

제주 재래마와 쓰시마 재래마의 혈액내 단백질의 다형

오유성 · 오문유 · 김세재 · 김기옥 · 고미희 · 1茅野 搏 · 2양영훈

제주대학교 자연과학대학 생물학과, 2농과대학 축산학과, 1日本國 長崎大學 教養部

제주 재래마와 쓰시마 재래마 간의 유전적 유연관계를 16개 혈액 단백질 좌위(Ti, CTi, Al, Es, Tf, Hb, Cat, EsD, GOT, GLO I, AcP, SOD, LDH, HK, MDH, ME)의 유전적 다형현상을 분석하여 연구하였다. 두 지역의 재래마 집단에서 5개의 단백질 좌위(SOD, LDH, HK, MDH, ME)를 제외한 11개 좌위에서는 유전적 다형현상을 보였다. 다형현상을 나타내는 좌위에서 분석된 유전자 빈도를 이용하여 평균 이형접합자 빈도를 분석한 결과 제주 재래마에서는 0.375로 쓰시마 재래마의 0.304 보다 다소 높게 나타났다. Nei (1987) 방법에 의해 계산된 Da distance와 유전자 동일성(gene identity)은 각각 0.108과 0.868이었다. 본 연구결과와 이미 보고된 아메리카말 집단들에서의 결과를 이용하여 phylogenetic tree를 구성하여 본 결과 크게 세 개의 cluster를 이루었다. 즉 아메리카말 집단들이 하나의 cluster를 이루었고 제주 재래마 집단과 쓰시마 재래마 집단이 하나의 cluster를 이루었으며, 이 두 cluster는 현존 말(*Equus caballus*)의 기원으로 보는 몽고 야생마(*Equus przewalskii*) cluster에서 분지됨을 알 수 있었다.

KEY WORDS: Cheju Native Horses, Tsushima Native Horses, Polymorphism, Da Distance, Phylogenetic Tree

말은 기체목(Perissodactyla) 말과(Equidae)에 속하며, 현존하는 말의 종은 3계열(wild horse, donkey, zebra)에 7종(species)이 있는 것으로 보고되어 있다. 말의 조상은 북아메리카에서 비롯된 것으로 알려지고 있으며, 1개의 발가락을 가진 말의 계통으로부터 최초로 분리된 것은 그레비 얼룩말(Grevy's zebra, *Equus grevyi*)로서 이는 현 지구상의 말 중 가장 원시적인 특징을 지니고 있다. 가축화된 말의 조상은 몽고 야생마(wild horse, *Equus przewalskii*)로 알려져 있다(Putt and Whitehouse, 1983).

동아시아에 분포하는 재래마 집단들에 대한 형태학적(체고, 모색 등) 연구에 의하면 재래마들은 체고가 125 cm 미만인 소형마(small-sized horse)와 125 cm 이상인 중형마(medium-sized horse)로 구분된다고 하였다(Mori, 1929). 따라서 제주도 재래마와 쓰시마(Tsushima) 재래마들은 소형마로 분류되고 있

으며, 이들의 형태학적 유사성은 제주도와 쓰시마가 공통적으로 격리된 섬이어서 대륙의 재래마들에 비해 교잡에 의한 인위적인 선택을 덜 받았기 때문에 유사성이 유지된 것이라고 설명된 바 있다(Hayashida, 1968). 한편 재래마 집단들의 유전적 형질을 분석하고 재래마집단간의 계통 유전학적 관계를 구명하려는 다양한 연구들이 이루어진 바 있다(Nozawa et al., 1965; 1975; 1976; Shotake, 1967; Oh et al., 1992; Nozawa and Kondo, 1970).

