

## 두록 정자 운동학적 특성과 후보유전자 CD9 유전자와의 연관성 분석

정용대<sup>1,\*</sup>, 정진영<sup>1,\*</sup>, 김기현<sup>1,\*</sup>, 조은석<sup>1</sup>, 유동조<sup>1</sup>, 최정우<sup>2</sup>, 장현준<sup>3</sup>, 박성권<sup>4</sup>, 사수진<sup>1,†</sup>, 우제석<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립축산과학원 <sup>2</sup>강원대학교 동물생명과학대학 <sup>3</sup>단국대학교 약학대학  
<sup>4</sup>세종대학교 생명과학대학 식품생명공학과

## Association study analysis of CD9 as candidate gene for Duroc pig sperm motility and kinematic characteristics

Yong-dae Jeong<sup>1,\*</sup>, Jin-Young Jeong<sup>1,\*</sup>, Ki-Hyun Kim<sup>1,\*</sup>, Eun-Seok Cho<sup>1</sup>, Dong-Jo Yu<sup>1</sup>,  
Jung-Woo Choi<sup>2</sup>, Hyun-Jun Jang<sup>3</sup>, Sungk-won Park<sup>4</sup>, Soo-Jin Sa<sup>1,†</sup>, Jae-Seok Woo<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, <sup>2</sup>College of Animal Life Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea, <sup>3</sup>College of Pharmacy, Dankook University, 119 Dandae-ro, Cheonan, Chungnam 330-714, Republic of Korea, <sup>4</sup>Department of Food Science & Technology, Sejong University, Seoul 05006, Republic of Korea

### ABSTRACT

Cluster-of-differentiation antigen 9 (CD9) gene expressed in the male germ line stem cells is crucial for sperm - egg fusion, and was therefore selected as a candidate gene to investigate Duroc boar semen motility and kinematic characteristics. This study was performed to investigate their association with semen motility and kinematic characteristics. DNA samples from 96 Duroc pigs with records of sperm motility and kinematic characteristics [Total motile spermatozoa (MOT, 82.27±5.58), Curvilinear velocity(VCL, 68.37±14.58), Straight-line velocity(VSL, 29.06±6.58), the ratio between VSL and VCL(LIN, 47.36±8.42), Amplitude of Lateral Head displacement(ALH, 2.88±0.70)] were used in present study. A single nucleotide polymorphism (g.358A>T) in intron 6 was associated with MOT, VCL, VAP and ALH in Duroc population ( $p < 0.05$ ). Therefore, we suggest that the porcine CD9 may be used as a molecular marker for Duroc boar semen quality, although its functional effect was not clear yet. These results will improve the understanding of the functions of the CD9 in spermatogenesis within the reproductive tracts, and will shed light on CD9 as a candidate gene in the selection of good sperm quality boars.

(Key word: Cluster-of-differentiation antigen 9, Boar sperm motility and kinematic characteristics, Polymorphism)

### 서 론

돼지 번식에 있어 인공수정은 양돈산업에 있어 아주 중요한 수단이다. 돼지 인공수정은 자연교배와는 달리 수돼지의 능력을 손쉽게 후대에 전달할 수 있고 외부 질병으로부터 자연교배보다는 덜 위험하다(Maes et al., 2008). 인공수정은 세계적으로 매년 늘어나는 추세에 있으며 국내에 인공수정 보급률은 90%에 이른다. 국내 인공수정은 주로 신선한 액상정액을 사용하고 있다. 그 이유 중의 하나는 신선한 액상정액이 수태율이 높고 그것이 높다는 것은 경제동물(돼지)에 있어서 가장 중요한 생산성이 높다는 말이다 즉, 품질 좋은 액상정액

을 사용해야 돼지 번식에 있어서 가장 중요한 생산성을 높이는 효과를 가져 올 수 있다. 이렇듯 국내에서는 액상정액의 품질에 높은 관심을 가지고 있다. 정액의 품질을 결정하는데 가장 중요한 요인은 정자의 운동학적 특성이 좋고 나쁨에 따라서 결정 되어진다. 특히 정자의 활동성은 액상정액 품질을 결정하는데 중요한 역할을 한다. 최근 선진국에서는 액상정액의 품질이 좋은 개체를 선발 하려는 많은 연구가 진행되고 있고, 그 중에서도 돼지의 유전적 다형성에 따른 정액의 품질과의 연관성을 분석한 연구가 많이 진행되고 있다(Thurston et al., 2002; Fraser et al., 2008; Gunawan et al., 2011; Gunawan et al., 2012; Kaewmala et al 2012; Zeng et al., 2014; Diniz

