

A Novel SNP in the Exon 8 Region of the CLMN Gene and Its Association with Marbling Score in Hanwoo

Sung-Chul Shin and Eui-Ryong Chung*

Department of Animal Biotechnology, College of Life Science, Sangji University, 83, Sangjidaegil, Wonju-si, Gangwon-do 26339, Korea

Received October 29, 2019 / Revised December 17, 2019 / Accepted December 23, 2019

This study aimed to identify single nucleotide polymorphisms in exon 8 region of the calmin (CLMN) gene and to evaluate their associations with meat yield and quality traits in Hanwoo (Korean cattle). We compared gene expression pattern of CLMN between high and low marbling score groups with extremely different intramuscular fat content of the longissimus lumborum muscles in Hanwoo. The CLMN gene was highly expressed in the high marbling score group. Total of nine SNPs were identified in the exon 8 region of CLMN gene, genotyping of the SNPs was carried out using direct-sequencing analysis in Hanwoo population (n=300) to evaluate their association with meat yield and quality traits. As a result, g.23249G>C in exon 8 was significantly associated with marbling score. Animals with the CC and GC genotypes had higher marbling score than those with the GG genotype. We constructed haplotypes of CLMN gene by linkage disequilibrium analysis and analyzed association between haplotypes and meat yield and quality traits. Haplotype of CLMN gene was associated with marbling score. As a result, animals with the CC-CC haplotype (g.23249G>C and g.23465T>C SNPs) had higher marbling score than those with CT and GT haplotypes. These findings suggest that the SNPs of bovine CLMN gene may be a useful molecular marker for selection of meat quality traits in Hanwoo.

Key words : Calmin gene, gene expression, Hanwoo, marbling score, SNP

서 론

최근 분자유전학적 기술의 발전에 따라 가축의 육종개량에 분자유전기술을 접목하는 수 많은 연구가 수행되고 있으며, 특히 동물 유용유전자 탐색, 개발 및 이용에 관한 연구에 상당한 성과가 축적되어 동물 유전정보의 분석 및 이용에 대한 기술은 동물산업의 핵심기술 분야로 평가 받고 있다[7, 8]. 특히, MAS (marker-assisted selection) 기술을 이용하여 자질이 우수한 한우를 조기에 선발하여 육종하는 기술의 개발은 전통적인 선발육종 체계의 한계성을 뛰어 넘어 가축의 유전능력을 향상시킬 수 있는 매우 유용한 기술 분야로 인정받고 있다[12, 13]. 이에 따라 그동안 국내에서도 한우의 육량 및 육질 등 주요 경제형질과 관련된 MAS 선발육종기술 개발에 관한 연구가 활발히 수행되어 왔다[2, 3, 6, 10, 11]. 동물에서 특정 형질이 발현됨에 있어서 여러 가지의 다양한 유전자가 동시에 관여한다는 다인자유전 현상에 입각하여 판단해 볼 때 더욱 정확하고 효율적인 한우의 MAS 선발육종기술을 개발하고 활용

하기 위해서는 보다 다양한 후보유전자들을 대상으로 폭 넓은 연구가 지속되어야 한다.

본 연구에서 한우의 육질형질 관련 기능성 후보유전자로 선정된 CLMN (calmin) 유전자는 소의 21번 염색체 상에 위치하고 있으며, 인간의 statin을 매개하여 지질의 축적반응에 관여하여 총 콜레스테롤 수치 및 각종 근육 증상들과 관련이 있는 것으로 보고되어 있다[1]. 최근 Shin 등(2016a)은 차세대 염기서열분석 기법을 이용한 whole exome sequencing 분석을 통하여 한우 등심조직에서 근내지방도 등급 간 유의적인 차이를 나타내는 총 840개의 SNP를 발굴하였는데 그 가운데 CLMN 유전자가 포함되어 있는 것으로 보고하였다. 그러나, 현재까지 CLMN 유전자의 SNP와 육량 및 육질형질과의 연관성을 분석한 연구는 전무한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 동물 생체 근육 내 지질반응에 관여하는 CLMN 유전자를 대상으로 한우 등심조직의 근내지방도 등급 간 유전자 발현양상을 비교 분석하고, CLMN 유전자의 coding 영역 내에 존재하는 single nucleotide polymorphism (SNP)를 탐색 및 발굴하여 한우의 육질형질과 밀접하게 연관되어 있는 새로운 SNP를 규명하고자 수행하였다.

