

닭의 성숙/미성숙란에서 RNA Sequencing을 이용한 유전자 발현 양상 고찰

강경수^{1,2*} · 장현준^{1*} · 박미나^{1*} · 최정우^{1*} · 정원형³ · 허강녕¹ · 최창용¹ · 김영주¹ ·
이시우¹ · 조은석¹ · 김남신³ · 김태현¹ · 한재용² · 이경태^{1†}

¹농촌진흥청 국립축산과학원, ²서울대학교 농생명공학부, ³한국생명공학연구원 국가생명연구자지원정보센터

Gene Expression Profiling by RNA Sequencing in Mature/Immature Oocytes of Chicken

Kyung-Soo Kang^{1,2*}, Hyun-Jun Jang^{1*}, Mi Na Park^{1*}, Jung-Woo Choi^{1*}, Won-Hyong Chung³, Kang-Nyeong Heo¹,
Chang-Yong Choe¹, Young-Joo Kim¹, Si-Woo Lee¹, Eun-Seok Cho¹, Namshin Kim³, Tae-Hun Kim¹,
Jae-Yong Han² and Kyung-Tai Lee^{1†}

¹National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

²Department of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

³Korean Bioinformation Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-806, Korea

ABSTRACT Chicken eggs undergo various physiological changes during egg maturation. To study genes associated with the egg maturation in pre-ovulation (immature) and post-ovulation (mature), we compared gene expression patterns between in the immature egg and mature egg using RNA sequencing data. Mature and immature eggs were obtained from a Heuksaek Jaerae-jong of Korean native chicken. Total RNAs obtained from the eggs were sequenced by Illumina HiSeq 2000 platform, and the generated sequence reads were mapped to Galgal4 reference sequence assembly using Tuxedo Protocol. From the comparison of the RNA sequencing data, 315 genes were differentially expressed between mature and immature eggs, and 46 genes were only detected in immature egg. Further gene ontology (GO) analysis was performed for the differentially expressed genes using DAVID, showing that 29 and 28 GO terms were independently clustered from mature and immature, respectively. From those clustered GO terms, genes related to germ cell development, sex differentiation and defense response to bacterium were mainly expressed in the immature egg, while genes related to regulation of apoptosis, steroid metabolic process and lipid homeostasis were mainly detected in the mature egg. Our results could contribute to understand egg maturation before and after ovulation, and develop genetic markers for improving egg quality and productivity.

(Key words : egg maturation, RNA sequencing, gene ontology, differential gene expression)

서 론

닭에서 부화 후 어린 육성추의 난소는 1만여 개 정도의 미세한 크기로 된 난자 덩어리로 구성되어 있으며, 여포 계층 구조를 이루며 성장하게 된다(Pearl, 1917). 품종마다 차이가 있으나, 6개월 암탉에서 지름 1~35 mm가 되는 2,500개 이상의 난포로 이루어진 성숙한 난소를 관찰할 수 있다(Johnson, 2012). 난소는 시산 3~5주 전에 급격한 발달을 시작하는데, 이 시기에 혈액 중에 황체호르몬(Luteinizing Hormone; LH)의 농도가 증가하면서 난소에서 에스트로젠(oestrogen)과 프

로게스테론(progesterone) 그리고 안드로젠(androgen) 호르몬의 분비를 자극하여, 간에서 지방과 단백질 합성을 촉진시킨다(Asem and Hertelendy, 1983; Diaz et al., 2011). 합성된 지방과 단백질 등의 난황물질은 난자에 축적되면서 1개 씩 순차적으로 난자가 성숙하게 된다. 난포의 성숙은 여포 계층 구조를 따라 성장하는데, 보통 3~5 mm 크기로 자라는데 3일 정도 시간이 필요하고, 5~8 mm 자라는데 2 일 정도가 필요하며, 8 mm에서 마지막 단계인 산란까지 걸리는 시간은 6일 정도가 소요된다(Gilbert et al., 1983). 특히 배란 8~10일 전부터 뇌하수체의 성선자극호르몬에 의하여 난황

* 공동 제1저자(Equal contribution)

† To whom correspondence should be addressed : leekt@korea.kr

이 급격히 성장한다(Diaz et al., 2011). 성숙 난자(난황)는 난소에서 체강으로 떨어져 나온다. 떨어져 나온 난자(난황)는 곧바로 난관 끝단에 열려 있는 난관 누두부로 들어가서 수탉의 정자와 만나 수정이 일어난다. 그리고 난황은 난백 분비부인 난관 팽대부로 이동하며, 이곳에서 난백이 분비된다. 그 후에는 협부로 이동되는데, 여기서는 난각막이 형성된다. 난각막을 형성한 계란은 자궁으로 이동하며, 이곳에서는 수분이 난백에 첨부되면서 무게는 2배로 되며, 그 후 난각막 위에 칼슘염이 침착되면서 난각을 형성하게 된다. 마지막으로, 계란은 질부를 통과하여 총배설강에 이르러 산란하게 된다(한국양계연구소, 2001). 이러한 난 성숙 과정은 주로 호르몬에 의해 조절되는데, 초기에는 폴리스타틴(follistatin)이 관여하고, 중기에는 억제 호르몬 B(inhibin B)와 활성 호르몬 A(activin A) 그리고 난황이 성숙되는 말기에는 억제 호르몬 A(inhibin A)가 관여하며(Findlay, 1993; Chen and Johnson, 1996), 특히 난황 성숙의 마지막 단계인 F₁~F₅ 단계의 경우, 여러 종류의 스테로이드 호르몬이 복합적으로 작용하게 된다(Huang and Nalbandov, 1979; Etches and Schoch, 1984). 최근 연구 결과에 따르면, 호르몬 이외에 gga-miR-375나 gga-miR-217 등 small RNA도 난황 성숙에 관여하는 것으로 밝혀졌다(Kang et al., 2013).

