

순열검정과 부스트랩 방법에 의한 한우 6번 염색체의 ILSTS035에 대한 우수 DNA Marker 선별

이용원¹⁾, 이제영²⁾, 김문정³⁾, 한초희⁴⁾

요약

한우 6번 염색체 유전자 지도에서 QTL (quantitative trait loci) 분석을 실시하여 선별된 Locus 값을 순열검정(Permutation Test)을 이용하여 유의성 검정을 실시하였다. 한편, 우수 경제형질 DNA marker들을 K-평균 군집법을 실시 파악하였다. 이들 QTL과 K-평균법에 의해 한우의 염색체 6번 ILSTS035의 우수 DNA marker 235번을 선별하였다. 선별된 DNA Marker 235번을 출품우에 적용하여 Bootstrap 방법을 이용하여 신뢰구간을 구하여 검정하였다.

Keyword : QTL, 순열검정, Bootstrap, 후대검정우, 출품우

1. 서론

21세기는 생명공학의 시대를 맞이하여, 그 핵심이 될 지놈(genome) 연구가 활발히 진행되고 있으며 얼마전 인간의 지놈 지도도 완성되었다. 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. 선진국에서는 경제성이 높은 동물의 Genome Project가 추진되고 있어, 우리나라에서도 재래가축 유전자원 중 가장 경제성이 높아 경쟁력이 있는 것으로 확인된 한우를 대상으로 유전자지도 작성(gene mapping)이 시도되고 있다(Kim 등, 2000, 2001). 한우를 비롯한 축우의 유전자지도 작성에서는 주로 microsatellite를 이용하고 있다.

특히, 소에서 일당증체량, 근내지방도, 등지방 두께 및 산자수 등의 중요한 경제 형질에 관여하는 유전자 연관 표식인자가 몇 번 염색체의 어느 위치에 존재하는가를 밝히기 위한 QTL(Quantitative Trait Loci)에 대한 연구가 진행되어지고 있으며, Taylor 등(1998)과 Stone 등(1999)은 근내지방(marbling)과 고기연도(meat tenderness)에 관련되는 유전자가 27번 염색체에 있음을 보고하였고, Stone 등(1999)은 bovine 염색체 6번에 생시 및 1세령 체중에 연관된 유전자가 존재함을 그리고 Casas 등(1999)은 bovine 염색체 6번에 위치한 7개의 microsatellite loci(INRA133, BM1329, BMS2508, BMS382, BM306, BMS483 및 BM415)가 생시 체중과 증체에 연관되어 있음을 보고하였다.

따라서, 본 연구는 우선 농림부 기획과제로 수행중인 환경적인 요인의 영향을 배제시킨 후 사

-
- 1) (712-749) 경북 경산시 대동 214-1 영남대학교 이과대학 통계학과 대학원생
 - 2) (712-749) 경북 경산시 대동 214-1 영남대학교 이과대학 수학과통계학부 교수
 - 3) (712-749) 경북 경산시 대동 214-1 영남대학교 이과대학 통계학과 대학원생
 - 4) (712-749) 경북 경산시 대동 214-1 영남대학교 이과대학 통계학과 대학원생

순열검정과 부스트랩 방법에 의한 한우 6번 염색체의 ILSTS035에 대한 우수 DNA Marker 선별

육하여 유전적인 요인의 영향을 많이 받는 후대검정우를 대상으로 한우의 주요 경제형질인 육질과 육량에 연관된 유전자들이 다수 위치하는 6번 염색체의 microsatellite loci를 대상으로 우선 육질에 연관된 loci의 QTL 분석을 하여 선별된 loci값을 계산하고(2장), 그 이후 데이터 마이닝에 의해 우수 DNA를 Mining하려고 시도하고(3장), 부스트랩을 이용하여 신뢰구간을 구하고(4장), 선별된 우수 DNA marker들을 환경적인 요인의 영향을 많이 받는 출품우에 적용하여(5장), 후대검정우에서 선별된 우수 DNA Marker들이 출품우에 양질의 영향을 주는지 알아보고자 하였다.

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 제시하고 있어 본 연구의 수행에 적극 활용하였다.

본 연구는 한우의 6번 염색체의 유전자 지도 작성을 이용한 근내지방 연관(bovine 경우) QTL의 LOD값을 계산하여 경제형질의 기록이 있는 한우농가 개체들의 QTL 검정하였다. 그리고, 기존의 개량모형의 예상결과와 비교하여 한우의 선발체계를 구축할 수가 있을 것으로 판단했다. 우선 “LOD 값>3.0”을 판정기준으로 여러개의 잠정 우수 형질로 선정한다. 하지만, “LOD 값>3.0”을 판정기준에 대한 문제점이 발생하여 Lod Score 값의 통계적 유의성을 검정해주기 위해 Permutation Test를 실시하였다(Churchill and Doerge, 1994). 각 locus별로 10,000번의 simulation을 통해 p-value를 계산한다.

그 결과는 <표 1>과 같다.

< 표 1 > ILSTS035의 우수 Loci에 대한 Permutation Test 결과

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

<표 1>에서 보면 AFR227은 LOD값은 3이상으로 높게 나타났지만, P-value가 0.07235로 낮게 나오는 것을 알 수 있다. 전체적으로 볼 때 ILSTS035와 BM4311의 locus가 근내지방 경제형질

에서 우수한 값으로 나타났다. 우선 본 논문에서는 ILSTS035에 대해서 우수 DNA를 선별하고자 한다.