재료 및 방법

공시재료

한우 등심조직의 고급육 집단과 저지방육 집단 간의 CLMN

*Corresponding author

Tel : +82-33-730-0541, Fax : +82-33-730-0541

E-mail : erchung@sangji.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

유전자 발현량 비교 동정을 위해 (주) 강원LPC 도축장에서 서로 혈연관계가 없는 27개월령 거세 한우 1st등급 5두(고지방육 그룹)와 2등급 이하 5두(저지방육 그룹)의 등심조직을 채취하였다. 각 개체별 등심조직 시료는 도축 후 30분 이내에 채취하여 즉시 액체질소로 냉각시켜 공기 중 RNase에 의한 RNA 분해를 최대한 차단시켜 보관하였으며, 이들로부터 total RNA를 분리 및 정제하여 cDNA 합성용 표준시료로 사용하였다. CLMN 유전자의 주요 SNP에 대한 각 개체별 유전자형 분석을 위해 국가 후대검정우 집단 300두의 혈액시료를 수집하여 이들로부터 genomic DNA를 추출 및 정제하여 분석에 활용하였다. 수집한 국가후대검정우 집단에 대한 도체형질 관련 표현형 측정치 성적과 육종가 추정치 성적을 수집하여 CLMN 유전자의 single SNP marker 및 haplotype과 한우 도체형질과의 연관성 통계분석 자료로 사용하였다.

한우 등심조직의 total RNA 추출 및 cDNA 합성

한우 등심조직의 total RNA의 추출은 easy-spinTM Total RNA Extraction Kit (Intron biotechnology, USA)를 이용하여 제조회사의 안내에 따라 추출하였다. RT-PCR을 통한 cDNA 합성을 위해 Transcriptor first strand cDNA synthesis kit (Roche, Germany)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA 합성은 total RNA 1 µl에 oligo (dT) primer를 첨가하고 DEPC 처리된 멸균증류수를 이용하여 13 µl로 조정된 다음 65°C에서 10분간 변성 후 4°C에서 냉각하였다. 그 다음, 5X buffer 4 µl, dNTP 2 µl, RNase inhibitor 0.5 µl 및 reverse transcriptase 0.5 µl를 첨가하여 50°C에서 60분간 반응시킨 후, 85°C에서 5분간 reverse transcriptase를 불활성화 시킴으로써 cDNA를 합성하였다. 최종적으로, 합성된 cDNA들의 농도 및 순도를 측정하고 각 개체별 cDNA 농도를 200 ng/µl의 농도로 정확히 동량 희석하여 ddRT-PCR (differentially display reverse transcriptase-PCR)과 qRT-PCR (quantitative real time-PCR) 실험에 사용하였다.

한우 고지방육 및 저지방육 그룹 간의 CNMN 유전자 발현량 비교

한우 고지방육 및 저지방육 그룹 간의 CLMN 유전자의 발현량 비교 분석을 위해 ddRT-PCR 및 qRT-PCR 분석을 수행하였다. Table S1에 제시한 primer를 설계 및 합성하여 실험을 수행하였으며, GAPDH 유전자를 보정유전자(control gene)로 사용하여 유전자 발현량을 비교하였다. ddRT-PCR 분석은 각 개체별 cDNA 200ng에 10 pmols/µl F, R primer 각 1 µl, dNTP 200 µM, Tap DNA 중합효소 1 U, 10X PCR 완충용액 2 µl를 혼합하여 총 20 µl 부피로 반응액을 조성한 후 PCR 증폭반응을 수행하였다. 증폭이 완료된 증폭산물들은 2.5% agarose gel에 전기영동하여 각 개체별 DNA band의 발현양상을 비교 분석하였다.

qRT-PCR 분석은 QuantiTect SYBR Green primix (Qiagen, USA) kit와 ABI 7500 system (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 다음과 같이 수행하였다. First strand cDNA 2 µl (200 ng), 10 pmols/µl primer 각 1 µl, 2X QuantiTect SYBR Green 10 µl, 그리고 멸균 증류수로 전체 20 µl로 맞추어 PCR 반응을 수행하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 15초, 58°C에서 25초, 72°C에서 20초간으로 총 40회 cycle을 수행하였다. ABI 7500 system (Applied Biosystems, USA) 장치를 이용하여 증폭이 완료된 PCR 증폭산물에 대한 real-time PCR을 수행하였다. 유전자 발현의 상대적 정량은 $\Delta\Delta Ct$ 값(시료의 Ct 값 - GAPDH의 Ct 값)을 계산하고, $\Delta\Delta Ct$ 값(시료의 ΔCt 값 - 비교할 시료의 ΔCt 값)을 구하여 고지방육 그룹의 시료를 1로 보았을 때의 상대적 정량을 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 값으로 계산하였다.

