

넙치 Lymphocystis 바이러스 질병 내성 유전자 Marker

강정하*·남보혜·한현섭·이상준
국립수산과학원 생명공학연구소

A Genetic Marker Associated with Resistance to Lymphocystis Disease in the Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*

Jung-Ha KANG*, Bo-Hae NAM, Hyon-Sob HAN and Sang-Jun LEE
Biotechnology Research Institute, NFRDI, Gijang, Busan 619-902, Korea

We identified a microsatellite marker, Poli121TUF, which appears to be significantly linked ($P < 0.001$) with a lymphocystis disease virus (LCDV)-resistance gene in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. The olive flounder is an economically important food fish, that is widely cultured in Korea, Japan, and China. Lymphocystis disease has spread in these countries and has seriously reduced the economic value of the fish. LCDV causes lymphocystis cells (LC) to form on the body surface, fins, gills, mouth, and intestine. Fish with LC lose commercial value due to their deformed appearance. The identified microsatellite marker can be used as a candidate locus for marker-assisted selection (MAS) in order to enhance the efficiency of selection for LCDV resistance in the olive flounder.

Key words: Olive flounder, Lymphocystis virus disease, Genetic marker, QTL

서론

최근 분자생물학적 기술의 발전은 동·식물의 주요 경제 형질에 대한 유전정보를 밝힐 수 있게 되었다. 그 중, DNA marker를 기본으로 한 유전자 지도는 특정 형질관련 유전자의 염색체상 위치를 파악하는 중요한 도구가 된다. 이는 궁극적으로 양적 형질을 지배하는 기능유전자의 동정을 용이하게 한다 (Collins, 1992). 이러한 기능 유전자 marker를 이용하여 선발된 개체들은 표현형의 발현을 조절하는 유전자형에 따른 선발개체가 됨으로 장시간 사육을 통해 파악되는 유전적 획득을 선발초기에 미리 파악할 수 있으므로 정확하고 효율적인 선발 육종을 가능하게 한다. 넙치인 경우 다양한 유전자 표지에 의한 연관 유전자 지도가 작성되었고 (Coimbra et al., 2003) 이를 바탕으로 QTL 확인 연구가 진행 중에 있다. 그 중 넙치 lymphocystis disease virus (LCDV) 내성 유전자 marker에 대한 연구가 Fuji et al. (2006)에 의해 발표되었다. 이 논문에서는 LCDV-내성 line과 LCDV-감수성 line에서 만들어진 넙치의 역교배 가계를 이용한 QTL-mapping 결과, 넙치 유전자 지도 상 linkage group 15에 있는 Poli9-8TUF 유전자 marker가 단일 위치에서 내성 형질의 발현을 50% 지배하는 유전자 marker임을 보고하였다.

본 연구에서는 microsatellite Poli9-8TUF marker의 검증을 위해 특정 line 혹은 가계가 아닌 일반 양식장에서 사육되는 임의의 개체들을 대상으로 유전자 마커와 LCDV 내성 형질과의 linkage disequilibrium을 조사하였다. 한편 QTL 연구에

있어서의 핵심은 marker와 형질 유전자와의 상대적 거리가 가깝게 위치해 있는 marker를 찾아야 recombination 확률을 줄일 수 있어 임의의 집단이나 가계에서도 marker로서 활용할 수 있어 marker assisted selection (MAS) 육종을 가능하게 한다 (Andersson et al., 1994; Georges et al., 1995; Elouafi et al., 2001). 즉, 목적 형질 유전자와 근접해 있는 유전자 marker를 찾는 것이 관건이 된다. 이미 밝혀진 Poli9-8TUF marker와 LCDV-내성 형질과의 상대적 유전거리는 14.7 cM으로 형질을 관여하는 목적 유전자와 Poli9-8TUF 유전자 marker와는 상당한 거리가 있음에 착안하여 같은 linkage group에 있는 다른 유전자 마커 Poli121TUF 및 전혀 관련이 없는 임의의 유전자 마커 Poli130TUF를 대상으로 LCDV 감염 및 발병 집단과 정상 집단에서 유전자형 분포를 비교하여 형질과 연관성 있는 유전자 marker를 조사하였다.

