

한국 재래닭의 MHC 영역 유전자형 분석

정기철¹ · 라세돌² · 서동원² · 박병권³ · 최강덕⁴ · 이준현^{2,†}

¹농촌진흥청 국립축산과학원 가금과, ²충남대학교 동물자원과학부, ³공주대학교 특수동물학과, ⁴한경대학교 생물정보통신대학원

Genotype Analysis of the Major Histocompatibility Complex Region in Korean Native Chicken

Kie Chul Jung¹, Md. Rashedul Hoque², Dong Won Seo², Byung Kwon Park³, Kang Duk Choi⁴ and Jun Heon Lee^{2,†}

¹Poultry Science Division, National Institute of Animal Science, RDA, Cheonan 331-801, Korea

²Department of Animal Science and Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

³Department of Companion & Laboratory Animal Science, Kongju National University, Yesan 340-702, Korea

⁴The Graduate School of Bio & Information Technology, Hankyong National University, Ansung 456-749, Korea

ABSTRACT The chicken major histocompatibility complex (MHC) is known to be associated with disease resistance and susceptibility to several pathogens. The microsatellite marker LEI0258 is physically located between the BG and BF of MHC region and variations near this marker have been well documented. In this report, the LEI0258 marker was used to find specific alleles for the Korean native chicken. The MHC haplotype was analyzed by PCR screening and sequencing of LEI0258 region in four different breeds including black Korean native chicken, brown Korean native chicken, Cornish and Rhode island red. The serologically same MHC haplotypes showed the differences in repeat numbers, a few indels or single nucleotide polymorphisms by sequencing analysis. Even though we could not identify specific alleles for Korean native chickens, the genotypes analyzed in these breeds can give valuable information for the relationships with disease resistance and establishment of breeding strategies for the Korean native chicken.

(Key words : genotype, marker, MHC, Korean native chicken)

서 론

Major Histocompatibility Complex(MHC)는 다양한 종류의 질병 저항성과 관련되어 있는 것으로 알려져 있다. 질병에 대한 저항성은 많은 유전자들에 의해 이루어지는데, 이미 밝혀진 질병 저항성 관련 유전자들은 cytokine 유전자, CD-encoding 유전자, NRAMP1, 성장 호르몬 및 immunoglobulin 유전자 등이 있다.

양계 산업에서 MHC 유전 정보는 질병 저항성을 개선하거나, vaccine에 대한 반응을 증가하는 데에 활용할 수 있을 것으로 알려졌으며, MHC 유전자형은 마렙병의 백신 효용과 관련이 있다는 보고가 있다(Bacon과 Witter, 1994). 또한 닭의 MHC는 마렙병뿐만 아니라 Avian Leukosis Virus(Yoo와 Sheldon, 1992), Rous Sarcoma Tumor Virus(Taylor, 2004), Coccidiosis(Lillehoj 등, 1989) 및 Salmonella(Cotter 등, 1998)의 질

병과 관련되어 있어 많은 연구가 진행되고 있다.

닭의 MHC는 B complex라고 불리고 16번 염색체에 존재하고 있으며, BF(class I), BL(class II β) 그리고 BG(Immunoglobulin superfamily)로 구성되어 있다(Miller 등, 2004). 이러한 저항성을 갖는 MHC 유전자형의 빈도는 부모 세대에서의 선발 및 교정을 통해 증가시킬 수 있는 것으로 알려져 있다. 대부분의 MHC haplotype 정보는 근교계통인 White Leghorn에서 동정되었으며, 초기 닭 MHC haplotype의 명명은 혈청학적인 분석에 의해 이루어졌지만 최근에 실험축군의 유전자 염기서열에 의한 명명법으로 개정되고 있다(Miller 등, 2004). 닭의 MHC 부위중 MHC B 지역은 다형성이 높은 것으로 알려져 있는데, 이런 다양한 변이는 특정 질병에 대한 저항성과 감수성을 결정하는 것으로 알려져 왔다. 특히 Class I의 BF2 부위는 BF1보다 다형성이 높으며, MHC B 부분은 recombination이 실험축군에서 확인되지 않았다는 보고가 있다(O'Neill

[†] To whom correspondence should be addressed : junheon@cnu.ac.kr

등, 2009).