한우 CLMN 유전자의 SNP 탐색 및 유전자형 분석

한우 CLMN 유전자의 SNP 탐색 및 각 검정대상 개체별 SNP genotyping을 위해 direct-sequencing을 수행하였다. Direct-sequencing 분석은 정제된 PCR 증폭산물을 forward 및 reverse primer를 각각 다른 tube에 분주하고, BigDye Ver. 3.1 sequencing kit (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 양방향으로 direct sequencing 반응을 수행하였다. PCR 증폭산물을 ZR DNA Sequencing Clean-UP kit (ZYMO RESEARCH, USA)을 이용하여 BigDye 및 primer를 제거한 다음 70% ethanol로 세척하여 sequencing 반응물을 정제하였다. 그 다음 10

Table 1. Association analysis between g.23249G>C SNP marker of CLMN gene and meat quality traits in Hanwoo (n=300)

SNP	Traits	SNP genotype (n)			P-value	Genetic effect	
		GG (161)	GC (118)	CC (21)		Additive	Dominance
CLMN g.23249G>C	LW	538.461±6.742	537.105±7.887	537.142±18.376	0.990	1.318±19.574	-1.393±25.139
	CW	307.730±4.056	306.236±4.744	302.714±11.055	0.903	5.016±11.775	2.028±15.123
	LDA	77.211±1.061	74.578±1.241	73.000±2.893	0.165	4.211±3.081	-1.053±3.957
	BF	0.776±0.035	0.663±0.041	0.714±0.095	0.114	0.062±0.102	-0.164±0.131
	MS	2.153±0.203 ^b	2.894±0.238 ^a	2.857±0.555 ^a	0.005	-0.703±0.591 ^{**}	0.778±0.760

LW: live weight, CW: carcass weight, LDA: musculus longissimus dorsi area, BF: backfat thickness, MS: marbling score.

** P<0.01, ^{a,b}Within a row, means with different superscript letter differ (p<0.05).

μl의 formamide로 반응물을 현탁하고, 95°C에서 2분간 변성 및 급속 냉각 과정을 거쳐 ABI 3130xl DNA analyzer (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 염기서열을 분석하여 각 개체별 CLNM 유전자의 SNP 유전자형을 결정하였다.

한우 CLMN 유전자의 SNP genotype과 육질형질과의 연관성 분석

한우 CLMN 유전자의 각 SNP marker의 대립유전자 및 유전자형 출현빈도를 분석하고, SNP 유전자형에 대한 이형접합체율(He)과 다형정보량(PIC)을 분석하여 각 분자표지별 다형성을 비교 분석하였다. 각 SNP marker별 χ^2 통계검정을 수행하여 검정 집단에 대한 하디-와인버그 평형 여부를 분석하고, 최종적으로 SNP marker 유전자형과 한우 도체형질 표현형 측정치와의 연관성 분석을 통해 분자표지의 유효성을 검증하였다. 각 SNP marker 유전자형과 한우 육량 및 육질형질 관련 도체성적 표현형 측정치와의 통계분석은 SAS 9.2 Package/PC를 이용하여 아래에 제시한 통계 모형으로 ANOCVA (analysis of covariance, 공분산분석)을 수행하였다.

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + YS_j + P_k + G_l + e_{ijkl}$$

여기에서, Y_{ijkl} 는 도체형질에 대한 표현형 관측치, μ 는 전체 평균, S_i 는 종모우에 대한 임의효과, YS_j 는 분만 년도 및 계절에 대한 고정효과, P_k 는 분만 장소에 대한 고정효과, G_l 은 SNP genotype 효과를 나타낸다. 각 SNP marker별로 SNP 유전자형 효과의 유의성이 나타난 형질들에 대해서는 던컨의 다중검정을 수행하여 유전자형별 유의성을 검정하였다.

한우 CLMN 유전자의 Haplotype과 육질형질과의 연관성 분석

연관불평형 분석을 통해 각 후보유전자 SNP pair 간의 Lewontine's D ($|D'|$)값 (Hedrick, 1987)과 두 개 SNP 간의 상관계수(r^2)를 추정하여 통계적 상관관계 정도를 분석하였다. 본 연구에서는 SNP pair 간 강한 연관불평형을 나타내는 SNP 조합에 의한 haplotype을 구성하기 위하여 SNP-Studio™ (ISTECH. Co., Ltd, Korea) 프로그램을 이용하여 D'의 값이 0.7 이상이 되는 SNP 조합에 의한 haplotype block을 구성하였다. CLMN 유전자의 haplotype과 한우 도체형질과의 연관성 분석은 각 개체의 haplotype 조합들이 임의적으로 다음세대 유전되기 때문에 haplotype을 임의 효과로 설정하여 앞서 제시한 통계 모형으로 ANOCVA 분석을 수행하였다.

