

발간등록번호
11-1543000-002008-01

**모돈 생애총생산성 향상을 위한
고산차모돈의 번식/면역능력 증대 및 조기선발지표 개발**

(Development of techniques
to improve sow lifetime productivity)

고려대학교 산학협력단

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “모든 생애총생산성 향상을 위한 고산차모돈의 번식/면역능력 증대 및 조기선발지표 개발”(개발기간 : 2014.09.25 ~ 2017.09.24)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018.01.04.

주관연구기관명 : 고려대학교 산학협력단 (인)

주관연구책임자 : 홍 기 창

세부연구책임자 : 송 권 화

세부연구책임자 : 전 태 훈

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	114065-3	해당 단계 연구 기간	2014.09.25 - 2017.09.24	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단계)
연구 사업 명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구 과제 명	대 과 제 명	모든 생애총생산성 향상을 위한 고산차모돈의 번식/면역능력 증대 및 조기선발지표 개발			
	세 부 과 제 명	제1세부 : 모든의 생애총생산성 향상을 위한 조기선발지표개발 제2세부 : 모든의 산차별 유전자발현 네트워크분석을 통한 착상률 증진기술 개발 제3세부 : 모든의 면역조절을 통한 자돈생존율 개선기술 개발			
연구 책임 자	홍기창	해당단계 참 여 연구원 수	총: 57명 내부: 54명 외부: 3명	해당단계 연구 개발 비	정부:780,000천원 계:780,000천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 57명 내부: 54명 외부: 3명	총 연구개발비	정부:780,000천원 계:780,000천원
연구기관명 및 소 속 부 서 명	제1세부 : 고려대학교 산학협력단 제2세부 : 고려대학교 산학협력단 제3세부 : 고려대학교 산학협력단			참여기업명	
위 탁 연 구	연구기관명:			연구책임자: 홍기창	
국내 모든의 생애총생산성의 실태를 조사하였다. porcine 60k SNP chip분석을 통해 모든의 생애총생산성 형질에 미치는 주요 염기변이를 Screening하고, 유효DNA마커들의 최적 유전자형 조합을 선정하여 생애총생산성이 우수한 종돈선발에 활용할 수 있는 조기선발기법을 개발하였다. 모든의 산차에 따른 임신초기 착상과정동안 태아발달 및 태반 형성에 있어 유용물질의 효과를 검증하고 그에 관련된 조절 네트워크를 다각적으로 분석하였다. 이를 통해 유용물질의 효과적인 전달을 위한 사료첨가물 개발하였다. 모든의 Th1/Th2 면역상태를 조절할 수 있는 유용물질을 screening하고 생쥐 면역세포를 이용하여 유용물질의 효과 및 분자적 기전을 연구하였다. 또한, 이러한 유용물질을 사료첨가물로 사용함으로써 임신모돈의 사료첨가물 급여에 의한 자돈생존율을 측정하여 유용성을 평가하였다.				보고서 면수 211쪽	

〈 국문요약 〉

	코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<p>모든의 생산성을 나타내는 지표들은 그동안 ‘산자능력’에 초점을 맞추어왔으나 최근에는 번식지속성의 개념이 추가되어 ‘생애총생산능력’이 주목 받고 있다. 즉, ‘산자수’와 ‘이용산차’의 두 마리토끼를 잡아야 모든생산성을 극대화 시킬 수 있음을 의미한다. 그러나 우리의 현실은 그렇지가 못하다. 우리나라의 모든은 평균적으로 2.8산차에 도태되고 있는데, 이는 외국에 비교하여 많게는 1.5산차 적게 이용되고 있는 실정이며, 낮은 MSY(모돈당 연간출하자돈수)와 맞물려 모든 생애총생산성이 매우 낮은 수준(생애총 출하자돈수: 스웨덴 44두 vs 한국 22두)에 머물러 있다. 또한, 짧은 이용산차와 함께 상대적으로 비싼 신규모돈 도입비로 인해 모돈 및 자돈생산비를 크게 증가시키는 악순환을 겪고 있다.</p> <p>일반적으로 모든은 산차가 거듭될수록 산자수가 감소하고, 생시체중미달자돈 발생율이 증가하며, 면역력 저하에 따라 이유전 자돈폐사율이 증가하는 문제가 발생한다. 따라서 고산차 모든의 산자능력과 면역력 증대를 통해 생애총생산성을 향상시킬 수 있는 기술 개발이 필요하다. 또한, 생애총생산성에 대한 유전적 개량에 있어 여러 산차의 번식성적을 얻고 난 뒤에야 우수한 모돈을 판단할 수 있는 한계를 극복하기 위한 조기선발지표 개발이 필요하다.</p> <p>따라서, 본 연구과제에서는 모든의 다산성과 번식지속성을 동시에 향상시키기 위해 번식학적, 면역학적, 분자유종학적 방법으로 접근하고자 한다. 이에 본 연구진은 아래와 같은 목표를 갖고 연구를 수행하고자 한다.</p> <ol style="list-style-type: none"> ① 모든의 산차별 면역 및 번식능력 특성변화 구명 ② 고산차 모든의 산자능력 향상을 위한 착상촉진제 개발 ③ 자돈생존을 개선을 위한 임신초기모돈용 면역조절제 개발 ④ 모든의 생애총생산성관련 유전적 개량을 위한 조기선발지표 개발 				
연구개발성과	<p><사업화지표> 특허 : 출원 5건 , 등록 1건 기술이전 : 1건</p> <p><연구기반지표> 논문 : SCI 7편, 비SCI 3편 학술발표 : 1건 인력양성 3명</p>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> - 모든의 이용가능산차 증가를 통한 모든생애총생산성 향상 - 고산차 모든의 임신초기 착상효율 증대를 통한 수태율 향상 - 고산차 모돈용 면역조절제 개발로 이유전 자돈폐사율 감소 - DNA마커를 이용하여 고산차까지 다산성을 유지할 수 있는 모든 조기선발 - 개발된 기술(착상촉진제, 면역조절제, 조기선발기법)에 대해 기술거래 가능 - 모든 생애총생산성관련 기술(착상촉진제, 면역조절제, DNA마커) 선점을 통한 국제양돈경쟁력 확보 				
중심어 (5개 이내)	모든 생애총생산성	번식	면역	전장유전체연관 성분석	조기선발지표

< SUMMARY >

		코드번호	D-02		
Purpose& Contents	<p>Indicators of productivity of sows have been focused on ‘reproductive ability’, but in recent years, ‘lifetime productivity’ has been attracting attention which was concerned the persistency of reproductive ability. This can chasing two hares (‘litter size’ and ‘parity’) at once and it could maximize profit of commercial pig farms. But In Korea, sows usually culled at 2.8 parity. This is more than 1.5 parity less than other countries with advanced swine industry. When it calculated by lifetime productivity, the gap is more deepen (lifetime piglet weaned: EU 44 vs Korea 22).Furthermore, the relatively high cost of sows are leading to a vicious cycle of increasing sow and piglet production costs.</p> <p>Generally, the higher parity sows produce less piglets, high risk of low birth weight piglets, high mortality rate of piglets during suckling period. Therefor, improve the sow lifetime productivity by increasing reproductive ability and immunity is necessary. moreover, to genetic improvement, juvenile selection indicator to select superior lifetime productivity sows must needed.</p> <p>In this study, to simultaneous improvement of high productivity and persistency, reproduction, immunology, molecular breeding tool were applied. We aim to carry out research with the following objectives.</p> <ul style="list-style-type: none"> ① Immunological, reproductional difference of the sows by parity ② Development implantation catalyst for high parity sows ③ Development immune system modulator to improve the survival rate of piglet ④ Development DNA markers for improve sow lifetime productivity 				
Results	<p><Commercialization indicator> Patent : application 5 , registration 1 Thechnology transfer : 1 <Research-based indicator> Paper : SCI 8, non-SCI 2 Conference poster: international 3, national 2 New human resource : 3</p>				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> - Increased sow lifetime productivity by increasing parity of sows - Improvement of conception rate by increasing conception efficiency in early pregnancy - reduce the mortality rate during suckling period by immune regulation - Juvenile selection of superior lifetime productivity sows by DNA markers - Technology transfer - Securing international competitiveness through technology preemption 				
Keywords	Sow lifetime productivity	reproductive	immune	GWAS	DNA marker

< CONTENTS >

1. Overview of the project	8
2. Status of research and development	28
3. Contents and results of research and development	38
4. Achievement and contribution to related fields	194
5. Application plan of the research results	199
6. Foreign countries research information	201
7. Security rating of R & D achievement	203
8. Research facilities	203
9. Performance of safety measures of laboratory	204
10. Representative research achievements of R & D tasks	206
11. Others	208
12. References	209

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	8
2. 국내외 기술개발 현황	28
3. 연구수행 내용 및 결과	38
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	194
5. 연구결과의 활용계획 등	199
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	201
7. 연구개발성과의 보안등급	203
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	203
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	204
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	206
11. 기타사항	208
12. 참고문헌	209

<별첨> 자체평가의견서

제 1 장 연구개발과제의 개요

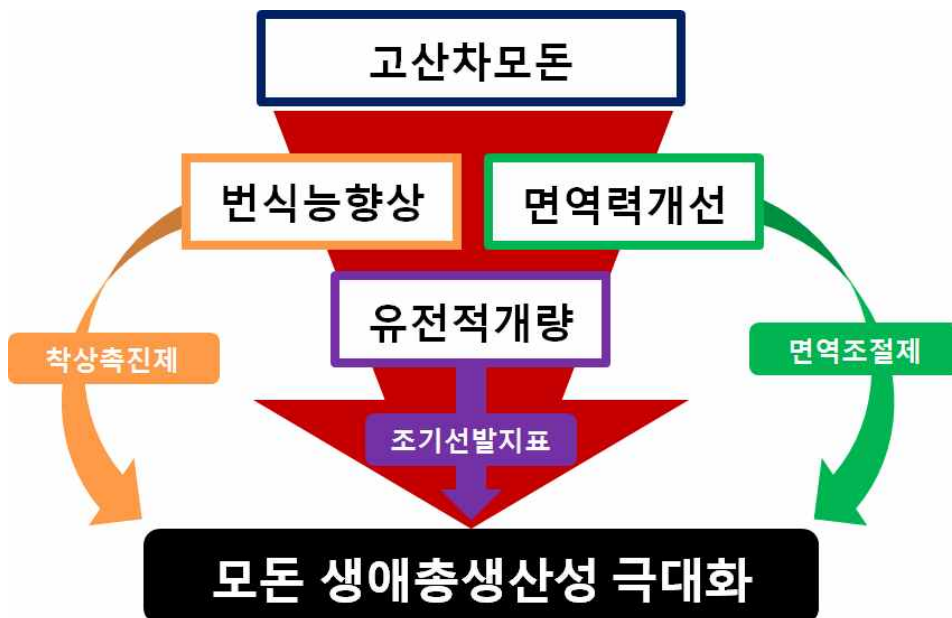
제 1 절 연구개발 목적

모돈의 생산성을 나타내는 지표들은 그동안 ‘산자능력’에 초점을 맞추어왔으나 최근에는 번식 지속성의 개념이 추가되어 ‘생애총생산능력’이 주목 받고 있다. 즉, ‘산자수’와 ‘이용산차’의 두 마리토끼를 잡아야 모돈생산성을 극대화 시킬 수 있음을 의미한다. 그러나 우리의 현실은 그렇지 못하다. 우리나라의 모돈은 평균적으로 2.8산차에 도태되고 있는데, 이는 외국에 비교하여 많게는 1.5산차 적게 이용되고 있는 실정이며, 낮은 MSY(모돈당 연간출하자돈수)와 맞물려 모돈 생애총생산성이 매우 낮은 수준(생애총 출하자돈수: 스웨덴 44두 vs 한국 22두)에 머물러 있다. 또한, 짧은 이용산차와 함께 상대적으로 비싼 신규모돈 도입비로 인해 모돈 및 자돈생산비를 크게 증가시키는 악순환을 겪고 있다.

일반적으로 모돈은 산차가 거듭될수록 산자수가 감소하고, 생시체중미달자돈 발생율이 증가하며, 면역력 저하에 따라 이유전 자돈폐사율이 증가하는 문제가 발생한다. 따라서 **고산차 모돈의 산자능력과 면역력 증대**를 통해 생애총생산성을 향상시킬 수 있는 기술 개발이 필요하다. 또한, 생애총생산성에 대한 유전적 개량에 있어 여러 산차의 번식성적을 얻고 난 뒤에야 우수한 모돈을 판단할 수 있는 한계를 극복하기 위한 **조기선발지표 개발**이 필요하다.

따라서, 본 연구과제에서는 **모돈의 다산성과 번식지속성을 동시에 향상**시키기 위해 번식학적, 면역학적, 분자유종학적 방법으로 접근하고자 한다. 이에 본 연구진은 아래와 같은 목표를 갖고 연구를 수행하고자 한다.

- ① 모돈의 산차별 면역 및 번식능력 특성변화 구명
- ② 고산차 모돈의 산자능력 향상을 위한 착상촉진제 개발
- ③ 자돈생존율 개선을 위한 임신초기모돈용 면역조절제 개발
- ④ 모돈의 생애총생산성관련 유전적 개량을 위한 조기선발지표 개발



제 2 절 연구개발의 필요성

1. 경제, 산업적 필요성

가. 국내 농·축산업 중에서 가장 규모가 큰 산업 중 하나인 양돈산업

2012년 농림업생산액은 46조 3,571억원이며 농림업에서 축산은 3분의 1을 넘는 높은 비중(약 35%)을 차지하고 있으며, 축산중에서도 양돈은 약 5조 3,482억원으로 큰 비중을 차지하고 있다. 국내 양돈산업은 2003년까지 지속적으로 성장하여 사육두수가 1990년 이후 2배이상 증가했으며 급증가추세가 멈춘 2004년이후에도 꾸준히 유지하여 2013년 1분기에 사상 처음으로 1000만두를 넘겼으며, 2014년 현재 991만마리를 기록하고 있다. 또한 1인당 돈육소비량 또한 꾸준히 높은 수치를 유지하고 있어(19.2kg, 2012년 농림수산식품부) 국내육류소비시장에서 가장 큰 부분(47%, 육류유통수출입협회 2012)을 차지하고 있다. 이와 같이 양돈산업은 우리 국민들의 주요한 단백질공급의 원천으로서 매우 중요한 의미를 가지고 있다.

나. 미국, EU와의 FTA체결로 인해 국내 양돈산업에 가장 타격이 클 것으로 예상

국내 양돈산업은 축산물에 대한 해외시장 개방과 함께 국제경쟁력 확보라는 과제에 직면해 있다. 국내 돼지고기 소비량은 꾸준히 증가하고 있지만, 돈육수입량은 2003년 이후 연간 37%씩 급증하는 추세에 있는 가운데 국내산공급량은 오히려 감소하는 경향을 나타내고 있다. 2000~2008년 사이에 수입된 돼지고기는 냉동육비율이 95.6%로 대부분을 차지하며, 냉동수입량의 51.8%를 삼겹살이 차지하고 있는 실정이다. 이러한 가운데 칠레 및 미국과의 연이은 FTA협정으로 인해 각각 2010년부터 칠레산 돈육이 무관세수입이 되었으며, 2014년부터 미국산 냉동돈육에도 적용됨에 따라 양돈산업에 위기감이 고조되고 있다. 설상가상으로 돼지고기 시장개방이 최대 쟁점 중 하나였던 한·EU FTA도 타결됨(2010년)에 따라 양돈분야의 피해가 이어지고 있다. FTA에 따른 수입증가로 피해를 보았다고 정부지원을 요청하는 기업이 2010년까지는 2개 혹은 3개에 그쳤지만 2012년 13개, 2013년 31개로 열배이상 증가했으며, 이중 압도적인 부분을 돼지고기 관련 품목이(총 16개) 차지하였다(산업통상자원부, 2014).

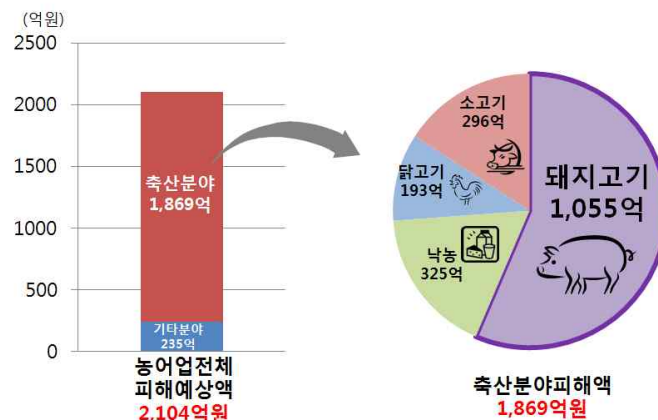


그림 1. 한-미 & EU FTA발효 10년후 농림업 피해 예상액

(농림수산식품부, 2010)

다. 높은 생산비 때문에 가격경쟁력이 떨어지는 국내양돈산업의 현 실정

세계 주요 양돈국가의 돼지고기 생산비를 살펴보면, 캐나다가 도체를 기준으로 kg당 1,749원으로 가장 낮았으며, 미국이 1,763원, 덴마크와 네덜란드는 각각 2,226원과 2,237원이었다. 우리나라의 돼지고기 생산비는 3,218원으로 미국의 1.8배에 달하였으며, 덴마크와 네덜란드 등 유럽 국가들에 비해서는 1.4~1.5배 수준에 이르는 것으로 나타났다(그림2). 따라서 국내 농축산업이 외국농산물의 잠식으로부터 국내 생산기반 유지를 위해서는 기술개발로 생산성 향상을 통한 가격경쟁력의 확보가 시급한 실정이다.

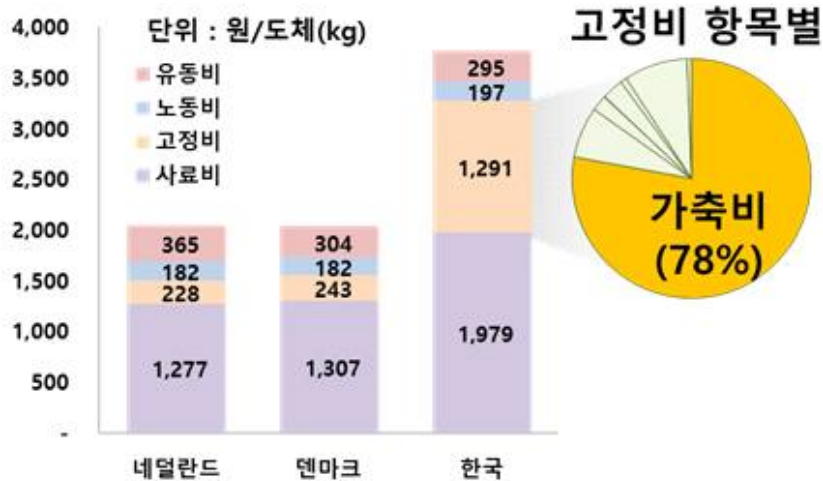


그림 2. 유럽국가와의 양돈생산비 비교 (통계청, 2012; BPEX, 2012)

라. 양돈선진국과의 현저한 생산비 격차, 그 원인은 모돈이용성

대한민국의 양돈 생산력과 수준은 선진국에 훨씬 미치지 못하는 수준이다. 선진국과 비교한 돼지고기 1kg 생산비용에서 볼 수 있듯이 우리나라는 타국에 비해 사료비와 고정비가 많이 차지하고 있다. 선진국의 5배 이상(덴마크 243원, 한국 1,291원으로 약 5.3배) 높은 고정비의 약 80%를 가축비가 차지하고 있으며, 이는 농장에서 도태된 모돈을 대체하는 신규모돈 도입비가 매우 높기 때문이다. 우리나라의 모돈 갱신율은 40%(대한양돈협회, 2011)이상이므로, 연간 상시모돈 사육두수가 100만두라고 가정하였을 경우, 매년 40만두의 모돈이 도태되고 있는 실정이다. 이러한 가운데 신규모돈 도입비는 평균 900,000원(대한양돈협회, 2012)에 육박하여 농가에 부담을 주는 요인이 되고 있다. 또한 우리나라의 모돈은 평균 2.8산차에 도태되고 있는데, 이는 스웨덴 4.4산차, 미국과 일본 3.8산차 정도로 이용하고 있다는 점과 비교하였을 경우 1에서 많게는 1.5산이 적게 이용되고 있는 실정이다. 이는 저조한 번식능력(모돈당 연간 출하자돈수 MSY수치 덴마크 28두, 한국 18두; pig international 2013)과 맞물려 모돈이 평생 생산할 수 있는 자돈의 수인 생애총생산성에 있어서 크나큰 격차를 불러일으킨다(생애총 출하자돈수 스웨덴 44두 vs 한국 22두로 2배차이). 저조한 번식능력, 1 cycle 이상 차이 나는 이용산차, 도태시 감수해야 하는 높은 교체비용으로, 종합적으로 열등한 수준에 머물러 있음을 알 수 있다.

마. 한국모돈, 왜이렇게 빨리 도태되고 있는가

위에서 서술한 것처럼 국내모돈은 평균 2.8산차에 도태되고 있다. 하지만, 외국과는 달리 우리나라는 현재 모돈도태사유에 대해 국가적으로 구체적으로 분석된 데이터가 없어서, 낮은 모돈이용성의 근본적인 해결을 위한 원인분석조차 힘든 상황이다.

일반적으로 모돈은 초산부터 3산까지 산자수가 증가하고 이후 점점 감소하는 추세를 보이고, 그것은 국내의 연구결과에서 동일한 경향성을 보이고 있으나 산차에 관계없이 번식능력이 저조한 것은 우리나라의 현실이다(그림3). 그러나 모돈의 산차에 따른 번식능력감소의 문제는 전 세계 양돈산업의 과제라고도 볼 수 있으며, 생산비가 높은 현실을 타파할 수 없는 우리나라 양돈산업에서는 더욱더 모돈의 ‘생애총생산성’이 중요하다고 볼 수 있다.

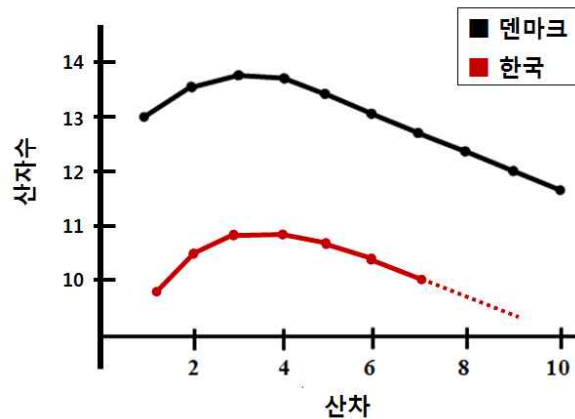


그림3. 덴마크와 우리나라의 산차별 산자수 비교 (Bono. C., 2012, 한돈협회 2013)

외국의 도태사유를 살펴보면, 산차가 지속됨에 따라 체미돈, 즉 체중미달로 포유개시 전 도태되는 자돈의 비율이 늘어나기 때문에 고산차모돈을 도태한다는 것이다. 생시체중이 900g미만일 경우 평균생시체중 1.4kg의 자돈에 비해 3배의 폐사율로 보이기 때문에 자돈의 체중미달은 생산성에 악영향을 미치는 주요요인중 하나이다. 미국의 조사결과에 따르면 5산차 이상의 모돈에서 생산되는 자돈에서는 850g 미만자돈의 비율이 13%까지 올라가는 양상을 보여(그림4), 고산차로 갈수록 체미돈 출현율이 늘어나 생산성에 문제가 된다고 판단할 수 있다.