재료 및 방법

실험어

실험에 사용한 넙치는 우리나라 양어장 7군데에서 LD 병어 및 정상어의 지느러미를 샘플하여 알코올에 보관하여 실험에 사용하였다. 체표나 지느러미 등에 LC가 형성되어 있는 넙치를 병어로, 외관상 환부를 형성하지 않는 넙치를 정상어로 간주하여 샘플하였다 (Table 1). 샘플된 지느러미는 genomic DNA 추출을 위하여 TNEs-urea buffer에 저장한 후 Pro-K 및 phenol 추출법 (Asahida et al., 1996)에 의해 분리하였다.

넙치 LCDV 질병관련 유전자에 의한 감염개체 진단
넙치 체표 및 지느러미 부위의 종양 조직으로부터 LCDV

*Corresponding author: jhkang@nfrdi.re.kr

Table 1. The number of sampled fish and LCDV infected fish in various olive flounder farms

Fish Farm	Total	Fish with LC	Fish without LC	Infected fish with LCDV	LCDV-free fish
KS	57	31	26	24	2
SS	52	31	21	21	0
KM	18	8	10	10	0
DA	33	15	18	13	5
HS	99	60	39	37	2
KK	41	31	10	10	0
JJ	159	75	84	74	10
Total	457	250	207	188	19
Wild fish	31	0	31	0	31

를 순수 분리하고 바이러스 DNA를 증폭시켜 LCDV 전체 염기서열 해석을 통해 기존의 LCDV 유전체와 비교하였다. 그 중 질병관련 유전자 정보 분석 및 확보를 위해 유전자 선별을 생물정보학적 방법을 이용한 annotation을 수행하였고 최종적으로 질병관련 유전자 리스트를 확보하였다. 선정된 질병관련 유전자 중 NIF/NLI interacting factor 유전자를 선택하여 LCDV를 신속하게 진단할 수 있는 유전자 marker로 채택하여 넙치가 LCDV에 감염되었는지 여부를 조사하였다. 선정된 NIF/NLI interacting factor 유전자 sequence는 forward primer 5'-gATTCg CCATCAAAAaggTTg-3'와 reverse primer 5'-TgTCATCAACgATgCTTTgC-3'으로 0.5-1 kb 사이에 증폭될 수 있도록 제작하였다.

넙치 LCDV 내성 유전자 screening

Fuji et al. (2006)는 LCDV-내성 관련 QTL이 linkage group 15 에 존재함을 보고하였다. 본 연구에서는 linkage group 15에 있는 두개의 marker (Poli121TUF와 Poli9-8TUF)와 그의 다른 연관군에 있는 임의의 MS marker Poli130TUF를 선택하여 각각의 marker와 LCDV 병어군과 LCDV 정상군으로 구분된 random 집단에서의 개체들을 genotyping에 의한 allele frequency를 조사하였고 두 집단의 유전적 차이는 GENEPOP (Raymond and Rousset 1995) 프로그램을 사용하여 유의성 검증을 하였다.

Poli121TUF sequence:

Forward primer 5'-ACTgCATgCATAACCAACAgTgTgT-3'

Reverse primer 5'-ggCTgAATTATTTggAgCagAAggT-3'

Poli9-8TUF sequence:

Forward primer 5'-gAgAgACAgAAggTCgTCAACggTA-3'

Reverse primer 5'-ACAAAgACCACgATgCAAAgTgAC-3'

Poli130TUF sequence:

Forward primer 5'-gCggTgAggACTTTATTTCTggACT-3'

Reverse primer 5'-gTggTACTgCagAAAAgCgACTgTT-3'

Genotyping 실시

Microsatellite DNA의 di-nucleotide repeat에 따른 다형 (polymorphism)으로 다양한 genotype pattern이 조사되며 이를 분석을 위해 ABI 3100 sequencer에서 GeneScan Size standard

marker 400HD ROX를 이용하여 GeneScan 및 Genotyper software에 의해 각 marker에서의 allele size를 결정하여 개체의 genotype을 분석하였다.

