

두록 정자의 운동학적 특성과 후보 유전자 ESR2 유전적 다형성과의 연관성 분석

정용대^{1,*}, 정진영^{1,*}, 사수진^{1,*}, 김기현¹, 조은석¹, 유동조¹, 최정우², 장현준³, 우제석^{1,†}, 박성권^{4,†}

¹농촌진흥청 국립축산과학원 ²강원대학교 동물생명과학대학 ³단국대학교 약학대학
⁴세종대학교 생명과학대학 식품생명공학과

Investigation on Association of ESR2 polymorphism as a Candidate Gene for Duroc sperm motility and kinematic characteristics

Yong-dae Jeong^{1,*}, Jin-Young Jeong^{1,*}, Soo-Jin Sa^{1,*}, Ki-Hyun Kim¹, Eun-Seok Cho¹, Dong-Jo Yu¹,
Jung-Woo Choi², Hyun-Jun Jang³, Jae-Seok Woo^{1,†}, Sungk-won Park^{4,†}

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

ABSTRACT

For evaluating the boar semen quality, sperm motility (MOT) is an important parameter because the movement of spermatozoa indicates active metabolism, membrane integrity and fertilizing capacity. Estrogen receptors 2(ESR2) is involved in estrogen related apoptosis in cell cycle spermatogenesis, but their functions have not been confirmed in pig until now. Therefore, this study was conducted to analyze their association with sperm motility and kinematic characteristics. DNA samples from 105 Duroc pigs with records of semen motility and kinematic characteristics [Total motile spermatozoa (MOT), Curvilinear velocity(VCL), Straight-line velocity(VSL), the ratio between VSL and VCL(LIN), Amplitude of Lateral Head displacement(ALH)] were analyzed. A SNP in coding region of ESR2 g.35547A > G in exon 5 was associated with MOT ($p < 0.05$) in Duroc population. Therefore, we suggest that the porcine ESR2 gene may be used as a molecular marker for Duroc boar semen quality, although its functional effects were not defined yet. These results might shed new light on the roles of ESR2 in spermatogenesis as candidate gene for boar fertility, but still the lack of association across populations should be considered.

(Key word: Estrogen Receptor 2, Boar sperm motility and kinematic characteristics, Polymorphism)

서 론

양돈산업에서 돼지 인공수정은 중요한 기술 중 하나이다. 인공수정은 자연교배에 비해 질병을 유발하는 외부감염원 차단에 용이하며 수태지의 우수한 능력을 후대에 안전하게 전달할 수 있다(Maes et al., 2008). 국내의 인공수정 보급률은 90%가 넘으며 주로 액상정액을 활용하고 있다. 우수한 품질의 액상정액은 수태율을 향상시킬 수 있어 인공수정의 장점을 극대화할 수 있다. 하지만, 액상정액의 품질은 개체 및 품

종간 변이가 크므로 고품질의 정액을 생산하는 개체의 선발은 품질에 주요한 영향을 미친다. 그리고, 정자의 운동성은 액상정액의 품질을 결정하는 지표로서 사용되고 있다. 최근 선진국에서는 액상정액의 품질이 좋은 개체를 선발하려는 많은 연구가 진행되고 있으며, 그 중에서 돼지의 유전적 다형성과 정액의 품질은 상호간 연관성이 있음이 보고되고 있다 (Gunawan et al., 2012; Kaewmala et al., 2011; Chen et al., 2014; Zeng et al., 2014; Diniz et al., 2014).

에스트로젠 수용체(estrogen receptor, ESR)는 여성 또는 암

* These authors contributed equally to this paper

† Corresponding authors contributed equally to this paper

† Corresponding author: Jae-Seok Woo, Sungk-won Park

Tel: +82-41-580-3457

E-mail: segi0486@korea.kr

컷에게 중요한 역할을 하며 또한 남성 또는 수컷에서도 생식 기능의 조절에 관여한다고 알려져 있다(Zhou et al. 2002). 특히 ESR 유전자를 knockout 시킨 쥐는 비정상적 정자형성과정이 유도됨을 보고되어 웅성개체의 번식생리에서 역할의 중요성을 나타내었고(Eddy et al., 1996), 최근에는 인간 뿐만 아니라 쥐, 개, 고양이, 원숭이 등의 정자의 농도 및 불임 등 생식 능력과도 연관성이 있다고 보고되었다(Selva et al. 2004; Hess et al. 1997; Saunders et al. 1997; Nie et al. 2002; Zhou et al. 2002; Rago et al. 2007 and Saunderson et al. 2001). 한편, ESR beta(ESR2) 유전자의 35547번째 염기가 A에서 G로 변이는 정자의 운동성에서 영향을 미쳤다고 보고되었다(Gunawan et al., 2012). 돼지에서 ESR2 유전자는 1번 염색체 p22-27에 존재하고(Munoz et al. 2004), 이 좌위는 후보돈의 유두수와 정자의 농도 및 정자의 운동성에 관한 QTL(quantitative trait loci) 이라고 보고되었다(Cassady et al. 2001; Xing et al., 2008). 하지만, 돼지 정액의 운동성과 ESR2 유전자에 관련된 연구는 상대적으로 제한적이다

