

Haptoglobin SNP의 돼지 일당 증체량에 관한 효과

김명직¹, 정호영^{2,*}, 조규호³, 전기준³, 김진형⁴

¹농촌진흥청 축산과학원 응용생명공학과, ²축산과학원 동물유전체과, ³축산과학원 양돈과, ⁴축산과학원 축산물이용과

Effects of SNPs in Haptoglobin on Average Daily Gain in Pig

Myung-Jick Kim¹, Ho-Young Chung^{2,*}, Kyu-Ho Cho³, Gi-Jun Jeon³ and Jin-Hyung Kim⁴

¹Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

²Animal Genomics and Bioinformatics Division, National Institutes of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

³Swine Science Division, National Institutes of Animal Science, RDA, Seungwhan 330-801, Korea

⁴Animal Products Processing Division, National Institutes of Animal Science, RDA, Suwon 330-801, Korea

ABSTRACT

In order to provide information of genetic variants for Haptoglobin (Hp) gene, which may be related to weight traits in pig, a total of 235 animals from National Institute of Animal Science (NIAS) were screened with 3 primers. The primer sequences were selected using the porcine cDNA sequences based on NM_214000, and the exon boundaries were estimated. Genetic variants were observed using direct sequencing analysis, and there were 9 SNPs detected at nucleotide positions 503 (A/G), 509 (A/G), 709 (C/T), 734 (C/A), 742 (G/A), 769 (A/G), 840 (C/T), 876 (C/T) and 882 (C/A). All the SNPs were located in coding regions, and mutations caused amino acid changes at nucleotide positions 503, 509, 734, 742 and 769. Allele frequencies of SNPs were estimated for all segments. The SNPs at nucleotide position 509 ($p < 0.0001$) and 734 ($p < 0.05$) were significantly associated with average daily gain, but no significance was observed with other SNPs. From the results, the identified SNPs may be a useful candidate marker for the porcine weight gain traits.

(Key words : average daily gain, Haptoglobin, SNPs)

서 론

Haptoglobin(Hp)은 free hemoglobin-binding 단백질로서 고 밀도 lipoprotein 형태로 혈액 내에 다량으로 존재하는 양성급성반응 단백질(positive acute phase protein)로 알려져 있으며, apolipoprotein AV(APOA4)의 발현에 관여한다(Ponsuksili *et al.*, 2002). 인간을 포함한 모든 동물의 건강 상태를 표시하는 간접 표지인 Hp의 물리화학적 성질은 알려져 있으나, 생체 내에서의 유전적 혹은 생리적 기능은 완전히 밝혀져 있지 않다. 한편, 돼지에서 Hp는 감염과 병리학적 손상에 대한 급성 반응을 지표이며 잠재적으로 림프구 기능을 억제하거나 helper T-cells을 조절하는 면역 억제자로 활동하는 것으로 보고되어 있다(Eckersall 등, 1996; Sadrzadeh and Bozorgmehr, 2004). 아울러, 여러 연구에서 Hp는 성장 단계별로 발현량에 차이가 있으며, 특히 출생 직후에는 충분한 발현량을 보이지 않으나 이유 단계 후에는 증가하는 것으로 보고되어 있다(Alsemgeest 등, 1995; Orro 등, 2006). 이러한 현상으로 생시부터 성장 단계별로 Hp의 농도가 증가하며 체중의 증가에 관여하는 것으로 알려져

있으며, Sauerwein 등(2005) 및 Eurell 등(1992)은 Hp 농도가 돼지의 체중 증가의 훌륭한 지표라고 주장했다. 게다가 Orro 등(2008)은 통계적 유의성이 Hp 농도와 체중 증가에 있으며, 특히 생후 7주부터는 유전적인 요인에 의해 Hp의 발현량에 차이가 나타나며 이러한 발현량의 차이는 체중 변화와 밀접한 관계를 보이므로 선발 지표로의 사용 가능성이 제기되고 있다(Sauerwein 등, 2005; Hiss and Sauerwein, 2003; Eurell 등, 1992). 그러므로 Hp의 발현에 관여하는 coding 염기서열 부분에 단일 염기치환(SNP)을 검출하고 체중과의 관련성을 규명한다면, 향후 증체량(일당 증체량)에 관한 high weight gain 혹은 low weight gain group으로 선발할 수 있는 지표로 돼지 산업에서의 활용이 가능할 것이다.