이처럼 닭에서 난성숙과 관련된 많은 연구가 수행되어졌음에도 불구하고, 분자생물학적 측면에서 난 성숙과 관련된 조절 유전자들에 대한 전반적인 발현 양상을 연구한 사례가 아직까지 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 배란 전후의 난에서 전체 발현 RNA에 대한 염기서열 해독 및 빈도 분석을 통하여 단계별 유전자 발현 정보를 확보하고, 배란 전후의 특이 유전자 발현 양상을 분석하여 난 성숙 조절과 관련된 유전자들을 발굴하였다. 이러한 정보는 계란의 성숙 과정의 조절 기작을 이해하고, 계란의 품질과 관련된 마커 유전자 개발하는데 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

재료 및 방법

1. 공시계 및 외모 표현형 조사

본 시험에 사용된 공시계인 흑색 재래계 L계통(L421)은 국립축산과학원 가금과에서 보유하고 있는 대표 토종닭 품종으로 7세대 이상의 세대 기록이 있고, 순수혈통이 유지되어 토착화된 재래닭이다. 표현형으로는 모색 전체가 흑색이며, 정강이, 발가락도 회흑색이다(국립축산과학원, 2008; 국립축산과학원, 2011).

2. mRNA 추출 및 라이브러리 제작, 염기서열 분석

흑색 재래계 L계통 암컷 한 마리(L421)를 도축하여 배란 전의 F₁ 단계의 미성숙란과 배란 후 난관 내 성숙란을 샘플링하고, 각각 1개의 미성숙란과 성숙란으로부터 전체 RNA를 추출하였다. 그리고 Oligo(DT) magnetic beads(Invitrogen, USA)를 이용하여 추출된 전체 RNA에서 mRNA를 정제하였다. 이후 RNA fragmentation kit(Ambion, USA)를 이용하여 정제된 mRNA를 절편화하여 paired-end library를 제작하였고, Illumina High-seq 2000 sequencing system을 이용하여 제작된 라이브러리의 염기서열 결정을 수행하였다.

3. Mapping and Counting Reads

생성된 데이터는 Tuxedo Protocol의 Low-divergent sequences mapping을 실시하고, BWA 파일을 생성하였다. TopHat을 이용하여 각 염기서열 단편을 Ensembl에서 제공하는 닭 참조유전체 서열(Galgal4, GCA_000002315.2)에 mapping하였다. 이를 Cufflink를 이용하여 tansfrag 자료를 만들었다. 이렇게 형성된 파일을 Cuffmerge를 이용하여 참조유전체의 발현체(transcriptome) 정보와 통합하고, Cuffdiff를 이용하여 유전자의 발현량이 다른 315개의 유전자를 선정하였다. DAVID 프로그램을 이용하여 이들 315개의 유전자에 대한 온톨로지(gene ontology; GO)를 분석하였다 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/summary.jsp>).

결과 및 고찰

1. 미성숙란과 성숙란 사이에 특이적인 유전자의 발현 양상 분석

미성숙란과 성숙란 사이에 차등 발현을 보이는 유전자를 알아보기 위하여 RNA seq 분석기법을 이용하여 전체 유전자 발현 양상을 비교 분석하였다(fold change>5 또는 <0.2, $p<0.05$). 미성숙란에서의 유전자 발현 정도를 기준으로 성숙란의 발현 정도와 비교하여 fold change 값을 구하였고, 미성숙란과 성숙란에서 특이적으로 발현하는 유전자들을 명확하게 구분하기 위하여, fold change 값에 log₂ 값을 취하여 성숙란에서 높게 발현하는 유전자들은 양의 값으로, 미성숙란에서 높게 발현하는 유전자들은 음의 값으로 나타내었다(Fig. 1). 이와 같은 분석을 통해 67개의 유전자가 성숙란에서 특이적으로 발현하는 것과, 248개 유전자가 미성숙란에서 특이적으로 발현하는 것을 확인하였다(Fig. 1). 특히 미성숙란에서 특이적으로 발현하는 총 248개 유전자 가운데 46

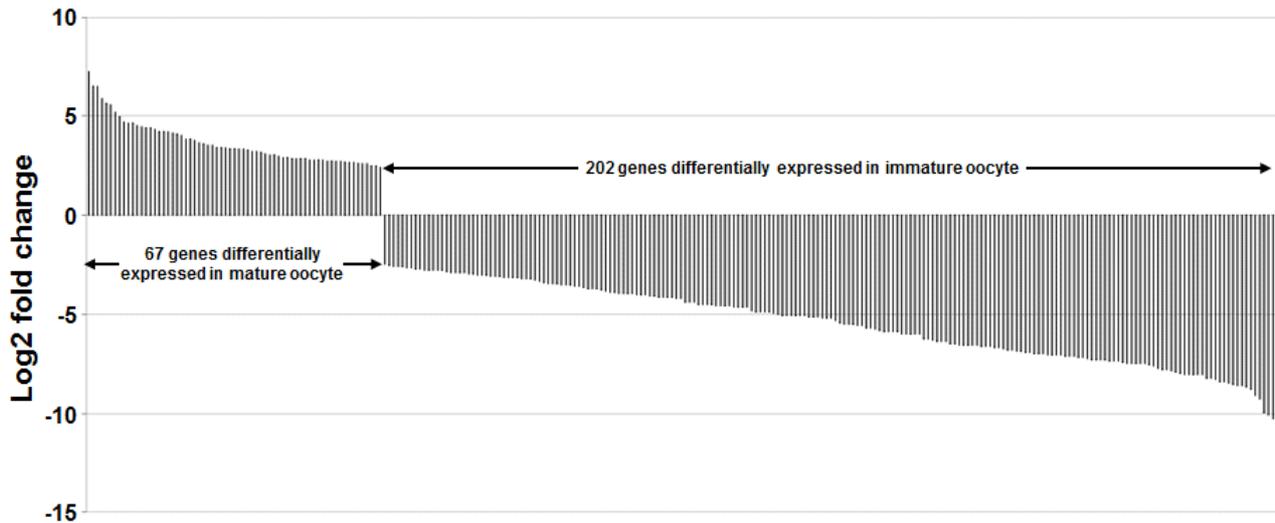


Fig. 1. Expression level of the genes differentially expressed in mature and immature oocytes.

