

## 돼지 Phosphatidylinositol Glycan, Class K (PIGK)

### 유전자의 동정과 양적형질과의 연관성 분석

임현태\* · 김재환\* · 최봉환\*\*\* · 이상호\* · 박응우\*\*\* · 김태현\*\*\* · 조인철\*\* ·

오성중\*\*\* · 이정규\* · 전진태\*

경상대학교 응용생명과학부\*, 농촌진흥청 난지농업연구소\*\*, 농촌진흥청 축산연구소\*\*\*

## Characterization of Phosphatidylinositol Glycan, Class K (PIGK) Gene and Analysis of Association with Quantitative Traits in Pigs

H. T. Lim\*, J. H. Kim\*, B. H. Choi\*\*\*, S. H. Lee\*, E. W. Park\*\*\*, T. H. Kim\*\*\*, I. C. Cho\*\*,

S. J. Oh\*\*\*, J. G. Lee\* and J. T. Jeon\*

Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University\*,

National Institute of Subtropical Agriculture, R. D. A.\*\*,

National Livestock Research Institute, R. D. A.\*\*\*

### ABSTRACT

PIGK(phosphatidylinositol glycan, class K) is a subunit of GPI transamidase that cleaves the signal peptide in proproteins and replaces it with GPI. In addition, the structure and synthesis of GPI are critically involved in some of the cellular functions of insulin. Therefore, PIGK would be essential for mammalian development and many specific cellular functions as well as for metabolic activity of insulin associated with GPI. Two types of full-length cDNAs of porcine PIGK were cloned through RT-PCR and RACE experiments. One is thought to be a normal form(consist of 395 amino acids) and the other is considered as an alternative spliced form(consist of 371 amino acids) which contains additional 63 bps in intron 7. Since a stop codon was contained within the insertion, the spliced form has a shorter coding sequence than that of normal form. A missense mutation (T314I) in exon 6 was detected and used for genotyping to estimate association with the growth and fat deposition traits for 545 F<sub>2</sub> animals(Korean native boars × Landrace). From the PCR-RFLP analysis using *Hpy*CH4III, *CT* genotype showed highly significant relationship( $P < 0.01$ ) with carcass fat contents.

(Key words : PIGK, Missense mutation, Association, Fat deposition traits)

### I. 서 론

돼지의 주요 경제형질 중 근내지방도(intra-muscular fat content)는 유전육종 분야에서 돼지의 육질과 관련하여 매우 중요한 인자로서, 근내지방도가 높을수록 품질이 좋아지고 육질이

부드러워지며, 육색이나 보수력이 향상되게 된다. 그러나 돼지 육질의 확인은 약 30주령에서 도체 후 확인되기 때문에 시간적, 경제적으로 비효율적이다. 이로 인하여 높은 근내지방도를 나타내는 돼지를 조기에 선발할 수 있는 분자적 marker가 절실히 필요한 실정이다.

Corresponding author : J. T. Jeon, Department of Animal Science, Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Gyeongnam, Korea. Tel : 055-751-5516. Fax : 055-756-7171, E-mail : jtjeon@nongae.gsnu.ac.kr.

양적형질좌위(Quantitative trait loci, QTL)는 경제적으로 중요한 형질에 영향을 미치는 유전자들의 genome상의 위치를 말한다. 소, 돼지를 포함한 여러 가축들을 대상으로 QTL의 위치를 파악하고 그 내부에 존재하는 유전자를 분석함으로써 여러 경제형질과의 연관성을 분석하기 위한 많은 연구가 진행되어 왔다(Bidanel 등, 2002; Brym 등, 2004; Li 등, 2004; Rohrer와 Keele, 1998). 현재 돼지의 18개의 상염색체 전체 genome을 대상으로 양적형질좌위 분석이 전반적으로 진행되었으며(Knott 등, 1998; Nagamine 등, 2003; Ovilo 등, 2002; Wang 등, 1998), 성염색체인 X chromosome 내에 근내지방도 및 등지방두께에 영향을 줄 수 있는 양적형질좌위가 존재한다고 보고되었다(Gaboreau 등, 2004; Harlizius 등, 2000). de Koning 등(1999)과 Ovilo 등(2002)은 돼지 6번 염색체가 근내지방도와 연관성이 높다는 것을 증명하였으며, Grindflex 등(2001)은 marker *SW1823*과 *S0003* 사이에 근내지방도를 위한 유전자가 존재할 것이라고 보고하였다. 지방산화과정과 관련된 *FABP3* 유전자가 근내지방도와 등지방 등 돼지의 육질에 영향을 주는 것으로 보고되어 있는데(Gerbens 등, 2001; Urban 등, 2002), 이 유전자는 6번 염색체 내 marker *SW1823*과 *S0003* 사이에 위치하고 있다(Gerbens 등, 2000).

