

# Adiponectin을 암호화하는 돼지 APM1 유전자의 염색체상 위치파악과 돌연변이 탐색

박응우\* · 김재환\*\* · 서보영\*\* · 정기철\*\*\* · 유성린\*\*\* · 조인철\*\*\*\* · 이정규\*\* · 오성종\* · 전진태\*\* · 이준현\*\*\*

농촌진흥청 축산연구소\*, 경상대학교 응용생명과학부\*\*, 충남대학교 동물자원학부\*\*\*, 난지농업연구소\*\*\*\*

## Chromosomal Localization and Mutation Detection of the Porcine APM1 Gene Encoding Adiponectin

E. W. Park\*, J. H. Kim\*\*, B. Y. Seo\*\*, K. C. Jung\*\*\*, S. L. Yu\*\*\*, I. C. Cho\*\*\*\*, J. G. Lee\*\*, S. J. Oh\*, J. T. Jeon\*\* and J. H. Lee\*\*\*

National Livestock Research Institute, RDA\*,  
Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University\*\*,  
Division of Animal Science and Resources, Chungnam National University\*\*\*,  
National Institute of Subtropical Agriculture, RDA\*\*\*\*

### ABSTRACT

Adiponectin is adipocyte complement-related protein which is highly specialized to play important roles in metabolic and hormonal processes. This protein, called GBP-28, AdipoQ, and Acrp30, is encoded by the adipose most abundant gene transcript 1 (*APM1*) which locates on human chromosome 3q27 and mouse chromosome 16. In order to determine chromosomal localization of the porcine *APM1*, we carried out PCR analysis using somatic cell hybrid panel as well as porcine whole genome radiation hybrid (RH) panel. The result showed that the porcine *APM1* located on chromosome 13q41 or 13q46-49. These locations were further investigated with the two point analysis of RH panel, revealed the most significant linked marker (LOD score 20.29) being *SIATI* (8 cRs away), where the fat-related QTL located. From the SSCP analysis of *APM1* using 8 pig breeds, two distinct SSCP types were detected from Korean native and Korean wild pigs. The determined sequences in Korean native and Korean wild pigs showed that two nucleotide positions (T672C and C705G) were substituted. The primary sequence of the porcine *APM1* has 79 to 87% identity with those of human, mouse, and bovine *APM1*. The domain structures of the porcine *APM1* such as signal sequence, hypervariable region, collagenous region, and globular domain are also similar to those of mammalian genes. (**Key words** : Pig, *APM1*, Mapping, SSCP, Mutation)

I 서 론  
을 기초로 소, 돼지, 말, 닭 등 가축들의 형질과 연관된 유전자의 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 유전병과 관련된 유전자에 대한 연  
Human genome project에 의해서 밝혀진 서열

본 연구에서의 변이를 포함하는 염기서열은 GenBank(AY627882)에 등록되었음.  
Corresponding author : J. H. Lee, Division of Animal Science and Resources, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-704, Korea. Tel : 042-821-5779, Fax : 042-825-9754, E-mail : junheon@cnu.ac.kr.

구가 인간과 가축을 중심으로 광범위하게 연구되고 있다(MacLennan 등, 1990; Nicholas와 Harper, 1996). 가축에서는 경제적으로 중요한 젖소의 유량과 유지율, 육우의 성장률, 돼지의 등지방 두께 등 양적형질(quantitative trait)에 대한 연구도 최근 괄목한 성과를 이루고 있으며, 돼지에서 육질에 영향을 미치는 *PRKAG3*와 유우에서 유지방 함량에 영향을 미치는 *DGATI*이 최근 발표되었다(Milan 등, 2000; Grisart 등, 2002). 이런 연구의 기초는 인간에게서 밝혀진 원하는 유전자의 정보를 토대로 가축에서 그 유전자의 정확한 염색체상의 위치를 규명하고 DNA 염기서열을 밝힘으로서 인간과 동물 사이의 유전자를 비교하는 비교 유전자지도(Comparative mapping)의 작성이 필수적으로 선행되어야 한다. 돼지와 소의 경우 최근 상세한 연관 유전자 지도(Barendse 등, 1997; Kappes 등, 1997; Ma 등, 1996; Rohrer 등, 1996)와 미세 RH map이 완성됨으로서(Band 등, 2000; Hawken 등, 1999; Yerle 등, 1998) 이런 연구의 기반이 조성되어 있다.

최근 식생활을 포함한 생활 습관의 변화로 비만의 인구가 급증하여 지방의 섭취를 줄여 성인병을 예방하려는 많은 연구들이 진행되고 있다. 또한 가축의 경우에도 피하지방 및 복부 지방의 함량을 줄이고 근내지방도를 높여 육질의 품질을 높이는 연구에 중점을 두고 있다. 지방조직은 동물체내에서 에너지저장, 지방산 공급 및 대사, 글루코오스의 항상성 유지 등 생체 내에서 이루어지는 에너지 대사과정에서 중요한 역할을 담당하고 있다(Katz 등, 1996; Tsao 등, 1997). 또한 지방조직을 구성하는 지방세포는 triglyceride를 합성하여 저장하며, leptin, interleukin(IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), resistin 그리고 adiponectin과 같은 다양한 단백질을 분비함으로써 이들과 연관된 세포내 신호전달 기작과도 밀접한 연관성을 나타낸다(Wiecek 등, 2002).