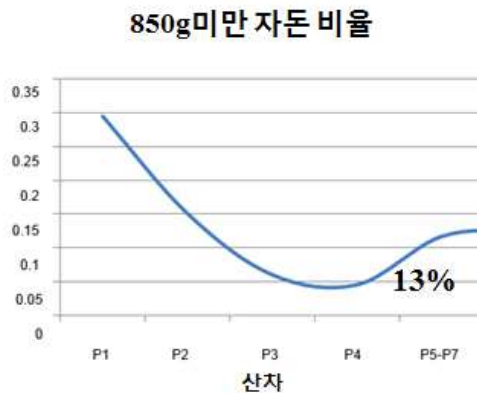


그림4. 미국의 산차별 체미돈 비율 (Fig333, 2013)

모돈의 이용산차를 증가시키는 데 또 하나의 문제점은 산차가 거듭됨에 따라 이유전 폐사율이 증가한다는 것이다(그림5). 돼지는 임신 모돈의 태반구조가 여러개의 조직 층으로 이루어져 있어서 임신 중의 모돈에서 태아로의 항체의 이행이 전혀 이루어지지 않는다. 이런 이유로 신생자돈의 경우 병원체들의 감염에 무방비 상태로 태어나게 되는데, 초유를 통하여 필요한 항체를 전달받게 된다. 따라서 모돈의 면역력이 자돈의 폐사율과도 직결된다고 판단할 수 있다.

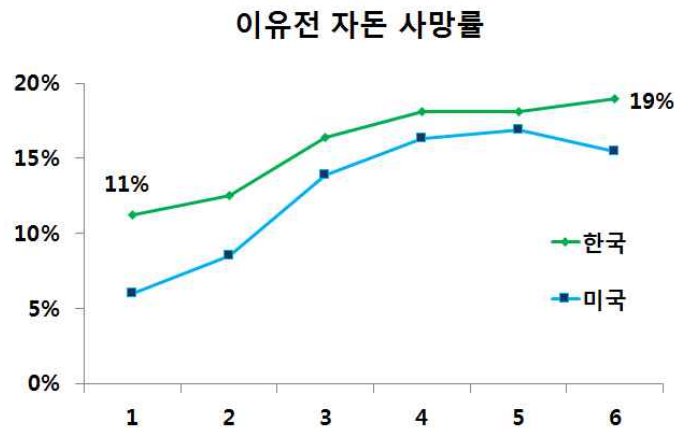


그림5. 미국과 우리나라의 산차별 자돈폐사율
(대한한돈협회, 2013; National Hog Farmer, 2013)

위 사항을 종합해보면, 우리나라의 모돈은 산차가 거듭됨에 따라 적게 낳고, 자돈은 작고 약하며(그림6), 설상가상으로 진 산차에 거쳐 외국에 비해 저조한 수치를 보이고 있음을 알 수 있다.

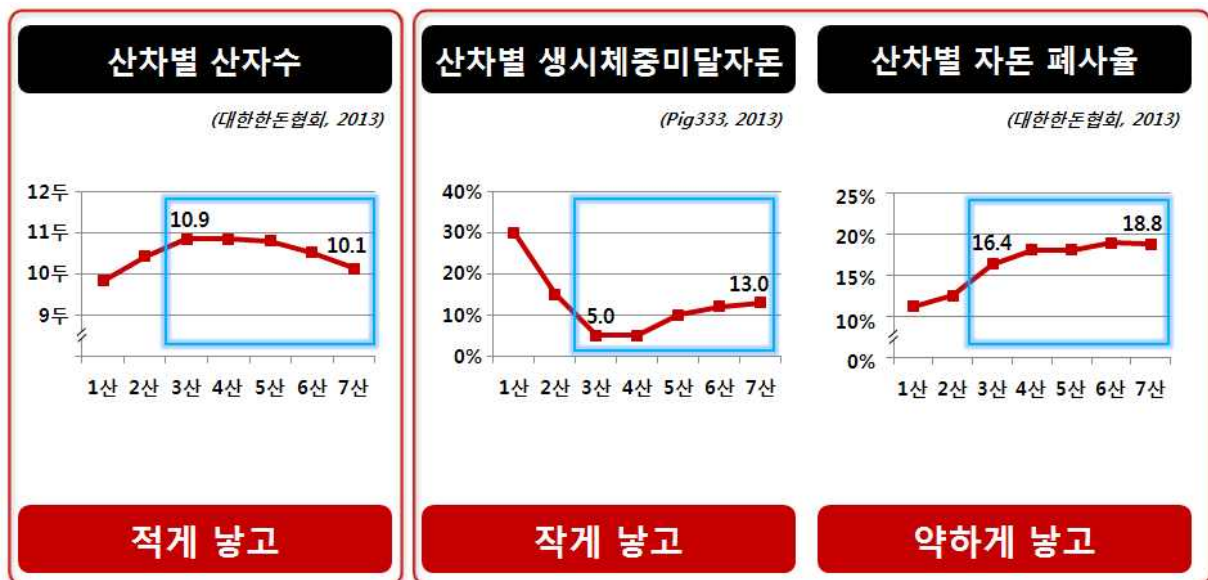


그림6. 고산차모돈 사용의 문제점

2. 기술적 필요성

가. 세계는 지금 모든 생애총생산성에 주목중

연간 모든 한 마리당 이유두수(Pig per Sow per Year; PSY)와 연간 모든 한 마리당 출하두수(Market pig per Sow per Year; MSY)는 돼지의 생산성 지표로 중요하게 사용되어왔다. 1990년 중반 이후, 생산성 증대와 생산비 절감을 위하여 모든의 장수성(longevity)가 대두되었고, 덴마크 같은 유럽의 양돈선진국에서는 국가적 사업으로 번식돈 경제형질 평가에 후보돈 도입에서 2산차 수정시까지 잔류율을 관리할 만큼 경제수명의 중요성을 크게 보고 있는 상황이다.

나. 돼지 생산성 증대를 위한 사료배합연구의 중요성

우수한 모든의 유전적 특성과 적합한 영양, 환경 조건 그리고 질병과 감염에 대한 예방 등은 모든의 생산성 증대와 밀접한 관련이 있는 요인들로 여겨진다. 특히 양돈의 생산성 향상에 무엇보다 중요한 사항은 모든의 사양관리(feeding)라고 할 수 있다. 태아가 정상적으로 발달하기 위한 적절한 영양환경을 조성해 주는 것이 가장 중요한데, 현재 국내의 양돈생산을 위해 지출되는 비용 중 사료비가 50% 이상을 차지하는(통계청, 2012) 현시점에 적절하고 효과적인 영양성분 배합사료 공급은 모든의 생산성 증대를 통한 농가의 사료비 절감 효과를 가져 올 수 있을 것이라 생각된다. 돼지의 사료 내 황기(서태우, 2012)를 첨가하거나 L-아르기닌 보충제(Kaiguo G, 2012) 첨가에 따라 모든의 산자수와 태반 형성 비율이 증가하는 결과를 확인하였으며 비타민E(김대실, 2010) 첨가 사료를 통한 정자의 질적 향상과 이에 따른 인공 수정 후 산자 수 증가에 대한 연구가 진행되었다. 이처럼 사료 내 적절한 영양성분 첨가는 모든과 웅돈의 번식능을 증대시킬 수 있을 것으로 보인다. 그러나 이는 소동물 대상 연구에 비해 상대적으로 현저히 미흡한 수준이며, 실질적으로 사료비에 가장 많은 부분을 차지하는 탄수화물, 지방 및 단백질의 혼합비 조절을 통한 사료개량 연구는 개선 가능한 경제 효과에 비해 시행되는 연구는 부족한 실정이다. 따라서 이에 대한 활발한 연구를 통해 사료비 절감을 위한 경제적인 사료첨가물 개발을 도모하여 양돈업계의 수익 창출에 관한 노력이 절실히 필요한 실정이다.

3. 학술적 필요성

가. 돼지의 산차에 따른 유전적 특성 규명 필요

국내 양돈 산업은 농업부문에서는 미곡다음으로 큰 생산규모를 가지며 축산업계에서는 가장 큰 생산규모를 보이는 등 농업부문 전반에 걸쳐 가장 경쟁력 있는 산업으로 여겨지고 있다. 그럼에도 불구하고 우리나라 양돈 산업은 국내외적으로 많은 어려움을 겪

고 있는데, 세계 각국의 무역 장벽 철폐에 따라 값싼 외국산 축산물의 수입이 증가하고, 이에 따른 우리나라 돼지고기의 수요가 변화하고, 국제 곡물가격으로 인한 사료가격 상승과 정부의 녹색 성장 정책으로 인한 환경 제도의 변화로 발생하는 비용 뿐 아니라 계속되는 유행성 질병으로 인한 폐사율 증가로 양돈업계의 수익성을 보장받기가 날로 힘들어지고 있는 실정이다(강화순, 2010).

이러한 변화에 대처하기 위하여 우수한 생산성을 가진 모돈을 확보하는 일이 매우 중요하게 여겨지며, 여기에서 복당 산자수, 포유개수두수와 이유 시 체중 등은 수익성 증대에 관여하는 주요 경제 형질이자 번식형질로 여겨지며 이들은 모돈의 생산성과 관련이 깊어 개량 시 고려해야 할 주요 형질로 여겨지고 있다. 이러한 모돈의 생산 능력에 관여하는 요인으로는 분만년도, 분만계절, 산차수 등과 같은 환경 요인과 초교배일령, 등지방두께, 등심단면적 등의 효과와 같은 성장 요인으로 모돈의 번식능을 분석하는 연구가 수행되어 왔다(김희열, 2007). 이들 중 환경적 요인에 대한 연구는 현재까지도 활발하게 이루어지고 있으며 이들 중 돈사의 온도관리, 성별 분리 사육, 돈사의 형태 등과 같은 돈육의 사육 환경을 개선하여 번식을 증진 시키고자 하는 연구(김성태, 2013)가 이루어지고 있다. 또한 모돈의 산차에 따른 자돈수 연구 역시 국내외에서 계속해서 진행되고 있으며 일반적으로 모돈의 산자수는 약 4산차 까지 증가하는 추세를 보이지만 이후 산자수가 현저하게 감소한다고 보고(이명지, 2009; Bono. C., 2012)된 바에 따라 국내 양돈업계에서는 모돈을 평균 2.8산차까지 사육 후 도태시키며 이는 4산차 이후 번식능력(출산자돈수 감소, 미이라 자돈수 증가)의 저하가 주요 원인으로 작용할 것이라 사료된다. 앞선 연구들이 산차수에 대한 자돈수 감소를 단순히 환경적 요인으로 한정하여 연구한데에 반해 산차에 따른 유전적 특성을 규명하는 연구는 미흡한 실정이다. 이에 본 연구진은 산차수 증가에 따른 유전적 발현 특이성을 규명하여 산차에 따른 산자수 감소에 대한 기초적 연구 기반을 확립하고자 한다.

나. 산차에 따른 면역학적 접근의 필요성

일반적으로 동물체는 병원체에 감염된 경우 체내에서 항체를 생성하여 효과적으로 병원체계를 제거하게 된다. 그러나 갓 태어난 신생자돈의 경우에는 면역물질을 갖지 않은 상태로 태어난다. 그 이유는 사람의 경우 산모의 항체가 태반을 통과하여 태아에게 이행하는 반면 돼지는 모돈의 항체가 태반을 통과하지 못해 자돈에게 항체가 전달되지 않기 때문이다. 따라서 신생자돈의 경우 초유를 통하여 필요한 항체를 전달 받게 된다. 이에 고산차 모돈에서도 면역력이 높은 수준으로 유지될 경우 초유에 항체의 함량이 높아져 자돈의 폐사율을 감소시킬 수 있다.

한 편 고산차 모돈에서 산자수의 감소경향은 착상에 대한 실패에 기인하며 이는 면역학적으로 설명될 수 있다. 포유류의 임신 및 수정 착상과정은 모체와 태아간 면역계의 관용과 거부의 균형에 의존하게 되며 이런 면역반응은 부성의 major

histocompatibility complex (MHC)를 가진 배아 또는 태아에 의한 면역계의 자극을 모체가 인지함으로써 시작된다. 하지만 태아에 대한 모체의 면역반응은 “면역관용, immune tolerance”이라는 자궁 특유의 면역학적 특징을 보인다. 인간의 경우 이러한 면역세포에 의한 면역관용은 자궁 내의 태아와 모체가 접촉하는 “태아-모체 접촉면, feto-maternal interface”에 decidual associated lymphoid tissue (DALT)라는 임신 특이적 조직학적 구조물 내에 존재하며 태아에 대한 모체의 면역관용을 획득하는데 중요한 역할을 하고, 착상 및 임신 유지에 수반되는 혈관생성 및 영양막(trophoblast)의 발달에 필수적인 무균성 염증반응(sterile inflammation)을 유발하는 것으로 알려졌다. 돼지의 경우 아직 DALT라는 구조물에 대한 연구가 되지 않았지만 태아-모체 접촉면인 자궁내막에 존재하는 면역세포들이 돼지의 임신초기 착상 등에 영향을 미친다는 연구가 진행되었다.

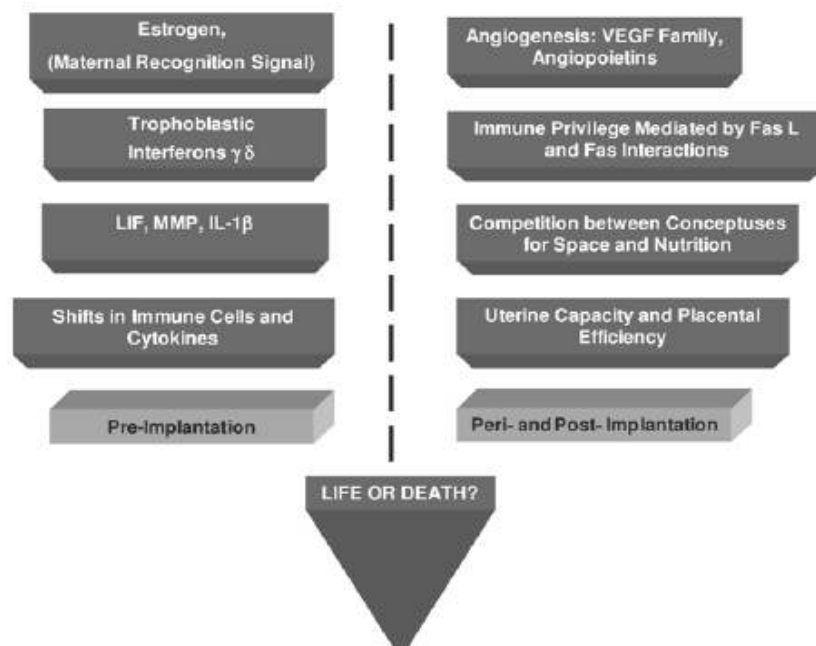


그림 7. 돼지에서 착상 시 태아 성장에 영향을 미치는 면역학적 요인 (TAYAD et al. 2007)

다. 임신초기 착상 기간 중 배아의 발달 및 분화에 관련된 중요 유전자 발굴 및 기능분석 연구의 필요성

인간의 게놈 프로젝트가 완료된 후 돼지, 소, 닭 등 경제가축의 유전자 서열정보들 역시 밝혀졌고, 이에 따라 이러한 동물모델에서 나타나는 생리현상에 대한 유전적 규명 연구가 활발히 진행되고 있다. 이 중 돼지에 대한 연구는 양돈 산업의 발전에 크게 기여할 수 있으며, 돼지의 생산량 증대를 위해 임신 초기기간 동안 수정란 발생과 분화를 조절하는 유전자들을 발굴하기 위한 연구가 이어지고 있다. 돼지는 품종에 따라 번식 능력의 차이를 보이며 이러한 번식능력의 차이를 유전적으로 접근하기 위한 연구가 수행되었다. 이에 따라 다산종의 유전 형질을 비교하여 산자수 증진에 영향을 줄 수 있는

후보유전자를 선별하는 연구가 계속해서 이루어지고 있다. *ESR, PRLR, PBP4, MMP-9, PGE2, PFG2a* 등의 후보 유전자가 확인되었고 이는 산자 수, 모돈의 배란, 배아 발육, 착상에 관련이 있다고 알려져 있으며 임신 유지를 도와 배아의 생존율의 차이를 설명할 수 있는 근거가 될 것이라 사료된다(Vincent, 1998; Rothschild, 2000; Huang, 2004; Buyue Niu, 2013; Zhang H, 2013).

이러한 연구들에도 불구하고 돼지 수정란의 착상이나 임신에 관련된 모체 환경과 태아의 유전적 변이에 대한 연구는 다른 종에 비해 미흡한 실정이며, 현재까지 보고된 연구들은 주로 배아발달 기간 동안의 내분비학적 환경의 변화 및 이에 따른 유전자의 발현 변화 분석 정도에 머무르고 있는 실정이다. 뿐만 아니라, 모돈의 산자수 증진을 위한 품종 개량을 위한 특이적인 유전적 차이 규명 연구는 활발히 이루어지고 있는 데에 반해 산차에 따른 번식률 저하에 대한 유전적 원인 규명 연구는 미흡한 실정이다. 이에 산차에 따른 유전자 발현 특성 및 기능을 분석하고 고산차 모돈에서의 번식 능력 향상을 위한 관련 유전자 선발 연구를 통한 고효율 모돈의 개발이 필수적이라 사료된다.

또한 자궁은 초기배아 및 착상 후 배의 발달과 분화를 위해 다양한 신호 분자들을 분비하는데 현재까지 그 기능이 완전히 이해되지 않고 있기에 이들에 대한 연구가 필요하며, 현재까지 알려진 인자들 이외에 착상과 태반형성에 관여하는 새로운 인자들의 발굴과 그들의 기능에 관해 연구가 절실한 형편이다. 따라서 본 연구를 통한 임신 초기 태아-모체 환경의 생리학적·유전학적 기틀마련은 모돈의 생산성 증대뿐만 아니라 복제 동물 및 형질전환동물의 생산효율을 높임으로서 고부가가치를 창출할 수 있는 기술개발에 기여할 것이며, 더 나아가 임신초기 여성의 빈번한 유산 방지를 위한 모체 환경에 대한 심도 있는 이해와 더불어 임상적인 응용과 접근이 가능할 것으로 사료된다.

라. 산차수에 따른 착상기전 규명을 위한 후성유전학적 접근의 필요성

후성유전학은 DNA 염기서열의 변화, 즉 유전자변이 없이 일어난 유전자 기능 변화를 연구하는 학문으로, 이러한 후성유전에는 DNA 메틸화와 non-coding RNA를 통한 유전자 발현억제가 포함된다(오정환, 2008). DNA 메틸화는 가장 잘 알려진 유전자의 화학적 변형으로 CpG염기서열에 있는 C(시토신)에 메틸화를 시켜 유전자 발현을 억제하는 과정을 말한다. 이러한 DNA 메틸화는 주로 생물의 발생 과정에서 중요한 역할을 하며, 여성의 X 염색체 불활성화가 DNA 메틸화의 주요 예라고 할 수 있다(Singer-Sam, 1993). 돼지를 모델로 한 DNA 메틸화 연구로는 착상 전 배아발달동안 각인유전자 내의 메틸화 수립을 증명하기 위한 연구를 통하여 각인 유전자로 밝혀진 *IGF2/H19* 염기서열을 통하여 정자 DNA 지역은 완전히 메틸화되고 난자의 DNA 내에는 탈메틸화 된 상태를 보여주었다. 이러한 연구를 통해 돼지 배아 발생동안 나타나는 각인 유전자 메틸화 과정을 확인 할 수 있었고(박치훈, 2009), 초기 배아 발달에 관하여 전분화능 관련 유전자인 *POU5F1, NANOG*는 탈메틸화 후 다시 메틸화가 이루어지며, 발달동안 CpG-rich

region인 *SOX2*, *CDX2* 등은 저메틸화(hypomethylation)된다. 이렇게 다양한 DNA 메틸화는 초기 배 발생 과정 중 전사 조절, 유전체 안정화와 유전체 각인 등 많은 기능적 유전자의 발현을 조절 할 수 있음을 제시한다(Ming-Tao, 2013).

또한 단백질로 번역되지 않는 non-coding RNA로는 tRNA, rRNA, sno-RNA, miRNA, siRNA 등이 있는데 이 중 유전자 조절 기능으로 잘 알려진 것은 miRNA로 타깃이 되는 전사체에 결합하여 단백질 합성을 억제하는 방식으로 유전자 조절에 관여한다. miRNA는 세포증식과 발달, 사멸, 종양성성, 형태 발생 등 거의 모든 생명현상에 관여한다고 알려져 있다(류제은, 2013). 착상과 태반형성 역시 성공적인 임신을 위한 중요한 단계로서 이 과정에도 miRNA에 의한 DNA 조절현상이 나타나고 있는데, 배아나 태아를 손실하는 돼지에게서 임신 기간 동안 자궁내막의 기능을 확인하기 위하여 착상기간, 태반형성시간, 임신 중기에서의 miRNA 패턴을 분석하였고, 발현의 차이를 보이는 miRNA는 세포 부착, 세포 증식이나 tissue remodeling에 관여하는 신호기전과 연관되어있었으며, 이러한 miRNA의 target 유전자로는 배아의 착상에 관여한다고 잘 알려진 *SPP1*, *ITGB3*, *ESR1* 등이 있다(Su L. 2014).

이처럼 발생단계에서 나타나는 유전자 발현 변화는 후성유전학적 접근과 밀접한 연관이 있을 것이라 생각되며, 임신 초기의 착상과 배 발달에 관한 기작을 규명하고 이에 대한 심도 있는 이해를 위해서는 후성유전학적 연구가 반드시 수반되어야 한다. 그러나 국외 연구에 비해 국내 돼지의 초기 임신과정 중 착상과 배 발달에 관한 후성유전학적 연구는 미흡한 실정이며, 지속적인 연구 수행이 요구되고 있다. 또한 후성유전학적 접근법으로 산차에 따른 유전자 발현 변화를 규명하고자하는 연구가 수행되지 않고 있으므로, 본 연구에서는 착상과 배 발달 연구에 기반한 산차에 따른 유전자 발현 패턴의 변화를 후성유전학적으로 접근하여 이에 대한 조절 기전의 전반적인 기초 연구를 진행하고자 한다.

마. 돼지의 영양외배엽세포 내 유용물질 투여를 통한 분자적 기전 연구의 필요성 및 유용성

돼지의 자궁에서, 착상은 자궁의 luminal epithelium(LE)에 태아의 영양외배엽 세포가 apposition, attachment로 시작된다(Bazer, 2010), 실제로 돼지의 태아는 임신 초기 기간의 착상 전 단계에서 착상과 태반 형성을 준비하기 위하여 영양외배엽세포의 분화와 증식, 이동이 활발하게 일어난다(Bazer, 2009). 배반포 단계 이후에 배아는 5-150mm로 길쭉해지며 임신 10-12일 사이에 모체 인지 신호(maternal recognition signal)을 분비한다(Bazer and Thatcher, 1997; Geisert, 1982). 필라민트 형태의 배아는 임신 13일 쯤에 자궁의 LE에 부착되기 시작하고, 착상은 임신 24일 쯤에 완전히 끝나게 된다(Key and King, 1990; Geisert and Yelich, 1997). 이러한 과정에는 자궁 상피를 통해 임신 유지를 위한 영양물질, 성장인자, 호르몬, 사이토카인, 지질, 당 등의 조직영양이 필수적이다(Bazer, 2010). 때문에 영양외배엽세포에 유용물질 투여는 모체로부터 오는 신호에 대한

배아의 발달 및 착상에 대한 연구를 수행하기에 적합한 연구 방법이며, 이러한 근거로 본 연구진에서는 돼지의 영양외배엽세포에 과당을 처리하여 세포증식을 유도함으로써 성공적인 착상과 안정적인 태반 형성에 기여할 수 있음을 제시하였다(Kim, 2012). 본 연구진의 이러한 선행 연구를 기반으로 하여 착상 및 태아발달과 태반형성에 관련된 유전자과 또 다른 유용 영양물질의 연관관계를 연구하여 모돈의 초기 착상 효율을 증가시키고 특히 고산차 모돈에서 나타나는 번식력 저하를 해결하기 위한 새로운 연구방향을 제시할 수 있을 것이다.

