

돼지 Cytochrome P450 (CYP2A6) 유전자 내의 단일염기변이 발굴 및 고기내 불포화 지방산 조성에 미치는 영향

노정건¹ · 김상욱¹ · 김관석^{1*}

¹충북대학교 축산학과

Effect of the single nucleotide polymorphism from cytochrome P450 (CYP2A6) gene to fatty acid composition traits in Korean native pig crossed progeny

Jung-Gun Roh¹, Sang-Wook Kim¹, Kwan-Suk Kim^{1*}

¹Department of Animal Science, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea

Received on 7 November 2011, revised on 21 November 2011, accepted on 18 December 2011

Abstract : The purpose of this study was to investigate the Cytochrome P450 (CYP2A6) gene as a candidate gene for the traits related with meat fatty acid composition traits in pigs. Porcine CYP2A6 polymorphisms were detected and PCR-RFLP was performed for genotyping of Korean native pig (n=14), Landrace (n=3), Duroc (n=3), Berkshire (n=3), Yorkshire (n=8) and F2 population composed of 202 individuals from an intercross between Korean Native pig and Yorkshire. PCR primer set amplified a 612 bp fragment of CYP2A6 and digestion of the PCR products was performed with the restriction enzymes *SchI*. The CYP2A6 *SchI* polymorphism was only found in the KNP breed. The genotype frequencies of TT, TC and CC genotypes were 0.36, 0.56 and 0.08 in the KNP respectively and the other pig breeds were fixed with CC genotype (Duroc, Landrace, Berkshire and Yorkshire). Statistical association between genotypes and fatty acid composition traits were tested in the Korean native pig and Yorkshire crossed F2 pigs. The CYP2A6 *SchI* polymorphism was associated with only fatty acid composition C20:3n3 level (cis11,14,17-Eicosatrienoic acid, p=0.0252). The 'T' allele was associated with lower C20:3n3 level. Further study is required to validate the genotypic association and biological consequence of the CYP2A6 gene polymorphism in pigs.

Key words : CYP2A6 gene, Unsaturated Fatty-Acid Composition, Single nucleotide polymorphism

I. 서 론

돼지고기의 품질은 많은 생화학적 특성 및 생리학적 메커니즘에 의해 좌우된다. 특히 고기내의 지방산 조성은 육질과 높은 상관관계가 있으며, 이를 섭취하는 사람의 건강에 영향을 줄 수 있는 중요한 요소이다. 사람은 고기를 통해 포화지방산을 많이 섭취 했을 경우 혈청 내에 콜레스테롤이 높아지고 심혈관 질환 일으키게 되지만, 불포화지방산은 혈소판의 응집을 억제하여 혈전형성을 막는 효과가 있기 때문에 심장질환으로 인한 사망률을 줄여주는 것으로

보고되었다 (Lee 등, 1997). 이러한 결과로 일부 소비자들은 고기방 기피현상으로 인해 고단백질이면서 지방함량이 낮아 인체에 유익한 건강지향적 돼지고기의 품질을 선호하고 있고, 돼지고기내 지방산의 조성은 소비자들의 구매에 있어서 중요한 척도가 될 수도 있다.

한국재래돼지는 작은 몸집에 느린 성장을 그리고 높은 등지방 두께를 가지고 있지만(Kim 등, 2005), 이러한 단점을 보완하기 위해 타 품종과의 교배를 통해 유전적 차이를 나타내는 염색체좌위를 탐색하고 있다(Kim 등, 2007). 한국재래돼지와 요크셔 두 품종 사이의 등지방 조직에서의 불포화지방산조성과 차등발현유전자들을 조사하였을 때, Cytochrome P450 유전자의 발현양상은 아라키돈 지방산

*Corresponding author: Tel: +82-43-261-2547
E-mail address: kwanskim@chungbuk.ac.kr

함량에 따라 명확한 차이를 보였다(Choi 등, 2008).