우리는 앞서 somatic cell hybrid panel(Yerle 등, 1996)과 radiation hybrid panel(Yerle 등, 1998)를 이용하여 돼지 *PIGK* 유전자의 염색체상 위치를 파악하였다(Park 등, 2005). 그 결과 *PIGK* 유전자는 돼지 6번 염색체 q32 위치에 존재하는 marker *SW1647*과 가장 가깝게 위치하고 있었으며, 이 위치는 근내지방도와 연관성이 높은 marker *SW1823*과 *S0003* 사이임을 확인하였다. 기존에 보고된 QTL 분석을 토대로 *PIGK* 유전자는 근내지방도와 연관된 유전자들이 존재할 것으로 추정하고 있는 위치에 있음을 알 수 있다. GPI(glycosylphosphatidylinositol) - 결합 단백질(GPI-anchored protein)들은 진핵생물에서 발견되는 세포표면항체, 체외효소(ectoenzyme), 혹은 세포-부착 분자들로서, GPI는 인슐린의 일부 세포성 작용과 연관되어 있다(Englund,

1993; McConville과 Ferguson, 1993; Lazar 등, 1994). *PIGK*(phosphatidylinositol glycan, class K)는 GPI transamidase의 소단위체로서, 이 효소에 의해 소포체에서 transamidation 과정을 거쳐 GPI - 고정 단백질이 합성되는데 있어서 중요한 역할을 담당한다(Kinoshita 등, 1995; Lazar 등, 1994; Nagamune 등, 2003).

이상에서 언급한 *PIGK* 유전자의 genome상의 위치 및 기능들을 토대로 이 유전자는 등지방층두께, 도체지방 및 근내지방 함량과 같은 지방축적형질과 연관된 후보유전자임을 추론할 수 있었다. 따라서 본 연구는 돼지 *PIGK* 유전자의 전장 cDNA 확보, 염기서열 분석 및 품종별 염기변이파악 등을 통하여 유전자를 동정하고, 그에 따라 밝혀진 유전자형과 성장 및 지방축적 형질과의 연관성 조사를 위하여 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시 재료

한국재래돼지(Korean native pig, KNP)와 Yorkshire의 근육 및 장기조직에서 total RNA 분리하여 cDNA를 합성에 사용하였다. 품종별 유전자형의 빈도를 확인하기 위한 KNP, Landrace, Yorkshire, Duroc 각 20두의 DNA는 제주난지 농업연구소에서 제공받아 사용하였고, 유전자형과 경제형질과의 연관성을 추정하기 위해 KNP와 Landrace의 교잡으로 생산된 F<sub>2</sub> 545두의 DNA를 축산연구소에서 제공받아 분석에 사용하였다.

### 2. total RNA, cDNA 합성 및 *PIGK* 증폭

Trizol(Gibco BRI, USA)로 total RNA를 추출하였으며, cDNA 합성은 Smart™ Race cDNA Amplification Kit(Clontech, USA)를 이용해서 1 µg의 total RNA를 첨가하여 수행하였다. 돼지 *PIGK*의 전체 coding sequence(CDS) 부분을 증폭하기 위해 GenBank database의 사람(NM\_005482)과 마우스(NM\_025662)의 CDS 서열을 정렬시

Table 1. Primer sequences used for amplifying of porcine *PIGK* in this study

Analysis methods	Primer names	Primer sequences	
CDS analysis	PIGK-F	5'-AGTCACATCGTTCTGATGCTTGCAGATGATATG-3'	
	PIGK-R	5'-GACATCAACTTTTATCCACGGTGTAGTCTTCC-3'	
RACE	5' RACE	RACE-5'-1	5'-TCTCTCATACATGGATGCTCCTTGACAAGTGTC-3'
		RACE-5'-2	5'-CCACATCATCTCCATACACATTTAGTTCATAT-3'
	3' RACE	RACE-3'-1	5'-AGCTGAAAGATTGGCATCCTCCTGGAGGAT-3'
		RACE-3'-2	5'-CGTATGGAATCAAGCACATG-3'
PCR-RFLP	PIGK-RFLP-F	5'-AGTTTCAGGTGTGCCCAAA-3'	
	PIGK-RFLP-R	5'-ATCTGGCTGCAAACCTTATAGTCACT-3'	
63bp insertion	PIGK-IN-F	5'-CAGCCATGAGAAAGCTGGAATGGATGAGGA-3'	
	PIGK-IN-R	5'-GACATCAACTTTTATCCACGGTGTAGTCTTCC-3'	

킨 후 이를 토대로 한 쌍의 primer를 제작하였다(Table 1).

PCR 반응은 template DNA 5  $\mu$ l, 10 pmol primer 2  $\mu$ l, Taq polymerase 2 unit(TaKaRa, Japan), 10  $\times$  buffer 5  $\mu$ l, 0.2 mM dNTP 4  $\mu$ l, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> 3  $\mu$ l의 조성에 증류수를 첨가하여 최종 부피를 50  $\mu$ l로 반응하였으며, PCR 조건은 94  $^{\circ}$ C에서 5분간 denaturation을 실시 후 94  $^{\circ}$ C에서 1분, 64  $^{\circ}$ C에서 1분, 72  $^{\circ}$ C에서 1분을 1 cycle로 하여 35회 반복하였다. 그 후 72  $^{\circ}$ C에서 5분간 extension 후 4  $^{\circ}$ C에서 종료하였다.

### 3. 돼지 *PIGK*의 cloning 및 염기서열 분석

PCR product는 TOPO TA Cloning Kit(Invitrogen, USA)를 사용해서 ligation을 실시한 후 Top 10 F'competent cell 내부로 형질전환 시켰다. Plasmid 추출은 Minipreps DNA Purification System(Promega, USA)를 이용하였으며, DNA sequencing은 Applied Biosystems 3700 DNA sequencer(PE Applied Biosystems, USA)를 이용하였다. 결정된 KNP와 Yorkshire의 염기서열은 Clustal X version 1.83 (Thompson 등, 1997)으로 다중비교하여 염기변이를 확인하였다.