한국 재래닭은 1980년대부터 보존 연구가 시작되어 현재 품종 및 계통이 유지되고 있으며, 최근 한국 재래닭의 높은 육질에 기인하여 소비량이 증가하고 있다. 그러나 상업화된 재래닭 산업의 이면에는 둔갑한 재래닭이 유통되고 있어 농가의 피해가 발생하고 있다. 한국 재래닭 산업의 보호를 위하여 재래닭 품종 특이 마커의 개발이 절실히 필요하며, 조류의 유전자 중 미토콘드리아내에 존재하는 Cytochrome oxidase I(COI) 유전자 변이를 이용한 품종 구분 연구도 진행되고 있다(Hebert 등, 2003; 진 등, 2009). MHC 유전자의 LEI0258 microsatellite marker는 polymerase chain reaction(PCR)에 의해 유전자형을 쉽게 구분할 수 있으며, 이 marker 주위에 염기서열 변이가 다양하다는 특징을 갖고 있다. 따라서 본 연구는 한국 재래닭의 품종 특이 마커를 탐색하기 위한 하나의 후보 마커로 MHC 지역에 있는 LEI0258 microsatellite marker 주위에 존재하는 반복 염기서열의 반복수 및 다형성 변이를 한국 재래계 흑색종, 한국 재래계 갈색종, Cornish종 및 Rhode Island Red종에서 비교함으로써 LEI0258 microsatellite marker를 품종 구분 표지로서의 가능성을 제시함과 동시에 질병과 MHC 유전자형과의 연관 관계 규명을 통하여 차후 질병 저항성 계통 조성을 위한 기초 자료로 이용하고자 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시 재료 및 Genomic DNA 추출

본 연구에 이용된 공시 재료는 국립축산과학원(성환) 가금과에서 보유한 한국 재래계 흑색종 23수, 한국 재래계 갈색종 82수 코니쉬종(Cornish) 30수, 로드아일랜드레드(Rhode Island Red)종 42수를 이용하였다.

2. DNA 추출

공시계의 익정맥에서 200 μ L의 혈액을 EDTA가 함유된 tube에 채혈하였으며, DNA 추출은 PrimePrep™ Genomic DNA Isolation Kit(Genetbio, Korea)와 MagExtractor® Genome kit (Toyobo, Japan)를 이용하여 지침서에 따라 추출하였고, 추출된 DNA는 실험에 이용될 때까지 4 $^{\circ}$ C에 저장하였다.

3. MHC 유전자의 PCR 증폭 및 정제

닭 MHC 부위에 존재하는 microsatellite marker LEI0258를 증폭하기 위한 primer는 Fulton 등(2006)에 의해 보고된 primer

들(Forward primer: 5' CACGCAGCAGAACTTGGTAAGG 3', Reverse primer: 5' AGCTGTGCTCAGTCCTCAGTGC 3')을 이용하였다. PCR(Polymerase Chain Reaction) 증폭은 공시 재료인 genomic DNA에 10X 반응 완충액(Tris-HCl pH 9.0, 200 mM MgCl₂, (NH₄)₂SO₄, PCR enhancers), 10 mM dNTP, forward와 reverse primer 각각 10 pmol, 1.5 units *Taq* DNA polymerase (Genetbio, Korea)와 그리고 멸균수를 첨가하여 총 20 μ L 용량으로 반응하였다. PCR 반응 조건은 최초 denaturation으로 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후, 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 65 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 45초에서 35회 반복하였으며, 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 final extension 후 4 $^{\circ}$ C에서 종료하였다. PCR 증폭 산물은 PCR Purification Kit(Bioneer, Korea)을 사용하여 정제하였다.