Cytochrome P450 유전자들은 프로스타글란дин의 활동을 감소시키지만, 아라키돈 지방산(epoxy-modified arachidonic acids)에 촉매활동으로 영향을 주며(Ayajiki 등, 2003), 생리적 활성 유도체로 파생되어 아라키돈 지방산(hydroxy-modified arachidonic acids) 대사에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Chuang 등, 2004). Cytochrome P450 유전자는 포유동물에서 간에서 지방산 산화분해 효소를 만들어 내고 있는데, CYP2A6 유전자는 사료 섭취 후 생기는 Skatole과 수컷에게 생성되는 Androstenone와 결합하여 돼지지방조직에 축적 되면서 웅치 냄새가 나게 되는 것으로 보고하였다(Chen 등, 2007). 본 연구에서는 한국재래돼지와 요크셔 품종에서 발현 차이로 나타나었던 Cytochrome P450 유전자 가운데 하나인 CYP2A6 유전자 염기서열변이 조사하였고, 또한 CYP2A6 유전자내의 변이가 돼지고기내의 지방산 조성 및 함량에 미치는 영향을 연구하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시재료, DNA 추출 및 농도측정

Cytochrome P450 유전자 변이와 고기 내 지방산 구성과 연관성을 분석하기 위해 이용된 공시재료는 충북대학교 축산학과에서 보유한 한국재래돼지와 요크셔 품종간 교배에서 생산된 F2 202두와 삼원교잡 일반 비육돈 50두, 돼지 품종별 Duroc(4두), Landrace(4두), Yorkshire(4두) 및

Berkshire(4두)를 사용 하였다. DNA의 추출은 조직 300 mg으로부터 DNeasy Tissue kit(Qiagen, USA)를 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. DNA 정량 분석은 spectrophotometer(Pharmacia Biotech, England)를 이용하여 260 nm~280 nm에서 흡광도를 측정하여 DNA의 농도와 순도를 확인하였다.

2. 지방산 측정 분석

돼지고기내 지방산 조성은 200 mg의 동결된 지방조직을 10 ml chloroform/methanol(2:1)용액으로 조제한 지방산의 methyl ester를 가스크로마토그래피에(PT-MR3100, Polytron, Switzerland) 주입하여 분리된 지방산을 같은 조건으로 주입한 표준물질과 비교하여 지방산 조성을 측정하였다.

3. Cytochrome P450 유전자의 염기서열 분석

돼지 Cytochrome P450 유전자는 염색체 위치 및 genomic DNA 염기서열이 밝혀져 있지 않아 Pig EST mRNA 염기서열(GenBank accession no. AY280866.1)을 이용하여 NCBI database에서 BLAST 검색을 이용하여 Human Exon 6, 7, 8, 9의 염기서열을 확보하였으며 genomic 염기서열을 확보하기 위해 2단계로 나누어서 염기서열 분석을 진행하였다. Primer는 Oligo 6(Molecular Biology Insights, Cascade, Co, USA)을 이용하여 Primer set를 제작하였다(Table 1).

Table 1. Primer sequence information for PCR.

Primer Name	Primer Sequence(5'-3')	Annealing Temperature (°C)	Product Size (bp)
CYP2A6-1 F	ATGCGCTACCGCTTCC	58	612
CYP2A6-1 R	GTCGGAAACTTGGTATCCTT		
CYP2A6-2 F	GCCCAGAGAGTCACCAAGGAT	58	658
CYP2A6-2 R	AAGCCTCGGGGGTTGGA		
CYP2A6-3 F	GTGCTGAGAGACCCAAGTTC	58	630
CYP2A6-3 R	ACCTTCTCCGAAACAGTACCG		
CYP2A6-4 F	TCCTCCCCCTCCCGCAGCCAAA	58	610
CYP2A6-4 R	GCAGGGGGCGGGGTCTGTTG		
CYP2A6-5 F	ATCCCCCTCCCTGCTATGG	58	624
CYP2A6-5 R	CTTGGTGGTTATGGGGTTGC		

유전자 내 단일염기 변이를 조사하기 위하여 한국재래돼지 품종 8두와 Yorkshire 품종 8두의 DNA 샘플을 주형 DNA로 이용하였다. DNA 증폭을 위해 사용된 PCR 기계는 PTC-200 thermocycler(MJ Research, Watertown MA, USA)이며, DNA 중합효소는 h-Taq polymerase(Solgent, Korea)를 사용하였다. PCR 반응조건은 template DNA 25 ng, primer 0.01 uM, dNTP 5 mM, 10XPCR buffer 2.5 ul, 그리고 h-Taq DNA polymerase를 0.625 units를 넣어 최종 반응액 25 ul을 이용하였다. 반응조건은 최초 95°C에서 15분간 예비가열 한 후 95°C에서 20초 동안 변성시키고, 각 Primer에 대응하는 annealing 온도(Table 1)에서 20초 그리고 72°C에서 30초 합성(extension)시키는 총 40 사이클 반복증폭하고 72°C에서 5분 마지막 합성단계(final extension)를 수행하고 DNA 증폭을 중단하였다. 증폭한 산물들은 4ul를 취하여 모두 2% agarose gel에서 100mv 전압에서 20분간 전기영동을 통해 확인하였다.