### 4. 5' 및 3' rapid amplification of cDNA ends(RACE)

5' 및 3' untranslated region(UTR) 서열을 포함한 전장 mRNA 서열을 확보하기 위해 Smart<sup>TM</sup> Race cDNA Amplification Kit(Clontech, USA)를 이용하여 5' 및 3' RACE를 수행하였으며, 이를 위해서 분석된 염기서열을 기초로 primer를 제작하였다(Table 1).

1차 RACE-PCR 반응은 합성된 cDNA 5  $\mu$ l, Taq polymerase 2.5 unit(TaKaRa, Japan), 10  $\times$  buffer 5  $\mu$ l, 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, F primer(RACE-5'-1) 또는 R primer(RACE-3'-1) 각각 2  $\mu$ l, UPM(10 $\times$ ) 5  $\mu$ l 그리고 증류수 28.7  $\mu$ l를 첨가하여 최종 50  $\mu$ l로 반응하였다. 2차 RACE-PCR 반응은 1차 PCR product 3  $\mu$ l에 Taq polymerase 2.5 unit(TaKaRa, Japan), 10  $\times$  buffer 5  $\mu$ l, 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, F primer(RACE-3'-2) 혹은 R primer(RACE-5'-2) 각각 2  $\mu$ l, NUP 5  $\mu$ l 그리고 증류수 30.7  $\mu$ l를 첨가하여 최종 50  $\mu$ l로 수행하였다. 1차 및 2차 PCR 반응조건은 동일하게 수행하였다. PCR 조건은 94  $^{\circ}$ C에서 5분간 denaturation을 실시한 후 94  $^{\circ}$ C에서 1분, 58  $^{\circ}$ C에서 1분, 72  $^{\circ}$ C에서 1분을 1 cycle로 하여 40회 반복하였다. 그 후 72  $^{\circ}$ C에서 5분간 extension 후 4  $^{\circ}$ C에서 종료하였다. 증폭된 PCR product는 QIAEX II Gel Extraction Kit(Quagen, USA)를 사용하여 정제하였으며, DNA sequencing은 Applied Biosystems 3700 DNA sequencer(PE Applied Biosystems, USA)를 사용하여 direct

sequencing을 수행하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 5. PCR-RFLP 분석

PCR-RFLP 방법에 의해 품종별 및 F<sub>2</sub> 개체들의 유전자형을 분석하기 위해 한 쌍의 primer를 제작하였고(Table 1), PCR 반응은 *Taq* polymerase 1.5 unit(TaKaRa, Japan), 10 × buffer 2.5 μl, 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 pmol primer 각각 1.5 μl, genomic DNA 2 μl 그리고 증류수 13.7 μl를 첨가하여 최종 25 μl로 반응하였으며, PCR 반응조건은 94 °C에서 5분간 변성시킨 후 94 °C에서 30초, 56 °C에서 45초, 72 °C에서 1분을 1 cycle로 하여 40회 반복하였다. 그 후 72 °C에서 5분간 신장시킨 후 4 °C에서 종료하였다. 증폭된 PCR product는 *Hpy*CH4III를 처리하여 5시간 동안 37 °C에서 반응시키고 4% agarose gel을 제작하여 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 확인하였다.

#### 6. 통계 분석

RFLP 분석에 의한 유전자형과 성장형질 및 지방관련 형질들과의 연관성은 SAS 통계 프로그램(SAS, 1996)의 GLM 분석을 하였으며, 성장형질에 대한 분석은 Model I 식을 이용하여 분석 하였으며, 지방축적형질에 대한 분석은 Model II 식을 이용하여 분석하였다.

$$\text{Model I} : Y_{ijk} = \mu_i + S_{ij} + T_{ik} + e_{ijk}$$

$$\text{Model II} : Y_{ijk} = \mu_i + S_{ij} + T_{ik} + bx + e_{ijk}$$

여기서,  $Y_{ijk}$  : i 번째 형질의 j 번째 성의 k 번째 유전자형에 대한 phenotype

$\mu_i$  : i 번째 형질의 전체 평균

$S_j$  : i 번째 형질의 j 번째 성별의 효과

$T_k$  : i 번째 형질의 k 번째 genotype의 효과

$bx$  : 30주령 체중에 대한 회귀계수

$e_{ijk}$  : 임의오차

를 나타낸다.

본 연구는 돼지 *PIGK*의 CDS를 포함한 mRNA 서열을 분석하여 염기변이를 확인하고, 여기서 나타나는 염기변이의 유전자형과 근내지방도를 포함한 경제형질과의 연관성을 분석하기 위해 실시하였다.

돼지 *PIGK*의 염기서열이 본 연구 이전에 보고되어 있지 않았기 때문에 돼지의 CDS 부분을 확보하기 위하여 GenBank database에 보고된 사람(NM\_005482)과 마우스(NM\_025662)의 CDS를 정렬시킨 후 상호 보존적인 지역의 염기서열을 토대로 primer를 제작하였으며(Table 1), PCR 및 유전자 클로닝 기법을 이용하여 KNP와 Yorkshire의 CDS를 분석하였다. 또한 5' 및 3' UTR의 서열을 확인하기 위하여 앞서 밝혀낸 CDS를 이용하여 primer를 제작하고 PCR-RACE를 실시하여 전체 mRNA 서열을 완성하였다(Table 1과 Fig. 1).

