한국가금학회지 제 35권 제 4호, 335~339 (2008)
Korean J. Poult. Sci. Vol. 35, No.4, 335~339 (2008)

한국 재래닭의 경제형질 개량을 위한 apoVLDL-II 유전자의 유전자형 분석

정기철[1] · 이유주[1] · M. S. A. Bhuiyan[1] · 장병귀[2] · 최강덕[3] · 이준헌[1,†]
[1]충남대학교 동물자원과학부, [2]농촌진흥청 난지농업연구소, [3]한경대학교 생물정보통신대학원

Genotype Analysis of apoVLDL-II Gene in Korean Chicken Breeds

K. C. Jung[1], Y. J. Lee[1], M. S. A. Bhuiyan[1], B. K. Jang[2], K. D. Choi[3] and J. H. Lee[1,†]
[1]*Division of Animal Science and Resources, Chungnam National University*
[2]*National Institute of Animal Science, R.D.A.*
[3]*The Graduate School of Bio & Information Technology, Hankyong National University*

ABSTRACT The very low density apolipoprotein-Ⅱ (apoVLDL-Ⅱ) gene is closely related with the constitution of the lipoprotein in various tissues. The apoVLDL-Ⅱ gene have main functions for reducing fat elements from tissues and muscles. Previous results indicated that the polymorphisms in apoVLDL-Ⅱ gene were positively related with growth and body composition traits in chicken. In this study, we analyzed previously identified apoVLDL-Ⅱ gene polymorphisms using the PCR-RFLP method and investigated allele and genotype frequencies in three chicken breeds. Data indicated that Korean native chicken and Korean Oge chicken have similar B and F gene frequencies, indicating that this marker can be used for the improvement of growth and body composition traits in those breeds and can be used as marker assisted selection with further verifications.

(Key words : apoVLDL-Ⅱ gene, allele frequency, growth, body composition)

서 론

동물의 형질 개량은 육종학에 바탕을 둔 선발과 교배에 의하여 현재까지 계속적으로 이루어져 왔으며, 유전 능력의 계량은 괄목한 성과를 거두어 오고 있다. 그러나 최근에 분자유전학의 발달과 더불어 DNA marker를 동물의 육종에 이용하는 분자 육종학(Molecular Breeding)이 새롭게 등장하였다. 최근 돼지와 소의 경우, 경제적으로 유용한 형질의 개량에 분자유전학적인 DNA marker를 이용하여 선발의 정확도를 높이는 동시에 개량의 효과를 극대화시키고 있다. 소의 경우 대표적인 DNA marker는 육질 관련 유전자인 calapin과 calpastatin으로 이들 DNA marker의 유전자형을 이용하여 호주와 뉴질랜드의 Catapult Genetics사와 미국의 Igenity사에서 농가를 상대로 상업적인 서비스를 하고 있다(http://www. geneticsolutions.com.au/; http://www.igenity.com/). 또한, 호주의 연구소인 CSIRO 연구원에 의해 개발된 TG5(Thyroglobulin) 유전자의 경우 육질 중요 판단 요소 중 하나인 근내지방도와 밀접한 연관이 있는 것으로 밝혀져 육질 선발용 마커로 널리 이용되고 있다. 돼지의 경우, 지금까지 상업적으로 이용되는 DNA marker의 수는 소에 비해 더 많아 PSS(Porcine stress syndrome)와 관련된 RYR1 유전자, 산자수의 중요한 마커인 ESR 유전자, 근육량과 밀접한 관계가 있는 IGF2 유전자 및 육질과 관련된 PRKAG3 등 많은 DNA marker가 상업적으로 이용되고 있으며, 현재 전 세계의 여러 연구자들이 경제형질 관련 DNA marker의 개발에 활발히 참여하고 있다(이와 박, 2005).