제주와 쓰시마는 지리적으로 가까운 위치에 있고, 격리된 섬이라는 공통적 특성을 가지며, 이곳에서 사육되고 있는 재래마들은 뚜렷한 구분점이 없는 서로 유사한 형태적 크기와 특성을 지니고 있다. 이들은 섬으로 이주하여 섬만이 갖는 독특한 환경하에서 살아왔으며, 오랜동안 유전적 격리 등이 이루어진 점을 고려해 볼 때 나름대로의 유전적 중요성을 지닐 것으로 생각된다. 본 연구는 두 지역에서 사육되는 재래마 집단에서

혈액 단백질(Trypsin inhibitor: Ti, Chymotrypsin inhibitor: CTi, Albumin: Al, Transferrin: Tf, Esterase: Es, Hemoglobin: Hb, Catalase: Cat, Esterase D: EsD, Glutamate oxaloacetate transaminase: GOT, Glyoxalase I: GLOI, Acid phosphatase: AcP, Superoxide dismutase: SOD, Lactate dehydrogenase: LDH, Hexokinase: HK, Malate dehydrogenase: MDH, Malic enzyme: ME)의 다형현상을 통해 두 집단 간의 유전적 유연 관계를 구명하고자 실시되었다.

재료 및 방법

혈액 채취 및 시료준비

제주 재래마의 혈액은 제주 경마장의 경주마 중에서 소형마(125 cm 미만)로 인정된 100여 두의 경정맥에서 50 ml 씩 채취 되었다. 그리고 쓰시마 재래마의 혈액은 쓰시마의 농가에서 사육되고 있는 소형마 25두의 경정맥에서 50 ml의 혈액을 채취하였다. 혈액응고를 방지하기 위해 0.5 M EDTA를 5 ml 넣고, 1,500g에서 5분간 원심분리하여 혈장과 혈구를 분리하였다. 분리된 적혈구는 0.9% 생리적 식염수로 세 번 세척한 후 냉동(-50°C) 보관하였다가 사용 직전에 0.02 M phosphate buffer(pH 6.8)를 동량 넣어 해동시킨 hemolysates를 시료로 사용하였다.

혈장 단백질의 전기영동과 염색

Trypsin inhibitor, Chymotrypsin inhibitor 및 Albumin의 표현형은 Bell 등(1984)의 방법을 약간 변형한 thin layer acid gradient polyacrylamide gel electrophoresis를 실시한 후 선별염색하여 그 다형현상을 분석하였다. Esterase의 표현형은 Anderson과 Braend(1989)의 Isoelectrofocusing-polyacrylamide gel electrophoresis(IEF-PAGE) 방법으로 분석하였고, Transferrin은 starch

gel electrophoresis(Gahne, 1966)방법으로 분석하였다.

적혈구 단백질 및 효소의 전기영동과 염색

Hemoglobin의 표현형은 Bowling등(1988)의 IEF-PAGE(pH 5.5-8.5) 방법을 약간 변형하여 분석하였고, Acid phosphatase, Catalase, Esterase D, Glyoxalase I, Glutamateoxaloacetatetransaminase, Hexokinase, Lactate dehydrogenase, Malate dehydrogenase, Malic enzyme, Superoxide dismutase의 표현형은 Harris와 Hopkinson(1976) 방법에 의한 10% 전분 겔 전기영동을 실시한 후 각각 선별염색을 하여 다형현상을 분석하였다.

유전적 유연관계의 분석

집단간의 평균 이형집합자(average heterozygosity)빈도와 유전자 동일성(gene identity)은 Nei(1987)의 computer program에 의해 분석하였다. 각 집단들간의 유연관계를 분석하기 위한 phylogenetic tree는 Nei(1987) 방법으로 계산된 Da distance 값에 의해 UPGMA(unweighted pair-group method of the arithmetic mean; Sneath and Sokal, 1979)방법으로 구성하였다.