결과 및 고찰

한우 고지방육 및 저지방육 그룹 간의 CLMN 유전자 발현량 비교

ddRT-PCR 기법을 이용한 한우 등심 조직의 고지방육 및 저지방육 그룹 간 CLMN 유전자의 발현양상을 비교 분석한 결과 Fig. 1A에 제시한 바와 같이 high marbling 그룹이 low marbling 그룹에 비해 높게 발현된 것으로 관찰 되었다. 보다 정확한 mRNA 발현정량 비교 분석을 위하여 qRT-PCR 분석 기법을 이용하여 한우 CLMN 유전자에 대한 발현정량 비교 검증을 수행한 결과 Fig. 1B에 제시한 바와 같이 저지방육 그룹에 비해 고지방육 그룹의 평균 발현량이 약 7.82배 높게 나

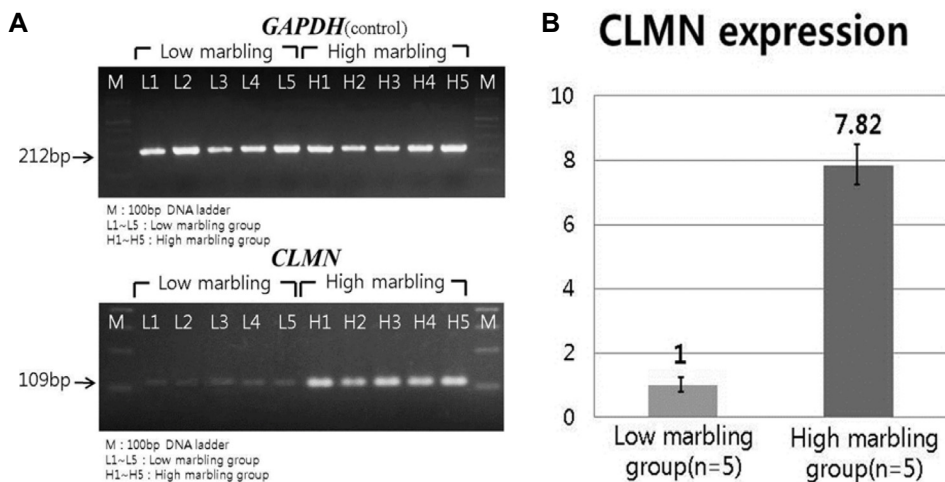


Fig. 1. Gene expression of CLMN gene between high- and low-marbling score grades of the loin muscle in Hanwoo. (A) The mRNA expression of CLMN gene by differentially expressed reverse transcriptase-PCR analysis. (B) The relative quantification of mRNA level for CLMN gene using quantitative real-time PCR analysis. Data are shown as means \pm SD and P-value. The relative quantification of gene expression was analysis using $\Delta\Delta Ct$ method. The ΔCt value was determined by subtracting the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) Ct value for each sample from the target Ct value. The $\Delta\Delta Ct$ was calculated by subtracting the low-marbled group ΔCt value from the high-marbled group ΔCt value. Fold change in the relative gene expression of target were determined by calculating the $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

타났다.

Lee 등(2008)은 한우의 등심조직에서 근내지방도가 높은 그룹과 낮은 그룹 사이에서 5개의 후보유전자(FABP4, SCD, PPAR γ , Titin 및 Nebulin)의 발현량을 비교 검증하였는데, 이들 가운데 FABP4 유전자는 근내지방도가 높은 그룹에서 발현량이 높게 나타났으며, SCD와 PPAR γ 유전자는 근내지방도가 낮은 그룹에서 발현량이 높은 것으로 보고하였다. 또한 Shin과 Chung (2016)은 한우 등심조직에서 근내지방도가 높은 그룹과 낮은 그룹 사이에서 차등적으로 발현되는 총 137개의 유전자를 발굴하였는데 그 가운데 41개 유전자는 근내지방도가 높은 그룹에서 발현량이 높게 나타났으며, 96개 유전자는 근내지방도가 낮은 그룹에서 발현량이 높게 나타난 것으로 보고하였다. 한편, 본 연구에서 검증한 CLMN 유전자는 근내지방도가 높은 그룹에서 약 7.82배 더 높게 발현되었는데, 현재까지 한우를 포함한 육우품종을 대상으로 CLMN 유전자의

발현량 비교 검증 연구는 수행된 바 없다. 따라서, 본 연구를 통해 한우의 근내지방도 형질과 관련이 있는 새로운 후보유전자를 발굴한 것으로 사료된다.

