

한우 6번 염색체의 Bootstrap기법을 이용한 우수 DNA 탐색

이제영¹⁾, 여정수²⁾,
김재우³⁾, 이용원⁴⁾, 김문정⁵⁾

요약

한우 6번 염색체 유전자 지도에서 한우의 질을 높이기 위한 QTL(quantitative trait loci)분석을 실시하여 선별된 Loci 값을 Permutation Test를 이용하여 계산하였다. 한편, 경제적으로 주요한 한우의 특성부위(질적부위와 육량등)에 따른, 우수 경제형질 DNA marker를 K-평균 군집법을 실시 파악하였다. 이들 QTL과 K-평균법에 의해 한우의 염색체 6번, ILST035의 주요 경제 형질별 DNA marker들을 선별하여, Bootstrap BCa방법을 이용하여 각 DNA marker들의 신뢰구간을 구했다.

주요용어 : 후대검정수, QTL모델링, K-평균법, 유전자지도, Permutation test, Bootstrap

1. 서론

21세기는 생명공학의 시대를 맞이하여, 생명공학의 핵심이 될 지놈(genome) 연구가 활발히 진행되고 있다. 지놈 연구란 한 생명체가 생명을 지닌 개체로서 기능을 하도록 하는 정보가 담겨 있는 유전정보의 총 집합체인 지놈을 구성하고 있는 DNA의 서열을 밝히는 프로젝트를 말하는 것이다. 이 지놈 프로젝트로써 21세기 생명체로서 활동하는 개체에 대한 근본정보를 모두 밝히게 될 예정이다. 선진국에서는 인간지놈 프로젝트(Human Genome Project) 뿐만 아니라 경제성이 높은 동물의 지놈 프로젝트도 추진되고 있어, 우리나라에서도 선진국에 종속되지 않는 고유한 재래유전 자원을 이용한 지놈 프로젝트의 필요성이 끊임없이 제기되어져 왔으며, 우리나라 재래가축 유전 자원 중 가장 경쟁력이 확보되고 경제성이 높은 것으로 확인된 한우를 대상으로 유전자지도 작성(gene mapping)이 시도되고 있다(Kim 등, 2000). 한우를 비롯한 축우의 유전자지도 작성에서는 주로 microsatellite를 이용하고 있다. microsatellite란 생물에 존재하는 단순염

1) (712-749) 경북 경산시 대동 214-1 영남대학교 이과대학 수확통계학부 부교수
jlee@yu.ac.kr

2) (712-749) 경북 경산시 대동 214-1 영남대학교 자연자원대학 생물자원학부 교수

3) (712-749) 경북 경산시 대동 214-1 영남대학교 자연자원대학 생물자원학부 연구교수

4) (712-749) 경북 경산시 대동 214-1 영남대학교 이과대학 통계학과 대학원생

5) (712-749) 경북 경산시 대동 214-1 영남대학교 이과대학 통계학과 대학원생

기서열(simple repetitive sequence)들의 수많은 반복단위 수의 변이에 따른 DNA다형성을 나타내는 것으로 1~6개의 nucleotide가 순차적 반복염기(tandem repeat sequence)로 구성되어 있는 것으로 보고되었으며(Rassman 등, 1991), 이들 microsatellite들은 주변의 특이 염기서열로부터 프라이머(primer)를 이용한 PCR 방법은 사용이 용이하고 증폭된 산물들은 단순염기서열 반복단위의 수를 변이시킴으로서 높은 다형성을 나타내게 된다. 그리고 이들이 나타내는 marker들은 개체에서 특이적인다형성과 공우성(codominance)을 나타내게 되어 동일 종의 혈연관계가 가까운 가계나 계통간에도 높은 수준의 이형 접합성을 보인다. 그러므로 가계 내 연관분석에 매우 효과적으로 이용할 수 있어 동물의 유전자지도 작성에 유용한 도구로 사용할 수 있는 것으로 밝혀져(Bishop 등, 1994; Georges 등, 1995), 개체식별 및 친자감별 등에 microsatellite가 유용한 도구로 사용되어 왔다(Mannen 등, 1993).