30 kDa의 adiponectin은 ACRP30, AdipoQ라고도 불려졌으며 지방세포에서 분비되는 호르몬의 일종으로서 사람과 동물에서 에너지의 조절, glucose 및 지방의 대사에 관여하는 것으로

알려져 왔다(Scherer 등, 1995; Hu 등, 1996). 인간의 adiponectin은 *APMI*에 암호화되어 있는데, 이 유전자는 당뇨병과 연관된 좌위인 3q27에 위치하고 있다고 밝혀졌다(Yamauchi 등, 2001). 이 유전자는 크기가 16 kb이며 3개의 exon과 총 244개의 아미노산으로 구성되어 있으며 promoter 부위에 TATA box가 없는 것이 특징이다(Schaffler 등, 1999). 특히, 이 유전자는 collagen like motif인 G-X-Y 반복서열을 가지고 있기 때문에 collagen X, collagen VIII 및 complement protein인 C1q와 높은 상동성을 가지고 있는 것으로 보고되었다(Maeda 등, 1996). 이 유전자는 근육에서 AMPK(AMP-activated protein kinase)의 인산화를 유도하여 지방산의 산화와 glucose의 이용을 높이는 작용을 한다(Yamauchi 등, 2002). 따라서 *APMI*의 이런 생체 내 작용에 의해 근육 내 glucose 함량을 조절함으로써 육질에 영향을 주며 특히 근육의 pH, 보수력과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되었다(Milan 등, 2000).

따라서 본 연구는 돼지에서 지방의 대사 및 육질과 높은 연관성이 존재할 것으로 추정되는 *APMI*의 염색체 상의 위치를 밝히고 염기서열 분석 및 품종간의 변이를 탐색함으로써 육질 향상을 위한 유전적 표지를 규명하고자 실시하였다.

## II 재료 및 방법

### 1. 유전자의 염색체상 위치결정

*APMI*의 염색체 상의 위치를 확인하기 위해서 somatic cell hybrid panel(Yerle 등, 1996)과 porcine radiation hybrid panel(Yerle 등, 1998)을 사용하여 PCR 분석을 수행하였다. 분석에 사용된 primer sequence는 다음과 같다.

HP-F: 5'---TGG TAG AGA AGG AAG CCT  
GT---3'

HP-R: 5'---CTC TGG CTC TGT GCT CCT  
CT---3'

Somatic cell hybrid panel을 이용한 *APMI*의

mapping을 위하여 돼지와 햄스터가 혼성화된 27개의 clone들을 이용하여 PCR 분석을 수행하였다. PCR 반응은 총 25 $\mu$ l로, 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 50 mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% gelatin으로 구성된 10 $\times$  Reaction buffer, 0.2 mM dNTP, 10 pmol 각각의 primer, 25 ng radiation hybrid DNA, 1.5 unit *Taq* DNA polymerase(TaKaRa, Japan)에 증류수를 첨가하였다. 유전자의 증폭을 위해서 DNA 변성은 94 $^{\circ}$ C에서 30초, primer 결합은 57 $^{\circ}$ C, DNA 가닥의 신장은 72 $^{\circ}$ C에서 45초로 설정하여 35 cycle을 실시하였다. PCR product의 분석은 agarose 전기영동 상에서 확인하였으며, positive band의 유무에 따라서 + 혹은 -를 부여하였다. Radiation hybrid panel을 이용한 *APM1*의 mapping을 위하여 햄스터와 돼지가 혼성화된 세포 중 118개의 clone들을 이용하여 PCR 분석을 수행하였다. 이 과정에서 돼지의 DNA만을 첨가시킨 positive control, 햄스터 DNA만 첨가된 background DNA control 그리고 negative control을 분석에 함께 포함시켰다. PCR 반응은 somatic cell hybrid panel의 분석과 동일한 조건하에서 두 번 반복하여 실시하였다. 증폭된 PCR product는 agarose 전기영동 후 확인하였으며, positive band의 유무에 따라 1 혹은 0을 부여하였다. 각각 panel의 결과에 대한 분석은 프랑스의 INRA 연구소에서 제공하는 web page(<http://www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/pcr/pcr.htm>, <http://imprh.toulouse.inra.fr/>)를 통해서 분석하였다. somatic cell hybrid panel의 분석은 기준에 위치가 알려진 marker들의 정보와 비교 분석함으로써 가장 유의성이 높은 위치를 선택하며(Chevalet 등, 1997), Radiation hybrid panel을 이용한 *APM1*의 위치 확인은 RHMAP 3.0 program을 이용하여 분석하였다(Lange 등, 1995).

## 2. 공시동물과 DNA

본 연구에서 사용한 돼지 DNA는 한국재래돼지(20두), Landrace(20두), Duroc(20두), Yorkshire(20두), Hampshire(2두), Berkshire(3두), 한국야생돼지(10두), 가고시마흑돈(2두) 등 8품종으로 제

주단지농업연구소에서 제공받아 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

## 3. *APM1* 유전자의 증폭

돼지의 *APM1*을 증폭하기 위한 primer는 기존에 보고되어 있는 *APM1*의 전체 cDNA 서열이 포함된 mRNA 서열(GenBank accession No. AY135647)을 이용하여 제작하였으며, primer sequence는 다음과 같다.