바. 모돈의 자궁내막의 면역세포 연구의 필요성

자궁내막에 존재하는 면역세포는 주로 백혈구만 존재하며 주로 세 가지 아형의 면역세포 즉, T 림프구, 대식세포, 자궁 내 자연살해세포 등이 주를 이루고 B림프구가 거의 없다는 점에서 말초혈액의 면역세포 구성과 차이가 있다. 인간의 경우 세 가지 아형 중 T 림프구는 자궁내막에서 면역세포의 약 45%를 차지하고 착상 시기에는 약 32%를 차지하지만 임신 초기에는 자궁 내 자연살해세포 (uterine NK cell)의 급격한 증가에 따라 상대적으로 약 20%로 감소하게 된다. 하지만 T림프구는 착상 및 태아에 대한 모체의 면역관용 등 생식과정 전반에 있어 면역반응의 중추적인 역할을 하고 있다는 것이 초기 생쥐모델에서 이미 밝혀진 바 있다. 돼지의 경우에는 자궁내막의 면역세포들의 구성에 대한 연구결과는 아직 없으나 인간과 마찬가지로 임신 초기에 자궁내막에 자연살해세포가 급격히 증가하고 T 림프구가 초기 착상 과정에서 중요하다는 보고가 존재한다 (Engelhardt H. 2002).

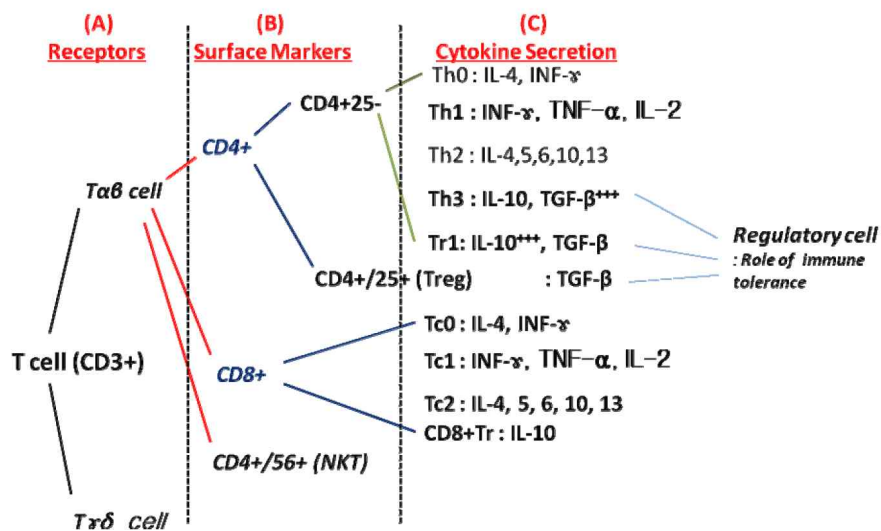


그림 8. T세포의 분류 (KM Yang et al. 2009)

T 림프구는 CD3(cluster of differentiation 3) 항원을 세포표면에 공통적으로 발현하며 CD3+CD4+ Helper T 림프구와 CD3+CD8+ Cytotoxic T 림프구 CD4+CD25+

regulatory T 림프구로 나뉜다. 이러한 T 림프구들은 태아-모체 접촉면에서 면역반응의 중추적인 역할을 하며 T 림프구의 종류에 따라 서로 다른 기능을 한다고 알려져 있다. 이중 조절 T 림프구는 자연성 조절 T 림프구와 적응성 조절 T 림프구로 분류한다. 인간에서 자연성 조절 T 림프구는 흉선에서 유래하며 TGF- β , IL-10 등을 분비함으로써 고유의 면역조절기능과 항염증작용을 수행한다. 반면 적응성 조절 T 림프구는 말초조직에서 생성되며 미성숙한 수지상세포와 결합하여 tryptophan 대사에 필수적이고 태아-모체 접촉면에서 강력한 항염증작용을 하는 것으로 잘 알려진 indoleamine 2,3 - deoxygenase (IDO)라는 효소를 생산한다. 이 효소는 tryptophan 대사를 통한 tryptophan 감소와 대사물질 증가를 유도하여 T 림프구의 세포성장을 억제하고 세포자멸사(apoptosis)를 촉진시켜 강력한 면역억제효과를 유발한다.

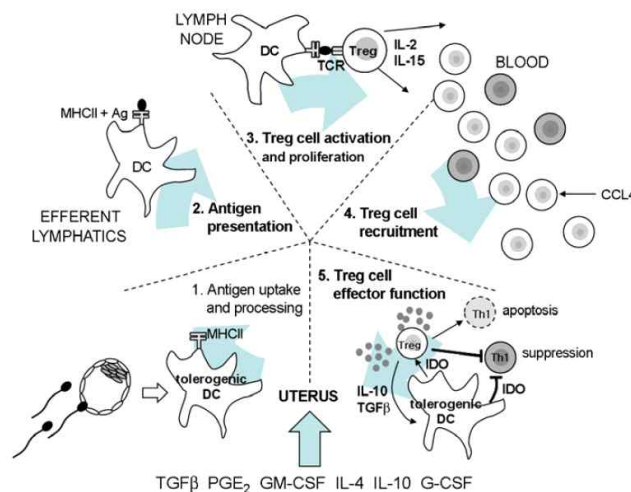


그림 9. 태아-모체 접촉면에서 면역적 관용을 유도하는 조절 T 세포 모델

(Guerin et al., 2009)

돼지에서 또한 조절 T 세포와 IDO 효소를 통한 면역억제 기작에 대해서 여러 연구가 진행 되었다. 특히 사료 조성에서 tryptophan의 비율조절을 통한 여러 염증반응에 대한 연구가 진행되었고 임신상태에서 tryptophan 급이 비율에 대한 연구도 있다.(N Le Floch et al., 2008) 따라서 돼지에서 또한 이러한 조절 T 세포를 통하여 태아-모체간의 면역적관용이 이뤄 질 것이라 예상된다. 그러므로 돼지의 자궁내막 면역세포를 연구함으로써 돼지에서의 태아-모체 접촉면에서 착상 시 면역학적 기작에 대해 더 잘 이해할 수 있을 것이다.

사. 고산차 모돈에 특이적인 면역조절제 개발의 필요성

CD4+ T 림프구는 사이토카인을 생산하는 주된 면역세포로 분비하는 사이토카인의 종류에 따라 Th0, Th1, Th2, Th3, 그리고 Th17 림프구로 분류된다. Th0 림프구는 Naive T 림프구로 Th1과 Th2 세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포로서 프로세스

태론은 Th0 세포를 Th2 세포로 분화시키는 강력한 물질로 임신 중 고농도의 프록세스 태론에 의해 IL-4, IL-5 등 Th2 사이토카인의 분비를 촉진시켜 면역관용 환경을 조성한다. Th1 림프구의 경우 일반적으로 IFN- γ , IL-2, TNF- α 및 TNF- β 를 생산, 분비하며 대식세포 매개에 의한 숙주방어에 주된 역할을 한다. 반면 Th2 림프구는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13을 생산하며 IL-13, IL-10, IL-4는 대식세포의 기능을 억제하는 작용을 하며, Th1 림프구와는 달리 숙주의 방어기전이 대식세포와는 독립적인 기전으로 작용한다.

임신 초기에는 Th₁ 형 면역반응과 Th₂ 형 면역반응은 각자의 사이토카인을 통해 임신 시 태아와 태반의 성장에 필요한 Th₂ 형 면역반응이 우세한 환경을 유지하며, 반면 Th₂형 면역반응의 우세현상은 태아와 태반의 성장을 저해하며 태아의 생존을 위해서는 Th₁ 형 면역반응과 Th₂형 면역반응의 균형이 중요하다. 결국 Th₁/Th₂ 면역반응의 균형에는 사이토카인이 관여하고 사이토카인과 T 림프구들간의 긴밀하고 복잡한 network이 형성되어 배아의 착상 및 성장과 발달에 필수적인 역할을 한다.

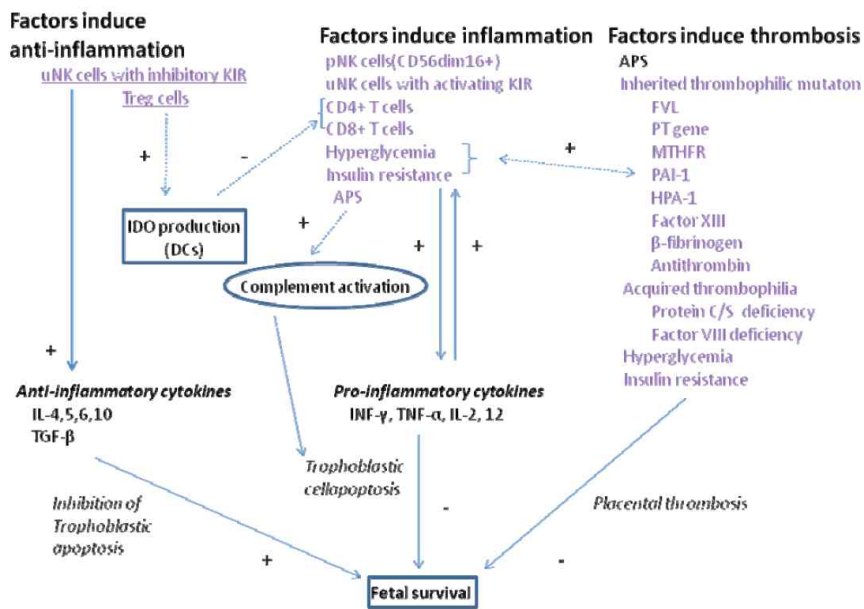


그림 10. 태아의 생존을 위한 Th₁/Th₂ 사이토카인 network (KM Yang et al., 2009)

이처럼 사람의 경우 사람의 경우 정상인 산모에서 Th₂가 우세한 쪽으로 면역반응이 유도되는 반면 재발성 자연유산 산모에서 Th₁이 우세한 쪽으로 면역반응이 유도된다는 보고(Hill 등, 1995) 등 태아의 착상과 발달에 Th₁과 Th₂의 균형의 중요성과 연구가 활발히 진행되고 있다. 하지만 돼지의 경우 태아-모체 접촉면에서 키모카인을 통한 면역세포의 유도에 대한 연구는 있으나 사이토카인에 대한 연구 및 Th₁/Th₂의 균형에 관한 연구가 없는 실정이다. 따라서 고산차 모돈 및 자돈 폐사율이 높은 모돈에서의 Th₁/Th₂의 균형을 조절하여 태아의 착상 및 태아의 생존을 감소를 해결 할 수 있는 방안이 필요하다.

아. 모든 장수·다산성에 대한 개량을 위한 조기선발지표 필요성 및 가능성

우리나라의 중돈 개량을 위한 능력검정은 현재 산육 형질 위주로 이루어져있으며, 상대적으로 모돈의 장수·다산성에 대한 개량의 효과는 낮은편이다. 따라서 번식관련 형질에 대한 정의가 통일되지 못하여 이에 대한 정비가 시급한 실정이며, 전산화가 이루어지지 않은 중돈장들이 존재하므로 기록 관리 및 육종가 추정에 어려움이 있다. 따라서, 번식관련 형질들의 표준화된 측정 방법을 강구하고, 번식 성적의 전산화 및 올바른 유전능력 평가 체계를 구축하여야한다. 그러나 번식능력의 유전력은 10% 내외로 낮은 편이므로 단시일내에 높은 개량 효과를 얻기 어려우며 유전적 연결이 가능한 개량 단위도 적은 편이다. 하지만 분자유전학 기법의 도입으로 기존의 통계유전학적인 방법에 의한 개량이 어려웠던 형질에 대한 개량이 이루어지고 있고, 그 결과로 덴마크에서는 20년 사이에 복당산자수를 3두 이상 끌어올렸다(그림11).

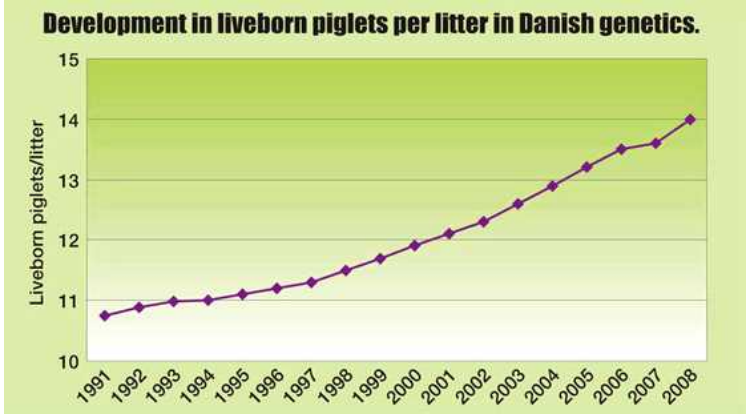


그림11. 덴마크의 생존자돈수 개량량 (Pig international, 2010)

산자수에 있어서 눈부신 발전을 이룩한 덴마크 역시 최근 모돈의 이용성에 대해 연구필요성이 꾸준히 제기되고 있다(Livestock & prairie swine center, 2011). 기존 분자유전학적 기법도입으로 인한 개량은 모돈의 산차에 따른 번식능력 저하에 포커스를 두고 있지 않기 때문이다. 단순 산자능력 뿐 아니라 다산하는 번식능력의 지속성의 향상은 양돈산업에 있어서 파급효과가 훨씬 더 클것으로 판단되며, 이러한 생애총생산성 형질역시 분자유전학적기법을 통해 충분히 개량이 가능할 것으로 보인다.

제 3 절 연구개발 범위

1. 연구개발의 최종목표

- ① 모돈의 산차별 면역 및 번식능력 특성변화 구명
- ② 고산차 모돈의 산자능력 향상을 위한 착상촉진제 개발
- ③ 자돈생존율 개선을 위한 임신초기모돈용 면역조절제 개발
- ④ 모돈의 생애총생산성관련 유전적 개량을 위한 조기선발지표 개발



2. 연구개발의 주요내용

<제1세부> 모든의 생애총생산성 향상을 위한 조기선발지표 개발

산차별 번식기록을 보유한 기초돈군에 대한 번식형질, genomic DNA시료, 도태관련 자료를 수집한다. 실험돈군에 대해 porcine 60k SNP chip분석을 실시 후 전장유전체 분석기법 (GWAS)을 활용하여 모든의 생애총생산성 형질에 미치는 주요 염기변이를 Screening하고, 해당 염기변이의 위치정보를 활용하여 후보유전자를 선별한다. 선별된 후보유전자의 발현조절영역 등에서 신규한 변이를 발굴하여 생애총생산성 형질과의 연관성분석을 통해 유용 DNA마커를 개발한다. 유효DNA마커들의 최적 유전자형 조합을 선정하고, 분자유전학 추정용 최적통계모형을 확립한다. 또한 해당 DNA마커 적용에 따른 경제성분석도 함께 실시한다. 최종적으로 생애총생산성이 우수한 종돈선발에 활용할 수 있는 조기선발기법을 개발하고자 한다.

<제2세부> 모든의 산차별 유전자 발현 네트워크 분석 및 번식능력 증대 기술 개발

본 연구의 최종목표는 모든의 생애총생산성 향상을 위해 고산차모돈의 착상효율증진 및 사료첨가물의 효용성 검증을 위한 생리학적, 분자유전학적, 후생유전학적 조절기전을 구명함으로써 모든의 번식능력 증대 및 자돈의 생산성을 높이는 것이다. 이를위해 생물정보학적 분석을 통하여 모든의 산차별 자궁내막에서 발현차이를 보이는 수용체를 선별하여 모든의 자궁 내 미세환경과 태아의 착상 및 발달에 관한 분자유전학적 메커니즘을 구명한다. 또한 효율적인 영양공급을 통해 산차수 증가에 따른 자돈의 생산 효과를 극대화시키기 위하여 임신 초 배아의 발달과 착상에 중대한 영향을 미치는 유용 물질을 발굴하여 영양외배엽세포 내에 투여함으로써 임신초기 배아의 착상효율과 임신의 유지에 있어 유용물질과 선발수용체간의 복합적 작용 메커니즘을 구명하며 모든의 산차수 증가를 통해 양돈산업의 생산성을 향상시키고자 한다. 본 연구진은 선행연구를 통해 돼지의 영양외배엽 세포가 과당(fructose)의 투여를 통해 활발하게 증식됨을 검증하였으며, 이는 과당이 임신초기 배아의 발달과 착상에 중대한 영향을 미칠 것이라 제시하였다. 이와 같은 방법으로 본 과제를 통해 모든의 산차에 따른 임신초기 착상과정동안 태아의 발달 및 분화와 태반 형성에 있어 유용물질의 효과 및 기능성을 검증하고 그에 관련된 조절 네트워크를 다각적으로 분석함으로써 모든의 착상을 증진 및 산차수 손실 방지를 통하여 양돈생산성 향상에 기여하고자 한다.

<제3세부> 모든 면역력강화를 통한 자돈생존율 개선기술 개발

고산차 모든의 산차수 감소와 자돈 폐사율 증가는 모든의 면역상태에 영향을 받을 것으로 예상되며, 따라서 산차에 따른 특이적 면역관련지표를 정립해야한다. 이를 위해 모든의 자궁내 번식관련 면역기관에서 면역세포의 구성을 분석하고, Th₁/Th₂ 면역상태를 나타내는 후보 cytokine을 측정하여 산차별 모든의 면역관련지표의 변화를 측정하고자 한다. 이후 모든의 Th₁/Th₂ 면역상태를 조절할 수 있는 유용물질을 screening하고 생쥐 면역세포를 이용하여 유용물질의 효과 및 분자적 기전을 연구한다. 또한, 이러한 유용물질을 사료첨가물로 사용함으로써 임신모돈의 사료첨가물 급여에 의한 자돈생존율을 측정하여 유용성을 평가하고자 한다.

<제1세부: 모든의 생애총생산성 향상을 위한 조기선발지표 개발>

1) 기초돈군조성을 통한 시료확보 및 모든 생애총생산성 자료조사

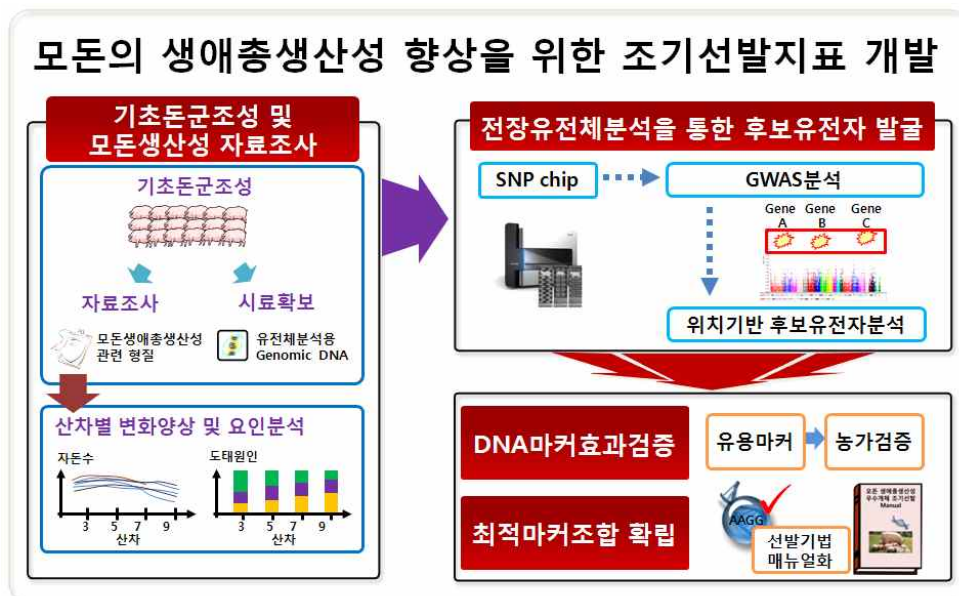
- 산차별 번식기록을 보유한 기초돈군 조성 및 모든생애총생산성관련 형질자료 조사
- 실험돈의 유전체분석용 혈액시료채취 및 Genomic DNA 추출
- 산차에 따른 모든의 번식능력 변화 양상 구명 및 도태요인 분석

2) GWAS분석을 통한 후보유전자 발굴 및 유전자구조 분석

- 실험돈에 대한 porcine 60K SNP chip 유전자형 결정
- 전장유전체연관성(GWAS)분석 수행을 통한 모든생애총생산성 연관 genomic region 동정 및 SNP 확보
- 위치기반 후보유전자탐색 및 해당 후보유전자의 구조분석과 기능조사

3) 모든 생애총생산성관련 DNA마커의 효용성 검증 및 최적마커조합 설정을 통한 조기선발지표 개발

- 발굴된 후보유전자 영역내 유효 SNP 발굴 및 유전자형진단기법 개발
- 연관성분석을 통한 생애총생산성관련 DNA마커 효과 확인
- 임의회귀(random regression)분석을 통한 모든의 산차별 반복측정된 산자수와 DNA마커의 관련성 검증
- 유효 DNA마커들의 최적 조합 설정 및 현장에서 이용가능한 분자육종가 추정용 최적통계모형 제시
- 모든 생애총생산성관련 DNA마커 적용에 따른 경제성 분석



<제2세부: 모든의 산차별 유전자발현 네트워크분석을 통한 착상률 증진기술 개발>

1) 모든의 산차별 차등발현 영양물질 수용체 선별

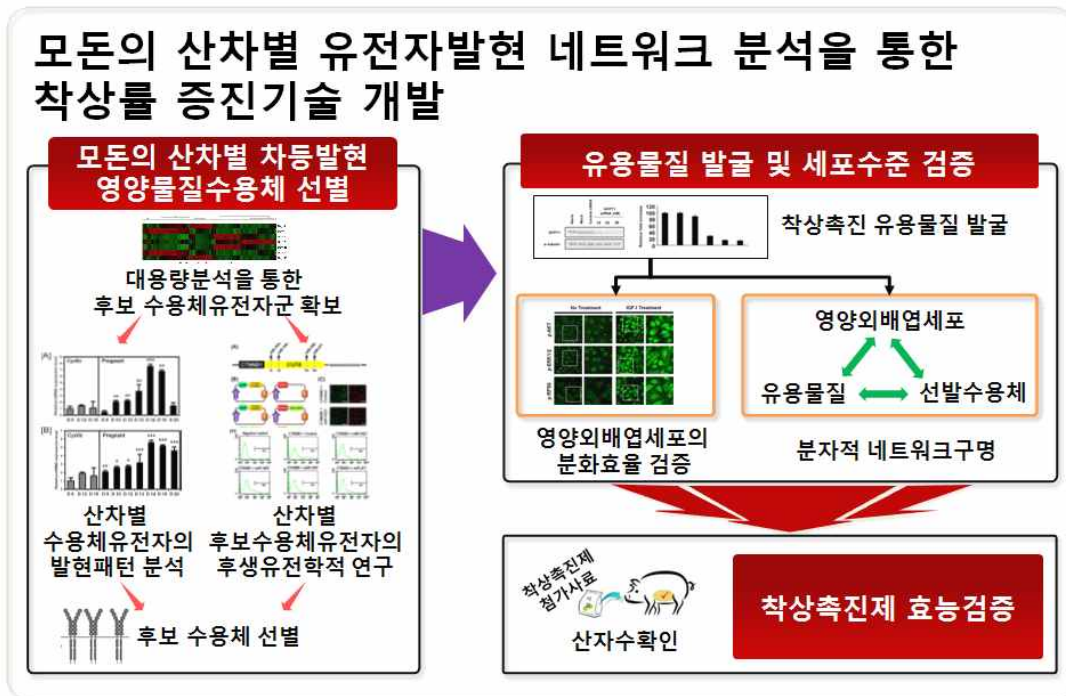
- 산차별 모든의 자궁내막내 수용체유전자 발현양상 대용량 분석
- 생물정보학적 분석을 통한 모체분비인자 및 태아 발달, 태반형성관련 수용체선발
- 산차별 주요 선발수용체 발현유무 및 후성유전학적 변화 분석