D_a 값은 다음과 같은 방법으로 산출되었다.

$$D_a = \sum_{k=1}^r (1 - \sum_{i=1}^{mk} \sqrt{x_{ik} y_{ik}}) / r$$

($mk = k$ 번째 좌위에서 대립인자 수, $r =$ 조사된 좌위 수)

결과 및 고찰

본 연구는 형태적으로 유사해서 같은 소형마로 구분되는 제주 재래마와 쓰시마 재래마에서 혈액 단백질의 다형을 이용하여 유전학적 관계를 알아 보았다. 총 16개의 gene loci를 비교한 결과 SOD, LDH, HK, MDH, ME 등 5개 유전자

Table 1. Gene frequencies of plasma and red blood cell proteins

	Cheju native horse	Tsushima native horse
Trypsin inhibitor (Ti)	$Ti^F = 0.10$ $Ti^G = 0.08$ $Ti^I = 0.27$ $Ti^L = 0.31$ $Ti^S = 0.24$	$Ti^G = 0.12$ $Ti^I = 0.42$ $Ti^L = 0.12$ $Ti^S = 0.34$
	$\chi^2 = 22.88, P > 0.05, N = 37$	$\chi^2 = 4.42, P > 0.05, N = 25$
Chymotrypsin inhibitor (CTi)	$CTi^F = 0.05$ $CTi^G = 0.39$ $CTi^I = 0.15$ $CTi^L = 0.11$ $CTi^S = 0.3$	$CTi^G = 0.08$ $CTi^I = 0.58$ $CTi^L = 0.28$ $CTi^S = 0.06$
	$\chi^2 = 7.13, P > 0.05, N = 40$	$\chi^2 = 9.25, P > 0.05, N = 25$
Esterase (Es)	$Es^F = 0.266$ $Es^I = 0.712$ $Es^S = 0.022$	$Es^F = 0.36$ $Es^I = 0.34$ $Es^S = 0.30$
	$\chi^2 = 21.28, P < 0.05, N=269$	$\chi^2 = 2.43, P > 0.05, N=25$
Transferrin (Tf)	$Tf^A = 0.29$ $Tf^B = 0.48$ $Tf^C = 0.15$ $Tf^D = 0.09$	$Tf^A = 0.1$ $Tf^B = 0.32$ $Tf^C = 0.4$ $Tf^D = 0.18$
	$\chi^2 = 9.09, P > 0.05, N=40$	$\chi^2 = 8.36, P > 0.05, N=25$
Albumin (Al)	$Al^A = 0.40$ $Al^B = 0.60$	$Al^A = 0.52$ $Al^B = 0.48$
	$\chi^2 = 0.02, P > 0.05, N=269$	$\chi^2 = 0.99, P > 0.05, N=25$
Hemoglobin (Hb)	$Hb^B = 0.12$ $Hb^{B1} = 0.62$ $Hb^{B11} = 0.26$	$Hb^{B1} = 0.34$ $Hb^{B11} = 0.56$ $Hb^Y = 0.06$ $Hb^Z = 0.08$
	$\chi^2 = 2.63, P > 0.05, N=211$	$\chi^2 = 4.5, P > 0.05, N=25$
Catalase (Cat)	$Cat^F = 0.31$ $Cat^S = 0.69$	$Cat^F = 0.44$ $Cat^S = 0.56$
	$\chi^2 = 9.06, P > 0.05, N=106$	$\chi^2 = 2.23, P > 0.05, N=25$
Glyoxalase I (GLO I)	$GLO I^F = 0.43$ $GLO I^S = 0.57$	$GLO I^F = 0.52$ $GLO I^S = 0.48$
	$\chi^2 = 7.05, P < 0.05, N=100$	$\chi^2 = 0.99, P > 0.05, N=25$
Acid phosphatase (ACP)	$AcP^F = 0.46$ $AcP^S = 0.54$	$AcP^F = 0.5$ $AcP^S = 0.5$
	$\chi^2 = 30.9, P < 0.05, N=98$	$\chi^2 = 1201, P < 0.05, N=25$
Esterase D (EsD)	$EsD^F = 0.32$ $EsD^S = 0.68$	monomorphic
	$\chi^2 = 0.41, P < 0.05, N=87$	
Glutamate-oxaloacetate -transaminase (GOT)	$GOT^F = 0.49$ $GOT^S = 0.51$	monomorphic
	$\chi^2 = 0.25, P > 0.05, N=95$	