한우 CLMN 유전자의 SNP 발굴 및 유전자형 분석

한우 CLMN 유전자의 SNP 탐색 및 각 검정대상 개체별 SNP genotyping을 위해 direct-sequencing을 수행한 결과 exon 8번 영역에서 총 9개의 SNP를 검출하였다. Fig. 2A와 B에 제시한 바와 같이 아미노산 치환에 관여하는 non-synonymous SNP는 총 5개가 검출되었으며(g.23465T>C, g.22159A>G, g.22725T>C, g.22794G>C 및 g.22818T>G), 아미노산의 변화가 없는 synonymous SNP가 총 4개(g.22154T>C, g.22790A>G, g.23249G>C 및 g.23465T>C) 검출되었다. 각 SNP marker 별 유전자형을 분석하여 대립유전자 및 유전자형 출현빈도를 분석하고, SNP유전자형에 대한 이형접합체율과 다형정보량

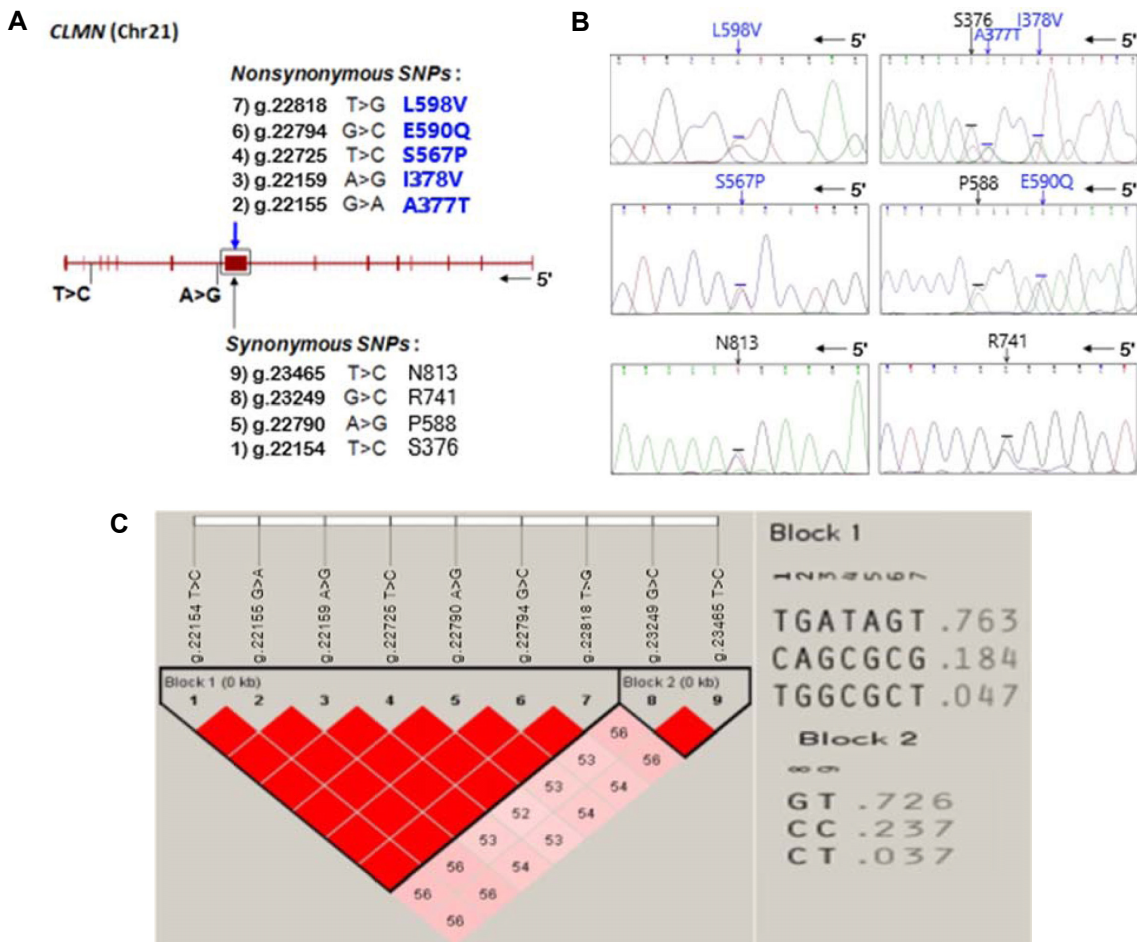


Fig. 2. SNP annotation and linkage disequilibrium analysis among SNPs of CLMN gene in Hanwoo. (A) SNP annotation of CLMN gene in exon 8 region (NCBI bovine Reference Seq. AC_000178.1). (B) Sequence chromatograms of SNP genotype of CLMN gene by using direct-sequencing. (C) Linkage disequilibrium analysis among SNPs of CLMN gene in Hanwoo. The color code on the Haploview plot follow the standard color scheme: shades of pink/red ($|D'| < 1$, $LOD \geq 2$); bright red ($|D'| = 1$, $LOD \geq 2$). The number in cells are D' value.