따라서 본 연구에서는 돼지의 액상정액 운동성과 관련성이 높을 것이라고 판단되어서는 ESR2 유전자의 유전자형을 분석하여 유전적 다형성을 확인하였고 유전자형에 따른 액상정액의 운동학적 특성을 비교분석하고자 수행하였다

재료 및 방법

정액 채취

수퐁지들은 농촌진흥청 국립축산과학원에서 동일한 품종 동일한 환경조건 하에서 사육되었다. 공시축은 2012년에서 2015년까지 1.5~2년생의 성숙한 두록 수퐁지 105두를 사용하였으며, 정액 채취는 의빈대를 이용한 수압법을 이용하였다. 본 연구에 사용된 정액은 정자 운동성과 형태학적으로 정상인 정자의 비율이 80% 이상인 사출정액만을 이용했다. 채취한 정액은 정액필터를 통해 1차적으로 걸러진 정액을 37°C 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 30×10^6 cells/ml 농도로 준비하였다. 5 μ l의 정자샘플을 38°C로 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(MOT,

total motile spermatozoa, %), 곡선속도(VCL, Curvilinear velocity, μ m/s), 직선속도(VSL, Straight-line velocity, μ m/s), 평균 이동속도(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

Direct sequencing 및 유전자형 분석

Genomic DNA 분리는 공시동물의 혈액에서 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하였고 제조사에서 제공하는 분리방법을 일부 변형하여 다음과 같이 실시하였다. 300 μ l 전혈과 900 μ l cell lysis solution를 inverting을 통해 혼합시키 뒤, 상온에서 10분동안 incubation 하였으며 14,000rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상층액 제거 후, 300 μ l nuclei lysis solution을 첨가하고 resuspension 한 뒤에 37°C에서 1시간동안 incubation하였다. 그리고 100 μ l protein precipitation solution을 넣고 혼합하고 14,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 분리된 상층액은 1.5 ml 튜브에 수집 후, isopropanol은 첨가 뒤 inversion하고 14,000 rpm에서 3분간 원심분리 처리하였다. 흰펄렛을 제외한 상층액을 부드럽게 흡입 후 70% 에탄올을 이용해 washing하였고 14,000 rpm에서 1분간 원심분리한 뒤 상층액을 제거했다. 100 μ l DNA rehydration solution 첨가하고 4°C에서 overnight한 뒤 DNA 시료로 사용하였다.

direct sequencing을 위하여 두록 수퐁지 105두의 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°C에서 30초, 64°C에서 30초 그리고 72°C에서 45초를 수행하였고 DNA Engine Tetrad® 2 Thermal Cycler(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 총 35 cycle로 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 논문에서 나와있는 5' - GACAGCTTCCTGCAGATTC -3' and 5' - TTCATCATGCCACTTCGTA -3' 를 사용하였다(Gunawan et al., 2012).

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, μ 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 정액의 운동학적 특성과 연관성이 있다고 생각되어지는 후보 유전자 ESR2 유전자의 SNP를 확인하고 두록 105두에 대해 유전자형을 분석하고 액상정액의 운동학적 특성과 연관성을 알아 보고자 하였다. 정액의 운동학적 특성은 평균값으로 나타내었다 (Table 1). MOT는 81.91%이며 VCL, VSL 및 VAP는 각각 68.01, 28.69 그리고 46.91 $\mu\text{m s}^{-1}$ 로 측정되었다. 정자의 직진운동성 나타내는 LIN (VSL/VCL)은 47.2이며 ALH는 2.88 μm 으로 나타났다. 운동성 관련 조사 항목간 직접적 비교는 할 수 없지만 표준편차, 최대값 및 최소값의 큰 범위는 개체간 변이가 존재함을 의미하므로 유전적 다형성이 정액 운동학적 특성을 설명하기에 적합한 지표