4. 유전자 염기서열 분석

각 품종별 닭 MHC 유전자 염기서열을 확인하기 위하여 sequencing을 실시하였다. 염기서열 분석은 정제된 PCR 증폭 산물을 Geno Tech(Korea)에 의뢰하여 direct sequencing 방법으로 실시하였으며, Chromas software(Technelysium, Australia)를 사용하여 염기서열을 확인하였다. 확인된 염기서열은 CLUSTAL W(BioEdit) software를 이용하여(Hall 등, 1999) alignment를 실시한 후 단일 염기 다형성, indel 및 반복 염기서열수를 확인하였다.

결과 및 고찰

MHC 유전자 지역의 LEI0258 microsatellite marker는 MHC 유전자형을 동정하기 위하여 활용되고 있다. 품종별 LEI0258 microsatellite marker의 반복수와 유전자 다형성을 이용하여 닭의 품종 구분 가능성을 시험하기 위하여 한국 재래계 흑색종 23수, 한국 재래계 갈색종 82수, 코니쉬종(Cornish) 30수, 로드아일랜드레드(Rhode Island Red)종 42수를 이용하였다. MHC 유전자의 LEI0258 microsatellite marker 부분을 PCR 증폭 후 전기영동한 결과 다양한 haplotype을 확인할 수 있었다. PCR 증폭물의 크기는 대략 200 bp부터 450 bp까지 다양하게 육안으로 확인되었다. 전기영동 후 gel 상에서 유전자형을 분류한 결과, 총 25가지의 유전자형으로 분류할 수 있었다. 한국 재래계 흑색종에서는 ff(0.35) 유전자형의 빈도가 가장 높았으며, 한국 재래계 갈색종에서는 aa(0.34) 유전자형의 빈도가 가장 높았다. 외래종인 Rhode Island Red 종과 Cornish 종에서 ff의 유전자형 빈도가 각각 0.3과 0.27로 가장 높았다. 특히 Cornish 종에서는 15개의 유전자형이 확인되어

타 품종보다 다양한 유전자형이 분포되어 있음을 확인할 수 있었다(Table 1). 유전자형의 분포를 알아보기 위하여 Hardy-Weinberg test를 4개의 집단 모두에서 조사를 해본 결과 유의성이 없음이 확인되었다.

각 품종별 LEI0258 marker의 homozygote 빈도를 조사한 결과, 한국 재래계 흑색종이 0.7, 한국 재래계 갈색종 0.65, 로드 아일랜드 레드종 0.46, 코니쉬종 0.57로 한국 재래계 흑색종이 가장 높은 homozygote 빈도를 보였다. 특히 af와 ch 유전자형은 한국 재래계 흑색종에서만 나타났으며, ac, jj, jk 유전자형은 한국 재래계 갈색종에서만 나타났었다. 로드아일랜드 레드종에서만 탐색된 유전자형은 cc, ee, eh, fg였으며, 코니쉬종에서만 탐색된 유전자형은 cd, cf, dd, dh, di, hi, hj로 확인되었다. 또한, 대립 유전자 a는 한국 재래계 흑색종, 갈색종 및 로드 아일랜드 레드종에서는 관찰되었으나, 코니쉬종에서는 관찰되지 않았으며, b 대립 유전자는 재래계 흑색종 및 코니쉬종에서만 확인이 되었다. 본 연구에서 확인된 allele의 정확한 allele 크기와 polymorphism을 확인하기 위하여 증폭된 PCR 산물을 이용하여 염기서열을 분석하였다. 그 결과 총 13개의 allele type을 확인할 수 있었으며, 크기의 범위는 193 bp부터 443 bp 사이로 많은 크기의 변이가 있는

것을 확인할 수 있었다. 유전자형 분석 시 염기서열을 분석하지 않은 나머지 시료에 대해서는 전기영동 후 gel 상에서 유전자형을 추정하였다(Fig. 1). 본 연구에서 대립 유전자의 분석은 전 수수를 sequencing하지 않고 gel상에서 band의 크기를 확인하여 이루어졌기 때문에 한국 재래계 흑색종의 241 bp와 249 bp의 대립 유전자들은 동일한 “c” 대립 유전자로 분류가 되었으며, 한국 재래계 갈색종의 193 bp와 194 bp의 대립 유전자들은 동일한 “a” 대립 유전자로 분류가 되었다.

