

Association of a Single Nucleotide Polymorphism with Economic Traits in Porcine Uncoupling Protein 3 Gene

Jae-Don Oh, Kun-Woo Lee, Il-Jung Jung, Gwang-Joo Jeon, Hak-Kyo Lee and Hong-Sik Kong*

Genomic Informatics Center, Hankyong National University, Ansong 456-749, Korea

Received September 14, 2010 / Accepted December 11, 2010

Uncoupling protein (UCP) 3 has a number of proposed roles in the regulation of fatty acid metabolism. A number of polymorphisms in the human UCP3 gene have been identified, and the correlation with obesity related phenotypes evaluated. The objective of this study was to identify SNP in porcine UCP3 gene and to investigate the effect of the SNP on economic traits. The sequencing analysis method was used to identify nucleotide polymorphisms at position 1405 bp (Genebank accession No : AY739704) in porcine UCP3 gene. The SNP (G150R), located in the exon 3, changed the amino acid to glycine (GGG) from arginine (AGG). This G150R showed three genotypes - GG, GR and RR - by digestion with the restriction enzyme *Sma* I using the PCR-RFLP method. The G150R showed significant effects only on back fat ($P < 0.05$). Animals with the genotype GG had significantly higher back fat thickness (1.358 cm) than animals with the genotype GR (1.288 cm, $P < 0.05$) and RR (1.286 cm, $P < 0.05$). However, the genotypes had no significant association with ADG and days to 90kg. According to results of this study, a G allele of the G150R was found to have a significant effect on back fat thickness. It will be possible to use SNP markers on selected pigs to improve backfat thickness, an important economic trait.

Key words : Uncoupling protein 3 (UCP3), SNP, backfat thickness, pig

서 론

에너지의 항상성은 음식물의 섭취, 에너지의 소비, 지방질의 대사와 당의 대사에 의해 유지가 된다. 또한 비만 또는 관련 질병에 크게 영향을 미치고 있으며 여러 유전자들의 복합적인 상호작용에 의해 일어나게 된다[13]. 그 중 Uncoupling protein (UCP) 3 유전자는 갈색지방세포의 미토콘드리아 내막에 존재하며 탈공역 산소(uncoupling oxygen)를 통해 ATP를 생산하는 것으로 알려져 있다. 이는 세포 내의 과다 에너지를 열로 발산시키는 기능을 하고 있다. UCP1은 갈색지방세포에서만 특이적으로 발현하는 반면 UCP2는 갈색지방세포를 포함한 흰지방세포, 장, 비장, 간 등 어디에나 존재하고 있으며 UCP3의 경우 근육과 지방세포에서 주로 발현되고 있다[4]. 근육은 몸 전체의 40%를 차지하고 있으며 에너지의 항상성 유지와 산화작용 및 열의 발산에 있어 중요한 역할을 하고 있다[9,12]. UCP3는 미토콘드리아에서 지속적인 지방산의 산화작용에 관여하고 있고 비만에 영향을 미치고 있음이 여러 논문을 통해 보고되었다[2,3,7,8,11,16,17]. 이러한 이유로 UCP3 유전자는 에너지의 균형과 몸무게의 증감에 매우 중요한 역할을 하고 있는 것으로 추정되고 있다.

Urhammer등[14]은 인간의 UCP3 유전자내의 인트론 지역

에서의 변이를 보고하였으며 두 개의 silent mutation (Y99Y, Y200Y)과 엑손3 변이역에 위치한 missense mutation (G84S)을 보고하였다. Walder 등[15]의 보고에 따르면 Y99Y와 Y210Y 변이와 비만과 연관성이 검출 되었으며, Otabe 등[10]도 UCP3 유전자 내 변이가 비만과 연관되어 있음을 보고하였다. 따라서 본 연구는 인간의 UCP3 유전자 내 변이가 비만과 연관되어 있음이 보고된 바 본 연구는 돼지의 UCP 3 유전자 내 missense mutation의 유전자형을 조사하고 경제형질과의 연관성을 분석하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

공시 재료

축산과학원에서 사육중인 검정자료(등지방 두께, 일당증체량, 90 kg 도달일령)를 보유한 등록 품종의 돼지 189두를 선발하여 혈액을 채취하였으며 수집된 혈액으로부터 게놈 DNA(genomic DNA)를 정제하여 공시재료로 이용하였다.