2) 착상률 증진을 위한 유용물질 발굴 및 세포수준 검증

- 고산차 모든의 자궁내막 세포에서 선발된 수용체의 기능성 분석
- 영양외배엽 세포의 발달 및 분화를 유도하는 유용물질 발굴
- 영양외배엽 세포에서 유용물질과 수용체간의 분자적 기전 연구

3) 고산차 모든의 착상효율 증대에 대한 사료첨가물의 효능 검증

- 유용물질의 효과적인 전달을 위한 사료첨가물 개발
- 사료첨가물의 효능 극대화를 위한 급여방법 모색
- 사료첨가물 급여개체와 비급여개체간의 자돈수 비교 분석을 통한 착상촉진제 효능검증



<제3세부: 모든의 면역조절을 통한 자돈생존율 개선기술 개발>

1) 모든의 산차별 면역수준 차이 구명

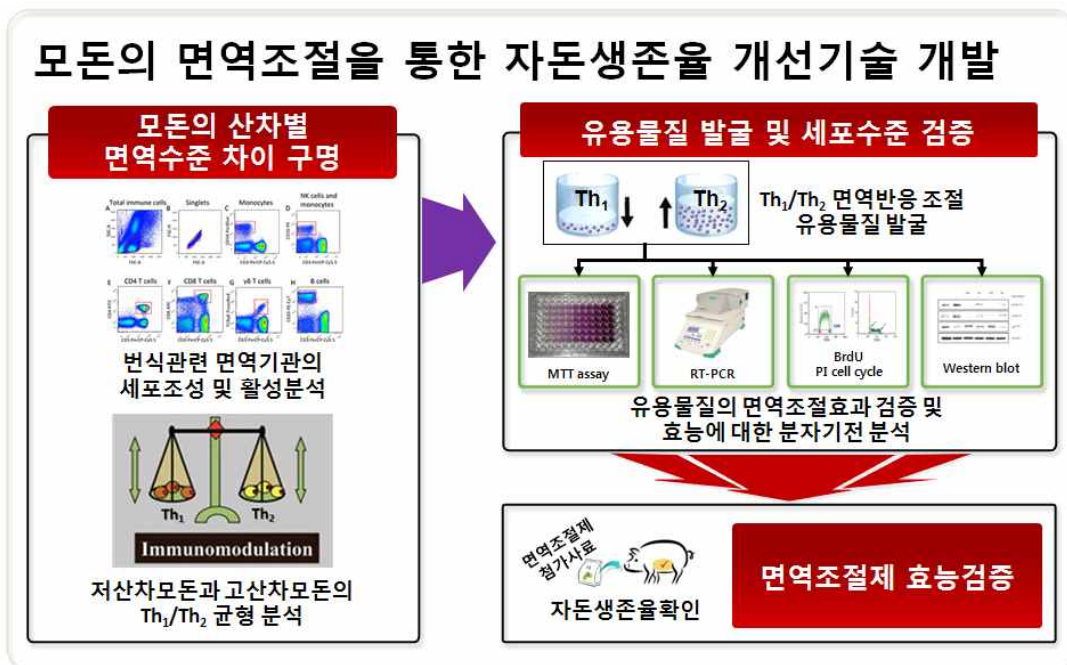
- 산차별 모든의 자궁 내 번식관련 면역기관의 면역세포 분석
- 저산차모돈과 고산차모돈의 면역관련지표 분석
- 면역관련지표에 의한 자돈생존율 변화 측정

2) 면역관련지표의 조절이 가능한 사료첨가물 발굴

- 모든의 면역관련지표를 조절할 수 있는 유용물질 screening
- 유용물질에 대한 세포수준의 효능검증
- 유용물질의 효능에 대한 분자기전 분석

3) 임신모돈 사료첨가물 급여에 의한 자돈생존율 증가 검증

- 다양한 사료 배합에 의한 사료첨가물의 효과적인 전달 시스템 모색
- 사료첨가물 급여개체와 비급여개체간의 자돈생존율 비교



제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 본 연구관련 국내의 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구팀		
모든의 생애총생산성 향상을 위한 조기선발지표 개발	미국/EU	30	20	80	
모든의 산차별 유전자 발현 네트워크 분석 및 번식능력 증대 기술 개발	EU	30	10	60	
모든의 면역력강화를 통한 자돈생존율 개선기술 개발	미국	50	30	90	

2. 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	국외특허검색(유럽특허검색 http://ep.espacenet.com) 국내특허검색(특허정보원 www.kipris.or.kr)
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목 및 초록

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	모든의 생애총생산성향상을 위한 조기선발지표 개발	모든의 산차별 유전자발현 네트워크 분석 및 번식능력 증대 기술 개발	모든의 면역조절을 통한 자돈생존율개선기술 개발	
Keyword	모든, 산차, 산자수	모든, 번식, 산차	모든, 면역	
검색건수	10(국내)	2(국내)	29(국내)	
유효특허건수	1(국내)	1(국내)	3(국내)	
핵심특허 및 관련성	특허명	돼지의 다산 개체 선발을 위한 SNP 마커와 이를 이용한 평가방법	모든의 생산성 향상을 위한 사료용 첨가제 조성물	돼지 대장균 및 유행성 설사바이러스에 의한 설사증 예방 및 치료용 난황항체를 이용한 복합 면역제제
	보유국	대한민국	대한민국	대한민국
	등록년도	2014.01.02	2002.11.05	2000.07.07
	관련성(%)	50%	50%	30%
	유사점	모든 생산성관련 SNP마커 및 평가방법	모든의 번식능력 향상을 위한 방법	돼지의 면역력 증대를 위한 방법
차이점	이 특허는 산자수에 국한되어 있으며, 본 과제의 기술적 목표는 산자수뿐만 아니라 이용산차를 포함하는 생애총생산성관련 DNA 마커 개발에 있음	이 특허는 모든의 번식능력 등 생산성 향상을 위한 기술로 국한되어 있으며 본과제는 번식능력 증대뿐만 아니라 산차에 따른 유전자 발현을 통한 네트워크 분석 개발에 있음	이 특허는 자돈의 복합적 면역증진에 대한 것인데 본과제 목표는 모든의 면역력강화를 통해 자돈생존율까지 개선하는 기술개발에 있음	

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov)
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		모든의 장수·다산성향상을 위한 조기선발지표 개발	모든의 산차별 유전자 발현 네트워크 분석 및 번식능력 증대 기술 개발	모든 면역력강화를 통한 자돈생존율 개선기술 개발
Keyword		Dam, Parity	Pig, pre-implantation	Sow, Supplementation, humoral Immune
검색건수		230	68	3
유효논문건수		4	8	2
핵심논문 및 관련성	논문명	Effect of dam parity on litter performance, transfer of passive immunity, and progeny microbial ecology.	Specific gene-regulation networks during the pre-implantation development of the pig embryo as revealed by deep sequencing.	Effect of maternal fish oil and seaweed extract supplementation on colostrum and milk composition, humoral immune response, and performance of suckled piglets.
	학술지명	Journal of animal science	BMC Genomics	Journal of animal science
	저자	Carney-Hinkle <i>et al.</i>	Cao S <i>et al.</i>	S. G. Leonard <i>et al.</i>
	게재년도	2013	2014	2010
	관련성(%)	40	30	70
	유사점	모든의 산차별 생산성을 분석	초기착상단계 유전자조절네트워크 분석	사료첨가물에 의한 모든의 면역력 강화 및 자돈 생존율
차이점	본 연구는 고산차 모돈에 초점이 맞춰져 있으며 기능 향상을 위한 조기선발지표를 개발하고자 함	본 연구는 배아가 아닌 모돈을 타겟으로 유전자조절네트워크 분석을 실시하고자 함	고산차 모돈을 대상으로 면역조절을 통해 자돈생존율 강화	

Keyword		Sow + longevity	Sow, Implantation	pig, cytokine, immune
검색건수		45	18	33
유효논문건수		15	5	2
핵심논문 및 관련성	논문명	Genetic associations for gilt growth, compositional, and structural soundness traits with sow longevity and lifetime reproductive performance	Identification of differentially expressed genes in the uterine endometrium on day 12 of the estrous cycle and pregnancy in pigs	Effects of mannan oligosaccharide on cytokine secretions by porcine alveolar macrophages and serum cytokine concentrations in nursery pigs
	학술지명	Journal of animal science	Molecular Reproduction and Development	Journal of animal science
	저자	Nikkilä <i>et al.</i>	Hakhyun Ka <i>et al.</i>	T. M. Che <i>et al.</i>
	게재년도	2013	2009	2011
	관련성(%)	70	60	60
	유사점	암태지의 장수성과 생애총생산성에 대한 유전적인 연구	모돈의 초기착상단계에서의 유전자발현 연구	면역조절을 통한 면역력 증가
	차이점	장수·다산성향상을 위한 유전자탐색과 조기선발지표를 연구	산차별 유전자발현특성 비교분석	상기 연구는 육아기 돼지를 대상으로 하고있으나 본 연구는 모돈을 대상으로 하고자 함
Keyword		Sow + Removal	pig, feed, litter size	Helper T cell, pregnancy, cytokine
검색건수		82	289	55
유효논문건수		11	50	3
핵심논문 및 관련성	논문명	An investigation of the success of production-based sow removal and replacement in the context of herd performance.	Effects of pre-weaning energy substitutions on post-weaning follicle development, steroid hormones and subsequent litter size in primiparous sows	Characterization of the Th profile of the bovine endometrium during the oestrous cycle and early pregnancy.
	학술지명	Journal of animal science	Reprod Domest Animal	PLoS One
	저자	Rutten-Ramos <i>et al.</i>	Chen TY <i>et al.</i>	Oliveira LJ
	게재년도	2009	2013	2013
	관련성(%)	50	40	50
	유사점	모돈의 생산성향상을 위한 연구	모돈 영양 섭취에 따른 자돈수 변화 연구	초기 임신에서 헬퍼 T 세포 및 면역상태
	차이점	조기선발지표를 통해 모돈의 경제산차를 늘리고자 함	본 연구에서는 영양수준조절이 아닌 사료첨가제 개발	본 연구는 모돈의 특이적 면역상태를 바탕으로 자돈생존율과 연관성을 연구하고자 함

4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

1) 국내 제품생산 및 시장 현황

1-1 국내 주요 축산물 수급현황

(단위: 톤)

구 분	년도	공급			수요				
		수입육	국내산	공급계	국내소비			수 출	수요계
					수입산	국내산	소 계		
	2009	197,860	197,676	395,536	197,860	197,676	395,536	-	395,536
쇠고기	2010	245,146	186,153	431,299	245,146	186,153	431,299	-	431,299
	2011	289,444	216,403	505,847	289,444	216,403	505,847	-	-
	2009	209,840	745,604	976,005	208,820	706,714	915,534	12,513	928,047
돼지고기	2010	179,491	787,486	988,558	188,491	752,129	940,620	482	941,102
	2011	370,382	610,446	993,409	356,077	581,566	937,643	547	938,190
	2009	70,625	416,032	486,657	70,625	398,503	469,128	11,472	480,600
닭고기	2010	105,802	435,528	547,387	105,802	416,508	522,310	15,991	538,301
	2011	130,949	456,467	596,502	130,949	435,236	566,185	15,346	581,531

(출처: 식육편람, 2013)

1-2 국내 주요 축산물 소비량

구 분	총소비량(톤)				1인당 소비량(kg)			
	쇠고기	돼지고기	닭고기	계	쇠고기	돼지고기	닭고기	계
2002	402,683	810,447	384,989	1,596,266	8.4	17.0	8.0	33.5
2003	390,247	834,059	373,398	1,597,704	8.1	17.4	7.9	33.4
2004	327,776	856,682	318,849	1,503,307	6.8	17.9	6.6	31.3
2005	316,853	838,479	356,743	1,512,075	6.5	17.3	7.6	31.3
2006	330,554	874,704	416,849	1,622,107	6.8	18.1	8.6	33.6
2007	368,749	931,339	433,787	1,733,875	7.6	19.2	9.0	35.8
2008	365,116	926,853	435,991	1,727,960	7.5	19.1	9.0	35.6
2009	395,536	915,534	469,128	1,780,198	8.1	19.1	9.6	36.8
2010	431,286	943,492	534,912	1,909,690	8.8	19.3	10.7	38.8
2011	505,847	937,643	566,185	2,009,675	10.1	18.8	11.3	40.3

(출처: 식육편람, 2013)

1-3 국내 주요 축산물 가격 동향

- 산지가격

구 분	한우(천원/600kg)	돼지(천원/100kg)	닭(원/kg)
2008	4,506	276	1,560
2009	5,036	332	1,939
2010	5,248	320	1,912
2011	3,785	465	1,860
2012	3,610	335	1,698

(출처: 식육편람, 2013)

- 도매가격

구 분	쇠고기(원/kg)	돼지고기(원/kg)	닭고기(원/kg)
2008	11,035	4,046	2,739
2009	13,388	4,449	3,431
2010	16,036	4,232	3,527
2011	12,782	6,149	3,461
2012	13,121	4,135	3,260

(출처: 식육편람, 2013)

- 소매가격

구 분	쇠고기(원/500g)	돼지고기(원/500g)	닭고기(원/kg)
2008	20,109	8,410	4,259
2009	17,349	9,118	5,335
2010	22,857	8,315	5,707
2011	18,198	10,105	6,048
2012	10,630	8,390	5,761

(출처: 식육편람, 2013)

1-4 국내 양돈농가 후보모돈 및 모돈현황

(단위:천마리)

구 분	후보모돈	모돈(천마리)
2010. 12	84	892
2011. 12	100	803
2012. 12	78	885
2013. 12	68	827

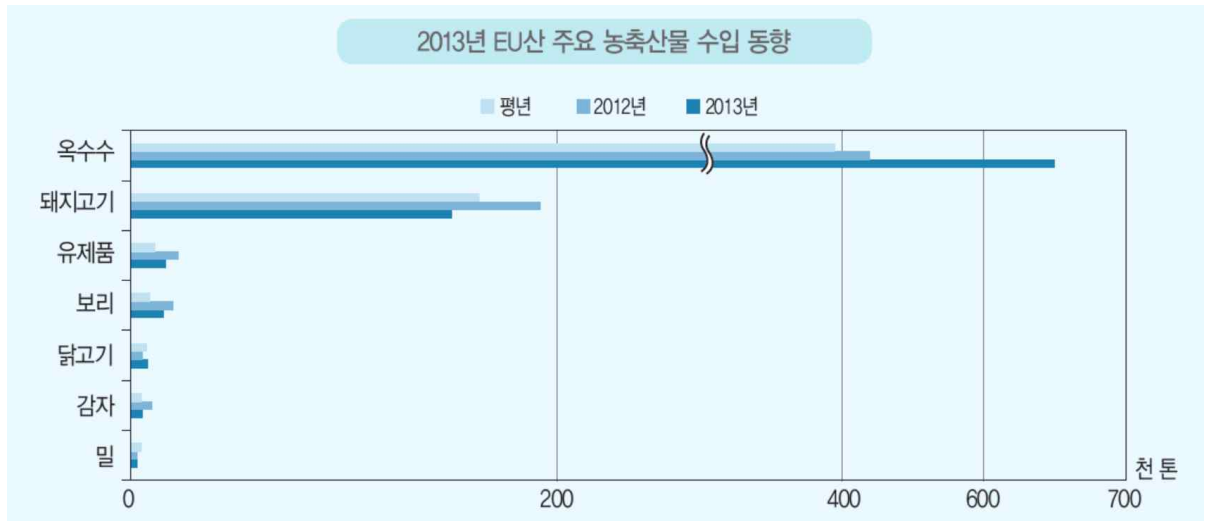
(출처: 가축동향, 2013. 12)

1-5 국내 비육돈 1두 당 고정비 내역

내역	금액(원)	비율(%)
가축비	88,484	57.38
수도광열비	3,309	2.15
방역치료비	9,006	5.84
농구비	6,708	4.35
(감가상각비)	4,919	3.19
(수리유지비)	1,572	1.02
(임차료)	20	0.01
(소농구비)	197	0.13
영농시설비	7,858	5.10
(감가상각비)	3,770	2.44
(수리유지비)	3,745	2.43
(임차료)	343	0.22
제재료비	2,389	1.55
차입금이자	2,440	1.58
토지임차료	83	0.05
고용노동비	10,536	6.83
분뇨처리비	6,073	3.94
생산관리비	965	0.63
기타비용	1,786	1.16
소계	154,203	100

(2012년 축산물생산비, 2013)

1-5 한-EU FTA 주요 농축산물 수입동향



(관세무역개발원, 농수산식품유통공사, 2013)

1-6 한-미 FTA 주요 농축산물 수입동향



(관세무역개발원, 농수산식품유통공사, 2013)

○ 시장 분석결과 및 고찰

전세계적으로 많이 소비되는 축산식품은 쇠고기, 돼지고기, 닭고기이다. 이 중에서 돼지고기는 미국을 제외한 유럽, 일본, 국내에서 가장 많이 소비되고 있다. 특히 국내에서 돼지고기는 전체 축산식품 소비량의 절반 이상을 차지하고 있는 중요 축산식품이다. 국내에서의 소비패턴을 보면 국민소득의 증가와 함께 생활수준이 높아지면서 돼지고기를 포함한 축산식품의 수요량과 소비량이 꾸준히 증가하는 추세이며, 축산식품의 소비량은 앞

으로도 꾸준히 증가할 것으로 생각된다. 이러한 국내 돼지고기 수요량을 충족시키기 위해 FTA를 통해 가격경쟁력을 확보한 수입 돼지고기의 수입량은 점점 증가하는 추세이다. 이는 국내 양돈농가의 수익이 줄어드는 결과를 불러오게 된다. 따라서 국내 양돈산업의 가격경쟁력을 향상시키고 양돈농가의 수익성을 높여 FTA로 인한 피해를 감소시키는 것이 필요하다. 양돈농가에서 고정비 대비 가축비의 규모는 절반 이상을 차지하고 있다. 이러한 결과는 국내 양돈농가에서 모돈의 자돈생산능력이 덴마크와 같은 양돈선진국에 비해 많은 차이를 보이고, 모돈 교체주기가 매우 빠르게 이루어지고 있음을 대변한다. 그러므로 모돈의 생산성과 교체주기를 늘려주면 고정비 대비 가축비의 규모가 줄어들게 되어 양돈산업의 가격 경쟁력과 양돈농가의 수익성이 개선될 것으로 예상된다. 따라서 본 연구 지향하고 있는 목표가 국내 양돈산업의 가격경쟁력 확보와 농가의 수익증대를 위해 반드시 필요하다고 본다.

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

- 모돈의 임신초기 착상촉진용 사료첨가물
- 자돈생존율향상을 위한 모돈의 면역조절용 사료첨가물
- 모돈의 생애총생산성 개량을 위한 DNA마커분석법 및 육종가추정법

2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	15	16.5	18.2	20.0	22.0	1762.8
경제적 파급효과	137	150.7	165.8	182.3	200.6	1740.8
부가가치 창출액	450	495.0	544.5	599.0	658.8	1540.2
합 계	602	662.2	728.42	801.262	881.4	881.4

- 1) 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- 2) 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- 3) 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

2013년 국내 양돈산업분야에서는 모돈 89만 5천마리를 포함하여 935만여두를 사육하고, 연간 1,613만여두를 도축하였다. 본 연구를 통해 개발된 기술에 대한 효과를 추정함에 있어서, 국내 전체 양돈규모에 대한 기대효과를 산정하는 것에는 무리가 있다는 판단 하에 모돈 200두 규모의 종돈장(GGP)과 모돈 200두 규모의 비육농장 각 1호씩에 대하여 그 효과를 추정하였다.

모돈의 다산성을 나타내는데 유용하게 이용되는 지수는 PSY와 MSY이다. PSY(Pig per Sow per Year)는 어미돼지 1마리가 1년에 낳는 새끼돼지의 마리수를 말하며, MSY(Market pig per Sow per Year)란 암돼지 1마리당 연평균 출하 두수를 의미한다. PSY의 경우 2013년도 기준 22.6두를 기록하고 있으며 (월간한돈, 2014년 4월호), MSY의 경우 2010년도의 국내 평균지수는 15.5두였으며, 2013년도의

경우 17두정도로 추정되고 있다(월간 양돈 2014년 1월호). 산업화를 위한 기대효과 산출에 있어서 PSY는 23두(1산차당 평균 11.5두), MSY 17두를 기초로 하였으며, 비육농장의 경우 연간 3000두를 도축할 경우를 가정하였다.

따라서 모든 200두 규모를 갖으며, PSY가 23두인 종돈장과 MSY가 17두인 비육농장 각 1호씩을 모델로 하여, 직접 경제효과, 경제적 파급효과, 부가가치 창출액의 측면에서 분석을 실시하였다.

본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치로서 다음과 같이 산출되었다. 본 연구과제의 개발기술로 PSY의 1두 증가를 예상하였을 경우, 산자수 증가에 따른 이유자돈 판매증가 효과는 국내 평균 이유자돈가 7만원을 기준으로 직접경제효과를 추정하였다. 또한, 사료첨가제 판매에 따른 직접 경제효과는 일반적인 사료첨가제 가격을 마찬가지로 약 5,000원/kg으로 보면, 두당 5,000원의 수익으로 볼 수 있다.

본 연구과제 개발기술에 의한 경제적 파급효과를 살펴보기 위하여 1산차의 추가이용으로 인한 농가의 소득효과를 계상하였다. 농가의 후보돈 도입에는 입식, 사육, 기타비용을 포함하여 총 900,000만원의 경비가 소요되며, 경산돈의 1산차 유지를 위해서는 정액구입, 모돈사료, 자돈사료를 포함하여 매산차 214,000원의 경비가 소요된다. 따라서 1산차 추가이용으로 절감되는 후보돈 도입비용은 686,000원으로 모든 200두 규모의 종돈장에서는 연간 1억 3720만원의 경제적 파급효과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

부가가치 창출액의 경우 국내 생산 모돈의 수출이 어렵기 때문에 수입에 대한 대체효과로 산출했다. 2013년도의 종돈수입량은 약 2000여두로, 그중 1500여두가 종빈돈으로 조사되었다. 다산·장수성을 갖춘 종돈으로 외국종돈에 대한 약 10%의 대체효과를 기대하였을 경우, 평균 300만원수준의 미국, 덴마크산 종돈을 가정하여 최종산출하였다. 그리고 연차별 기대효과는 전년대비 10% 향상되는 것으로 추정하였다.