Allele 크기의 차이를 나타내는 가장 큰 원인은 repeat의 개수인데, 12 bp와 13 bp 두 종류의 repeat(R13 : CTATGCTC

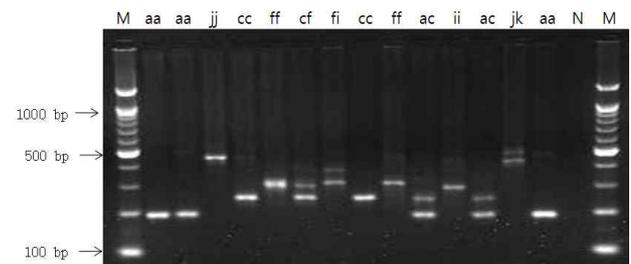


Fig. 1. Example of PCR results showing the genotypes for the LEI0258 marker in Korean native chicken.

Table 1. Genotype and allele frequencies for the LEI0258 microsatellite marker region in four different breeds. The information of alleles is shown in Table 2.

Korean Native Chicken Black		Korean Native Chicken Brown		Rhode Island Red		Cornish	
Genotype frequency	Allele frequency	Genotype frequency	Allele frequency	Genotype frequency	Allele frequency	Genotype frequency	Allele frequency
af (0.04)	a (0.02)	aa (0.34)	a (0.41)	aa (0.02)	a (0.02)	bb (0.03)	b (0.08)
bb (0.26)	b (0.3)	ac (0.15)	c (0.29)	cc (0.02)	c (0.04)	bc (0.03)	c (0.12)
bc (0.04)	c (0.15)	cc (0.18)	e (0.01)	cf (0.02)	e (0.22)	f (0.07)	d (0.12)
bf (0.04)	f (0.46)	cf (0.09)	f (0.18)	ee (0.12)	f (0.55)	cc (0.07)	f (0.37)
cc (0.09)	h (0.07)	ef (0.01)	i (0.02)	ef (0.16)	g (0.01)	cd (0.03)	h (0.08)
cf (0.04)		ff (0.12)	j (0.05)	eh (0.05)	h (0.16)	cf (0.03)	i (0.22)
ch (0.04)		fi (0.01)	k (0.04)	ff (0.3)		dd (0.07)	j (0.01)
ff (0.35)		ii (0.01)		fg (0.02)		dh (0.03)	
fh (0.09)		jj (0.01)		fh (0.28)		di (0.03)	
		jk (0.08)				ff (0.27)	
						fh (0.03)	
						fi (0.07)	
						hi (0.07)	
						hj (0.03)	
						ii (0.13)	

TCTTT, R12: CTTTCCTTCTTT)을 확인할 수 있었고 이들 repeat의 앞 부분(-30, -29, -10)에 3개의 SNP, 뒷 부분에서 'ATTTTGAG' INDEL 및 3개의 SNP(26, 28, 34)를 확인할 수 있었다(Fig. 2). 특히 13 bp repeat의 수에서 443 bp의 B haplotype은 15개의 13 bp repeat을 가짐으로서 PCR 반응 산물의 크기가 커진 것을 알 수 있었다. 또한 12 bp repeat은 B haplotype 13.1에서 18개로 구성되어 가장 많은 repeat 수를

보였다(Table 2). B haplotype 13과 17은 혈청학적으로 분류

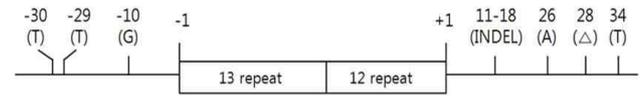


Fig. 2. Representation of the repeat structure, position of SNPs and deletions in the marker LEI0258 region.