유전자 증폭

UCP3 유전자의 exon 3 지역을 증폭하여 염기서열 분석과 RFLP 분석을 실시하기 위해 두 쌍의 primer를 제작하여 활용하였다(Accession. No. AY739704) (Table 2). PCR (Polymerase Chain Reaction) 반응액은 Template DNA 1 µl, 각각의 프라이머 0.1 µl (10 pmole), dNTP 1 µl, 10X Buffer 1.2 µl 및 Taq polymerase 0.06 µl를 첨가하여 PCR 반응액을 총 10µl로 조정

*Corresponding author

Tel : +82-31-670-5330, Fax : +82-31-675-5331

E-mail : kebinkhs@empal.com

한 후 94°C에서 사전 변성(pre-denaturation) 4분, 94°C에서 변성(denaturation) 40초, 53.6°C에서 어닐링(annealing) 40초, Pre Extension 72°C에서 1분으로 총 35 cycle로 실행 후 final Extension을 72°C에서 20분 동안 수행하여 증폭된 PCR-Products는 Ethidium Bromide를 첨가한 2% agarose gel에서 전기영동 하여 확인하였다.

염기서열 분석

돼지의UCP3 유전자의 변이지역 확인을 위해 PCR Product 5 µl에 ExoSAP-IT (Amersham Bioscience, USA) 2 µl을 첨가 하여 총 부피를 7 µl로 하여 37°C에서 20분, 80°C에서 20분간 반응시켜 증폭산물 이외의 이물질들을 제거하여 준 다음 E. T. terminator dye (Amersham Bioscience, USA)을 제작사의 지침서에 따라 재증폭 과정을 수행하였다. 전처리 과정을 통해 얻어진 산물을 MegaBace Analysis System (Amersham Bioscience, USA.)을 이용하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 seqMAN (DNA STAR Inc.) 프로그램을 이용하여 변이 지역을 확인하였다.

PCR-RFLP

돼지의 UCP3 유전자 내에 존재하는 변이 지역의 유전자형을 확인하기 위하여 PCR 증폭여부 및 크기가 확인된 증폭산물 10 µl를 제한효소 *Sma I*를 이용하여 37°C에서 6시간 동안 절단반응을 시킨 후 EtBr (Ethidium bromide)가 포함된 agarose gel (2%)에서 전기영동을 실시하여 절단된 유형에 따라 유전자형을 결정하였다.

경제형질과의 연관성 분석

돼지의 UCP3 유전자 내 변이와 경제형질간의 연관성을 분석하기 위해 SAS Package (Version 9.1)를 사용하였으며 통계분석이 이용된 모형은 아래와 같다.

$$Y_{ijk} = u + P_i + G_j + T_{ijk} + e_{ijk}$$

Y: 대상형질에 대한 관측치, u: 대상형질의 전체평균,
 P: 동일한 가계에 대한 효과, G: 유전자형 효과(J=GG, GR 그리고 RR), T: 검정일에 대한 공변이 효과,
 e_{ijk}: 임의 오차

결과 및 고찰

돼지의 UCP3 유전자 내 염기변이를 조사하기 위해서 엑손 3번 지역을 포함하는 증폭산물을 얻기 위해 제시한 primer를 (Table 2) 이용하여 PCR을 실시하였다. PCR을 통해 319 bp의 증폭산물을 얻었으며 이 증폭산물은 UCP3 유전자 서열의 일부임을 확인하였다(accession number: AY739704). 염기서열 분석을 통해 본 증폭산물 내에 1405 bp 지역에서 G염기가 A염기로 치환되는 변이를 확인하였다(Fig. 1). 확인된 변이지역은

Table 1. Characteristics of study subjctions by sex

SEX	No of Animals ¹⁾	ADG ²⁾	BF ³⁾	90DAY ⁴⁾
Fmale	76	0.84±0.099	1.33±0.155	145.23±9.046
Male	113	0.97±0.123	1.27±0.162	135.37±8.079
Total	189	0.92±0.130	1.29±0.162	139.33±9.748

¹⁾number of animals, ²⁾average daily gain, ³⁾back fat thickness, ⁴⁾days to 90 kg.