따라서 본 연구는 한우의 주요 경제형질인 육질과 육량에 연관된 유전자들이 다수 위치하는 6번 염색체의 microsatellite loci를 대상으로 QTL 분석을 하여 선별된 Loci값을 계산하고(2장), 그 이후 데이터 마이닝에 의해 우수 DNA를 Mining하려고 시도하고(3장), 문제점을 보완하여(4장), 이들 loci들이 가지는 DNA marker를 이용한 한우의 형질의 능력 개량을 위하여 본 연구를 시행하였다.

2. QTL (quantitative trait loci) 모델링과 Permutation Test

한우에서 경제형질연관 DNA marker를 이용한 육질형질의 능력 개량을 위해 QTL 분석의 활용은 한우의 육질능력 개량에서 보다 신속하고, 정확한 육질 연관 DNA marker의 활용을 가능하게 할 수 있다. 따라서 한우가 국제경쟁력을 가지기 위해서는 육질에 연관된 한우의 고유한 유전자를 찾고, 이를 위한 linkage map을 기초로 한 한우 집단에 적합한 새로운 QTL 분석 model 및 program의 개발이 반드시 필요하다. 이러한 측면에서 볼 때 Kim 등(2000)이 보고 한 한우의 6번 염색체의 유전자 지도 작성을 이용한 QTL 분석 model은 반형매 가계를 이용한 linkage mapping과 QTL 분석의 가능성을 충분히 제시하고있어 본 연구의 수행에 적극 활용하였다.

본 연구는 한우의 6번 염색체의 유전자 지도 작성을 이용한 근내지방 연관(bovine 경우) QTL의 LOD값(그림1)을 계산하여 경제형질의 기록이 있는 한우농가 개체들의 QTL 검정하였다. 그리고, 기존의 개량모형의 예상결과와 비교하여 한우의 선발체계를 구축할 수가 있을 것으로 판단했다. 그 결과로 그림1에서 우선 “LOD 값>3.0”을 판정기준으로 여러 개의 잠정 우수 형질로 선정한다.

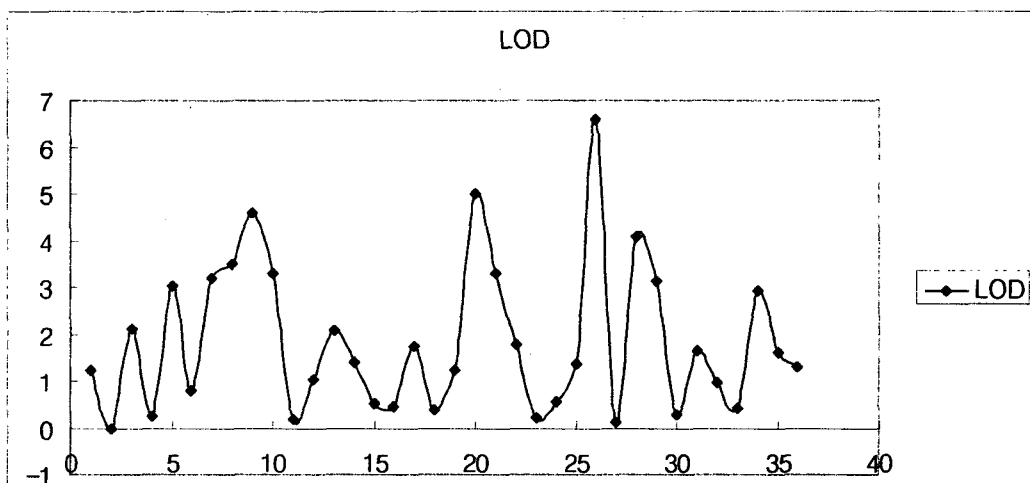


그림 1 : 6번 염색체의 근내지방 연관 QTL의 LOD값 그래프

선정된 Lod Score 값의 중요성을 이론적으로 나타내어 주기 위해 Permutation Test를 실시하였다 (Churchill and Doerge, 1994). 10,000번의 simulation을 통해 p-value를 결정하였다.