Black bars represent Log₂ fold change values of 67 and 202 genes in mature and immature oocytes, respectively. The positive and negative values of Y axis indicate specifically expressed levels in mature and immature, respectively and X axis represents the analyzed genes in mature and immature oocytes.

개 유전자는 오직 미성숙란에서만 발현하였으며, 성숙란에서는 그 발현이 관찰되지 않았다. 위의 결과를 토대로 성숙란과 미성숙란에서 발현하는 유전자 가운데 발현량의 차이가 큰 상위 10개 유전자에 대한 발현량을 분석하였으며(Table 1), 미성숙란에서만 발현하는 46개 유전자의 발현량을 분석하였다(Table 2). 분석 결과로부터 대다수의 유전자가 배란 후 난이 성숙하게 되면서 발현이 줄어드는 현상을 확인하였다. Elis 등(2008)은 마우스에서 난 성숙과 관련된 것으로 보고된 유전자를 포함하여 28,416개의 유전자 정보가 집적된 Affymetrix사의 GeneChip Chicken Genome Array를 사용하여 닭의 난 성숙과 배 발달에 관여하는 유전자를 보고한 바가 있다. 본 연구에서 미성숙란 특이 과발현 유전자로 나타난 *BTG4*, *DAZL* 유전자는 Elis 등이 보고한 미성숙란 관련 유전자와 일치하고 있다(Table 1, 2). 하지만 성숙란에서 높은 발현을 보인 *ZPD* 유전자는 Elis 등의 보고에서는 미성숙란에서 과발현하는 것으로 나타나 차이가 보인다(Table 1). 이러한 차이는 연구에 사용된 시료의 차이와 분석 기법의 차이에서 기인한 것으로 예상된다. 본 연구에서 특이한 점은 미성숙란에서 배아 줄기세포 생성 과정에서 *OCT4* 및 *SOX2* 와 함께 직접적으로 다분화성 단계를 조절하는 *NANOG* 유전자가 높은 발현을 보였다(Pan and Thomson, 2007; Table 2). 이는 *NANOG*가 닭의 난 발생 초기에 배아 줄기세포 발생에서의 기능하고는 다른 방식으로 난 발달에 관여하고 있다는 것을 입증하는 것이다. 따라서 본 연구에서 도출된 난

발생 관련 유전자들의 발현 패턴은 조류의 난 발생의 특성을 연구하는데 중요한 자료가 될 것이다.

포유동물에서 난자는 제1 감수분열 전기에 1차 세포 정지기 상태로, 5~10개의 원시과립세포(pregranulosa cell)에 둘러싸여 있으며, 이 상태를 원시난포(primordial follicle)라 한다(Gougeon, 1996). 성 성숙시기가 되면 성장을 멈추고 있던 원시난포들 중에서 한 달에 20~30개의 원시난포가 1차 난포(primary follicle)로 성장을 시작하고, 과립세포가 두 층 이상으로 증가하면 이를 2차 난포(secondary follicle)로 발달한다. 이후 과립세포가 증식하여 난포강(antrum)이 형성된 난포(antral follicle)를 3차 난포(tertiary follicle)로 발달하게 되며, 이러한 난 성숙 과정에서 난자와 난포의 성장과정은 밀접하게 연관되어 있다(Braw-Tal, 2002). 난포의 성장이 완성되면 황체형성호르몬(leutinizing hormone)에 의해 난자가 난포 바깥으로 배란(ovulation) 되는데, 이때 난자는 제1 감수분열을 재개하여 제2 감수분열 중기(metaphase II, MII)까지 진행되고, 이후 정자와 수정이 이뤄지기 전까지 2차 세포 정지기를 갖게 된다(Eppig, 2001; Eppig, 2002). 이처럼 난자가 배란되기까지 세포 정지기에 머무는 반면, 난포는 난자가 난관으로 배란되기까지 계속해서 발달하게 된다. 또한 닭 난황은 배란 전에 난소에서 발달하며, 난황을 둘러싼 난백 단백질과 난각 형성이 배란 후에 집중적으로 일어난다(한국양계연구소, 2001). 그러므로 이들 미성숙란에서 특이적으로 발현이 증가하는 248개의 유전자들은 주로 난황의 발달

Table 1. Top 10 differentially expressed genes from mature and immature oocyte-specific genes