현재까지 인류에서 Haptoglobin(Hp)은 2개의 class가 존재하며, 대표적으로 3개의 유전자형(Hp1-1, Hp2-1, and Hp2-2)을 Bowman and Kurosky(1982)가 최초로 보고하였다. 하지만 돼지에서는 단편적인 SNP들이 3' UTR(Maeda, 1986), exon 5(Ponsuksili 등, 2002) 및 haplotypes(Cox 등, 2007)가 보고되어 있으나 Hp 유전자 coding 지역 전체에 대한 연구는 진행되어 있지

* Correspondence : E-mail : chung133@rda.go.kr

않다. 따라서, 본 연구에서는 Hp coding 지역에 대한 SNP를 검출하고 유전적 변이체들의 체중에 대한 관련성을 규명하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물

축산과학원에서 사육중인 2개의 상업돈 집단(72두 2원교잡 Landrace and Yorkshire 및 163두 3원교잡 Landrace, Yorkshire 및 Duroc) 235두를 2005년부터 2007년 사이에 출생한 개체들을 공시하였다. 약 생후 30일경에 이유를 실시하였으며, 사료는 NRC 영양소 요구량에 따라 급여하였다. 개시 체중(30 kg)과 종료체중(90 kg)을 계속하여 일당 증체량을 산출하였으며, 전 두수에 대해 혈액 10 ml를 채취하고 genomic DNA를 추출하여 유전자 분석에 사용하였다. Table 1에서와 같이 개시 체중 및 종료체중의 평균은 각각 30.99 및 96.81 kg이었고, 일당 증체량은 평균 1.01 kg이며 최소 및 최대값은 각각 0.62 및 1.82였다.

2. Primer Design

Hp genomic DNA에 대한 염기서열이 보고되어 있지 않기에 primer design은 GenBank에 등록된 염기서열(NM_214000, 1,182 bp)을 사용하였으며, coding 지역을 대상으로 3쌍의 primer를 제작하였다(Table 2).

3. Polymerase Chain Reaction

Template DNA는 genomic DNA 1 ul를 사용하여 10 × PCR reaction buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂)와 2.5 mM dNTPs, 10 pM primer, 1 U *Taq* DNA polymerase(Core BioSystem, Korea)를 사용하여 총 반응액 25 ul로 PTC-240 DNA Engine Tetrad 2 Cyclor(MJ research, USA)에서 실시하였다. 합성 반응은 94°C에서 45초 동안 denaturation시킨 후, 51~57°C에서 1분 annealing, 그리고 72°C에서 1.5분 extension 반응 순서로 35회 반복한 후 72°C에서 6분간

마지막 합성 단계(final extension)를 수행하였다. PCR이 끝난 후 3 ul의 PCR 산물을 1% agarose gel 전기영동상에서 UV를 통하여 증폭 여부를 확인하였다.

4. 유전변이체 검출

PCR 증폭 산물을 확인 후 direct sequencing 방법을 사용하여 ABI 3730XL Genetic Analyzer으로 염기서열을 분석하였다. 모든 개체에 대한 염기서열을 alignment 프로그램(DNAstar version 6.0)으로 SNP를 분석하였으며, 실험 오류를 줄이기 위해 전 개체에 대한 PCR 및 sequencing을 2회 반복하였다.

5. 통계 분석

검출된 SNP들의 체중에 대한 효과를 검증하기 위하여 분산분석을 실시하였으며, 시험 개시 체중(30 kg) 및 종료 체중(90 kg)으로부터 일당 증체량을 산출하였다. 분석 모형에는 일당 증체량에 대한 고정 효과로 각각의 SNP genotype과 공변량으로 개체의 나이를 포함시켜 SAS GLM procedure를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 단일염기변이(SNP)