결론 및 고찰

LCDV 질병관련 유전자에 의한 감염개체 판별

육안으로 확인된 LCDV 발병개체에서 LCDV 질병관련 유전자로 선정된 NIF/NLI interacting factor 유전자 존재 여부를 확인하기 위한 PCR 증폭 결과 100% 해당 유전자가 존재하고 있었다. 또한 자연수계에서는 LCDV 질병이 발견되지 않음에 착안하여 자연산 넙치의 genomic DNA를 이용하여 분석한 결과 LCDV 바이러스 유전자가 전혀 존재하지 않았다. 이와 같은 결과는 선정된 질병관련 유전자는 넙치에는 존재하지 않고 LCDV에만 존재하는 유전자임을 알 수 있었으며 바이러스 DNA에는 넙치 유전자의 오염은 없는 것으로 확인되었다. LCDV가 발병한 양식장의 넙치인 경우 육안으로 발병된 개체들 뿐 만아니라 발병개체와 동일 수계에 있는 정상개체인 경우도 207마리 중 188마리에서 LCDV 유전자가 검출되었다 (Table 1). 이들 결과는 외관상 정상개체이지만 바이러스에 상당수가 감염되었을 것으로 예상되며 일차적으로 LCDV-free 개체 선별을 위해 NIF/NLI interacting factor 유전자를 이용할 수 있다. 이상의 결과에 따르면 단순한 single PCR법에 의해 LCDV에 감염된 개체와 free한 개체를 용이하게 판별할 수 있었으며 Fig. 1에서와 같이 감염개체와 발병 개체에서 LCDV 바이러스 증식정도에 따라 바이러스 유전자 복제수의 차이로 인한 PCR 산물량에 차이가 있음을 알 수 있었다.

동일 사육환경에서 LCDV 질병이 발병하면 사육개체들 대부분은 바이러스에 노출되어 전체 개체 중 4.1% (총 457마리 중 19마리)에 해당하는 개체들만 LCDV-free로 판별이 됨으로 보아 수평 감염 경로를 갖고 있을 가능성을 시사한다.

넙치 LCDV-내성 후보 유전자 marker의 genotyping

질병내성 유전자 마커를 확인하기 위해 microsatellite DNA marker Poli121TUF, Poli9-8TUF, Poli130TUF를 대상으로 genotyping을 실시하여 LCDV-내성 및 LCDV-발병 집단으로 나누어 allele frequency를 비교하였다 (Fig. 2). 유전자 marker

