

## 제주마에서 월라 모색의 유전적 특성

김남영<sup>1\*</sup> · 신광윤<sup>2\*</sup> · 이종언<sup>1</sup> · 한상현<sup>1</sup> · 이성수<sup>1</sup> · 박용상<sup>1</sup> · 고문석<sup>1</sup> · 홍현주<sup>1</sup> · 양재혁<sup>3</sup> · 장덕지<sup>4</sup> · 양영훈<sup>5</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립축산과학원, <sup>2</sup>제주특별자치도 축산진흥원, <sup>3</sup>한국마사회, <sup>4</sup>제주마문화연구소, <sup>5</sup>제주대학교 생명공학부

## Genetic Characterization of Wolla Coat Color in Jeju Horses

Nam-Young Kim<sup>1\*</sup>, Kwang-Ynu Shin<sup>2\*</sup>, Chong-Eon Lee<sup>1</sup>, Sang-Hyun Han<sup>1</sup>, Sung-Soo Lee<sup>1</sup>, Yong-Sang Park<sup>1</sup>, Moon-Suck Ko<sup>1</sup>,  
 Hyun-Ju Hong<sup>1</sup>, Jae-Hyuk Yang<sup>3</sup>, Deok-Jee Jang<sup>4</sup> and Young-Hoon Yang<sup>5</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Animal Science, RDA, 175-6 O-deung Dong, Jeju 690-150, Korea, <sup>2</sup>Institute for Livestock Promotion, Jeju special self-governing province, 13, Chuksanmaeul-gil, Jeju 690-802, Korea, <sup>3</sup>Korea Racing Authority, 2144, Pyeonghwa-ro, Aewol-eup, Jeju 695-794, Korea, <sup>4</sup>Jeju Equine Research Institute, 383, Sallokseo-ro, Aewol-eup, Jeju 695-916, Korea, <sup>5</sup>Faculty of Animal Biotechnology, Jeju National University, 102 Jejudaehakno, Jeju 690-756, Korea

### ABSTRACT

This study was carried out to define the “Wolla” coat color using 376 Jeju registered horses (white patched 142, solid coat color 234). Three major factors related to the white patches i.e ECA3-inversion for Tobiano, *EDNRB* 2 bp nucleotide substitution for frame Overo, and the *KIT* intron 16 single nucleotide polymorphism (SNP) for Sabino types of coat color were analyzed. It was found that out of 142 Jeju horses with white patches that have the genotype for ECA3-inversion (*To*) 140 horses were *+To* heterozygous and 2 horses were *To/To* homozygous all Jeju horses with white patches had ECA3-inversion allele. However, there was no frame Overo or Sabino allele type in *EDNRB* and *KIT* intron 16 SNP in Jeju horses with white patches. As for 234 Jeju horses with a solid coat color, there was no ECA3-inversion allele related to the white patches. Thus, it could be considered that Wolla coat color with white patches in Jeju horses might have come from the Tobiano line in the genetic classification by coat color.

(Key words : Jeju horse, Coat color, Tobiano, Frame Overo, Sabino)

### 서 론

제주마는 국내 유일의 재래마필자원으로 순수혈통 보존 및 멸종 방지를 위해 1986년부터 천연기념물 제 347호로 지정되어 보존되고 있다. 또한 2000년부터는 제주마의 혈통관리를 위해 등록사업이 진행되고 있다.

Lee (1971)는 제주마의 모색 명칭을 12개 대분류와 39개 세분류로 정의 하였다. 이 중 월라(Wolla) 모색은 박모(駮毛, 얼룩말)로써 원래 모색이 있음에도 불구하고 백박(白駮, 흰 얼룩말 무늬)이 있는 것으로 서양의 Piebald(흑색과 백색이 혼재된 얼룩기)와 Skewbald(흑색 이외의 다른 색에 백색이 혼재된 얼룩기)에 일치한다고 보고하였다. 또한 월라를 가라월라, 유마월라, 적다월라 3가지로 분류하였다.