형질	Loci	LOD Score	P-value	Ratio of QTL variation (%)
근내지방	BM3026	3.50199907	P<0.01	9.37
	BMS690	4.602844364	P<0.01	12.53
	ILSTS035	4.991694330	P<0.01	16.54
	BM4311	6.594214985	P<0.01	16.38
	BMS511	4.079206916	P<0.01	11.03
	AFR227	3.150859863	0.07235	19.47
	BMC4203	2.915809464	P<0.01	7.88

여기서 볼 때 BM4311의 Lod Score가 높음에도 불구하고 한우의 육질을 높이기 위해 ILSTS035에 대하여 알아보도록 한다.

3. K-평균 군집화 기법을 이용한 우수 DNA Mining

연구에 활용된 자료는 농림기획과제로 수행중인 한우의 경제형질 우수 유전자 선별을 위해 실험되고 있는 후대검정우 165두를 사용하였다. 이중 한우 6번 염색체 ILSTS035 microsatellite loci의 DNA marker를 사용하였다. 변수의 개수는 13개이다. 13개의 변수 중 각 DNA marker의 유무에 대하여 나누어진 변수가 8개 DM210,……,DM266로 정의되고, 한우 특성에 관한 변수가 5개이다. 한우 특성에 관한 변수에는 근내지방, 일당증체, 등지방, 등심 및 도체중이 있다. 이런 한우의 특성에 관한 변수들에 대하여 군집을 나누어서 어떤 DNA marker가 어느 군집에 많이 속해 있는지를 발견하고자 하였다. 변수들 간의 단위가 달라서 군집 형성시 문제가 발생할 가능성이 있기 때문에 처음 변수들을 표준화 시켰다. 그리고, 등지방은 값이 적을수록 좋은 것이 되므로, 군집 분석 전에 역 등지방이란 새로운 변수를 만든다. 역 등지방을 계산하는 방식은 $(1/\text{등지방}) \times 10$ 으로 하였다.

한우의 특성에 관한 5개의 변수들의 특성을 DNA marker들과의 모형구축을 위해 비관리학습 신경망분석 방법인 K-Means 군집분석을 시도하였다.

< 표 1 > K-Means 군집화 결과

	군집 1(58)	군집 2 (36)	군집 3 (43)
근내지방	-0.673177	1.341518	-0.215128
일당증체	-0.711536	0.08525	0.888374
(역)등지방	0.333065	-0.11327	-0.354413
등심	-0.564381	0.169661	0.619216
도체중	-0.791399	0.172412	0.923122

<표 1>에서 보면 각 군집에 대한 수치적 특성이 나타나고 있다. 군집1은 (역)등지방에 양호한 영향을 주는 DNA marker군이고, 군집2는 근내지방에 양호한 영향을 주는 DNA marker군이며, 군집3은 일당증체, 등심, 도체중에 양호한 영향을 주는 DNA marker군이다.

다음으로, 표준화된 데이터에 대한 각 DNA marker별 평균을 내어 군집화 결과와 그 특징을 비교분석 하고자 하였다. <표 2>에서 근내지방의 평균이 높게 나타난 DNA marker는 DNA marker는 235였고, (역)등지방의 평균이 높게 나타난 DNA marker는 DNA marker210, 215, 235였으며, 일당증체, 등심, 도체중의 평균이 높게 나타난 DNA marker는 DNA marker240, 255, 260, 266 였다.

이들로부터 한우의 주요형질인 육질과 육량에 관련한 <표 3>의 결과들로 요약할 수 있다. 역등지방에 영향을 주는 DNA marker로 DNA marker 210, DNA marker 215가 나왔고, 근내지방에 영향을 주는 군집으로 DNA marker 235가 선별이 되었고, 일당증체, 등심, 도체중에 우수한 인자는 DNA marker 260, DNA marker 266이 나왔다. 여기서 각 DNA marker들의 두수가 다르게 나타나기 때문에, 각 군집에는 속하지만 두수가 적은 DNA marker들의 실질적인 영향에 대하여 알아 볼 필요가 있다.