KNP와 Yorkshire의 *PIGK* 유전자 서열을 현재 알려져 있는 사람(NM\_005482), 마우스(NM\_025662)의 서열과 다중염기정렬한 결과 두 품종에서 서로 다른 형태의 서열이 확인되었다. 첫 번째 형태는 CDS의 크기가 사람 및 마우스의 서열과 동일한 1118 bp로 나타난 반면 두 번째 형태는 개시코돈으로부터 1071 번째 염기와 1072 번째 염기 사이에 63 bp가 삽입되어 있었다(Fig. 1A, 1B). 이를 더 정확히 확인하기 위해서 삽입서열을 포함되도록 primer를 제작하고(Table 1), KNP와 Yorkshire의 간과 4개의 근육 조직의 cDNA를 주형으로 PCR를 수행한 후 전기영동을 실시하였다. 그 결과 사용한 모든 조직에서 288 bp의 절편이 확인되었으며, 63 bp가 첨가된 361 bp의 절편은 간을 제외한 근육조직에서만 확인할 수 있었다(Fig. 1C). *PIGK* 유전자의 염기 삽입은 사람에서는 밝혀져 있지 않지만 마우스(NM\_178016)에서는 141 bp의 염기 삽입이 보고되어 있다. 그러나 본 연구결과에서 나타난 삽입위치와는 다른 지역에서 나타났다. 염기 삽입이 되지 않았을 경우 개시코돈과 종료코돈을 포함한 전체 CDS는 1188 bp, 삽입되었을 경우 1116 bp로 확인되었다(Fig. 1). 본

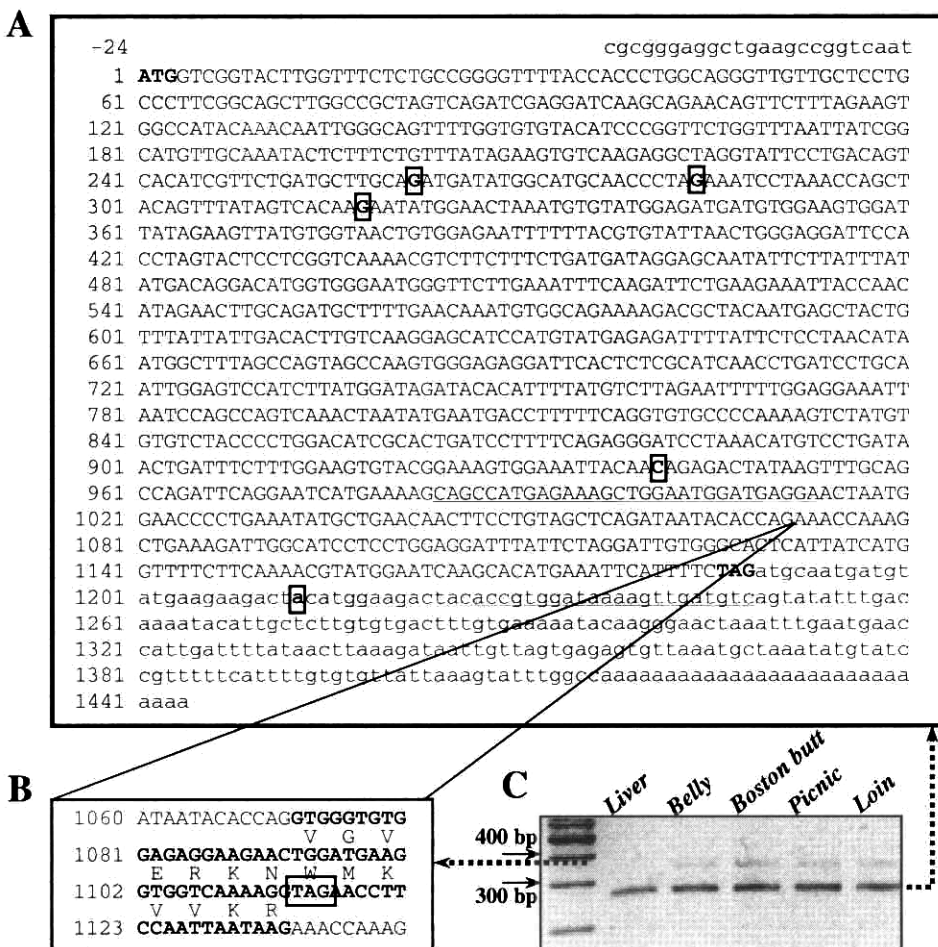


Fig. 1. Nucleotide sequences of porcine *PIGK* mRNA and the information of 63 bps insertion. Nucleotide numbers located at the left margin indicated the length from start codon A, mRNA sequence of normal form. The bold and letters indicated mutation points, and the start and stop codons are showed as bold letters. B, alternative splicing form and insertion site. 63 bp insertion sequences was shown bold letters. The bold and boxed letters indicated a stop codon in the inserted sequence. C, electrophoresis patterns between normal and alternative splicing forms using five tissues from each of KNP and Yorkshire breeds. Primer sequences used for RT-PCR were indicated by underlined letters.

자료에는 명시하지 않았지만, 염기 삽입이 존재하지 않을 경우 사람과 돼지의 염기 유사성은 91%로 사람과 마우스(82%)에 비해서 상대적으로 높게 나타났다. 또한 KNP와 Yorkshire의 mRNA 서열을 정렬한 결과 개시코돈으로부터 262 번째, 284 번째, 318 번째, 941 번째, 1213 번째(염기 삽입인 경우 1276 번째) 등 5개의 염

기변이가 확인되었다(Fig. 1).