| Specifically expressed genes in mature oocyte | | | | | | | | |
|--|-----------------|-----------|-----------------|---------------|-------------|------------------|-----------|-------------|
| Gene ID | Gene symbol | Base mean | Immature oocyte | Mature oocyte | Fold change | log2 gold change | P value | P adjusted |
| ENSGALG00000011234 | <i>INHA</i> | 2,158.148 | 28.060 | 4,288.236 | 152.82622 | 7.25575 | 6.77E-12 | 5.44E-09 |
| ENSGALG00000012327 | <i>INHBA</i> | 642.556 | 14.030 | 1,271.082 | 90.59887 | 6.50142 | 2.57E-11 | 1.87E-08 |
| ENSGALG00000006440 | Novel | 74.739 | 1.651 | 147.828 | 89.56247 | 6.48482 | 0.0011541 | 0.06531808 |
| ENSGALG00000026790 | <i>DMRT2</i> | 99.193 | 3.301 | 195.085 | 59.09655 | 5.88500 | 0.0005208 | 0.034753973 |
| ENSGALG00000001069 | <i>ZPD</i> | 5,044.867 | 202.194 | 9,887.541 | 48.90129 | 5.61180 | 6.32E-06 | 0.000941924 |
| ENSGALG00000009844 | <i>ACTC1</i> | 1,777.151 | 74.275 | 3,480.027 | 46.85308 | 5.55007 | 3.80E-09 | 1.41E-06 |
| ENSGALG00000028102 | Uncharacterized | 237.626 | 12.379 | 462.873 | 37.39111 | 5.22462 | 7.71E-06 | 0.001101344 |
| ENSGALG00000016086 | <i>EGR4</i> | 454.898 | 28.885 | 880.912 | 30.49739 | 4.93061 | 2.22E-07 | 5.07E-05 |
| ENSGALG00000013409 | Uncharacterized | 6,397.296 | 465.459 | 12,329.133 | 26.48815 | 4.72727 | 0.0003139 | 0.023725287 |
| ENSGALG00000028841 | Uncharacterized | 4,930.519 | 369.726 | 9,491.312 | 25.67121 | 4.68208 | 7.38E-05 | 0.007722 |
| Specifically expressed gene in immature oocyte | | | | | | | | |
| ENSGALG00000016664 | <i>NEIL2</i> | 222.194 | 443.176 | 1.212 | 0.00273 | -8.51469 | 4.96E-08 | 1.33E-05 |
| ENSGALG00000011243 | <i>DAZL</i> | 232.922 | 464.633 | 1.212 | 0.00261 | -8.58291 | 2.68E-08 | 7.60E-06 |
| ENSGALG00000000803 | Uncharacterized | 718.987 | 1,434.338 | 3.635 | 0.00253 | -8.62416 | 1.92E-14 | 4.19E-11 |
| ENSGALG00000005842 | <i>GDPD2</i> | 251.079 | 500.946 | 1.212 | 0.00242 | -8.69147 | 9.74E-09 | 3.24E-06 |
| ENSGALG00000004665 | <i>KPNA7</i> | 1,078.590 | 2,152.333 | 4.847 | 0.00225 | -8.79464 | 1.73E-15 | 1.32E-11 |
| ENSGALG00000007055 | Uncharacterized | 331.131 | 661.050 | 1.212 | 0.00183 | -9.09157 | 1.65E-10 | 9.70E-08 |
| ENSGALG00000020819 | Uncharacterized | 753.868 | 1,505.313 | 2.423 | 0.00161 | -9.27880 | 2.93E-15 | 1.49E-11 |
| ENSGALG00000001721 | Uncharacterized | 591.920 | 1,182.628 | 1.212 | 0.00102 | -9.93074 | 1.57E-14 | 4.01E-11 |
| ENSGALG00000008928 | Uncharacterized | 648.864 | 1,296.517 | 1.212 | 0.00093 | -10.06338 | 4.13E-15 | 1.58E-11 |
| ENSGALG00000002083 | Novel | 747.898 | 1,494.584 | 1.212 | 0.00081 | -10.26849 | 6.40E-16 | 9.78E-12 |

및 난포 발달에 관련된 유전자들로 예상되며(Fig. 1), 배란 후 알이 성숙하면서 주로 난관에서 발현하는 유전자 및 단백질에 의해 난 성숙이 이뤄지기 때문에 상대적으로 적은 수의 유전자가 발현하는 것으로 예상된다.

2. 미성숙란과 성숙란 사이에 특이적인 발현 유전자의 기능별 분석

성숙란과 미성숙란에 발현하는 유전자들의 기능을 분석하기 위하여 성숙란과 미성숙란에서 특이적으로 발현하는 유전자에 대하여 GO 분석한 결과, 성숙란에서 특이적으로 발현하는 67개의 유전자에서 29개 GO term이 예측되었고(Table 3), 미성숙란에서 특이적으로 발현하는 248개의 유전자에서

28개의 GO term이 예측되었다(Table 4). 또한 미성숙란과 성숙란에서 특이적인 GO term을 비교해 본 결과, GO term이 전혀 일치하지 않는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 일반적으로 유전자 개수와 GO term 수가 비례하는데 반해서 미성숙란에서는 유전자수에 비하여 상대적으로 적은 GO term이 예측되는 사실을 확인할 수 있다. 이를 미뤄보아 미성숙란에서 특이적으로 발현하는 많은 유전자들이 특정 기능을 수행하는데 집중되어 있다는 것을 추측할 수 있다.

미성숙란에서 특이적으로 발현하는 유전자들과 관련된 기능을 살펴보면 생식세포 발달과 관련된 germ cell development, gonad development, odontogenesis, reproductive structure development, sexual reproduction, female gonad development,

