

Phospholipase C zeta 유전자의 유전적다형성과 돼지 액상정액의 운동학적 특성과의 연관성 분석

정용대^{1,*}, 정진영^{1,*}, 사수진^{1,*}, 김기현¹, 조은석¹, 유동조¹, 박성권², 장현준³, 우제석^{1,†}, 최정우^{4,†}

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

Association study analysis of phospholipase C zeta gene polymorphism for sperm motility and kinematic characteristics in liquid semen of Boar

Yong-dae Jeong^{1,*}, Jin-Young Jeong^{1,*}, Soo-Jin Sa^{1,*}, Ki-Hyun Kim¹, Eun-Seok Cho¹, Dong-Jo Yu¹, Sungk-won Park², Hyun-Jun Jang³, Jae-Seok Woo^{1,†}, Jung-Woo Choi^{†,4}

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

ABSTRACT

For evaluating the boar semen quality, sperm motility is an important parameter because the movement of sperm indicates active metabolism, membrane integrity and fertilizing capacity. Phospholipase C zeta (PLCz) is important enzyme in spermatogenesis, but the effect has not been confirmed in pigs yet. Therefore, this study was aimed to analyze their association with sperm motility and kinematic characteristics. DNA samples from 124 Duroc pigs with records of sperm 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 subjected. A SNP in non-coding region of PLCz g.158 A > C was associated with MOT ($p < 0.05$), VCL ($p < 0.01$), LIN ($p < 0.01$) and ALH ($p < 0.05$) in Duroc population. Therefore, we suggest that the intron region of the porcine PLCz gene may be used as a molecular marker for Duroc boar semen quality, although its functional effect was not defined yet. Whether the association is due to the candidate gene or not require further verification. Thus, it will be of interest to continue association studies in the regions surrounding those genes.

(Key word: Phospholipase C zeta, Boar semen motility and kinematic characteristics, Polymorphism)

서 론

돼지 번식은 양돈산업에 있어서 경제성에 아주 중요한 요인 중의 하나이다. 돼지 인공수정은 자연교배에 비해 질병의 위험을 최소화 할 수 있고, 유전능력이 우수한 씨수퇘지의 유전자를 다음세대에 효율적으로 전달 할 수 있어 개량의 속도를 높일 수 있는 장점을 가진 매우 유용한 기술이다(Maes et al., 2008). 이러한 인공수정은 전세계적으로 보급률이 매년 증가해오고 있으며, 국내 돼지 인공수정 보급률은 90% 이상에 이르고 있다. 인공수정용 정액은 크게 두 가지 형태로 구

분되어 질 수 있는데, 수퇘지로부터 채정한 원정액을 정액희석제와 희석하여 냉장상태로 보관하였다가 사용하는 액상정액(Fresh liquid semen)과 정액을 동결하여 -196℃ 액체질소에 보관하였다가 해동하여 사용하는 동결정액(Frozen semen)이 있다. 하지만 동결정액의 해동후, 활성도 및 수태율 저하에 따른 부작용으로 상업용 비육돼지 생산에 사용되는 인공수정용 정액은 95% 이상이 액상정액을 사용하고 있다. 앞에서 언급한 바와 같이 국내 돼지 인공수정은 액상정액이 많은 부분을 차지하고 있고 인공수정 보급율도 대다수를 차지하고 있다. 돼지 정액의 개체간 및 품질간의 차이를 나타내고 있어서 정

* These authors contributed equally to this paper

† Corresponding authors contributed equally to this paper

† Corresponding author: Jae-Seok Woo, Jung-Woo Choi

Tel: +82-41-580-3457

E-mail: segi0486@korea.kr

액체취용 돼지를 선발하는 것이 가장 중요한 요건중의 하나이다(인용문헌 삽입). 최근 이러한 문제들을 개선하기 위해 돼지의 유전적 다형성에 따른 정액의 운동학적 특성에 관련된 많은 연구가 진행되고 있다(Gunawan 등, 2012; Kaewmala 등, 2011; Chen 등, 2014; Zeng 등, 2014; Diniz 등, 2014). 이 중 Kaewmala 등 (2011)은 정자의 형성과 관련되어지는 후보 유전자 phospholipase C zeta(PLCz)의 인트론 1번의 유전적 변이가 정액의 품질과 연관성이 있다고 보고 하였다 PLCz 단백질은 arachidonic acid 합성의 필수지방산이며 inflammatory prostaglandins의 전구체로 알려져 있다(인용문헌 Walter, 2003). 이러한 PLCz 단백질은 사람, 햄스터, 쥐의 정자형성과 정에서 중요한 역할을 수행한다고 보고 하고 있다(Frungiери 등, 2006; Yamaguchi 등, 2008; Sirianni 등, 2009). 돼지의 경우에는 정관의 직경과 고환의 무게에 연관성이 있고 PLCz 유전자는 5번 염색에 q11-12위치에 존재한다고 알려져 있다(Ren 등, 2009). 또한 돼지의 수정과정과 태아의 사산수에도 연관성이 있다고 보고하고 있다(Cassady 등, 2001; Kurokawa 등, 2005).

