

한우 FASN 유전자변이와 한우 지방형질 및 지방산조성과의 연관성 분석

이승환¹ · 김형철^{1*} · 조원모¹ · 장선식¹ · 김범수² · 장길원² · 이준현³ · 연성흠² · 홍성구¹

¹농촌진흥청 국립축산과학원 한우시험장, ²동물유전체과, ³충남대학교 동물자원생명과학과

Association of genetic polymorphism in fatty acid synthase with BodyFat and fatty acid composition in Hanwoo

Seung-Hwan Lee¹, Hyeong-Cheol Kim^{1*}, Won-Mo Cho¹, Sun-Sik Chang¹, Bum-Soo Kim², Gul-Won Chang², Jun-Hun Lee³, Seong-Heum Yeon², Seong-Koo Hong¹

¹Hanwoo Experiment Station, National Institute of Animal Science, RDA, Pyeongchang 268, Korea

²Animal Genome & Bioinformatics Division, NIAS, RDA, Suwon, 441-706

³Department of Animal Science & Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Received on 18 April 2011, revised on 7 May 2011, accepted on 20 June 2011

Abstract : The aim of this study was to identify the polymorphism on fatty acid synthase (FASN) gene and its association with fat traits and fatty acid composition in Hanwoo. We genotyped a SNP (g.16024G → A) detected in Exon34 of FASN on 90 Hanwoo steers by PCR RFLP. A linear mixed model revealed an association of g.16024G → A with total body fat contents ($P=0.006$), while there is no significant effect between g.16024G → A and other traits (IMF, BF and fatty acid composition). Regression coefficient and R^2 of the SNP was -1.5 kg and 0.36 in this analysis. Especially, AA type of g.16024G → A has a less amount of body fat (1.5 kg) than GG type of the SNP in Hanwoo. In conclusion, this study indicates an important role for FASN gene in determining body fat content in Hanwoo.

Key words : Hanwoo, FASN, SNP, BodyFat

I. 서론

쇠고기의 품질은 육색, 지방색, 연도 및 근내지방도에 의해서 좌우되며(Hocquette 등, 2005; Geay 등, 2001), 이들 요인중 근내지방은 쇠고기의 품질과 연도를 증가시킬 뿐만 아니라 쇠고기의 등급을 결정하는 매우 중요한 요인이다(Tatum 등, 1982). 따라서, 쇠고기의 근내지방도를 향상시키기 위하여 소의 비육기간 연장 및 고 에너지 사료급여프로그램과 같은 다양한 연구가 진행되고 있다(Kim 등, 2005). 그러나 이러한 방법으로 근내지방은 향상되었지만, 등지방 및 내장지방과 같은 불가식지방의 증가로 쇠고기 생산에 있어서 비효율적인 결과를 초래하고 있다. 따라서 근육 내 지방특이적인 유전자 및 근육내 지방축적에 대한 생리·생화학적 메커니즘을 규명을 위하여 Wang 등(2005)

은 육우중 근내지방축적능력이 가장 우수하다고 알려진 일본 흑모화우와 유우인 홀스타인종의 등심조직으로부터 근육 내 지방합성에 특이적으로 차등 발현하는 유전자를 탐색하였다. 또한 Childs 등(2002)은 앵거스와 헤어포드 교잡종을 대상으로 곡물사료와 같은 고 에너지 사료급여에 따른 근내지방 축적량을 3그룹으로 나누어 근내지방 조절 인자를 ddRT-PCR을 이용하여 탐색하였다. 이러한 근내지방 특이적인 차등발현 유전자 탐색은 근육 내 지방합성에 대한 생리·생화학적인 기작을 규명하는 것 외에 그 유전자내에 존재하는 SNP(single nucleotide polymorphism) 탐색을 통한 DNA marker 개발과 같은 산업화에 직접적으로 적용할 수 있다는 장점이 있다. 최근 Lee 등(2006)은 지방합성이 왕성하게 진행되는 비육후기의 근육 내 지방합성에 있어서, 지방산(fatty acid) 및 당과 같은 에너지를 세포내로 전달하는 FABP4, GLUT4 및 근육 내 지방합성의 주요 유전자 4개에 대하여 유전자 발현양상을 분석하였다.