5. 3P(특허,논문,제품)분석을 통한 연구추진계획

가. 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

1) 특허분석 측면

- 기존 특허는 모돈의 산자능력관련 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 산자능력뿐만 아니라 번식지속성을 유지가능한 기술개발방향으로 연구를 추진하여 임신모돈특이 사료첨가물 및 국내 DNA마커에 관한 특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획임

2) 논문분석 측면

- 기존 논문은 임신초기 번식/면역적 특징연구는 사람에 대한 연구가 주를 이루고 있으며, 돼지에서 단순 산자수 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 모돈생산성을 다산성과 번식지속성에 대한 다각적 방향으로 연구를 추진하여 학술지에 게재할 계획임

3) 제품 및 시장분석 측면

- 국내 및 국외시장 분석결과 모돈의 도입비는 외국에 비해 상대적으로 비싸게 소요되고 있으며, 본 연구과제에서는 다산 및 번식지속성에 대한 동시 접근 연구를 추진하여 단기적으로는 사료첨가물 급여를 통한 장수 및 다산성 증대를 이루고자 하며, 장기적으로는 생애총생산성이 우수한 모돈을 선발할 수 있는 기술을 개발하고자 함

제 3 장 연구수행 내용 및 결과

연구 범위	연구수행방법	구체적인 내용
<p>-1차년-</p> <p><1세부> 기초돈군 조성을 통한 시료확보 및 모돈 생애총생 산성 자료조사</p>	<p>이론적 방법</p> <p>실험적 방법</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 유전체분석을 위한 실험모돈집단을 선정 (Landrace 119 + Yorkshire 361두 = 총 480두) - 농장이 보유하고 있는 모돈의 산차별 번식기록을 포함한 생애총생산성 형질을 통합 DB화 - 실험돈의 산차별 번식능력변화에 대해 분석 - 국내 종돈장, 종돈업관계자, 일반농가를 대상으로 모돈생애총생산성에 대한 실태 및 인식조사를 실시 - 협력농장 시료확보 협력농장내 모돈 전 개체에 대해 DNA추출용 시료를 확보함 채혈을 통한 혈액시료확보를 목표로 하였으나, 실험돈의 스트레스 최소화를 위하여 모근으로 수정함 - DNA추출 및 정성·정량분석 모돈480두 규모에 대한 DNA추출을 실시하고, 정성·정량분석을 통해 SNP chip분석이 가능한지 확인함 또한, 동일한 농도로 희석하여 분석에 최적화함
<p>-1차년-</p> <p><2세부> 모돈의 산차별 차등발현 영양물질 수용체 선별</p>	<p>이론적 방법</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 고산차 모돈에서의 번식 능력 향상을 위한 관련 유전자를 선별하기 위해 태아의 착상 및 임신 유지를 위한 영양물질, 성장인자, 호르몬, 사이토카인 등의 조직영양소의 교환에 필수적인 산차별 모돈(1산차, 출산 경험이 없는 모돈; 3산차, 2번의 출산 경험이 있는 모돈; 6산차, 5번의 출산 경험이 있는 모돈)의 자궁 내막 조직을 동정함. - 자궁 내막 조직에서 추출한 RNA 및 cDNA를 바탕으로 작은 면적에 수천 개의 oligonucleotide나 cDNA로 된 gene fragment가 고밀도로 배열된 Genechip Pig Genome Array를 통하여 array에 결합하는 정 도를 측정하여 발현 유전자의 데이터베이스를 구축함. - Genechip array 결과를 기반으로 생물정보학적 분석을 통해 산차수의 증가에 따른 자궁 내막 조직 내 특이적 발현 경향을(감소 혹은 증가) 나타내는 유전자를 선별함. - 선별된 유전자의 발현을 자궁 내막 조직 내에서 검증하고 태아의 착 상 및 발달에 관한 분자유전학적 메커니즘을 구명하기 위하여 quantitative RT-PCR 및 <i>in situ</i> hybridization을 통해 산차별 자궁 내막 조직 내 mRNA의 발현을 확인함.

	실험적 방법	<ul style="list-style-type: none"> - 산차별 모든 샘플 확보 1) 모든의 산차별 샘플 확보 2) 조직시료 동결 및 고정 3) 조직학적 분석 (H&E staininig) - 모든 자궁 내막 조직의 대용량 분석을 통한 데이터베이스 구축 1) 대용량 분석을 위한 RNA 및 cDNA 준비 2) GeneChip® WT PLUS Reagent Protocol 수행 3) Fluidics protocol 수행 및 Array scan 4) Array Image 분석을 통한 전사체 데이터베이스 구축 - 산차별 모든의 자궁 내막 조직 내 주요 선발 유전자 발현 변화 분석 1) Quantitative RT-PCR을 통한 주요유전자의 mRNA 발현양상 분석 <ul style="list-style-type: none"> ① cDNA합성 ② Quantitative RT-PCR 분석 2) 주요 선발 유전자의 복제 (Cloninig) 및 cRNA probe 합성. 3) 현장혼성화 분석 (<i>In situ</i> hybridization analysis)
<p>-1차년-</p> <p><3세부></p> <p>모든의 산차별 면역수준 차이 구명</p>	<p>이론적 방법</p> <p>실험적 방법</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 실험집단을 산차별 5두씩 3그룹, 도축일을 교배일 27~29일 이후로 설정 - 채취용 샘플로 혈액과 자궁내막을 설정 - 산차별 자궁내막 조직의 유전자 발현 비교분석 - 산차별 혈액 내 면역세포 사이토카인 비교분석 - 산차별 혈액 내 면역세포의 Th₁/Th₂ 사이토카인 비율 분석 - 자궁내막의 Th₁ 사이토카인발현과 실산자수와의 연관성 분석 - 산차별 모든의 자궁내막샘플과 혈액샘플 채취 - 자궁내막 조직 RNA 추출하여 cDNA 합성 - 자궁내막 cDNA로부터 혈관형성, 세포자멸사, 사이토카인 관련 유전자 발현 Realtime PCR로 확인 - 혈액샘플에서 면역세포(PBMCs) 분리 - PBMCs에 생체 외(<i>In vitro</i>) 자극을 주어 세포 활성화 - 자극시킨 PBMCs에 RNA 추출하여 cDNA 합성 - PBMCs의 cDNA로부터 사이토카인 발현 Realtime PCR로 확인

연구 범 위	연구수 행방법	구체적인 내용
-2차년-	이론적 방법	<ul style="list-style-type: none"> - 유전체분석개체들의 번식성적을 협력농장을 통해 매월말 업데이트 - General linear model을 활용하여 GWAS분석에 적합한 통계모델선정 - 분석된 유전체정보를 활용하여 개체들간의 Genomic relationship matrix(GRM)를 제작한 후 이를 통해 GWAS분석을 실시함 - 생애총생산성형질들에 대해 유의미한 Top10 SNP들의 밴다이어그램을 그려 종합적인 분석을 실시함 - Association 된 SNP들의 위치정보를 앙상블 서버에서 검색하여 주변영역의 유전자정보를 파악하고, 이를 통해 후보유전자를 선정
<1세부> GWAS분 석을 통한 후보유전자 발굴 및 유전자구조 분석	실험적 방법	<ul style="list-style-type: none"> - SNP chip분석 1차년 선정된 480두 개체에 대해 Chip분석을 실시함. (Illumina Porcine SNP 60K Bead chip) 총 61,565개 SNP에 대해 유전자형결정이 완료됨 - SNP Chip분석개체들에 대한 Outlier 제거작업 <ul style="list-style-type: none"> 1. 이유일부터 다음 교배일까지 115일 이상인 개체 2. 기록이상으로 추정되는 개체 (예: 포유개시전 도태두수가 10마리 이상인 개체) 들은 이상치라고 판단하고, 분석대상에서 제외함 - 분석된 SNP에 대해 Outlier제거작업 <ul style="list-style-type: none"> 1. Hardy-Weinberg Equilibrium 검정결과 0.000001 미만인 SNP 2. Genotype call rate 가 0.95 미만인 SNP 3. minor allele frequency가 0.01 미만인 SNP 들은 이상치라고 판단하고, 분석대상에서 제외함 - GWAS분석 <ul style="list-style-type: none"> 1. Genomic relationship matrix를 제작함 2 GCTA 프로그램을 통해 Mixed(fixed + random) linear moded association analysis를 실시함

<p>-2차년-</p> <p><2세부> 착상률 증 진을 위한 유 용 물 질 발굴 및 세 포 수 준 검증</p>	<p>이론적 방법</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 고산차 모돈의 자궁내막 세포에서 선발된 수용체의 기능성을 분석하기 위하여 수용체에 해당하는 리간드 유용물질을 처리하여 in vitro 실험을 수행함 -자궁내막세포, 영양외배엽세포의 발달 및 분화를 유도하는 유용물질의 발굴 및 검증하기 위해 기존에 수행되어 온 연구결과를 바탕으로 임신유지 및 태반형성에 도움을 줄 수 있는 후보 유용물질 정보를 확보하여, in vitro 실험을 수행함 - 해당 유용물질을 자궁내막 세포 및 영양외배엽 세포에 처리하여 유용물질과 수용체 신호전달 경로를 통하여 세포의 발달과 분화에 미치는 영향을 proliferation assay, migration assay를 통하여 확인 - 또한 이 때 세포의 발달과 분화에서 나타나는 분자적 신호전달기전을 규명하기 위하여 western blot 방법과 분자적 발현 변화를 확인하기 위한 Immunofluorescence assay를 수행하고, cell cycle assay를 통하여 세포 증식이 일어나게 되는 세포 주기의 변화를 규명함 - 모돈의 수정 후 자궁내막세포를 배양하여, 앞서 대용량 분석 및 real time PCR을 통해 유의적 차이가 확인된 수용체를 대상으로 하는 siRNA를 처리하여 해당유전자의 knockdown을 유도하여 분석함
	<p>실험적 방법</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 자궁내막 세포, 영양외배엽 세포의 발달 검증 <ol style="list-style-type: none"> 1) proliferation assay 세포에 영양 물질을 처리 농도와 시간 별로 설정하여 최적의 조건 및 증식 수준 확인 2) migration assay 세포에 영양 물질을 처리 한 뒤 세포 이주능력의 변화를 확인 -분자적 신호전달 기전 규명 <ol style="list-style-type: none"> 1) western blot 세포에 영양 물질을 처리하고 발달 관련 의 신호전달 분자들을 분석 2) Immunofluorescence assay 분자적 신호전달 기전의 형태학적 변화를 세포 수준에서 확인 3) inhibitor treatment 신호전달 억제제를 처리하여 해당 신호전달 분자 발달 기전 검증 -세포 주기 확인 및 영양 물질 수용체의 기능성 검증 <ol style="list-style-type: none"> 1) cell cycle assay 세포 주기를 분석하여 영양 물질이 미치는 구체적 발달 원인 규명 2) siRNA treatment 영양물질 수용체의 siRNA를 처리하여 그 기능성을 검증함

<p>-2차년-</p>	<p>이론적 방법</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Th₁ 면역반응 억제효과를 가진 천연물을 대상으로 함 - 천연물을 면역 세포주에 처리하여 세포 생존능력 측정 - 천연물을 면역 세포주에 처리하여 세포성장 측정 - 천연물을 면역 세포주에 처리하여 세포주기 측정 - 천연물 처리 시 세포주기 관련 단백질 발현 측정 - 천연물 처리 시 세포주기 관련 signaling 변화 측정 - 관절염 모델로 동물에서 면역억제 효과 확인
<p><3세부> 면역관련지 표의 조절이 가능한 사료 첨가 물 발굴</p>	<p>실험적 방법</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 대상 천연물을 RMA (생쥐 T 세포주), A20 (생쥐 B 세포주), J774(생쥐 대식세포주) 세포주 및 B6 생쥐의 비장세포에 처리하여 PI staining을 통해 세포 생존능력 측정 - 대상 천연물을 면역 세포주에 및 OVA 항원으로 자극시킨 OTII 생쥐 비장세포에 처리하여 CFSE staining을 통해 세포성장능력 측정 - 대상 천연물을 면역 세포주에 처리하여 PI staining을 통해 세포주기 측정 - 대상 천연물을 처리한 RMA 세포주에서 RNA를 추출하여 cDNA 합성 후 세포주기 관련 단백질 realtime PCR로 확인 - 대상 천연물을 처리한 RMA 세포주에서 단백질을 추출하여 Western blot으로 세포주기 관련 단백질 발현확인 - 세포주기 관련 signaling을 확인하기 위하여 Werstern blot, nuclear translocation, Chromatin immunoprecipitation assay를 진행 - 동물세포에서 면역억제 효과를 확인하기 위하여 관절염 동물모델 선정 후 임상평가, 조직학적 분석 및 혈청학적 분석을 통해 효능 검증

연구 범 위	연구수 행방법	구체적인 내용
<p>-3차년-</p> <p><1세부> 모든 생애 총생산성관 련 DNA 마커 의 효용성 검 증 및 최적마커조 합 설정을 통한 조기선발지 표 개발</p>	<p>이론적 방법</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 발굴된 후보유전자의 영역내 유효 SNP 발굴을 위해 프라이머 제작 - 유전자형에 따른 생애총생산성형질비교를 위한 통계분석실시 - 주요유전자형 조합에 따른 생애총생산성비교 - 조기선발을 위한 최적마커조합 선정 - DNA마커적용에 따른 효과분석 실시
	<p>실험적 방법</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 검증용 집단에 대해 DNA추출 - 추출된 DNA의 정성 정량분석 실시 - 실험집단에 대한 유전자형분석 실시 <ul style="list-style-type: none"> · DNA마커에 특이한 primer set을 이용하여 PCR함 - 마커별 최적의 유전자형진단기법 설정 <ul style="list-style-type: none"> · Direct Sequencing, RFLP 등 최적 유전자형진단기법 설정

<p>-3차년-</p> <p><2세부> 고산차 모든의 착상효율 증대에 대한 사료첨가물 의 효용성 검증</p>	<p>이론적 방법</p> <ul style="list-style-type: none"> - 유용물질의 효과적인 전달을 위한 사료첨가물 선정 모든의 자궁 내막 상피세포주에서 효용성이 검증된 유용물질을 모든에게 적용시키기 위한 급수, 급이, 주사와 같은 최적의 전달 시스템을 모색하여 모든의 생애 총생산량 향상에 가장 효과적인 사료첨가물 혼합과 이에 대한 전달 방법을 개발하여 실제 농가에 적용 가능하도록 함. - 사료첨가물의 효능 극대화를 위한 급여방법 모색 또한 사료 첨가물 적용 간격 및 양의 세분화를 통한 사료 첨가물의 편이성 및 효용성을 동시에 만족시키는 최적의 급여 체계를 확립하여 개발된 사료 첨가물의 상용화를 도모함. - 사료첨가물 급여개체와 비급여개체간의 자돈수 비교 분석을 통한 착상축진제 효능검증 각 그룹 간 비교군 및 대조군을 설정하여 선정한 사료 첨가물을 인공수정 후 한 달간 적용함. 이후 태어나는 건강한 자돈의 수와 미이라돈, 사산돈, 도태돈의 수를 각각 확인하며 산차가 높아짐에 따른 자돈수의 향상 정도를 분석함. 이를 종합하여 사료첨가물 급이시 생애 총생산량의 증가율을 확인하고 최적의 사료 배합률 및 급여 조건을 설정하는 것을 최종 목표로 함.
	<p>실험적 방법</p> <ul style="list-style-type: none"> - 고산차 모든의 착상효율 증대에 대한 사료첨가물의 효용성 검증 <ol style="list-style-type: none"> 1) 사료 첨가물의 선정 1, 2년차에서 확인한 유용 영양 물질 중 사람과 마우스를 대상으로 독성과 부작용 없으며, 산자 능력 증대가 기대되는 첨가물을 선정 2) 농장 선정 및 사료 첨가물 급이 방법 선정 대조군과 비교군을 확보하고 있는 모든 농장 중 산차별로 모돈을 관리하는 농장 선정 및 사료 첨가물 급이 방법을 실무 전문가들과 상의하여 선정 3) 산차별 모돈 그룹을 대상으로 사료 첨가물 급이 사료 첨가물을 인공 수정이 이뤄진 그룹별 모돈을 대상으로 임신초기 착상이 발생하는 기간 동안 사료와 함께 급이 4) 사료 첨가물 급이 그룹을 대상으로 산자 능력 분석 대조군과 비교군 모돈의 출산 기록을 통하여 다음 능력들을 분석 <ol style="list-style-type: none"> ① 총 산자 비교 분석 ② 실 산자 비교 분석 ③ 자돈 생시 체중 비교 분석 ④ 자돈 미이라 발생 비율 비교 분석 ⑤ 자돈 사산 발생 비율 비교 분석 ⑥ 자돈 도태 발생 비율 비교 분석

<p>-3차년-</p>	<p>이론적 방법</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 2차년도 실험결과 토대로 효능을 보일 수 있는 사료첨가물 농도 설정 - 문헌조사를 통한 사료 급이기간 설정 - 사료 첨가물 급이 시 이전 산차대비 자돈 생산을 비교 - 사료 첨가물 급이 시 이전 산차대비 자돈 생존을 비교 - 사료 첨가물 급이 시 이전 산차대비 자돈 몸무게 증가율 비교
<p><3세부> 임신모돈 사료첨가물 급여에 의 한 자돈생존율 증가 검증</p>	<p>실험적 방법</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 이전 산차에서 생산성이 비슷한 모돈을 급이, 비급이 그룹으로 나누어 실험 그룹을 설정함. - 사료 첨가물의 양 설정을 생쥐에게 주사를 통한 전달방법의 10~20배인 일일 사료량의 1%(25g)으로 설정함. - 문헌조사를 통해 임신초기 태아사망률의 대부분을 차지하는 기간인 30일까지를 사료첨가물의 급이기간으로 설정함. - 자돈 총 생산율을 측정하기 위하여 급이 비 급이 그룹간 이전 산차 총산 대비 현산차 총산의 비율 및 실질적 증가량을 현 산차 총산에서 이전 산차 총산을 뺀 값으로 측정함. - 자돈 생존율을 측정하기 위하여 급이 비 급이 그룹간 이전 산차 실산 대비 현산차 실산의 비율 및 실질적 증가량을 현 산차 실산에서 이전 산차 실산을 뺀 값으로 측정함. - 자돈 몸무게 증가율을 측정하기 위하여 급이 비 급이 그룹간 이전 산차 몸무게 대비 현산차 몸무게의 비율 및 실질적 증가량을 현 산차 몸무게에서 이전 산차 몸무게를 뺀 값으로 측정함.

제 1 절 모든의 생애총생산성 향상을 위한 조기선발지표 개발

1. 기초돈군조성을 통한 시료확보 및 모든 생애총생산성 형질자료 조사

가. 산차별 번식기록을 보유한 기초돈군 조성 및 모든생애총생산성관련 형질자료 조사

제1세부과제의 1차년도 연구는 기초축군을 마련하고, 유전체분석을 위한 준비작업을 실시하는 것을 목표로 하고 있으며, 기초축군의 조건은 아래 Table 1-1-1과 같음. 환경의 영향을 많이 받는 번식능력의 특성상 유전체분석의 정확성을 위해 환경효과를 최소화하려면 동일한 사양관리와 기준으로 사육되는 1개 농장을 선정해야 함. 또한 형질의 정확성을 위해서는 교배, 분만, 이유시 낱자 및 자돈의 성적기록, 생애총생산성을 완료하게 된 근거(도태사유)와 일시를 정확히 기록하는 농장이어야 하며, 협력농장으로 선정시 연구기간동안 지속적으로 해당정보가 공유되어야만 함. 이는 살아있는 돼지에서 시료를 추출해야 하는 ‘유전체분석’과, 모두가 생애총생산성을 완료하였을 때 확보할 수 있는 ‘생애총생산성 형질’의 특성 때문임.

Table 1-1-1. 실험농장과 실험돈의 조건

	조건	이유
농장	1개 농장	
	동일한 사양조건에서 사육	환경효과를 최소화
	청결한 돈사관리	
	산차별 번식기록 (교배일, 분만일, 이유일, 산자수 등)	
	정확한 도태기준 보유	정확한 형질확보
실험돈	도태시 도태사유, 도태일 기록	
	지속적으로 농장↔실험실간 정보공유	
	혈통정보가 분명한 모돈	유전체분석의 정확성 향상
	혈연관계가 최대한 먼 개체들	유전정보의 다양성 확보
	3산차 이상 모돈 최소 360두	학술적 효과를 위한 최소한의 집단

본 연구진은 A종돈장을 협력농가로 선정, 동일한 농장내 사육되고 있는 모돈 838두(순종돈 Landrace 237두, Yorkshire 601두)의 실험대상 선별작업을 실시함. 유전적 다양성 확보를 위하여 부모가 동일한 동복형매관계(fullsib)에 있는 개체들은 최대한 배제시켜 1두만 선정하는 작업을 거쳐 Table 1-1-2(1)의 실험돈 집단을 선정함. 최종 랜드레이스 119두(25%), 요크셔 361두(75)로 구성됨. 산차별 구성은 4산차모돈이 49%로 가장 많으며, 3산차 이상의 모돈이 총 63%로 대부분을 차지하고 있고, 2산차 이하의 모돈은 최대한 균일하게 분포하도록 집단을 선별함. 유전적인 요인만을 고려하기 위하여 양돈장의 시설을 청결히 유지하고, 사료 및 영양조건을 동일하게 하여 실험돈군의 환경적인 변이를 최대한 줄이기 위해 농가 실무진에게 중점관리를 요청하였음.

Table 1-1-2. 기초돈군의 품종별, 산차별 구성(연구개시일기준)

품종 \ 산차	산차							합계	구성비
	5산차	4산차	3산차	2산차	1산차	0산차			
랜드레이스 (Landrace)	7	64	6	8	18	18	119	25%	
요크셔 (Yorkshire)	36	170	19	32	51	51	361	75%	
계	43	234	25	40	69	69	480	480	
분포	9%	49%	5%	8%	14%	14%	100%		

해당 실험돈군에 대해 확보한 형질은 아래 Table 1-1-3과 같음. 개체정보와 개체의 혈통정보, 번식정보로 나뉘어 있으며, 혈통정보는 유전체분석의 정확도 향상을 위해 필요한 정보로서, 부모의 고유ID를 확보하였음. 가계정보 검토결과 랜드레이스는 부돈36두, 모돈 89두에 의해, 요크셔는 부돈55두, 모돈 231두에 의해 출생됨을 파악했음. 충분히 유전적 다양성을 확보했다고 판단됨.

개체정보는 식별을 위한 고유ID, 최종수명 계산을 위한 생일, 도태사유와 도태일을 형질로 선정했고, 현재 농장으로부터 도태된 모돈의 도태일과 도태사유를 수집중에 있으며, 8월부터 과제종료시까지 매달 번식기록과 도태기록을 농장으로부터 업데이트할 수 있도록 협약한 상태임. 번식정보는 교배, 분만, 이유를 한 날짜정보, 총산자수, 실산자수, 포유개시전 도태자돈수(기형/사산/체미/미라자돈), 이유자돈수와 같은 자돈의 마릿수정보, 자돈의 생시체중과 이유체중정보를 매 산차 구분하여 확보함.

Table 1-1-3. 개체별 기록형질

구분	형질명	비고
개체정보	개체ID	
	생일	
	도태일	
	도태사유	
혈통정보	부ID	
	모ID	
번식정보	교배일(산차별)	
	분만일(산차별)	
	이유일(산차별)	
	총산자수(산차별)	사산, 미라자돈을 포함한 분만자돈수
	실산자수(산차별)	총산자수-(사산자돈수+미라자돈수)
	포유개시전도태두수	기형/사산/미라/체미자돈수
	이유자돈수(산차별)	
	자돈생시체중	
	자돈이유체중	

기초돈군의 출생년도는 아래 Table 1-1-4와 같음. 480두의 출생간격이 2년을 넘지 않아 출생시기에 따른 효과를 최소화할 수 있다고 판단됨. 구체적인 구성비를 보면 2012년이 가장 많고(47.5%) 뒤이어 2013년(28.5%), 2014년(24.0%)순으로, 대부분을 차지하는 2012년생 실험돈은 3산차이상 모돈이며, 2013년생 모돈도 50%이상이 3산차이상 모돈임(Figure 1-1-1).

