

## 닭의 모색 연관 유전자인 *MC1R*, *MITF*, *TYRP1*의 SNP(Single Nucleotide Polymorphism) 규명

김병기<sup>1,\*</sup> · 변윤화<sup>3,\*</sup> · 하재정<sup>1</sup> · 정대진<sup>1</sup> · 이윤석<sup>2</sup> · 형기은<sup>3</sup> · 여정수<sup>3</sup> · 오동엽<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>경상북도 축산기술연구소, <sup>2</sup>서울대학교 그린바이오 과학기술연구원, <sup>3</sup>영남대학교 생명공학부 생명공학과

### Identification of SNP(Single Nucleotide Polymorphism) from *MC1R*, *MITF* and *TYRP1* associated with Feather Color in Chicken

Byung Ki Kim<sup>1,\*</sup>, Youn-Hwa Byun<sup>3</sup>, Jea Jung Ha<sup>1</sup>, Daejin Jung<sup>1</sup>, Yoon-Seok Lee<sup>2</sup>, Ki-Eun Hyeong<sup>3</sup>,  
Jung-sou Yeo<sup>3</sup> and Dong-yep Oh<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>Gyeongsangbuk-do Livestock Research Institute, Yeongju 750-871, Korea

<sup>2</sup>Institute of Green Bio Science and Technology, Seoul National University, Pyeongchang 232-916, Korea

<sup>3</sup>School of Biotechnology, Yeungnam University, Gyeonsan 712-749, Korea

**ABSTRACT** The Feather Color of chicken is considered as most obvious, and the purpose of this study is to identify the genotype following the SNP of *MC1R*, *MITF* and *TYRP1*, which are genes related to Feather Color, and develop a SNP marker that can be classified per breed. When a haplotype is observed through the combination of markers, a Korean Native Chicken can especially be distinguished when it is a CGG type in the SNP combination of the *MC1R* gene. In case of the TAG, TGG and TAA types, only Araucana was identified, and for the CAA type, Leghorn could specifically be distinguished. In the SNP combination of *TYRP1* gene, only Leghorn was differentiated in case of the TTTCA and CCTCA types, and only Silky Fowl was identified in case of the CTTTA type. The SNP combination of *MC1R* gene enabled for Korean Native Chicken, Leghorn, and Araucana to be distinguished and each of the SNP and combination of *TYRP1* gene allowed for all 4 breeds to be classified. If many researches are conducted about genetic polymorphism between breeds, then it is considered that the differences between breeds will be understood from a molecular biological aspect instead of simply distinguishing the breeds through Feather Color.

(Key words : *MC1R*, *MITF*, *TYRP1*, SNP, haplotype)

## 서 론

닭에서 모색은 품종의 특징을 구분하는 주요 형질 중 하나로, 개체 및 품종을 식별하기 위한 기준으로 이용되기도 하는 대표적인 질적 형질이다. 주로 백색, 청색, 흑색, 적색으로 크게 구분되지만, 이외에도 다양한 모색이 존재한다. 모색 유전 연구는 유전학뿐만 아니라, 진화, 발달생물학 등의 연구 분야에서도 중요한 역할을 담당하고 있다. 포유동물에서 약 100개 이상의 유전자들이 모색 형성 과정(pigmentation)에 관여하는 것으로 추정되며, 현재까지 염기 서열과 기능이 밝혀진 것은 60여 개 정도이다(Jackson, 1994;

Hoekstra, 2006).

오골계의 경우, 부리는 창백색, 눈의 홍채는 갈색, 귀는 창백색, 다리는 연색 또는 황색이다. 짧은 목에는 깃털이 많으며, 꼬리는 짧은 편이고, 많지 않은 부드러운 깃털로 되어 있다. 피부·고기·뼈의 경우, 모두 어두운 자색을 띠고, 다섯 개의 발가락이 있는 것이 특징이다. 대개 백색 품종이나, 흑색 품종과 백색에 가슴만 붉은색이 도는 품종도 있다(Kim et al., 2012; Yun et al., 2005).

특히 저 콜레스테롤 기능성 청색 계란(김병기 등, 2006)을 생산하는 아라카나(Araucana) 종은 칠레 북부가 원산지라 야생계였으나, 남아메리카와 벨기에 등 유럽에서 육종 개량한

\* Byung Ki Kim and Youn-Hwa Byun contributed equally to this work.

† To whom correspondence should be addressed : ody1234@korea.kr

품종으로써 성질이 사나운 편이며, 산육 겸용으로 활용되나, 훈련을 통하여 싸움닭으로도 이용하기도 한다. 모색은 대체로 짙은 청색이며, 콧볼과 정강이는 대부분 노란색이다(김병기 등, 2006).

한편, 백색 형상을 띄고 있는 레그혼 종은 원산지가 이탈리아인 전형적인 산란계로서, 성질이 예민하고 재빠르며, 체질이 강건하고, 벃이 크며, 콧볼은 희고, 정강이는 누렇다(Lee et al., 1992; Oh et al., 2008).

현재 대부분 동물들은 그 지역의 계절이나 기후 등 여러 환경에 따라 일시적 또는 점진적으로 모색의 변화가 관찰되기도 한다. 현존하는 재래닭, 레그혼의 집단에서도 각각 황적갈색, 백색의 범위에 있기는 하지만, 색의 명암이나 농도에서는 개체 간 차이가 관찰되고 있다.