좌위에서 두 집단 간은 모두 monomorphic함을 보였고, EsD, GOT, AcP 좌위에서는 제주 재래마 집단에서 polymorphic(EsD: $EsD^F=0.32$, $EsD^S=0.68$, GOT: $GOT^F=0.49$, $GOT^S=0.51$, AcP: $AcP^F=0.46$, $AcP^S=0.54$)한 반면 쓰시마 재래마에서는 monomorphic 하였다(Table 1). 제주 재래마와 쓰시마 재래마에서 조사된 16개 혈액 단백질 중 다형현상을 보인 각각의 유전자 빈도는 Table 1과 같았다. 각 유전자 좌위의 유전자 빈도를 이용하여 Nei(1987)의 computer program에 의해 평균 이형접합자(average heterozygosity) 빈도를 구한 결과 제주 재래마 집단에서는 0.375, 쓰시마 재래마 집단에서는 0.304로 각각 산출되었으며, Da 값과 유전자 동일성(gene identity)은 0.108과 0.868로 각각 계산되었다. 제주 재래마 집단에서 평균 이형접합자 빈도가 높은 것은 쓰시마 재래마 집단에서 보다 더 많은 단백질 좌위에서 다형 현상을 나타냈기 때문으로 생각된다.

제주 재래마 집단과 쓰시마 재래마 집단에서 분석된 유전자 좌위와 이미 보고된 아메리카말 집단들과 몽고 야생마(*Equus przewalskii*) 집단에서의 결과를 이용하여 얻은 Da 값으로 구성한 phylogenetic tree는 세 개의 cluster를 이루었다(Fig. 1). 즉, 아메리카 말 집단들이 하나의 cluster를 이루었고, 본 연구의 결과인 제주 재래마 집단과 쓰시마 재래마 집단이 하나의 cluster를 이루었다. 그리고 상기의 두 cluster는 몽고 야생마(*Equus przewalskii*) cluster ($Da = 0.202$)에서 분지되었다고 추측할 수 있었다.

Nozawa와 Kondo(1970)는 제주 재래마와 일본 재래마의 계통 유전학적 분석을 통하여 일본 재래마의 기원을 제주 재래마라고 한 바 있다. 제주 재래마 집단은 체형, 모색, 혈액형이 다른 섬 집단(Tokara, Ryukyu)의 재래마와 유사하였지만, 일부 모색과 혈액형에서는 대륙집단(Kiso, Hokkaido) 재래마와 비슷하여서 제주 재래마의 기원이 하나가 아닐 것이라고 보고하였다. 그리고 동아시아와 유럽 경주마 집단에

