

## *GHSR* 유전자 내 유전변이의 탐색과 한국재래계의 성장 및 산란 특성에 미치는 연관성 분석

최소영<sup>1</sup> · 홍민욱<sup>1</sup> · 양승이<sup>1</sup> · 김종대<sup>2</sup> · 정동기<sup>3</sup> · 홍영호<sup>4</sup> · 이성진<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 동물생명과학대학, <sup>2</sup>농촌진흥청 국립축산과학원, <sup>3</sup>제주대학교 생명공학부, <sup>4</sup>중앙대학교 동물생명공학과

### Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) Discovery in *GHSR* Gene and Their Association Analysis with Economic Traits in Korean Native Chickens

So-Young Choi<sup>1</sup>, Min-Wook Hong<sup>1</sup>, Song-Yi Yang<sup>1</sup>, Chong-Dae Kim<sup>2</sup>,  
Dong Kee Jeong<sup>3</sup>, Yeong Ho Hong<sup>4</sup> and Sung-Jin Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Animal Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

<sup>2</sup>Poultry Science Division, National Institute of Animal Science, RDA, Cheonan 31000, Korea

<sup>3</sup>Department of Animal Biotechnology, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

<sup>4</sup>Department of Animal Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong 17546, Korea

**ABSTRACT** Recently, it was reported that certain polymorphisms in the growth hormone secretagogue receptor gene (*GHSR*) are associated with the growth of chickens. However, the correlation between *GHSR* polymorphisms and economic traits has not been investigated in Korean native chickens (KNCs). Therefore, the objective of this study was to confirm the suitability of the *GHSR* gene as a candidate for genomic selection and identify a genetic marker for KNCs. A total of 220 KNCs from six breeds raised at the National Institute of Animal Science were genotyped for the c.739+726 SNP in the *GHSR* gene using polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), and the sequence for a subset of 30 birds was analyzed using direct sequencing. The association between the SNP genotypes and the economic traits of the KNCs was analyzed using the statistical package for the social science (SPSS) software program. The association analysis between the c.739+726T>C SNP and economic traits revealed that the SNP was significantly associated with body weight at 150 and 270 days (BW150 and BW270, respectively) in all KNCs ( $p<0.01$ ), BW150 in KNC (Gary) ( $p<0.05$ ), and egg production number in KNC (White,  $p<0.05$ ). In addition, the SNPs discovered using direct sequencing (513A>G, 517A>T) had a significant effect on the body weight and egg production traits ( $p<0.05$ ). In conclusion, these results might be useful as a basis for studies on the improvement of KNC breeds. Furthermore, these results suggest that the SNPs (c.739+726T>C, 513A>G, and 517A>T) located in the *GHSR* gene could be useful molecular genetic markers for KNCs.

(Key words : *GHSR*, Korean native chickens, SNP, economic traits)

## 서론

1970년도 후반에 이르러 농촌진흥청 산하 국립축산과학원은 재래계의 보존과 유전자원 확보를 위한 여러 가지 사업을 진행하였고, 일부 농가에서 소규모로 사육되던 한국재래계를 표현형과 모색을 기준으로 확보하였으며, 이러한 노력에 의해 한국재래계의 사육은 증가하는 추세를 보였다 (Kong et al., 2006; Choi et al., 2016).

한국재래계는 오랜 기간 외래 유전자의 도입이 없이 그 목적성을 분명히 하지 않은 채 소규모 집단으로 사육되어 왔기 때문에 대형 기업에 의해 산육 또는 산란을 위하여 개량되어온 외래계에 비해 낮은 성장률과 산란율을 보인다. 이를 극복하기 위한 방안으로 재래계의 고유 유전자원의 보존과 개량을 위한 기술의 필요성이 대두되고 있으며, 이를 통해 기존의 맛과 육질 등 재래계의 특징을 유지하면서 낮은 성장률과 산란율을 개선하는 것이 궁극적으로 재래계의 시

\* To whom correspondence should be addressed : sjlee@kangwon.ac.kr

장경쟁력과 가치를 높이는 초석이 될 수 있을 것이다(Zhou et al., 2005; Choi et al., 2015).

Kim et al.(2013)은 외래육계를 대상으로 닭의 산육 및 산란형질과 연관성이 밝혀진 유전자 변이 43개를 보고하였다. 이러한 연구결과가 한국재래계에서 같은 영향력을 미치는지 비교하기 위해 재래계 집단 내에서 검증실험이 필요하다고 보여진다.