이러한 조류의 색은 Extended black(E) 대립인자에 의해서 주요하게 조절되고, 이 대립인자 영역은 *melanocortin 1 receptor(MC1R)* 유전자로 암호화 되어 있다. *MC1R* 유전자 변이에 의하여 eumelanin(brown/black)과 pheomelanin(yellow/red)의 착색에 영향을 끼치는 것으로 알려져 있다(Takeuchi et al., 1996b; Robbins et al., 1993; Gunnarsson et al., 2007). 따라서 닭의 품종별 모색의 다양성은 *MC1R* 유전자의 염기서열 E 대립인자와 높은 연관성이 있다(Kerje et al., 2003). *TYR* 유전자는 멜라닌 색소 침착을 조절하는 주요한 후보 유전자로, eumelanin(black-brown pigmentation)과 pheomelanin(yellow-red pigmentation)의 착색을 결정하고(Lerner et al., 1950; Sazanov et al., 1998), *MITF*의 경우, melanocyte와 osteoclast의 발달에 영향을 미치는 basic helix-loop-helix leucine zipper 전자인자이며, 이 유전자의 돌연변이는 난청, 골소실, small eyes와 눈과 피부색이 얼어짐 등을 유발하는 유전자이다(Levy et al., 2006; Hershey et al., 2004; Moore, 1995).

아직까지 재래닭과 특히 아라카나(Araucana) 종의 경우, 모색에 대한 객관적인 기준이 없어, 단지 육안 관찰에 의해 구분하고 있으며, 이를 명확히 제시할 수 있는 분석법은 개발되지 못하고 있다. 우리나라의 재래닭 계통의 모색에서도 대표적인 예로 재래닭은 황적갈색, 오골계는 흑색으로 단편적인 기준만을 가지고 계통 구분에 적용하고 있으나, 모색에 대한 명확한 판단 기준을 설정할 필요가 대두되고 있다.

따라서 본 연구는 다양한 모색의 표현형을 가지고 있는 오골계, 재래닭, 레그혼, 아라카나 계통과 모색 관련 후보 유전자들의 연관성 분석을 통하여 유전적 특성을 살펴보고, 향후 이를 이용하여 품종별 정확히 구분 가능한 분자 마커 개발의 기초 연구로 수행하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 동물 및 재료

본 시험에 사용된 공시계는 경상북도축산기술연구소에서 보유하고 있는 오골계(O), 재래닭(KR), 레그혼(W), 아라카나(AR) 각각 96수를 이용하여 각 품종별로 구분하여 조사하였다. 사육환경은 무창계사 내 온도는 20~25℃, 습도는 70~85% 정도로 유지하며, 점등 시간은 백열전구(60 W)를 설치하였고, 1일 평균 8시간이 자동으로 소등이 되도록 자동 점등 개폐 장치로 점등 유지·관리되도록 하였다. 사료 급여는 양계용 사료(농협안동사료공장에서 생산한 종계용 사료)를 구입하여 자유급이하였으며, 음수는 자외선 유수멸균기(Dynamics, M600, USA)를 통과시킨 물을 자유 급수하였다.

### 2. Genomic DNA 추출

닭 조직의 약 5 mg을 1.5 mL tube에 넣고 Cell Lysis Solution(AL buffer) 300 µL를 첨가한 뒤, Proteinase K(10 mg/mL, Promega Co. USA)를 전체 볼륨의 1/200인 1.5 µL를 첨가하여 65℃에서 overnight 시켰다. 여기에 Protein Precipitation Solution(PP buffer) 100 µL를 첨가한 후, 13,000 rpm에서 8분간 원심분리를 하여 상층액을 다른 tube에 분주하였다. 이 후 4℃ 13,000 rpm에서 5분간 원심분리를 하여 DNA를 추출한 뒤, TE(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)를 약 1~2 mL 정도 넣어 DNA를 용해시켜 4℃에 보관하였다. 또한, 정량 분석을 위해 spectrophotometer(SHIMADZU, Japan)를 이용하여 260 nm와 280 nm 흡광도에서 측정하여 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>의 비가 1.8~2.0 정도인 DNA를 사용하였다.

### 3. 품종별 닭 Primer 설계 및 합성

직접 염기서열 분석을 하기 위해 BigDye Terminator(Ver 3.1) cycle sequencing kit(Applied Biosystems, Foster City, CA)를 사용하여 염기서열을 분석하였다. 또한 염기 표식영역 표지인자의 시발체는 GenBank에 제시된 염기서열로 Primer3 프로그램([http://frodo.wi.mit.edu/cgi\\_bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi_bin/primer3/primer3_www.cgi))를 사용하여 제작하였다. 분석된 염기서열 자료들은 Sequencher 4.6 프로그램(Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI)을 이용하여 가시적으로 편집한 결과는 Table 1에 나타내었다.

