

닭의 CaSR 유전자내 단일 염기 변이 탐색 및 경제 형질간의 연관성 분석

홍윤숙¹ · 오재돈¹ · 이제현¹ · 공홍식¹ · 최철환² · 이승수² · 전광주¹ · 이학교^{1*}

¹한경대학교 유전정보연구소, ²축산과학원

Identification of a SNP in Chicken CaSR Gene and Its Effect on Economic Traits

Y. S. Hong¹, J. D. Oh¹, J. H. Lee¹, H. S. Kong¹, C. H. Choi², S. S. Lee², G. J. Jeon¹ and H. K. Lee^{1*}

¹Genomic Informatics Center, Hankyong National University, Korea, ²National Institute of Animal Science, Korea

ABSTRACT The Function of the calcium sensing receptor (CaSR) is to control calcium levels by altering PTH (parathyroid hormone) secretion and renal calcium resorption. The influence of calcium on the basal and stimulated release of several hormones from chicken pituitary glands has been determined *in vitro*. The objective of this study was to identify SNP in chicken CaSR gene and to investigate the effect of the SNP on economic traits. The sequencing analysis method was used to identify nucleotide polymorphisms within chicken CaSR gene. This study identified SNP at position 1949 bp(Genebank accession No : XM_416491) in the exon 1. The SNP changed the amino acid to alanine(GCC) from serine(TCC). This SNP showed three genotypes, AA, AS and SS by digestion with the restriction enzyme *Nco*I using the PCR-RFLP method. The A963S showed significant effect only on the first lay day ($P<0.05$) in Leghorn population. Leghorn with the genotype AA had significantly faster the first lay day(137.6) than the genotype AS(143.0, $P<0.05$). Also, the A963S showed significant effect only on the first lay day($P<0.05$) and mean of egg weight($P<0.05$) in KNC population. KNC with the genotypes AA and AS had significantly faster the first lay day (151.0 and 152.6, respectively) than the genotype SS(159.4, $P<0.05$). And the genotypes SS had significantly heavier the mean of egg weight(50.4 kg, $P<0.05$) than the genotype AA and AS (47.5 and 47.8 kg, respectively). According to result of this study, an allele of the A963S was found to have a significant effect on the first lay day. It will be possible to use this SNP marker on selecting chicken to improve the first lay day.

(Key words : Chicken CaSR gene, SNP, The first lay day)

서론

CaSR 유전자는 Calcium Sensing Receptor의 약자로 세포의 밖에서 칼슘의 항상성을 조절하는 역할을 담당하며, 부갑상선 호르몬의 분비를 조절하고, 비노기에서 칼슘의 흡수를 담당하는 것으로 알려져 있다(David 등, 1999; Hough 등, 2004; Cifuentes 등, 2005; Pidasheva 등, 2005; Robert 등, 2006; Yun 등, 2007). 김 등(1991)은 PTH, 칼시토닌, 비타민 D 등은 체내의 칼슘 대사에 관여한다고 하였다. 체내의 칼슘 농도가 증가하게 되면 갑상선에서 칼시토닌을 분비하게 되어 신장에서 칼슘 이온 배출이 증가하여 소장에서 칼슘 이온 흡수를 촉진하게 된다. 반면, 체내의 칼슘 농도가 감소되면 부갑상선에서 부갑상선 호르몬을 분비하게 되어 신장에서 칼슘

이온 배출이 감소하여 소장에서 칼슘 이온의 흡수를 촉진하게 된다. 또한, 체내의 칼슘 농도의 저하는 뇌하수체 분비 기관에서 성장 호르몬의 분비를 자극하게 되며(Hall 등, 1985) 프로게스테론의 분비를 강화시켜 주는 역할을 한다(Veldhuis 등 1982). 이렇게 체내의 칼슘 농도는 성장과 번식에 관련한 호르몬 분비에 큰 영향을 미치고 있다.