사람의 전체 genome sequence의 draft가 완성된 후, 가축중 소와 닭의 1차 draft가 완성되었으며, 2008년 9월 현재 돼지와 말의 염기서열 분석이 진행 중에 있어 멀지 않아 주요 경제 가축의 유전체 분석이 완료될 예정이다. 이미 mouse 등의 model 동물에서는 유전체 염기서열의 분석이 완료되어 포스트게놈(post-genome)의 시대로 접어들고 있으며, 신약 개발 등을 목표로 많은 연구들이 진행되고 있다(Weinshilboum과 Wang, 2004). 닭의 경우, 2004년에 draft genome sequence가 발표됨과 동시에 미국국립보건원에서 척추동물의 발생 및 발달 유전학의 필요성 때문에 연구에 필요한 model organism으

† To whom correspondence should be addressed : junheon@cnu.ac.kr

로 등록되어 그 중요성이 더욱 강조되고 있다(Wallis 등, 2004). 이런 시대적 흐름에 맞추어 최근의 유전학은 구조 유전체학(structural genomics)의 단계를 지나 기능 유전체학(functional genomics) 및 systems biology의 단계로 접어들고 있으며, 생명체를 구성하고 있는 수많은 유전자들의 기능 이해를 통한 유전체내에 잠재되어 있는 유전 정보를 능동적으로 활용하는 방향으로 연구가 진행되고 있다.

과거에 비해 사양 기술과 사육 환경이 매우 개선되어 환경에 의한 형질의 개선을 기대하기 매우 힘든 현대의 동물 사육 여건에서는 동물의 유전 능력 향상에 의한 생산성 증대가 더욱더 강조되고 있다. 이와 관련하여 현재 많은 유전자들이 그 특이적 기능과 연관되어 개발자들에 의해 이용의 독점권이 주장되고 있다. 이러한 면에서 현재 유용유전자 관련 연구는 이미 관련 유전자의 발굴뿐만 아니라 유전자의 작용기전을 밝히는 한 차원 높은 방향으로 나아가고 있다(Van Laere 등, 2003).

일반적으로 지질(lipid)은 혈액을 통해 각 신체 부위로 운반되며 지질의 종류로 알려진 콜레스테롤(cholesterol)과 중성지방(triglyceride)은 수용성이 아니므로 혈장에 용해되지 않는다. 따라서 지질단백(lipoprotein)이 존재하여 지질(lipid)을 혈중 콜레스테롤과 중성지방이 운반하며, 외부의 인지질과 유리 콜레스테롤 및 지방-단백 결합체인 아포지단백(apolipoprotein)을 형성한다. 아포지단백은 지질단백을 분해하는 효소를 자극하거나 세포 표면에 있는 지질단백 수용체에 지질단백이 결합하게 매개를 하는 ligand 역할을 함으로써, 결합된 아포지단백의 종류에 따라 지질단백의 대사가 결정된다. 본 연구에서는 지질단백 중 여러 조직의 지방단백질 분비와 밀접한 관련을 가진 유전자인 Very low density apolipoprotein-Ⅱ(apoVLDL-Ⅱ) 유전자의 변이를 살펴보았다. 특히, apoVLDL-Ⅱ는 초저밀도 지방을 분비하며 plasma에서 중성지방의 운반에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 이 유전자는 계란내 protein의 구성 성분 중 하나로 지방단백질 분해 효소의 inhibitor로 작용하고 중성지방을 유지하는 기능이 있는 것으로 알려져 있다. 닭의 apoVLDL-Ⅱ 유전자의 전체 nucleotide sequence는 van het Schip 등(1983)에 의해 처음 밝혀졌으며, 이 유전자는 간에서 합성되며 발생중인 배자의 지방구성에 관여한다고 보고되었다(Luskey 등, 1974). Douaire 등(1992)이 밝힌 apoVLDL-Ⅱ 유전자가 성장과 관련이 있음을 밝혀낸 연구를 토대로 최근에는 apoVLDL-Ⅱ 유전자를 PCR-RFLP 방법을 이용하여 성장과 body composition에 관한 후보 유전자로서 연구가 행해졌다(Li 등, 2005).

본 연구는 닭에서 성장 및 체구성과 높은 연관성이 있다고 알려진 apoVLDL-Ⅱ 유전자를 한국재래계, 오계 및 백색레그혼 종에서 유전자형 및 유전자형 빈도를 추정함으로써 차후 성장 및 체구성 향상을 위한 유전적 표지로서의 가능성을 제시하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시 재료

본 연구에서 이용된 공시재료는 성환에 위치한 축산과학원 가금과에서 사육중인 한국재래계 78수와 오계 55수, 백색레그혼(White Leghorn) 64수를 이용하였다.