Growth hormone secretagogue receptor(*GHSR*)은 NPY/AgRP neuron의 presynaptic neuron에 위치한 Ghrelin 단백질과 성장호르몬 분비 촉진물질(*GHS*, Growth Hormone Secretagogue)이 결합하는 수용체이다. 이러한 *GHSR* 수용체를 암호화하는 *GHSR* 유전자는 소의 경우, 생시체중과 6개월령의 일당증체량과 연관되어 있다는 연구결과가 보고된 바 있으며(Zhang et al., 2009), 닭의 경우, 9번 염색체에 위치하여 Ghrelin(*GHLR*) 유전자, insulin-like growth factor 1 receptor(*IGF1R*) 등과 같이 가축의 성장형질을 조절하는 유전자 중 하나로 알려져 있다(Jin et al., 2014).

닭 *GHSR* 유전자는 닭의 성장형질과 연관된 후보 유전자로서 이에 대한 단일염기다형성(Single nucleotide polymorphism; SNP)과 유전자의 삽입-결실(Insertions and deletions; INDEL)을 비롯한 유전자 변이에 대한 많은 연구가 수행되었다. Nie et al.(2005)은 *GHSR* 유전자를 포함하는 총 12개의 후보 유전자를 Leghorn, White recessive rock, T aihe sikies, Xinghua 계군을 대상으로 분석하였으며, *GHSR* 유전자 부위에서 10개의 SNP과 1개의 INDEL을 보고하였다. Fang et al.(2007)은 Nie et al.(2005)이 보고한 *GHSR*의 8 bp INDEL(CTAACCTG)과 닭의 체중 및 도체성적과 연관성을 조사하여 보고하였다.

또한 Fang et al.(2010)은 빠른 성장이 특징인 White recessive rack(*WRR*)와 중국의 토착종이며, 성장이 더딘 Xinghua의 F<sub>2</sub> 교배종을 대상으로 Nie et al.(2005)이 보고한 *GHSR* 유전자 상의 5개의 SNP과 닭의 성장 및 도체성적과의 연관성을 연구하였다. 이를 통해 *GHSR* 유전자의 c.739+726T>C SNP(rs14678932)이 닭의 28일령, 90일령 체중 및 가슴근 중량(breast muscle weight)과 도체중(carcass weight), 내장을 제거한 체중(eviscerated weight), 넓적다리 중량(thigh weight)과의 연관성이 있다고 보고한 바 있다. 최근 연구에서는 Guangdong Wens Nanfang Poultry Breeding Co.(China)의 두 계통(N202, N301) 내에서 *GHSR* 유전자 상의 4개 SNP(rs16675844, rs14678932, rs13735309, rs14678937)이 각각 사료섭취와 사료효율, 49일과 70일령 체중과 연관성이 있는 것으로 보고한 바 있다(Jin et al., 2014).

한국재래계의 유전자 마커를 이용한 선발 육종은 시대의

흐름에 따라 필연적으로 필요하게 되나, 외래계를 대상으로 선행된 연구결과만을 가지고 선발 마커로 사용하는 데에는 한계가 있을 것으로 판단된다. 특히 SNP의 경우 중간 특이성을 가지므로, 한국재래계를 대상으로 유전자마커에 대한 검증실험이 필요하다고 사료된다. 따라서 본 논문은 선행논문(Fang et al., 2010)에서 외래계의 성장과 연관성이 입증된 *GHSR* 유전자의 후보유전자로서의 가능성을 한국재래계의 경제형질과 비교하여 확인하고 재래계 선발 육종에 적합한 유전자 마커를 탐색하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료

모색 및 형태학적인 분류방법을 통해 총 6계통(Ogol, Black, Gray, Red, White, Yellow)으로 분류된 국립축산과학원에서 사육된 한국 재래계 암컷을 공시재료로 이용하였다. 재래계 6계통의 각각 Ogol 34수, Black 40수, Gray 30수, Red 40수, White 37수, Yellow 39수, 총 220수의 익정맥으로부터 혈액을 채취하여 c.739+726T>C SNP의 유전자형 분석의 공시재료로 사용하였으며, 이 중 30수를 선발하여 염기서열을 분석하였다.

### 2. 조사항목 및 조사방법

#### 1) 조사항목

연관성 분석을 위한 닭의 경제형질로 개체별 150일령 체중(BW150)과 270일령 체중(BW270), 270일령 산란수(EPN)가 측정되었다.

#### 2) DNA 추출

닭의 적혈구에서 genomic DNA를 추출하기 위한 전처리 과정으로 1X RBC lysis buffer(SIGMA Lifescience, USA) 90 µL, 개체의 적혈구 시료 10 µL, 1X SSC 용액을 100 µL로 조성하여 실온에서 10분간 보관하였다. 이후 G-spin™ total DNA extraction kit(iNtRON Biotechnology, Korea)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출한 genomic DNA는 Nano-Drop™ 2000 분광감도계(Thermo SCIENTIFIC, USA)를 이용하여 DNA농도 및 순도를 측정 후, PCR 및 sequencing 주형으로 이용하였다.