각 primer에 대한 최적 annealing 온도는 gradient PCR을 통해 57°C에서 결정되었으며, Table 2에서 보는 것과 같이 Hp01 좌위를 제외하고 증폭이 이루어졌으며, 평균 증폭 산물은 500 bp였다. 총 9곳에서 SNP들이 Hp02와 Hp03 좌위에서 검출되었으며 direct sequencing은 SNP 지역에 N 혹은 4가지 염기로 써(A, T, G 및 C)나타났으나, 일반적으로 direct sequencing 시의 실험적인 오류(base calling errors)를 제거하기 위해 염기서열 결정을 2회 반복을 통해 성공적으로 돌연변이들을 확정하였다(Table 3). 염기변이가 나타난 곳은 GenBank에 등록된 염기서열(NM_214000)을 기준으로 503(A/G), 509(A/G), 709(C/T), 734(C/A), 742(G/A), 769(A/G), 840(C/T), 876(C/T) 및 882(C/A)에서 검출되었다. 9개 SNP에 대한 대립 유전자 빈도를 산출하였으며, 3개 SNP(503, 509 및 734)에서는 한 쪽의 대립유전자가 90% 이상을 나타냈다. 각 SNP에 대한 chi-square 검정을 하였으며, 전반적으로 추정치들을 얻을 수 있었으며, 이는 본 연구에 공시된 돼지 집단들에 사용된 품종 수와 대립 유전자 빈도의 차이에 기인하는 것으로 사료된다. 하지만 집단간의 유의적인 유전자 빈도의 차이는 나타나지 않았다. 아울러, 염기서열변이에 따라 coding 지역에서의 아미노산 서열이 변화는 4곳(237, 280, 292 및 294)을 제외한 곳에서 검출되었다. 인간에서 보고된 여러 SNP(Gueye 등, 2006; Saeed 등, 2007; Maeda 등, 1986; Oliviero 등, 1985)들과 달리 돼지에서는 2002년 Ponsuk-sili 등이 exon 5번 지역에 624 bp에서 C/T SNP를 확인하였으

Table 1. Basic statistics for estimation of average daily gain (ADG)

Trait	N	Mean	Standard deviation	Minimum	Maximum
ONW ¹	235	30.99	5.79	14.50	45.00
OFW ²	235	96.81	8.75	76.30	125.50
ADG	235	1.01	0.15	0.62	1.82

¹ On test weight.

² Off test weight.

Table 2. Primer sequences and size of products for Haptoglobin (Hp)

Seg-ment	Sequence ¹	Position		Product size (bp)
		Start	End	
HP01F	CTGTCGTCGCCCT CCTGCTCTG	17	38	NA ²
HP01R	AATCACCTTCTCA ATCTCCACCTC	511	534	
HP02F	AGAATCTCCGCTT GGGTCAT	428	447	500
HP02R	GGTGTCATCATCC TTGTCGTG	907	927	
HP03F	TTATGTGAATGTG GGGCTTGTGG	636	658	506
HP03R	GCGATGTGGGGCT GGAACC	1,123	1,141	

¹ The sequences were selected based on NM_214000 (1,182 bp) for pig Hp gene.

² NA : not available.

나 본 연구에서는 검출되지 않았다. 검출된 9곳의 SNP는 모두 coding 지역에 위치하는 것으로 아미노산 서열 변화는 유전적 구조 변이를 초래하므로 표현형적 차이를 유발시키는 매우 중요한 유전 정보이며 Hp에 대한 본 연구의 SNP들은 돼지에서 최초의 보고로 여겨진다. 아울러, 돼지의 haptoglobin 은 염색체 6번 S0035(18.1cM)과 S0087(37.7cM) 표지인자 사이에 위치한다(Ponsuksili 등, 2002).

2. 연관 분석

많은 연구자들에 의해 Hp는 기능적으로 hemoglobin(Hb)과 결합하며 Hb로 유도되어 산화가 진행되는 조직의 파괴를 예방하는 주된 기능을 가지고 있다(Asleh 등, 2005). 그리고 이러한 Hp의 항산화 작용은 hemoglobin으로부터 iron 방출을 예방하는 능력에 좌우된다. 때문에 Hp는 Asleh 등(2005) 및 Sauerwein 등(2005)이 보고한 것과 같이 oxidative stress와 관련이 있으며, 외부적인 stress나 감염이 없는 건강한 상태를 유지하는 것은 그만큼 Hp concentration이 적게 유지되므로 안정한 상태로 돼지의 생리를 활성화 하고 결국 증체로 연관되는 순환고리를 가지고 있다. 따라서, 위에 언급한 것과 같이 Hp 농도와 증체간에는 inverse relationship이 존재하며, Alsemgeest 등(1995), Orro 등(2007)과 더불어 Eurell 등 (1992)은 Hp 농도는 돼지의 체중 증가에 대한 지표라고 보고했으며, 이들은 또