Table 2. Specific expressed gene in immature oocyte

| Gene ID | Gene symbol | Base mean | Immature oocyte | Mature oocyte | <i>P</i> value | <i>P</i> adjusted |
|---------------------|-----------------|-----------|-----------------|---------------|----------------|-------------------|
| ENSGALG00000024381 | Novel | 426.670 | 853.341 | 0 | 3.66E-13 | 6.22E-10 |
| ENSGALG00000027772 | <i>NANOG</i> | 373.027 | 746.054 | 0 | 3.41E-12 | 3.47E-09 |
| ENSGALG00000007618 | <i>BTG4</i> | 281.008 | 562.016 | 0 | 3.05E-10 | 1.66E-07 |
| ENSGALG00000016465 | <i>ZPAX</i> | 280.183 | 560.366 | 0 | 3.18E-10 | 1.68E-07 |
| ENSGALG00000012762 | <i>SYCP2</i> | 268.629 | 537.258 | 0 | 5.97E-10 | 2.85E-07 |
| ENSGALG00000011345 | Novel | 266.153 | 532.306 | 0 | 6.84E-10 | 3.17E-07 |
| ENSGALG00000015968 | <i>ESRP1</i> | 245.521 | 491.042 | 0 | 2.19E-09 | 8.58E-07 |
| ENSGALG00000015406 | <i>MOS</i> | 233.555 | 467.109 | 0 | 4.40E-09 | 1.56E-06 |
| ENSGALG00000012100 | Novel | 217.049 | 434.098 | 0 | 1.18E-08 | 3.75E-06 |
| ENSGALG00000003320 | <i>CCDC180</i> | 214.986 | 429.971 | 0 | 1.34E-08 | 4.16E-06 |
| ENSGALG00000015106 | Novel | 188.989 | 377.979 | 0 | 6.84E-08 | 1.77E-05 |
| ENSGALG00000012145 | <i>TBPL2</i> | 181.975 | 363.949 | 0 | 1.09E-07 | 2.63E-05 |
| ENSGALG00000011052 | <i>SLC38A11</i> | 162.993 | 325.986 | 0 | 3.97E-07 | 8.32E-05 |
| ENSGALG000000021198 | <i>HAUS3</i> | 146.075 | 292.150 | 0 | 1.34E-06 | 0.000262 |
| ENSGALG00000001206 | Novel | 140.298 | 280.596 | 0 | 2.04E-06 | 0.000363 |
| ENSGALG00000001293 | <i>IGF2BP1</i> | 139.885 | 279.770 | 0 | 2.11E-06 | 0.00037 |
| ENSGALG00000014762 | Novel | 139.473 | 278.945 | 0 | 2.17E-06 | 0.000376 |
| ENSGALG00000003904 | <i>MLPH</i> | 129.569 | 259.138 | 0 | 4.58E-06 | 0.000736 |
| ENSGALG00000000394 | <i>SLC6A17</i> | 127.919 | 255.837 | 0 | 5.19E-06 | 0.000817 |
| ENSGALG00000024136 | Novel | 127.506 | 255.012 | 0 | 5.36E-06 | 0.000835 |
| ENSGALG00000010376 | Novel | 125.855 | 251.711 | 0 | 6.08E-06 | 0.000919 |
| ENSGALG00000021452 | Novel | 123.380 | 246.759 | 0 | 7.35E-06 | 0.00106 |
| ENSGALG00000019041 | <i>NOBOX</i> | 113.064 | 226.127 | 0 | 1.65E-05 | 0.002113 |
| ENSGALG00000027373 | Novel | 112.238 | 224.476 | 0 | 1.76E-05 | 0.002237 |
| ENSGALG00000028666 | <i>CCDC175</i> | 103.160 | 206.320 | 0 | 3.63E-05 | 0.004199 |
| ENSGALG00000023693 | Novel | 97.383 | 194.766 | 0 | 5.80E-05 | 0.006333 |
| ENSGALG00000006438 | <i>MNX1</i> | 95.320 | 190.640 | 0 | 6.87E-05 | 0.007341 |
| ENSGALG00000016032 | <i>FBXO43</i> | 95.320 | 190.640 | 0 | 6.87E-05 | 0.007341 |
| ENSGALG00000003403 | <i>ZNF385C</i> | 89.130 | 178.261 | 0 | 0.000114 | 0.010867 |
| ENSGALG00000004401 | <i>WNT11B</i> | 87.067 | 174.134 | 0 | 0.000136 | 0.012364 |
| ENSGALG00000019896 | Novel | 79.640 | 159.279 | 0 | 0.000253 | 0.020579 |
| ENSGALG00000027489 | Novel | 79.640 | 159.279 | 0 | 0.000253 | 0.020579 |
| ENSGALG00000012297 | <i>GRM1</i> | 77.989 | 155.978 | 0 | 0.000291 | 0.022563 |
| ENSGALG00000016268 | <i>CXorf22</i> | 77.576 | 155.153 | 0 | 0.000301 | 0.023125 |

Table 2. Continued

| Gene ID | Gene symbol | Base mean | Immature oocyte | Mature oocyte | P value | P adjusted |
|---------------------|---------------|-----------|-----------------|---------------|----------|------------|
| ENSGALG00000004545 | <i>WDR72</i> | 75.101 | 150.201 | 0 | 0.000371 | 0.026993 |
| ENSGALG000000011349 | Novel | 73.863 | 147.725 | 0 | 0.000412 | 0.029224 |
| ENSGALG000000027973 | <i>CATHL1</i> | 71.387 | 142.774 | 0 | 0.000507 | 0.034176 |
| ENSGALG000000026761 | <i>LIN28B</i> | 69.736 | 139.473 | 0 | 0.000583 | 0.037895 |
| ENSGALG000000019696 | <i>CATHL2</i> | 68.086 | 136.171 | 0 | 0.00067 | 0.042066 |
| ENSGALG000000028207 | <i>ZBBX</i> | 68.086 | 136.171 | 0 | 0.00067 | 0.042066 |
| ENSGALG000000003494 | Novel | 65.610 | 131.220 | 0 | 0.000824 | 0.049788 |
| ENSGALG000000005361 | Novel | 59.833 | 119.666 | 0 | 0.001334 | 0.073347 |
| ENSGALG000000008635 | Novel | 59.833 | 119.666 | 0 | 0.001334 | 0.073347 |
| ENSGALG000000010137 | <i>TTC6</i> | 59.833 | 119.666 | 0 | 0.001334 | 0.073347 |
| ENSGALG000000010500 | <i>NKX6-2</i> | 58.182 | 116.365 | 0 | 0.00153 | 0.079614 |
| ENSGALG000000029089 | Novel | 56.944 | 113.889 | 0 | 0.001694 | 0.085996 |

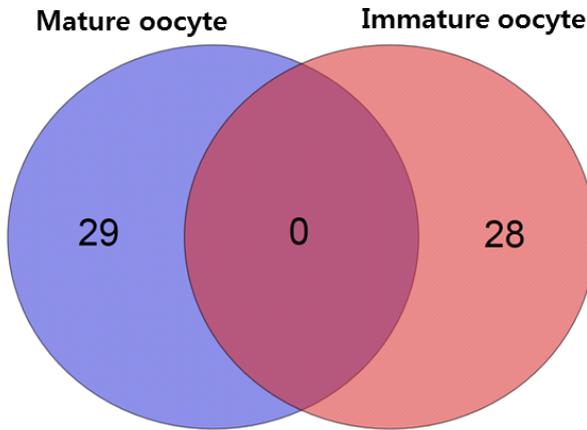


Fig. 2. Comparison of gene ontology terms between mature oocyte and immature oocyte.