### 4. SNPs 유전자형 분석

**Table 1.** Information of SNP markers for the genes associated with feather colors

Gene	SNP	Chromosome	Amino acid change	Position	Sequence	Tm	Product size			
<i>MC1R</i>	c.69 T>C	11	N23N	Exon 1	F <sup>1</sup> GCTTTGTAGGTGCTGCAGTT	59	213			
					R <sup>2</sup> GCGTCAGGAAGAGCTCATTG					
					E <sup>3</sup> AGTGAGGGCAACCAGAGCAA					
	c.376 G>A		F GCTCTTCATGCTGCTGATGG							
			R CGTTGTTGCGGTAGTAGGTG							
			E ACATGCTCATCTGCAGCTCC							
c.427 A>G	F GCTCTTCATGCTGCTGATGG	59	279							
	R CGTTGTTGCGGTAGTAGGTG									
	E TCGCCGTGGACCGCTACATC									
<i>MITF</i>	c.1484 G>A			12	S495S	Exon 9	F CCTTCAGTGACAACCTCGGA	59	330	
							R GGCTACCGATGAAGCACAAAG			
							E TCTGTGTCTCCTGGAGCATC			
	c.299 C>T	Y78Y	Exon 1		F CAGTGCGCTACCATTGAGTC		59			254
					R TGACCCACAGTTGTAACCAGA					
					E CGACCCCATGGCCACAGTA					
<i>TYRP1</i>	g.2122 C>T	Z		Intron 1	F ACTGTCTGTTGGCATGTTGA	58	219			
					R TGGGCTTGGTCTTAATCTTGC					
					E TAAGTGAGCTGTCTAAATTG					
	g.2127 T>A			Intron 1	F ACTGTCTGTTGGCATGTTGA			58	345	
					R TGGGCTTGGTCTTAATCTTGC					
					E TGTAGTCAGTGTAGGTGCTT					
g.8510 C>T		Intron 4	F ACAAACCAAGTATCCTCACCA	58	345					
			R ATTTGCCAGCCGTTACGTTT							
			E CAGCCAATTTACTGTACTGA							
g.8608 G>T		Intron 4	F ACAAACCAAGTATCCTCACCA	58	345					
			R ATTTGCCAGCCGTTACGTTT							
			E TTACCAGGTGGTGGATACTG							

<sup>1</sup> Forward primer sequence, <sup>2</sup> Reverse primer sequence, <sup>3</sup> Extension primer sequence.

단일염기 다형성 유전자형을 분석하기 위해 PCR 반응은 20 ng genomic DNA, 0.25 U Taq polymerase(Solgent Co., Ltd, south korea), 1 × buffer, 0.2 mM dNTP, 5 pmol 시발체 (forward/reverse)를 첨가하여 전체 15 µL가 되도록 하고, 혼합한 후 94°C 5분에서 1 cycle, 94°C에서 30초, 합성 온도에서 30초, 72°C에서 3분의 조건으로 35 cycle, 72°C 3분에서 1 cycle을 반응시켰다. 생성된 PCR product에서 1 µL를 전기 영동하여 생성물을 확인하였고, PCR 생성물에 5 U SAP와 2 U Exo I를 첨가하여 잘 혼합한 다음, 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다.

반응이 끝난 다음 75°C에서 15분간 불활성화 시켰다. ABI

PRISM SNa Pshot™ Multiplex Kit(Applied Biosystems, Foster City, CA)을 사용하여, 정제된 PCR 생성물 1 µL, SNaP Shot multiplex ready reaction mix 1 µL, 5 pmol extension 시발체 1 µL를 넣어 전체 10 µL가 되게 하고, 잘 혼합하여 96°C에서 10초, 50°C에서 5초, 60°C에서 30초의 조건으로 25 cycle을 반응시켰다. 반응된 PCR 생성물에 1 U SAP를 첨가해준 다음 37°C에서 1시간 동안 배양하였고, 75°C에서 15분 동안 불활성화 시켰다. 최종적으로 정제된 PCR 생성물 1 µL를 GeneScan-120 LIZ size standard(Applied Biosystems, Foster City, CA) 0.25 µL와 Hi-Di formamide 9.5 µL(Applied Biosystems, Foster City, CA)를 첨가하여 잘 섞어준 다음,

95°C에서 5분간 변성시킨 후 ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer(Applied Biosystems, Foster City, CA)에 전기영동을 하였다. 전기영동이 끝난 자료는 Gene Mapper v4.0 software (Applied Biosystems, Foster City, CA)를 통해서 분석하였다.

## 5. 통계 분석 방법

각 품종별 모색의 특이성을 가지는 색상들끼리 분류하여 SNP, haplotype과의 연관성을 Haploviewer v4.2 프로그램을 이용하여 분석하였다. 각 개체에 대한 haplotype의 작성과 빈도는 혈통 정보 없이 Scheet 등 (2006)이 개발한 algorithm을 사용하여 계산하였다. 또한 Gabriel 등 (2002)이 정의한 방식뿐만 아니라, four-gamete rule의 방식에 따른 마커를 선 발하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 모색 연관 후보 유전자별 SNP 위치 및 정보

본 연구에서 사용된 후보 유전자는 *MC1R*(melanocortin 1 receptor), *TYRP1*(tyrosinase-related protein 1), *MITF*(microphthalmia-associated transcription factor)로써 *MC1R*의 경우, eumelanin(brown/black)과 pheomelanin(yellow/red)의 착색에 영향을 끼치는 것으로 알려져 있다(Takeuchi et al., 1996b; Robbins et al., 1993; Gunnarsson et al., 2007).

Fig. 1, Table 1에서 제시한 것처럼 *MC1R* 유전자의 경우, chromosome 11번에 intron이 없이 단일 exon으로만 구성된 유전자이며, c.69 T>C, c.376 G>A와 c.427 A>G 총 3개의 SNPs를 발견했다. 특히 c.376 G>A는 122번 아미노산이 발린에서 아이소루신으로, c.427 A>G는 143번 아미노산이 트레오닌에서 알라닌으로 아미노산 배열에 변이가 일어나는 non-synonymous SNP이다.