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

Traits	Mean	SD	Min	Max
MOT (%)	81.91	6.20	64.18	92.36
VCL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	68.01	15.73	42.13	113.53
VSL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	28.69	6.49	16.43	52.29
VAP ($\mu\text{m s}^{-1}$)	46.91	10.99	29.97	79.18
LIN (VSL/VCL)	47.20	8.48	28.61	70.31
ALH (μm)	2.88	0.77	1.65	5.59

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 ESR2 polymorphisms in Duroc boars

SNP position	Genotype frequency (n=105)			Allele frequency	
	AA (n=79, 0.75)	AG (n=17, 0.16)	GG (n=9, 0.09)	A (0.83)	G (0.17)
g.35547A>G					

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

Table 3. Associations between SNP of porcine ESR2 and semen parameters

Gene	Traits	Genotype			P-value
		AA (n=79)	AG (n=17)	GG (n=9)	
ESR2	MOT(%)	82.61±2.81 ^a	78.50±3.99 ^a	71.89±2.28 ^b	0.0482 [*]
	VCL($\mu\text{m/s}$)	69.55±16.65	61.14±9.66	62.11±6.53	0.1170
	VSL($\mu\text{m/s}$)	28.83±6.76	28.93±5.93	26.46±3.75	0.6469
	VAP($\mu\text{m/s}$)	47.95±11.41	43.08±8.95	41.53±5.77	0.1348
	LIN(VSL/VCL)	46.54±8.79	51.63±6.42	47.05±5.89	0.1307
	ALH(μm)	2.94±0.82	2.59±0.51	2.72±0.44	0.2583

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.

¹ Values are expressed as least squares means and standard errors.

^{a,b} Least square means with different superscripts in the same row differ

* $p<0.05$

일지도 모른다 후보 유전자 ESR2 유전자의 SNP를 확인한 결과, 이전 논문과 동일하게 g.35547 A > G 위치에서 SNP가 확인되었다(인용문헌). 두록 105두의 유전자형을 분석한 결과 table 2와 같이 AA, AG 및 GG 유전자형의 빈도는 각각 0.79, 0.17 그리고 0.09로 계산되었다. 그리고 A 대립유전자가(0.83) G 대립유전자(0.17)보다 빈도가 매우 높은 것으로 나타났다 Gunawan 등 (2012)은 피어트레인 교잡종피어트레인 x 햄프셔)내 동일한 좌위상에서 SNP를 확인하였고, 그 유전자형의 빈도는 AA형 빈도가 가장 높았다고 보고하였으며 이러한 선행연구결과는 본 연구와 일치하였다 유전자형이 확인된 두록 105두의 정액의 운동학적 특성과 유전적 다형성간 연관성 분석을 한 결과, MOT에서만 유의성을 나타내었다(Table 3, $p < 0.05$). 비록 나머지 운동성 지표에서는 통계적인 차이는 나타나지 않았지만 A 대립유전자를 보유하고 있는 개체에서 높은 수치를 나타냈다. 이러한 결과는 이전 논문과 일치 하였다(Gunawan et al., 2012). Aschim 등(2005)은 인간에서 ESR2 유전자의 1082 G>A 다형성이 남성의 불임과 연관성이 있다고 보고하였다. 하지만 본 연구에서는 ESR2 유전자의 기능적 부분이 구명하지 않았을 뿐만 아니라 분석 개체수도 많지 않아서 ESR2 유전자의 g.35547 A > G 변이가 정자의 운동학적 특성에 명확하게 영향을 미친다고 할 수 없다. 그러나, 이전 연구에서 g.35547 A > G 변이가 액상영역에 존재하면서 아미노산을 치환(메티오닌→발린)한다는 보고(Munoz et al. 2007)와 이러한 다형성은 ESR2 mRNA와 이차구조에 직접적인 영향을 미칠수 있다는 보고(Iida and Akashi 2000)를 바탕으로 추론하면 ESR2는 정자운동성에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 그리고, 액상정액의 운동성관련 선행연구들은 정장내 성분특성, 희석제의 조성변화 등 정액의 외부환경요인에 초점을 맞추어 수행해왔다(Bergeron et al., 2004, 2007; Bergeron and Manjunath, 2006; Manjunath et al., 2007 and 2009). 따라서, 본 연구와 같은 정자내부환경에 대한 연구는 제한적이다. 그러므로, g.35547 A > G 변이는 두록 액상정액의 운동학적 특성에 영향을 주는 요인으로서 가능성을 시사하며 정액의 운동성을 결정하는 원인구명연구의 기초적 자료로 활용가능할 것으로 판단된다. 하지만 앞으로 품종 특이적인 효과와 다른 집단 크기에서도 연구들이 고려되어야 하며 국내에서는 인공수정의 보급화로 많은 수의 수태지를 구할 수 없기 때문에 연구자간의 협업도 꼭 필요할 것으로 사료되어진다.