#### 3) c.739+726T>C SNP의 유전자형 분석

c.739+726T>C SNP의 분석을 위해서 Fang et al.(2010)에

의해 보고된 primer 한 쌍의 존재를 NCBI GenBank(Accession #NC\_006096.3)에서 확인한 후 실험에 이용하였다. 실험에 이용된 primer 정보는 Table 1에 제시하였다. PCR 반응을 위한 반응액의 조성은 genomic DNA 50ng을 포함하는 i-star Tag™ DNA polymerase(iNtRoN biotech., Korea) 반응조건을 참고하였다. PCR 반응은 Veriti® 96-Well Thermal Cycler(Applied Biosystem®, USA)를 이용하여 예비가열을 94°C에서 3분간 수행한 후, 94°C 45초, 58.0°C 45초, 72°C 1분의 반응과정을 35회 반복한 다음, 마지막 72°C에서 10분을 주어 PCR 반응을 종료하였다. 증폭이 끝난 PCR 반응산물은 EtBr이 첨가된 2.0% 아가로오스겔에서 전기영동 후 UV상에서 증폭반응 여부를 확인하였다.

이후 증폭산물을 *Hin6I* 제한효소(Fermentas Life Sciences Inc, USA)에 반응시키기 위한 반응액 조성으로는 10 µL의 PCR 증폭산물과 *Hin6I* 제한효소 10U, 10× FastDigest buffer 2 µL, nuclease-free water 17 µL를 정량하여 최종용량이 30 µL가 되도록 하였으며, 이 반응액을 *Hin6I* 제한효소의 활성 온도인 37°C에서 5분간 보관하였다. 제한효소 반응 이후에 DNA 절편의 양상을 확인하기 위해서 EtBr이 첨가된 2% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 UV상에서 유전자형을 판단하였다.

#### 4) 염기서열 분석

일부 재래계통에서 체중과의 유의성을 보인 c.739+726T>C SNP을 포함하는 *GHSR* 유전자의 1번 인트론 부위의 염기서열 분석을 위한 primer 조합을 Table 1에 표기하였다. 한 쌍의 Primer는 *GHSR* 유전자의 815 bp를 증폭할 수 있게 고안되었으며, 염기서열 분석을 위한 PCR 과정은 BIO-RAD사의 DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler를 사용하였다. 온도조건 및 반응시간은 94°C에서 5분간 예비가열 후에 DNA 변성온도 94°C에서 30초, 합성온도 62.0°C에서 30초, 신장온도 72°C에서 40초를 총 35회 반복하였고, 이후 72°C에서 7분을 주어 PCR 반응을 종료하였다. PCR 반응 시에 증폭에 사용되지 않은 nucleotide와 primer를 제거하고, 순도

높은 증폭산물을 얻기 위하여 PCR 반응 결과물을 Millipore plate MSNU030(Millipore SAS, Molsheim, France)를 이용하여 정제하였다. BigDye terminator v3.1 sequencing kit(Applied Biosystems)와 3730xl automated sequencer(Applied Biosystems)를 사용하여 정제된 증폭산물에 대한 염기서열 분석을 수행하였다.

#### 3. 통계분석

*GHSR* 유전자 c.739+726T>C SNP을 포함한 염기서열 분석을 통해서 밝혀진 11개의 유전자변이와 한국재래계의 체중 및 산란수와의 연관성 분석을 위하여 SPSS version 22.0 프로그램을 이용하여 일원 분산분석(one-way ANOVA)을 수행하였으며, 통계적 유의성은  $p < 0.05$  수준에서 판정하였다.

## 결과 및 고찰

#### 1. c.739+726 SNP의 RFLP 패턴 확인

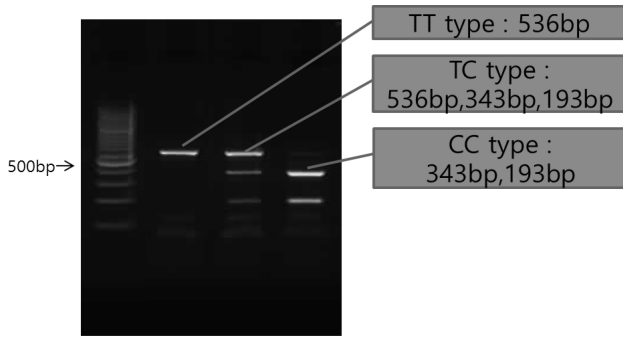
PCR 증폭산물에 *Hin6I* 제한효소를 처리하여 SNP의 유전자형 별 RFLP 패턴의 차이를 확인하였다. TT유전자형의 경우, 536 bp의 1개의 밴드가 확인되었으며, CC 유전자형의 경우 343 bp, 193 bp의 크기가 다른 2개의 밴드로, hetero 타입인 TC 유전자형의 경우 536 bp, 343 bp, 193 bp의 3개 밴드로 나타나, 유전자형에 따른 전기영동 결과의 차이를 확인할 수 있었다(Fig. 1).