2. Genomic DNA 추출

공시계의 익정맥에서 200 μL의 혈액을 EDTA가 함유된 tube에 채혈하였으며, DNA 추출은 QIAamp® DNA Blood Mini Kit(QIAGEN, USA)와 MagExtractor® Genome kit(TOYOBO, Japan)를 이용하여 지침서에 따라 추출하였고, 추출된 DNA는 실험에 이용될 때까지 4℃에 저장하였다.

3. apoVLDL-II 유전자의 PCR 증폭

닭의 apoVLDL-Ⅱ 유전자를 증폭하기 위한 primer는 Li 등(2005)에 의해 보고된 apoVLDL-Ⅱ 유전자 5'-flanking 부분 primer(apoVLDLⅡ-F : 5' CCT CTA TGA CAT GGT TGC CT 3', apoVLDLⅡ-R : 5' ATG GGT TTG ACC CTG CTA TG 3')를 이용하였다. PCR(Polymerase Chain Reaction) 증폭은 10 X 반응 완충액(Tris-HCl pH 9.0, 200 mM $MgCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$, PCR enhancers), 10 mM dNTP, forward와 reverse primer 각각 10 pmol, 1.5 units *Taq* DNA polymerase(GENET BIO, Korea)와 genomic DNA 그리고 멸균수를 첨가하여 총 25 μL 용량으로 반응하였다. PCR 반응 조건은 94 ℃에서 3분간 변성시키고, 94 ℃에서 3분, 65 ℃에서 1분, 72 ℃에서 1분씩 37회 반복하였으며, 마지막으로 72℃에서 10분간 반응시킨 후 4 ℃에서 보관하였다.

4. PCR-RFLP

증폭된 PCR 산물은 밝혀진 다형성 부위에 특이적으로 반응하는 *Sfc* I 제한 효소(New England Biolabs, USA)를 사용하여 37 ℃에서 처리 후 2% agarose gel 상에서 전기영동기법으로 확인하여 품종별 유전자형을 분석하였다. 각 개체는 RFLP band pattern을 확인하였으며, Li 등(2005)이 보고한 바와 같이 Broiler type인 B allele과 Fayoumi type인 F allele로 결정하였다.

5. 유전자 Cloning과 염기서열 분석

각 품종별 닭의 apoVLDL-Ⅱ 유전자 부분에 다형 현상을 나타내는 유전자 서열을 재확인하기 위하여 PCR 증폭산물을 cloning한 후 sequencing을 수행하였다. PCR 산물은 pGEM®-T Easy plasmid vector(Promega, USA)를 사용하여 cloning하였고, QIAprep® spin Miniprep Kit(QIAGEN, USA)으로 plasmid에서 DNA를 추출하였다. 각 타입별로 sequencing한 후 염기서열 분석은 Chromas software(Technelysium, Australia)를 사용하였다.