분석된 염기 서열을 이용하여 아미노산으로 변화시킨 후 사람(NP\_005473), 마우스(NP\_079938), 효모(NP\_010618) 그리고 멕시코리슈만 편모충(CAB55340)의 아미노산 서열과 비교하였다(Fig. 2.) 염기 삽입이 없는 경우 사람, 마우스, 돼지에서 전체 395개의 아미노산으로 동일하게 나

H. S	MAVTDLSLRAATVFLATVLLSFGSVAASHIEDQAEQFFRSG--HTNNWAVLVCTSRFWFNRYRHVANTLSV	68
S. S	.VG.WF.C.GF.T.GL.P.L.Q.....	68
M. M	..APCF.TLRVAT..ALA...L.S.G.....	68
S. C	-----M.I.MH.PLL..YI.LLPLSGANNTD.AHEVIAT--.....S.....M.V..M	61
L. M	.RT.AYVMTSP.RCIATA.IV.AFLVLVLTAAAAASAPLGAT.KGQS.....I.SS..YL.....T..A.TM	70
H. S	YRSVKRLGIPDSHIVLMLADDMACNPRNPKPATVFSHK-----NMELNVYGDDVEVDYRSYEVTVEN	130
S. S	.....Y.....V.....	130
M. M	.....A.....	130
S. C	..T.....Q.I...S.V...S.LF.GS..NN-----DHAIIDL...S.....G.....	123
L. M	.HLLRQH..D.D..L.F.S.SF..D...VY..EI..QPPGAHDADGRASM.L..CSAQ...AGSD.D.RR	140
H. S	FLRVLTGRIPPSTPRSKRLLSDDRSNLIYMTGHGGNGFLKFQDSEETNIELADAFEQMWQKRRYNELL	200
S. S	.....V.....	200
M. M	.....V.....	200
S. C	.I.L..D.WTEDH.K...T.EN...F.....DD.....A...ASEDI...Q..YE.K..N.IF	193
L. M	.LS..Q..YDEN..PTR.....NT...I..VA...AKSYF...T.FLSSSDISETLTM.H.Q...GRVV	210
H. S	FIIDTCQGASMYERFYSPNIMALASSQVGEDSLSHQPDPAIGVHLMDRYTFYVLEFLEEINPASQTNMND	270
S. S	.....	270
M. M	.....	270
S. C	.M.....ANT..SK.....L.VG..EMD.S.Y..HS.VE...AVI..F.Y.C.D...Q.DKN.TLTLQ.	263
L. M	.LA...HAIALC.HVEA..VVC..A.DAESE.Y.C.Y.EQL.T.MVS---.WMN.MYLLL.G---.SCSN	274
H. S	LFQVCPKSLCVSTPGHRTDLFQRDPKNVLIITDFFGSVRKVEIIT-----ETIKLQDSE	324
S. S	.....P.....H.....S..P..G	324
M. M	.....E.IS..W..Q	324
S. C	..DSFTFEKIH.HV.V...D.N.SE.....AN.QN.IPLDSKPLSVSHYHHYKDHID.AQYELNNN	333
L. M	PLTRRIGDDA..VLHQSWYN.NYH.YR.EASRNRSKPAHRDAVN-----DPTA.R-EWI	328
H. S	IME---SSYKEDQMDEKLEMEPLKYAEQLPVAQIIHQKP--KLKDWHPGGFILGLWALIIMVFFKTYGIK	389
S. S	..K---.HEKAG...E.....	389
M. M	VVD---.S...GTA.ER.G.....PR.....	389
S. C	VLDLALET.RKNNQSS.IEKKI.DIKSTS.LDVIDSDNECFFTSFQKSATT..A.IVT.LWFMLRGNTA.	403
L. M	VAD-----FVCG.VSAAVPVDVR.DLE-----	350
H. S	HMKFIF--	395
S. S	.....--	395
M. M	.....--	395
S. C	ATYDLYTN	411
L. M	-----	350

Fig. 2. An alignment of *PIGK* amino acid sequences among *Sus scrofa*(this study), *Homo sapiens* (NP\_005473), *Mus musculus*(NP\_079938), *Saccharomyces cerevisiae*(NP\_010618), and *Leishmania mexicana*(CAB55340). A dash indicates a deletion point, and a dot denotes sequence identity to human.

타났으며, 아미노산 유사성은 사람과는 0.93 %, 마우스와는 0.89 %로 마우스보다는 사람과 더 유사하게 나타났다. 반면에 효모와는 42 %, 멕시코리슈만 편모충과는 26 %로 상대적으로 낮은 아미노산 유사성을 나타내었다. 이 결과는 고등생물에서 하등생물로 갈수록 단백질의 구조가 변형을 초래하며, 그에 따른 단백질의 기능적인 변화를 추정할 수 있다. 앞서 확인된 5개의 염기변이 중 941 번째 염기변이(T314I)에 의해서 Thr(Threonine)에서 Ile(Isoleucine)으로 변환됨을 확인하였으나, 사람을 포함한 나머지 종에서는 나타나지 않았다(Fig. 2). KNP와 Yorkshire

의 서열에서 나타난 63 bp 염기 삽입을 포함하는 전체 CDS의 아미노산 변환 결과 첨가된 63 bp 내부의 종료코돈(TAG)에 의해서 번역이 완성되었으며, 이 결과로 인해 24개가 줄어든 전체 371개의 아미노산으로 구성됨을 확인하였다 (Fig. 1).