*Corresponding author: Tel: +82-33-330-0656

E-mail address: khc3365@korea.kr

지방산합성 및 체내지방합성을 조절하는 유전자변이를 알 수 있다면, 유전자변이의 효과를 개량프로그램에 이용 할 수 있을 것이다.

신 지방산합성과정(De novo fatty acid synthesis)에서 glucose는 당대사를 통해 합성된 피루빅산(Pyruvate)이 미토콘드리아의 TCA과정을 거치면서 시트릭산(Citrate)이 합성되고, ATP citrate lyase에 의해 지방합성의 주요한 전구물질인 아세틸산(Acetyl-CoA)가 합성된다. 지방산합성효소는(Fatty acid synthase; FASN) 소의 19번 염색체에 위치한 42개의 exon으로 이루어진 유전자이며, 아세틸산(Acetyl-CoA)을 전구물질로 팔미틴산(Palmitate)과 같은 긴사슬 지방산을 합성하는 주요 유전자이다(Liu 등, 2010). Morris 등(2007)은 소 저지/리무진교잡종에 있어서 염색체 19번 60~90cM 사이에 유 지방함량 및 지방산 조성관련 QTL을 검출하였으며, 이 영역에 FASN 유전자가 위치해 있다고 보고하였다. Zhang 등(2008)은 미국의 육우인 앵거스 집단에서 Exon 39번에 위치한 g.17924 G → A와 Exon 42번에 위치한 g.18663 G → C 두 개의 SNP과 지방산조성, 특히 올레인산(C18:1)과 총 단가불포화지방산(Monounsaturated fatty acid)과 연관성이 있음을 보고하였다. 따라서, 지방산합성효소는 지방산조성 뿐 아니라, 체내 지방합성에 매우 중요한 역할을 하는 유전자임을 알 수 있다.

본 연구는 한우에서 기 보고된 FASN 유전자의 Exon 34번에 위치한 g.16024 A → G과 지방산조성 및 지방형질과의 연관성을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시재료와 DNA추출

본 연구는 농촌진흥청 국립축산과학원에서 2002년 4월부터 2004년 4월까지 사양 실험한 한우 90두에 대해서 도축 후 냉도체로부터 등심조직으로부터 조직을 확보하였고, 확보된 조직은 곧바로 액체질소에서 동결하여 -70°C에 보관하여 실험하였다. 확보된 조직으로부터 DNA 추출은 Genomic DNA Prep kit(Solgent, Korea)를 이용하여 추출하였으며, 조사된 형질로는 도축후 등지방두께, 불가식지방 무게(내장 및 신장지방), 근내지방함량(%), 지방산조성을 측정하였다. 본 연구에서 사용된 공시축 표현형자료에 대한 기초 통계량은 Table 1에 정리하였다.

2. FASN 유전자변이(g.16024G → A)의 유전자형 결정

본 실험을 위하여 제작된 프라이머는 기존에 Zhang 등(2007)이 보고한 프라이머 서열을 이용하여 제작하였다(Table 2). 유전자형결정은 PCR-RFLP법을 이용하여 유전자형 분석을 실시하였다(Fig. 1). FASN 유전자변이(g.16024 A → G)에 대한 제한효소는 Table 1에 나타내었다. PCR-RFLP를 위한 PCR 반응은 genomic DNA 1 ul(50 ng), 10× PCR reaction buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂), 2.5 mM dNTPs, 10 pmol primer,

Table 1. Means and standard deviations for fat and fatty acid composition in Hanwoo.