*MITF*의 경우, melanocyte와 osteoclast의 발달에 영향을 미치는 basic helix-loop-helix leucine zipper 전사인자이고, 이 유전자의 돌연변이는 난청, 골소실, small eyes와 눈과 피부색이 얼어짐 등을 유발하는 유전자이다(Levy et al., 2006; Hershey et al., 2004; Hughes et al., 1993; Moore, 1995). *MITF* 유전자는 Fig. 1에서 제시했듯이 크로모솨 12번에 위치하고 있으며, exon 9개와 intron 8개로 구성된 유전자로서, exon 9번에서 c.1484 G>A 단 하나의 SNP만이 발견되었다. 이는 염기는 치환되지만, 아미노산 배열에는 변이가 없는 synonymous한 SNP였다.

*TYRP1*은 멜라닌 세포의 특이적 산물로서 멜라닌 합성에

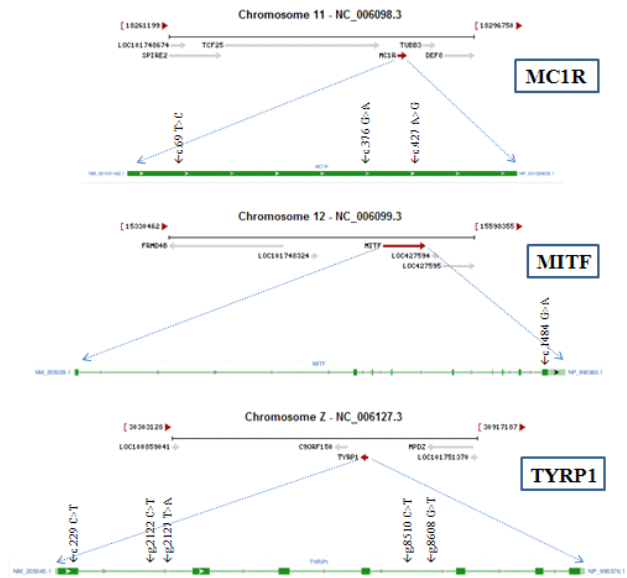


Fig. 1. Candidate genes and the position of SNPs.

관여한다(Sarangarajan et al., 2001). *TYRP1*은 eumelanin(black-brown pigmentation)과 pheomelanin(yellow-red pigmentation)의 착색을 결정하고, 멜라닌 색소 침착을 조절하는 주요한 후보 유전자인 *TYR* 유전자(Lerner et al., 1950; Sazanov et al., 1998)로부터 생성된 *TYR* 단백질의 안정성과 효소적 활성을 조절한다(Sarangarajan et al., 2001). Fig. 1에서 제시했듯이 exon 7개와 intron 6개로 구성된 유전자로서, exon 1번에 하나의 SNP와 intron 1번과 4번에서 4개의 SNP를 발견했다. Exon1번의 c.299 C>T는 염기는 치환되지만, 아미노산 배열에는 변이가 없는 synonymous한 SNP이다.

### 2. 품종 간 유전자 간 SNP 빈도 분석

*MC1R* 유전자의 c.69 T>C의 경우, Table 2에서 제시했듯이, 레그혼에서는 CC 유전자형만 발견되었으며, 아라카나에서는 TT 유전자형만이 발견되었다. 또한 c.376 G>A의 경우, 오골계와 재래닭에서 GG 유전자형만 발견되었다. 그리고 c.427 A>G의 경우, 오골계와 레그혼에서는 AA 유전자형만 발견되었고, 재래닭과 아라카나에서는 GG와 AG의 유전자형이 발견되었다. 이러한 결과는 Hoque (2011)의 논문에서 밝힌 오골계, 재래닭, 레그혼 품종의 *MC1R* 유전자 내 SNP들의 빈도들과 일치하는 점을 볼 수 있었다. 같은 품종이며, 위치가 같은 SNP였기 때문에 동일한 결과를 도출할 수 있었다. 결론적으로 c.69 T>C의 경우는 레그혼과 아라카나에서 확실한 유전자형 차이를 보였기 때문에 마커로서의 효율이 높지만, 아미노산 배열에 변이가 없는 synonymous한