APM1-1F: 5'---GCT CAG GAT GCT GTT GTT GG---3'

APM1-1R: 5'---ACG CCA TCT CTG CCA TCA CG---3'

APM1-2F: 5'---CGT GAT GGC AGA GAT GGC GT---3'

APM1-2R: 5'---AAC GGT AGA CAT AGG CGC TT---3'

APM1-3F: 5'---AAG CGC CTA TGT CTA CCG TT---3'

APM1-3R: 5'---CTG AAG ACC TCA GCC TGG TG---3'

각각의 PCR 반응은 *Taq* polymerase 1.5 unit(TaKaRa, Japan), 10 $\times$  buffer 2.5 $\mu$ l, 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 pmol primer 각각 1.5 $\mu$ l, genomic DNA 2 $\mu$ l 그리고 증류수 13.7  $\mu$ l를 첨가하여 최종 25 $\mu$ l를 반응하였으며, PCR 반응조건은 94 $^{\circ}$ C에서 2분간 변성시킨 후 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 57 $^{\circ}$ C에서 45초, 72 $^{\circ}$ C에서 45초를 1 cycle로 하여 35회 반복하였다. 그 후 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 신장시킨 후 4 $^{\circ}$ C에서 종료하였다.

## 4. Single-stranded conformation polymorphism (SSCP) 분석

APM1-1F와 APM1-1R, APM1-3F와 APM1-3R에 의해서 증폭된 PCR product는 각각 166 bp, 462 bp를 나타내었다. 이들 product 각각 2.5 $\mu$ l와 denaturation buffer(95% formamide, 0.05%

xylene cyanol, 0.05% bromophenol blue)를 혼합하였다. 혼합액을 95°C에서 3분간 변성시킨 다음 즉시 0°C로 옮겨 2분간 보관하였다. 그 후 이미 제작된 10% polyacrylamide gel 상에서 전기영동(150V; 20시간; 16°C)한 후 silver staining 하여 확인하였다.

## 5. 유전자 cloning 및 DNA sequencing

PCR product는 TOPO TA Cloning Kit(Invitrogen, USA)를 사용하여 ligation을 실시한 후 Top 10 F' competent cell 내부로 형질전환 시켰다. DNA sequencing은 ABI PRISM™ 3730 DNA Sequencer(Perkin Elmer, USA)를 이용하여 direct sequencing에 의해서 실시하였으며, 얻어진 염기서열 및 아미노산서열은 Clustal x version 1.83 (Thompson 등, 1997)을 이용하여 다중비교하였다. Neighbor-joining tree는 사람, 마우스, 소 및 돼지 *APMI*의 아미노산 서열을 토대로 Dayhoff 등(1978)의 PAM model을 이용하여 산출된 거리지수를 기초로 작성되었다.

## III 결과 및 고찰

### 1. Gene Mapping

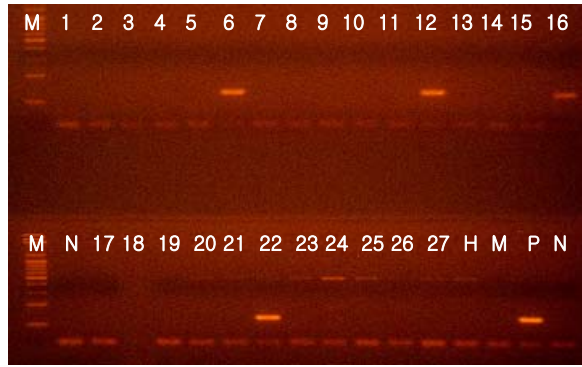
Somatic cell hybrid panel을 이용한 PCR 분석 결과, 돼지의 *APMI*은 1.00의 높은 유의성 상관(significant correlation)을 나타내며 chromosome 13q41과 13q46-49에 위치하였다(Fig 1a, b). 이 두 위치가 동일한 상관관계가 나타난 것은 Somatic cell hybrid panel의 해상도가 낮기 때문이며 *APMI*은 이 두 위치 중 한 곳에 위치해 있다는 것을 알 수 있다. Radiation hybrid panel 분석에서 chromosome 13의 *SW207* marker와 *SIATI* marker 사이에 위치하며 *SIATI*과 가장 가까운 연관성(8 cR away; LOD = 20.29)을 나타낸 것으로 보아 Somatic cell hybrid panel 결과의 13q41이 *APMI*의 정확한 위치라 결론을 내릴 수가 있다(Fig 1c). *APMI*은 사람의 chromosome 3q27 위치에, mouse의 16번 염색체에 위치하는 것으로 밝혀져 있다(Takahashi 등, 2000;

Das 등, 2001). 돼지의 13번 염색체는 지방대사, 특히 등지방 두께와 관계된 양적형질 유전자 좌위가 존재하는 것으로 알려져 있어(Malek 등, 2001) 이 연구에서 밝혀진 *APMI*은 후보 유전자로서 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