G가 A로 치환됨으로 인해 150번째 아미노산 서열이 glycine (GGG)에서 arginine (AGG)으로 바뀌는 missense mutation임을 확인하였다. 따라서 본 변이지역을 G150R으로 표기하기로 하였다. 본 변이지역의 유전자형을 분석하기 위해 제한효소 *Sma I*을 이용한 RFLP 방법을 이용하였으며 분석을 통해 GG, GR 그리고 RR 유전자형을 확인할 수 있었다. G 대립유전자의 경우 126 bp와 193 bp의 단편을 보유하고 있고, R 대립유전자의 경우 319 bp의 단편을 보유하고 있다(Fig. 2). 각 유전자형의 빈도는 0.164(GG), 0.587(GR) 그리고 0.249(RR)로 확인되었으며, 각 대립유전자의 빈도는 0.458(G)과 0.542(R)로 확인되었다. 돼지의 UCP3 유전자 내 변이지역의 유전자형 분석 결과를 Table 3에 제시하였다.

돼지 UCP3의 G150R 유전자형과 경제형질 간의 연관성을 확인하기 위한 실험에 사용된 돼지 집단의 평균 일당증체량은 0.92 kg, 등지방두께는 1.29 cm 그리고 90 kg 도달일령은 139.3 일로 조사 되었다(Table 1). UCP3 유전자 내 G150R 유전자형과 경제형질 간의 연관성을 분석한 결과를 Table 4에서 제시하였다. 결과에 따르면 G150R 유전자형은 등지방 두께에 있어 유의적인 연관성이 검출되었다. GG 유전자형은 등지방 두께가 1.358 cm로 GR (1.288 cm)과 RR (1.286 cm) 유전자형에 비해 두꺼운 것으로 나타났으며 이러한 차이가 유의적인 값 ($p < 0.05$)으로 조사되었다. 그러나 일당증체량과 90 kg 도달일

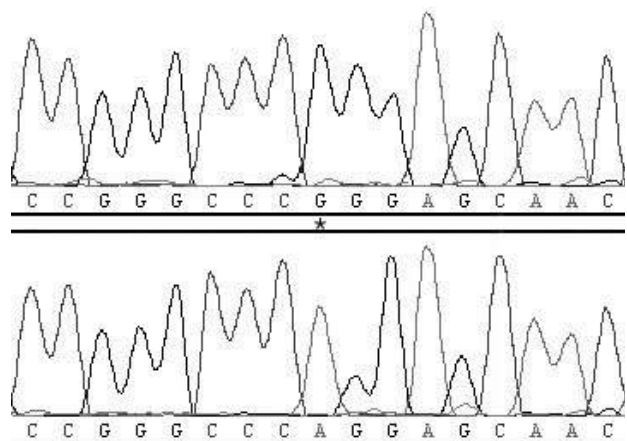


Fig. 1. Chromatograms showing sequence variation at position G150R within exon 3 on porcine UCP 3 gene. * polymorphism site.

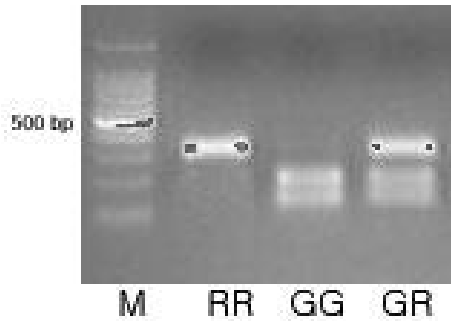


Fig. 2. A 3% agarose gel displaying a *Sma*I restriction digest on an amplified portion of the G150R on porcine UCP3 gene. Three SNP genotypes, GG, GR and RR, were detected. M: 100 bp DNA ladder.