Table 1-1-4. 기초돈군의 출생년도 구성

품종 \ 생년	2012	2013	2014	합계
랜드레이스 (Landrace)	52	39	30	121
요크셔 (Yorkshire)	176	98	85	359
계	228 (47.5%)	137 (28.5%)	115 (24.0%)	480

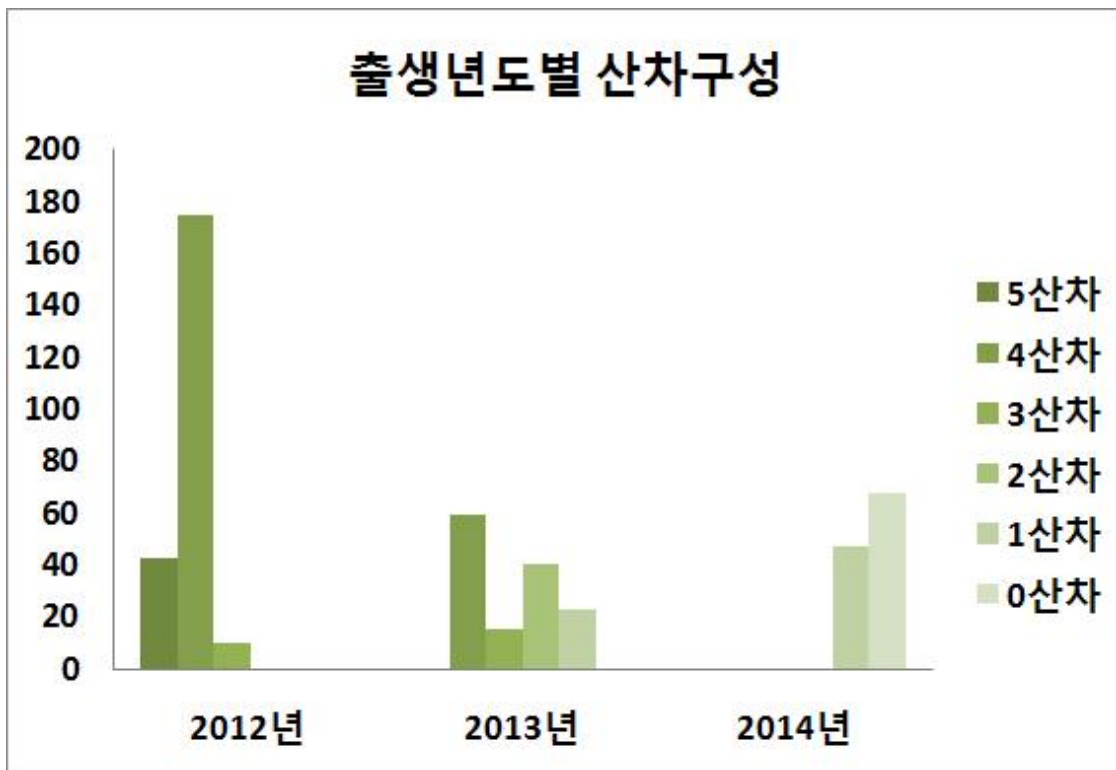


Figure 1-1-1. 기초돈군의 출생년도별 산차구성

모든이 생애총생산을 완료하게 되면 확보한 형질을 이용하여 생애총생산성 형질을 산출할 예정이며, 생애총생산성 형질과 그에 대한 산출방식은 Table 1-1-5에 정리되어 있음. 모든의 생애총생산성형질은 크게 두 갈래로 구분 지을 수 있음. 첫번째로는 생애총 성적총합으로, 첫분만일부터 최종산차까지의 총산자수(NL), 실산자수(LNBA), 이유자돈수(LTP)와 첫분만일부터 도태일까지의 일수를 합한 생산수명(LPL)이 이에 포함됨. 두번째는 생애총 번식효율성으로, 분만일부터 도태일까지의 비생산일수를 생산수명으로 나눈 생애총 비생산일수 비율(LNPDR), 생애총 총산자수, 실산자수, 이유자돈수를 각각 수명일수로 나눈 생산수명대비 생애총산자수(LN365), 생산수명대비 생애총 실산자수(LNBA365), 생산수명대비 생애총 이유자돈수(LTP365) 등을 산출해낼 수 있음.

Table 1-1-5. 생애총생산성 형질과 산출방식

구분	형질명	산출방식
생애총 성적 총합	LTNB (Lifetime total number of born piglets)	생애총 총산자수
	LNBA (Lifetime number born alive piglets)	생애총 실산자수
	LPW (Lifetime piglet weaned)	생애총 이유자돈수
	FP (Final parity)	도태산차
	LL (Length of life)	모든수명
생애총 번식효율성	LPL (Length of productive life)	생산수명(첫분만일~도태일)
	LNPDR (lifetime nonproductive days ratio)	생애총 비생산일수 비율
	LNDPP (lifetime nonproductive days/parity)	평균 비생산일수
	LTNB365 (NL/LL)	생애총 총산자수/수명
	LNBA365 (LNBA/LL)	생애총 실산자수/수명
	LPW365 (LTP/LL)	생애총 이유자돈수/수명

협력농장은 연간 모돈교체를 50%를 목표로 사양관리를 하고 있음. 이에 따른 실험축군의 생애총생산 완료시점을 어느정도 예측해볼 수 있으며, 그 결과는 Table 1-1-6과 같음. 모돈의 연간회전율을 약 2회라고 가정했을 때 6개월에 집단내 산차는 1산차씩 늘어나고(도태모돈 제외), 1년후에는 개체 각각 분만산차가 2산차씩 증가하며, 약 50%가 교체될 예정이므로, 240두가량이 생애총생산을 완료할 것으로 보임. 또한 현재 보유하고 있는 집단내 산차구성중 약 60%가 4산차이상으로, 18개월(3산차)이내에 생애총생산을 완료할 확률이 높을 것으로 판단됨. 3년의 연구기간 중 유전체분석을 실시하게 될 2차년까지 충분한 규모의 생애총생산이 완료되는 모돈이 축적될 것으로 보이며, 결론적으로 본 연구진의 실험축군 구축은 적절하다고 판단됨.

Table 1-1-6. 연구기간경과에 따른 실험집단의 산차변화 예측

	현재	6개월후	12개월후	18개월후
집단내 최고산차	5산차	6산차	7산차	8산차
생존모돈	480	360	240	180
생애총생산완료(예측)	0	120	240	300

3년간의 추적관찰결과 480마리의 모돈 중 6마리를 제외한 474마리가 도태되었으며, 그 비율은 Table 1-1-7과 같으며, 예상대로 집단구성이 이루어졌다고 판단됨.

Table 1-1-7. 기초돈군의 품종별, 산차별 구성(연구종료일기준)

	도태산차								계
	1	2	3	4	5	6	7	8	
랜드레이스 (Landrace)	1	2	10	14	48	41	3	0	119
	1%	2%	8%	12%	40%	34%	3%	0%	
요크셔 (Yorkshire)	10	19	28	38	127	107	22	4	355
	3%	5%	8%	11%	36%	30%	6%	1%	
계	11	21	38	52	175	148	25	4	474
(비율)	2%	4%	8%	11%	37%	31%	5%	1%	

나. 실험돈의 유전체분석용 혈액시료채취 및 Genomic DNA 추출

실험돈으로 선정된 모돈들에게서 DNA추출용 생체시료를 확보하는 과정에서 추출용 시료가 변경되었음. 계획서상 채혈시료확보를 목표로 하였으나, 임신모돈의 스트레스 최소화를 위하여 털을 뽑아 모근시료를 사용하기로 함. 털은 Figure 1-2-1 좌측과 같이 최소 60개 최대 300개 지퍼백 또는 비닐봉지에 모돈의 고유ID와 함께 냉동발송되었음. 발송된 털시료는 실험실에서 Figure 1-2-1 우측과 같이 전처리 되었으며, 이는 DNA가 주로 분포하는 모근을 채취하기 위하여 털의 아래쪽 끝 1cm가량을 잘라 1.5ml 튜브에 최소 60개 최대 100개까지 옮겨 담은 결과임.



Figure 1-2-1. 실험돈의 모근시료 및 추출전처리

DNA추출은 iNtRON Biotechnology사의 G-spin Total DNA extraction Kit를 활용하여 추출하였으며, 25 μ l로 최종 elution시킴. 추출된 DNA는 유전체분석에 적합한지 정성, 정량분석을 거치게 되는데 그 과정은 Figure 1-2-2와 같음.

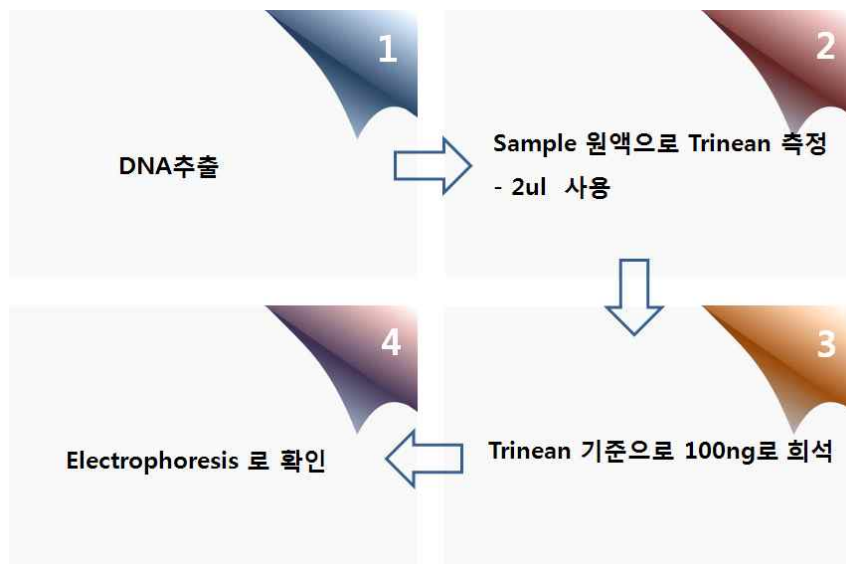


Figure 1-2-2. 추출된 DNA시료의 정성, 정량분석 과정

Figure 1-2-3은 Trinean을 통해 정성, 정량분석된 결과로, 260nm의 파장수치를 통해 추출된 DNA의 양을 알 수 있고, 230, 280nm의 파장수치를 통해 DNA의 Quality를 알 수 있는데, Figure 1-2-3의 좌측은 추출된 DNA중 양적, 질적으로 이상적으로 잘 나온 DNA라고 볼 수 있으며, 우측은 230nm파장의 수치가 비정상적으로 높아 유전체분석에 적합하지 않은 DNA라고 볼 수 있음. Trinean으로 측정된 농도값을 기준으로 DNA를 100ng의 농도로 희석시키는 과정을 실시함.

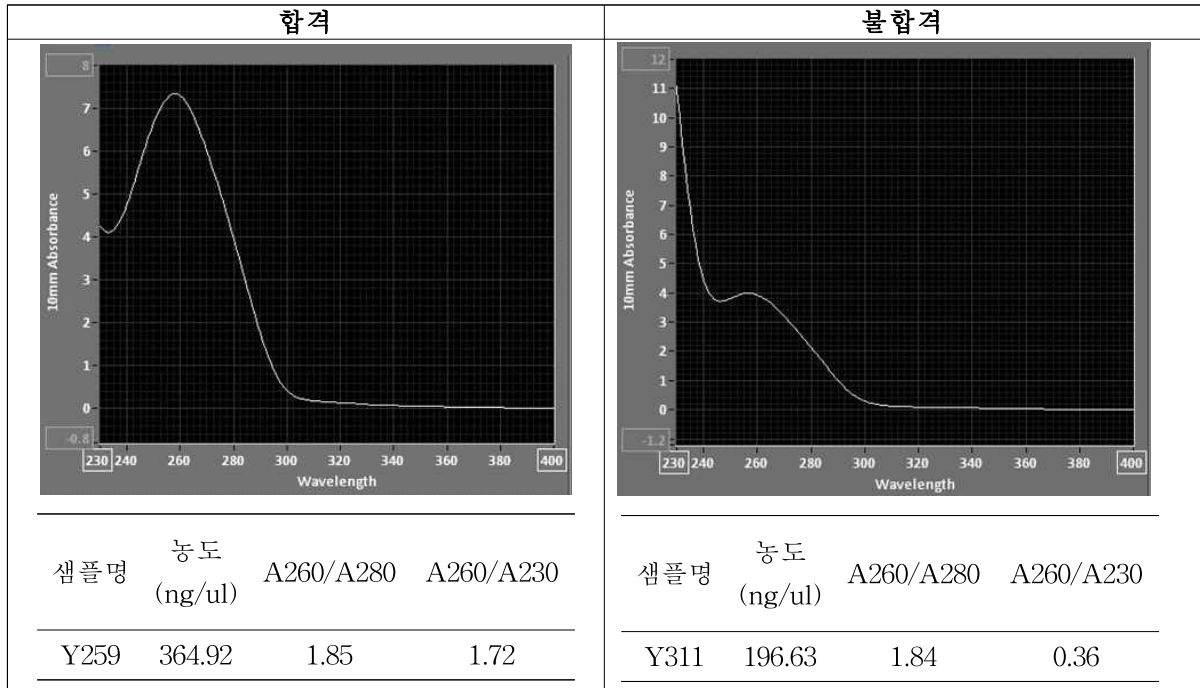


Figure 1-2-3. 정성,정량분석결과 합격Sample과 불합격Sample 예

동일한 농도로 희석된 DNA는 전기영동과정을 거쳐 유전체분석에 적합한지 최종점검과정을 거치게 되는데, 이상적인 형태는 Figure 1-2-4의 전기영동결과중 가장 오른쪽 Control 과 같이 Ladder보다 위쪽에 두껍고 밝은 밴드의 형태이지만, 실제 추출한 DNA는 Ladder아래쪽으로 smear하게 gradation을 보이고 있음. 이는 DNA추출용 털 시료를 돼지에서 뽑고나서 냉동보관 하기까지, 그리고 발송 및 추출까지 시간이 어느정도 지나면서 모근이 말라버렸기 때문으로 생각됨. Chip분석에 부적절하다고 판정받은 DNA는 재추출을 위하여 농장에 시료 재발송을 요청함.

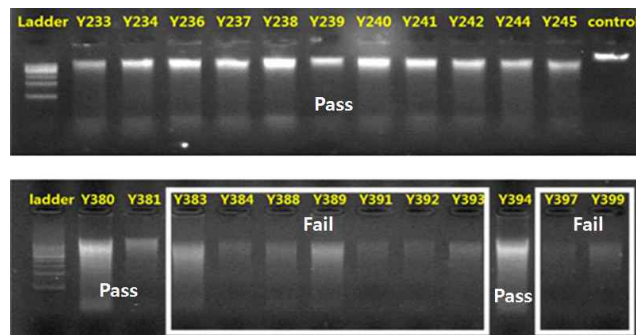


Figure 1-2-4. 추출된 DNA시료의 정성, 정량분석

다. 산차에 따른 모돈의 번식능력 변화 양상 구명 및 도태요인 분석

(1) 국내 종돈장을 대신으로 한 모돈생애총생산성에 대한 실태 및 인식조사

국내에 모돈생애총생산성에 대한 조사가 현재 전무하기 때문에 그 실태와 현장의 인식조사가 필요하다고 판단됨. 따라서 국내 종돈장을 잇는 허브역할을 하고 있는 1세부과제의 연구진인 종축개량협회가 주축이 되어 모돈생애총생산성에 대한 인식 및 실태조사를 실시하기로 함. 설문조사는 아래와 같이 진행됨

설문조사 대상

- ① 한국종축개량협회에 등록된 국내 종돈장 전수 126개소
- ② 제21회 종돈개량세미나에 참석한 종돈장, AI센터 및 종돈업관계자 전수
- ③ 일반농가

설문조사 방식

- ① Fax전송 및 유선조사
- ② 설문조사지 직접수거

설문조사문항 구성

- A. 농가의 모돈도태 현황조사 관련 5문항 (농장관계자만 응답)
- B. 모돈 생애총생산성에 대한 인식조사관련 7문항

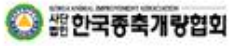
설문조사문항은 농가의 모돈도태현황조사를 통한 모돈생애총생산성에 대한 실태조사, 종돈업 관계자들의 모돈생애총생산성에 대한 인식조사로 나뉘어있음. 국내에서 모돈의 생애총생산성에 대해 구체적으로 실태 및 원인분석에 대한 조사는 이루어지지 않은 상황을 고려해 모돈 생애총생산성에 대한 인식조사를 추가로 구성함. 모돈생애총생산성에 대한 현장 설문조사는 국내에서 최초이기 때문에 의미가 클 것으로 판단됨.

한국종축개량협회가 종돈농가에 발송한 팩스전송표지와 설문조사지 원안은 아래 Figure 1-3-5와 Figure 1-3-6에서 확인할 수 있음.

팩 스 전 송

발 신 처		수 신 처	
기 관 명	사)한국중축개량협회	회 사 명	중축업(중돈)등록업체
부 서 명	중돈개량부 등록심사팀	부 서 명	
성 명		성 명	
전화번호		전화번호	
FAX 번호		FAX 번호	
주 소		주 소	
발송매수	표지포함 2 매		
<p>1. 귀 농장의 무궁한 발전을 진심으로 기원하며,</p> <p>2. 고려대학교 홍기창 교수연구팀 연구과제인 '모든 생애총생산성 향상을 위한 고산차모돈의 번식/면역능력 증대 및 조기선발지표 개발'과 관련됩니다.</p> <p>3. 현재 우리나라의 평균 모든 도태산차가 2.8산차로 굉장히 낮음에도 불구하고 이에 대한 도태사유나 원인분석에 대한 자료가 미흡합니다.</p> <p>4. 따라서, 국내 모돈의 조기도태 사유에 대한 몇 가지 질문을 드리오니 바쁘시더라도 설문에 응해주시고,</p> <p>5. 6월 19일(금)까지 설문지에 안내된 팩스번호로 회신하여 주시길 바랍니다.</p> <p>붙임 : 설문조사지 1부. 끝</p>			

Figure 1-3-5. 농가발송용 Fax내용



설문조사지

소속 :

응답자 :

지역 : 도

※ 귀 농장의 최근 3년간의 관리지침 및 성적을 기준으로 답해주시기 바랍니다.

A. 모돈도태 현황조사

A0. 소속 또는 관리하고 계신 농장이 있습니까?

있다 () → A1문항으로

없다 () → B1문항으로

A1. 모돈규모 : 약 두

A2. 목표하고 있는 연간 모돈 교체율 : 약 %

A3. 귀 농장내 모돈의 평균 도태산차 : 약 산차

A4. 연간 도태되는 모돈의 산차별 분포 (합계가 100%인지 확인바랍니다)

구분	분포		예시
초산	약	%	약 20 %
2-3산차	약	%	약 35 %
4-5산차	약	%	약 20 %
6산차이상	약	%	약 25 %
합계	0	%	100%

A5. 귀 농장에서 모돈을 도태할 때 그 이유는 무엇입니까? (모든 문항에 체크)

구분	매우드물	가끔있음	보통임	자주있음	이주 빈번함
1) 신규모돈 도입을 위해	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
2) 고령(산차가 너무 높아서)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
3) 불임(미발정, 휴양, 재발정)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4) 유산	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
5) 능력저하(산자수)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
6) 생식기불량(외음부 농 등)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
7) 유두불량(유방염, 무유종 등)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
8) 지체불량	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Figure 1-3-6. 설문조사지

B. 모든 생애총생산성에 대한 인식조사

B1. ‘모든의 생애총생산성’이란 용어에 대하여 알고계십니까?

※ 모든생애총생산성 : 모든 한 마리가 도태될 때까지의 번식 성적
(생존산자수 총합, 미유자돈수 총합, 비생산일수 총합 등)

처음들었다	들어보았지만 의미는 모른다	알고 있다	알고 있으며 관심 있다	현재 농장성적 관리에 적용하고 있다
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

B2. 모든의 ‘경제산차’는 몇 산차라고 생각하십니까? _____ 산차

B3. 우리나라 모든의 평균 도태산차는 28산차로, 유럽(44산차)과 큰 차이가 난다는 사실에 대해 어떻게 생각하십니까?

전혀 문제없다	별로 문제없다	보통이다	비교적 큰 문제이다	매우 큰 문제라고 생각한다
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

B4. 모든의 생애총생산성은 우리나라 28두, 유럽 49두(약 1.9배 차이)인데, 이에 대해 어떻게 생각하십니까?

※ 모든 한 마리가 도태될 때까지의 미유자돈수 총합으로 계산

전혀 문제없다	별로 문제없다	보통이다	비교적 큰 문제이다	매우 큰 문제라고 생각한다
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

B5. 양돈선진국과의 모든생애총생산성 격차로 인한(우리나라 28두 vs 유럽 49두) 국내양돈업계의 손해는 어떨 것으로 생각되십니까?

손해가 전혀 없다	손해가 별로 없다	보통이다	손해가 비교적 크다	손해가 매우 크다
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

B6. 모든을 몇 산차까지 사용하고 싶으십니까? _____ 산차

B7. 이 연구를 통해 모든의 생애총생산성이 향상된다면 국내양돈업계에 미치는 영향은 어떨것으로 생각되십니까?

부정적인 영향	영향없음	긍정적이지만 미비한 영향	어느정도 긍정적인 영향	상당히 큰 긍정적인 영향
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

소중한 시간 내어주셔서 감사합니다.
해당 설문조사는 농림수산식품기술기획평가원(PET) 사업인 ‘모든생애총생산성 향상을 위한 고산차모든의 번식/면역능력 증대 및 조기선발지표개발’의 일환으로 제작되었습니다.

Figure 1-3-6. 설문조사지(계속)

Table 1-3-6. 설문조사 응답자

구분	응답자	비고
국내 등록 종돈장	48	A문항 이상치로 판단되어 제거된 농장 2개
AI센터 등 종돈업 관계자	19	

국내등록 종돈장을 대상으로 한 설문조사는 1,2차 Fax발송형태로 진행되었으며, 2차는 Fax 발송후 유선협조요청을 통해 실시함. 설문지 회수율은 약 1/3가량임. 현장업무가 바쁜 농장의 특성상 설문지 회수율이 높지 않았으나, 1개월에 1회씩 주기적으로 추가조사를 하여 전수조사를 목표로 하고 있음.

또한, 한국종축개량협회가 주최한 2014 종돈능력검정보고회 및 제21회 종돈개량 세미나에 참석한 종돈업관계자를 대상으로 한 설문조사는 설문지 배포량이 적었고(30부가량) 회수는 19부가량으로 기대치(80부이상)에 비해 저조한 수준을 보임. 매년 종돈능력검정보고회 및 종돈개량 세미나에는 100여명이 참석하는데, 당시(2015년 6월 26일) 중동호흡기증후군(MERS)의 영향과 비가 오는 날씨 때문에 참석인원이 저조했고, 이미 팩스를 통해 응답한 인원이 당 행사에 참석한 경우도 있기 때문에 비교적 설문지 회수가 저조한 것으로 판단됨.