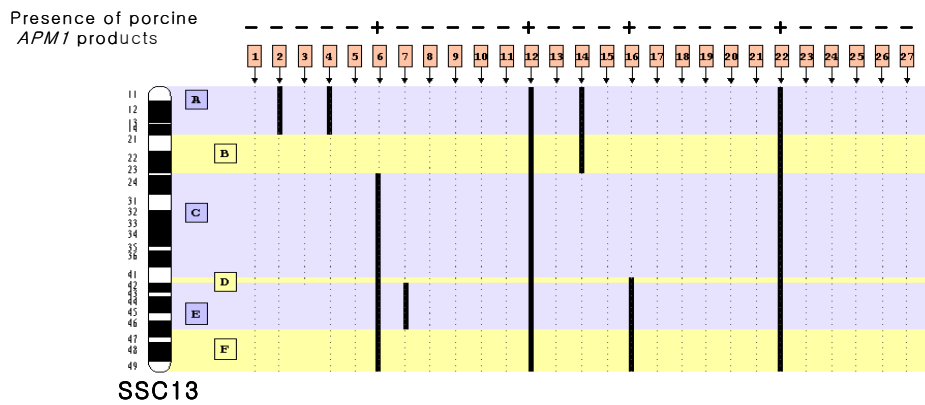
### 2. Mutation detection

돼지 *APMI* 내부의 변이를 확인하기 위하여 8개의 품종(한국재래돼지, Landrace, Duroc, Yorkshire, Hampshire, Berkshire, 한국야생돼지, 가고시마흑돈)의 exon2와 exon3을 증폭하였다. Fig 2는 이들 PCR product를 이용한 SSCP 분석 결과를 보여주고 있으며 서로 다른 3가지 type이 발생하였다. A-C는 한국재래돼지에서 나타나는 band pattern을, a와 b는 한국야생돼지에서 나타나는 band pattern을 보여주고 있으며, 두 품종을 제외한 나머지 품종들은 모두 type 1과 동일한 결과를 보였다. 이들 중 type 1과 type 2는 두 품종에서 동일하게 나타나는 양상인 반면 type 3은 한국재래돼지에서만 나타나는 특이적인 밴드 양상이다. 또한 한국재래돼지에서 type 2는 77%의 높은 비율로 나타났으며, 한국야생돼지에서 역시 50%의 발생빈도를 보였다.

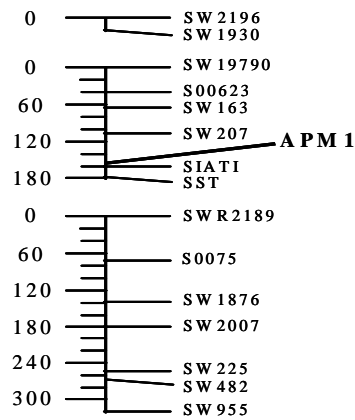
Fig 3는 돼지 품종들 사이에서 *APMI*의 염기 및 아미노산 서열을 보여주고 있다. 전체 732 bp로 앞서 보고된 *APMI*의 mRNA 서열(GenBank accession no. AY135647) 결과와 일치하였으나, 420번째와 487번째 서열에서 염기치환, T420C와 G487A가 나타났으며, 특히 487번째 염기치환, G487A에 의해서 아미노산 치환(V163I)이 발생하였다. 염기서열 분석 결과 한국재래돼지와 한국야생돼지에서 염기치환이 발생한 반면 나머지 품종들은 앞선 SSCP 분석과 동일한 결과를 보였다. SSCP 분석 결과, type 1인 경우는 변이가 없는 품종들과 같이 672번째 T, 705번째 C로 나타난다. 반면에 type 2는 672번째와 705번째에서 이형 접합성으로 나타났으며, type 3은 두 위치에서 C와 G로 나타났다. 한국재래돼지에서는 이런 세 가지 type이 모두 나타났으나, 한국야생돼지에



(a)



(b)



(c)

Fig. 1. Physical mapping of the *APM1* PCR product to SSC13 using somatic cell hybrid panel and radiation hybrid panel. (a) PCR amplification of *APM1* PCR product on the 27-clone somatic cell hybrid panel. In this case, a rodent background product did not amplify. H: Chinese hamster, M: Mouse, N: Negative control, P: Pig. (b) Proportion of pig chromosome 13 retained in each of the 27 somatic hybrid clones. Clones positive for the porcine *APM1* products are indicated by a +. A, B, C, D, E, F indicate regions of SSC13 distinguishable by the panel. (c) RH map location of the *APM1* in the part of SSC13.

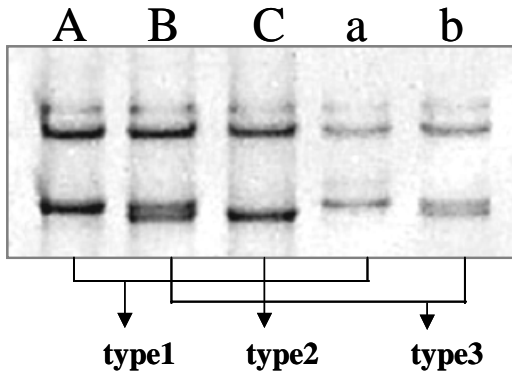


Fig. 2. The SSCP patterns of the *APM1* exon 2 region. The pig breeds used in the study were identified to have the A or a SSCP pattern. The B and b SSCP patterns were found in Korean native pig and Korean wild pig. Especially, the C SSCP pattern was observed only in Korean native pig.