사람, 마우스, 돼지, 효모, 멕시코리슈만 편모충의 *PIGK*의 아미노산 서열을 토대로 Dayhoff 등(1978)의 PAM model로부터 산출된 유전적 거리지수를 기초로 하여 UPGMA tree를 작성하였다(Fig. 3). 돼지(*Sus scrofa*)와 사람(*Homo sapiens*)이 하나의 그룹을 형성하면서 가장 가까

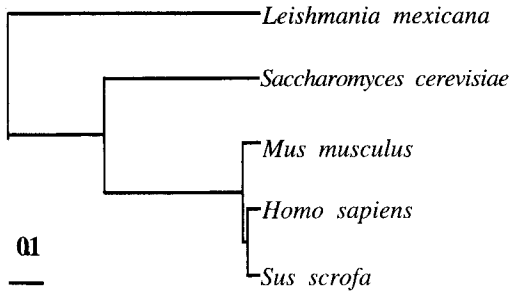


Fig. 3. An UPGMA tree constructed from the amino acid sequences among five species analyzed previously. The tree was generated using PAM(point accepted mutation) model of amino acid mutation by Dayhoff et al.(1978). H S, S S, M M, S C and L M represent *Homo sapiens*, *Sus scrofa*, *Mus musculus*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Leishmania mexicana*, respectively.

은 유연관계를 나타내었으며, 마우스(*Mus musculus*), 효모(*Saccharomyces cerevisiae*), 멕시코리슈만 편모충(*Leishmania mexicana*) 순으로 먼 유연관계를 보여주고 있다.

5개의 염기변이 중 아미노산 변환의 원인이 되는 961 번째 변이를 대상으로 품종별 유전자형의 빈도를 확인하였다. 변이부위를 중심으로 primer를 제작하였으며(Table 1) KNP, Landrace, Yorkshire, Duroc 4 품종 각각 5 두를 대상으로 *HpyCH4III* 제한효소를 이용하여 RFLP 분석을 수행하였다(Fig. 4와 Table 2). 그 결과 KNP의 경우 5 두 모두 *TT* 유전자형만 나타났으며 Landrace, Duroc은 *CC*와 *CT* 유전

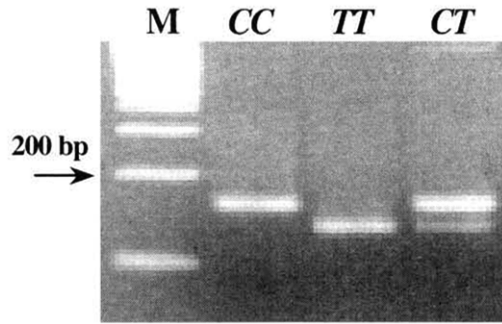


Fig. 4. Three genotypes generated from PCR-RFLP analysis with *HpyCH4III* restriction enzyme. M, size marker ; CC, CT and TT, three genotypes from the PCR-RFLP analysis.

자형이, Yorkshire는 3가지 유전자형이 모두 나타나는 것을 확인하였다.

이와 같은 결과를 이용하여 KNP와 Landrace의 교잡으로 생산된 F<sub>2</sub> 545 두를 대상으로 유전자형을 확인하였으며, 그 결과와 성장형질 및 도체형질과의 연관성 분석을 실시하였다(Table 3). 도체지방에서 *CT* 유전자형이 *TT* 유전자형에 대해 고도의 유의차(P<0.01)를 보이며, 높은 상관관계를 보였으나 다른 성장형질과는 신뢰적 유의차를 보이지 않았다. 그러나 Zhao 등(2003)에 의하면 타 품종간 교잡에 의한 후보유전자 분석인 경우 연관불평형(linkage disequilibrium, LD)은 상대적으로 염색체 상의 긴 지역으로 확장되는 반면 동일한 품종집단인 경우 상대적으로 짧아진다고 보고하였다. 본 연구는 KNP와 Landrace의 교잡에 의해 생산된 F<sub>2</sub> 집단을 대상

Table 2. Distributions and allele frequencies of *HpyCH4III* polymorphism in exon 6 of porcine *PIGK* among breeds

Breeds	Genotypes			Frequencies of C allele	
	Total	CC	CT		TT
KNP	5	0	0	5	0
Landrace	5	3	2	0	0.8
Duroc	5	2	3	0	0.7
Yorkshire	5	1	1	3	0.3

Table 3. Least square means for growth and fat depot traits with three genotypes in *PIGK* exon 6 among F<sub>2</sub> animals

Traits <sup>1)</sup>	Genotypes			Significance <sup>2)</sup>
	CC	CT	TT	
BW0	1.23 ± 0.02	1.26 ± 0.01	1.24 ± 0.02	n.s.
BW3	4.81 ± 0.13	4.86 ± 0.07	4.87 ± 0.11	n.s.
BW5	7.01 ± 0.38	7.40 ± 0.22	7.03 ± 0.33	n.s.
BW12	25.81 ± 0.61	25.75 ± 0.35	25.13 ± 0.52	n.s.
BW30	90.70 ± 1.68	91.38 ± 0.94	88.97 ± 1.40	n.s.
BF(mm)	23.41 ± 0.62	24.26 ± 0.35	23.36 ± 0.52	n.s.
IMF(%)	2.18 ± 0.14	2.00 ± 0.08	2.05 ± 0.12	n.s.
CF(kg)	11.00 ± 0.35 <sup>ab</sup>	11.30 ± 0.20 <sup>a</sup>	10.42 ± 0.31 <sup>b</sup>	**

<sup>1)</sup> BW0, BW3, BW5, BW12 and BW30 are body weight at birth, 3, 5, 12 and 30 weeks of age, respectively. BF, CF and IMF represent backfat thickness, carcass fat and intramuscular fat content, respectively.