Thiruvankadan 등 (2008)은 말에서 백색을 기본으로 하는 모색에는 백색 털이 혼재된 모색(Grey, Roan, White)과 말의 몸통에 백반이 있는 형태로 구분하였다. 백반형태는 말의 몸통에 불규칙적

이고 비대칭적인 백반이 나타나는 Tobiano와 Overo가 있으며, 반점이 대칭 형태로 나타나는 Leopard 또는 Appaloosa로 구분하였다. Tobiano의 일반적인 형태는 네 다리의 구절(球節) 아래 부분이 백색이고 보통 귀에서 꼬리 사이의 등선을 가로지르는 백반을 갖는다. Standardbred, Thoroughbred, Arabian, Quarter Horses는 Tobiano 모색이 없으며, Paint, Pinto 등에서는 이런 Tobiano의 모색을 갖는다(Thiruvankadan 등, 2008). Overo는 frame Overo, sabino, splashed white 3가지로 분류되며, Overo 모색의 백반 특징은 툽니 모양의 백반이 복부에서 시작되며, 다리의 백색은 사지백, 삼지백 등 다양하게 나타난다(Metallinos 등, 1998).

Tobiano와 Overo 같은 백반 모색뿐만 아니라 백마(white coat color pattern)와 같은 모색의 원인을 찾기 위한 분자유전학적 연구들이 수행되었다(Haase 등, 2007; Holl 등, 2010). Bowling (1987)은 *albumin-b* (*ALB-B*)와 *vitamin D binding factor-S* (*Fc-S*)가 Tobiano와 연관되었다고 보고하였으며, Brooks 등 (2002)은 *KIT* 유전자의 13번 intron의 염기치환이 Tobiano와 강

\* These authors contribute equally to this work

\* Corresponding author : Young-Hoon Yang, Faculty of Animal Biotechnology, Jeju National University, 102 Jejudaehakno, Jeju 690-756, Korea. Tel: 82-64-754-3338, Fax: 82-64-725-2403, E-mail: yhyang@jejunu.ac.kr

하게 연관되었다고 보고하였다. 최근에 Brooks 등 (2007)은 Tobiano 형태를 갖는 말에서 3번 염색체의 inversion을 확인하였으며, Hasse 등 (2008)은 ECA3-inversion 분석을 통해 German horse breeds에서 Tobiano와 연관이 있는 것을 확인하였다. Metallinos 등 (1998)은 *endothelin-B receptor (EDNRB)* 유전자의 missense mutation이 frame Overo의 Lethal White Foal Syndrome과 연관이 있는 것으로 보고하였다. Brooks와 Bailey (2005)는 *KIT* 유전자의 exon skipping이 말에서 sabino 모색의 원인으로 보고하였다.

제주마의 다양한 모색 중 기본모색(Kim 등, 2011)과 총마(Gray)(Han 등, 2009)에 대한 연구 보고는 있었으나 율라 모색에 대한 분자수준의 연구는 보고된 바 없다. 본 연구는 말의 모색유전학적 분류를 통해 제주마의 율라 모색 백반형태(Tobiano, frame Overo, sabino)에 대해 정의하고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시동물 및 DNA 추출

연구시료는 제주마등록관리규정에 의해 등록 관리되고 있는 제주마 1,465두에 대한 DNA 시료를 제주특별자치도 축산진흥원으로 부터 분양 받아 이용하였다. 율라 모색(몸통과 사지에 백반)은 제주마 1,465두 중 율라 모색이 확인된 142두 (0.096)를 이용하였으며, 비율라(solid) 모색은 234두를 분석에 이용하였다. DNA 용액은 NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA)로 흡광도를 측정 후 100 ng/μl로 희석하여 PCR 증폭을 위한 주형으로 이용하였다.

### 2. ECA3-inversion 유전자형 분석

ECA3-inversion 분석을 위해 Brooks 등 (2007)이 보고한 방법을 변형하여 분석하였다. 말의 3번 chromosome의 inversion을 확

인하기 위해 Table 1의 3종의 primer를 혼합하여 분석하였다. 유전자 절편의 증폭을 위한 PCR 반응은 1×reaction buffer, 12 mM dNTP, ECA3F는 15 pmol, ECA3xR과 ECA3toR은 각각 7.5 pmol, 1.5 units *i-Taq* DNA polymerase (iNtRON, Korea)와 25 ng genomic DNA를 혼합하여 15 μl volume으로 혼합하였다. PCR 반응조건은 DNA Engine Tetrad 2(Bio-Rad, USA)를 이용하여 95°C 3분 초기변성 후, 94°C 45초, annealing 68°C 45초, 72°C 45초로 구성된 연쇄반응을 30회 반복한 후 72°C에서 5분간 최종 신장하였다. PCR 증폭 산물은 QIAxcel Advanced 자동전기영동 장치 (Qiagen, Germany)를 이용하여 유전자형을 확인하였다.