**Table 2.** SNPs frequency in each breed and candidate gene

GENE	SNP	Amino acid change	Genotype and allele	Genotype and allele frequency (%)				
				O	KR	W	AR	
<i>MC1R</i>	g.69T>C	N23N	TT	80.2(77)			100(96)	
			TC	19.8(19)	33.3(32)			
			CC		66.7(64)	100(96)		
			T	90.1	16.7		100	
			C	9.9	83.3	100		
	g.376G>A	V122I	GG	100(96)	100(96)		25(24)	
			GA			16.7(16)	75(72)	
			AA			83.3(80)		
			G	100	100	8.3	62.5	
			A			91.7	37.5	
g.427A>G	T143A	AA	100(96)	36.5(35)	100(96)	5.2(5)		
		AG				94.8(91)		
		GG		63.5(61)				
		A	100	36.5	100	52.6		
		G		63.5		47.4		
<i>MITF</i>	c.1484 A>G	S495S	AA	11.5(11)	5.2(5)			
			AG	33.3(32)	44.8(43)			
			GG	55.2(53)	50(48)	100(96)	100(96)	
			A	28.1	27.6			
			G	71.9	72.4	100	100	
<i>TYRP1</i>	c.299 C>T	Y78Y	CC	100(96)	100(96)	12.5(12)		
			CT			25(24)		
			TT			62.5(60)	100(96)	
			C	100	100	25		
			T			75	100	
	g.2122 C>T			CC			57.3(55)	100(96)
				CT			28.1(27)	
				TT	100(96)	100(96)	14.6(14)	
				C			71.4	100
				T	100	100	28.6	
g.2127 T>A			TT	100(96)	100(96)	100(96)	100(96)	
			T	100	100	100	100	
			CC	87.5(84)	100(96)	100(96)	100(96)	
			CT					
			TT	12.5(12)				
g.8510 C>T			T	12.5				
			C	87.5	100	100	100	
			AA	100(96)	100(96)	100(96)	100(96)	
			A	100	100	100	100	
g.8608 G>T			AA	100(96)	100(96)	100(96)	100(96)	
			A	100	100	100	100	

SNP이기 때문에, 모색에 확실하게 영향을 주는 지는 확인하기 어렵다고 판단된다. 또한 c.376 G>A와 c.427 A>G의 경우는 앞서 말했듯이, non-synonymous한 SNP이지만 종간의 뚜렷한 차이를 확인하는 마커로서 효율성은 높지 않다고 판단된다.

*MITF* 유전자의 경우, c.1484 G>A의 유전자형 빈도는 오골계와 재래닭의 경우는 AA, AG, GG 세 가지 유전자형 모두 발견되었으며, 레그혼과 아라카나에서는 모두 GG 유전자형만 발견되었다. 따라서 아미노산 배열에 변이가 없고, 종간에 특이적 빈도 차이가 나타나지 않기 때문에 마커로서의 효율이 떨어진다고 할 수 있었다.

*TYRP1* 유전자의 c.299 C>T의 경우, 오골계와 재래닭에서는 CC 유전자형만 발견되었지만, 아라카나에서는 TT 유전자형만이 발견되었고, g.2122 C>T의 경우, 오골계와 재래닭에서는 TT 유전자형만 발견되었지만, 아라카나에서는 CC 유전자형만 발견되었다. 그리고 g.8510 C>T의 경우는 재래닭, 레그혼과 아라카나에서는 CC 유전자형만 발견되었지만, 오골계에서는 TT 유전자형이 11.7%만큼 발견되었다. 이외의 g.2127 T>A는 모든 종에서 TT 유전자형만 발견되었으며, g.8608 G>T의 경우는 모든 종에서 AA 유전자형만이 발견되어 Polymorphism이 나타나지 않았다.

따라서 c.299 C>T의 경우는 오골계, 재래닭과 아라카나 간의 확실한 차이를 보여주고 있으며, g.2122 C>T의 경우 또한 오골계, 재래닭과 아라카나 간의 확실한 차이를 보여주기 때문에, 아라카나를 선발할 수 있는 마커로서의 효율이 높다고 할 수 있다. 그리고 g.8510 C>T의 경우는 오골계에서만 TT 유전자형을 발견할 수 있기 때문에, 마커로서의 효율이 높다고 할 수 있다.

*MITF*와 *TYRP1*의 경우, 이미 밝혀진 기능적 측면에서는 모색에 영향을 줄 수 있다고 판단하여(Fang et al., 2002; Keny et al., 2012), 본 연구에서 처음 밝힌 SNPs로써 아라카나 및 오골계를 선발할 수 있는 효율적인 마커이다. 또한 *TYRP1* 유전자의 경우는 멜라닌 합성과정에 직접적으로 관여하는 *TYR*(Kumar et al., 2011; Barton et al., 1988; Hearing et al., 1980) 유전자와 함께 모색 관련 SNPs 실험을 진행시킨다면 마커로서의 효율이 더욱 증가될 것이라고 판단된다.

### 3. *MC1R* 및 *TYRP1* 유전자의 Haplotype 분석

하나의 유전 효과를 이용하여 색상을 결정하는 형질을 설명하기엔 한계가 있다. 따라서 모색 연관 유전자 중 *MC1R*과 *TYRP1* 유전자에서 haplotype 분석을 통한 SNP 마커의 효율성을 높이고자 한다. 특히 본 연구에서 사용된 Gabriel