Table 3. SNP allele frequencies, locations of nucleotide and amino acids change in the polymorphic segments for Haptoglobin (Hp) gene

Seg-ment	Nu- cleotide position ¹	Allele	Fre- quency	Chi- square	Amino acid		
					Change	Loca- tion	
Hp02	503	A G	0.909 0.091	69.19	K	R	168
Hp02	509	A G	0.900 0.100	28.66	Q	R	170
Hp02	709	C T	0.898 0.102	46.14	L	L	237
Hp03	734	A C	0.085 0.915	74.43	A	D	245
Hp03	742	G A	0.368 0.632	139.80	E	K	248
Hp03	769	A G	0.164 0.836	52.65	S	G	257
Hp03	840	C T	0.136 0.864	28.59	F	F	280
Hp03	876	C T	0.117 0.883	46.33	C	C	292
Hp03	882	A C	0.102 0.898	92.90	G	G	294

¹ The nucleotide positions were based on the haptoglobin gene sequence from GenBank (accession number of NM_214000).

한 Hp 농도의 유전적 변이는 이유 후 돼지를 high weight gain 혹은 low weight gain group으로 분류시킬 수 있으며, 결과적으로 Hp의 능력에 의해 증체가 결정된다고 보고하고 있다. 즉, 개체별 Hp 농도가 다르며, 유전적인 차이점이 존재한다는 것이다. 이에 유전적 변이체를 검출하고자 본 연구가 진행되었다. 인간에서는 Hp의 유전적 변이체(299, 아미노산변이 D~G)를 검출하였으며, 주로 면역 계통의 질병과 관련 있는 것으로 보고하고 있다(Papp 등, 2007, 2008, Conway 등, 2007). 아울러 coding 지역에서의 유전적 변이체를 찾는 작업은 매우 가치 있는 연구이다. 하지만 돼지에서는 유전적 변이체를 이용한 면역 및 증체와 관련된 연구가 없었으며, 본 연구가 돼지 Hp에 관한 9곳의 SNP에 대한 최초 보고이다. 본 연구에서 검출된 SNP들을 돼지에서 중요한 형질인 일당 증체량과 연관 분석을 한 결과, Table 4에서 보는 것과 같이 돼지 집단에 대해 Hp SNP의 고도의 통계적 유의성이 SNP 509($p < 0.0001$) 및 734($p < 0.05$) 에서 인정되었으며, SNP에 의한 아미노산 서열 변화를 관찰하

Table 4. Least squares means and standard errors of porcine average dairy gain (ADG) by SNPs for commercial cross-breed pig population

Posi- tion	Geno- type	N	ADG (kg)	Posi- tion	Geno- type	N	ADG (kg)
			P=0.2738				P=0.0906
503	AA	209	0.98±0.01	769	AA	32	0.95±0.02
	AG	9	0.92±0.05		AG	12	0.93±0.03
	GG	17	1.02±0.03		GG	188	0.99±0.01
			P=0.0001				P=0.2237
509	AA	206	1.01±0.01 ^b	840	CC	14	0.92±0.04
	AG	11	0.72±0.03 ^a		CT	36	0.99±0.02
	GG	18	0.96±0.02 ^b		TT	185	0.98±0.01
			P=0.1219				P=0.5577
709	CC	199	0.98±0.01	876	CC	14	1.02±0.03
	CT	24	0.93±0.03		CT	27	0.98±0.02
	TT	12	1.02±0.04		TT	194	0.98±0.01
			P=0.0427				P=0.9907
734	CC	12	0.98±0.04 ^a	882	AA	16	0.98±0.03
	CA	16	0.98±0.03 ^a		CA	16	0.98±0.03
	AA	207	0.87±0.01 ^b		CC	203	0.98±0.01
			P=0.5488				
742	AA	136	0.98±0.01				
	AG	25	0.97±0.02				
	GG	74	1.02±0.03				

Different letters mean significances of least squares mean differences.