<sup>2)</sup> \*\* superscripts indicate means are different at the 1% significance thresholds and n.s. means non significance. Mean ± S.E, values in the same raw with different letter are significantly different.

으로 이루어졌기 때문에 *PIGK* 자체에 의한 유의적 효과라고 단정내릴 수는 없다. 그러므로 더욱 정확하고 신뢰성 높은 결과를 유도하기 위해서는 순수 KNP 집단을 대상으로 돼지 *PIGK*의 LD 분석이 추가적으로 이루어져야 할 필요성이 있다고 사료된다.

본 연구는 돼지 *PIGK* 유전자의 염색체 상의 위치와 세포 내에서 작용하는 기능적인 면을 토대로 CDS를 포함한 mRNA 서열을 분석하였고, 유전자 내에서 나타나는 염기변이와 경계형질과의 연관성을 분석 실시하였다. 그 결과 도체지방과는 고도의 유의성을 나타내었으나, 다른 형질들과는 신뢰적 유의차를 보이지 않았다. 또한 마우스에서 보고된 염기 삽입과는 달리 돼지에서 63 bp 염기 삽입에 의해서 아미노산 구성이 달라지는 현상을 발견하였다. 이로 인해서 *PIGK*의 구조에 영향을 줌으로서 발생하는 단백질의 기능적인 측면을 연구할 필요가 있다고 사료된다.

#### IV. 요약

*PIGK*(phosphatidylinositol glycan, class K)는

transamidase의 소단위체로서, 이 효소에 의해서 C-말단 신호서열을 제거하고 GPI에 고정시키는 transamidation 과정에서 중요한 역할을 담당한다. 또한 GPI의 구조와 합성은 인슐린의 세포성 역할과 중요한 연관성을 가지고 있다. 결국 *PIGK*는 포유류의 발생과 여러 특이적인 세포성 기능뿐만 아니라 GPI와 연관된 인슐린의 대사활성에 필수적이다. full-length cDNAs 서열 분석 결과 두 가지 형태의 서열을 확인하였다. 일반적인 형태의 *PIGK* 전체서열은 1188 bp이고 395개의 아미노산으로 구성되어 있다. 또 다른 형태는 alternative splicing에 의해 intron 7번에서 특이하게 63 bp의 삽입현상을 보이며, 삽입서열 내부에서 형성되는 종료코돈(TAG)에 의해 번역이 완성되어 전체서열이 1116 bp이며 아미노산 서열은 24개가 줄어든 371개로 구성되어 있음을 확인하였다. F<sub>2</sub> 545 두(KNP × Landrace)를 대상으로 exon 6번에서 발견된 missence mutation (T314I)의 PCR-RFLP 분석을 통하여 성장 및 지방관련 형질들과의 연관성 분석을 수행하였다. 그 결과 CT 유전자형이 도체지방에서 TT 유전자형에 대해 고도의 유의차(P < 0.01)를 보였다.



## V. 사 사

본 연구는 농촌진흥청 ‘바이오그린 21사업’의 지원에 의해 이루어진 연구결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