\* These authors contributed equally to this paper

† Corresponding authors contributed equally to this paper

† Corresponding author: Soo-Jin Sa, Jae-Seok Woo

Tel: +82-41-580-3457

E-mail: segi0486@korea.kr

et al., 2014). 그 중 2011년 Kaewmala 등의 보고에 따르면 Cluster-of-differentiation antigen 9 (CD9) 유전자의 358번째 염기가 A에서 T로 변이가 일어남에 따라 정자의 전체 운동성에 변화가 있다고 발표 하였다(Kaewmala et al., 2011). CD9 단백질은 transmembrane 4의 슈퍼패밀리로 알려져 있고 정원 줄기세포 및 여러 세포에서 발현된다고 보고 되었다(Horejsi and Vlcek, 1991; Klassen et al., 2001; Oka et al., 2002). 또한 세포의 이동, 부착, 전이 등 여러 세포과정에 관여하고 쥐에서 수컷의 생식 줄기세포의 마커로 활용되어진다고 보고 하였다(Boucheix et al., 2001; Kanatsu-Shinohara et al., 2004). 그리고 포유동물에서 정자와 난자의 융합에 필요한 중요한 단백질이다(Le Naour et al., 2000). 돼지에서 CD9 유전자는 5번 염색체 q25위치에 존재하며 이 지역은 돼지의 고환 무게에 대한 QTL(quantitative trait loci)로 알려져 있다(Yuberoa et

al., 2003; Ren et al., 2009).

따라서 본 연구에서는 CD9 유전자를 정액의 운동학적 특성에 관련된 후보 유전자로 추측하였고 SNP를 유전자형분석을 통하여 분류하였고, 본 연구에서 사용된 액상정액의 운동학적 특성과 연관성 분석을 하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 정액 채취

수태지들은 농촌진흥청 국립축산과학원에서 동일한 품종 동일한 환경조건 하에서 사육되었다. 공식축은 2012년에서 2015년까지 1.5~2년생의 성숙한 두루 수태지 96두를 사용하였으며, 정액 채취는 의빈대를 이용한 수압법을 이용하였다.

Table 1. Means, standard deviation (S.D.), sample size, ranges of traits in Semen parameters of Duroc boars

Traits	Mean	SD	Min	Max
MOT (%)	82.27	5.58	71.48	92.36
VCL (um s <sup>-1</sup> )	68.37	14.58	43.93	106.93
VSL (um s <sup>-1</sup> )	29.06	6.58	16.43	56.29
VAP (um s <sup>-1</sup> )	47.52	10.80	29.97	79.18
LIN (VSL/VCL)	47.36	8.42	32.27	70.31
ALH (um)	2.88	0.70	1.65	4.60

Abbreviations: SD, standard deviation; MOT, Yielded Sperm motility; VCL, Curve Linear Velocity; VSL, Straight Line Velocity; VAP, Average Path Velocity; LIN, linearity; ALH, Amplitude of Lateral Head displacement

Table 2. Allele and genotype frequencies of CD9 polymorphisms in Duroc boars

SNP position	Genotype frequency (n=96)			Allele frequency	
	AA (n=50, 0.52)	AT (n=36, 0.37)	TT (n=10, 0.11)	A (0.71)	T (0.29)
g.358A>T					

The number of genotyped animals and genotype frequency are shown in parentheses.

Table 3. Associations between SNP of porcine CD9 and semen parameters

Gene	Traits	Genotype			P-value
		AA (n=50)	AT (n=36)	TT (n=10)	
CD9	MOT(%)	82.21±5.40 <sup>a</sup>	82.12±78.15 <sup>a</sup>	78.15±5.70 <sup>b</sup>	0.0302*
	VCL(um/s)	69.09±14.59 <sup>a</sup>	70.41±14.72 <sup>a</sup>	57.64±9.74 <sup>b</sup>	0.0427*
	VSL(um/s)	29.55±6.19	29.48±7.53	25.18±2.95	0.1425
	VAP(um/s)	48.33±10.79 <sup>a</sup>	48.59±11.19 <sup>a</sup>	39.65±5.89 <sup>b</sup>	0.0498*
	LIN(VSL/VCL)	47.80±7.86	46.66±9.46	47.76±7.80	0.8184
	ALH(um)	2.95±0.70 <sup>a</sup>	2.95±0.70 <sup>a</sup>	2.32±0.53 <sup>b</sup>	0.0246*

Abbreviations: MOT, Yielded Sperm motility; VCL, Curve Linear Velocity; VSL, Straight Line Velocity; VAP, Average Path Velocity; LIN, linearity; ALH, Amplitude of Lateral Head displacement.