Table 2. Primer, sequence, location used in sequencing and RFLP analysis of porcine UCP3 gene

Primer	Sequences	Location ^a
G150R_F	5'-tcttcagactccagcatca-3'	1289-1317
G150R_R	5'-tagaatcgcaggagtagacc-3'	1575-1593

^aLocation was based on the sequence of porcine UCP3 gene from GenBank accession no. AY739704.

Table 3. Genotype and allele frequency of the A1405G polymorphism in porcine UCP 3 gene

Locus	Genotype	Frequency	Allele	Frequency
G150R	GG	0.164(31)	G	0.458
	GR	0.587(111)	R	0.542
	RR	0.249(47)		

(n): number of animals.

령에서는 유의적인 값이 검출되지 않았다. 따라서 G150R의 G 대립유전자는 등지방의 침착에 영향을 미쳐 두께가 두꺼워지는 것과 연관이 있는 것으로 추정된다.

Bao 등[1]의 보고에 따르면 인간의 UCP3 mRNA의 증가는 체지방의 양과 비만에 있어 밀접한 연관관계를 확인하였다. 기아상태에서 체지방의 소모는 근육에서의 UCP3 유전자의 발현 증가 및 지방산 산화의 증가와 밀접하게 연관되어 있으며 음식을 먹는 동안 체지방의 복구는 근육 내 UCP3 유전자의 발현 감소 및 지방산 산화 감소와 연관되어있다. 인간의 경우 UCP3 유전자 내 여러 개의 염기변이 지역이 발견되어 보고되어 있으며 이러한 변이는 비만과 연결되어 있다고 Dalgaard와 Pedersen [5]는 보고하였다.

돼지의 UCP3 유전자는 311개의 아미노산을 코딩하고 있으며 인간과 91%의 상동성을 가지고 있다. 소와 쥐의 경우도 각각 90%와 86%의 상동성을 지니고 있음을 확인하였다. 따라서 UCP3 유전자는 포유동물에게 중요한 역할을 하는 유전자로서 보존이 잘 되어있음을 알 수 있다. 또한 돼지의 UCP와 UCP2의 아미노산 서열을 비교한 결과 76%의 상동성을 확인

Table 4. Effect of the polymorphism in porcine UCP 3 gene on the economic traits

Traits	Genotype		
	GG	GR	RR
ADG ¹⁾	0.895±0.02	0.911±0.01	0.907±0.01
BF ²⁾	1.358±0.02 ^b	1.288±0.01 ^a	1.286±0.02 ^a
90kg days ³⁾	139.7±1.53	140.6±0.81	139.7±1.25

¹⁾average daily gain, ²⁾back fat thickness, ³⁾days to 90 kg
^{a,b}Different superscripts within rows are significantly differ, *p*<0.05.

```
ucp2: 120 LLAGSTTGALAVAVAQPTDVVKVRFQQAARAG--GRRYRSTVDAYKTIAREEGLRGLWK
ucp3: 117 LLAGCTTGAMAVTCAQPTDVVKVRFQASIHAGPRSNRKVSGTMDAYRTIAREEGVRGLWK
      *** ** ** * ** ** ** * - * * * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
```

Fig. 3. Protein partial sequences of porcine UCP 3 compared with the UCP 2. *: identical position, -: mutation site.

하였다. Damon 등[6]의 보고에 따르면 UCP와 UCP2는 모두 돼지의 골격근과 지방세포에서 발현한다고 보고하였다. 그러나 두 유전자의 근육 내에서의 mRNA 발현 기작은 서로 상의한 부분이 확인되었다. 본 연구를 통해 분석한 G150R을 포함하고 있는 UCP3의 아미노산 서열과 UCP2의 아미노산 서열과의 상동성을 비교하여 제시하였다(Fig. 3).