## VI. 인 용 문 헌

1. Bidanel, J. P., Milan, D., Iannuccelli, N., Amigues, Y., Boscher, M. Y., Bourgeois, F., Caritez, J. C., Gruand, J., Le Roy, P., Lagant, H., Quintanilla, R., Renard, C., Gellin, J., Ollivier, L. and Chevalet, C. 2002. Detection of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Genet. Sel. Evol.* 33:289-309.
2. Brym, P., Kaminski, S. and Ruse, A. 2004. New SSCP polymorphism within bovine *STAT5A* gene and its associations with milk performance traits in Black-and-White and Jersey cattle. *J. Appl. Genet.* 45:445-452.
3. de Koning, D. J., Janss, L. L. G., Rattink, A. P., van Oers, P. A. M., de Vries, B. J., Groenen, M. A. M., van der Poel, J. J., de Groot, P. N., Brascamp, E. W. and van Arendonk, J. A. M. 1999. Detection of quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs. *Genetics* 152:1679-1690.
4. Englund, P. T. 1993. The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu. Rev. Biochem.* 62:121-138.
5. Gaboreanu, A. M., Grapes, L., Ramos, A. M., Kim, J. J. and Rothschild, M. F. 2004. Characterization of an X-chromosome PCR-RFLP marker associated with fat deposition and growth in the pig. *Animal Genetics* 35:401-402.
6. Gerbens, F., de Koning, D. J., Harder, F. L., Meuwissen, T. H. E., Janss, L. L. G., Groenen, M. A. M., Veerkamp, J. H., Van Arendonk, J. A. M. and te Pas, M. F. W. 2000. The effect of adipocyte and heart fatty acid-binding protein genes on intramuscular fat and backfat content in Meishan crossbred pigs. *J. Anim. Sci.* 78:552-559.
7. Gerbens, F., Verburg, F. J., Van Moerkerk, H. T. B., Engel, B., Buist, W., Veerkamp, J. H. and te Pas, M. F. W. 2001. Association of heart and adipocyte fatty acid-binding protein gene expression with intramuscular fat content in pigs. *J. Anim. Sci.* 79:347-354.
8. Grindflek, E., Szyda, J., Liu, Z. and Lien, S. 2001. Detection of quantitative trait loci for meat quality in a commercial slaughter pig cross. *Mamm. Genome* 12:299-304.
9. Harlizius, B., Rattink, A. P., de Koning, D. J., Faivre, M., Joosten, R. G., van Arendonk, J. A. M. and Groenen, M. A. M. 2000. The X chromosome harbors quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs. *Mamm. Genome* 11:800-802.
10. Knott, S. A., Marklund, L., Hakey, C. S., Andersson, K., Davies, W., Ellegren, H., Fredholm, M., Hasson, I., Hoyheim, B., Lundström, K., Möller, M. and Adersson, L. 1998. Multiple marker mapping of quantitative trait loci in a cross between outbred wild boar and Large White pigs. *Genetics* 149:1069-1080.
11. Kinoshita, T., Inoue, N. and Takeda, J. 1995. Defective glycosyl phosphatidylinositol anchor synthesis and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Adv. Immunol.* 60:57-103.
12. Lazar, D. F., Knez, J. J., Medof, M. E., Cuatrecasas, P. and Saltiel, A. R. 1994. Stimulation of glycogen synthesis by insulin human erythroleukemia cells requires the synthesis of glycosylphosphatidylinositol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9665-9669.
13. Li, C., Basarab, J., Snelling, W. M., Benkel, B., Kneeland, J., Murdoch, B., Hansen, C. and Moore, S. S. 2004. Identification and fine mapping of quantitative trait loci for backfat on bovine chromosomes 2, 5, 6, 19, 21, and 23 in a commercial line of *Bos taurus*. *J. Anim. Sci.* 82:967-972.
14. McConville, M. J. and Ferguson, M. A. J. 1993. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem. J.* 294:305-324.
15. Nagamine, Y., Haley, C. S., Sewalem, A. and Visscher, P. M. 2003. Quantitative trait loci variation for growth and obesity between and within lines of pigs (*Sus scrofa*). *Genetics* 164:629-635.
16. Nagamune, K., Ohishi, K., Ashida, H., Hong, Y., Hino, J., Kangawa, K., Inoue, N. and Kinoshita, T. 2003. GPI transamidase of *Trypanosoma brucei* has two previously uncharacterized (trypanosomatid transamidase 1 and 2) and three common subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:10682-10687.
17. Ovilo, C., Oliver, A., Noguera, J. L., Clop, A., Barragan, C., Varona, L., Rodriguez, C., Miguel, T., Sanchez, A., Perez-Enciso, M. and Sillio, L. 2002. Test for positional candidate genes for body composition on pig chromosome 6. *Genet. Sel. Evol.* 34:465-479.
18. Park, E. W., Kim, J. H., Lim, H. T., Seo, B. Y., Cho, I. C., Lee, J. G., Oh, S. J., Cheong, I. C.,

- Lee, J. H. and Jeon, J. T. 2005. Assignment of phosphatidylinositol glycan, class K (*PIGK*) gene to porcine chromosome 6q32 by somatic cell and radiation hybrid panel mapping. *Cytogenet. Genome Res.* 108:363G.
19. Rohrer, G. A. and Keele, J. W. 1998. Identification of Quantitative Trait Loci Affecting Carcass Composition in Swine: I. Fat Deposition Traits. *J. Anim. Sci.* 76:2247-2254.
20. SAS. 1996. SAS/STAT guide for personal computers @6.08. SAS inst., Cary, NC., USA.
21. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25:4876-4882.
22. Urban, T., Mikolasova, R., Kuciel, J., Ernst, M. and Ingr, I. 2002. A study of the H-FABP genotypes with fat and meat production of pigs. *J. Appl. Genet.* 43:505-509.
23. Wang, L., Yu, T. P., Tuggle, C. K., Liu, H. C. and Rothschild, M. F. 1998. A directed search for quantitative trait loci on chromosome 4 and 7 in pigs. *J. Anim. Sci.* 76:2560-2567.
24. Yerle, M., Echard, G., Robic, A., Mairal, A., Dubut-Fontana, C., Riquet, J., Pinton, P., Milan, D., Lahbib-Mansais, Y. and Gellin, J. 1996. A somatic cell hybrid panel for pig regional gene mapping characterized by molecular cytogenetics. *Cytogenet. Cell Genet.* 73:194-202.
25. Yerle, M., Pinton, P., Robic, A., Alfonso, A., Palvadeau, Y., Delcros, C., Hawken, R., Alexander, L., Beattie, C., Schook, L., Milan, D. and Gellin, J. 1998. Construction of a whole-genome radiation hybrid panel for high-resolution gene mapping in pigs. *Cytogenet. Cell Genet.* 82:182-188.
26. Zhao, H., Rothschild, M. F., Fernando, R. L. and Dekkers, J. C. M. 2003. Tests of candidate genes in breed cross populations for QTL mapping in livestock. *Mamm. Genome.* 14:472-482.
- (접수일자 : 2005. 1. 21. / 채택일자 : 2005. 4. 12.)