<sup>1</sup> Values are expressed as least squares means and standard errors.

<sup>a,b</sup> Least square means with different superscripts in the same row differ

\*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$

본 연구에 사용된 정액은 정자 운동성과 형태학적으로 정상인 정자의 비율이 80% 이상인 사출정액만을 이용했다 채취한 정액은 정액필터를 통해 1차적으로 걸러진 정액을 37℃ BTS (Beltsville thawing solution)와 1 : 1 비율로 희석하여 신속히 실험실로 운반하였다.

#### 정자 운동학적 특성 분석

정자 운동성(MOT, Motility)은 computer-assisted semen analysis system (SAIS SI-100, Medical Supply, Korea)를 사용하여 평가하였다 정자샘플은 BTS로 희석하여 30×10<sup>6</sup> cells/ml 농도로 준비하였다 5 μl의 정자샘플을 38℃로 가온된 pre-wormed markler counting chamber(Sefi-Medical Instruments, Israel)에 올려놓고 샘플 당 최소 100마리의 정자를 평가하였으며, 분석은 4회 이상 실시하였다 각 정자 샘플의 전체 운동성(TMS, Total motile spermatozoa, %), 곡선속도(VCL, Curvilinear velocity, um/s), 직선속(VSL, Straight-line velocity, um/s), 평균이동속도(VAP, Average path velocity), 직진성(LIN, e.g., the ratio between VSL and VCL), ALH(Amplitude of Lateral Head displacement)를 포함하는 운동학적 특성들을 측정했다 두록 96두 에 대한 정액에 대한 평가결과는 table 1에 제시하였다.

#### Direct sequencing 및 유전자형 분석

Sequencing을 하기 위한 genomic DNA는 수태지의 혈액에서 Wizard Genomic DNA Purification Kit를 사용하여 제조사의 방법을 약간 변형하여 분리 하였다(Promega, Madison, WI, USA). direct sequencing을 위하여 두록 수태지 96두의 DNA를 이용하여 PCR(Polymerase chain reaction)을 수행하였다. PCR은 10pml의 primer, 0.25mM dNTP, 10X PCR buffer, 1.25u DNA polymerase(Genet Bio, Chungnam, Korea)와 100ng의 DNA를 포함하여 20ul의 부피에서 수행하였다 PCR 조건은 94℃에서 30초, 64℃에서 30초 그리고 72℃에서 45초를 수행하였고 DNA Engine Tetrad® 2 Thermal Cycler(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 총 35반복으로 PCR을 수행하였다. PCR 수행 후 염기서열 분석을 위하여 Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit V3.0 (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA)와 ABI PRISM® 3730 Genetic Analyzer (Life Technologies Corp.)를 이용하여 염기서열 분석을 하였고 SeqMan program (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA)을 이용하여 SNP(Sngle nucleotide polymorphism)를 비교하여 유전자형을 결정하였다. 염기서열분석에 이용된 primer는 이전 논문에 나와 있는 5'- taatgggggaagtggaaaca -3' and 5'- cgccaatgatgtggaactt -3' 를 사용하였다(Kaewmala et al., 2011).

#### 통계 분석

연관성분석은 SAS 9.13(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)의 generalized linear model(GLM)을 이용하였으며 유전자형의 효과와 경제형질들에 대해 최소 유의차 검정으로 평균간 차이에 대한 유의성을 조사하였다 통계분석에 이용한 모형은 다음과 같다

$$Y_{ijkl} = \mu + G_i + S_j + P_l + e_{ijkl}$$

$Y_{ijkl}$ 는 관측치,  $\mu$  전체의 평균,  $G$  유전자형 효과,  $S_j$  성별의 효과,  $P_l$  정액채취기간,  $e_{ijkl}$  임의오차를 나타내며 유전자형 효과, 성별의 효과, 정액채취기간은 고정효과로 사용되었다 그리고 유의적 차이는  $P < 0.01$  와  $P < 0.05$ 로 표시 하였다.