reproductive cellular process, reproductive developmental process, gamete generation 등이 예측되었으며, 성 분화와 관련된 sex differentiation, epidermis development, oogenesis, female sex differentiation, development of primary female sexual characteristics, development of primary sexual characteristics 등과 관련된 유전자들이 발현하는 것을 확인하였다. 또한 epithelium development, keratinocyte proliferation, keratinocyte differentiation, odontogenesis of dentine-containing tooth, autonomic nervous system development, tissue morphogenesis 등 배아세포 분화와 관련된 유전자 및 negative regulation of

macromolecule metabolic process, regulation of translation, posttranscriptional regulation of gene expression 등 유전자 조절 기작에 관련된 유전자들의 발현이 증가하였다. 특히 defense response, oligopeptide transport, defense response to bacterium, response to bacterium 등 흥미롭게도 host defense에 관련된 유전자들이 증가하는 것을 확인하였다(Table 4).

반면에 성숙란에서 특이적으로 발현하는 유전자들은 주로 세포 사멸과 관련된 positive regulation of programmed cell death, regulation of programmed cell death, regulation of apoptosis, positive regulation of apoptosis, positive regulation of cell death, regulation of cell death, killing of cells of another organism, cell killing 등과 관련되었으며, 이외에 sterol homeostasis, steroid metabolic process 등 호르몬 관련 유전자의 발현이 증가하였다. 특히 지질대사와 관련되어 lipid homeostasis, lipid transport, lipid localization, cholesterol homeostasis 등의 기능과 관련된 유전자의 발현이 증가하였다. 또한 response to nutrient levels, chemical homeostasis, response to inorganic substance 등 영양 항상성 조절에 관련된 유전자들이 증가하는 것을 확인하였다(Table 3). 이들 결과를 통하여 난모세포가 성세포 분화 관련 유전자들이 특이적으로 발현하는 것은 배란 전까지 생식 및 분화 능력이 집중되어 있고, 배란 후에는 수정되지 못한 난모세포가 더 이상 분화하지 못하도록 세포사멸사(apoptosis)와 관련 유전자가 발현하는 것으로 유추해 볼 수 있다. 또한 이와 더불어

Table 3. Functional categorization of specifically expressed genes in mature oocyte

| GO ID | GO term ^a | Genes | P value | FDR ^b |
|------------|--|-------------------------------------|----------|------------------|
| GO:0008202 | Steroid metabolic process | <i>APOA4, ALPL, GC, NR5A2</i> | 0.002011 | 2.828952 |
| GO:0031667 | Response to nutrient levels | <i>GAL9, CHRNA7, HSD3B2</i> | 0.004894 | 6.756377 |
| GO:0009991 | Response to extracellular stimulus | <i>GAL9, CHRNA7, HSD3B2</i> | 0.006804 | 9.276018 |
| GO:0031640 | Killing of cells of another organism | <i>GAL9, INHBA</i> | 0.01442 | 18.70611 |
| GO:0042541 | Hemoglobin biosynthetic process | <i>INHA, ALB</i> | 0.01442 | 18.70611 |
| GO:0006869 | Lipid transport | <i>APOA4, VTG2, VTG1</i> | 0.01642 | 21.02612 |
| GO:0001558 | Regulation of cell growth | <i>WISP2, ALB, CYR61</i> | 0.018775 | 23.68008 |
| GO:0001906 | Cell killing | <i>GAL9, INHBA</i> | 0.019182 | 24.13057 |
| GO:0010876 | Lipid localization | <i>APOA4, VTG2, VTG1</i> | 0.01959 | 24.57907 |
| GO:0003013 | Circulatory system process | <i>CHRNA7, MYL4, ACTC1</i> | 0.02042 | 25.48422 |
| GO:0008015 | Blood circulation | <i>CHRNA7, MYL4, ACTC1</i> | 0.02042 | 25.48422 |
| GO:0048878 | Chemical homeostasis | <i>CHRNA7, APOA4, KCNMA1, NR5A2</i> | 0.022556 | 27.76727 |
| GO:0020027 | Hemoglobin metabolic process | <i>INHA, ALB</i> | 0.023922 | 29.19392 |
| GO:0055092 | Sterol homeostasis | <i>APOA4, NR5A2</i> | 0.033336 | 38.33163 |
| GO:0042632 | Cholesterol homeostasis | <i>APOA4, NR5A2</i> | 0.033336 | 38.33163 |
| GO:0055088 | Lipid homeostasis | <i>APOA4, NR5A2</i> | 0.047292 | 49.87996 |
| GO:0044057 | Regulation of system process | <i>CHRNA7, APOA4, MYL4</i> | 0.047878 | 50.31781 |
| GO:0003015 | Heart process | <i>MYL4, ACTC1</i> | 0.051901 | 53.22822 |
| GO:0060047 | Heart contraction | <i>MYL4, ACTC1</i> | 0.051901 | 53.22822 |
| GO:0043065 | Positive regulation of apoptosis | <i>INHA, ALB, KCNMA1</i> | 0.065413 | 61.88428 |
| GO:0043068 | Positive regulation of programmed cell death | <i>INHA, ALB, KCNMA1</i> | 0.065413 | 61.88428 |
| GO:0010942 | Positive regulation of cell death | <i>INHA, ALB, KCNMA1</i> | 0.066738 | 62.64785 |
| GO:0040008 | Regulation of growth | <i>WISP2, ALB, CYR61</i> | 0.076267 | 67.732 |
| GO:0042981 | Regulation of apoptosis | <i>GAL9, INHA, ALB, KCNMA1</i> | 0.078141 | 68.65306 |
| GO:0043067 | Regulation of programmed cell death | <i>GAL9, INHA, ALB, KCNMA1</i> | 0.081694 | 70.33256 |
| GO:0010941 | Regulation of cell death | <i>GAL9, INHA, ALB, KCNMA1</i> | 0.082594 | 70.74423 |
| GO:0010035 | Response to inorganic substance | <i>APOA4, KCNMA1</i> | 0.092424 | 74.90988 |
| GO:0042592 | Homeostatic process | <i>CHRNA7, APOA4, KCNMA1, NR5A2</i> | 0.092776 | 75.04829 |
| GO:0043085 | Positive regulation of catalytic activity | <i>CHRNA7, APOA4, MYL4</i> | 0.093535 | 75.34407 |

^a Gene ontology term, ^b False discovery rate.