Table 2. Sequencing analysis for the LEI0258 marker region in four chicken breeds

Breed	Samples No.	Consensus size (bp)	Position				Position				Genbank accession no.	B haplo-type	* Allele type
			-30-29 TT	-10 G	R13	R12	11-----18 ATTTTGAG	26 A	28 Δ	34 T			
Cornish	391	205	-	-	1	4	Δ	-	-	-	DQ239501	13	b
											DQ239505	13.2	
											DQ239514	17	
											DQ239560	BW11	
	398	295	Δ	-	1	11	-	-	-	-	DQ239496	11.1	d
											DQ239541	5	
											DQ239494	10	
	376	309	-	-	1	12	-	T	-	-	DQ239533	24	f
											DQ239537	26	
											DQ239554	76	
Rhode Island Red	381	381	-	-	1	18	-	T	-	-	DQ239504	13.1	i
											DQ239513	15.2	
	555	249	-	-	1	7	-	-	A	-	DQ239531	22	c
											DQ239551	73	
											DQ239496	11.1	
	559	295	Δ	-	1	11	-	-	-	-	DQ239541	5	d
											DQ239494	10	
											DQ239533	24	
											DQ239537	26	
	563	309	-	-	1	12	-	T	-	-	DQ239537	26	f
DQ239554											76		
DQ239513											15.2		
DQ239531											22		
Korean Native Chicken (Black)	528	241	-	-	1	7	Δ	-	-	-	DQ239531	22	c
											DQ239551	73	
	486	249	-	-	1	7	-	T	-	-	DQ239513	15.2	c
											DQ239531	22	
											DQ239551	73	
	508	309	-	-	1	12	-	T	-	-	DQ239494	10	f
											DQ239533	24	
											DQ239537	26	
											DQ239554	76	
	Korean Native Chicken (Brown)	260	193	-	-	1	3	Δ	-	-	-	DQ239512	15.1
DQ239495												11	
DQ239547												61	
207		194	-	A	1	3	Δ	-	A	-	DQ239561	BW3	a
											DQ239538	27	
205	443	-	-	15	8	-	-	-	-	DQ239544	6	j	

*The allele type is corresponded to the figure 1 for indicating homozygous and heterozygous.

되며 allele 크기는 205 bp이다. 기존 B haplotype 13과 17의 염기서열 분석에서는 단일 SNP(C/T)가 발견되었지만(Fulton 등, 2006) 본 연구에서는 SNP가 없는 것으로 확인되었다. Haplotype B15.1과 15.2는 혈청학적으로 유사하지만 다른 repeat 수로 구성되어 있었으며 다른 SNP(A/T)를 나타내고 있음을 확인할 수 있었다. Allele 193(B11)은 모든 품종에서 확인이 되었으며, B11 haplotype은 Marek's disease virus에 대해 저항성을 갖는다는 보고가 있다(Wakenell 등, 1996).

본 연구에서는 MHC 지역의 microsatellite marker를 이용하여 한국 재래닭 및 외국 품종의 유전자형을 분석하였으며, 4품종으로 구성된 175개 시료에서 LEI0258 microsatellite marker를 분석한 결과 총 25개의 다른 유전자형이 확인되었다. MHC 지역은 유전자 변이가 많은 부분이라 품종 특이 마커를 찾는 데 어려움이 있지만 다른 microsatellite marker들의 조합(Rikimaru와 Takahashi, 2007)을 함께 사용한다면 정확한 닭의 품종 구분이 가능할 것으로 판단되며, 이러한 DNA 마커 정보를 통해 품종을 보존하는데도 유용할 것으로 사료된다. 또한 기존의 많은 보고에서 밝혀진 바와 같이 MHC는 질병과의 관련성을 가지기 때문에 본 연구의 결과는 한국 재래닭의 질병 저항성 관련 연구의 기초 자료로 유용하게 이용될 것으로 사료된다.