< 표 2 > ILSTS035 내 DNA marker들의 표준화 평균 () : 두수

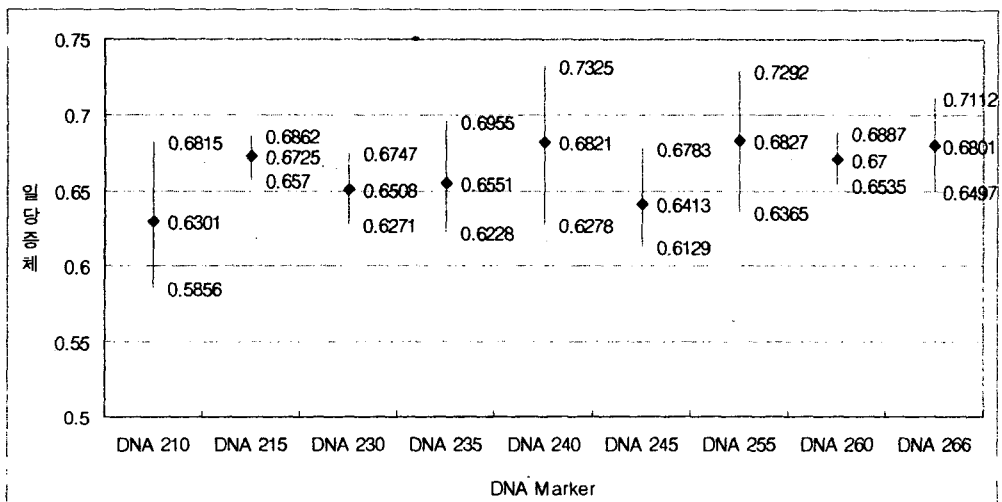
	DNA marker 210 (10)	DNA marker 215 (79)	DNA marker 230 (34)	DNA marker 235 (15)	DNA marker 240 (4)	DNA marker 245 (12)	DNA marker 255 (10)	DNA marker 260 (59)	DNA marker 266 (21)
근내지방	-0.4286	0.0804	-0.1459	0.5838	0.1355	-0.1981	-0.134	0.0147	-0.0356
일당증체	-0.5216	0.0741	-0.2309	-0.1715	0.2109	-0.364	0.2196	0.0384	0.182
역등지방	0.8808	0.1168	0.0597	0.2417	0.0689	-0.407	-0.0365	-0.2142	0.0967
등심	0.0483	0.0668	-0.1997	0.1683	0.1968	-0.5815	-0.196	0.1646	0.4375
도체중	-0.5999	0.0594	-0.2924	-0.0201	0.3722	-0.4761	-0.1376	0.1091	0.1997

< 표 3 > 표준화된 데이터 평균값에 따른 DNA marker와 Mining된 DNA marker

	데이터의 평균결과	K-means Mining
< 군집 1 > 역 등지방에 영향을 주는 군집	DNA marker210, DNA marker215, DNA marker235	DNA marker210, DNA marker215, DNA marker230, DNA marker245
< 군집 2 > 근내지방에 영향을 주는 군집	DNA marker235	DNA marker235, DNA marker240
< 군집 3 > 일당증체, 등심, 도체중에 영향을 주는 군집	DNA marker240, DNA marker255, DNA marker260, DNA marker266	DNA marker245, DNA marker260, DNA marker266

4. DNA marker들에 대한 Bootstrap Method 적용

두수가 적은 DNA marker들이 실제로 영향을 주는지에 대하여 고려해 보도록 한다. DNA maker 210번인 경우 군집 1에 속하며, 역등지방에 높은 표준화 평균을 나타내고 있지만 10두에 불과하고, DNA maker 240번인 경우 군집 2에 속하며, 일당증체에 높은 표준화 평균을 나타내고 있지만 4두에 불과하며, DNA maker 255번인 경우 군집 3에 속하며, 일당증체에 높은 표준화 평균을 나타내고 있지만 10두에 불과해 실제로 판단이 어려운 경우였다. bootstrap method (Visscher et al., 1996)을 이용하여 DNA marker에 대한 신뢰구간을 계산하였다.