배란 후 난모세포는 난 성숙과정에서 영양분의 균형을 갖추도록 각종 호르몬 조절, 지질대사 및 영양 조절 기작에 유전자들이 특이적으로 발현하는 것으로 보인다. 이러한 결과들은 향후 토종닭에서 난성숙과 관련된 유전자들을 선발하고,

나아가 계란 품질 향상을 위한 마커 유전자를 발굴하는 기초로 자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

적 요

Table 4. Functional categorization of specifically expressed genes in immature oocyte

| GO ID | GO Term ^a | Genes | P value | FDR ^b |
|------------|--|---|----------|------------------|
| GO:0042742 | Defense response to bacterium | <i>LYG2, GAL1, CATHL2, GAL7, GAL2</i> | 3.11E-04 | 0.446358 |
| GO:0009617 | Response to bacterium | <i>LYG2, GAL1, CATHL2, GAL7, GAL2</i> | 0.00237 | 3.353376 |
| GO:0046545 | Development of primary female sexual characteristics | <i>LHX8, TP63, WNT4, FST</i> | 0.003897 | 5.457431 |
| GO:0043616 | Keratinocyte proliferation | <i>IRF6, TP63, FST</i> | 0.004396 | 6.135387 |
| GO:0046660 | Female sex differentiation | <i>LHX8, TP63, WNT4, FST</i> | 0.004865 | 6.769492 |
| GO:0003006 | Reproductive developmental process | <i>LHX8, TP63, DAZL, WNT4, PIWIL1, FST</i> | 0.006205 | 8.556955 |
| GO:0006417 | Regulation of translation | <i>DAZL, PIWIL1, IGF2BP1, IGF2BP3</i> | 0.006569 | 9.03678 |
| GO:0048608 | Reproductive structure development | <i>LHX8, TP63, WNT4, FST</i> | 0.014578 | 19.02757 |
| GO:0045137 | Development of primary sexual characteristics | <i>LHX8, TP63, WNT4, FST</i> | 0.017715 | 22.65424 |
| GO:0010608 | Posttranscriptional regulation of gene expression | <i>DAZL, PIWIL1, IGF2BP1, IGF2BP3</i> | 0.017715 | 22.65424 |
| GO:0019953 | Sexual reproduction | <i>ZP2, DAZL, WNT4, PIWIL1, FST</i> | 0.020309 | 25.53774 |
| GO:0048729 | Tissue morphogenesis | <i>ACTG2, TP63, WNT4, RET, FST</i> | 0.022004 | 27.3685 |
| GO:0008585 | Female gonad development | <i>LHX8, WNT4, FST</i> | 0.026989 | 32.51102 |
| GO:0006952 | Defense response | <i>LYG2, GAL1, CATHL2, GAL7, GAL2</i> | 0.028609 | 34.10871 |
| GO:0048610 | Reproductive cellular process | <i>ZP2, DAZL, WNT4, PIWIL1</i> | 0.029218 | 34.69968 |
| GO:0007548 | Sex differentiation | <i>LHX8, TP63, WNT4, FST</i> | 0.0322 | 37.5245 |
| GO:0042476 | Odontogenesis | <i>LHX8, TP63, FST</i> | 0.037928 | 42.63308 |
| GO:0042475 | Odontogenesis of dentine-containing tooth | <i>LHX8, TP63, FST</i> | 0.037928 | 42.63308 |
| GO:0006857 | Oligopeptide transport | <i>SLC15A1, SLC15A5</i> | 0.038313 | 42.9623 |
| GO:0007276 | Gamete generation | <i>DAZL, WNT4, PIWIL1, FST</i> | 0.05527 | 55.8305 |
| GO:0007281 | Germ cell development | <i>DAZL, WNT4, PIWIL1</i> | 0.060323 | 59.10701 |
| GO:0008406 | Gonad development | <i>LHX8, WNT4, FST</i> | 0.067383 | 63.30742 |
| GO:0060429 | Epithelium development | <i>IRF6, TP63, WNT4, RET</i> | 0.077126 | 68.44769 |
| GO:0048477 | Oogenesis | <i>DAZL, WNT4</i> | 0.087153 | 73.03211 |
| GO:0048483 | Autonomic nervous system development | <i>TP63, RET</i> | 0.087153 | 73.03211 |
| GO:0010605 | Negative regulation of macromolecule metabolic process | <i>TP63, GHOX-7, PIWIL1, GMNN, IGF2BP1, FST</i> | 0.088825 | 73.73346 |
| GO:0008544 | Epidermis development | <i>IRF6, TP63, FST</i> | 0.090049 | 74.23615 |
| GO:0030216 | Keratinocyte differentiation | <i>IRF6, TP63</i> | 0.098975 | 77.63943 |

^a Gene ontology term, ^b False discovery rate.

조류의 난포 성장은 호르몬의 작용에 따라 크기가 달라져 각각의 단계를 이루며 성장하게 된다. 난의 성숙에 관련된 유전자는 난 단백질 생산과 산란률에 밀접한 관련이 있으며, 이를 유전자 발현 측면에서 심도 있는 고찰이 필요가 있다.