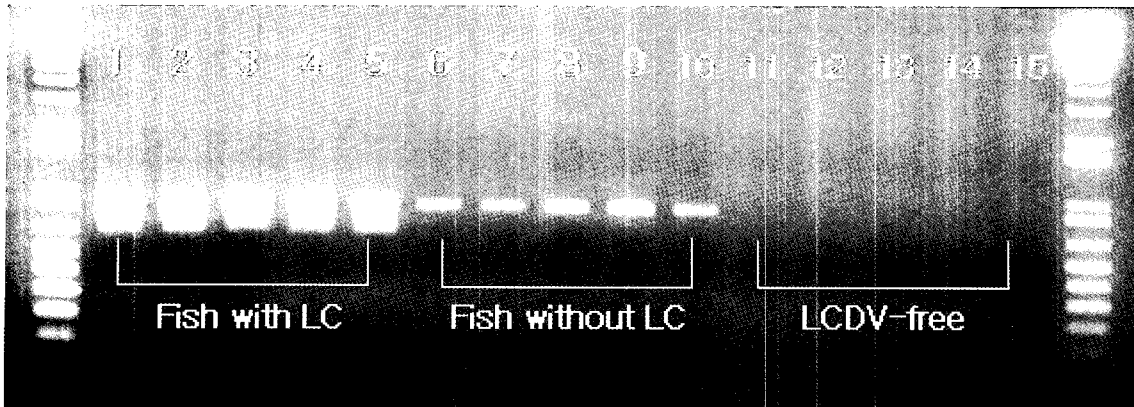


Fig. 1. Detection of LCDV from infected and uninfected olive flounder by PCR using a NIF/NIL interacting factor gene primer. Lane 1-5, fish samples with LC; lane 6-15, fish samples without LC.