최근에는 인체에서 CaSR 유전자에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 인체에서 CaSR 유전자 내 A986S 변이 지역의 다형성은 체내의 칼슘 농도의 증가와 감소를 초래하고 있으며, 골다공증 및 고혈압 및 비만 등의 질병과 연관되어 있음을 보고한 바 있다(David 등, 1999; Felderbauer 등, 2005; Robert 등, 2006; Yun 등, 2007). 그러나 사람이 아닌 다른 포유류나 조류 등에서 CaSR 유전자와 관련된 연구는 아직까

* To whom correspondence should be addressed : breedlee@empal.com

지 부족한 실정이다. CaSR 유전자의 체내 칼슘 농도 조절 기작은 동물의 여러 경제 형질에 영향을 미칠 것으로 추정되며, 경제 형질을 개량하는데 있어 강력한 후보유전자로서의 가능성이 잠재되어 있다고 하겠다. 따라서 본 연구는 닭의 CaSR 유전자 내 염기 변이 지역을 탐색하고 이를 통해 검출된 변이 지역과 경제 형질간의 연관성을 규명하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시 재료

본 연구에서 이용된 공시 재료는 축산기술연구소에서 사육중인 검정 자료(시산일령, 산란수, 난중, 체중)를 보유한 한국 재래닭 60수와 레그혼 60수를 선발하여 혈액을 채취하였으며, 수집된 혈액으로부터 genomic DNA를 정제하여 공시재료로 이용하였다.

2. Genomic DNA의 추출

공시축의 혈액으로부터 DNA의 분리 및 추출은 Genomic DNA Extraction kit(Bioneer™)으로 지침서에 따라 실행되었고, 분리된 DNA는 TE Buffer(10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA)에 용해하였다.

3. 유전자 증폭

PCR(Polymerase Chain Reaction) 반응액은 Template DNA 1 μ L, 각각의 Primer 0.1 μ L(10 pmole), dNTP 1 μ L, 10X Buffer 1.2 μ L 및 Taq polymerase 0.06 μ L를 첨가하여 PCR 반응액을 총 10 μ L로 조정 후 94°C에서 pre-denaturation 4분, 94°C에서 denaturation 40초, 53.6°C annealing 40초, primer extension 72°C 1분으로 총 35 cycle로 실행 후 final extension을 72°C 20분 동안 수행하여 증폭된 PCR-Products는 ethidium Bromide를 첨가한 2% agarose gel에서 전기 영동하여 확인하였다.

4. 염기 서열 분석

CaSR 유전자의 SNP 탐색을 위해 PCR Product 5 μ L에 Exo-SAP-IT(Amersham Bioscience, USA) 2 μ L를 첨가하여 총 부피를 7 μ L로 하여 37°C에서 20분, 80°C에서 20분간 반응시켜 증폭 산물 이외의 것들을 제거하여 준 다음 E.T terminator dye(Amersham Bioscience, USA)를 제작사의 지침서에 따라 Table 1의 primer와 함께 GeneAmp PCR System 2700(Applied

Biosystems)을 이용하여 재증폭 과정을 수행하였다. 전처리 과정을 통해 얻어진 산물을 MegaBace Analysis System (Amersham Bioscience, USA.)을 이용하여 염기 서열을 결정하였다. 결정된 염기 서열은 seqMAN II (DNA STAR Inc.) 프로그램을 이용하여 변이 지역 탐색에 활용하였다.

5. 제한 효소 처리

닭의 CaSR 유전자 내에 존재하는 변이 지역의 유전자형을 확인하기 위하여 PCR 증폭 여부 및 크기가 확인되어진 증폭산물 10 μ L를 제한 효소 *Nco* I (C^VCATG_G)를 이용하여 65°C에서 6시간 동안 절단 반응을 시킨 후 EtBr(Ethidium bromide)가 포함된 agarose gel(3%)에서 100V로 30분 동안 전기영동을 실시하여 절단된 유형에 따라 유전자형을 결정하였다.

6. 통계적 분석

$$Y_{ijk} = u + P_i + G_j + T_{ijk} + e_{ijk}$$

Y = 대상 형질에 대한 관측치,

u = 대상 형질의 전체 평균,

P = 동일한 가계에 대한 효과,

G = 유전자형 효과(j = AA, AB 그리고 BB),

T = 검정일에 대한 공변이 효과,

e_{ijk} = 임의 오차.