였다. 증체의 효과에 대해서는 509에서 AA 혹은 GG형이 AG 이형 접합체보다 월등히 우수한 것으로 나타났으며, 이는 A 혹은 G 대립유전자의 접합을 통한 이형 접합체보다 동형 접합체를 생산하는 것이 일당 증체량을 개선하는데 획기적으로 기여할 것으로 본다. 아울러 734에서는 미세한 통계적 유의성이 나타났으며 C 대립유전자를 소유한 개체들이 A 대립유전자를 소유한 개체들보다 다소 일당 증체량이 큰 것으로 나타났다. 물론 인간의 유전변이인 299 bp에서와 같이 질병과 밀접한 연관을 가진 변이체로서 본 연구의 SNP 509에서의 유전변이는 일당 증체량에 지대한 영향을 미치고 있는 것으로 사료된다. 또한, 많은 연구자들이 제기한 것과 같이 Hp 농도가 증체에 대한 지표로서의 이용성과 더불어 본 연구의 유전적인 변이 또한 지표로서 활용 가능성을 보여주고 있다. 즉, 본 연구에서 확인된 SNP 509는 상업용 돼지의 육종과 선발에 있어서 중요한 일당 증체량에 대한 선발 지표로 활용이 가능할 것으로 판단된다. 결론적으로 본 연구에서 검출된 Hp SNP들은 새로운 유전적 정보를 제공하고 있으며, 향후 증체와 관련한 연구에 매

우 유익한 정보를 제공하고 있다.

결론

본 연구는 체중 변화에 관련 있는 Haptoglobin(Hp) 유전자를 대상으로 유전적 변이체를 총 235두의 개체를 이용하여 단일염기서열변이(SNP)를 탐색하였다. 총 3개의 primer를 이용하여 축산과학원 양돈과에서 사육중인 2원 및 3원 교잡종 돼지를 사용하였다. Primer 제작은 Hp 유전자에 대한 genomic 염기서열이 밝혀지지 않았기 때문에 mRNA 정보를 이용하였으며, GenBank에서 NM_214000를 사용하였다. 총 9종의 단일염기서열변이가 발견되었으며, 염기서열분석법으로 염기서열 변이를 확인하였다[503(A/G), 509(A/G), 709(C/T), 734(C/A), 742(G/A), 769(A/G), 840(C/T), 876(C/T), 및 882(C/A)]. 본 연구에서 탐색된 모든 변이는 coding 지역에서 나타났으며, 돌연변이체에 의한 아미노산의 변화가 5개 SNP들에서(503, 509, 734, 742, 및 769) 검출되었다. SNP에 대한 대립유전자의 빈도를 추정하였다. SNP 509($p<0.0001$) 및 734($p<0.05$)에서 일당 증체량에 대한 고도의 통계적 유의성이 관찰되었으나 다른 SNP에서는 유의하지 않았다. 본 결과를 통해 탐색된 SNP는 아마도 돼지에서 일당 증체량과 관련하여 개체 선발에 유의한 표지인자로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Alsemgeest SP, Jonker FH, Taverne MA, Kalsbeek HC, Wensing T and Gruys E. 1995. Serum amyloid-A (SAA) and haptoglobin (Hp) plasma concentrations in newborn calves. *Theriogenology* 43:381-387.
- Asleh R, Guetta J, Kalet-Litman S, Miller-Lotan R and Levy AP. 2005. Haptoglobin genotype- and diabetes-dependent differences in iron-mediated oxidative stress *in vitro* and *in vivo*. *Circ. Res.* 96:435-441.
- Bowman BH and Kurosky A. 1982. Haptoglobin: the evolutionary product of duplication, unequal crossing over, and point mutation. *Adv. Hum. Genet.* 12:189-261.
- Conway BR, Savage DA, Brady HR and Maxwell AP. 2007. Association between haptoglobin gene variants and diabetic nephropathy: haptoglobin polymorphism in nephropathy susceptibility. *Nephron. Exp. Nephrol.* 105:75-79.
- Cox SE, Doherty C, Atkinson SH, Nweneka CV, Fulford AJ, Ghattas H, Rockett KA, Kwiatkowski DP and Prentice AM. 2007. Haplotype Association between Haptoglobin (Hp2) and Hp Promoter SNP (A-61C) May Explain Previous Controversy of Haptoglobin and Malaria Protection. *PLoS. ONE.*