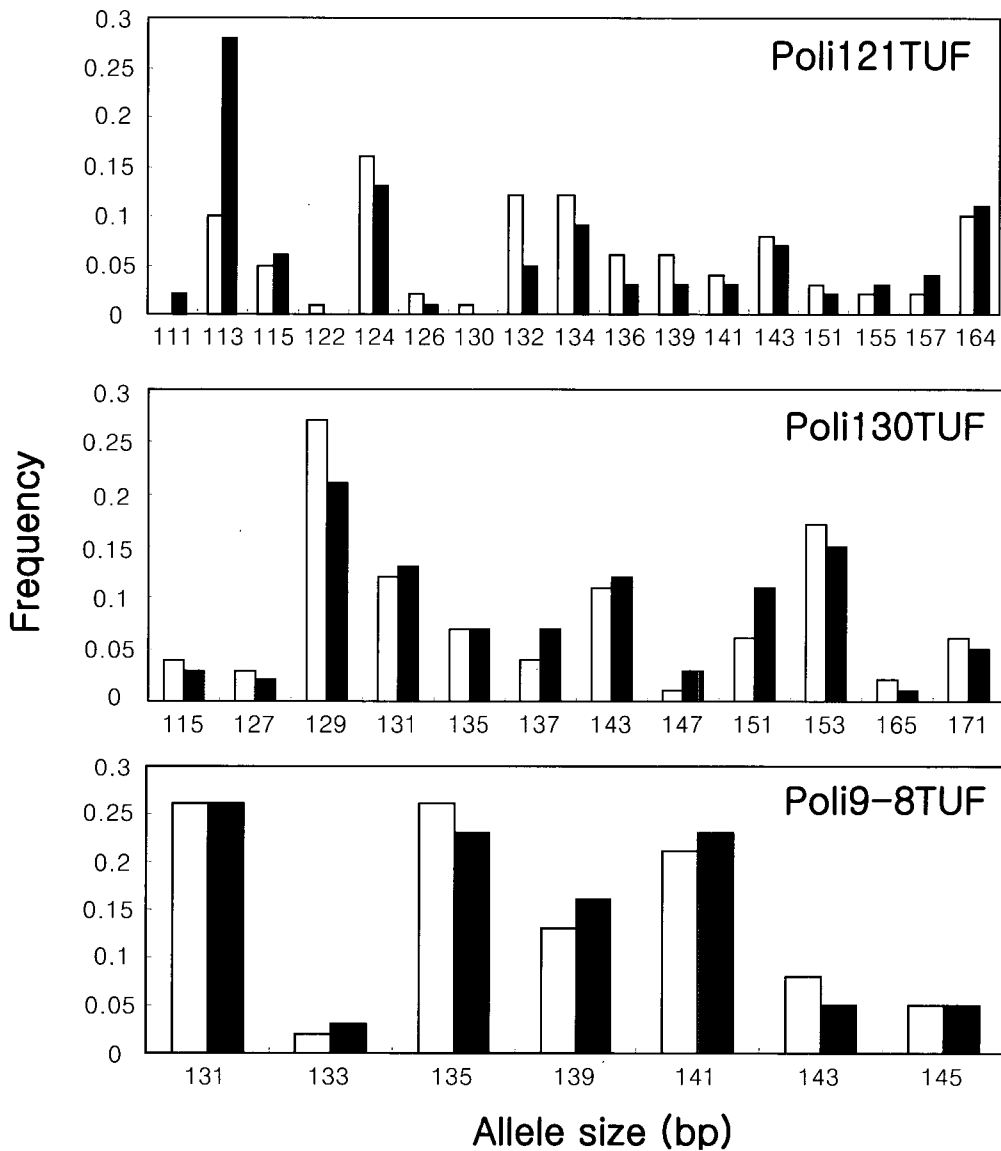


Fig. 2. Allele frequency of LCDV-resistance candidate markers. White bar, fishes with LC. Gray bar, fishes without LC.

Poli9-8TUF인 경우 7개의 allele이 존재하고 있었고 두 집단간 allele frequency는 비슷하였으며 Poli130TUF 인 경우는 12개의 allele로 분포되면서 두 집단의 차이는 볼 수 없었다. 그러나 Poli121TUF 인 경우 존재하고 있는 17개의 allele 중 113 allele이 특이적으로 LCDV-내성 집단에 높은 빈도로 존재하고 있었으며 ($p < 0.0001$) 두 집단을 유의적으로 분리할 수 있었다.

넙치 집단의 유전적 다양성 분석에 의하면 Poli121TUF locus에서의 allele 빈도를 조사한 보고에 의하면 113 allele 빈도인 경우 넙치 자연집단인 경우 0.065이었고 양식 넙치 집단인 경우는 0.112를 나타내고 있었고 두 집단 유의적인 차이가 없음이 나타나 있다 (Kang et al., 2006). 이처럼, 본 연구에서 관찰된 LCDV-내성 집단에서의 113 bp allele 빈도는 0.28이라는 높은 빈도를 나타내고 있었고 일반 넙치집단과도 현저한 차이를 나타내고 있음을 알 수 있었다.

Linkage disequilibrium 분석

동일 환경에서 사육되는 넙치 집단인 경우 LCDV가 발병되면 육안으로 수포성 종양이 보이지 않는 정상개체이지만 상당수가 LCDV에 감염은 되어 있었으나 발병되지는 않고 있음을 알 수 있었다. 즉, 바이러스에 노출은 되었으나 질병으로 발병하지 않는 것은 넙치 자체가 질병 내성 인자를 내재하고 있을 가능성을 시사한다고 할 수 있다. Fuji et al (2006)에 의해 이미 밝혀진 Poli9-8TUF marker는 본 연구에서는 LCDV-내성 형질과 아무런 상호 연관성이 없는 linkage equilibrium 상태였다. 즉, Poli9-8TUF marker와 LCDV-내성관련 QTL의 상대적 유전거리는 14.7 cM으로 형질을 관여하는 목적 유전자와 유전자 marker는 상당한 거리가 있었으므로 임의의 집단이나 다른 개체에서도 동일한 효과를 나타낼 수 있는 유전자 marker는 될 수 없음을 확인하였다.