#### 2. c.739+726 SNP의 유전자형 분석결과

한국재래계 220수의 c.739+726T>C SNP의 유전자형을 분석한 결과, T 대립 유전자의 빈도는 0.80, C 대립유전자의 빈도는 0.20이며, 각각의 유전자형의 빈도는 0.72(TT), 0.15(TC), 0.13(CC)으로 확인되었다. 대부분의 재래계통에서 TT 유전자형의 빈도가 90% 이상으로 높게 나타났으며 오골계와 KNC(Gray), KNC(White)에서는 heterozygosity와 CC유전자형의 빈도가 다른 계통에 비해 상대적으로 높게 나타났다. 각각의 계통별 대립유전자의 빈도 및 유전자형 빈도를 Table 2

**Table 1.** Primer sequences and fragment size for genotyping of *GHSR* gene

| Primer name | Sequence                    | Size (bp) | Annealing Tm (°C) | Genotyping method |
|-------------|-----------------------------|-----------|-------------------|-------------------|
| GHSR_F      | 5'-CCCACAAAGTTAGCTGCAGAC-3' | 536       | 58                | PCR-RFLP          |
| GHSR_R      | 5'-CACCTCTCCATCTGGCTCATT-3' |           |                   |                   |
| GHSR_S_F    | 5'-CTAAGCAAGCAGGGTGTGAT-3'  | 815       | 62                | Sequencing        |
| GHSR_S_R    | 5'-TCTGCATGTTTAACCGTAAGG-3' |           |                   |                   |



**Fig. 1.** Genotype profile detected by PCR-RFLP method for the detection of a c.739+726C>T SNP of the *GHSR* gene in Korean native chickens.

**Table 2.** The allele and genotype frequencies about c.739+726T>C SNP within *GHSR* gene in KNCs (n=220) and each KNC breeds

| Breed  | n   | Allele frequency |      | Genotype frequency |      |      |
|--------|-----|------------------|------|--------------------|------|------|
|        |     | T                | C    | TT                 | CT   | CC   |
| Ogol   | 34  | 0.53             | 0.47 | 0.38               | 0.29 | 0.32 |
| Black  | 40  | 0.99             | 0.01 | 0.98               | 0.03 | 0.00 |
| Gray   | 30  | 0.33             | 0.67 | 0.17               | 0.33 | 0.50 |
| White  | 37  | 0.86             | 0.14 | 0.78               | 0.16 | 0.05 |
| Red    | 40  | 0.95             | 0.05 | 0.90               | 0.10 | 0.00 |
| Yellow | 39  | 0.96             | 0.04 | 0.92               | 0.08 | 0.00 |
| Total  | 220 | 0.80             | 0.20 | 0.72               | 0.15 | 0.13 |

에 제시하였다.

Fang et al.(2010)이 White recessive rock(WRR)과 Xinghua의 교배종을 대상으로 동일 유전자 변이의 산육에 대한 유전적 효과를 분석한 논문에서 제시된 세 유전자형의 빈도는 0.67(TT), 0.32(TC), 0.01(CC)로 TT 유전자형 빈도가 우세하다는 점에서 본 연구결과와 유사하나, 재래계의 유전자 분포가 선행연구 결과보다 고르게 나타났다.

### 3. c.739+726 SNP의 유전자형과 경제형질과의 연관성 분석

전체 한국재래계 집단(n=220)에서 각각 150일령과 270일령에 측정된 체중이 c.739+726T>C SNP의 유전자형에 따라 통계적으로 유의미한 차이( $p<0.001$ )가 있음을 확인하였으며, TT 유전자형이 CC 유전자형에 비해 산육성적이 높은 것을 확인하였다. 반면, 계통에 따라서 유전자형과 체중 및 산란성적과의 연관성에 차이가 나타났다(Table 3).