일당증체에 대한 DNA marker 240번의 신뢰구간을 계산해 본 결과 넓은 신뢰구간 (0.7325, 0.6278)을 가지게 됨을 알 수 있다. DNA marker 255번의 신뢰구간 역시 (0.6365, 0.7292)로 넓게 나타남을 알 수 있다.

5. 결론

한우 6번 염색체 유전자 지도에서 선별된 Loci값을 Permutation Test를 이용하여 계산하였다. 그리고, ILSTS035 microsatellite loci #20의 우수 DNA marker Mining을 해 보았다. 그래서, 한우의 특성에 따라 우수 DNA marker 선별을 시도하였다. 그리고, 각 DNA marker들의 최소성 두수에 대한 문제점을 보완하기 위해 Bootstrap 방법을 사용하여 신뢰구간을 구하였다. 우리가 원하는 한우의 특성부분을 증가시키기 위해 어떤 DNA marker를 중점적으로 연구해야 하는지의 결론도 얻을 수 있었다. 나아가 본 분석에서 얻

은 우수DNA marker 값을 향후 한우의 출품우에 적용해서 양질의 한우 DNA marker 연구에 기초적인 토대를 만들 것이다.

6. 참고자료 및 문헌

1. Barendse, W., S. M. Armitage, L. M. Kossarek, A. Shalom, B. W. Kirkpatrick, A. M. Ryan, D. Clayton, L. Li, H. L. Neibergs, N. Zhang, W. M. Grosse, J. Weiss, P. Creighton, F. McCarthy, M. Ron, A. J. Teale, R. Fries, R. A. McGrew, S. S. Moore, M. Georges, M. Soller, J. E. Womack and D. J. S. Hetzel, (1994). A genetic linkage map of the bovine genome. *Natl. Genet.* 6:227-235.
2. Barendse, W., D. Vaiman, S. J. Kemp, Y. Sugimoto, S. M. Armitage, J. L. Williams, H. S. Sun, A. Eggen, M. Agaba, S. A. Aleyasin, M. Band, M. D. Bishop, J. Buitkamp, et al. (1997). A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. *Mammalian Genome* 8:21-28.
3. Bishop, M. D., S. M. Kappes, J. W. Keele, R. T. Stone, S. L. F. Sunden, G. A. Hawkins, S. S. Toddo, R. Fries, M. D. Grosz, J. Yoo and C. W. Beattier, (1994). A genetic linkage map for cattle. *Genetics* 136:619-639.
4. Casas, E., S. D. Shackelford, J. W. Keele, R. T. Stone, S. M. Kappes and M. Koohmaraie, (1999a). Evidence of quantitative trait loci affecting growth and carcass composition traits in cattle segregating the muscle hypertrophy locus. *Journal of Animal Science* 77 Supplement(1) :126-127.
5. Kappes, S. M., J. W. Keele, R. T. Stone, R. A. MacGraw, T. S. Sonstegard et al., (1997). A second- generation linkage map of the bovine genome. *Genome Res.* 7:235-249.
6. Kim, J. W., T. K. Jang, Y. A. Park and J. S. Yeo. (2000). Linkage mapping of chromosome 6 in the Korean Cattle(Hanwoo). *Asian-Aust. Anim. Sci.*13(Suppl.):235
7. Kim, J. W., S. I. Park, Y. A. Park, T. S. Kang, N. H. Park and J. S. Yeo. (2001). Linkage Mapping of Hanwoo Chromosome 6 Using Half-sib family. *The 10th Annual Congress on Korean Society of Anim. Sci. and Tech.*:PA21037
8. Rassman, K., C. Scholotterer and D. Tautz, (1991). Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction base DNA fingerprinting. *Electrophoresis* 12:113-118.
9. Roslin Institute, 2000. Bovine Gene Map. URL=<http://ri.bbsrc.ac.uk/>
10. Phillip G. (1994) "Permutation Test" Springer-Verlag
11. Efron B., Tibshirani R. (1993) "An Introdcction to bootstrap" CHAMPMAN & HALL