을 분석하여 각 분자표지별 다형성을 비교 분석하여 Table S2에 제시하였다.

한우 CLMN 유전자의 SNP genotype과 육질형질과의 연관성 분석

후대검정우 총 300두를 대상으로 수행한 총 9개 SNP들에 대한 SNP genotype과 한우 도체성적 표현형 측정치와의 연관성 통계 분석을 통해 각 SNP marker 유전자형이 경제형질에 미치는 효과를 추정하였다. Table 1에 제시한 바와 같이 CLMN g.23249G>C에서 근내지방도(marbling score, MS)와의 고도의 연관성이 입증되었다($p<0.01$). 즉, GG 유전자형을 가진 개체들이 GC 및 CC 유전자형을 가진 개체들에 비해 약 0.714 및 0.704 정도 유의적으로 낮게 나타났으며 상가적 효과를 갖는 것으로 확인되었다. 한편, CLMN g.23465T>C에서는 근내지방도 형질과의 유의적 연관성이 확인되진 않았지만, $p=0.053$ 으로서 매우 유의성에 근접한 결과를 도출하였으며, 등지방두께에서도 $p=0.065$ 로서 유의성에 근접한 결과가 도출되었다(Table S3). 그 밖의 나머지 7개 SNP 들에서는 한우의 육량 및 육질형질과의 연관성이 입증되지 않았다(Table S3).

한우 CLMN 유전자의 Haplotype과 육질형질과의 연관성 분석

연관불평형 분석은 각 SNP pair 간의 Lewontine's D ($|D'|$) 값과 두 개 SNP 간의 상관계수(r^2)를 추정하여 통계적 상관관계가 어느 정도 되어 있는지를 나타내는 것으로서 연관불평형의 유의수준은 $D'>0.5$ 와 $r^2>0.1$ 이다[5]. 또한, Gabriel 등(2002)의 보고에 의하면, 95% 신뢰구간에서 D' 의 값의 상한치가 0.98 이상이고, 하한치가 0.7 이상이 되면 강한 연관불평형이 되는 것으로 보고하였다. Gabriel 방법에서는 D' 에 기반을 둔 pairwise SNP를 이용하여 유전자 재조합이 많이 일어나서 변이가 생긴 지역을 찾고 block을 유전자 재조합이 거의 일어나지 않았거나 일어나지 않은 연속적인 SNP의 세트로 정의하였다 즉, haplotype block의 지정은 95% 신뢰범위에서 상한치가 0.98 이상이고 하한치가 0.7 이상일 때 SNP 간에 강한 연관불평형이 되었다. 따라서, 본 연구에서는 SNP pair 간 강한 연관불평형을 나타내는 SNP 조합에 의한 haplotype을 구성하

기 위하여 haploview 4.2 (Broad Institute, USA) 프로그램을 이용하여 Haplotype block을 구성하였다. Fig. 2C에 제시한 바와 같이 CLMN 유전자의 총 9개 SNP 좌위들을 대상으로 연관불평형 분석을 수행한 결과 7개 SNP (g.22154T>C, g.22155G>A, g.22159A>G, g.22725T>C, g.22790A>G, g.22794G>C 및 g.222818T>G) 조합으로 구성된 block 1과 2개 SNP (g.23249G>C 및 g.23465T>C) 조합으로 구성된 block 2의 2가지 haplotype이 구성되었다. CLMN 유전자의 haplotype과 한우 도체형질과의 연관성을 분석한 결과 Fig. 2C에 제시한 block 1 조합에 의한 haplotype에서는 그 어떤 형질과도 연관성이 도출되지 않았으나, block 2 조합에 의한 haplotype에서는 Table 2에 제시한 바와 같이 근내지방도와 유의적 연관성이 입증되었다($p<0.05$). 즉, CC-CC haplotype을 가진 개체들이 CT 및 GT haplotype을 가진 개체들에 비해 약 0.351 및 0.672 정도 유의적으로 높은 값을 나타냈다.