등 (2002)이 정의한 방식을 살펴보면, pairwise SNP에 대한 D'값을 근거로 하여 사용하였고, 분석에 사용된 개체는 혈연관계가 없어야 한다. 여기에서 추정된 연관 불평형 값은 Haploviewer v4.2 프로그램에 있는 방식으로 Qin 등 (2002)에 의해 보고된 algorithm을 사용하여, 부모의 유전 정보 없이 결정된 haplotype 빈도 추정치를 구하였고, 95% 신뢰구간에서 D'값의 상한치(Upper)가 0.98이상이고, 하한치(Low)가 0.7 이상이 되면 강한 연관 불평형(Strong Linkage Disequilibrium)이 된다. 따라서 haplotype block은 pairwise SNP 간에 신뢰 구간이 95% 이상이 되는 지역을 선정한다. 본 연구에서는 기존의 Gabriel(2002)이 정의한 방식뿐만 아니라, 흔히 four-gamete rule이라고 불리는 것을 같이 사용하였다. Four-gamete rule 방식이란, 단일 marker 분석의 5% 수준의 genome-wide에 도달한 각각의 SNPs와 LD의 계수( $r^2$ ) 사이에 LD 값 평가하기 위해 계산하는 방식이다(Wang 등, 2002). Four-gamete rule로 접근한다면, 2개의 marker haplotype는 4개의 gamete로 가능하게 되는 집단의 빈도로 계산된다. 만약 모든 4개 gamete가 적어도 0.01의 빈도에서 관찰된다면, 재조합이 발생하는 것으로 여겨진다. 각 개체에 대한 haplotype의 작성과 빈도는 혈통정보 없이 Scheet(2006)이 개발한 algorithm을 사용하여 계산하였다. HtSNP 선정은 Haploviewer v4.2 프로그램에서 Tagger 프로그램의 pairwise tagging 방법(de Bakker 등, 2005)을 이용하였고, Gabriel (2002)이 정의한 방식뿐만 아니라 four-gamete rule의 방식에 따른 marker를 선발하였다.

Table 3에서 제시했듯이, *MC1R* 유전자의 haplotype 분석에서 CGG type의 경우, 재래닭에서만 특이적으로 나타나는 SNP조합이며, CAA type의 경우는 레그혼에서만 특이적으로 나타나는 SNP 조합으로서, 앞서 언급된 선행 연구 결과인 Lee (2011)의 haplotype과 유사하게 나타났다. 아라카나 품종의 경우는 TAG, TGG, TAA type 3가지 경우에 특이적으로 나타났다. 오골계의 경우는 TGA type일 때, 90%로 높은 확률을 가지지만, 재래닭과 겹치므로 판별하기는 어렵다고 판단된다. 하지만 *MC1R*의 3가지 마커의 조합은 재래닭, 레그혼에서는 각각 CGG type 65%, CAA type 92.5%로 높은 haplotype 빈도를 가지므로 마커로서의 효율이 매우 높으며, 아라카나에서는 TAG, TGG, TAA type 각각 27.1%, 25.4%, 10.4%로 haplotype의 빈도는 낮지만, 아라카나에서만 특이적이므로 마커로써 효율적이다. Table 2의 경우, 각 품종 간 구분할 수 있는 마커가 제한적이면서 부정확하였으나, Table 3를 살펴볼 때 각각 SNP로서의 효율보다 3개의 SNP 마커 간의 조합으로서 haplotype을 봤을 때, 더욱 효율

**Table 3.** Haplotype analysis of *MC1R* gene

Haplotype	Haplotype frequency(%)			
	O	KR	W	AR
CGG		65.0		
CGA	10.0	17.5	7.5	
TGA	90.0	17.5		37.1
TAG				27.1
TGG				25.4
TAA				10.4
CAA			92.5	

이 증가한다(Oh et al., 2013; Lee et al., 2010). 따라서 *MC1R*의 3가지 SNP조합은 오골계를 제외한 품종 간을 구별할 수 있는 효율적인 마커라고 판단된다.

*TYRP1*의 haplotype(Table 4)을 살펴보면 TTTCA, CCTCA type의 경우, 레그혼에서만 특이적으로 나타나는 SNP조합이며, CTTTA type의 경우, 오골계에서만 특이적으로 나타나는 마커 조합이다. 하지만 CTTCa type의 경우, 재래닭에서 100%의 haplotype 빈도를 나타내며, 오골계의 경우에서 90%의 빈도로 나타나기 때문에, 재래닭 또는 오골계에 대한 품종을 구별하기는 어렵다. 또한 TCTCA type의 경우, 아라카나에서 99.95%로 높은 haplotype 빈도를 나타내지만, 레그혼에서도 40%의 빈도로 나타나기 때문에, 아라카나를 구별하기는 어렵다. *TYRP1* 유전자 haplotype의 경우, 레그혼과 오골계에서는 품종을 구별할 수 있는 마커 조합을 찾을 수 있었으나, 아라카나와 재래닭의 경우는 마커 조합으로서 품종을 구별하기가 어렵다. *TYRP1* 하나의 마커를 활용하였을 때 아라카나는 구분할 수 있었으나, 오골계와 재래닭은 구별하지 못하였다. 하지만 haplotype으로 마커를 조합할 경우, CTTTA 유전자형으로 인하여 오골계와 재래닭을 구분

**Table 4.** Haplotype analysis of *TYRP1* gene

Haplotype	Haplotype frequency(%)			
	O	KR	W	AR
CTTCA	90	100		
TCTCA			40	99.9545
TTTCA			32.5	
CCTCA			27.5	
CTTTA	10			

할 수 있게 된다.