### 3. *EDNRB*, *KIT* 유전자형 분석

*EDNRB* 유전자 exon 1의 2bp 염기치환(TC/AG)을 분석하기 위해 Metallinos 등 (1998)이 보고한 방법을 변형하여 이용하였다. *KIT* intron 16의 1037bp 위치의 T/A SNP 분석은 Brooks와 Bailey (2007)의 방법을 변형하여 분석하였다. *EDNRB*와 *KIT* 유전자의 증폭을 위해 PyroMark Assay Design 2.0 (Qiagen, Germany) 프로그램을 이용하여 PCR용 primer와 sequencing용 primer들을 고안하였다(Table 1). 유전자 절편의 증폭을 위한 PCR 반응은 1×reaction buffer, 20 mM dNTP, 각각 15 pmol primer (Table 1), 1 units *i-Taq* DNA polymerase (iNtRON, Korea)와 25 ng genomic DNA를 혼합하여 25 μl volume으로 혼합하였다. PCR 반응조건은 DNA Engine Tetrad 2(Bio-Rad, USA)를 이용하여 94°C 5분 초기변성 후, 94°C 30초, annealing 30초 (*EDNRB*와 *KIT* intron 16 각각 56°C), 72°C 30초로 구성된 연쇄반응을 34회 반복한 후 72°C에서 5분간 최종 신장하였다. PCR 증폭 산물은 agarose gel 상에서 전기영동법으로 확인하였으며, *EDNRB*와 *KIT* 유전자의 유전자형 결정은 PyroMark Q96 ID (Qiagen, Germany)를 이용하였다.

Table 1. Primer sequences used in this study

Target	Sequence(5'→3')
ECA3-inversion	ECA3F : TGATAGATCAGTGTAGACGTAGTGTGACAGAGAC
	ECA3toR : TTCACCACAGAGTATCCAATTATGCTTTTCACATAATGC
	ECA3xR : AACAGCTACTCCACTCTAGCATAGGTTTC
<i>EDNRB</i> missense mutation	Forward : F1 *AGTAGTGTCTCCTGCCTAGTGTTCG
	Reverse : R1 GATATTAGGCCGTTCCGC
	pyrosequencing : S1 TCAGCAGTGTGGAGTTT
<i>KIT</i> intron 16 SNP	Forward : F1 *TTAAATGGCTTTCTTTTCTCCC
	Reverse : R1 GGATATTTCTGGCTGCCAAGTC
	pyrosequencing : S1 CTATGAATACACTATTAGGA

\* : 5'-end biotinylated.

결과 및 고찰

말의 모색유전학에서 White patch는 백반이 불규칙적이고 비대칭적으로 나타나는 형태인 Tobiano와 Overo 모색과 백색 반점이 대칭적인 형태로 나타나는 Leopard 또는 Appaloosa 형태로 구분된다(Thiruvnkadan 등, 2008). Tobiano는 일반적으로 사지가 백색이며 귀부터 꼬리까지 등선을 따라 백색반점이 가로지르는 형태로 나타나며, 백반의 형태는 타원형 또는 원형인 둥근 형태로 뚜렷이 구분된다. 백반의 범위는 몸 표면의 20%~80%로 다양하게 나타난다(Haase 등, 2008; Thiruvnkadan 등, 2008). Overo는 다리의 백색이 사지백, 삼지백 등 다양하게 나타나며, 몸의 백반은 톱니 모양과 유사한 형태로 주로 복부에서부터 시작된다. sabino는 얼굴과 사지로부터 시작하여 백반이 나타나나 Tobiano나 Overo처럼 백반의 형태는 명확히 구분되지 않는다. 제주마 월라 모색은 일반적으로 사지는 백색이며 백반이 등선을 가로지르는 형태에서부터 (Fig. 1 A, B, C) 사지는 백색이나 백반이 몸통에 극히 일부분만 나타나는 형태로 다양하게 나타났다(Fig. 1 D). 본 연구에서 조사된 142 두의 제주마 월라 모색의 형태는 표현형적으로는 일반적인 Tobiano 모색 형태와 유사한 것으로 확인 되었다.