결과 및 고찰

양적 형질은 그 작용하는 유전자가 매우 많고 각각의 작용역가가 너무 경미하여 그 효과를 일일이 나타낼 수 없다는 것이 기존의 이론이었다. 그러나 이 이론은 여러 가축에서 양적형질 유전좌 좌위(QTL: Quantitative Trait Locus) 탐색 결과가 나옴으로써 특정 양적 형질에 작용하는 주요 유전자가 존재한다고 바뀌게 되었다. 각 가축의 양적 형질 유전좌 좌위는 최근 QTL database에 모아지고 있는데, 이는 표현형에 관련된 유전자를 탐색하고 다른 연구 결과를 비교하는데 매우 유용하게 이용될 수 있다. 다양한 종에서 QTL 탐색은 여러 대사 활동의 결과물인 표현형에 주요하게 영향을 미치는 유전좌위를 찾는데 매우 유용하다고 알려져 있다(Andersson, 2001). 이렇게 밝혀진 유전좌위들은 수백에서 수천개의 유전자를 포함하는데 닭의 연구에서도 마찬가지로 현재까지 많은 QTL들이 실험에 의해 밝혀졌다(Hocking, 2005). 따라서 최근에는 형질의 원인이 되는 후보 유전자를 선발하는데 더욱 많은 관심을 기울이고 있다. Abasht 등(2006)은 닭의 QTL을 보고한 50편의 논문을 조사하여 총설을 보고하였는데, 그 중 21편은 닭의 성장과 근육 성분 조성에 관련된 것이었고, 13편은 질병 저항, 8편은 산란, 5편은 닭의 행동, 3편은 대사 활동에 관련된 연구들이었으며, 특히 최근까지 닭의 성장에 관련된 연구가 많이 진행되고 있음을 알 수 있다. 2004년 Red Jungle Fowl line(UCD011)을 이용한 chicken genome project가 완성되었으며(http://www.chicken-genome.org/), 닭의 전체 염기서열 분석에는 whole genome shotgun 방법과 BAC(Bacterial Artificial Chromosome) contig 방법을 같이 이용하였다. Chicken genome project 결과는 양계 연구뿐만 아니라 비교유전학, 진화생물학, 분류학, 축산학, 사람과 관련된 질병 연구에 많은 도움을 줄 것으로 예상하고 있다(Burt, 2005). 또한, 최근에 미국 국립보건원에서 모델 동물로 선정되어 그 중요성이 더욱 강조되고 있다.

본 연구에서 닭의 성장과 체조성과 밀접한 관련이 있다고 알려진 apoVLDL-Ⅱ 유전자의 변이를 한국재래계, 오계 및 백색 레그혼에서 확인을 하였으며, 각 집단간 유전자형 및 유전자 빈도를 조사함으로써 차후 이 집단에 있어 성장과 체구성을 개량하는 마커 개발을 목적으로 실시하였다.

PCR 증폭을 실시한 결과, 모든 품종에서 492 bp의 증폭 산물을 확인할 수 있었다. Broiler 타입(B)과 Fayoumi 타입(F)을 결정짓는 염기 변이를 조사하기 위해 *Sfc* Ⅰ 제한 효소를 사용하여 PCR-RFLP를 실시한 결과, Broiler 타입은 396 bp, 96 bp의 단편이 검출되었고, Fayoumi 타입은 492 bp의 단편이 검출되었다. BB 유전자형에서의 약한 492 bp의 PCR product의 출현은 *Sfc* Ⅰ 제한 효소가 충분하지 않아 나타나는 현상으로 유전자형 분석에는 영향을 주지 않았다(Fig. 1). 또한, 각 타입별 염기서열을 분석하여 634 bp 위치(accession number V00448)에서 G/A 염기에 SNP를 확인하였다(Fig. 2). 닭의 품종간 타입별 유전자 빈도와 유전자형 빈도를 분석한 결과, 한국재래계, 오계 및 백색레그혼에서 전반적으로 BF 유전자형이 가장 높게 나타났으며, 유전자의 빈도가 대체로 비슷한 양상을 나타내었다. 이렇게 집단내에 B와 F의 유전자가 동시에 존재한다는 것은 이 유전자의 변이를 통하여 apoVLDL-Ⅱ 유전자와 연관이 되어 있는 체중 및 체조성과 관련된 형질을 개량할 수 있음을 의미하기도 한다. 본 연구 결과에서는 FF