본 연구에서 한우의 육질 관련 후보유전자로 선정된 CLMN 유전자는 현재까지 주로 인간의 근육 증후군 관련 질환들의 유전적 연구에 활용되어 왔으며, 육우를 대상으로 육질 연관성 분석에 관한 연구는 전무한 실정이다. Barber 등(2010)에 의하면 CLMN 유전자는 statin을 매개하여 지질의 축적반응에 관여하여 인간의 혈액 내 총 콜레스테롤 수치 및 각종 근육 관련 질환 증상들과 관련이 있는 것으로 보고되어 있다. 특히 CLMN유전자 내에 위치한 SNP rs8014194는 베이지안 분석에 의한 확률 84%를 가진 총 콜레스테롤의 상태 매개 변화, 그리고 유전자 전체의 중요성에 대한 기존 수준을 초과하는 p -값과 강력하게 연관되어 있다[1]. 이러한 유전자의 기능적 특징을 살펴볼 때 소의 근내지방 축적에도 영향을 미칠 수 있는 잠재적 능력을 지닌 새로운 한우 육질형질 관련 후보유전자로 활용하기에 적합한 것으로 판단된다. 본 연구에서는 CLMN 유전자의 exon 8번 영역 내 존재하는 SNP들로 구성된 haplotype과 한우 근내지방도와 고도의 유의적 연관성이 입증되었다($p<0.01$). 이러한 결과로 미루어 볼 때 CLMN유전자는 향후 한우의 육질형질 관련 분자표지로서의 활용 가치가 매우 높을 것으로 사료된다. 따라서, 본 연구를 통해 발굴된 CLMN 유전자의 SNP와 haplotype은 육질형질이 우수한 한우 개체 조기 선발을 위한 새로운 DNA marker로 활용될 가능성이

Table 2. Association analysis between Haplotypes of CLMN gene and meat quality traits in Hanwoo

Traits	Least square means ± SD of CLMN haplotypes (Block 2)			P-value
	CC-CC	CT	GT	
LW (kg)	531.698±6.693	540.754±6.693	538.847±3.125	0.569
CW (kg)	302.339±4.014	307.773±4.014	307.679±1.875	0.470
LDA (cm ²)	73.849±1.054	74.075±1.054	76.692±0.492	0.103
BF (cm)	0.662±0.035	0.715±0.035	0.752±0.016	0.060
MS (1~9)	2.943±0.200 ^a	2.592±0.200 ^{ab}	2.271±0.093 ^b	0.002

LW: live weight, CW: carcass weight, LDA: musculus longissimus dorsi area, BF: backfat thickness, MS: marbling score.

^{a,b}Within a row, means with different superscript letter differ ($p<0.05$).

있음을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 2018년도 상지대학교 교내연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