오히려 본 연구에 사용된 linkage group 15에 있는 Poli121TUF locus에서 더 강한 연관성을 보인 것을 고려해 볼 때 linkage group 15의 어딘가에 LCDV-내성유전자가 확실히 존재하고 있음을 시사해 준다. 질병관련 QTL 연구를 보면 무지개송어의 IPN 질병 내성 관련 QTL 후보 유전자 marker 효과는 27-34%라고 보고가 있다 (Ozaki et al., 2001). 식물인 경우 양적형질관련 marker인 경우 10-20%의 효과를 보이는데 (Lin et al., 1998) 어류의 질병인 경우 병원체를 인지하여 제거하거나 감염 여부에 대해서는 호스트가 가지고 있는 어떤 유전인자의 유무에 의해 설명되어 지는 경우가 많다 (Fuji et al., 2006). 따라서 내성 QTL marker 효과가 상대적으로 높은 것은 질병관련 유전자가 단일 혹은 몇 개의 유전자가 관여하기 때문이라고 볼 수 있다. Fuji 등에 의해 보고된 Poli9-8TUF locus에서 표현형 변이의 50%를 차지하여 LCDV 내성 형질을 단독으로 지배한다고 했다. 본 연구 결과에서는 LCDV-내성과 관련된 유전자는 Poli121TUF와 더 가까운 위치에 있을 것으로 예상되었고 linkage group 15 연관군내 어딘가에 LCDV-내성 형질을 좌우하는 유전자가 존재할 확률이 아주 높다고 할 수 있다. 향후 BAC clone을 이용한 gene target 연구

및 interval mapping등을 통하여 LCDV 내성관련 목적 유전자를 탐색하는데 본 연구결과가 유용한 유전정보로서 활용 가치가 높다고 할 수 있다.

사 사

이 연구는 국립수산물과학원 (RP-2007-BT-006)의 지원에 의해 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Andersson, L., C.S. Haley, H. Ellegren, S.A. Knott, M. Johansson, K. Andersson, L. Andersson-Eklund, L. Edfors-Lija, M. Fredholm, L. Hansson, J. Hakansson and K. Lundstrom. 1994. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Science*, 263, 1771-1774.
- Asahida, T., T. Kobayashi, K. Saitoh and I. Nakayama. 1996. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fish. Sci.*, 62, 727-730.
- Coimbra, M.R.M., T. Kobayashi, S. Koretsugu, O. Hasegawa, E. Ohara, A. Ozaki, T. Sakamoto, K. Naruse and N. Okamoto. 2003. A genetic linkage map of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 220, 203-218.
- Collins, F.S. 1992. Positional cloning; let's not call it reverse anymore. *Nat. Genet.*, 1, 3-6.
- Elouafi, I., M.M. Nachit, L.M. Martin. 2001. Identification of a microsatellite on chromosome 7B showing a strong linkage with yellow pigment in durum wheat (*Triticum turgidum L.var.durum*). *Hereditas*, 135, 255-261.
- Fuji, K., K. Kobayashi, O. Hasegawa, M.R.M. Coimbra, T. Sakamoto and N. Okamoto. 2006. Identification of a single major genetic locus controlling the resistance to lymphocystis disease in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 254, 203-210.
- Georges, M., D. Nielson, M. Mackinnon, A. Mishra, R. Okimoto, A.T. Pasquino, L.S. Sargeant, A. Sorenso, M.R. Steele, X. Zhao, J.E. Womack, I. Hoeschele. 1995. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics*, 139, 907-920.
- Kang, J.H., J.K. Noh, J.H. Kim, J.H. Lee, H.C. Kim, K.K. Kim, B.S. Kim and W.J. Lee. 2006. Genetic relationship between broodstocks of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) using microsatellite markers.

- Aquacul. Res., 37, 701-707.
- Lin, S.Y., T. Sasaki. and M. Yano. 1998. Mapping quantitative trait loci controlling seed dormancy and heading date in rice, *Oryza sativa* L., using backcross inbred lines. Theor. Appl. Genet., 96, 997-1003.
- Ozaki, A., T. Sakamoto, S. Khoo, K. Nakamura, M.R.M. Coimbra, T. Akutsu. and N. Okamoto. 2001. Quantitative trait loci associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Mol. Gene. Genomics, 265, 23-31.
- Raymond, M. and F. Rousset. 1995. GENEPOP (ver.1.2). Population genetics software for exact test and ecumenicism. J. Heredity, 86, 28-29.

2007년 4월 9일 접수
2007년 6월 26일 수리