서는 type 1과 type 2만이 확인되었다. 아직까지 한국 야생돼지와 한국재래돼지와와의 연관성을 뒷받침할만한 연구결과는 보고되어 있지 않지만 이런 결과는 상대적으로 다른 품종들보다 두 품종이 높은 연관성을 갖는다고 사료된다.

Fig 5은 분석된 염기서열을 이용하여 아미노산으로 변환시킨 후 사람, 마우스 그리고 소의 아미노산서열과 비교한 결과이다. 본 연구에서 분석한 돼지 *APM1*은 전체 243개의 아미노산으로 구성되어 있으며, Yoda 등(2001)이 보고한 것과 같이 N-말단에 17개의 signal peptide가 위치하고 있고 그 뒤로 고도변이부위(hypervariable region)를 확인할 수 있다. 또한 22개의 Gly-X-Y 혹은 Gly-X-Pro가 주기적으로 나타나는 collagenous region과 C1q와 높은 아미노산서열의 유사성을 나타내는 globular domain을 포함하고

```

ATGCTGTTGTTGGGAGCTGTTCTACTGCTACTAGCCCTGCCAGTCTCGGCCAGGAAACC 60
M L L L L G A V L L L L A L P S L G Q E T
ACCGAGAAGCCTGGAGCACTACTGCCCATGCCCAAGGGGGCTGCGCAGGCTGGATGGCG 120
T E K P G A L L P M P K G A C A G W M A
GGTATCCCAGGGCATCCTGGCCACAACGGTACCCCAGGCCGTGATGGCAGAGATGGCCTC 180
G I P G A G H P G H N G T P G R D G R D G V
CCTGGCGAGAAGGGTGAGAAAGGAGATACAGGTCCTTACTGGTCCTAAGGGTGACACTGGG 240
P G E K G E K G D T G L T G P K G D T G
GAATCTGGAGTGACTGGGGTTGAAGGTCCCCGAGGTTTCCAGGAATCCCGGGCAGAAAA 300
E S G V T G V E G P R G F P G I P G R K
GGAGAACCTGGAGAAAGCGCTATGTCTACCGTTTCAGCATTTCAGTGTGGGCTGGAGACT 360
G E P G E S A Y V Y R S A F S V G L E T
CGGGTCACTGTCCCTAACATGCCATTTCGCTTTACCAAGATCTTCTACAATCAGCAAAA 420
R V T V P N M P I R F T K I F Y N Q Q N
CACTATGATGTCACCACTGGCAAATTCACCTGCAACATTCCTGGGCTGTACTACTTCTCC 480
H Y D V T T G K F H C N I P G L Y Y F S
TTCCACRTCACGGTCTACTTGAAGGATGTGAAGGTCAGCCTCTACAAGAAGGACAAGGCT 540
F H I T V Y L K D V K V S L Y K K D K A
GTACTCTTCACCTACGACCAGTACCAGGACAAGAATGTGGACCAGGCCTCTGGCTCTGTG 600
V L F T Y D Q Y Q D K N V D Q A S G S V
CTCCTCTATCTGGAGAAGGGGGACCAAGTCTGGCTCCAGGCATACGGGGATGAAGAGAA 660
L L Y L E K G D Q V W L Q A Y G D E E N
AATGGGGTCTAYGCTGACAATGTCAATGACTCCATCTTCACAGGSTTCCTTCTCTACCAC 720
N G V Y A D N V N D S I F T G F L L Y H
AACATTGAAATGA 732
N I E
    
```

Fig. 3. The coding and amino acid sequences of *APM1* observed in pig breeds. The start and stop codons are showed as box. The positions at 420 and 487 are indicated the differences(indicated by italic letters) between results in this study and the previously report(GenBank accession No. AY135647), and the base substitutions of 672 and 705 (indicated by italic and underlined letters) are found only in Korean native and Korean wild pigs.