모색 및 표현형에 의해 구분된 6개의 계통별 통계분석 결과에서는 KNC(Gray) 집단(n=30) 내에서 TC 유전자형 집단의 150일령, 270일령 체중 평균이 다른 두 homozygosity(TT, CC)보다 높게 나타났으며, CC 유전자형 그룹의 평균보다는 TT 유전자형 그룹의 평균이 높게 나타났고, 이러한 그룹간의 체중의 평균의 차이는 유의적이었다( $p<0.05$ ). 하지만 다른 5계통의 재래계군 내에서는 c.739+729T>C SNP과 닭의 체중과의 연관성을 확인할 수 없었다(Table 4).

반면, 산란성적과의 *GHSR* SNP의 유전자형 간의 연관성 분석결과는 전체 재래계 집단 내에서의 유의적인 차이는 발견할 수 없었으나, KNC(White) 계통에서 유전자형과 닭의 산란수와의 연관성을 확인할 수 있었다( $p<0.05$ ) (Table 4).

전체집단 내에서 T 유전자형의 성장에 미치는 효과는 Fang et al.(2010)에 의한 White recessive rock(WRR)과 Xinghua의 F<sub>2</sub> 교배종을 대상으로 수행된 선행연구 결과와 유사하게 T 유전자형이 C 유전자형보다 높은 성장특성을 보였지만 Fang et al.(2010)에 의한 결과에 비해 TT 유전자형과 CC 유전자형의 차이가 더 크게 나타났다. Jin et al.(2014)에 의한 중국 육종회사 유래의 2계통의 육계, N202와 N301의 교배종을 대상으로 한 동일 유전자 변이에 대한 실험결과는 계통별 분석에서의 KNC(Gray) 집단의 결과와 유사하게, CT 유전자형이 다른 두 homo 타입의 유전자형에 비해 증체량이 높다고 보고하였다. 이러한 실험 대상에 따라 선발유전자형에 차이가 나타나는 것은 SNP에 의한 효과가 중간에 차이를 가지는 점에 기인하는 것으로 사료된다. 다만 본 실험결과를 포함한 3개의 실험에서 공통적으로 CC 유전자형이 다른 두 유전자형보다 낮은 산육특성을 나타냈다. Oh et al.(2009)에 의한 한국재래계(적갈재래닭, 황갈재래닭, 흑색재래닭, 오골

**Table 3.** The results of association analysis between c. 739+726 T>C SNP genotypes within *GHSR* gene and economic traits in KNCs (n=220)

| Trait            | BW150 (g) <sup>1</sup><br>(AVG±S.E.) | BW270 (g) <sup>2</sup><br>(AVG±S.E.) | EPN (n) <sup>3</sup><br>(AVG±S.E.) |            |
|------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|------------|
| c.739+726<br>T>C | TT                                   | 1,852.78±22.30 <sup>a</sup>          | 2,167.22±29.76 <sup>a</sup>        | 91.82±1.43 |
|                  | CT                                   | 1,776.32±41.08 <sup>ab</sup>         | 2,043.97±57.70 <sup>ab</sup>       | 88.09±2.69 |
|                  | CC                                   | 1,645.89±33.89 <sup>b</sup>          | 1,846.25±37.88 <sup>b</sup>        | 86.46±2.31 |

<sup>1</sup> BW150 = Body weight at 150 days of age.

<sup>2</sup> BW270 = Body weight at 270 days of age.

<sup>3</sup> EPN = Egg production number at 270 days of age.

<sup>ab</sup> Different superscripts with in columns are significantly different ( $p<0.05$ ).