결 과

1. 닭 CaSR 유전자 내 변이 지역 탐색 및 유전자형 분석

CaSR 유전자 내 염기 서열 분석을 통해서 exon 1 지역의 319 4bp(accession no. XM_416491)에서 G가 T로 치환되는 변

Table 1. Primer sequence and position use for the chicken CaSR gene analysis

Primer name	Primer sequence	Location ^a	Product size
Chicken CaSR_F	5' agcaatgtgtcagcaag 3'	2978~2995	468 bp
Chicken CaSR_R	5' gcctataaaattcgga gt 3'	3426~3435	

^a Location was based on the sequence of the chicken CaSR gene from GenBank accession no. XM_416491.

이를 확인하였다. 이 변이는 아미노산 서열 963지역의 Alanine (GCC)이 Serine(TCC)으로 바뀌는 missense mutation으로 확인되었으며 A963S로 표기하기로 하였다.

A963S 지역의 유전자형 분석을 위해 염기 서열 변이 지역을 인식하는 제한 효소 *Nco* I (C^VCATG_G)를 이용하여 PCR-RFLP을 실시하였으며, 확인된 유전자형은 AA, AS 그리고 SS이다. 각 유전자형별 확인된 단편의 유형은 Fig. 1과 같이 나타났다. Lane 1과 2는 AS 유전자형이며 468 bp, 218 bp 그리고 250 bp, 3개의 단편을 확인하였다. 250 bp와 218 bp 두 개의 단편이 확인된 Lane 3은 AA 유전자형이며, Lane 4는 468 bp의 단편이 확인된 SS 유전자형이다. 분석된 A963S의 유전자형 빈도를 Table 2에 제시하였다. 한국 재래닭의 AS

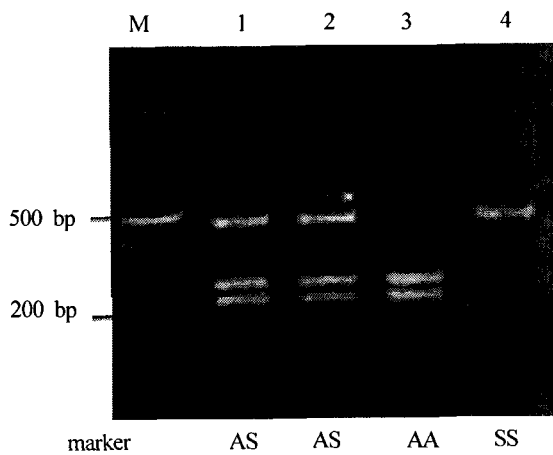


Fig. 1. 3% agarose gel displaying a *Nco* I restriction digest on an amplified portion on the chicken CaSR gene. M : size marker, lane 1, 2 : AS genotype, lane 3 : AA genotype, lane 4 : SS genotype.

유전자형이 65%로 가장 높은 출현 빈도를 보였으며, SS 유전자형이 23%, AA 유전자형이 12%로 나타났다. 반면, 레그혼 품종에서는 AS 유전자형이 92%로 높은 빈도를 나타냈으며 AA유전자형이 0.8%의 빈도를 보였다. 그리고 레그혼 품종에서 SS 유전자형은 발견되지 않았다.

2. A963S 유전자형과 경제 형질간의 연관성 분석

Table 3은 본 연구에 활용된 집단의 시산일령, 산란수, 난중 그리고 체중에 관한 평균 값을 나타낸 것이다. 재래닭과 레그혼간의 각 형질별 차이가 확연하게 나타나고 있음을 확인할 수 있었다.

각 개체들이 보유한 경제 형질의 성적과 A963S 유전자형간의 연관성 분석 결과를 Table 4와 Table 5에 제시하였다. Table 4는 레그혼 집단에서 분석된 결과를 제시한 것으로 결과에 따르면 시산일령에서 유전자형과의 유의한 연관성이 검출되었다. AA(137.6±2.63) 유전자형은 AS(143.0±1.60) 유전자형보다 빠른 시산일령을 가진 것으로 나타났다. Table 5는 한국 재래닭 집단에서 분석된 결과를 제시한 것으로 결과에

Table 2. Genotype and allele frequency of the A963S polymorphism in chicken CaSR gene

Breed	Genotype			Allele	
	AA	AS	SS	A	S
KNC*	0.12	0.65	0.23	0.445	0.555
Leghorn	0.08	0.92	-	0.540	0.460
Total	0.09	0.79	0.12	0.485	0.515

* Korean native chicken.