- 4:e362.
- Eckersall PD, Saini PK and McComb C. 1996. The acute phase response of acid soluble glycoprotein, alpha (1)-acid glycoprotein, ceruloplasmin, haptoglobin and C-reactive protein, in the pig. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 51:377-385.
- Eurell TE, Bane DP, Hall WF and Schaeffer DJ. 1992. Serum haptoglobin concentration as an indicator of weight gain in pigs. *Can. J. Vet. Res.* 56:6-9.
- Gueye PM, Glasser N, Ferard G and Lessinger JM. 2006. Influence of human haptoglobin polymorphism on oxidative stress induced by free hemoglobin on red blood cells. *Clin. Chem. Lab. Med.* 44:542-547.
- Hiss S and Sauerwein H. 2003. Influence of dietary ss-glucan on growth performance, lymphocyte proliferation, specific immune response and haptoglobin plasma concentrations in pigs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl).* 87:2-11.
- Maeda N, McEvoy SM, Harris HF, Huisman TH and Smithies O. 1986. Polymorphisms in the human haptoglobin gene cluster: chromosomes with multiple haptoglobin-related (Hpr) genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:7395-7399.
- NRC. 1985. *Nutrient Requirements of Sheep.* 6th Ed. National Academy Press, Washington, D.C.
- Oliviero S, DeMarchi M, Bensi G, Rauegi G and Carbonara AO. 1985. A new restriction fragment length polymorphism in the haptoglobin gene region. *Hum. Genet.* 70:66-70.
- Orro T, Nieminen M, Tamminen T, Sukura A, Sankari S and Soveri T. 2006. Temporal changes in concentrations of serum amyloid-A and haptoglobin and their associations with weight gain in neonatal reindeer calves. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 29:79-88.
- Orro T, Jacobsen S, Lepage JP, Niewold T, Alasuutari S and Soveri T. 2008. Temporal changes in serum concentrations of acute phase proteins in newborn dairy calves. *Vet. J.* 176:182-187.
- Papp M, Foldi I, Nemes E, Udvardy M, Harsfalvi J, Altörjay I, Mate I, Dinya T, Varvolgyi C, Barta Z, Veres G, Lakatos PL, Tumpek J, Toth L, Szathmari E, Kapitany A, Gyevtvai A and Korponay-Szabo IR. 2008. Haptoglobin polymorphism: a novel genetic risk factor for celiac disease development and its clinical manifestations. *Clin. Chem.* 54:697-704.
- Papp M, Lakatos PL, Hungarian Palatka K, Fold I, Udvardy M, Harsfalvi J, Tornai I, Vitalis Z, Dinya T, Kovacs A, Molnar T, Demeter P, Papp J, Lakatos L and Altörjay I. 2007. Haptoglobin polymorphisms are associated with Crohn's disease, disease behavior, and extraintestinal manifestations in Hungarian patients. *Dig. Dis. Sci.* 52:1279-1284.
- Ponsuksili S, Schellander K and Wimmers K. 2002. Isolation, polymorphism identification and linkage mapping of the porcine haptoglobin locus. *Animal Genetics* 33:324-325.
- Saeed SA, Ahmad N and Ahmed S. 2007. Dual inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase by human haptoglobin: Its polymorphism and relation to hemoglobin binding. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 353:915-920.
- Sadrzadeh SM and Bozorgmehr J. 2004. Haptoglobin phenotypes in health and disorders. *Am. J. Clin. Pathol.* 121:97-104.
- Sauerwein H, Schmitz S and Hiss S. 2005. The acute phase protein haptoglobin and its relation to oxidative status in piglets undergoing weaning-induced stress. *Redox. Rep.* 10:295-302.