Traits	Phenotype	
	Mean	SD
Intramuscular fat, %	15.8	5.3
Backfat thickness, cm	2.8	0.6
total bodyfat, kg	109.7	20.4
Myristic acid (C14:0)	2.9	0.9
Palmitic acid (C16:0)	28.3	4.6
Palmitoleic acid (C16:1)	4.9	1.0
Stearic acid (C18:0)	10.6	1.9
Oleic acid (C18:1)	49.5	7.7
Saturated fatty acid (SFA)	41.9	6.6
Unsaturated fatty acid (UFA)	58.0	8.9
Monounsaturated FA	55.4	8.5
Polyunsaturated FA	2.7	0.7

Table 2. Primer sequence for FASN SNP (g.16024 A → G).

Primer Name	Primer sequence (5' → 3')	Annealing TM	Product size (bp)	Restriction Enzyme
FASN_F	TTA AGG GCA CCT TAG GCT TG	58°C	291	HhaI
FASN_R	GCC TTT GGA GGG CTT CTT AG			

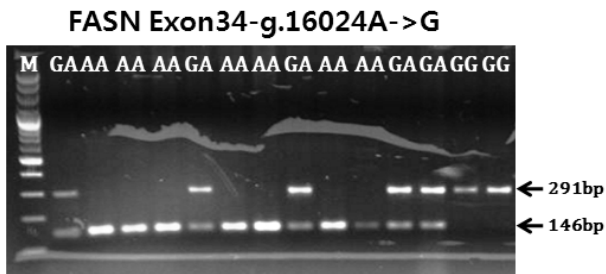


Fig. 1. PCR-RFLP analysis of FASN-exon34-g.16024 A → G. The 291 and 146 bp are band size of the allelic polymorphism.

1 unit Taq polymerase(G&P, Korea)를 사용하여 총 반응액 15 ul로 보정 후 PTC-240 DNA Engine Tetrad 2 Cyclor(MJ reserch, USA)를 이용하여 반응을 수행하였다. 합성 반응은 95°C에서 10분 간 최초 변성(pre-denaturation) 시킨 후, 95°C에서 40초 동안 변성(denaturation), 61°C에서 40초간 접합(annealing), 그리고 72°C에서 1분간 합성(extension)반응의 3단계를 35회 반복한 후 72°C에서 마지막 합성(final extension)을 10분간 수행하였다. PCR이 끝난 후 3 ul의 PCR 산물을 1.5% agarose gel에 전기영동을 실시하고 UV 상에서 증폭 여부를 확인하였다. PCR-RFLP 분석은 PCR반응물 5 ul에 제한효소 1~1.5 unit을 첨가하고 각 제한효소별 활성온도에서 3시간 이상 반응 시킨 후 절단된 DNA 단편의 크기를 고려하여 ethidium bromide가 포함된 2~3% agarose gel에 전기영동한 후, 나타난 DNA 밴드 양상 분석을 통해 최종적으로 각 개체별 SNP 유전자형을 판정하였다.

3. 경제형질과의 통계적 연관성 분석

본 연구에서 조사된 한우 표현형에 대한 유전자형의 효과를 분석하기 위해 ASReml package(Gilmour 등, 2006)를 이용하여 아래와 같은 혼합선형모형(Linear Mixed Model)으로 분석을 실시하였으며, 유전자형에 따른 각 표현형형가의 최소제곱평균(least square mean)과 표준오차를 추정하여 평균간 최소유의차 검정을 실시하였다.

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + G_j + b \cdot D_{ijk} + a_{ijk} + e_{ijk}$$

- 여기에서, Y_{ijk} : 각 표현형 관찰값
- μ : 전체 평균
- T_i : 처리효과(TDN 수준, $i=1, 2, 3$)
- G_j : 유전자형 효과
- b : 도체중에 대한 회귀계수
- D_{ijk} : 공변이(개체의 도체중)
- a_{ijk} : polygenic effect(랜덤 효과)
- e_{ijk} : 임의 오차, $N(0, \sigma_e^2)$

III. 결과 및 고찰

PCR-RFLP를 통해 검출된 총 90두의 공시축에 대한 FASN 유전자내의 엑손 34번에 위치한 g.16024 A → G 변이의 유전자형과 한우 도체형질중 지방형질 및 지방산조성형질과의 연관성 분석결과 g.16024 A → G변이가 한우 도체형질중 불가식지방 총량(kg)과 통계적인 유의성을 확인하였다($P=0.006$, Table 3). 그러나, 근내지방, 등지방 및 9종의 지방산조성과는 통계적 유의성이 없었다.