따라서 본 연구에서는 유전자를 돼지정액의 품질과 연관성이 높다고 알려진 PLCz 유전자를 판별하였고 기존 논문의 유전적 다형성의 유전자형을 분석 하였으며, 돼지 액상정액의 운동학적 특성과 연관성이 있는지 알아 보고자 하였다

재료 및 방법

정액 채취

수태지들은 농촌진흥청 국립축산과학원에서 동일한 품종 동일한 환경조건 하에서 사육되었다 공시축은 2012년에서 2015년까지 1.5~2년생의 성숙한 두록 수태지 124두를 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 정자자동분석기(CASA, Computer-assisted semen analysis system; SAIS SI-100, Medical Supply, Korea)를 사용하여 평가되었다. 정자샘플은 BTS로 희석하여 30×10⁶ cells/ml 농도로 준비하였다 5μl의 정자샘플을 38°C로 가온된 pre-warmed 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), 직선속도(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 124두 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 124두의 DNA를 이용하여 PCR(Polymerase chain reaction)을 수행하였다. PCR은 10pml의 primer, 0.25mM dNTP, 10X PCR buffer, 1.25unit DNA polymerase(Genet Bio, Chungnam, Korea)와 100ng의 DNA를 포함하여 20μl의 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 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(Single nucleotide polymorphism)를 비교하여 유전자형을 결정하였다 염기서열분석에 이용된 primer는 기존 논문에 있는 염기서열을 사용하였다. 염기서열은 5'-GGTGTTCAGACCGAAAGGAA-3' and 5'-AACAGAAAGGACTTCTGATGTGA-3'를 사용하였다(Kaewmala 등, 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, 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 운동성과 연관성이 있는 PLCz의 SNP를 확인하여 두록 124두에 대해 유전자형을 분석하고 액상정액의 운동학적 특성과 연관성이 있는지 알아 보고자 하였다. PLCz 유전자의 인트론 1번 지역의 SNP를 확인한 결과 이전 논문과 동일하게 g.158 A > C 위치에서 SNP를 확인 할 수 있었다. 두록 124두의 유전자형을 분석한 결과 table 2와 같이 AA, AC 및 CC 유전자형의 빈도는 각각 0.62, 0.28 그리고 0.1이었다. 그리고 A 대립유전자(0.76) C 대립유전자(0.24)보다 빈도가 훨씬 높으므로 나타났다(Kaewmala 등의 논문에서는 피어트레인과 교잡종피어트레인X 햄프셔)를 이용하여 동일한 SNP를 확인 하였고, 그 빈도는 AC유전자형

빈도가 가장 높았다(Kaewmala 등., 2011). 본 연구에서 많은 수의 두록을 사용할 수는 없었지만 AA 유전자형이 많이 존재 하는 이유는 국립축산과학원이 질병의 최소화를 하기 위하여 폐쇄교배를 하기 때문에 AA 유전자형이 많이 존재하는 것으로 생각되어진다.

두록 124두의 유전자형을 확인하여 액상정액의 6가지 운동학적 특성과 연관성을 분석한 결과 table 3과 같이 MOT, VCL, LIN 그리고 ALH 4가지 운동학적 특성에서 높은 유의성을 확인 할 수 있었다($p=0.0249$, $p=0.0099$, $p=0.0008$, $p=0.0191$). 2011년 Kaewmala 등의 논문에는 g.158 A > C SNP가 정액의 농도와 연관성이 높고 MOT와는 연관성이 없다고 보고 하였다. 하지만 본 연구에서는 불행히도 정액의 농도 정보가 존재하지 않아서 연관성 분석을 할 수 없었다 또

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

Traits	Mean	SD	Min	Max
MOT (%)	80.14	9.11	36.79	92.36
VCL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	66.74	16.39	19.31	113.53
VSL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	28.02	6.77	14.11	56.29
VAP ($\mu\text{m s}^{-1}$)	45.78	11.57	18.51	79.18
LIN (VSL/VCL)	47.27	9.12	28.61	83.51
ALH (μm)	2.84	0.78	1.321	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 PLCz polymorphisms in Duroc boars

SNP position	Genotype frequency (n=78)			Allele frequency	
	AA (n=77, 0.62)	AC (n=35, 0.28)	CC (n=12, 0.1)	A (0.76)	C (0.24)
g.158 A>C					

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=77)	AC (n=35)	CC (n=12)	
PLCz	MOT (%)	80.76±0.87 ^{a,1}	79.37±2.30 ^a	69.59±3.99 ^b	0.0249*
	VCL ($\mu\text{m/s}$)	67.80±1.63 ^a	67.26±4.24 ^a	45.24±7.09 ^b	0.0099**
	VSL ($\mu\text{m/s}$)	28.04±0.70	28.95±1.81	24.94±3.03	0.5267
	VAP ($\mu\text{m/s}$)	46.39±1.17	45.86±1.04	33.83±5.08	0.0595
	LIN (VSL/VCL)	46.44±0.88 ^b	47.54±2.30 ^b	61.93±3.85 ^a	0.0008**
	ALH (μm)	2.87±0.07 ^a	2.97±0.20 ^a	1.90±0.34 ^b	0.0191*

