 존재하는 341 bp 크기의 단편을 증폭할 수 있도록 새로운 primer를 제작하여 사용하였다. PCR-RFLP 분석 결과 T allele은 255 bp와 86 bp 단편이 검출되었고 변이가 일어난 C allele은 341 bp 단편이 검출되었다. T와 C allele의 빈도를 분석

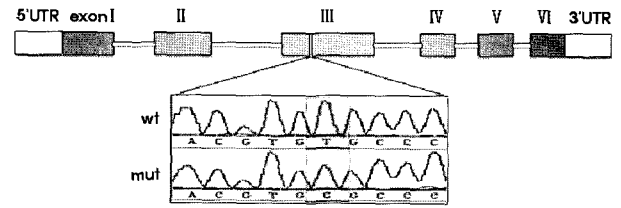


Fig. 1. Identification of sequence polymorphism(T+1316C) on the exon 3(Gene Bank accession no. AF433170) region in av-UCP gene. Leader and trailer sequence in white, coding sequence in gray and intronic sequence in black. wt: wild type, mut: mutant.

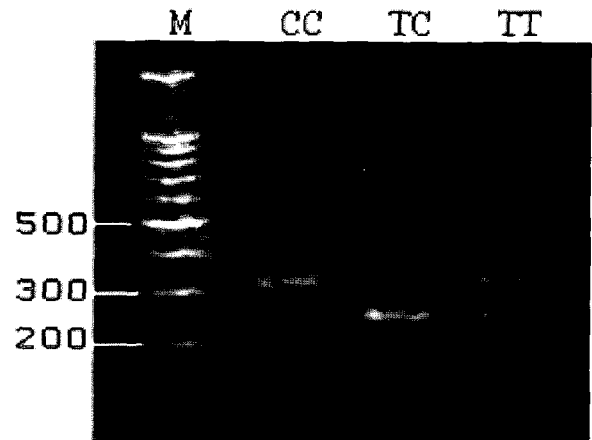


Fig. 2. Restriction fragment polymorphism patterns for exon 3 region in avUCP gene using *Afl* III restriction enzyme. M: size marker, CC, TC, TT: corresponding genotypes.

하기 위해 White Leghorn 40 수, Cornish 40 수, Rhode Island Red 40 수와 한국 재래닭 80 수를 PCR-RFLP 분석한 결과 White Leghorn과 Cornish 품종에서는 C allele을 보유하고 있는 개체는 나타나지 않았으며, Rhode Island Red와 한국 재래닭 품종에서만 C allele이 검출되었다(Table 2). Genotype 빈

Table 2. Genotype frequencies of UCP gene in 4 breeds chickens

Breed	Number of animals	Genotype frequency			Allele frequency	
		TT	TC	CC	T	C
Leghorn	40	1.0	-	-	1.0	-
Cornish	40	1.0	-	-	1.0	-
Rhode Island Red	40	0.95	0.05	-	0.975	0.025
KNC	80	0.7875	0.1875	0.025	0.881	0.119

KNC: Korean native chicken.

Table 3. Effect of UCP gene variation on economic traits of Korean native chicken

Geno-type	Daily percent lay (%)	Egg weight	Body weight
TT	84.61±1.729 ^a	48.88±0.478	1637.27±37.554
TC	79.93±2.962 ^{ab}	47.66±0.819	1614.66±64.318
CC	80.03±2.471 ^b	46.01±0.572	1603.05±49.105

^{ab} Different superscripts within columns are significantly differ, $p < 0.05$.

도를 확인한 결과 Rhode Island Red는 T/T와 T/C가 각각 0.95, 0.05로 검출되었고 C/C는 검출되지 않았다. 반면, 한국재래닭의 경우 T/T, T/C, C/C가 각각 0.7875, 0.1875, 0.025으로 검출되어 한국재래닭의 독특한 유전적 구조를 확인할 수 있었다.

PCR-RFLP 분석을 통해 얻어진 유전자형을 이용하여 경제형질과의 연관성을 분석하였다. 경제형질과 유전자형간의 연관성을 분석한 결과 일당 산란율에서 T/T 유전자형의 84.61과 C/C 유전자형의 80.83 간의 유의적($p < 0.05$) 차이가 있음이 검증하였다(Table 3). 또한 T/T 유전자형을 가진 집단이 비록 통계적 유의성은 나타나지 않았지만 한국재래닭의 난중과 체중에 있어서 가장 높은 성적을 나타내고 있다.

고찰

최근 보고서에 따르면 정상 온도와 추운 온도에 노출시킨 닭의 체중과 증체량을 조사한 결과 추운 온도에 노출된 닭 집단보다 정상 온도에 노출된 닭 집단이 체중과 증체량 모두에서 높게 나타났으며 이들 집단의 UCP gene expression을 분석한 결과 추위에 노출된 집단에서 더욱 높게 발현되었다. 이는 추위에 노출된 닭들이 추위에 순응하기 위하여 체내의 에너지를 이용하여 열로 발산시키기 때문에 나타나는 현상으로 추정된다 (Collin et al., 2003). 또한 닭의 UCP 유전자가 체내의 에너지 대사에 관여하고 있음을 나타내며 이러한 에너지 대사와 관련하여 다른 경제형질과도 연관이 있음을 시사하고 있다고 할 수 있다.