**Table 4.** The average and standard error of each genotypes of c.739+726T>C SNP within *GHSR* in six breeds of KNC

| Trait                     | Genotype | Breed           |                |                               |                           |                 |                 |       |  |     |  |        |  |
|---------------------------|----------|-----------------|----------------|-------------------------------|---------------------------|-----------------|-----------------|-------|--|-----|--|--------|--|
|                           |          | Ogol            |                | Black                         |                           | Gray            |                 | White |  | Red |  | Yellow |  |
| BW150 <sup>1</sup><br>(g) | TT       | 1,627.31± 82.22 | 2,042.18±40.34 | 1,701.00±119.84 <sup>ab</sup> | 1,619.83± 35.41           | 1,962.64± 41.17 | 1,827.92± 31.13 |       |  |     |  |        |  |
|                           | CT       | 1,719.00± 81.54 | 2,060.00± 0.00 | 1,836.50± 53.02 <sup>a</sup>  | 1,562.50± 38.44           | 2,002.50±131.03 | 1,798.33±164.17 |       |  |     |  |        |  |
|                           | CC       | 1,747.27± 52.42 | -              | 1,613.33± 32.33 <sup>b</sup>  | 1,332.50±102.50           | -               | -               |       |  |     |  |        |  |
| BW270 <sup>2</sup><br>(g) | TT       | 1,894.62± 94.95 | 2,320.00±49.77 | 1,886.00±155.20 <sup>ab</sup> | 1,781.72± 46.86           | 2,380.42± 55.38 | 2,236.53± 43.40 |       |  |     |  |        |  |
|                           | CT       | 2,057.00±100.27 | 2,340.00± 0.00 | 2,023.00± 64.47 <sup>a</sup>  | 1,685.83± 71.12           | 2,480.00±203.82 | 2,106.67±168.43 |       |  |     |  |        |  |
|                           | CC       | 1,986.36± 54.87 | -              | 1,779.33± 39.27 <sup>b</sup>  | 1,577.50± 32.50           | -               | -               |       |  |     |  |        |  |
| EPN <sup>3</sup><br>(n)   | TT       | 96.46± 4.85     | 91.64± 2.90    | 82.40± 2.01                   | 93.48± 2.81 <sup>a</sup>  | 86.39± 2.56     | 95.75± 3.72     |       |  |     |  |        |  |
|                           | CT       | 90.00± 3.75     | 67.00± 0.00    | 86.10± 4.41                   | 73.83± 7.01 <sup>b</sup>  | 102.25± 4.13    | 105.00± 1.15    |       |  |     |  |        |  |
|                           | CC       | 89.55± 4.43     | -              | 84.47± 2.85                   | 84.50± 2.50 <sup>ab</sup> | -               | -               |       |  |     |  |        |  |

<sup>1</sup> BW150 = Body weight at 150 days of age, <sup>2</sup> BW270 = Body weight at 270 days of age, <sup>3</sup> EPN = Egg production number at 270 days of age.  
<sup>ab</sup> Different superscripts with in columns are significantly different ( $p<0.05$ ).

계)와 외래계(백색레그혼, 로드아일랜드레드, 코니쉬)간의 유전적 거리를 확인한 연구결과에 따르면, 한국재래계통과 외래계통은 서로 다른 그룹으로 구분되며 재래계통 내에서도 유전적 거리의 차가 다르게 나타났다. 재래계통 중에서도 적갈색, 황갈색 재래계 간의 유전적 특성이 가장 유사하고, 유전적 거리가 가장 가까웠으며, 흑색재래계는 다른 두 계통과 하나의 그룹 내 존재하지만, 상대적으로 유전적 차이를 보였다. 오골계는 재래계군 중에서 다른 계통들과 가장 먼 유전적 거리를 가지는 것으로 확인되었다. 계통에 따라 유전자형 빈도 및 경제형질과의 연관성 분석에 차이가 나타난 본 논문의 연구결과 또한 이러한 재래계통 내에 존재하는 유전적 차이에 기인한 것으로 사료된다.

#### 4. 염기서열분석 및 유전자변이 분석 결과

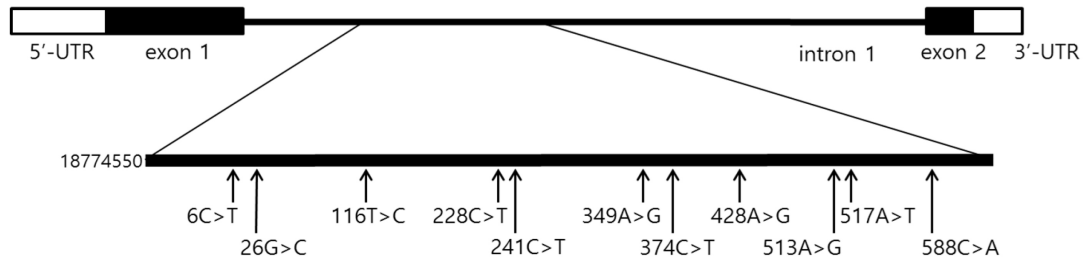
*GHSR* 유전자의 c. 739\_726T>C SNP의 유전자형 분석 및 연관성분석 결과는 해당 마커의 한국재래계를 대상으로 한 유전자 마커로서의 활용 가능성을 제시하였을 뿐만 아니라, *GHSR* 유전자의 닭의 산육관련 연관성을 보고함으로써 후보 유전자로서의 가능성을 시사하였다. 따라서 추가적인 실험으로 재래계 30수를 선발하여 생어 시퀀싱 방법을 이용하여 *GHSR* 유전자의 c.739+726T>C SNP의 전후 약 800 bp의 염기서열(Chr9: 19,387,877~19,388,691)을 밝혀내고, 해당 염기서열 내 SNP의 존재를 확인하여 한국재래계를 대상으로 활용 가능한 추가적인 마커를 확인하고자 하였다.