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

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

한 기존 결과와는 다르게 MOT와 높은 연관성이 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들은 2011년 Kaewmala 등의 논문에 다른 결과들은 찾을 수 없었지만 정액의 품질이 품종간의 차이가 난다는 것들이 보고가 되었기 때문에 기존의 논문과 다른 결과가 나온 것이 품종간의 차이일 수도 있다 하지만 본 연구에서는 PLCz 유전자의 SNP는 인트론 부위였고 이러한 유전적 변이가 정자 품질에 어떻게 영향을 미치는지 결론을 내리기 어려웠다 SNP와 관찰된 특성의 연관성은 mRNA metabolism에 관한 인트론의 영향에 의해 설명될 수도 있다 (Le 등, 2003).

PLCz에 대한 여러가지 연구들은 수년전부터 많이 연구가 되어져 왔다. 인간의 PLCz 유전자의 SNP들이 인트론과 엑손에서 확인되어 남성의 불임에 관하여 중대한 영향을 미칠 것으로 보고 되었고(Heytens et al. 2009), PLCz 단백질의 농도는 정자의 첨체에서 높이 발현되며(Kaewmala 등, 2011) 특이하게 정자요소들의 모든 필수적인 부분들을 가진다고 보고 되었다(Saunders 등, 2002). 또한, 돼지에서는 정자의 칼슘이동에 원인이 되는 PLCz는 성공적인 수정에 중요한 역할을 한다고 보고 되었다(Kurokawa 등, 2005). 또한, 유전자 및 조직 특이적 발현 패턴의 발현 수준을 조절하는 인트론들의 역할에 관한 보고들이 증가하고 있다 본 연구에서는 PLCz의 g.158 A > C 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 수퇘지를 보유할 수 없기 때문에 연구자 간의 협업도 필요할 것으로 생각되어진다 결론적으로 이러한 연구는 돼지의 액상정액 품질을 결정할 수 있는 기초적인 자료로 활용 가능할 것인라고 사료된다

사 사

This work was supported by Grant No. PJ01094002 from Rural Development Administration, Republic of Korea; This study was supported by 2016 Research Grant from Kangwon National University; and the 2016 Post-doctoral Fellowship Program of the Rural Development Administration, Republic of Korea.

REFERENCES

- Cassady JP, Johnson R, Pomp D, Rohrer G, Van Vleck LD, Spiegel E, Gilson K. 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.
- Frungeri MB, Gonzalez-Calvar SI, Parborell F, Albrecht M, Mayerhofer A, Calandra RS. 2006. Cyclooxygenase-2 and prostaglandin F_{2a} in Syrian hamster Leydig cells: inhibitory role on luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin-stimulated testosterone production. *Endocrinology* 147:4476-4485.
- 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.
- Heytens E, Parrington J, Coward K, Young C, Lambrecht S, Yoon S-Y, Fissore R, Hamer R, Deane C, Ruas M. 2009. Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLCζ) in spermatozoa from infertile men. *Human Reproduction* 24:2417-2428.
- Kaewmala K, Uddin M, Cinar M, Große Brinkhaus C, Jonas E, Tesfaye D, Phatsara C, Tholen E, Looft C, Schellander K. 2011. 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.
- Kurokawa M, Sato K-i, Wu H, He C, Malcuit C, Black SJ, Fukami K, Fissore RA. 2005. Functional, biochemical, and chromatographic characterization of the complete [Ca²⁺] i oscillation-inducing activity of porcine sperm. *Developmental Biology* 285:376-392.
- Le H, Nott A, Moore M. 2003. How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends Biochemical Sciences* 28: 215-220.
- Maes D, Nauwynck H, Rijsselaere T, Mateusen B, Vyt P, de Kruijff A, Van Soom A. 2008. Diseases in swine transmitted

- by artificial insemination: an overview. *Theriogenology* 70:1337-1345.
- 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.
- Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K, Lai FA. 2002. PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca $^{2+}$ oscillations in eggs and embryo development. *Development* 129:3533-3544.
- Sirianni R, Chimento A, De Luca A, Zolea F, Carpino A, Rago V, Maggiolini M, Andò S, Pezzi V. 2009. Inhibition of cyclooxygenase-2 down-regulates aromatase activity and decreases proliferation of Leydig tumor cells. *Journal of Biological Chemistry* 284:28905-28916.
- Walter F. 2003. *Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach*. Elsevier, Saunders 108.
- Yamaguchi K, Ishikawa T, Kondo Y, Fujisawa M. 2008. Cisplatin regulates Sertoli cell expression of transferrin and interleukins. *Molecular and Cellular Endocrinology* 283:68-75.
- 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 20, 2016,
Accepted September 29, 2016