본 연구를 통해 한국재래닭의 UCP 유전자 exon 3 지역내에 존재하는 SNP (single nucleotide polymorphism) T+1316C를 검출하였다. T+1316C 지역의 변이가 일어난 C allele의 발현빈도를 분석한 결과 한국재래닭 집단에서 10% 이상의 다

형성을 보유하고 있어 SNP로서의 가능성을 충분히 지니고 있음을 확인하였다.

PCR-RFLP 분석을 통해 얻어진 유전자형을 이용하여 경제형질과의 연관성을 분석한 결과 일당 산란율에서 T/T 유전자형의 84.61과 C/C 유전자형의 80.83 간의 유의적 ($p < 0.05$) 차이를 보이고 있다(Table 3).

이는 T+1316C 지역의 T allele이 산란율과 관련된 형질들에 있어 C allele 보다 좋은 영향력을 가지고 있음을 추정할 수 있다. 또한 다른 형질들에 있어서 비록 통계적 유의성은 검출되지 않았지만 T/T 유전자형을 보유한 집단의 난중과 체중의 성적이 높게 나타난 것을 볼 때 T allele이 우수한 형질을 나타내는 대사과정에 좋은 영향을 미치고 있는 것으로 추정된다. 검출된 SNP 지역의 C allele의 발현빈도를 외래품종들과 비교한 결과 White Leghorn과 Cornish 품종에서는 일당 산란율 검정에서 가장 낮은 성적을 보여준 C allele은 발견되지 않았으며 Rhode Island Red에서도 0.025의 작은 발현빈도를 보인 반면 한국재래닭에서는 0.119의 높은 발현빈도를 확인할 수 있었다. 이는 한국재래닭 집단은 왜래 품종과는 다른 독특한 유전적 구조를 가지고 있음을 추정할 수 있고 산란율에 관련된 경제형질의 개량 가능성을 내포하고 있다. 인간의 UCP 유전자의 변이가 비만이나 비만과 관련된 질병에 영향을 미친다고 보고되었으며 (Fogelholm et al., 1998; Pihlajamaki et al., 1998; Hayakawa et al., 1999; Sivenius et al., 2000; Heilbronn et al., 2000; Proenza et al., 2000; Herrmann et al., 2003), 비만이 번식 장애와 밀접한 상관관계를 가지고 있음으로 본 연구의 결과는 큰 의미를 시사하고 있다. 본 연구 결과에서 우수한 형질을 가졌다고 제시한 T allele은 향후 한국재래닭의 분자 육종 전략에 관한 연구를 통해 산란율을 개량하는 데 있어 큰 기여를 할 것으로 기대 된다.

적요

Uncoupling protein(UCP)은 갈색 지방세포에서 특이적으로 발현하고 있으며 복잡한 세포의 열 생산 작용에 관여한다고 알려져 있다. 본 연구는 한국재래닭 집단의 UCP 유전자내에 존재하는 SNP를 검출하였다. 한국재래닭 집단의 UCP 유전자 exon 3지역의 염기서열 분석 결과 1316 bp에서 T염기가 C염기로 치환되어짐을 확인하였다. T+1316C 지역의 PCR-RFLP 분석을 위해 제한효소 *Afl* III를 사용하였다. 한국재래닭 집단내 유전자형 빈도는 TT가 0.7875, TC가 0.1875 그리고 CC가 0.025로 검출되었으며 대립유전자의 빈

도는 T가 0.881 그리고 C가 0.119로 나타났다. 또한 검출된 SNP가 경계형질에 미치는 영향을 분석한 결과 한국 재래닭 집단의 T/T 유전자형과 C/C 유전자형에서 일당 산란율에서 통계적으로 유의한 차이가 있음을 확인하였다. 본 연구의 결과는 향후 더 많은 UCP 유전자와 관련된 연구와 한국 재래닭의 육종 전략에 도움이 될 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 지원에 의해 이루어진 것임. 농촌진흥청 바이오그린21사업단 관계자들과 시료를 제공한 축산연구소 관계자들에게 깊은 감사를 드리는 바이다.