증폭산물은 Geneclean turbo kit(MP Biomedicals, USA)를 이용하여 정제한 후 Applied Biosystems 3730 DNA sequencer(PE Applied Biosystems, USA)를 이용하여 염기서열분석을 수행하였다. 얻어진 염기서열들은 BLAST 검색을 통해 확인하였고, Sequencher ver 4.7(Gene codes, version 4.7, Ann RBOR, MI)을 사용하여 두 품종 사이에서 나타나는 단일염기변이를 조사하였다.

4. PCR-RFLP을 이용한 유전자형 분석

Cytochrome P450 유전자변이의 품종 별 빈도와 표현형 질의 연관성을 관찰하기 위해 CYP2A6-intron6 유전자의

염기서열에 대해 PCR-RFLP방법을 이용하여 CYP2A6-intron6 한 개의 SNP를 분석하였다. 제한효소 *SchI*를 유전자형결정에 이용하였고, 612 bp 증폭조각산물이 대립유전자 C일 때는 97 bp, 210 bp, 305 bp fragment로 분리되며 대립유전자 T일 때 402 bp 210 bp fragment가 잘리어 분리되었다(Fig. 1).

5. 통계분석

조사된 경제형질 측정치에 대한 유전자형의 효과를 추정하기 위해 SAS 9.1 Package/PC를 이용하여 일반선형모형(GLM)분석을 하였으며, 유전자형의 효과가 유의한 형질들에 대해 최소 유의차 검정으로 평균간 차이에 대한 유의성을 조사하였다. 통계분석에 이용한 모형은 다음과 같다.

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + G_j + e_{ijk}$$

여기서, Y_{ijk} , μ , S_i , G_j , e_{ijk} 는 각각 형질의 측정치, 전체 평균, 성별효과, 개체의 유전자형 효과, 임의오차를 나타내고 있다.

III. 결과 및 고찰

1. CYP2A6유전자의 단일 염기 다형성 및 품종별 빈도 분석

Table 2는 CYP2A6-in6-C>T 변이의 품종별 유전자형 분석을 나타낸 표이다. Landrace, Duroc, Yorkshire, Berkshire는 모두 CC 형으로 고정되어 있지만, 한국재래돼지(KNP)는 TT type 5두, TC type 8두, CC type은 오직

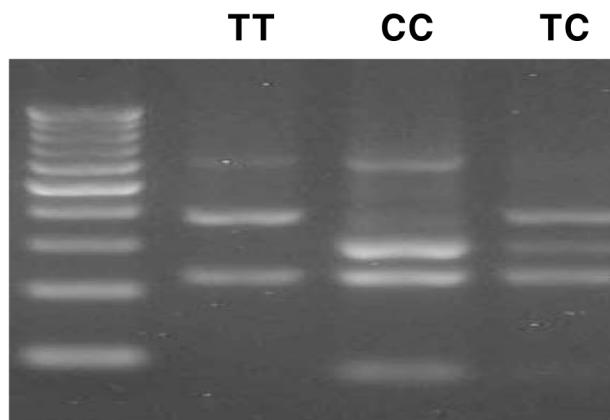


Fig. 1. PCR-RFLP analyses of CYP2A6-in6-C>T.

Table 2. CYP2A6-in6-C>T genotypic and allelic frequencies in eight breeds.

Breed	TT type	TC type	CC type
Landrace (n=3)			1
Duroc (n=3)			1
Berkshire (n=3)			1
KNP (n=14)	0.36	0.56	0.08
Yorkshire (n=8)			1
KY F1 (n=44)	0.02	0.68	0.30
KY F2 (n=306)	0.10	0.57	0.33
PIC commercial pigs (n=50)			1

Table 3. Association analyses of in6-C>T polymorphism of CYP2A6 gene with fatty-acid composition among Korean native pig x Yorkshire crossed F2 pigs.