Human	<u>MLLLGAVL</u> LLLLLALPGHDQETTTQG---PGVLLPLPKGACTGWMAGIPGHPGHNGAPGRDG	
cow	<u>MLLQGALL</u> LLLLLALPSHGEDNMED-----PPLPKGACAGWMAGIPGHPGHNGTPGRDG	
pig	<u>MLLLGAVL</u> LLLLLALPSLQGETTEK----PGALLPMPKGACAGWMAGIPGHPGHNGTPGRDG	
Mouse	<u>MLLLQALL</u> FLLLILPSHAEDDVTTTEELAPALVPPPKGTCAGWMAGIPGHSGHNGTPGRDG	60
Human	RDG <b>TPGEKGEK</b> GD <b>PLIGPK</b> GDIG <b>ETGV</b> PGAEGPRGF <b>PGIQGRK</b> GEPGEGAYVYR <b>SAF</b> SV	
cow	RDG <b>TPGEKGEK</b> GD <b>AGLLGPK</b> GETGD <b>VM</b> TGAEGPRGF <b>PTPGRK</b> GEPGEAYVYR <b>SAF</b> SV	
pig	RDG <b>VPGEKGEK</b> GD <b>TLTGPK</b> GD <b>TGES</b> GV <b>TG</b> VEGPRGF <b>PLPGRK</b> GEPGESAYVYR <b>SAF</b> SV	
Mouse	RDG <b>TPGEKGEK</b> GD <b>SGLL</b> GPKGETGD <b>VM</b> TGAEGPRGF <b>PTPGRK</b> GEPGEAYVYR <b>SGF</b> SV	120
Human	<u>GLE</u> TYVTIPNMP <b>IRFTK</b> IFYNQ <b>QNH</b> YDG <b>STGK</b> FHCNIPGLYYFAYHITVYMKDVKV <b>SL</b> FK	
cow	<u>GLE</u> TRVTVPNVP <b>IRFTK</b> IFYNQ <b>QNH</b> YDG <b>STGK</b> FCNIPGLYYFSYHITVYMKDVKV <b>SL</b> FK	
pig	<u>GLE</u> TRVTVPNMP <b>IRFTK</b> IFYNQ <b>QNH</b> YDVTTGK <b>FHC</b> NIPGLYYFSFHITVY <b>LK</b> DVKV <b>SL</b> YK	
Mouse	<u>GLE</u> TRVTVPNVP <b>IRFTK</b> IFYNQ <b>QNH</b> YDN <b>STGK</b> FCNIPGLYYFSYHITVYMKDVKV <b>SL</b> FK	180
Human	<u>KDK</u> AMLF <b>TYDQY</b> QEN <b>NVDQ</b> ASGSVLLHLE <b>VG</b> DQVWLQVYEGEGER <b>NGLY</b> ADNDND <b>STFT</b> GF	
cow	<u>KDK</u> AVLF <b>TYDQY</b> QEK <b>NVDQ</b> ASGSVLLHLE <b>VG</b> DQVWLQVYEGENHNGVYAD <b>NVND</b> STFTGF	
pig	<u>KDK</u> AVLF <b>TYDQY</b> QDK <b>NVDQ</b> ASGSVLLY <b>LEK</b> GDQVWLQAYGDEENNGVYAD <b>NVND</b> SIF <b>TG</b> F	
Mouse	<u>KDK</u> AVLF <b>TYDQY</b> QEK <b>NVDQ</b> ASGSVLLHLE <b>VG</b> DQVWLQVYGDGDH <b>NGLY</b> AD <b>NVND</b> STFTGF	240
Human	LLYHDT-N	
cow	LLYHNIVE	
pig	LLYHNI-E	
Mouse	LLFHDT-N	247

Fig. 4. The *APM1* primary sequence, domain structure, and alignment among human, cow, pig, and mouse orthologs. The underlined sequences at the N-terminus indicates signal peptide sequence. The 22 periodic glycine residues defining the collagenous domain are showed as bold letters. The globular domain of *APM1*(boxed) is located at the C-terminus.

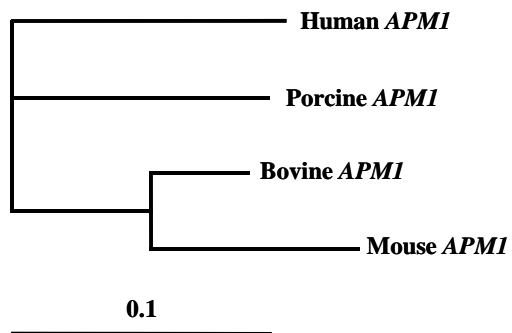


Fig. 5. A neighbor-joining tree constructed from the amino acid sequences of four mammals. This tree was generated using PAM(Point Accepted Mutation) model of amino acid mutation by Dayhoff et al.(1978).

있다. 돼지의 아미노산 서열은 사람 및 소의 서열과 83%의 유사성을 보였으며, 마우스와는

79%를 보였다. SSCP 분석과 염기서열 분석 결과에서 확인된 한국재래돼지와 한국야생돼지의 특이적인 변이는 아미노산을 암호화하는 코돈의 3번째 부위에서 발생하는 silent mutation으로서 아미노산의 변화는 발생하지 않았다.

본 자료에서 명시하지 않았지만 사람, 마우스, 소, 돼지의 *APM1*의 아미노산 서열을 토대로 Dayhoff 등(1978)의 PAM model을 이용하여 유전적 거리지수를 측정 한 결과, 돼지와 소가 0.1791로 가장 낮은 수치를 나타내었으며, 사람, 마우스 순으로 멀어짐을 보였다. Fig 4의 neighbor-joining tree에서 역시 돼지와 소가 가장 가까운 유연관계를 나타내었으며, 이들은 우제목(Artiodactyla)에 속하기 때문에 사람과 마우스에 비해서 상대적으로 유전자의 유사성이나 계통유전학적인 연관성이 더 높은 것으로 사료된다.