본 연구는 NGS를 이용한 RNA-seq 데이터를 이용하여 유전자의 발현량과 유전자 상호 구조에 대한 분석을 실시하여 난의 발달 과정에 필요한 유전자군을 조사하였다. 본 실험에 사용된 개체는 한국 채래계 흑색계통이 사용되었고, 비교

조직은 미성숙란과 성숙란의 RNA를 추출하여 유전자의 발현 양상을 살펴봄으로 난의 성숙에 필요한 유전자의 발현 양상을 보고자 하였다. 실험을 위해 Total RNA를 추출하였고, HiSeq 2000 platform을 사용하여 염기서열을 분석하고, Tuxedo Protocol과 DAVID 프로그램을 통해 유전자의 기능과 상호간의 연관관계를 예측하였다. 탐색된 유전자군은 미성숙란과 성숙란 간에 많은 차이를 보이고 있는 유전자군을 탐색한 결과, 315개의 발현이 다르게 나타나는 것으로 보이고 있으며, GO 분석을 통하여 기능면에서 미성숙란과 성숙란에서 확연히 구분되는 유전자 발현 양상을 확인할 수 있었다. 이들 결과를 통하여 향후 난성숙 과정을 이해하고, 계란 품질 향상을 위한 마커 개발을 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(한국 토종닭 표준 유전체 지도 작성 및 계통 특이 유전체 구조 연구, PJ008680012014)의 지원 및 2014년도 농촌진흥청 국립축산과학원 박사후연수과정 지원 사업에 의해 이루어진 것입니다.

REFERENCES

- Asem EK, Hertelendy F 1983 Effects of forskolin on progesterone and cyclic adenosine monophosphate production in avian granulosa cells. *Biol Reprod* 29:1098-1104.
- Braw-Tal R 2002 The initiation of follicle growth: The oocyte or the somatic cells? *Mol Cell Endocrinol* 187:11-18.
- Chen CC, Johnson PA 1996 Expression of inhibin alpha and inhibin/activin beta A subunits in the granulosa layer of the large preovulatory follicles of the hen. *Biol Reprod* 55:450-454.
- Diaz FJ, Anthony K, Halfhill AN 2011 Early avian follicular development is characterized by changes in transcripts involved in steroidogenesis, paracrine signaling and transcription. *Mol Reprod Dev* 78:212-223.
- Elis S, Batellier F, Couty I, Balzergue S, Martin-Magniette ML, Monget P, Blesbois E, Govoroun MS 2008 Search for the genes involved in oocyte maturation and early embryo development in the hen. *BMC Genomics* 9:110.
- Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL 2002 The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2890-2894.
- Eppig JJ 2001 Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122:829-838.
- Etches RJ, Schoch JP 1984 A mathematical representation of the ovulatory cycle of the domestic hen. *Br Poult Sci* 25:65-76.
- Findlay JK 1993 An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol Reprod* 48:15-23.
- George JW, Dille EA, Heckert LL 2011 Current concepts of follicle-stimulating hormone receptor gene regulation. *Biol Reprod* 84:7-17.
- Gilbert AB, Perry MM, Waddington D, Hardie MA 1983 Role of atresia in establishing the follicular hierarchy in the ovary of the domestic hen (*Gallus domesticus*). *J Reprod Fertil* 69:221-227.
- Gougeon A 1996 Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 17:121-155.
- Huang ES, Nalbandov AV 1979 Steroidogenesis of chicken granulosa and theca cells: *In vitro* incubation system. *Biol Reprod* 20:442-453.
- Johnson PA 2012 Follicle selection in the avian ovary. *Reprod Domest Anim* 47:283-287.
- Kang L, Cui X, Zhang Y, Yang C, Jiang Y 2013 Identification of miRNAs associated with sexual maturity in chicken ovary by Illumina small RNA deep sequencing. *BMC Genomics* 14:352.
- Lovell TM, Gladwell RT, Groome NP, Knight PG 2003 Ovarian follicle development in the laying hen is accompanied by divergent changes in inhibin A, inhibin B, activin A and follistatin production in granulosa and theca layers. *J Endocrinol* 177:45-55.
- Mahon MG, Lindstedt KA, Hermann M, Nimpf J, Schneider WJ 1999 Multiple involvement of clusterin in chicken ovarian follicle development. Binding to two oocyte-specific members of the low density lipoprotein receptor gene family. *J Biol Chem* 274:4036-4044.
- Palmer SS, Bahr JM 1992 Follicle stimulating hormone increases serum oestradiol-17 beta concentrations, number of growing follicles and yolk deposition in aging hens (*Gallus gallus domesticus*) with decreased egg production. *Br Poult Sci* 33:403-414.

- Pan G, Thomson JA 2007 Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res* 17:42-49.
- Pearl R 1917 Studies on the physiology of reproduction in the domestic fowl. Xvii. The influence of age upon reproductive ability, with a description of a new reproductive index. *Genetics* 2:417-432.
- Scanes CG, Godden PM, Sharp PJ 1977 An homologous radioimmunoassay for chicken follicle-stimulating hormone: observations on the ovulatory cycle. *J Endocrinol* 73:473-481.
- Zhang C, Shimada K, Saito N, Kansaku N 1997 Expression of messenger ribonucleic acids of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptors in granulosa and theca layers of chicken preovulatory follicles. *Gen Comp Endocrinol* 105:402-409.
- 국립축산과학원 2008 토종닭 사육 및 인증기준 설정 연구. 가금수급안정위원회.
- 국립축산과학원 2011 FTA 대응 토종닭종자개발 및 산업화 발전방안 심포지엄. 한국토종닭협회.
- 한국양계연구소 2001 산란계의 산란생리와 생산성 유지. *월간양계연구* 137:40-41.
- (접수: 2014. 10. 8, 수정: 2014. 10. 28, 채택: 2014. 11. 11)