적 요

닭의 MHC 유전자 내에 있는 microsatellite marker LEI0258은 혈청의 구분 및 질병 저항성 유전자로 많은 연구가 되어 있다. 본 연구는 유전변이가 있는 microsatellite marker LEI 0258을 한국 재래계 흑색종, 한국 재래계 갈색종, 코니쉬종, 로드 아일랜드 레드종에 적용하여 품종 특이 유전자형 및 allele을 탐색하고, 품종 구분 활용에 가능하지 여부를 실험하기 위하여 실시하였다. 한국 재래계만이 가지고 있는 특이 대립 유전자는 찾을 수는 없었지만 품종간 유전자형의 빈도 차이를 보이는 대립 유전자들을 확인할 수 있어 마커의 조합을 통하여 품종을 구분할 수 있는 가능성을 제시하였으며, 질병 저항성 연구의 기초 자료로 그 이용성이 높을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청의 FTA 대응기술개발사업(실용계 토종닭의 품종 식별 및 집단유전학적 분석)의 지원에 의해

수행되었습니다.

인용문헌

- 진선덕 서동원 심정미 백운기 정기철 장병귀 최강덕 이준현
2009 한국 재래닭 COI 유전자에 단일염기다형 분석. 한국가금학회지 36(1):85-88.
- Bacon LD, Witter RL 1994 B haplotype influence on the relative efficacy of Marek's disease vaccines in commercial chicken. Poult Sci 73:481-494.
- Cotter PF, Taylor RL Jr, Abplanalp H 1998 B-Complex associated immunity to *Salmonella enteritidis* challenge in congenic chickens. Poult Sci 77:1846-1851.
- Fulton JE, Juul-Madsen HR, Ashwell CM, McCarron AM, Arthur JA, O'Sullivan NP, Taylor RL Jr 2006 Molecular genotype identification of the *Gallus gallus* major histocompatibility complex. Immunogenetics 58(5-6):407-421.
- Hall TA 1999 BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. Nucl Acids Symp Ser 41:95-98.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR 2003 Biological identifications through DNA barcodes. Proc R Soc Lond B Biol Sci 270:313 - 321.
- Lillehoj HS, Ruff MD, Bacon LD, Lamont SJ, Jeffers TK 1989 Genetic control of immunity to *Eimeria tenella*. Interaction of MHC genes and non-MHC linked genes influences levels of disease susceptibility in chickens. Vet Immunol Immunopathol 20:135-148.
- Miller MM, Bacon LD, Hala K, Hunt HD, Ewald SJ, Kaufman J, Zoorob R, Briles WE 2004 2004 Nomenclature for the chicken major histocompatibility (B and Y) complex. Immunogenetics 56(4):261-279.
- O'Neill AM, Livant EJ, Ewald SJ 2009 The chicken BF1 (classical MHC class I) gene shows evidence of selection for diversity in expression and in promoter and signal peptide regions. Immunogenetics 61(4):289-302.
- Rikimaru K, Takahashi H 2007 A method for discriminating a Japanese brand of chicken, the Hinai-jidori, using microsatellite markers. Poult Sci 86(9):1881-1886.
- Taylor RL Jr 2004 Major histocompatibility (B) complex control of responses against *Rous sarcomas*. Poult Sci 83:636-

649.
Wakenell PS, Miller MM, Goto RM, Gauderman WJ, Briles WE 1996 Association between the Rfp-Y haplotype and the incidence of Marek's disease in chickens. *Immunogenetics* 44(4):242-245.
- Yoo BH, Sheldon BL 1992 Association of the major histocompatibility complex with avian leukosis virus infection in chickens. *Br Poult Sci* 33:613-620.
- (접수: 2009. 11. 27, 수정: 2009. 12. 19, 채택: 2009. 12. 19)