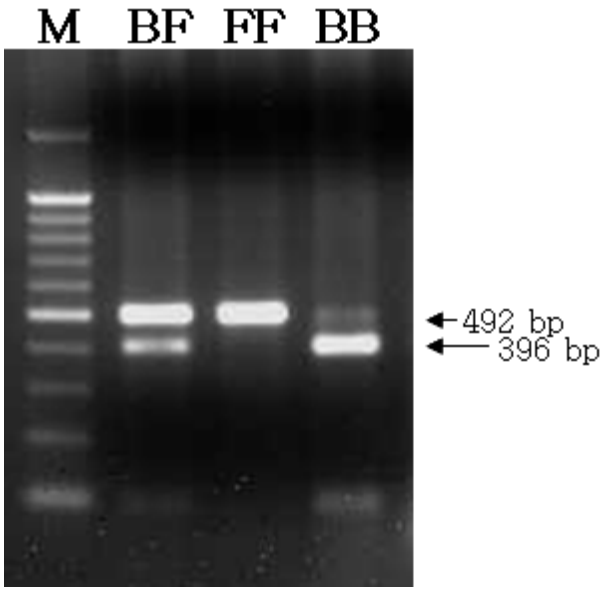

Fig. 1. PCR-RFLP patterns for apoVLDL-Ⅱ gene with *Sfc* I restriction enzyme digestion. M: 100 bp size marker; B: broiler allele; F: Fayoumi allele.

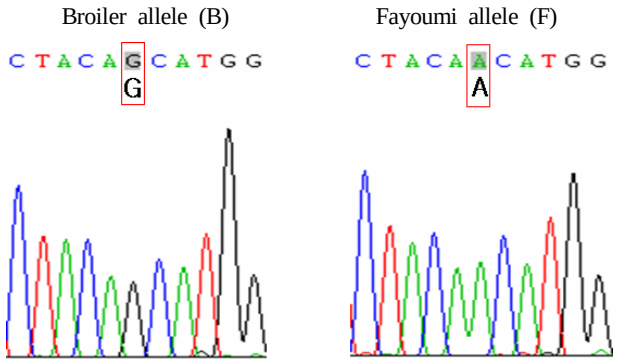

Fig. 2. Confirmation of G/A single nucleotide polymorphism at 634 bp position in apoVLDL-Ⅱ gene (Gene Bank accession no. V00448). Broiler allele (B) and Fayoumi allele (F) are also indicated.

유전자형이 백색레그혼에서 존재하지 않은 것으로 밝혀졌으나, BF 유전자의 높은 빈도로 미루어 볼 때 본 연구에 이용된 집단에 의한 편차일 것으로 사료되며, 집단의 크기를 크게 하면 FF 유전자형도 확인될 것으로 생각된다(Table 1). 또한, Hardy-Weinberg 평형 분석을 실시한 결과, 백색레그혼 집단에서 유의성(P<0.05)이 나타났는데, 이는 본 연구에 이용된 백색레그혼이 고도의 선발에 의해 집단이 유지되었거나 본 연구에 이용된 백색레그혼 개체들이 임의 집단이 아님을 의미한다. 따라서 백색레그혼 집단의 유전 분석을 다른 집단에서 동일하게 실시할 필요가 있을 것으로 사료된다.

최근 Li 등(2005)은 apoVLDL-Ⅱ 유전자의 Broiler 타입(B allele)은 Fayoumi 타입(F allele)보다 성장이 빠르고 체구성이 좋으며 이 유전자의 변이가 육종에 이용될 수 있다고 보고하였다. 본 연구를 통하여 한국의 고유한 유전자원인 한국재래계와 오계는 apoVLDL-Ⅱ 유전자형의 변이가 집단내 다양하게 존재하고 있어서 선발을 통하여 성장과 체구성을 개선할 수 있는 가능성이 있다는 결론을 내릴 수 있으며, apoVLDL-Ⅱ 유전자는 유전적 표지로서 이용될 가능성이 매우 높다는 것을 알 수 있었다. 그러나 본 연구에서는 형질과 유전자형과의 연관 관계를 살펴보지 않았으므로 앞으로 유전적 표지로 이용하기 위해서는 이런 연구가 선행되어야 할 것으로 사료된다.