A1. 응답농가 보유모돈규모

구분	200두미만	200-400두	400-600두	600-800두	800두이상
응답자	5	9	12	7	13
응답비율	11%	20%	26%	15%	28%

응답농가는 보유모돈 800두이상인 농가와 400-600두인 농가가 비슷한 수준으로 많았으며, 200두미만의 농가가 가장 적음. 또한, 분석시 보유모돈 규모가 50두미만인 소규모 농가의 모돈 관리현황에 대한 응답은 분석대상에서 제외하기로 함.

A2. 응답농가 모돈교체율

구분	30%미만	30-40%	40-50%	50-60%	70%이상	※ 전체평균
응답자	3	9	24	5	1	40.65%
응답비율	7%	21%	57%	12%	2%	

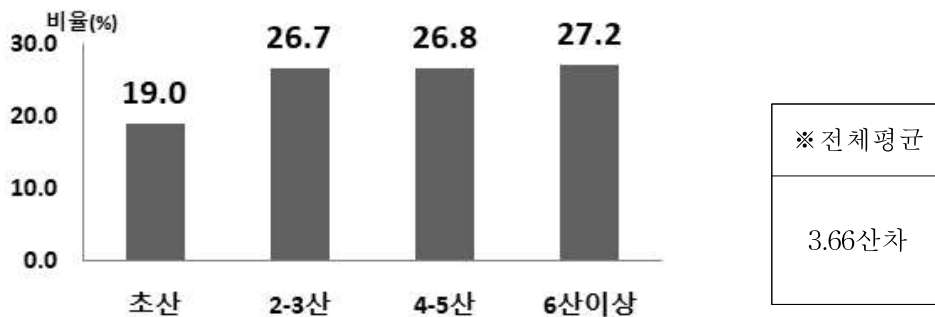
대부분의 농가가 모돈교체율을 40~50%를 목표로 관리하고 있다고 응답함(응답인원의 57%). 응답농가가 종돈장인 특성상 교체율이 비교적 높을 것으로 예상되었으나 일반적으로 권장하는 모돈 교체율과 비슷한 현황을 나타내고 있었음.

A3. 응답농가 평균도태산차

구분	3산미만	3-4산	4-5산	5-6산	7산이상	※ 전체평균
응답자	1	10	7	10	9	5.04산차
응답비율	3%	27%	19%	27%	24%	

도태모든의 평균산차가 3-4산차, 5,6산차라는 응답이 가장 많았으며 전체평균은 약 5산차임. 모든의 평균 도태산차가 2.8산차라는 기존 조사결과에 비해 평균 도태산차는 2산차가량 더 높게 나타남. 이에 대한 심도있는 분석을 위해 도태모든의 산차별 분포수치에 대한 응답결과를 보았음.

A4. 응답농가 도태모든의 산차별 분포



도태모든의 산차별 분포를 보았을 때 6산차 이상 모든의 비율이 28.9%로 가장 높았으나 2-3산 모든의 비율이 27.1%로 두 번째로 높음을 알 수 있고, 초산을 포함한 3산이하의 모든의 비율이 45.5%로 무시할 수 없는 수치임. 도태모든의 산차별 분포를 통해 평균도태산차를 계산하기 위해 2-3산차는 2.5산차, 4-5산차는 4.5산차, 6산차 이상은 6산차로 두고 계산함. 평균 도태산차를 도출한 결과 전체의 평균치는 3.66산차로, A3문항 응답결과(5.04산차)보다 1산차 이상 낮게 산출됨. 이는 농가에서 평균 도태산차관련 문항에 응답을 할 때 농장의 성적계산시 저산차(1,2산차)에 도태되는 모든은 무의식적으로 배제시켰기 때문으로 판단됨.

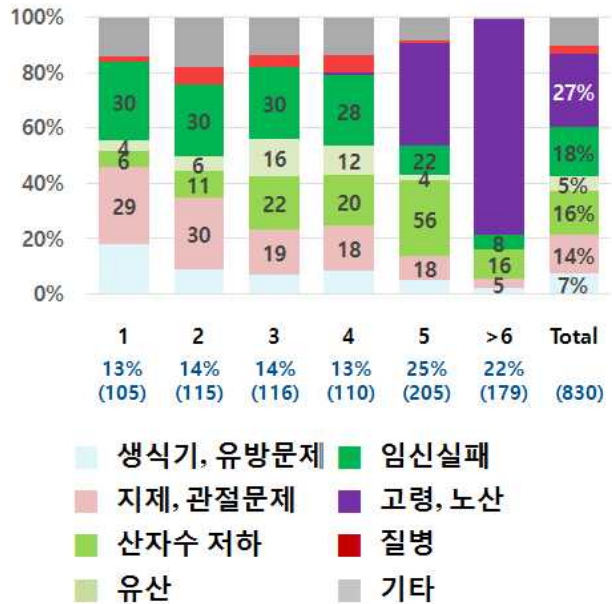
A5. 도태사유별 빈도

■ 도태사유에 대한 농장인식 설문조사

사유 \ 빈도	매우 잘못	잘못	보통	드뭄	매우 드뭄
생식기문제	3%	0%	15%	33%	50%
유방염, 무유증	7%	0%	14%	31%	48%
지체불량	9%	9%	27%	41%	14%
산자수저하	7%	9%	25%	50%	9%
유산	5%	5%	8%	48%	35%
임신실패	5%	25%	27%	39%	5%
고령, 노산	16%	20%	57%	2%	5%
모돈교체	10%	17%	39%	5%	29%

※ 사유별 빈도에 대한 득표율임
 ※ 열(column) 최빈값 / 행(row) 최빈값

■ 1개농장의 5년간 산차별 도태사유



모돈의 도태사유별 빈도를 조사한 결과, 각 열의 최빈값은 밑줄을, 각 행의 최빈값은 기울임 글꼴로 표시하였음(좌측). 생식기문제나 유방염, 무유증 으로 도태되는 모돈은 ‘매우드물다’ 또는 ‘드물다’고 응답한 농가가 80%가까이 주로 분포했으며, 매우 드물다고 공통적으로 ‘매우드뭄’에 가장 많은 응답자가 분포하고 있었음 (생식기문제 50%, 유방염 및 무유증 48%). 지체불량과 산자수저하로 도태되는 모돈의 빈도는 ‘보통’ 또는 ‘드물다’고 선택한 응답자가 공통적으로 75%가량 분포했으며, 가장 많은 응답자는 ‘드물다’에 분포하고 있었음 (지체불량 41%, 산자수저하 50%). 유산으로 인한 도태는 ‘드뭄’과 ‘매우 드뭄’에 주로 응답자가 분포하고 있었으나 ‘드뭄’이 가장 많은 비율을 차지하고 있었음 (48%).

앞선 사유들에 비해 응답자의 선택이 넓게 분포한 사유도 있었음. 임신실패로 인한 도태는 보통(27%)을 기준으로 ‘잘못(25%)’과 ‘드뭄(39%)’에 비교적 골고루 분포하고 있었음. 농장에서 고령, 노산으로 도태하는 모돈의 비율은 ‘보통’이라고 응답한 농장이 가장 많았으나(57%), 매우잘못(16%)이나 잘못(20%)으로 응답한 농가 역시 상당수 존재했음. 이는 농가마다 고령 노산도태에 대한 인식이나 기준이 상당히 다르다는 것을 알 수 있으며, 주로 보통이상의 빈도로 고령,노산 도태를 시키고 있다고 인식함을 의미함. 본 연구과제에서 유전체분석을 실시한 협력농장의 5년간 산차별 도태사유를 분석한 결과를 참조할 때 협력농장은 고령, 노산의 기준을 5산차부터로 설정하고 있다는 것을 알 수 있음.

마지막으로, 모돈교체로 인한 도태빈도에 대한 응답자 분포에서는 특별한 경향치를 찾을 수 없었는데, 이는 농가마다 모돈교체의 기준이 서로 다르기 때문이라고 판단됨.

신규모돈 도입을 위해서 도태를 하는 빈도는 응답자 분포가 어느 한쪽으로 치우치지 않는 모습을 보였는데, 이는 농장마다 관리기준이 매우 상이하기 때문으로 판단되며, 신규모돈 도입이 잦은 농가와 그렇지 않은 농가를 구분해 해당 군집의 차이를 살펴보기로 함. (Figure 1-3-7)

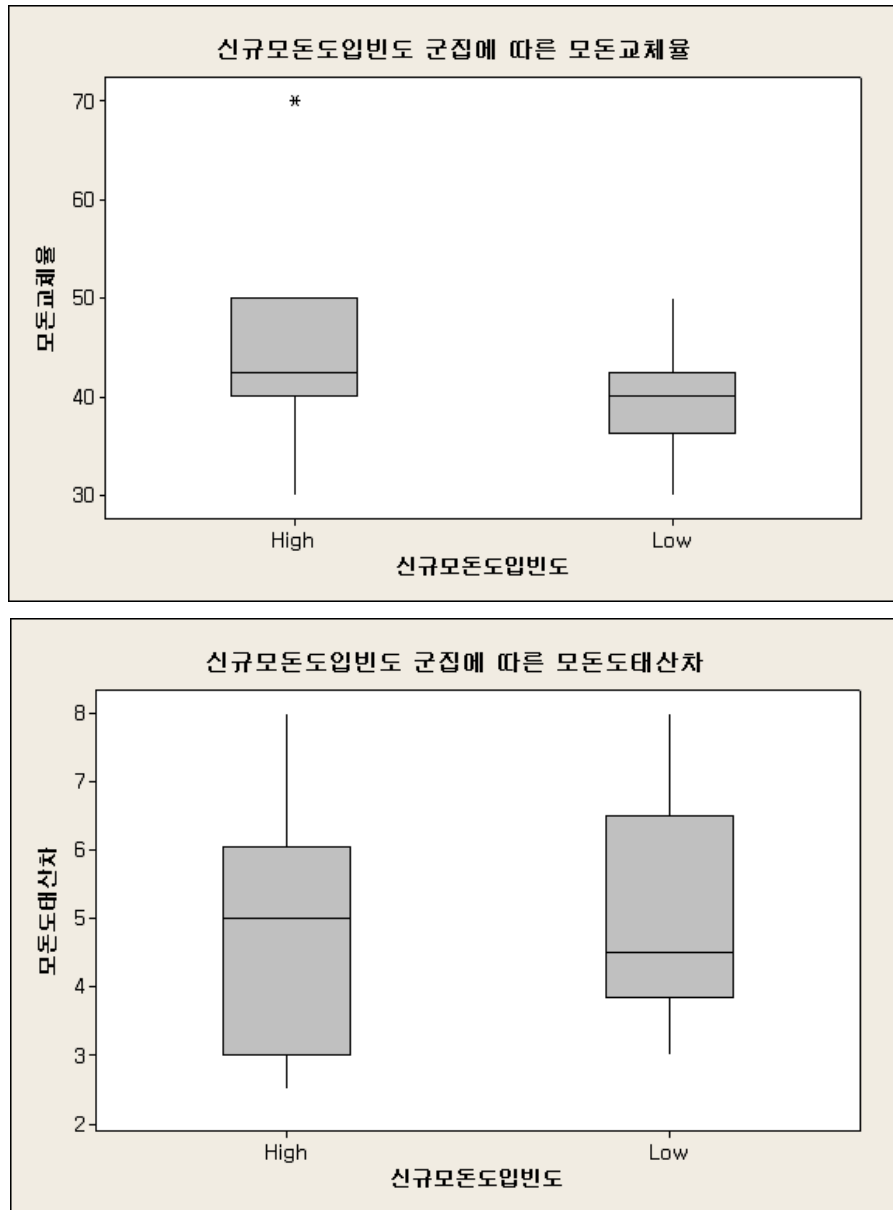


Figure1-3-7. 신규모돈도입빈도가 높은집단과 낮은집단의 모돈교체율, 도태산차비교

신규모돈의 도입빈도가 높다(자주있음+매우빈번)고 응답한 집단이 낮은집단(가끔있음+매우드뎠)에 비해 교체율은 높고(High 평균 45.5%, Low 평균 39.75%) 평균도태산차는 낮은(High 평균 4.8산차, Low 평균 5.12산차) 경향을 보이고 있으나 통계적으로 유의하지는 않음.

B1. ‘모든의 생애총생산성’ 용어에 대한 인식수준

	처음들었다	들어보았지만 의미는 모른다	알고있다	알고있으며 관심있다	농장성적관리에 적용하고 있다
응답자	5	4	20	22	11
응답 비율	8%	6%	32%	35%	18%

모든의 생애총생산성이란 용어는 알고있거나, 알고있으며 관심이 있는경우가 응답자의 67%로 대부분을 차지하고 있음을 알 수 있는데, 종돈장실무진 혹은 종돈업종사자들을 대상으로 한 설문조사이기 때문에 관심도가 높았던 것으로 판단됨.

B3~B5. 유럽과의 모든 도태산차 격차에 대한 문제인식

	전혀 문제없다	별로 문제없다	보통이다	비교적 큰 문제	매우 큰 문제
평균도태산차 격차 (2.8산 vs 4.4산)	0	1	11	32	19
모든생애총생산성 격차 (26두 vs 49두)	0	1	3	36	23
격차로 인한 국내 양돈업계의 손해에 대한 예측	0	1	3	35	24

유럽과 우리나라의 평균 도태산차 격차에 대한 정보를 접했을 때 대부분이 큰 문제라고 인식하였지만, 문제의식을 하지 않고 보통이라고 응답한 비율도 적지 않은 것을 알 수 있음. 그러나 이를 모두가 평생 생산하는 자돈의 수로 환산한 생애총생산성 수치격차를 보여주었을 때 응답자들의 대부분이 큰 문제라고 생각하며, 이로인한 국내 양돈업계의 손해도 상당할 것이라고 인식한다고 응답함.

B7. 모든생애총생산성 향상에 대한 업계의 기대

부정적인 영향	영향없음	긍정적이지만 미비한 영향	어느정도 긍정적인 영향	상당히 큰 긍정적인 영향
2	0	7	23	31

본 연구를 통해 모든의 생애총생산성이 향상이 되었을 때 업계에 어떤 영향을 줄 것인지에 대한 응답은 대부분이 큰 긍정적인 영향을 줄 것이라는 희망적인 응답을 하였음.

B2, B6. 본인이 생각하는 모든의 '경제산차'와 희망하는 모든사용산차

	구분	3산 미만	3-4산	4-5산	5-6산	6-7산	7산 이상	※ 전체 평균
경제산차	응답자	4	15	22	10	10	2	4.36산차
	응답비율	6%	24%	35%	16%	16%	3%	
희망사용 산차	응답자	1	0	7	6	19	28	6.40산차
	응답비율	2%	0%	11%	10%	31%	46%	

모든의 경제산차는 응답자 대부분이 3산-5산이라고 생각한다고 응답하였으며, 응답자의 전체 평균은 4.36산차임. 그러나 희망하는 모든사용 산차에 대해서는 대부분이 경제산차보다 높은 6산차 이상을 원하고 있으며, 본 연구를 통해 모든의 생애총생산성이 향상된다면 모든의 경제산차가 길어지게 되며, 이는 양돈업계의 니즈를 충분히 반영한 육종방향이라고 판단됨.

(2) 국내모든의 생애총생산성 분석

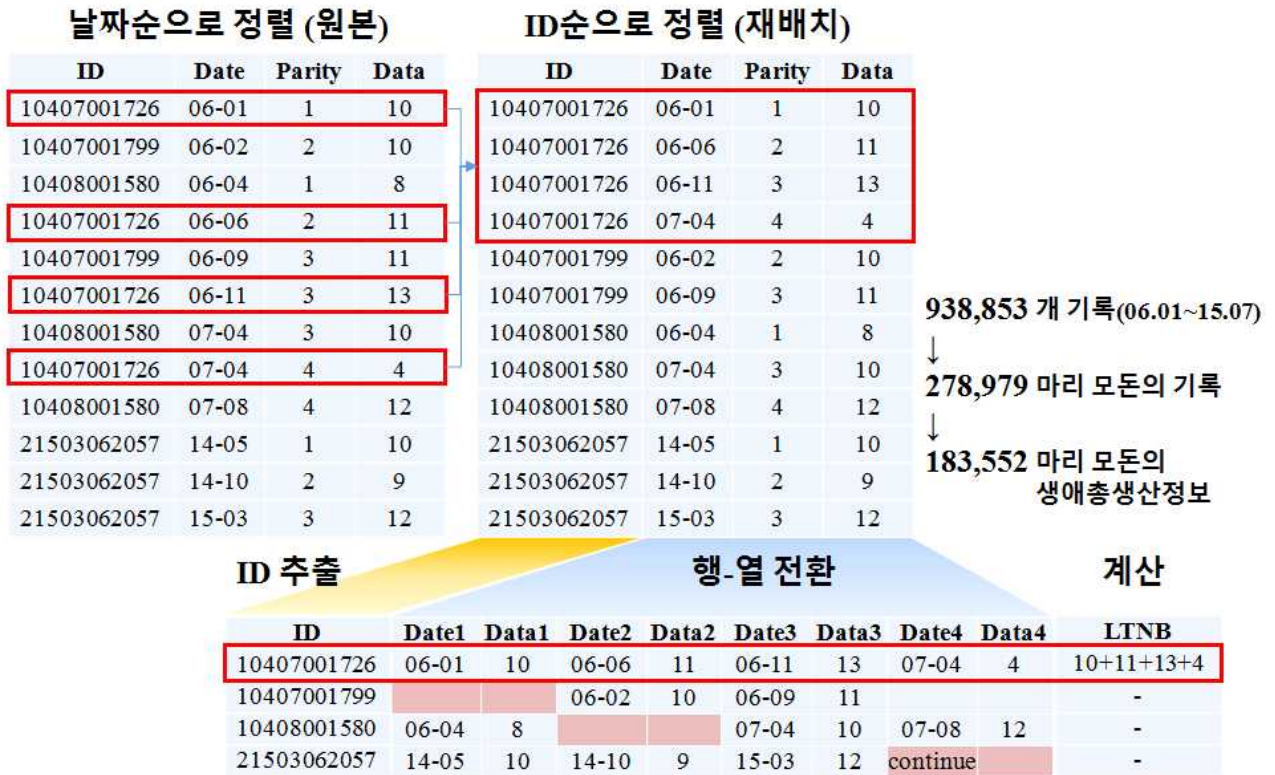


Figure1-3-8. 종축개량협회 번식기록데이터 추출 및 정제 개념도

<1> 품종선별 (모계품종위주)

Code	품종	두수
0	F1	256
1	버크셔	947
2	햄프셔	308
3	랜드레이스	28,883
4	요크셔	116,645
5	두록	7,794
7	Others	49
12	Others	105
49	Others	28,565
Total		183,552

183,552 sow`s full lifetime records

↓ Major maternal breed

145,528 sows (L28,883+Y116,645)

Figure1-3-9. 종축개량협회 번식기록데이터에서 추출,정제한
모든의 생애총생산성데이터의 선별과정

<2> 농장선별

145,528 sows from 266 farms

↓ 3년간 신규모돈기록 존재

↓ 매년 100두이상의 기록

↓ 300두 이상 기록

118,348 sows from 61 farms (L23,647+Y94,701)

↓ Other outlier (번식기록에 “NULL” 값)

↓ Other outlier (틀린 번식기록; 9 sows)

115,755 sows from 61 farms (L22,895+Y92,860)








Table 1-3-7 국내 모든의 생애총생산성 (주요모계품종별)

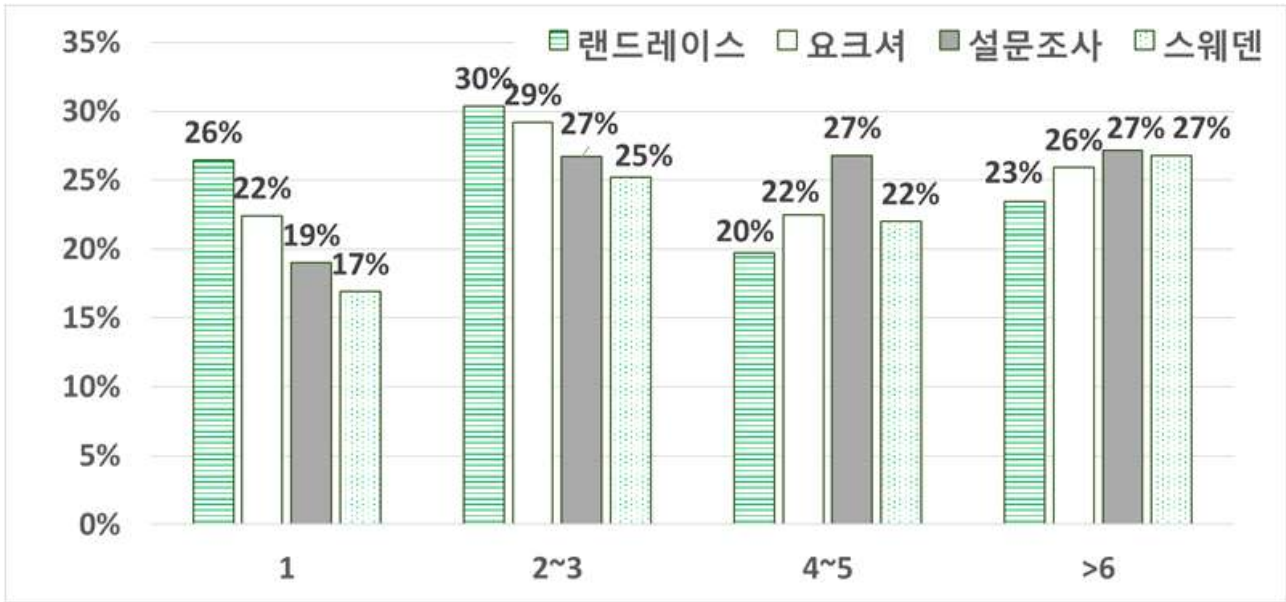
Traits	Landrace (n=22,895)	Yorkshire (n=92,860)	<i>P</i> -value	Southern Europe (n=109,373)
FP	3.61 (0.02)	3.74 (0.01)	<0.0001	4.9 (0.01)
LTNB	41.90 (0.21)	44.69 (0.11)	<0.0001	
LNBA	38.90 (0.20)	41.29 (0.10)	<0.0001	58.0 (0.10)
Lstart	38.95 (0.19)	40.90 (0.10)	<0.0001	
LTNBmean	11.54 (0.02)	11.84 (0.01)	<0.0001	
LNBAmean	10.76 (0.02)	10.96 (0.01)	<0.0001	11.9 (0.01)
Lstartmean	10.67 (0.02)	10.84 (0.01)	<0.0001	

※ 유럽 데이터는 125개농장의 08~13년 기록(R. Iida 등, 2015)

※ Model: 품종 + 초산연도 + 초산계절 + 농장
1산차 NBA를 공변량으로 사용

Table 1-3-8 국내 생애총생산성 형질의 연도별 변화추이

Traits	2010 (n=14,133)	2011 (n=10,093)	2012 (n=14,713)	2013 (n=13,974)	2014 (n=15,544)	2015 (n=22,556)	P-value	Trend
FP	4.16 ^a (0.02)	4.17 ^a (0.03)	3.68 ^d (0.02)	3.94 ^c (0.02)	4.06 ^b (0.02)	3.45 ^e (0.02)	<0.0001	
LTNB	49.08 ^a (0.29)	49.39 ^a (0.32)	43.63 ^c (0.28)	46.79 ^b (0.28)	48.90 ^a (0.27)	41.75 ^d (0.24)	<0.0001	
LNBA	45.42 ^a (0.26)	45.38 ^a (0.30)	40.27 ^c (0.25)	43.31 ^b (0.26)	45.20 ^a (0.25)	38.89 ^d (0.22)	<0.0001	
Lstart	45.08 ^a (0.26)	44.98 ^a (0.29)	40.04 ^c (0.25)	43.08 ^b (0.25)	44.67 ^a (0.24)	38.23 ^d (0.22)	<0.0001	
LTNBmean	11.37 (0.02)	11.46 (0.02)	11.56 (0.02)	11.85 (0.02)	12.20 (0.02)	12.27 (0.02)	<0.0001	
LNBAmean	10.48 (0.02)	10.56 (0.02)	10.73 (0.02)	11.02 (0.02)	11.35 (0.02)	11.49 (0.02)	<0.0001	
Lstartmean	10.40 (0.02)	10.47 (0.02)	10.66 (0.02)	10.93 (0.02)	11.20 (0.02)	11.28 (0.02)	<0.0001	



- ※ ‘스웨덴’ 은 2002~2005년 사이의 14,234두 L×Y 모돈기록 (Linda Engblom 등, 2007)
- ※ ‘랜드레이스’와 ‘요크셔’는 종축개량협회에서 실제 계산한 국내 모돈의 도태산차분포
- ※ ‘설문조사’ 는 설문조사에서 현장종사자가 응답한 모돈도태분포현황 계산수치

Figure 1-3-10 그룹별 도태모돈의 산차분포.