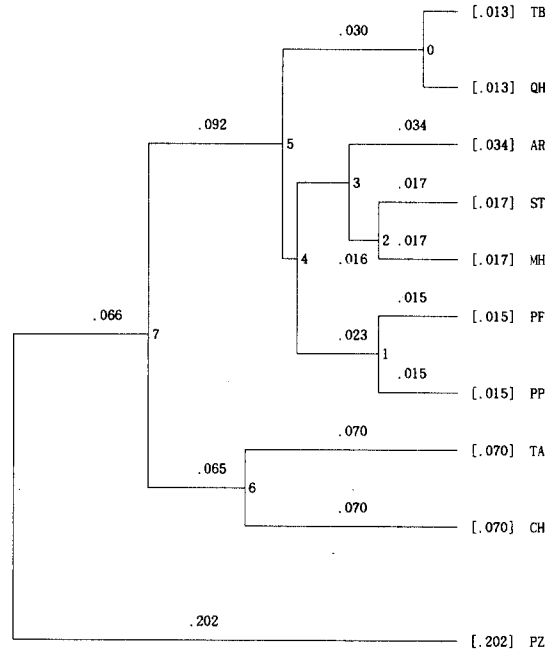


Fig. 1. Phylogenetic tree for allele frequencies of four protein loci (Tf, Es, Pi, and Hb) in ten equine populations (TB: Thoroughbred, AR: Arabian, ST: Standardbred, MH: Morgan Horse, QH: Quarter horse, PF: Paso Fino, PP: Peruvian Paso; Bowling and Clark, 1985, CH: Cheju native horse, TA: Tsushima native horse; This study, PZ: Przewalski horse; Bowling and Ryder, 1987). This tree was constructed by using the UPGMA methods (Sneath and Sokal, 1979) based on Da distance value (Nei, 1987).

서 혈액 단백질 변이를 분석한 결과에 의하면 Mori(1929)와 Hayashida(1958, 1968)의 추론과는 다른, 한국과 일본의 말은 두 가지 경로를 통해 유입되었다는 보고도 있다(Nozawa *et al.*, 1976). 즉, 남중국에서는 소형마(Small-sized horse)가 그리고 북중국과 한국 대륙으로부터는 중형마(Medium-sized horse)가 유입되었다고 했다.

현재에도 제주 재래마와 쓰시마 재래마의 기원에 대해서는 학자들 간에 차이는 있지만 크게 두 가지 기원으로 요약된다. 즉, 중국과 몽고 지역에서 유입되었을 것으로 추정하고 있다. 제주 재래마와 쓰시마 재래마가 소형마에 속하는 유전적 형질을 보이는 것은 오랜 기간 동안 그 지역의 자연환경에 적응된 결과라 볼 수 있다. 즉, 토질

의 척박성에 따르는 사료 등에 기인되는 각종 자연 환경에 순응한 결과일 가능성이 있다. 제주 재래마와 쓰시마 재래마는 형태적으로 유사한 공통적 특징을 갖고 있으며, 여러 연구 결과들과 더불어 본 결과에서도 유전적 유연관계가 가까운 위치에 있음을 알 수 있었다. 그러나 두 집단의 재래마가 어느 정도의 유전적 동일성을 소유하고 있는지를 DNA 수준에서 비교된다면 좀 더 확실한 결론을 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

사사

이 논문은 <1992년 교육부지원 학술연구조성비>와 日本 文部省 支援에 의한 <對馬暖流域의 生物地理學的 研究>의 一環으로 이루어졌음.