### 결과 및 고찰

본 연구에서는 정자의 운동성과 연관이 있다고 추측되는 후보유전자 CD9의 SNP를 확인하여 두록 96두에 대해 유전자형을 분석하고 액상정액의 운동학적 특성과 연관성이 있는지 알아 보고자 하였다. 두록 96두의 유전자형을 분석한 결과 table 2와 같이 AA, AT 및 TT 유전자형의 빈도는 각각 0.52, 0.37 그리고 0.11이었다. 그리고 A 대립유전자가(0.71)가 T 대립유전자(0.29)보다 빈도가 훨씬 높으므로 나타났다 Kaewmala 등의 논문에서는 피어트레인과 교잡종 피어트레인X 햄프셔)를 이용하여 동일한 SNP를 확인 하였고, 그 빈도는 동형접합체 (A/A, T/T) 유전자형 빈도가 가장 높았다(Kaewmala et al., 2011). 본 연구에서 비록 많은 수의 두록을 이용할 수 없었지만 AA형의 빈도가 높았지만 TT형의 빈도는 AT보다 낮은 빈도를 보였다.

두록 96두의 유전자형을 확인하여 액상정액의 6가지 운동학적 특성과 연관성을 분석한 결과 table 3과 같이 MOT, VCL, VAP 그리고 ALH 4가지 운동학적 특성에서 유의성을 확인 할 수 있었다( $p > 0.05$ ). 이전 논문에서도 본 연구결과와 일치하게 g.358 A > T SNP가 MOT에서 높은 유의성을 가진다고 보고 하였고, 정자의 농도와는 연관성이 없는 것으로 나타났다(Kaewmala et al., 2011). 하지만 2007년 Daghig-Kia의 보고에 의하면 소에서 CD9의 유전적 다형성이 정자의 활성도와 정자의 농도에 긍정적인 효과를 나타낸다고 하였다 불행히도 본 연구에서는 정자의 농도에 관련된 데이터가 미비하여 정자의 농도에 관련된 연관성은 분석하지 못하였다 하지만 본 연구에서는 CD9 유전자의 SNP는 인트론 부위였고 이러한 유전적 변이가 정자 품질에 어떻게 영향을 미치는지 결론을 내리기 어려웠다 SNP와 관찰된 특성의 연관성은 initial transcription, editing and polyadenylation of the pre-

mRNA, translation and decay of the mRNA product를 포함한 mRNA metabolism에 관한 인트론의 영향에 의해 설명될 수도 있다(Le et al. 2003). 또한, 유전자 및 조직 특이적 발현 패턴의 발현 수준을 조절하는 인트론들의 역할에 관한 보고서들의 수가 증가하고 있다(Jiang et al., 2000; Virts and Raschke, 2001; Pagani and Baralle, 2004).

본 연구에서는 CD9 의 g.358 A > T SNP가 두록 액상정액의 정자 운동성과 연관성이 높다고 판단 하였다. 하지만 이러한 연구들이 앞으로 품종 특이적인 효과와 다른 집단에서도 연구들이 고려되어야 할 것이다. 그리고 국내에서 많은 수의 수퇘지 보유할 수 없기 때문에 연구자 간의 협업도 필요할 것으로 생각되어진다. 결론적으로 이러한 연구는 돼지의 액상정액 품질을 결정할 수 있는 기초적인 자료로 활용 가능할 것 인라고 사료된다.

## 사 사

This work was supported by a grant from the Next-Generation BioGreen 21 Program (No. PJ01119102), Rural Development Administration, Republic of Korea; and the 2016 Post-doctoral Fellowship Program of the Rural Development Administration, Republic of Korea.