말에서 3번 염색체의 inversion을 확인하기 위해 Brooks 등 (2007)이 보고한 방법을 이용하여 유전자형을 결정하였다. Brooks 등 (2007)은 Tobiano 마필 13품종 121두를 분석한 결과 모든 개체에서 ECA3-inversion이 나타나는 것을 확인하였고, Hasse 등 (2008)은 Tobiano 204두와 solid 24두를 분석한 결과 Tobiano에서는 2두를 제외한 202두에서 ECA3-inversion이 나타났으며, solid 24두는 모두 ECA3-inversion이 없었다. 또한 ECA3-inversion이 나타나지 않은 2두는 Tobiano로 등록되어 있으나 등록이 부정확한 것으로 추정하였다.

분석에 이용된 제주마 집단의 ECA3-inversion에 대해 정상(+)과 inversion(*To*)으로 구분하여 유전자형의 분포 및 모색 연관을 조사하였다. 제주마 월라 142두 중 140두에서는 +/*To* 이형접합으로 나타났고, 2두는 *To/To* 동형접합으로 나타나 제주마 월라 모두에서 ECA3-inversion을 확인할 수 있었다. 그러나 비월라(solid) 모색인 234두에서는 모두 +/+ 동형접합으로 나타났다(Table 2). 제주마의 월라 모색은 Brooks 등(2007)과 Hasse 등(2008)의 결과와 같이 월라 모색 개체에서 모두 ECA3-inversion이 나타났으며, Tobiano 유전자형인 *To/To* 동형접합과 +/*To* 이형접합 간에 모색표현형에는 차이를 확인할 수 없었다(Fig. 1).