Fatty-acid	n=202	CC	TC	TT	p-value
C16:0(Palmitic acid)	200	21.3345(0.2228)	21.3664(0.1756)	20.9737(0.4138)	0.6797
C16:1(Palmitoleic acid)	202	3.7059(0.2075)	4.0566(0.1640)	4.0045(0.3882)	0.4082
C18:0(Stearic acid)	202	11.0191(0.1908)	10.9028(0.1509)	10.5633(0.3570)	0.5303
Cis 9-C18:1(Oleic acid)	202	31.4038(0.6539)	32.1004(0.5170)	31.7944(1.2234)	0.7054
C18:2n6(Linoleic acid)	201	12.6428(0.7953)	12.8061(0.6316)	12.6318(1.4879)	0.9847
C20:0(Eicosanoic acid)	195	0.2401(0.01508)	0.2443(0.01198)	0.2043(0.02853)	0.432
C18:3n3(Alpha-linoleic acid)	165	0.5667(0.2041)	0.6584(0.1630)	0.4765(0.3886)	0.8822
C18:3n6(Gammalinolenic acid)	169	0.8171(0.05367)	0.8014(0.04142)	0.7416(0.0914)	0.7774
C20:1(Eicosenoic acid)	165	0.3795(0.03711)	0.3233(0.02885)	0.3756(0.06313)	0.4413
C20:2(Eicosadienoic acid)	197	0.5739(0.05762)	0.5620(0.04476)	0.5779(0.1082)	0.982
C20:3n6 (cis8,11,14-Eicosatrienoic acid)	183	0.5737(0.04920)	0.5157(0.09132)	0.3666(0.09132)	0.1368
C22:0(Behenic acid)	133	1.4173(0.2904)	0.9987(0.2173)	0.6799(0.4705)	0.335
C20:3n3 (cis11,14,17-Eicosatrienoic acid)	181	2.6778(0.2531)	2.3649(0.1993)a	1.2459(0.4572)b	0.0252

Significance level: ^{a,b}0.05.

1두만 발견되었다. 이는 한국재래돼지에서만 T 대립유전자 가 존재 하는 것으로 사료되며, 이를 추가적으로 일반 비율을 50두를 이용하여 유전자형을 분석한 결과에서도 모두 CC유전자형이 나타났다. 한국재래돼지에서 발견된 C 대립유전자의 작은 빈도로 존재하는 것은 과거 재래돼지개량에 있어서 타 품종 간의 교잡으로 유입된 결과이거나 재래돼지에서 낮은 빈도로 존재하는 유전적 변이로 사료된다.

2. CYP2A6유전자의 변이와 고기 내 지방산 형질 과의 연관성 분석

본 연구에서는 돼지의 지방산의 함량과 조성에 영향을 주는지를 조사하기 위해서 CYP2A6 유전자내에 in6-C>T 변이와 지방산 함량 및 조성의 연관성을 분석 하였다. 지방산함량과 CYP2A6-in6-C<T 변이와의 통계적 연관성 분석 결과 Eicosatrienoic acid(C20:3)함량이 유전자형에 따라 유의적인 차이가 있는 것으로 관찰되었다($p<0.0252$). CC type 은 2.68 ± 0.25 로 나타났으며 CT type은 2.37 ± 0.20 으로 나타났으며 TT type 은 1.25 ± 0.46 으로 상가적인 유전자형 효과가 관찰되었다.

Eicosatrienoic acid(C20:3)는 오메가 3지방산인 필수 지방산의 하나로써 우리 몸 자체에서 생성할 수 없다. 그러므로 음식을 통해서 섭취 가능한 지방산이지만 그 양을 많이 섭취했을 경우 혈관 내 염증을 일으켜서 고혈압이나 동