Table 3. Mean and standard deviation of each economic traits in populations

Population	The first lay day (day)	No. of egg production (ea)	Mean of egg weight (g)	Mean of body weight (g)
KNC*	154.03±6.33	82.72±8.99	48.53±2.58	1632±202.7
Leghorn	141.85±9.64	109.02±9.56	60.35±3.41	1512±219.6

* Korean native chicken.

Table 4. Effect of the polymorphism in the CaSR gene on the economic traits in the Leghorn

A963S genotype	The first lay day (day)	No. of egg production (ea)	Mean of egg weight (g)	Mean of body weight (g)
AA	137.6±2.63 ^a	110.3±4.59	58.3±1.97	1580.0±96.85
AS	143.0±1.60 ^b	108.8±1.59	60.5±0.56	1504.1±44.67

Table 5. Effect of the polymorphism in the CaSR gene on the economic traits in the Korea native chicken

A963S genotype	The first lay day (day)	No. of egg production (ea)	Mean of egg weight (g)	Mean of body weight (g)
AA	151.0±2.87 ^a	90.0±4.25	47.5±1.15 ^b	1624.2±90.22
AS	152.6±1.21 ^a	81.2±1.80	47.8±0.49 ^b	1587.9±38.22
SS	159.4±2.03 ^b	83.0±3.00	50.4±0.81 ^a	1757.1±63.80

따르면 시산일령과 난중에서 유전자형과의 유의한 연관성이 검출되었다. 시산일령의 경우 AA(151.0±2.87)와 AS(152.6±1.21) 유전자형은 SS(159.43±2.03) 유전자형보다 빠른 것으로 나타났으며 난중은 SS(50.4±0.81) 유전자형이 AA(47.5±1.15)와 AS(47.85±0.49) 유전자형보다 무거운 것으로 나타났다.

고 찰

사람의 경우, 칼슘의 순환 및 골 밀도와 관련하여 CaSR 유전자에 대한 많은 연구가 진행되었고, 계속해서 진행 중에 있는 상태이다(Hough 등, 2004; Cifuentes 등, 2005; Pidasheva 등, 2005; Robert 등, 2006; Yun 등, 2007). Peters 등(2004)의 보고에 따르면 CaSR의 유전적 변이는 종양과 관련된 질병을 일으킬 수 있다. 또한 과 칼슘 혈증 및 부갑상선 기능 항진증과 같은 칼슘 관련 질병과의 연관성이 있음을 보고하였다(Felderbaure 등, 2005). 이와 같은 연구 결과를 토대로 하여 Francisco 등(2007)은 분자 생물학적 임상 진단이 가능하다는 연구 결과를 발표하였다. 인간의 CaSR 유전자 내에 존재하는 염기 서열 변이 지역은 체내의 칼슘 농도 조절 및 질병과의 연관성에 대해 여러 연구 결과를 통해 보고되어지고 있다(David 등, 1999; Bollerslev 등, 2004; Felderbauer 등, 2005; Perez-Castrillon 등, 2006; Robert 등, 2006; Yun 등, 2007). 이와 같이 인간의 CaSR 유전자는 여러 측면에서 많은 연구가 진행되어지고 있으며, 질병 및 여러 형질에 있어 중요한 후보 유전자로 인정 받고 있다.

체내 칼슘 농도의 변화는 프로게스테론과 성장 호르몬 등

의 분비에 영향을 미치고 있다(Raisz 등 1981; Veldhuis 등, 1982; Hall 등, 1985). 세포 내 칼슘 농도의 저하는 프로게스테론의 분비를 촉진하게 된다(Hall 등, 1985). Liu 등(2005)은 칠면조에서 프로게스테론이 산란율에 직접적인 연관이 있음을 보고하였다. 보고에 따르면 매일 0.17 mg/kg의 프로게스테론을 투여한 결과, 산란율이 감소하였고 0.5 mg/kg을 투여한 결과 산란을 멈추었다고 하였다. 또한, Hall 등(1985)은 칼슘의 농도에 따라 성장 호르몬 분비에 영향을 미치는데 칼슘 농도의 저하는 성장 호르몬 분비를 촉진시킨다고 보고한 바 있다.