- Barber, M. J., Mangravite, L. M., Hyde, C. L., Chasman, D. I., Smith, J. D., McCarty, C. A., Li, X., Wilke, R. A., Rieder, M. J., Williams, P. T., Ridker, P. M., Chatterjee, A., Rotter, J. I., Nickerson, D. A., Stephens, M. and Krauss, R. M. 2010. Genome-wide association of lipid-lowering response to statins in combined study populations. *PLoS One* **5**, e9763.
- Cheong, H. S., Yoon, D. H., Kim, L. H., Park, B. L., Lee, H. W., Han, C. S., Kim, E. M., Cho, H., Chung, E. R., Cheong, I. and Shin, H. D. 2007. Titin-cap (TCAP) polymorphisms associated with marbling score of beef. *Meat Sci.* **77**, 257-263.
- Cho, S., Park, T. S., Yoon, D. H., Cheong, H. S., Namgoong, S., Park, B. L., Lee, H. W., Han, C. S., Kim, E. M., Cheong, I. C., Kim, H. and Shin, H. D. 2008. Identification of genetic polymorphisms in FABP3 and FABP4 and putative association with back fat thickness in Korean native cattle. *BMB Rep.* **41**, 29-34.
- Gabriel, S. B., Schaffner, S. F., Nguyen, H., Moore, J. M., Roy, J., Blumenstiel, B., Higgins, J., DeFelice, M., Lochner, A., Faggart, M., Liu-Cordero, S. N., Rotimi, C., Adeyemo, A., Cooper, R., Ward, R., Lander, E. S., Daly, M. J. and Altshuler, D. 2002. The Structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* **296**, 2225-2229.
- Hedrick, P. W. 1987. Gametic disequilibrium measures: proceed with caution. *Genetics* **117**, 331-341.
- Kim, N. K., Seo, Y. W., Kim, G. H., Joh, J. H., Kim, O. H., Chung, E. R. and Lee, C. S. 2004. A previously unreported DraI polymorphism within the regulatory region of the bovine growth hormone gene and its association with growth traits in Korean Hanwoo cattle. *Anim. Genet.* **35**, 152-154.
- Kong, H. S., Oh, J. D., Lee, J. H., Yoon, D. H., Choi, Y. H., Cho, B. W., Lee, H. K. and Jeon, G. J. 2007. Association of sequence variations in DGAT 1 gene with economic traits in Hanwoo (Korean cattle). *Asian-Aust. Anim. Sci.* **20**, 817-820.
- Lee, H. J., Lee, S. H., Cho, Y. M. and Yoon, D. H. 2004. Association between the polymorphism on intron 5 of the lipoprotein lipase gene and carcass traits in Hanwoo (Korean cattle). *Kor. J. Anim. Sci. Technol.* **46**, 947-956.
- Lee, S. H., Cho, Y. M., Lee, S. H., Kim, B. S., Kim, N. K., Cho, Y. H., Kim, K. H., Yoon, D., Im, S. K., Oh, S. J. and Park, E. W. 2008. Identification of marbling-related candidate genes in *M. longissimus dorsi* of high- and low-marbled Hanwoo (Korean native cattle) steers. *BMB Rep.* **41**, 846-851.
- Lee, S. H., Van Der Werf, J. H. J., Lee, S. H., Park, E. W., Oh, S. J. and Gibson, J. P. 2010. Genetic polymorphisms of the bovine Fatty acid binding protein 4 gene are significantly associated with marbling and carcass weight in Hanwoo (Korean Cattle). *Anim. Genet.* **41**, 442-444.
- Shin, H. D. 2006. Growth hormone-releasing hormone (GHRH) polymorphisms associated with carcass traits of meat in Korean cattle. *BMC Genet.* **7**, 35-40.
- Shin, S. C. and Chung, E. R. 2007a. SNP Detection of Carboxypeptidase E gene and its association with meat quality and carcass traits in Korean cattle. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **20**, 328-333.
- Shin, S. C. and Chung, E. R. 2007b. Association of SNP marker in the thyroglobulin gene with carcass and meat quality traits in Korean cattle. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **20**, 172-177.
- Shin, S., Hong, C., Song, S., Ahn, K. and Chung, E. 2016a. Single nucleotide polymorphisms in exons of high- and low-marbled meats in Korean cattle. *Anim. Genet.* **47**, 756-757.
- Shin, S. C. and Chung, E. R. 2016b. Identification of differentially expressed genes between high and low marbling score grades of the longissimus lumborum muscle in Hanwoo (Korean cattle). *Meat Sci.* **121**, 114-118.

초록 : 한우 CLMN 유전자 exon 8번 영역의 신규 단일염기다형과 근내지방도의 연관성에 관한 연구

신성철 · 정의룡*

(상지대학교 동물생명공학과)

본 연구는 한우 CLMN 유전자 exon 8번 영역의 단일염기다형과 육량 및 육질형질과의 연관성을 평가하기 위해 수행하였다. 또한, 한우 등심조직에서 근육 내 지방함량의 극명한 차이를 나타내는 고지방육 그룹과 저지방육 그룹 간 CLMN 유전자의 발현양상을 비교 분석하였다. 그 결과 CLMN 유전자는 고지방육 그룹에서 더 높게 발현되었다. 한우 CLMN 유전자의 exon 8번 영역에서 총 9개의 단일염기다형을 검출하였으며, 이들 SNP의 유전자형과 육량 및 육질형질과의 연관성을 평가하기 위해 direct-sequencing 분석을 통하여 각 개체별 SNP genotyping을 수행하였다. 그 결과, exon 8번 영역 내에 존재하는 g.23249G>C SNP가 근내지방도 형질과 유의적인 연관성이 있는 것으로 분석되었다 즉, CC 및 GC 유전자형을 가진 개체들은 GG 유전자형을 가진 개체들에 비해 유의적으로 더 높은 근내지방도를 갖는 것으로 분석되었다. 연관불평형 분석을 통해 CLMN 유전자의 haplotype을 구성하고 육량 및 육질형질과의 연관성을 분석한 결과 근내지방도와 유의적 연관성이 입증되었다. 즉, CC-CC haplotype (g.23249G>C and g.23465T>C SNPs)을 가진 개체들이 CT 및 GT haplotype을 갖는 개체들에 비해 유의적으로 더 높은 근내지방도를 갖는 것을 확인하였다. 따라서 본 연구에서 발굴된 CLMN 유전자의 SNP는 육량과 육질형질이 우수한 한우를 선발하기 위한 분자 마커로 활용 가능할 것으로 사료된다.