## IV 요약

*APMI*(adipose most abundant gene transcript 1)은 지방세포에서 분비되는 단백질로서 *Adiponectin*을 암호화하며 *GBP-28*, *AdipoQ*, *Acrp30*으로 불리워졌다. 이 유전자는 쥐의 16번 염색체 및 인간의 3번 염색체 q27 부위에 존재하며 지방의 대사 및 호르몬의 여러 과정에 중요하게 작용하는 것으로 알려져 왔다. 돼지에서 *APMI*과 양적형질과의 연관성을 알아보기 위하여 somatic cell hybrid panel과 radiation hybrid panel을 이용하여 염색체상의 위치를 밝혀냈다. 분석결과 이 유전자는 돼지 13번 염색체의 q41이나 q46-49에 존재하는 것으로 밝혀졌다. RH panel의 분석 결과, 이 *APMI*과 가장 연관이 된 marker는 *SIAT1*(LOD score 20.29)로 밝혀졌으며 이미 보고된 지방과 관련된 양적형질 유전자 좌위와 일치하였다. 8개의 다른 품종을 이용한 SSCP 분석으로, 한국재래돼지와 한국야생돼지에서 두 개의 특이한 SSCP 타입이 발견되었으며 sequence 분석결과 두 개의 염기가 치환(T672C and C705G)되어 있음을 알 수 있었다. 이 유전자는 사람, 마우스, 소의 염기서열과 약 79-87%의 상동성을 가지고 있으며 다른 포유동물에서 밝혀진 signal sequence, hypervariable region, collagenous region, globular domain과 유사한 구조로 되어 있음을 알 수 있었다.

## V 사 사

이 논문은 2003년도 충남대학교 자체연구비의 지원에 의하여 연구되었음.

## VI 인용 문헌

- Band, M. R., Larson, H. H., Rebeiz, M., Green, C. A., Heyen, D. W., Donovan, J., Windish, R., Steining, C., Mahyuddin, P., Womack, J. E. and Lewin, H. A. 2000. An ordered comparative map of the cattle and human genomes. *Genome Res.* 10:1359-68.
- Barendse, W., Vaiman, D., Kemp, S. J., Sugimoto, Y., Armitage, S. M., Williams, J. L., Sun, H. S., Eggen, A., Agaba, M., Aleyasin, S. A., Band, M., Bishop, M. D., Buitkamp, J., Byrne, K., Collins, F., Cooper, L., Coppettiers, W., Denys, B., Drinkwater, R. D., Easterday, K., Elduque, C., Ennis, S., Erhardt, G., Ferretti, L., Flavin, N., Gao, Q., Georges, M., Gurung, R., Harlizius, B., Hawkins, G., Hetzel, J., Hirano, T., Hulme, D., Jorgensen, C., Kessler, M., Kirkpatrick, B. W., Konfortov, B., Kostia, S., Kuhn, C., Lenstra, J. A., Leveziel, H., Lewin, H. A., Leyhe, B., Lil, L., Martin Burriel, I., McGraw, R. A., Miller, J. R., Moody, D. E., Moore, S. S., Nakane, S., Nijman, I. J., Olsaker, I., Pomp, D., Rando, A., Ron, M., Shalom, A., Teale, A. J., Thieven, U., Urquhart, B. J. D., Vage, D. I., Van de Weghe, A., Varvio, S., Velmala, R., Vilkki, J., Weikard, R., Woodside, C., Womack, J. E., Zanotti, M. and Zaragoza, P. 1997. A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. *Mamm. Genome* 8:21-28.
- Chevalet, C., Gouzy, J. and SanChristobal-Gaudy, M. 1997. Regional assignment of genetic markers using a somatic cell hybrid panel: a WWW interactive program available for the pig genome. *Comput. Appl. Biosci.* 13:69-73.
- Das, K., Lin, Y., Widen, E., Zhang, Y. and Scherer, P. E. 2001. Chromosomal localization, expression pattern, and promoter analysis of the mouse gene encoding adipocyte-specific secretory protein *Acrp30*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257:79-83.
- Dayhoff, M. O., Schwart, R. M. and Orcutt, B. C. 1978. A model of evolutionary change in proteins. In: Dayhoff, M. (Ed.), *Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol. 5. National Biomedical Research Foundation, Washington, DC, pp.345-352.
- Grisart, B., Coppeters, W., Farnir, F., Karim, L., Ford, C., Berzi, P., Cambisano, N., Mni, M., Reid, S., Simon, P., Spelman, R., Georges, M. and Snell, R. 2002. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine *DGAT1* gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Res.* 12:222-31.
- Hawken, R. J., Murtaugh, J., Flickinger, G. H., Yerle, M., Robic, A., Milan, D., Gellin, J., Beattie, C. W., Schook, L. B. and Alexander, L. J. 1999. A first-generation porcine whole-genome radiation hybrid map. *Mamm. Genome* 10:824-30.
- Hu, E., Liang, P. and Spiegeman, B. M. 1996. *AdipoQ* is a novel adipose-specific gene dys-regulated in obesity. *J. Biol. Chem.* 271:10697-10703.