인간과 닭의 CaSR 유전자는 비교적 높은 상동성을 지니고 있다. 특히 인간에서 많은 연구가 진행된 A986S 지역과 닭의 A963S 지역에서 매우 높은 상동성을 확인할 수 있었으며(Fig. 2). 닭에서도 염기 변이 다형성이 검출되었다. 따라서 닭의 CaSR 유전자내 A963S 지역 역시 체내의 칼슘 농도 조절에 중요한 역할을 할 것으로 추정된다.

본 연구의 결과, A963S 지역의 변이가 시산일령에 유의적인 연관성이 검출되었다. 이는 A963S 지역의 변이가 칼슘 농도의 조절에 영향을 미치고 이에 따른 프로게스테론이나 성장 호르몬 등의 분비에 영향을 미쳐 결과적으로 시산일령과의 유의적인 연관성이 나타난 것으로 추정된다. 대립 유전자 A를 분자 생물학적 마커로 이용하여 경제 형질을 개량하는데 있어 산란일령을 앞당기는데 큰 기여를 할 수 있을 것으로 기대된다. CaSR 유전자는 질병뿐만 아니라 여러 경제 형질과의 연관성이 높을 것으로 기대되는 후보 유전자이지만 아직 경제 가축에 대한 연구가 많이 진행되지 않은 실정이다. 따라서 보다 다양한 방법을 이용한 접근과 연구를 통해 경제 형질의 개량하는데 있어 중요한 역할을 할 수 있는

A986S

```
Human 3367 CTGAGTTTTGAGGAGCCACAGAAGAACGCCATGGCCAACAGGAACGCCAAGCGCAGGAAC 3426
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Chicken 1198 CTGAGCTTTGATGAGCCTCAGAAGAACGCCATGGCCCACAGGAATTCTACGCACCAGAAC 1257
```

A963S

Fig. 2. Nucleotide partial sequences of the chicken CaSR gene compared with the human CaSR gene. A986S : mutation site in the human CaSR gene, A963S: mutation site in the chicken CaSR gene.

결과가 기대되어진다.

요 약

Calcium Sensing Receptor(CaSR) 유전자는 세포의 밖에서 칼슘의 항상성을 조절하는 역할을 담당하며, 부갑상선 호르몬의 분비를 조절하고 비뇨기에서 칼슘의 흡수를 담당하는 것으로 알려져 있다. CaSR 유전자의 체내 칼슘 농도 조절 기작은 동물의 여러 경제 형질에 영향을 미칠 것으로 추정되며 경제 형질 개량에 강력한 후보 유전자로서 가능성이 잠재되어 있다. 따라서 본 연구는 닭의 CaSR 유전자 내 염기 변이 지역을 탐색하고 이를 통해 검출된 변이 지역과 경제 형질간의 연관성을 규명하고자 실시하였다. 한국 재래닭의 AS 유전자형이 65%로 가장 높은 출현 빈도를 보였으며, SS 유전자형이 23%, AA 유전자형이 12%로 나타났다. 반면, 레그혼 품종에서는 AS 유전자형이 92%로 높은 빈도를 나타냈으며, AA 유전자형이 0.8%의 빈도를 보였다. 그리고 레그혼 품종에서 SS 유전자형은 발견되지 않았다. A963S 유전자형과 경제 형질간의 연관성 분석 결과를 레그혼 집단에서 분석된 결과에 따르면 시산일령에서 유전자형과의 유의한 연관성이 검출되었다. AA(137.6±2.63) 유전자형은 AS(143.0±1.60) 유전자형보다 빠른 시산일령을 가진 것으로 나타났다. 한국 재래닭 집단에서 분석된 결과에 따르면 시산일령과 난중에서 유전자형과의 유의한 연관성이 검출되었다. 시산일령의 경우 AA(151.0±2.87)와 AS(152.6±1.21) 유전자형은 SS(159.43±2.03) 유전자형보다 빠른 것으로 나타났으며, 난중은 SS(50.4±0.81) 유전자형이 AA(47.5±1.15)와 AS (47.85± 0.49) 유전자형보다 무거운 것으로 나타났다. 본 연구의 결과 A963S 지역의 변이가 칼슘 농도의 조절에 영향을 미치고 이에 따른 프로게스테론이나 성장 호르몬 등의 분비에 영향을 미쳐 결과적으로 시산일령과의 유의적인 연관성이 나타난 것으로 추정된다. 대립 유전자 A를 분자 생물학적 마커로 이용하여 경제 형질중 산란일령을 앞당기는데 큰 기여를 할 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(20050301034366)의 일환으로 수행되었습니다. 농촌진흥청 바이오그린21사업단 관계자들과 시료를 제공한 축산연구소 관계자들에게 깊은

은 감사를 드리는 바입니다.