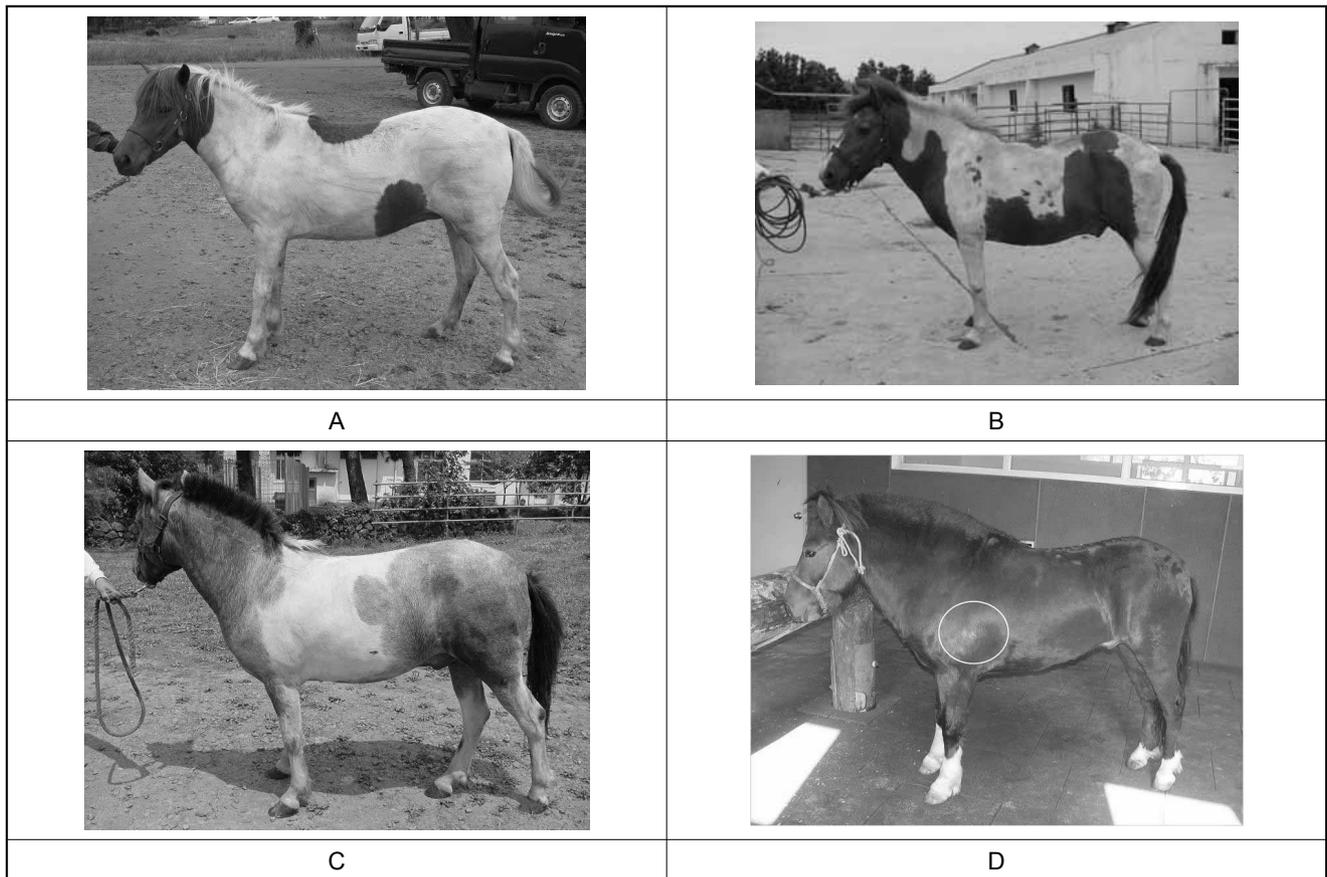


Fig. 1. Phenotypes of Wolla coat color in Jeju horses. Various patterns in shape and proportion of white patches on the trunk. Genotypes of ECA3-inversion are *To/To* homozygous in B and +/*To* heterozygous in A, C, and D. White patch is in white circle (D).

Table 2. Genotypes of the ECA3-inversion, the *EDNRB* and the *KIT* intron 16 in Jeju horse Wolla and Solid

Genetic variation	Genotype	Wolla No. of horse (frequency)	Solid No. of horse (frequency)
ECA3-inversion	+/+	—	234 (1.000)
	+/ <i>To</i>	140 (0.986)	—
	<i>To/To</i>	2 (0.013)	—
<i>EDNRB</i> 2-bp missense mutation	+/+	142 (1.000)	234 (1.000)
	+/ <i>O</i>	—	—
	<i>O/O</i>	—	—
<i>KIT</i> intron 16 SNP	<i>T/T</i>	142 (1.000)	234 (1.000)
	<i>A/T</i>	—	—
	<i>A/A</i>	—	—

ECA3-inversion이 멘델의 유전양상에 의해 후대에 전달되는지를 확인하기 위해 ECA3-inversion +/*To* 유전자형을 갖는 수말(월라) 1두와 +/+ 유전자형을 갖는 암말(비월라) 3두를 교배하여 생산된 자마 6두에 대해 분석한 결과, ECA3-inversion (*To*) 인자를 전달 받은 자마 4두에서 월라(+/*To*) 모색이 나타나 멘델의 유전양상을 따르는 것으로 확인 되었다 (data not shown).

Metallinos 등 (1998)은 frame Overo에서 *EDNRB* 유전자 내 2bp 염기치환 (*TC/AG*)에 의한 missense mutation (Isoleucine118 Lysine)이 Lethal White Foal Syndrome과의 관계를 분석하였다. 분석에 이용된 frame Overo 개체들은 모두 +/*O* 이형접합 형태로 나타났다. *EDNRB* 유전자 내 2bp 염기치환 분석에 이용된 제주마 월라 142두에서 +/+ 유전자형만이 나타났다. 비월라 (solid) 모색 234두에서도 모두 정상인 +/+ 동형접합으로 나타났다 (Table 2).

Brooks와 Bailey (2005)는 *KIT* 유전자 intron 16번 내의 *T/A* 염기치환이 exon 17번의 skipping과 관련이 있으며, *T/A* 염기치환을 갖는 말은 sabino 표현형이 나타나는 것으로 보고하였다. *KIT* intron 16번 내의 *T/A* SNP 분석에 이용된 제주마 월라 142두에서 *T/T* 동형접합만 나타났으며, 비월라 234두에서도 모두 *T/T* 동형접합만이 확인 되었다.

본 연구결과 제주마 월라모색은 ECA3-inversion (*To*/-)을 확인할 수 있었으며, *EDNRB* 및 *KIT* intron 16 SNP는 모두 wild type 형태로 확인할 수 있었다. 따라서 제주마 월라모색은 모색유전학적 분류에서 Tobiano 형태에 속하는 것으로 사료된다.