FASN유전자의 g.16024 A → G변이의 상가적 유전효과는 -1.5 kg으로서 불가식지방량이 A allele 보다 G allele에서 낮게 검출되었다(Table 4). 또한 불가식지방의 전체 표현형 분산중 FASN유전자의 g.16024 A → G 유전변이가 설명하는 통계모델의 적합성을 분석한 결과, R^2 값이 0.36으로서 전체 표현형분산의 36%를 설명할 수 있는 것으로 분석되었다. 이는, 통상적인 SNP의 효과보다 높은 효과로서 불가식지방량에 대한 FASN유전자효과에 통계적인 과추정이 존재하는 것으로 사료된다.

지방산합성효소는 동물이나 효모의 다효소 복합체로서 아세틸기 전이 및 축합, 3-ketoacyl 환원, 탈수를 일으키는 각 효소가 한 조로 구성된 복합체가 dimer로 이루어진 복합성 효소이며 아세틸-CoA와 말로닐-CoA와 같은 지방산합성 전구물질들을 이용하여 긴사슬 지방산을 합성하는 주요 효소이다(Wakil 등, 1989; Smith 등, 1994). 아울러,

Table 3. P-values of all associations tested between the single nucleotide polymorphisms (g.16024 A → G) in the exon 39 of the FASN gene with fat traits and fatty acid composition (n=90). Significant (p<0.05) traits are listed with an asterisk (*).

Traits	g.16024 A → G	
	F-statistics	P-value
Intramuscular fat, %	1.1	0.3
Backfat thickness, mm	1.5	0.2
Total bodyfat, kg*	8.6	0.006
Myristic acid(C14:0)	0.8	0.4
Palmitic acid (C16:0)	0.1	0.8
Palmitoleic acid (C16:1)	0.5	0.6
Stearic acid (C18:0)	0.1	0.9
Oleic acid (C18:1)	0.2	0.7
Saturated fatty acid (SFA)	0.3	0.7
Unsaturated fatty acid (UFA)	0.3	0.7
Monounsaturated FA	0.1	0.8
Polyunsaturated FA	2.1	0.1

Table 4. Association of FASN gene polymorphism(g.16024 A → G) with total bodyfat in Hanwoo (estimate of additive±SE).

Trait	g.16024 A → G	
	estimate (additive)	R ²
Total bodyfat, kg	-1.5 ± 1.5	0.36

FASN유전자는 지방산합성의 완성에 관여하며, 포유동물의 유전에서 활발히 발현하여 유지방조성 및 고기내 지방산조성에 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Lin and Smith, 1978; Wakil 등, 1983). FASN유전자의 엑손 39번부터 42번은 thioesterase(TE) 효소를 코딩하는 염기서열부분으로서 Pazirand 등(1989)은 이부분이 C14 acyl-ACP와 C16 acyl-ACP를 만드는 부분임을 증명하였다. 또한 Roy 등(2006)과 Morris 등(2007)은 FASN유전자의 TE 부분에 존재하는 유전변이(g.17924G → A)가 포유동물의 유지방함량과 연관이 있음을 보고하였고, Zhang 등(2008)은 g.17924G → A 변이의 유전자형 GG가 고기내 올레인산 함량을 높이고, AA형은 올레인산의 함량을 낮추는 효과를 보고하였다. 그러나, 본 연구에서 FASN 유전자의 엑손 34번에 위치한 유전변이(g.16024 A → G)의 효과를 한우의 지방 및 지방산조성과 분석한 결과, 한우의 지방산조성에서는 효과가 없는 것으로 분석되었다. 고기내 지방산함량은 가축의 성별, 품종, 영양 및 사양, 유전자효과와 같은 다양한 요인에 의해 영향을 받는다고 알려져 있다(Lee 등, 2004). 외국소품종(앵거스, 홀스타인)에서 효과를 보인 FASN 유전자의 변이가 한우에서 효과를 보이지 않는 것은 가축