참고문헌

- Antoni W, Svetlana P, Lucie C, Jerzy C, Franciszek K, Andrzej W, Geoffrey N. Hendy GN 2004 Functional characterization of calcium sensing receptor codon 227 mutations presenting either as familial(benign) hypercalcemia or neonatal hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 90(2):864-70.
- Bollerslev J, Wilson SG, Dick IM, Devine A, Dhaliwal SS, Prince RL 2004 Calcium-sensing receptor gene polymorphism A986S does not predict serum calcium level, bone mineral density, calcaneal ultrasound indices, or fracture rate in a large cohort of elderly women. *Calcif Tissue Int* 74: 112-17.
- Cifuentes M, Albala C, Rojas C 2005 Calcium-sensing receptor expression in human adipocytes. *Endocrinology* 146(5):2176-2179.
- David ECC, ReinholdVieth, Hoang MT, Betty YLW, Geoffrey NH, Laurence AR 2001 Association between total serum calcium and the A986S polymorphism of the calcium-sensing receptor gene. *Molecular Genetics and Metabolism* 72:168-174.
- Felderbauer P, Hoffmann P, Kelin W, Bulut K, Ansorge N, Epplen JT, Schmitz F, Schmidt WE 2005 Identification of a novel calcium-sensing receptor gene mutation causing familial hypocalciuric hypercalcemia by single-strand conformation polymorphism analysis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 113(1):31-4.
- Hall TR, Lam SK, Harvey S 1985 Calcium control of growth hormone release from chicken pituitary glands *in vitro*. *Gen Comp Endocrinol* 60(1):70-4.
- Hough TA, Bogani D, Cheeseman MT, Favor J, Nesbit MA, Thakker RV, Lyon MF 2004 Activating calcium-sensing receptor mutation in the mouse is associated with cataracts and ectopic calcification. *Proc Natl Acad Sci USA* 14;101(37):13566-71.
- Liu LHK, Bacon WL 2005 Changes in egg production rate induced by progesterone injection in broiler breeder hens. *Poultry Science* 84:321-327.
- Mattias O, Runny L, UIF HL, Peter N 2001 Calcium sensing receptor gene polymorphism, circulating calcium concentra-

- tions and bone mineral density in healthy adolescent girls. *European Journal of Endocrinology* 144:257-261.
- Perez-Castrillon JL, Sanz A, Silva J, Justo I, Velasco E, Duenas A 2006 Calcium-sensing receptor gene A986S polymorphism and bone mass in hypertensive women. *Archives of Medical Research* 37 607-611.
- Peters U, Chatterjee N, Yeager M, Chanock SJ, Schoen RE, McGlynn KA, Church TR, Weissfeld JL, Schatzkin A, Hayes RB 2004 Association of genetic variation in the calcium-sensing receptor with risk of colorectal adenoma. *cancer Epidemiol Biomarker Prev* 13(12).
- Pidasheva S, Canaff L, Simonds WF, Marx SJ, Hendy GN 2005 Impaired cotranslational processing of the calcium-sensing receptor due to signal peptide missense mutations in familial hypocalciuric hypercalcemia. *Hum Mol Genet* 15; 14(12): 1679-90.
- Raisz LG 1981 Calcium regulation. *Clin Biochem* 14(5):209-212.
- Takacs I, Speer G, Bajnok E, Tabsk A, Nagy Z, Horvath C, Kovacs K, Lakatos P 2002 Lack of association between calcium-sensing receptor gene A986S polymorphism and bone mineral density in hungarian postmenopausal women. *Bone* 30:6.
- Veldhuis JD, Klase PA 1982 Calcium ions modulate hormonally stimulated progesterone production in isolated ovarian cells. *Biocheem J* 202:381-386.
- Yun FH, Wong BY, Chase M, Shuen AY, Canaff L, Thongthai K, Siminovitch K, Hendy GN, Cole DE 2007 Genetic variation at the calcium-sensing receptor(CaSR) locus : Implications for clinical molecular diagnostics. *Clin Biochem* 40 (8):551-61.