3. K-평균 군집화 기법을 이용한 우수 DNA Mining

본 실험은 농림기획과제로 수행중인 한우고유의 우수 유전인자의 관찰을 위해 실험중인 후 대검정한우 165두를 사용하였다. 이중 한우 6번 염색체중 선별된 ILSTS035 microsatellite loci의 DNA marker를 분석하였다. 변수의 개수는 13개이다. 13개의 변수 중 각 DNA marker의 유무에 대하여 나누어진 변수가 9개 DM210, …, DM266으로 정의되고 이들은 각각 염기서열로부터 primer를 이용한 PCR 방법에서 얻어진 정량적(metric)자료이며, 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. 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. 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, 266였다.

< 표 2 > 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

이들로부터 한우의 주요형질인 육질과 육량에 관련한 <표 2>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.

4. Bootstrap Method를 통한 우수 유전자 탐색

DNA Marker들에 대하여 Bootstrap 방법(Visscher et al., 1996)을 이용하여 신뢰구간을 계산하여 실질적으로 영향력이 있는지를 알아보고자 하였다. 여기에서 시행하는 Bootstrap 방법은 BCa(Bias-Corrected accelerate)방법으로, 각 DNA Marker별로 B=1000번 실시하였다.

DNA marker 235번의 신뢰구간을 계산해 본 결과 다른 DNA Marker들에 비하여 평균값이 높게(9.8667) 나왔고, 신뢰구간 (7.726, 12.0667)이 나타나 근내지방에 양호한 영향을 주는 우수 유전자로 판단할 수 있다.

5. 출품우에 대한 DNA Marker 235번의 적용

후대검정우 6번 염색체 유전자 지도에서 ILSTS035 microsatellite loci에서 우수 DNA marker mining을 해 보았다. 그리고, 한우의 특성부위에 따른 유전적 요인의 DNA marker의 영향을 파악하였다. DNA Marker들의 실질적인 영향을 알아보기 위해 부스트랩(bootstrap) BCa 방법을 통해 신뢰구간을 계산하였다. 그 결과, DNA Marker 235번이 우수 DNA marker로 선별되었다. 후대검정우에서 선별된 우수 DNA marker를 환경적인 요인의 영향을 많이 받는 출품우 455두에 적용하여, 선별된 우수 DNA marker 235번의 실질적인 영향을 부스트랩(bootstrap) BCa 방법을 통해 신뢰구간을 계산하여 검정해 보았다.

근내지방에 대한 부스트랩 결과 DNA marker 215, 235번을 우수한 DNA Marker로 판단할 수 있다.

6. 결론

후대검정우 6번 염색체 ILSTS035 microsatellite locus에서 우수 DNA marker들을 선별해 보았다. 후대검정우에서 6번 염색체 ILSTS035 microsatellite locus에서 DNA Marker 235번이 우수 DNA Marker로 선별되었다. 선별된 DNA Marker 235번을 환경적인 영향을 많이 받는 출품우에 적용해 보았다. 그 결과, 환경적인 영향을 많이 받는 출품우에서도 DNA Marker 235번이 우수 DNA Marker로 선별되었다. DNA Marker 235번은 환경적인 영향에 관계없이 유전적인 영향을 주고 있다는 것을 알 수 있다.

참고 문헌

1. Bishop, M. D., Kappes, S. M., Keele, J. W., Stone, R. T., Sunden, S. L. F., Hawkins, G. A., Toddo, S. S., Fries, R., Grosz, M. D., Yoo, J., and Beattie, C. W. (1994). A genetic linkage map for cattle. *Genetics*, 136, 619-639.
2. Casas, E., Shackelford, S. D., Keele, J. W., Stone, R. T., Kappes, S. M., and Koohmaraie, M. (1999). 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.
3. Glowatzki-Mullis, Gaillard, C., Wigger, G., and Fries, R. (1995). Microsatellite based on parentage control in cattle. *Animal Genetics*, 26, 7-12.
 4. 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
 5. 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
 6. Lander, E.S. and Botstein, D. (1989) Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, 121, 185-199.
 7. Ma, R. Z., Beever, J. E., Da, Y., Green, C. A., Russ, I., Park, C., Heyen, D. W., Everts, R. E., Fisher, S. R., Overton, K. M., Teale, A. J. et al. (1996). A male linkage map of the cattle(*Bos taurus*)genome. *J. Hered.*, 87, 261-271.
 8. Rassman, K., Scholotterer, C., and Tautz, D. (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. Stone, R. T., Casas, E., Cappes, S. M., and Keele, J. W. (1999). Status of mapping bovine QTL at the U.S. meat animal research center. *Plant-Animal Genome VII Conference*, San Diego, CA, W34.
 11. Taylor, J. F., Davis, S. K., Sanders, J. O., Turner, J. W., Miller, R. K., and Smith, S. B. (1998). Identification of QTLs for growth and carcass quality in a cross between *Bos indicus* and *Bos taurus*. *Plant-Animal Genome VII Conference*, San Diego, CA, W19.
 12. G.A. Churchill and R.W. Doerge, 1994. Empirical Threshold Values for Quantitative Trait Mapping, *Genetics* 138:963-971.
 13. Phillip G. (1994) "Permutation Test" Springer-Verlag
 14. Peter M. Visscher, Robin Thompson and Chris S. Haley ,1996. Confidence Intervals in QTL Mapping by Bootstrapping. *Genetics* 143; 1013-1020.
 15. Efron B., Tibshirani R. (1993) "An Introdction to bootstrap" CHAMPMAN & HALL