의 육종프로그램으로 육종되어온 품종차이가 매우 큰 것으로 사료된다. 최근 유전체육종가추정에서 동일 유우(홀스타인 과 저지)종에서 유량 및 유질관련 QTL좌위를 비교분석한 결과, 홀스타인의 QTL이 저지종에서 적용이 되지 않는다고 보고되었다(Hayes, 2008). 그러나, FASN 유전자 변이(g.16024 A → G)는 한우의 불가식지방량에 대해서 통계적 유의성을 확인하였다. 특히, GG 유전자형은 AA유전자형에 비해서 1.5kg 불가식지방함량이 적은 것으로 분석되었다. Berndt 등(2007)은 FASN유전자가 사람에게 있어서 체지방을 결정하는 하나의 주요한 인자로 보고하였다. 특히, 사람의 내장지방과 피하지방에서 FASN유전자의 발현을 분석한 결과, FASN유전자는 사람의 피하지방에서보다 내장지방에서 2배가량 높은 발현량을 관찰하였으며, 이러한 결과는 성별에 관계없이 동일하게 내장지방에서 높은 발현량을 보였으며, 비만환자에 있어서 FASN유전자의 내장지방에서 발현이 4배이상 증가하였다(Berndt 등, 2007). 이러한 결과는 FASN유전자는 아세틸-CoA 및 말로닐-CoA를 전구물질로 긴사슬 지방산합성을 통하여 조직에 축적되는 트리글리세라이드(Triglyceride)의량을 증가시키는 것으로 사료된다.

한우 비육에 있어서 근내지방도 증가를 위한 비육기간연장 및 고에너지 사료급여는 근내지방도의 증가와 더불어 불가식지방량의 증가로 도축시 육량지수를 떨어뜨릴 가능성이 있다. 따라서, 육종목표에 부합하지 않는 형질에 대해서 선발반응을 낮출수 있는 방안이 연구가 되어야 할 것이다. 특히, 새로운 형질을 측정하여 육종프로그램에 추가하는 것은 많은 시간 및 비용이 소요된다. 따라서, 다양한 형질에 대한 QTL 및 유전자검색을 통하여 원인유전자를 검출할 수 있다면, 원인유전자의 변이의 분자유종가(molecular breeding value)를 활용하여 육종목표에 부합되지 않는 형질에 대해서 선발반응을 낮출 수 있을 것이다. 따라서, 본 연구에서 분석한 FASN 유전변이(g.16024 A → G)를 기반으로 분자유종가를 추정이 가능하며, 향후 한우 선발시 지방산함량의 변화없이 불가식지방함량을 줄일 수 있는 유용한 DNA 마커임이 사료된다.

IV. 결론

본 연구의 목적은 FASN 유전자변이와 한우의 지방 및 지방산형질과의 연관성을 찾는 데 있다. FASN 유전자 엑손 34번의 g.16024 A → G 변이의 유전자형과 한우 도체형질 중 지방형질 및 지방산조성형질과의 연관성 분석결과 g.16024 A → G 변이가 한우 도체형질 중 불가식지방 총량(kg)과 통계적인 유의성을 확인하였다($P=0.006$). 그러나, 근내지방, 등지방 및 9종의 지방산조성과는 통계적 유의성이 없었다. FASN 유전자의 g.16024 A → G 변이의 상가적 유전효과는 -1.5 kg 으로서 불가식지방량이 A 대립유전자보다 G 대립유전자에서 낮게 검출되었다. 또한 불가식지방의 전체 표현형 분산 중 FASN 유전자의 g.16024 A → G 유전변이가 설명하는 통계모델의 적합성을 분석한 결과, R^2 값이 0.36 으로서 전체 표현형 분산의 36%를 설명할 수 있는 것으로 분석되었다.