따라서 본 연구의 결과, 각각의 SNP 마커만으로 빈도를 비교했을 때는 *MC1R* 유전자의 c.69 T>C만이 아라카나와 레그혼 간의 확실한 차이를 확인할 수 있었고, *TYRP1* 유전자의 경우, c.299 C>T와 g.2122 C>T에서 오골계, 재래닭과 아라카나 간의 확실한 차이를 확인할 수 있었다. 이런 각각의 마커들을 조합으로 haplotype을 보았을 때, *MC1R* 유전자의 SNP 조합에서 CGG type일 경우, 재래닭만을 특별히 구별할 수 있었으며, TAG, TGG, TAA type일 경우에는 아라카나만을 구별할 수 있었고, CAA type의 경우, 레그혼만을 특이적으로 구별할 수 있었다. *TYRP1* 유전자의 SNP 조합에서는 TTTCA, CCTCA type의 경우, 레그혼만을 구별할 수 있었으며, CTTTA type의 경우, 오골계만을 특이적으로 구별할 수 있었다. 즉, 각각의 마커를 따로 사용하기보다 haplotype의 조합을 사용할 경우, 마커로서의 가치가 더욱 증가된다. *MC1R* 유전자의 SNP 조합으로 재래닭, 레그혼, 아라카나를 구별할 수 있었고, *TYRP1* 유전자의 각각의 SNP 및 조합으로 4가지 품종 모두 구별할 수 있었다. 이렇게 품종 간의 유전적 다형성에 대한 연구가 더 많이 진행된다면, 단순 모색만으로 품종을 구별하기보다는 분자생물학적으로 품종 간의 차이를 이해할 수 있게 될 것이라고 생각된다.

## 적 요

닭을 구분하는데 있어 가장 눈에 띄는 것이 모색이며, 모색 관련 유전자인 *MC1R*, *MITF*, *TYRP1*의 SNP에 따른 유전자형을 확인하고, 각 품종별로 구별이 가능한 SNP 마커를 개발하고자 하는데, 본 연구의 목적이 있다. 마커들을 조합으로 haplotype을 보았을 때, *MC1R* 유전자의 SNP 조합에서 CGG type일 경우, 재래닭만을 특별히 구별할 수 있었으며, TAG, TGG, TAA type일 경우에는 아라카나만을 구별할 수 있었고, CAA type의 경우, 레그혼만을 특이적으로 구별할 수 있었다. *TYRP1* 유전자의 SNP 조합에서는 TTTCA, CCTCA type의 경우, 레그혼만을 구별할 수 있었으며, CTTTA type의 경우, 오골계만을 특이적으로 구별할 수 있었다. *MC1R* 유전자의 SNP 조합으로 재래닭, 레그혼, 아라카나를 구별할 수 있었고, *TYRP1* 유전자의 각각의 SNP 및 조합으로 4가지 품종 모두 구별할 수 있었다. 이렇게 품종 간의 유전적 다형성에 대한 연구가 더 많이 진행된다면, 단순 모색만으로 품종을 구별하기보다는 분자생물학적으로 품종 간의 차이를 이해할 수 있게 될 것이라고 생각된다.

(색인어 : *MC1R*, *MITF*, *TYRP1*, 단일염기변이, 해플로타입)

## 사 사

본 연구는 2013년도 농촌진흥청 농업유전자원관리기관사업(PJ009649)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

## 인용문헌

- Barton DE, Kwon BS, Francke U 1988 Human tyrosinase gene, mapped to chromosome 11(q14-q21), defines second region of homology with mouse chromosome 7. *Genomics* 3(1): 17-24.
- Choe JH, Nam KC, Jung S, Kim B, Yun HJ, Jo C 2010 Differences in the quality characteristics between commercial Korean native chickens and broilers. *Korean J Food Sci Ani Resour* 30: 13-19.
- de Bakker PI, Yelensky R, Pe'er I, Gabriel SB, Daly MJ, Altshuler D 2005 Efficiency and power in genetic association studies. *Nat Genet* 37: 1217-1223.
- Fang D, Tsuji Y, Setaluri V 2002 Selective down-regulation of tyrosinase family gene *TYRP1* by inhibition of the activity of melanocyte transcription factor, *MITF*. *Nucleic Acids Res* 30(14): 3096-3106.
- Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero S, N, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Waed R, Lander ES, Daly MJ, Altshuler D 2002 The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296: 2225-2229.
- Gunnarsson U, Hellstrom AR, Tixier-Boichard M, Ninvielle F, Bed'hom B, Ito S, Jensen P, Rattink A, Vereijken A, Andersson L 2007 Mutations in *SLC45A2* cause plumage color variation in chicken and Japanese quail. *Genetics* 175: 867-877.
- Hearing VJ, Ekel TM, Montague PM, Nicholson JM 1980 Mammalian tyrosinase. Stoichiometry and measurement of reaction products. *Biochim Biophys Acta* 611 (2): 251-268.
- Hershey CL, Fisher DE 2004 *MITF* and *TFE3*: Members of a b-HLH-ZIP transcription factor family essential for osteoclast development and function. *Bone* 34(4): 689-696. doi: 10.1016/j.bone.2003.08.014. PMID 15050900.
- Hoekstra HE 2006 Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates. *Heredity* 97: 222-234.
- Hoque MR 2012 Identification of discrimination markers among chicken breeds in Korea. Submitted to the Graduate School in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy. Graduate School, Chungnam National University.
- Hughes MJ, JB L, Krakowsky JM, Anderson KP 1993 A helix-loop-helix transcription factor-like gene is located at the *mi* locus. *J Biol Chem* 268, 20687-20690.
- Jackson IJ 1994 Molecular and developmental genetics of mouse coat color. *Annu Rev Genet* 23: 189-217.
- Jeon HJ, Choe JH, Jung Y, Kruk ZA, Lim DG, Jo C 2010 Comparison of the chemical composition, textural characteristics, and sensory properties of North and South Korean native chickens and commercial broilers. *Korean J Food Sci Ani Resour* 30: 171-178.
- Kenny EE, Timpson NJ, Sikora M, Yee MC, Moreno-Estrada A, Eng C, Huntsman S, Burchard EG, Stoneking M, Bustamante CD, Myles S 2012 Melanesian blond hair is caused by an amino acid change in *TYRP1*. *Science* 336(6081): 554-554.
- Kerje S, Lind J, Schütz K, Jensen P, Andersson L 2003 Melanocortin 1-receptor (*MC1R*) mutations are associated with plumage colour in chicken. *Anim Genet* 34: 241-248
- Kim H, Kim DH, Park SB, Choi SB, YG, Kim JH, Do YJ, Park HG, Kim SW 2012 The effect of modified cryopreservation method on viability of frozen thawed blastodermal cells on the Korean Native Chicken(Ogolgye breed). *Reprod Dev Biol* 36(1): 65-70.
- Kim HK 2010 Breeding control of Woorimatdak. *Korean Poultry Journal* 487: 153-155.
- Kumar CM, Sathisha UV, Dharmesh S, Rao AG, Singh SA 2011 Interaction of sesamol (3,4-methylenedioxyphenol) with tyrosinase and its effect on melanin synthesis. *Biochimie* 93(3): 562-569.
- Lee HK, Choi CW, Park MK, Lee SH, Park TJ 1992 Studies on the selection response of generation for egg production in Single Comb Leghorn. *K J Poul Sci* 19(4): 187-195.
- Lee YS, Oh DY, Kim JJ, Lee JH, Park HS, Yeo JS 2010 A single nucleotide polymorphism in *LOC534614* as an un-