## 요 약

본 연구는 제주마 월라(Wolla) 모색의 백반형태(Tobiano, frame Overo, sabino)에 대해 유전학적 특성을 구명하고자 수행하였다. 제주마 376두(월라 142두, 비월라 234두)에 대해 Tobiano 모색 확인을 위해 ECA3-inversion을 분석하였으며, frame Overo 모색은 *EDNRB* 2-bp 염기치환 상태를 확인하였고, sabino 모색 인자형 확인은 *KIT* intron 16 SNP를 분석하였다. 제주마 월라 모색 개체에서 ECA3-inversion 유전자형이 +/*To* 이형접합 형태가 140두(0.986), *To/To* 동형접합 형태 2두(0.013)가 나타나 제주마 월라 모두에서 ECA3-inversion이 확인되었다. 반면에 *EDNRB*와 *KIT* intron 16 SNP에서는 frame Overo나 sabino 인자는 나타나지 않았다. 제주마 비월라에서는 ECA3-inversion, *EDNRB* 그리고 *KIT* intron 16 SNP에서 백반형태와 관련된 인자는 나타나지 않았다. 따라서, 본 연구 결과 제주마 월라(Wolla) 모색은 모색유전학적 분류에서 Tobiano 모색 유형에 속하는 것으로 사료된다. (주제어: 제주마, 모색, Tobiano, frame Overo, sabino, 유전자형)

## 사 사

본 연구에 이용된 제주마 DNA 시료는 제주특별자치도 축산진흥원의 협조로 확보되었으며, 시료 확보를 위해 도움을 주신 제주특별자치도 축산진흥원장님께 깊은 감사를 드립니다.

## 인 용 문 헌

- Bowling, A. T. 1987. Equine linkage group II : phase conservation of *To* with *AIB* and *GcS*. J. Hered. 78:248-250.
- Brooks, S. A. and Bailey, E. 2005. Exon skipping in the *KIT* gene causes a sabino spotting pattern in horses. Mamm. Genome 16:893-902.
- Brooks, S. A., Terry, R. B. and Bailey, E. 2002. A PCR-RFLP for *KIT* association with Tobiano spotting pattern in horses. Anim. Genet. 33:301-303.
- Brooks, S. A., Lear, T. L., Adelson, D. L. and Bailey, E. 2007. A chromosome inversion near the *KIT* gene and the Tobiano spotting pattern in horses. Cytogenet. Genome Res. 119:225-30.
- Han, S. H., Lee, C. E., Kim, N. Y., Ko, M. S., Jeong, H. Y. and Lee, S. S. 2009. Genetic polymorphisms of candidate loci and inheritance patterns of gray coat color in Jeju Horses. J. Life Sci. 19:793-798.
- Haase, B., Jude, R., Brooks, S. A. and Leeb, T. 2008. An equine chromosome 3 inversion is associated with the Tobiano spotting pattern in German horse breeds. Anim. Genet. 39:306-309.
- Hasse, B., Brooks, S. A., Schlumbaum, A., Azor, P. J., Bailey, E., Alaeddine, F., Mevissen, M., Burger, D., Poncet, P. A., Rieder,

- S. and Leeb, T. 2007. Allelic Heterogeneity at the Equine KIT Locus in Dominant White (*W*) Horses. *PLoS Genet.* 3:2101-2108.
- Holl, H., Brooks, S. and Bailey, E. 2010. *De novo* mutation of *KIT* discovered as a result of a non-hereditary white coat colour pattern. *Anim. Genet.* 41:196-198.
- Kim, N. Y., Han, S. H., Lee, S. S., Lee, C. E., Park, N. G., Ko, M. S. and Yang, Y. H. 2011. Relationship between *MC1R* and *ASIP* genotypes and basic coat colors in Jeju Horses. *Korean. J. Anim. Sci. & Technol. (Kor.)* 53:107-111.
- Lee, K. M. 1971. Studies on the old name and distribution of coat color in the Cheju Horse. *KONKUK Univ.* 12:893-909.
- Metallinos, D. L., Bowling, A. T. and Rine, J. 1998. A missense mutation in the endothelin-B receptor gene is associated with Lethal White Foal Syndrome: an equine version of Hirschsprung Disease. *Mamm. Genome* 9:426-431.
- Thiruvankadan, A. K. Kandasamy, N. and Panneerselvam. S. 2008. Coat colour inheritance in horses. *Livest. Sci.* 117:109-129.

(Received Aug. 14, 2012; Revised Oct. 22, 2012; Accepted Oct. 22, 2012)