9. Kappes, S. M., Keele, J. W., Stone, R. T., McGraw, R. A., Sonstegard, T. S., Smith, T. P., Lopez-Corrales, N. L. and Beattie, C. W. 1997. A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Res.* 7:235-249.
10. Katz, E. B., Burcelin, R., Taso, T. S., Stenbit, A. E. and Charron, M. J. 1996. The metabolic consequences of altered glucose transporter expression in transgenic mice. *J. Mol. Med.* 74:63-652.
11. Lange, K., Boehnke, M., Cox, D. R. and Lunetta, K. L. 1995. Statistical methods for polyploid radiation hybrid mapping. *Genome Res.* 5:136-150.
12. Ma, R. Z., Beever, J. E., Da, Y., Green, C. A., Russ, I., Park, C., Heyen, D. W., Everts, R. E., Fisher, S. R., Overton, K. M., Teale, A. J., Kemp, S. J., Hines, H. C., Guerin, G. and Lewin, H. A. 1996. A male linkage map of the cattle (*Bos taurus*) genome. *J. Hered.* 87:261-71.
13. MacLennan, D. H., Duff, C., Zorzato, F., Fujii, J., Phillips, M., Korneluk, R. G., Frodis, W., Britt, B. A. and Worton, R. G. 1990. Ryanodine receptor gene is a candidate for predisposition to malignant hyperthermia. *Nature* 343:559-561.
14. Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. and Matsubara, K. 1996. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, APM1(adipose most abundant gene transcript 1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221:286-289.
15. Malek, M., Dekkers, J. C., Lee, H. K., Baas, T. J. and Rothschild, M. F. 2001. A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. I. Growth and body composition. *Mamm. Genome* 12:630-636.
16. Milan, D., Jeon, J. T., Looft, C., Amarger, V., Robic, A., Thelander, M., Rogel-Gaillard, C., Paul, S., Iannuccelli, N., Rask, L., Ronne, H., Lundstrom, K., Reinsch, N., Gellin, J., Kalm, Roy, P. L., Chardon, P. and Andersson, L. 2000. A mutation in *PRKAG3* associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science* 288:1248-51.
17. Nicholas, F. W. and Harper, P. A. 1996. Inherited disorders: the comparative picture. *Aust. Vet. J.* 73:64-66.
18. Rohrer, G. A., Alexander, L. J., Hu, Z., Smith, T. P., Keele, J. W. and Beattie, C. W. 1996. A comprehensive map of the porcine genome. *Genome Res.* 6:371-391.
19. Schaffler, A., Orso, E., Palitzsch, K. D., Buchler, C., Drobnik, W., Furst, A., Scholmerich, J. and Schmitz, G. 1999. The human apM-1, an adipocyte-specific gene linked to the family of TNF's and to genes expressed in activated T cells, is mapped to chromosome 1q21.3-q23, a susceptibility locus identified for familial combined hyperlipidaemia(FCH). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260:416-425.
20. Scherer, P. E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G. and Lodish, H. F. 1995. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 270:26746-26749.
21. Takahashi, M., Arita, Y., Yamagata, K., Okutomi, K., Horie, M., Shimomura, I., Hotta, K., Kuriyama, H., Kihara, S., Nakamura, T., Yamashita, S., Funahashi, T. and Matsuzawa, Y. 2000. Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin. *Int. J. Obes. Metab. Disord.* 24:861-868.
22. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25:4876-4882.
23. Tsao, T. S., Stenbit, A. E., Li, J., Houseknecht, K. L., Zierath, J. R., Katz, E. B. and Charron, M. J. 1997. Muscle-specific transgenic complementation of GLUT4-deficient mice. Effects on glucose but not lipid metabolism. *J. Clin. Invest.* 100:671-677.
24. Wiecek, A., Kokot, F., Chudek, J. and Adamczak, M. 2002. Adipose tissue - a novel endocrine organ of interest for the nephrologist. *Nephrol. Dial. Transpl.* 17:191-195.
25. Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., Eto, K., Akanuma, Y., Froguel, P., Foufelle, F., Ferre, P., Carling, D., Nagai, R., Kimura, S., Kahn, B. B. and Kadowaki, T. 2002. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* 8:1288-1295.
26. Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., Ezaki, O., Akanuma, Y., Gavrilova, O., Vinson, C., Reitman, M. L., Kagechika, H., Shudo, K., Yoda, M., Nakano, Y., Tobe, K., Nagai, R., Kimura, S., Tomita, M., Froguel, P. and Kadowaki, T. 2001. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat. Med.* 7:887-888.
27. Yerle, M., Echard, G., Robic, A., Mairal, A., Dubut-Fontana, C., Riquet, J., Pinton, P., Milan,

- D., Lahbib-Mansais, Y. and Gellin, J. 1996. A somatic cell hybrid panel for pig regional gene mapping characterized by molecular cytogenetics. *Cytogenet. Cell Genet.* 73:194-202.
28. Yerle, M., Pinton, P., Robic, A., Alfonso, A., Palvadeau, Y., Delcros, C., Hawken, R., Alexander, L., Beattie, C., Schook, L., Milan, D. and Gellin, J. 1998. Construction of a whole-genome radiation hybrid panel for high-resolution gene mapping in pigs. *Cytogenet. Cell Genet.* 82:182-188.
29. Yoda, M., Nakano, Y., Tobe, T., Shioda, S., Dhoi-Miura, N. H. and Tomita, M. 2001. Characterization of mouse GPB2 and its induction by exposure to cold. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 25:75-83.
- (접수일자 : 2004. 5. 21. / 채택일자 : 2004. 7. 5.)