돼지의 경우 UCP3 유전자 내 변이에 대한 연구가 아직까지는 미진한 실정이다. UCP3유전자는 지방의 대사에 밀접한 연관관계를 지니고 있어 돼지의 경제형질을 개량함에 있어 유용한 후보유전자로 활용 가능성이 높을 것으로 기대 되어진다. 본 연구의 결과 UCP3 유전자 내 G150R 변이를 확인하였으며 제한효소 *Sma* I를 이용한 RFLP 방법을 통해 유전자형을 결정하여 경제형질과의 확인하였다. G150R 변이는 등지방두께에 있어 유의적인 연관성이 확인되었다. 하지만 본 연구는 듀록 품종만을 대상으로 이루어져 차후 여러 품종 대상으로 경제형질에 미치는 UCP3 변이효과를 검증해 볼 필요성이 있다. 또한 지방대사와 연관성이 높은 다른 후보유전자와의 상호작용들을 분석하여 등지방두께 및 지방대사와 관련한 경제형질을 개량함에 있어 주요한 유전표지로서의 활용이 가능 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 경기도의 경기도지역협력연구센터(GRRC) 사업과 농림수산식품부 농림기술개발사업(109180-03-2-HD110)의 지원에 의해 수행하였음. [GRRC환경2010-B03, 동물유전 및 천연물 소재를 이용한 안전 축산물 가공기술 개발]

References

1. Bao, S., A. Kennedy, B. Wojciechowski, P. Wallace, E. Ganaway, and W. T. Garvey. 1998. Expression of mRNAs

- encoding uncoupling proteins in human skeletal muscle. Effects of obesity and diabetes. *Diabetes* **47**, 1935-1940.
2. Boss, O., E. Bobbioni-Harsch, F. Assimakopoulos-Jeannet, P. Muzzin, R. Munger, J. P. Giacobino, and A. Golay. 1998. Uncoupling protein-3 expression in skeletal muscle and free fatty acids in obesity. *Lancet* **351**, 1933.
 3. Brun, S., M. C. Carmona, T. Mampel, O. Vinas, M. Giralt, R. Iglesias, and F. Villarroya. 1999. Uncoupling protein-3 gene expression in skeletal muscle during development is regulated by nutritional factors that alter circulating non-esterified fatty acids. *FEBS Letters* **453**, 205-209.
 4. Cline, G. W., A. J. Vidal-Puig, S. Dufour, K. S. Cadman, B. B. Lowell, and G. I. Shulman. 2001. In vivo effects of uncoupling protein-3 gene disruption on mitochondrial energy metabolism. *J. Biol. Chem* **276**, 20240-20244.
 5. Dalgaard, L. T. and O. Pedersen. 2001. Uncoupling proteins: functional characteristics and role in the pathogenesis of obesity and Type II diabetes. *Diabetologia* **44**, 946-965.
 6. Damon, M., A. Vincent, A. Lombardi, and P. Herpin. 2000. First evidence of uncoupling protein-2 (UCP-2) and -3 (UCP-3) gene expression in piglet skeletal muscle and adipose tissue. *Gene* **246**, 133-141.
 7. Himms-Hagen, J. and M. Harper. 2001. Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis. *Exp Biol Med* **226**, 78-84.
 8. Hoeks, J., M. A. van Baak, M. K. Hesselink, G. B. Hul, H. Vidal, W. H. Saris, and P. Schrauwen. 2003. Effect of α -1- and α -2-adrenergic stimulation on energy expenditure, substrate oxidation, and UCP3 expression in humans. *Am J Physiol. Endocrinol. Metab.* **285**, E775-E782.
 9. Muzzin, P., O. Boss, and J. P. Giacobino. 1999. Uncoupling protein 3: its possible biological role and mode of regulation in rodents and humans. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**, 467-473.
 10. Otabe, S., K. Clement, S. Dubois, F. Lepretre, V. Pelloux, R. Leibel, W. Chung, P. Boutin, B. Guy-Grand, P. Froguel, and F. Vasseur. 1999. Mutation screening and association studies of the human uncoupling protein 3 gene in normoglycemic and diabetic morbidly obese patients. *Diabetes* **48**, 206-208.
 11. Schrauwen, P., W. H. M. Saris, and M. K. C. Hesselink. 2001. An alternative function for human uncoupling protein 3: protection of mitochondria against accumulation of non-esterified fatty acids inside the mitochondrial matrix. *FASEB J.* **15**, 2497-2502.
 12. Simonsen, L., B. Stallknecht, and J. Bulow. 1993. Contribution of skeletal muscle and adipose tissue to adrenaline-induced thermogenesis in man. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord* **17**, S47-S51.
 13. Spiegelman, B. M. and J. S. Flier. 2001. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* **104**, 531-543.
 14. Urhammer, S. A., L. T. Dalgaard, T. I. Sørensen, A. Tybjaerg-Hansen, S. M. Echwald, T. Andersen, J. O. Clausen, and O. Pedersen. 1998. Organisation of the coding exons and mutational screening of the uncoupling protein 3 gene in subjects with juvenile-onset obesity. *Diabetologia* **41**, 241-244.
 15. Walder, K., R. A. Norman, R. L. Hanson, P. Schrauwen, M. Neverova, C. P. Jenkinson, J. Easlick, C. H. Warden, C. Pecqueur, S. Raimbault, D. Ricquier, M. H. Silver, A. R. Shuldiner, G. Solanes, B. B. Lowell, W. K. Chung, R. L. Leibel, R. Pratley, and E. Ravussin. 1998. Association between uncoupling protein polymorphisms (UCP2-UCP3) and energy metabolism/obesity in Pima Indians. *Hum Mol Genet.* **7**, 1431-1435.
 16. Wang, S., A. Subramaniam, M. A. Cawthorne, and J. C. Clapham. 2003. Increased fatty acid oxidation in transgenic mice overexpression UCP3 in skeletal muscle. *Diabetes, Obesity and Metabolism* **5**, 295-301.
 17. Weigle, D. S., L. E. Selfridge, M. W. Schwartz, R. J. Seeley, D. E. Cummings, P. J. Havel, J. L. Kuijper, and H. BeltrandelRio. 1998. Elevated free fatty acids induce uncoupling protein 3 expression in muscle: a potential explanation for the effect of fasting. *Diabetes* **47**, 298-302.