사 사

This work was supported by Grant No. PJ01099203 from Rural Development Administration, Republic of Korea; This

research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea(NRF) funded by the Ministry of Science, ICT & Future Planning(no. 2015R1C1A1A01051767); and the 2016 Post-doctoral Fellowship Program of the Rural Development Administration, Republic of Korea.

REFERENCES

- Aschim EL, Giwercman A, Ståhl O, Eberhard J, Cwikiel M, Nordenskjöld M, Haugen TB, Grotmol T, Giwercman YL. 2005. The Rsa I Polymorphism in the Estrogen Receptor- β Gene Is Associated with Male Infertility. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90:5343-5348.
- Bergeron A, Crête MH, Brindle Y, Manjunath P. 2004. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biology of reproduction* 70:708-717.
- Bergeron A, Manjunath P. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular reproduction and development* 73:1338-1344.
- Bergeron A, Brindle Y, Blondin P, Manjunath P. 2007. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. *Biology of reproduction* 77:120-126.
- Manjunath P, Bergeron A, Lefebvre J, Fan J. 2007. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. *Society for reproduction and fertility supplement* 65:217-228.
- Manjunath P, Lefebvre J, Jois PS, Fan J, Wright MW. 2009. New nomenclature for mammalian BSP genes. *Biology of reproduction* 80:394-397.
- Cassady JP, Johnson RK, Pomp D, Rohrer GA, Van Vleck LD, Spiegel EK, Gilson KM. 2001. Identification of quantitative trait loci affecting reproduction in pigs. *Journal of animal science* 79: 623-633.
- Chen X, Zhu H, Hu C, Hao H, Zhang J, Li K, Zhao X, Qin T, Zhao K, Zhu H. 2014. Identification of differentially expressed proteins in fresh and frozen-thawed boar

- spermatozoa by iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS. *Reproduction* 147:321-330.
- 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.
- Eddy E, Washburn T, Bunch D, Goulding E, Gladen B, Lubahn D, Korach K. 1996. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* 137:4796-4805.
- 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.
- Hess. 1998. Estrogen receptor (alpha or beta) expression in the excurrent ducts of the adult male rat reproductive tract. *Journal of andrology* 19:249-249.
- Iida K, Akashi H. 2000. A test of translational selection at 'silent' sites in the human genome: base composition comparisons in alternatively spliced genes. *Gene* 261:93-105.
- 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.
- 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.
- Munoz G, Ovilo C, Amills M, Rodriguez C. 2004. Mapping of the porcine oestrogen receptor 2 gene and association study with litter size in Iberian pigs. *Animal genetic* 35:242-244.
- Munoz G, Ovilo C, Estell J, Silio L, Fernandez A, Rodriguez C. 2007. Association with litter size of new polymorphism on ESR1 and ESR2 genes in a Chinese-European pig line. *Genetics, selection, evolution* 39:195-206.
- Nie R, Zhou Q, Jassin E, Saunders P, Hess R. 2002. Differential expression of oestrogen receptors alpha and beta in the reproductive tract of adult male dogs and cats. *biology reproduction* 66:1161-1168.
- Rago V, Aquilla S, Panza R, Carpino A. 2007. Cytochrome P450arom, androgen and estrogen receptors in pig sperm. *Reproductive biology and endocrinology* 5:23.
- Saunders P, Fisher J, Sharpe R, Millar M. 1997. Expression of oestrogen receptor beta (ESR2) occurs in multiple cell types, including some germ cells, in the rat testis. *Journal of endocrinology* 156:13-17.
- Saunders P, Sharpe RM, Williams K, Macpherson S, Urquart H, Irvine DS, Millar MR. 2001. Differential expression of oestrogen receptor alpha and beta proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. *Molecular human reproduction* 7:227-236.
- Selva DM, Tirado OM, Toràn N, Suárez-Quian CA, Reventos J, Munell F. 2004. Estrogen receptor β expression and apoptosis of spermatocytes of mice overexpressing a rat androgen-binding protein transgene. *Biology of reproduction* 71:1461-1468.
- Xing Y, Ren J, Ren D, Guo Y, Wu Y, Yang G, Mao H, Brenig B, Huang L. 2008. A whole genome scanning for quantitative trait loci on traits related to sperm quality and ejaculation in pig. *Animal reproduction science* 114:2110-2118.
- 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(1):113-121.
- Zhou Q, Nie R, Prins G, Saunders P, Katzenellenbogen B, Hess R. 2002. Localization of androgen and oestrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *Journal of andrology* 23:870-881.