인용문헌

- Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, Giacobino JP 1997 Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett* 408:39-42.
- Bouillaud F, Couplan E, Pecqueur C, Ricquier D 2001 Homologues of the uncoupling protein from brown adipose tissue (UCP-1):UCP2, UCP3, BMCP1 and UCP4. *Biochim Biophys Acta* 1:107-119.
- Cassard AM, Bouillaud F, Mattei MG, Hentz E, Raimbault S, Thomas M, Ricquier D 1990 Human uncoupling protein gene : structure, comparison with rat gene, and assignment to the long arm of chromosome 4. *J Cell Biochem* 43:255-264.
- Clement K, Ruiz J, Cassard-Doulcier AM, Bouillaud F, Ricquier D, Basdevant A, Guy-Grand B, Froguel P 1996 Additive effect of A→G (-3826) variant of the uncoupling protein gene and the Trp64Arg mutation of the beta 3-adrenergic receptor gene on weight gain in morbid obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20:1062-1066.
- Collin A, Buyse J, As PV, Darras VM, Malheiros RD, Moraes VM, Reyns GE, Taouis M, Decuypere EA 2003 Cold-induced enhancement of avian uncoupling protein expression, heat production, and triiodothyronine concentrations in broiler chicks. *General and Comparative Endocrinology* 130:70-77.
- Duchamp C, Marmonier F, Denjean F, Lachuer J, Eldershaw TPD, Rouanet JL, Morales A, Meister R, Bénistant C, Roussel D, Barré H 1999 Regulatory, cellular and molecular aspects of avian muscle non-shivering thermogenesis. *Ornis Fenn* 76:151-165.
- Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levy-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Riquier D, Warden CH 1997 Uncoupling protein-2 : a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* 15: 269-272.
- Fogelholm M, Valve R, Kukkonen-Harjula K, Nenonen A, Hakkarainen V, Laakso M, Uusitupa M 1998 Additive effects of the mutations in the beta 3-adrenergic receptor and uncoupling protein-1 genes on weight loss and weight maintenance in Finnish women. *J Clin Endocrinol Metab* 83:4246-4250.
- Fumeron F, Durack-Bown I, Betoulle D, Cassard-Doulcier AM, Tuzet S, Bouillaud F, Melchior JC, Ricquier D, Apfelbaum M 1996 Polymorphisms of uncoupling protein (UCP) and beta 3 adrenoreceptor genes in obese people submitted to a low calorie diet. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20:1051-1054.
- Garlid KD, Orosz DE, Modriansky M, Vassanelli S, Jezek PJ 1996 On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein. *J Biol Chem* 271:2615-2620.
- Gimeno RE, Dembski M, Weng X, Deng N, Shyjan AW, Gimeno CJ, Iris F, Ellis SJ, Woolf EA, Tartaglia LA 1997 Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog. A potential molecular mediator of human thermogenesis. *Diabetes* 46: 900-906.
- Hayakawa T, Nagai Y, Taniguchi M, Yamashita H, Takamura T, Abe T, Nomura G, Kobayashi K 1999 Phenotypic characterization of the beta 3-adrenergic receptor mutation and the uncoupling protein 1 polymorphism in Japanese men. *Metabolism* 48:36-40.
- Heilbronn LK, Kind KL, Pancewicz E, Morris AM, Noakes M, Clifton PM 2000 Association of -3826G variant in uncoupling protein-1 with increased BMI in overweight Australian women. *Diabetologia* 43:242-244.
- Herrmann SM, Wang JG, Staessen E, Kertmen JA, Schmidt-Petersen K, Zidek W, Paul M, Brand E 2003 Uncoupling protein 1 and 3 polymorphisms are associated with waist-

- to-hip ratio. *J Mol Med* 81:327-332.
- Kogure A, Yoshida T, Sakane N, Umekawa T, Takakura Y, Kondo M 1998 Synergic effect of polymorphisms in uncoupling protein 1 and beta 3-adrenergic receptor genes on weight loss in obese Japanese. *Diabetologia* 41:1399.
- Oppert JM, Vohl MC, Chagnon M, Dionne FT, Cassard-Doulier AM, Ricquier D, Perusse L, Bouchard C 1994 DNA polymorphism in the uncoupling protein (UCP) gene and human body fat. *Int J Obes Relat Metab Disord* 18:526-531.
- Pihlajamaki J, Rissanen J, Valve R, Heikkinen S, Karjalainen L, Laakso M 1998 Different regulation of free fatty acid levels and glucose oxidation by the Trp64Arg polymorphism of the beta 3-adrenergic receptor gene and the promoter variant(A-3826G) of the uncoupling protein 1 gene in familial combined hyperlipidemia. *Metabolism* 47:1397-1402.
- Proenza AM, Poissonnet CM, Ozata M, Ozen S, Guran S, Palou A, Strosberg AD 2000 Association of sets of alleles of genes encoding beta 3-adrenoreceptor, uncoupling protein 1 and lipoprotein lipase with increased risk of metabolic complications in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:93-100.
- Raimbault S, Dridi S, Denjean F, Lachuer J, Couplan E, Bouillaud F, Bordas A, Duchamp C, Taouis M, Ricquier D 2001 An coupling protein homologue putatively involved in facultative thermogenesis in birds. *Biochem J* 345:161-179.
- Sivenius K, Valve R, Lindi V, Niskanen L, Laakso M, Uusitupa M 2000 Synergistic effect of polymorphisms of uncoupling protein 1 and beta 3-adrenergic receptor genes on long-term body weight change in Finnish type 2 diabetic and non-diabetic control subjects. *Int J Obes Relat Disord* 24:514-519.
- Sophie LF, Catherine LS, Christine DS, Pierre B 2004 The common -866G/A polymorphism in the promoter of uncoupling protein 2 is associated with increased carbohydrate and decreased lipid oxidation in juvenile obesity. *American Diabetes Association* 53: 235-239.
- Vidal-Puig A, Solanes G, Grujic D, Flier JS, Lowell BB 1997 UCP3: an coupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 235:79-82.