참고 문헌

Berndt J, Kovacs P, Ruschke K, Kloting N, Fasshauer M, Schon M, Stumvoll M, Bluher M. 2007. Fatty acid synthase gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia*. 50: 1472-1480.
Childs K, Goad W, Allan F, Pomp D, Krehbiel C, Geisert D, Morgan B, Malayer R. 2002. Differential expression of NAT1 translational repressor during development of bovine

intramuscular adipocytes. *Physiol. Genomics*. 10: 49-56.
Geay Y, Bauchart D, Hocquette J, Culioli J. 2001. Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic factors on of muscles in ruminant, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. *Reprod. Nutr. Dev.* 41: 1-26.
Gilmour A, Gogel J, Cullis R, Thompson R. 2006. ASREML User Guide Release 2.0 VSN International Ltd., Hemel Hempstead, HP1 1ES, UK.
Hayes B. 2008. QTL mapping, MAS and Genomic selection. Text book for Armidale summer animal breeding course.
Hocquette J, Richardson I, Prachardson I, Prache S, Medale F, Duffy G, Scollan, N. 2005. The future trends for research on quality and safety of animal product. *Italian J. Anim. Sci.* 4: 49-72.
Kim KH, Lee JH, Oh YG, Kang SW, Lee SC, Park WY, Ko YD. 2005. The Optimal TDN Levels of Concentrates and Slaughter Age in Hanwoo Steers. *J Anim Sci & Technol (Kor.)*. 47: 731-744.
Lee SH, Yoon D, Choi NJ, Hwang SH, Cheong EY, Oh SJ, Cheong LC, Lee CS. 2004. Developmental Relationship of Unsaturated fatty acid composition and stearoyl-coA desaturase mRNA level in Hanwoo steers muscle. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 18: 562-566.
Lee SH, Park EW, Cho YM et al. 2006. Lipogenesis gene expression profiling on the early and late fattening stage of Hanwoo muscle. *J. Anim. Sci & Technol(kor)*. 48: 913-920.
Liu H, Liu JY, Zhang JT. 2010. Biochemistry, molecular biology, and pharmacology of fatty acid synthase, an emerging therapeutic target and diagnosis/prognosis marker. *Int. J. Biochem. Mol. Bio.* 1(1): 69-89.
Lin CY, Smith S. 1978. Properties of the thioesterase component obtained by limited trypsinization of the fatty acid synthetase multienzyme complex. *J. Biol. Chem.* 253: 1954-62.
Morris CA, Cullen NG, Glass BG, Hyndman DL, Manley TR, Hickey SM, McEwan JC, Pitchford WS, Bottema CDK, Lee MAH. 2007. Fatty acid synthase effects on bovine adipose fat and milk fat. *Mamm. Genome*. 18: 64-74.
Pazirandeh M, Chirala S, Huang Y, Wakil J. 1989. Characterization of recombinant thioesterase and acyl carrier protein domains of chicken fatty acid synthase expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 30: 18195-18201.
Roy R, Ordovas L, Zaragoza P, Romero A, Moreno C, Altarriba J, Rodellar C. 2006. Association of polymorphisms in the bovine FASN gene with milk fat content. *Anim. Genet.* 37: 215-218.
Smith S. 1994. The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB. J.* 8: 1248-1259.
Tatum J, Smith C, Carpenter Z. 1982. Interrelationships between marbling, subcutaneous fat thickness, and cooked beef palatability. *J. Anim. Sci.* 43: 777-784.
Wakil S, Stoops K, Joshi C. 1983. Fatty acid synthesis and its regulation. *A. R. Biochem.* 52: 537-579.
Wakil S. 1989. Fatty acid synthase, a proficient multifunctional

enzyme, *Biochem.* 28: 4523-4530.

Wang YH, Byrne K, Reverter A, Harper G, Taniguchi M, McWilliam S, Mannen H, Oyama K, Lehnert S. 2005. Transcriptional profiling of skeletal muscle tissue from two

breeds of cattle. *Mamm. Genome* 16: 201-210.

Zhang S, Knight T, Reecy J, Beitz D. 2008. DNA polymorphisms in bovine fatty acid synthase are associated with beef fatty acid composition. *Anim. Genet.* 39: 62-70.