인용문헌

- Andersen, A.E. and M. Braend, 1989. Polymorphism of Esterase in plasma of foxes. *Hereditas* **110**: 109-111.
- Bell, K., S.D. Patterson, and C.C. Pollitt, 1984. The plasma protease inhibitor system (Pi) of Standardbred horses. *Animal Blood Groups and Biochem. Genet.* **15**: 191-206.
- Bowling, A.T. and R.S. Clark, 1985. Blood group and protein polymorphism gene frequencies for seven breeds of horses in the United States. *Animal Blood Groups and Biochem. Genet.* **16**: 93-108.
- Bowling, A.T. and O.A. Ryder, 1987. Genetic studies of blood markers in Przewalski's horse. *J. Hered.* **78**: 74-80.
- Bowling, A.T., A.M. Scott, J. Flint, and J.B. Clegg, 1988. Novel alpha hemoglobin haplotypes in horse. *Anim. Genet.* **19**: 87-101.
- Gahne, B., 1966. Studies on the inheritance of electrophoretic forms of transferrins, albumins, prealbumins and plasma esterases of horse. *Genetics* **53**: 681-694.
- Harris, H. and D.A. Hopkinson, 1976. Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics, North-Holland, Amsterdam.
- Hayashida, S., 1958. Systematic studies on the Japanese native horse. *Jpn. J. Zootech. Sci.* **36**: 233-242.
- Hayashida, S., 1968. Origin and Phylogeny of Livestock in Japan, Japanese People and Southern Culture, pp. 385-402.
- Mori, T., 1929. Ancestry of Korea native horses (a preliminary report). *Jpn. J. Zootech. Sci.* **4**: 90-112.
- Nei, M., 1987. Molecular Evolutionary Genetics, Columbia University Press, New York, pp.209-253.
- Nozawa, K. and K. Kondo, 1970. Gene constitution of Cheju native horses and its phylogenetic relationships with Japanese native horses. *SABRAO Newsletter* **2**: 7-18.
- Nozawa, K., K. Esaki, N. Wakasugi, and S. Hayashida, 1965. Genetical studies on the native farm animals in Japan and her adjacent localities. I. Gene constitution of the island type native horse. *Jpn. J. Zootech. Sci.* **36**: 233-242.
- Nozawa, K., T. Shotake, and Y. Qhkura, 1975. Blood protein polymorphisms and population structure of the Japanese macaque *Macaca fuscata fuscata*, In: Isozymes IV. Genetics and Evolution (Markert, C.L., ed.). Academic Press, New York, pp.225-241.
- Nozawa, K., T. Shotake, and Y. Qhkura, 1976. Blood protein variations within and between the east Asian and European horse populations. *Z. Tierz. Zuechtungsbiol.* **93**: 60-74.
- Oh, M.Y., M.H. Ko, G.O. Kim, S.J. Kim, C.C. Chung, and K.I. Kim, 1992. Genetic variations of the blood proteins in Cheju native horse. *Korean J. Genet.* **14**: 39-50.
- Putt, W. and D.B. Whitehouse, 1983. Genetics of for plasma protein loci in *Equus przewalskii*: new alleles at the prealbumin, postalbumin and transferrin loci. *Anim. Blood Groups Biochem. Genet.* **14**: 7-16.
- Shotake, T., 1967. A study of Hokkaido native horses. *Rep. Res. Group Native Farm Anim.* **2**: 79-83.
- Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal, 1979. Numerical Taxonomy (Freeman, W.H., ed.). Freeman, San Francisco.

(Accepted April 18, 1995)

Polymorphisms of Blood Proteins in Cheju Native Horses and Tsushima Native Horses

You-Sung Oh, Moon-You Oh, Se-Jae Kim, Gi-Ok Kim, Mi-Hee Ko, Kayano Hiroshi¹, and Young-Hoon Yang² (Department of Biology, ²Department of Animal Science, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea, ¹Faculty of Liberal Arts, Nagasaki University, Nagasaki 852, Japan)

The phylogenetic relationships between Cheju native horses and Tsushima native horses were studied by protein polymorphism analyses in 16 gene loci (Trypsin inhibitor: Ti, Chymotrypsin inhibitor: CTi, Albumin: Al, Esterase: Es, Transferrin: Tf, Hemoglobin: Hb, Catalase: Cat, Esterase D: EsD, Glutamate oxaloacetate transaminase: GOT, Glyoxalase I: GLO I, Acid phosphatase: AcP, Superoxide dismutase: SOD, Lactate dehydrogenase: LDH, Hexokinase: HK, Malate dehydrogenase: MDH, Malic enzyme: ME). All allelic patterns of the protein loci, except 5 loci (SOD, LDH, HK, MDH, ME), were polymorphic in both two populations. Gene frequencies of the polymorphic loci of the population of Cheju native horses were higher than those of Tsushima native horses. Average heterozygosity in Cheju native horses was 0.375, showing higher than that of Tsushima native horses (0.304). The D_a distance and gene identity of two populations were 0.108 and 0.868, respectively. The phylogenetic tree constructed by these results and those previously reported in other horse populations, consisted of three clusters. From this phylogenetic tree, it could be suggested that Cheju native horses and Tsushima native horses had diverged from the Mongolian wild horse (*Equus przewalskii*).