NCBI 데이터베이스(Acc. #NC\_006096.4)에 따르면 시퀀

싱을 수행한 해당 범위 내에 총 22개의 SNP이 기존에 보고된 바 있었으나, 한국재래계의 DNA 염기서열 내에서는 c.739+726T>C SNP를 포함한 11개의 SNP만이 확인되었다(Fig. 2 & Table 5).

재래계 30수를 대상으로 시퀀싱을 수행하였으며, 염기서열 분석에 실패한 한 개의 시료를 제외한 29개의 한국재래계의 염기서열을 통해 확인된 SNP과 닭의 경제형질과의 연관성 분석을 수행하였다. 후보 유전자 검증에 사용했던 c.739+726T>C(241C>T, rs14678932) SNP을 포함한 9개 SNP에서는 재래계의 산란 및 산육 형질과 각 SNP의 유전자형 간의 유의성이 나타나지는 않았다. 하지만 513A>G(rs14678935) SNP은 150일령 체중과 270일령 체중에서 GG 유전자형이 높은 체중치를 보이며, 통계적인 유의미함을( $p<0.05$ )를 보였으며, 517A>T(rs14678936) SNP은 TT 유전자형 그룹의 150일령 체중 측정값이 높게 나타났으며, 산란수에 있어서는 hetero 타입인 TA 유전자형의 성적이 다른 유전자형들에 비해 낮아 통계적 유의성을 보였다( $p<0.05$ ). 이 두 SNP간의 물리적 거리는 가깝지만, 513A>G, 517A>T SNP은 연관(linkage)되어 있지 않음이 확인되었다(Table 6).

이 두 SNP의 산육 및 산란과 관련된 효과에 대해서는 보다 많은 시료를 확보하여 추가실험을 진행함으로써 유전자 마커를 통한 선발의 정확성에 힘을 더할 수 있을 것이라 사료된다. 본 실험에서의 결과는 한국재래계 내에서의 고산육 특성 선발을 위한 후보유전자인 *GHSR* 유전자의 효과를 입증하고, 재래계의 *GHSR* 유전자 상에 식별가능한 유전자 변



**Fig. 2.** Single nucleotide polymorphisms within chicken *GHSR* gene detected by direct sequencing.

**Table 5.** The results of association analysis between SNPs (513A>G, 517A>T) detected by sequencing and economic traits in KNCs

|        | Genotype | n  | BW150                       | BW270                         | EPN                      |
|--------|----------|----|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| 513A>G | AA       | 5  | 1,492.00±99.49 <sup>a</sup> | 1,611.00±130.26 <sup>a</sup>  | 69.60± 8.70              |
|        | AG       | 3  | 1,370.00±18.03 <sup>a</sup> | 1,561.67± 17.40 <sup>ab</sup> | 72.00±17.06              |
|        | GG       | 21 | 1,927.14±84.36 <sup>b</sup> | 2,151.43±112.95 <sup>b</sup>  | 87.86± 3.41              |
| 517A>T | AA       | 1  | 1,415.00± 0.00              | 1,520.00± 0.00                | 81.00± 0.00              |
|        | TA       | 6  | 1,450.00±86.93 <sup>a</sup> | 1,604.17±106.41 <sup>a</sup>  | 66.00± 9.61 <sup>a</sup> |
|        | TT       | 22 | 1,905.68±83.24 <sup>b</sup> | 2,126.14±110.62 <sup>b</sup>  | 87.82± 3.25 <sup>b</sup> |

<sup>1</sup> BW150 = Body weight at 150 days of age, <sup>2</sup> BW270 = Body weight at 270 days of age, <sup>3</sup> EPN = Egg production number at 270 days of age.

<sup>ab</sup> Different superscripts with in columns are significantly different ( $p<0.05$ ).

이를 제공함으로써 분자유전마커에 대한 기초정보를 제공하고자 한다.

## 적 요

*GHSR* 유전자 변이에 대한 선행연구는 몇몇의 변이가 닭의 성장형질에 영향을 미칠 수 있으며, 유전자마커로써 활용될 수 있음을 보고하였다. 하지만 한국재래계를 대상으로 하는 유전연구는 매우 미흡하고, 외래계 대상의 유전자마커의 도입에는 검증실험이 선 요구된다. 따라서 본 논문은 *GHSR* 유전자의 성장형질과의 연관성을 확인하며, 한국재래계에 적용할 수 있는 유전자마커를 제시하고자 하였다. 국립축산과학원에서 사육 중인 6계통의 한국재래계 220수를 공시재료로 하여 닭의 체중과의 연관성이 보고된 바 있는 *GHSR* 유전자의 c.739+726SNP 유전자형을 PCR-RFLP 방법을 통하여 분석하였다. 이후 집단 내에서 30수를 선발하여 염기서열 분석을 수행함으로써 한국재래계내 유전자 변이를 확인하였다. c.739+726SNP를 포함하여 염기서열 분석을 통해 파악된 유전자 변이와 한국재래계의 경제형질과의 연관성 분석에는