적 요

초저밀도 아포지단백(Very Low Density Apolipoprotein-Ⅱ)은 조직의 지방단백질 분비 조성과 밀접한 관련이 있다고 알려진 유전자로서 최근 닭에서 성장 및 체구성과 매우 높은 연관이 있다고 알려져 있다. 본 연구는 닭의 3품종에서 PCR-RFLP 방법을 통해 apoVLDL-Ⅱ 유전자의 유전자형을 분석하고 Broiler 형(B)과 Fayoumi 형(F)을 결정하였다. 각 품종간 유전자형 빈도는 한국 재래계에서 BB가 0.37, BF가 0.43, FF가 0.2로 검출되었고, 오계에서 BB가 0.2, BF가 0.6, FF가 0.2로 검출되었으며, 백색레그혼에서 BB가 0.16, BF가 0.84로 검출되었다. Broiler 형은 성장이나 체구성을 높이는 방향으로 작용한다는 기존의 보고를 바탕으로 본 연구에서 나타난 집단내 다양한 유전자형 분포는 재검증 작업을 거쳐 육종에 의해 이 형질들을 개량할 수 있음을 의미한다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청의 FTA 대응기술개발사업(실용계 토종닭의 품종 식별 및 집단유전학적 분석)의 지원에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

Abasht B, Dekkers JC, Lamont SJ 2006 Review of quantitative trait loci identified in the chicken. Poult Sci 85:2079-2096.

Table 1. Genotype and gene frequencies of apoVLDL-Ⅱ gene in three chicken breeds used in this study

Breed	No of animal	Genotypes			Allele frequency		HWE[a]
		BB	BF	FF	B	F	
Korean native chicken	78	29	34	15	0.59	0.41	P>0.05
Korean Oge chicken	55	11	33	11	0.50	0.50	P>0.05
White Leghorn	64	10	54	−	0.58	0.42	P<0.05

[a] Hardy-Weinberg equilibrium test for each breed was performed according to Falconer and Mackay (1996).

Andersson L 2001 Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. Nat Rev Genet 2:130-138.

Burt DW 2005 Chicken genome: current status and future opportunities. Genome Res 15:1692-1698.

Douaire M, Le Fur N, El Khadir-Mounier C, Langlois P, Flamant F, Mallard J 1992 Identifying genes involved in the variability of genetic fatness in the growing chicken. Poult Sci 71:1911-1920.

Falconer DS, Mackey TFC 1996 Introduction to quantitative genetics. 4th ed. Addison Wesley Longman Limited, Edinburgh Gate, Harlow.

Hocking PM 2005 Review of QTL results in chicken. World's Poult Sci J 61:215-226.

Li H, Deeb N, Zhou H, Ashwell CM, Lamont SJ 2005 Chicken quantitative trait loci for growth and body composition associated with the very low density apolipoprotein-II gene. Poult Sci 84:697-703.

Luskey KL, Brown MS, Goldstein JL 1974 Stimulation of the synthesis of very low density lipoproteins in rooster liver by estradiol. J Biol Chem 25:5939-5947.

van het Schip AD, Meijlink FC, Strijker R, Gruber M, van Vliet AJ, van de Klundert JA, Ab G 1983 The nucleotide sequence of the chicken apo very low density lipoprotein II gene. Nucleic Acids Res 11:2529-2540.

Van Laere AS, Nguyen M, Braunschweig M, Nezer C, Collette C, Moreau L, Archibald AL, Haley CS, Buys N, Tally M, Andersson G, Georges M, Andersson L 2003 A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. Nature 425(6960):832-836.

Wallis JW, Aerts J, Groenen MA, Crooijmans RP, Layman D, Graves TA, Scheer DE, Kremitzki C, Fedele MJ, Mudd NK, Cardenas M, Higginbotham J, Carter J, McGrane R, Gaige T, Mead K, Walker J, Albracht D, Davito J, Yang SP, Leong S, Chinwalla A, Sekhon M, Wylie K, Dodgson J, Romanov MN, Cheng H, de Jong PJ, Osoegawa K, Nefedov M, Zhang H, McPherson JD, Krzywinski M, Schein J, Hillier L, Mardis ER, Wilson RK, Warren WC 2004 A physical map of the chicken genome. Nature 432(7018):761-764.

Weinshilboum R, Wang L 2004 Pharmacogenomics: bench to bedside. Nat Rev Drug Discov 9:739-748.

이준헌 박찬규 2005 주요 가축들의 유용유전자 및 질병관련 유전자 연구 현황. 한국동물자원과학회지 47:325-340.

(접수: 2008. 09. 18, 수정: 2008. 10. 26, 채택: 2008. 10. 29)