초록 : 돼지의 UCP3 유전자의 단일염기서열 변이와 경제형질과의 연관성 분석

오재돈 · 이건우 · 정일정 · 전광주 · 이학교 · 공홍식*
(한경대학교 유전정보연구소)

Uncoupling protein (UCP) 3 유전자는 갈색지방세포의 미토콘드리아 내막에 존재하며 탈공역 산소(uncoupling oxygen)를 통해 ATP를 생산하는 것으로 알려져 있다. 이는 세포 내의 과다 에너지를 열로 발산시키는 기능을 하고 있다. 본 연구는 돼지의 UCP 3 유전자 내 missense mutation의 유전자형을 조사하고 경제형질과의 연관성을 분석하기 위하여 실시하였다. 돼지의 UCP3 유전자의 염기서열 분석을 통해 1405 bp 지역에서(accession number: AY739704) G염기가 A염기로 치환되는 변이를 확인하였다. 확인된 변이지역은 G가 A로 치환됨으로 인해 150번째 아미노산 서열이 glycine (GGG)에서 arginine (AGG)으로 바뀌는 missense mutation임을 확인하였다. 각 유전자형의 빈도는 0.164(GG), 0.587(GR) 그리고 0.249(RR)로 확인되었으며, 각 대립유전자의 빈도는 0.458(G)과 0.542(R)로 확인되었다. 돼지 UCP3의 G150R 유전자형과 경제형질 간의 연관성을 분석한 결과 등지방두께에 있어 유의적인 연관성이 검출되고 일당증체량과 90 kg 도달일령에서는 유의적인 값이 검출되지 않았다.