SPSS version 22.0을 이용하였다. c.739+726SNP는 전체계 군(n=220)에서 150일령 체중과 270일령 체중과의 연관성을 확인할 수 있었으며( $p<0.01$ ), 모색에 의해 구분된 계통별 분석에서는 한국재래계(Gray) 계군에서 150일령 체중과의 연관성이( $p<0.05$ ), 한국재래계(White) 계군에서 산란수와 연관성이 확인되었다( $p<0.05$ ). 또한 염기서열 분석을 통해서 확인한 513A>G, 517A>T SNP 유전자형에 따라 각각 체중과 산란수에서 통계적으로 유의미한 차이를 확인할 수 있었다( $p<0.05$ ). 이러한 결과는 외래육계와 유전적 차이를 가지는 한국재래계의 유전정보를 제공하고, 적합한 분자유전마커를 개발하는데 기초자료로 활용될 수 있을 것이며, *GHSR* 유전자 내의 유전변이가 분자유전마커 기반의 선발육종에 사용될 수 있을 것이라 사료된다.

(색인어 : *GHSR*, 한국재래계, SNP, 경제형질, 유전자마커)

## 사 사

본 논문은 Golden Seed Project 중축사업(과제 번호: PJ00-99252016)과 강원대학교 대학회계 학술연구조성비의 지원

으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

#### REFERENCES

- Choi SY, Won JY, Kim JD, Hong Y, Jeong D, Lee SJ 2015 Effects of C1032T SNP in IGF2BP2 gene on growth and egg production traits. *Ann Anim Resour Sci* 26(1):94-100.
- Choi SY, Yang SY, Hong MW, Shon S, Jeong D, Hong Y, Lee SJ 2016 Effect of SNP within HNF4a associated with growth performance in Korean native chickens. *Ann Anim Resour Sci* 27(2):81-86.
- Fang M, Nie Q, Luo C, Zhang D, Zhang X 2007 An 8bp indel in exon 1 of Ghrelin gene associated with chicken growth. *Domest Anim Endocrinol* 32(3):216-225. Epub 2007 Apr 25.
- Fang M, Nie Q, Luo C, Zhang D, Zhang X 2010 Associations of GHSR gene polymorphisms with chicken growth and carcass traits. *Mol Biol Rep* 37(1):423-428.
- Jin S, Chen S, Li H, Lu Y, Xu G, Yang N 2014 Associations of polymorphisms in *GHRL*, *GHSR*, and *IGF1R* genes with feed efficiency in chickens. *Mol Biol Rep* 41(6):3973-3979. doi: 10.1007/s11033-014-3265-8. Epub 2014 Feb 25.
- Kim H, Choi SY, Lee JY, Hong YH, Lee SJ 2013 Current status of study about association of SNPs on meat quantity and egg production traits in chickens : An overview. *Ann Anim Resour Sci* 24(2):178-188.
- Kong HS, Oh JD, Lee JH, Jo KJ, Sang BD, Choi CH, Kim SD, Lee SJ, Yeon SH, Jeon GJ, Lee HK 2006 Genetic variation and relationships of Korean native chickens and foreign breeds using 15 microsatellite markers. *Asian-Aust J Anim Sci* 19(11):1546-1550.
- Nie Q, Lei M, Ouyang J, Zeng H, Yang G, Zhang X 2005 Identification and characterization of single nucleotide polymorphisms in 12 chicken growth-correlated genes by denaturing high performance liquid chromatography. *Genet Sel Evol* 37(3):339-360.
- Oh JD, Kang BS, Kim HK, Park MN, Chae EJ, Seo OS, Lee HK, Jeon GJ, Kong HS 2009 Genetic relationship between populations and analysis of genetic structure in the Korean native chicken and the endemic chicken breeds. *Korean J Poult Sci* 35(4):361-366.
- Zhang B, Chen H, Guo Y, Zhang L, Zhao M, Lan X, Zhang C, Pan C, Hu S, Wang J, Lei C 2009 Associations of polymorphism within the *GHSR* gene with growth traits in Nanyang cattle. *Mol Biol Rep* 36:2259 - 2263.
- Zhou H, Alva M, John M, Chris A, Susan L 2005 Insulin-like growth factor-I gene polymorphism associations with growth, body composition, skeleton integrity, and metabolic traits in chickens. *Poult Sci* 84(2):212-219.

---

Received Dec. 8, 2016, Revised Dec. 27, 2016, Accepted Dec. 28, 2016