맥경화 등의 질병을 일으킬 수 있는 것으로 보고되었다(Lee 등, 1997). Eicosatrienoic acid(C20:3)는 Arachidonic acids(C20:4) 서로 상호작용을 하며 그 비율이 적정한 비율로 섭취하여야 이상적이며 이를 과 섭취할 경우 그 영양소간의 불균형을 초래하게 되어 우리 몸에 유해하게 된다. Choi 등(2008) 의 보고에 따르면 Yorkshire 품종은 Eicosatrienoic acid(C20:3)와 Arachidonic acids(C20:4)의 비율이 2배에서 3배의 함량으로 불균형을 일으킬 수 있지만 한국재래돼지는 비율이 1:1 비율로써 이상적인 Eicosatrienoic acid(C20:3)와 Arachidonic acids(C20:4) 섭취비율로 시사하였다. 본 연구에서는 Arachidonic acids(C20:4)의 함량이 조사되지 않았지만, CYP2A6 유전자가 Eicosatrienoic acid(C20:3)에 영향을 주는 것은 규명되었다. 본 연구를 바탕으로 Cytochrome P450 유전자그룹의 추가적인 연구가 이루어져야 할 것이며, 한국재래돼지의 품질 차별화를 위해 지방산조성에 영향을 미치는 한국재래돼지 특이적인 유전적 표지인자로 본 연구결과가 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

IV. 결 론

아라기돈산은 다양한 생리현상에 관여하고 있는 프로스터글란딘의 전구물질인데 선행연구에서 Cytochrome P450 한국재래돼지와 요크셔 품종의 지방조직 내에 함유된 아라

키돈산 함량의 차이에 영향을 주는 유전자로서 CYP3A4, CYP2UI 그리고 CYP2A6등 3개의 유전자의 발현양상은 아라키돈 지방산 함량에 따라 명확한 차이를 보였다. 본 연구에서는 Cytochrome P450중 추가적으로 지방산 조성에 연광성이 있는 후보 CYP2A6유전자를 염기서열 분석으로 밝혀진 intron 6번과 7번에서 2개의 SNP 가운데, intron 6번 변이의 품종별 빈도 분석을 수행하여 한국재래돼지는 T 대립유전자를 높은 빈도로 나타나 있었으며, 요크셔풀종 및 개량종은 C변이가 고정 되어있었다. 또한 CYP2A6-in6-C>T 유전자변이와 고기 내 지방산 조성과의 연관성 분석에서는 아이코사노이드의 함량에 영향을 줄 수 있는 것으로 사료되며 추가적인 연구가 이루어져야 할 것이다. 본 연구결과는 한국재래돼지가 보유한 생리적 특성을 유전학적 연구 소재로 활용하여, 유용유전자의 발굴에 이용될 수 있는 가능성을 제시하였다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2010년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었습니다.

참 고 문 헌

- Ayajiki KH, Fujioka N, Toda S, Okada Y, Minamiyama S, Imaoka, Y. Funae S, Watanabe A, Okamura T. 2003. Mediation of arachidonic acid metabolite(s) produced by endothelial Cytochrome P-450 3A4 in monkey arterial relaxation. *Hypertens. Res.* 26: 237-243.
- Chen GR, Cue K, Lundstrom JD, Doran O. 2008. Regulation of CYP2A6 Protein Expression by Skatole , Indole, and Testicular Steroids in Primary Cultured Pig. Hepatocytes. *Drug. Metab. Dispos.* 36: 56-60.
- Choi KM, Moon JK, Choi SH, Kim KS, Choi YI, Kim JJ, Lee CK. 2008. Differential Expression of Cytochrome P450 Genes Regulate the Level of Adipose Arachidonic Acid Sus Scrofa. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 21: 967-971.
- Chuang SS, Helving C, Taimi M, Ramshaw HA, Collop AH, Amad M, White JA, Petkovich M, Jones G, and Korczak B. 2004. CYP2UI, a novel human thymus- and brain-specific Cytochrome P450, catalyzes omega- and (omega-1)-hydroxylation of fatty acids. *J. Biol. Chem.* 279: 6305-6314.
- Kim TH, Choi BH, Chang GW, Lee KT, Lee HY, Lee JH, Kim KS, Park CK, Moran C. 2005. Molecular characterization and chromosomal mapping of porcine adipose differentiation related protein (ADRP). *J. Anim. Breed. Genet.* 122: 240-246.
- Kim EH, Choi BH, Kim KS, Lee CK, Cho BW, Kim TH, Kim JJ. 2007. Detection of medelian and parent-of-origin quantitative trait loci in a cross between Korean native pig and Landrace I. Growth and body composition traits. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 20: 669-676.
- Lee HA, Yoo IJ, Lee BI. 1997. Research and development trends on omega-3 fatty acid fortified foodstuffs. *Korean J. Food. Sci.* 26: 161-174. [in Korean]