## REFERENCES

- Boucheix C, Duc GHT, Jasmin C, Rubinstein E. 2001. Tetraspanins and malignancy. Expert reviews in molecular medicine 3:1-17.
- Daghigh-Kia H. 2007. Identification and SNP detection for preimplantation active genes and their association with embryo development and male fertility in cattle: PhD Thesis. Institute of Animal Science, Animal Breeding and Husbandry Group, University of Bonn, Bonn, Germany.
- Diniz D, Lopes M, Broekhuijse M, Lopes P, Harlizius B, Guimarães S, Duijvesteijn N, Knol E, Silva F. 2014. A genome-wide association study reveals a novel candidate gene for sperm motility in pigs. Animal reproduction science 151:201-207.
- Fraser L, Pareek CS, Strzerek J. 2008. Identification of amplified fragment length polymorphism markers associated with freezability of boar semen-a preliminary study-in English. Medycyna Weterynaryjna 64:646.
- Gunawan A, Cinar M, Uddin M, Kaewmala K, Tesfaye D, Phatsara C, Tholen E, Looft C, Schellander K. 2012. Investigation on association and expression of ESR2 as a candidate gene for boar sperm quality and fertility. Reproduction in domestic animals 47:782-790.
- Gunawan A, Kaewmala K, Uddin MJ, Cinar MU, Tesfaye D, Phatsara C, Tholen E, Looft C, Schellander K. 2011. Association study and expression analysis of porcine ESR1 as a candidate gene for boar fertility and sperm quality. Animal reproduction science 128:11-21.
- Hořejši V. and Vlček C. 1991. Novel structurally distinct family of leucocyte surface glycoproteins including CD9, CD37, CD53 and CD63. FEBS letters 288:1-4.
- Jiang Z, Cote J, Kwon,Goate AM, Wu JY. 2000. Aberrant splicing of tau pre-mRNA caused by intronic mutations associated with the inherited dementia frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17. Molecular and cellular biology 20:4036-4048.
- Kaewmala K, Uddin M, Cinar M, Große Brinkhaus C, Jonas E, Tesfaye D, Phatsara C, Tholen E, Looft C, Schellander K. 2012. Investigation into Association and Expression of PLCz and COX 2 as Candidate Genes for Boar Sperm Quality and Fertility. Reproduction in domestic animals 47:213-223.
- Kaewmala K, Uddin MJ, Cinar MU, Große-Brinkhaus C, Jonas E, Tesfaye D, Phatsara C, Tholen E, Looft C, Schellander K. 2011. Association study and expression analysis of CD9 as candidate gene for boar sperm quality and fertility traits. Animal reproduction science 125:170-179.
- Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, Baba S, Kato T, Kazuki Y, Toyokuni S. 2004. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. Cell 119:1001-1012.
- Klassen H, Schwartz MR, Bailey AH, Young MJ. 2001. Surface markers expressed by multipotent human and mouse neural progenitor cells include tetraspanins and non-protein epitopes. Neuroscience letters 312:180-182.
- Le Hir H, Nott A, Moore MJ. 2003. How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. Trends in biochemical sciences 28:215-220.
- Le Naour F, Rubinstein E, Jasmin C, Prenant M, Boucheix C. 2000. Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. Science 287:319-321.
- Maes D, Nauwynck H, Rijsselaere T, Mateusen B, Vyt P, de

- Kruif A, Van Soom A. 2008. Diseases in swine transmitted by artificial insemination: an overview. *Theriogenology* 70:1337-1345.
- Oka M, Tagoku K, Russell TL, Nakano Y, Hamazaki T, Meyer EM, Yokota T, Terada N. 2002. CD9 is associated with leukemia inhibitory factor-mediated maintenance of embryonic stem cells. *Molecular biology of the cell* 13:1274-1281.
- Pagani F, Baralle FE. 2004. Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nature Reviews Genetics* 5:389-396.
- Ren D, Ren J, Xing Y, Guo Y, Wu Y, Yang G, Mao H, Huang L-S. 2009. A genome scan for quantitative trait loci affecting male reproductive traits in a White Duroc× Chinese Erhualian resource population. *Journal of animal science* 87:17-23.
- Thurston LM, Siggins K, Mileham AJ, Watson PF, Holt WV. 2002. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biology of Reproduction* 66:545-554.
- Virts EL and Raschke WC. 2001. The role of intron sequences in high level expression from CD45 cDNA constructs. *Journal of Biological Chemistry* 276:19913-19920.
- Yubero N, Jiménez-Marín A, Yerle M, Morera L, Barbancho M, Llanes D and Garrido J. 2003. Molecular cloning, expression pattern and chromosomal mapping of pig CD9 antigen. *Cytogenetic and genome research* 101:143-146.
- Zeng C, He L, Peng W, Ding L, Tang K, Fang D, Zhang Y. 2014. Selection of optimal reference genes for quantitative RT-PCR studies of boar spermatozoa cryopreservation. *Cryobiology* 68:113-121.

---

Received September 09, 2016, Revised September 23, 2016,  
Accepted September 29, 2016