- known gene associated with body weight and cold carcass weight in Hanwoo (Korean Cattle). *Asian-Aust J Anim Sci* 23(12): 1543-1551.
- Lerner AB, Fitzpatrick TB 1950 Biochemistry of melanin formation. *Physiol Rev* 30(1): 91-126.
- Levy C, Khaled M, Fisher DE 2006 MITF: Master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* 12(9): 406-414. doi:10.1016/j.molmed.2006.07.008. PMID 16899407.
- Moore KJ 1995 Insight into the microphthalmia gene. *Trends Genet* 11, 442-448.
- Oh DY, La BM, Lee YS, Byun YH, Lee JY, Yeo GH, Yeo JS 2013 Identification of novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the lipoprotein lipase (LPL) gene associated with fatty acid composition in Korean cattle. *Mol Biol Rep* 40(4): 3155-3163.
- Oh JD, Kang BS, Kim HK, Park MN, Chae EJ, Seo OS, Lee HK, Jeon GJ, Kong HS 2008 Genetic relationship between populations and analysis of genetic structure in the Korean Native chicken and the Endemic Chicken Breeds. *K J Poul Sci* 35(4): 361-366.
- Robbins LS, Nadeau JH, Johnson KR, Kelly MA, Roselli-Reh fuss L, Baack E, Mountjoy KG, Cone RD 1993 Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutation that alter MSH receptor function. *Cell* 72: 827-834.
- Sang BD, Kong HS, Kim HK, Choi CH, Kim SD, Cho YM, Sang BC, Lee JH, Jeon GJ, Lee HK 2006 Estimation of genetic parameters for economic traits in Korean. *Asian-Aust J Anim Sci* 19: 319-323.
- Sarangarajan R, Boissy RE 2001 *Tyrp1* and oculocutaneous albinism type 3. *Pigment Cell Res* 14 (6): 437-444.
- Sazanov A, Masabanda J, Ewald D, Takeuchi S, Tixier-Boichard M, Buitkamp J, Fries R 1998 Evolutionarily conserved telomeric location of *BBC1* and *MC1R* on amicrochromosome questions the identity of *MC1R* and a pigmentation locus on chromosome 1 in chicken. *Chromosome Res* 6(8): 651-654.
- Scheet P, Stephens M 2006 A fast and flexible statistical model for large-scale population genotype data : Applications to inferring missing genotypes and haplotypic phase. *Am J Hum Genet* 78: 629-644.
- Takeuchi S, Suzuki S, Yabuuchi M, Takahashi S 1996 A possible involvement of melanocortin 1-receptor in regulating feather colour pigmentation in the chicken. *Biochim Biophys Acta* 1308: 164-168.
- Um HJ, Won MY, Lee DW, Go DW, Mo P 2006 Efficacy of in-ovo vaccination against Marek's disease in commercial broiler. *K J Poul Sci* 33(4): 295-301.
- Wang N, Akey JM, Zhang K, Chakraborty R, Jin L 2002 Distribution of recombination crossovers and the origin of haplotype blocks: The interplay of population history, recombination, and mutation. *American Journal of Human Genetics* 71: 1227-1234.
- Yun JS, Seo DS, Kim WK, Ko Y 2005 Expression and relationship of the insulin-like growth factor system with posthatch growth in the Korean Native Ogot Chicken. *Poult Sci* 84, 83-90.
- 김동진 2012 계란 기능 및 효능에 대한 연구. *대한양계협회 월간양계* 44(9) 137-139.
- 김병기 배만종 정승화 2006 저 콜레스테롤 함유 청색 계란 생산방법. 특허등록 10-0592551호.
- (접수: 2013. 10. 13, 수정: 2013. 11. 26, 채택: 2014. 3. 4)