2. GWAS분석을 통한 후보유전자 발굴 및 유전자구조 분석

가. 실험돈에 대한 porcine 60K SNP chip 유전자형 결정

(1) 유전체분석

제 1세부과제의 2차년 목표는 전장유전체연관성분석(GWAS)을 통해 후보유전자를 발굴하고, 기능 및 구조에 대한 사전연구로, 이를 위해 1차년도에 추출한 모돈의(총 480두) Genomic DNA를 이용하여 SNP chip분석을 실시하기로 함. Illumina Porcine SNP 60K Bead chip을 사용하였으며, 그 결과 총 61,565개 SNP에 대해 유전자형결정이 완료됨(Table 1-2-1).

Table 1-2-1. SNP chip분석결과

SNP정보			개체ID										
SNP명	염색체	위치	L001	L050	L073	L027	L013	L062	Y005	L039	L025	L074	L002
ALGA0000009	1	538161	GG	AG	GG	GG	GG	GG	AG	GG	GG	GG	AG
ALGA0000014	1	565627	GG	AG	GG	GG	GG	GG	AG	GG	GG	GG	AG
ALGA0000021	1	861439	AA	AC	AA	AA	AA	AA	CC	AA	AA	AA	AC
ALGA0000022	1	865364	AA	AG	AA	AA	AA	AA	AG	AA	AA	AA	AG
ALGA0000046	1	1314590	AG	AG	AG	AG	GG	GG	AA	GG	GG	GG	AG
ALGA0000047	1	1300464	GG	AG	GG	GG	GG	GG	AG	GG	GG	GG	AG
ALGA0000087	1	1901240	GG	AG	AG	GG	GG	GG	AG	GG	GG	--	AG
ALGA0000112	1	3327918	GG	AA	AG	GG	GG	GG	AG	GG	AG	AG	AA
ALGA0000120	1	3414845	AA	AC	AA	AC	AA	AA	AC	AA	AC	AA	CC
ALGA0000131	1	3485019	AG	AA	AG	AA	AA	AA	AG	AA	AG	AA	AA
ALGA0000133	1	3539284	AG	GG	AA	GG	GG	GG	AG	GG	AG	GG	GG
ALGA0000134	1	3528078	GG	AG	GG	AG	GG	GG	GG	GG	AG	GG	AG
ALGA0000172	1	3724750	AG	GG	AG	AG	AA	AA	AA	AA	GG	AG	GG
ALGA0000188	1	3067596	AA	AG	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AG	AA
ALGA0000195	1	2965787	AA	AG	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AG	AA
ALGA0000218	1	2051900	AG	GG	AG	GG	GG	AG	GG	AG	AG	AA	GG
ALGA0000232	1	1958514	AA	AC	AA	AA	AA	AA	AC	AA	AA	AA	AC
ALGA0000251	1	2153932	GG	AG	GG	GG	GG	GG	AG	GG	GG	GG	AG
ALGA0000269	1	3877542	GG	AG	GG	GG	GG	GG	AG	GG	GG	AG	AG
ALGA0000277	1	4022389	GG	AA	GG	GG	GG	GG	AG	GG	AG	AG	AA
ALGA0000288	1	4087929	AG	GG	AG	AG	GG	GG	AG	GG	AG	GG	GG
ALGA0000289	1	4101909	AC	CC	CC	AC	AC	AA	AC	AC	CC	AC	CC
...													

(2) 데이터 정제작업


유전자형이 분석된 총 61,565개의 SNP들에 대해 정제작업을 거쳐야 하는데, 우선 SNP들의 위치정보는 아래 Table 1-2-2 와 같음. 이들중 상염색체에 위치한 SNP들에 대해서만 분석을 하기 위해 위치정보가 없는 7,849개, X염색체에 있는 1,449개, Y염색체에 있는 9개를 제외한 총 52,258개의 유전자형 데이터를 추려내었음.

Table 1-2-2. 분석된 SNP들의 염색체상 위치

염색체번호	SNP 수	비고
1	6,512	
2	3,392	
3	2,805	
4	3,551	
5	2,361	
6	3,216	
7	3,348	
8	2,777	
9	3,213	
10	1,796	
11	1,890	
12	1,562	
13	4,090	
14	3,906	
15	2,906	
16	1,877	
17	1,720	
18	1,336	
X	1,449	분석제외
Y	9	분석제외
위치정보없음	7,849	분석제외

상염색체내 존재하는 52,258개의 SNP에 대해 이상치 제거작업을 실시함. 하디와인버그 평형에 많이 어긋나거나($P < 0.001$), 기계적으로 유전자형이 읽히지 않은 개체가 많거나(Genotype call rate, 99%미만), minor allele의 빈도가 너무 적어(0.05미만) 분석에 용이하지 않을 경우에는 GWAS분석이 의미가 없으므로 미리 제거를 해야 한다고 판단함. 따라서 이상치 제거를 위해 P-LINK 1.07 를 사용하였으며, 그 결과는 아래와 같음(Table 1-2-3).

Table 1-2-3. 분석된 SNP들의 염색체상 위치

기준	최종분석대상
1. 하디와인버그 평형정도 < 0.001	 <p>랜드레이스 38,695개 요크셔 38,665개</p>
2. Genotype call rate < 0.99	
3. Minor allele frequency < 0.05	

이때 Bonferroni method를 감안한 보정을 위해 1단계 임계치는 Genome wide suggestive significant threshold 값을 $1 \div$ 유전체내 SNP수로, 2단계 임계치는 Chromosome wide suggestive significant threshold 값을 $1 \div$ 염색체내 SNP수로 설정하여 해당 수치를 임계치로 설정함. Genome wide significant threshold 값이나($0.05 \div 42,086$) Chromosome wide significant threshold($0.05 \div$ 각 염색체내의 SNP갯수)의 수준보다는 Type I 오류(False Positive)가 일어날 수 있는 확률이 높지만 Type II 오류(False Negative), 즉 실제로 형질과 관련성이 있으나 P -value가 낮기 때문에 검출되지 못하는 SNP들을 찾을 수 있는 장점을 가지고 있음

나. 전장유전체연관성(GWAS)분석 수행을 통한
모든생애총생산성 연관 genomic region 동정 및 SNP 확보

(1) GWAS분석대상 정제작업

협력농장을 통해 지속적으로 모든의 번식자료와 도태상황을 업데이트해왔으며, 3차년 보고서 작성일 기준 농장의 형질수집결과는 아래 Figure 1-2-1과 같음. 모든은 도태가 될 때 생애총생산이 완료되므로, 도태가 된 모든은 ‘생애총생산완료’, 도태가 되지 않고 생존해 있는 모든은 ‘생애총생산 미완’ 으로 구분되었으며, 유전체분석을 실시한 그룹과 아닌 그룹으로 나누어 구분되었음. 총 838두 중에서 생애총생산이 완료된 모든은 830두로, 이들은 생애총생산성 형질의 유전특성분석(유전력, 유전상관 등)에 사용될 수 있음. 유전체정보는 총 480두가 분석되었지만 이중 생애총생산이 완료된 개체는 474두로(랜드레이스 119두, 요크셔 355두), 이들을 대상으로 GWAS분석을 할 예정임.

총 838두의 번식기록중 이상치로 판단되는 개체는 분석에 악영향을 미칠 수 있다고 판단하여 제거하기로 하였고, 제거의 기준은 Yosuke Sasaki 등이 2008년에 보고한 방법을 활용하여 초교배일령이 150일미만, 365일령 초과일 경우, 이유일과 교배일 사이의 간격이 115일 이상인 경우로 설정하였음. 또한 TNB와 NBA가 너무 차이나는 경우는 농장내 기록이상으로 판단하고 제거하기로 결정함.

	생애총생산 완료	생애총생산 미완	계
Chip분석 O	474 (L119/Y355)	6	480 (L121/Y359)
Chip분석 X (분석대상제외)	306 (L116/Y240)	2	356
계	830 (L235/Y595)	8	838

↓ 유전모수추정 (유전력/유전상관분석)
→ GWAS 분석
L: 랜드레이스
Y: 요크셔

Figure 1-2-1. 농장내 모든의 기록 추적관찰결과

모돈은 매 산차 교배, 분만, 이유, 재발정확인후 교배의 사이클을 반복하다가 도태가 되며, 이때 기록되는 날짜정보를 토대로 생성되는 형질은 아래에서 확인할 수 있음. 실선으로 묶인 부분(출생부터 도태일까지)이 모돈의 수명(LL, Length of Life)이라고 한다면 첫 분만일부터 도태일까지를 생산수명(LPL, Length of productive life), 각 산차의 사이에 있는 재귀발정일까지와 마지막산차이후 도태일까지 경과일을 비생산일(LNPD, Lifetime nonproductive days)로 구분지을 수 있으며, 이에따라 LNPD를 LPL로 나눈 비생산일수 비율(LNPDR, LNP ratio), LNPD를 산차로 나눈 평균 비생산일수 (LNDPP, LNPD per parity) 등이 재산출 될 수 있음.



Figure 1-2-2. 농장내 모돈의 일생에 따른 산출형질

모돈은 각 산차별 자돈을 낳게 되는데, 이때 기록된 형질을 도식화하면 아래 Figure 1-2-3 과 같음. 모돈이 출생한 돼지중 이미 죽어있거나(사산) 미라로 태어난 자돈을 포함한 마릿수를 총산자수(TNB)라고 하며, 사산/미라자돈을 제외한 숨을 쉬고 있는 자돈을 생존자돈수(NBA)라고 한다. 이중 생시체중미달이나 기형이어서 사육이 불가능하다고 판단된 개체들을 제외한 건강한 자돈이 포유개시자돈(start)이 되며, 포유기간을 거쳐 이유자돈(NW)으로 기록됨. 각 형질 들은 매 산차 기록이 되며, 생애총생산이 완료된 모돈들에 대해서는 산차별 성적들의 누적 합 (예: LNBA) 또는 평균(예: LNBAmean) 등으로 나타낼 수 있으며, 누적합 산자수를 연으로 환산한 생산수명으로 나는 연간 산자수 환산치로도 표현이 가능함(LNBA365).

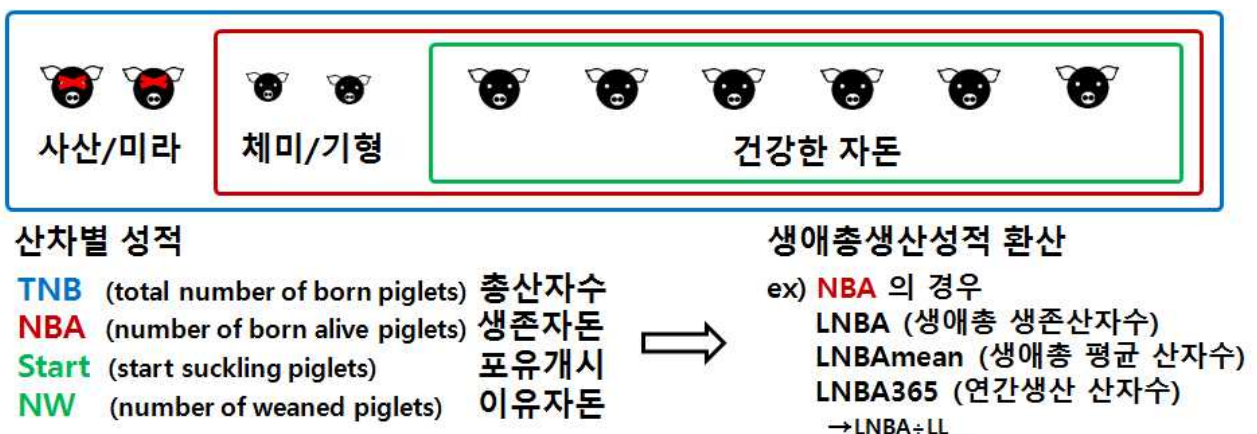


Figure 1-2-3. 농장내 모돈의 일생에 따른 산출형질

(2) GWAS분석

SNP chip분석을 통해 분석된 SNP들에 대한 정제작업을 통해 랜드레이스에서 38,695개, 요크셔에서 38,665개의 SNP가 분석대상으로 선정되었음. 이들에 대해 GCTA64 프로그램으로 genomic relationship matrix를 제작하였고, 이를 통해 GWAS분석을 실시하였음. 통계분석시 사용한 고정효과는 품종, 출생년도-계절효과, 출생지역(한국 또는 프랑스)을 사용하였고, 공변량으로 1산차의 생존산자수(NBA1), 첫분만일령(AFF)을 사용함. 분석에 사용된 형질은 아래 Table 1-2-4와 같음.

Table 1-2-4. GWAS에 사용된 생애총생산성 형질과 산출방식

구분	형질명	산출방식
생애총 성적 총합	FP (Final parity)	생애총 총산자수
	LPL (Length of productive life)	생산수명 (첫분만일~도태일)
	LTNB (Lifetime total number of born piglet)	생애총 총산자수
	LNBA (Lifetime number of born alive piglet)	생애총 생존자돈수
	LPW (Lifetime piglet weaned)	생애총 이유자돈수
생애총 번식효율성	LNDPP (lifetime nonproduction days/FP)	평균 비생산일수
	NTNB365 (LTNB/lifetime in year)	생애총 총산자수/수명
	LNBA365 (LNBA/lifetime in year)	생애총 실산자수/수명
특정성적 우수모돈	HL (High longevity pig)	6산차 이상 생존여부
판별용	HE (High efficiency pig)	LNBA365 상위25% 여부

GWAS분석결과, 생애총생산성 형질에 대해 모든 SNP들에 대해 *P*-value가 분석되었고, 이들을 통해 맨하탄 플랏(Manhattan plot)과 Q-Q plot을 그리고 *P*-value가 작은 Top 10개의 SNP들을 각각 정리하였음. 모든 작업은 R의 'qqman' Package를 활용함.

(가) 요크셔 집단의 GWAS결과

요크셔 집단에서 분석한 도태산차(FP)에 대한 GWAS결과는 아래 Figure 1-2-4와 같음. 모든 SNP의 염색체별 위치와 P-value를 Manhattan plot으로 표시했으며, P-value가 가장 낮은 10개의 SNP에 대해서 동그라미로 표시했음(Figure 1-2-4-a). 또한 P-value들의 Q-Q plot을 Figure 1-2-4-b에 나타냈음.

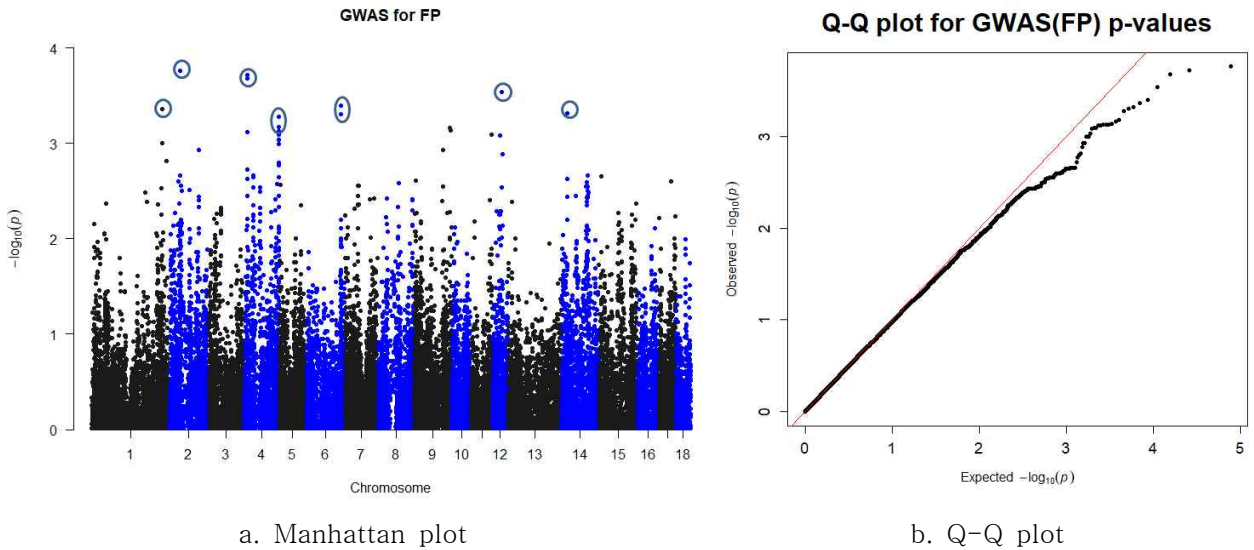


Figure 1-2-4. FP에 대한 GWAS결과

FP에 대한 GWAS결과 Top10 SNP에 대한 정보는 아래 Table 1-2-5와 같음. 4번염색체에 4개의 SNP가 검출되었고, 두 개씩 쌍을 지어 가까이 위치하고 있음 (2위가 3위와 가깝고, 9위가 10위와 가깝음).

Table 1-2-5. FP에 대한 GWAS결과 Top10 SNP

No.	염색체	SNP	위치 (1000bp)	P-value	Significance		
					genome suggestive ¹	Chromosome significant ²	Chromosome suggestive ³
1	2	ALGA0013534	46,430	1.74.E-04	NS ⁴	NS	*
2	4	CASI0009310	13,582	1.91.E-04	NS	NS	*
3	4	ALGA0023289	13,260	2.10.E-04	NS	NS	*
4	12	ALGA0102719	38,254	2.91.E-04	NS	NS	*
5	6	ALGA0037357	141,283	3.99.E-04	NS	NS	*
6	1	ALGA0009695	288,523	4.34.E-04	NS	NS	NS
7	14	ASGA0082121	22,512	4.80.E-04	NS	NS	NS
8	6	ALGA0117399	141,281	4.95.E-04	NS	NS	NS
9	4	ALGA0029695	142,385	5.25.E-04	NS	NS	NS
10	4	MARC0025163	142,318	6.66.E-04	NS	NS	NS

¹1/38,665 = 2.59.E-05; ²0.05/염색체별 SNP갯수; ³1/염색체별 SNP갯수; ⁴non significant

초산일부터 도태일까지를 모든의 생산수명(LPL)이라고 하며, 이에 대한 GWAS결과는 아래 Figure 1-2-10에서 확인할 수 있음. 모든 SNP의 염색체별 위치와 P-value를 Manhattan plot 으로 표시했으며, P-value가 가장 낮은 10개의 SNP에 대해서 동그라미로 표시했음(Figure 1-2-5-a). 또한 P-value들의 Q-Q plot을 Figure 1-2-5-b에 나타냈음.

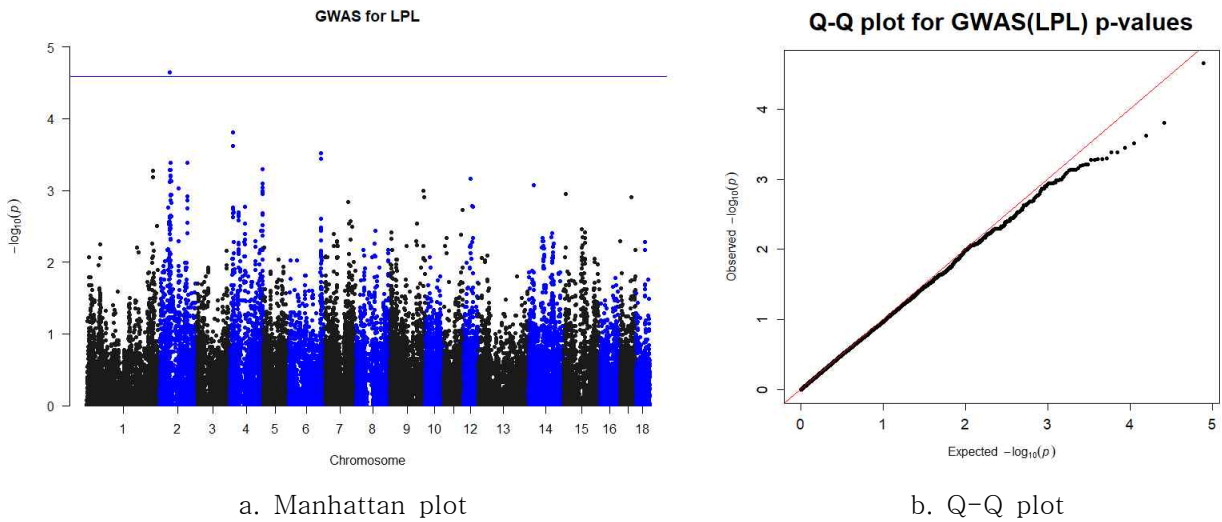


Figure 1-2-5. LPL에 대한 GWAS결과

LPL에 대한 GWAS결과 Top10 SNP에 대한 정보는 아래 Table 1-2-6과 같음. 4번염색체에 서 4개의 SNP가 검출되었으나, 네 SNP들의 거리는 서로 가깝지 않은 것으로 보임

Table 1-2-6. LPL에 대한 GWAS결과 Top10 SNP

No.	염색체	SNP	위치 (1000bp)	P-value	Significance		
					genome suggestive ¹	Chromosome significant ²	Chromosome suggestive ³
1	2	ALGA0013534	46,430	1.74.E-04	* ⁴	NS	*
2	4	CASI0009310	13,582	1.91.E-04	NS	NS	*
3	4	ALGA0023289	13,260	2.10.E-04	NS	NS	*
4	12	ALGA0102719	38,254	2.91.E-04	NS	NS	*
5	6	ALGA0037357	141,283	3.99.E-04	NS	NS	*
6	1	ALGA0009695	288,523	4.34.E-04	NS	NS	NS
7	14	ASGA0082121	22,512	4.80.E-04	NS	NS	NS
8	6	ALGA0117399	141,281	4.95.E-04	NS	NS	NS
9	4	ALGA0029695	142,385	5.25.E-04	NS	NS	NS
10	4	MARC0025163	142,318	6.66.E-04	NS	NS	NS

¹1/38,665 = 2.59.E-05; ²0.05/염색체별 SNP갯수; ³1/염색체별 SNP갯수; ⁴non significant

생애총 총산자수(LTNB)에 대한 GWAS결과는 아래 Figure 1-2-6와 같음. 모든 SNP의 염색체별 위치와 P-value를 Manhattan plot으로 표시했으며, P-value가 가장 낮은 10개의 SNP에 대해서 동그라미로 표시했음(Figure 1-2-6-a). 또한 P-value들의 Q-Q plot을 Figure 1-2-6-b에 나타냈음.

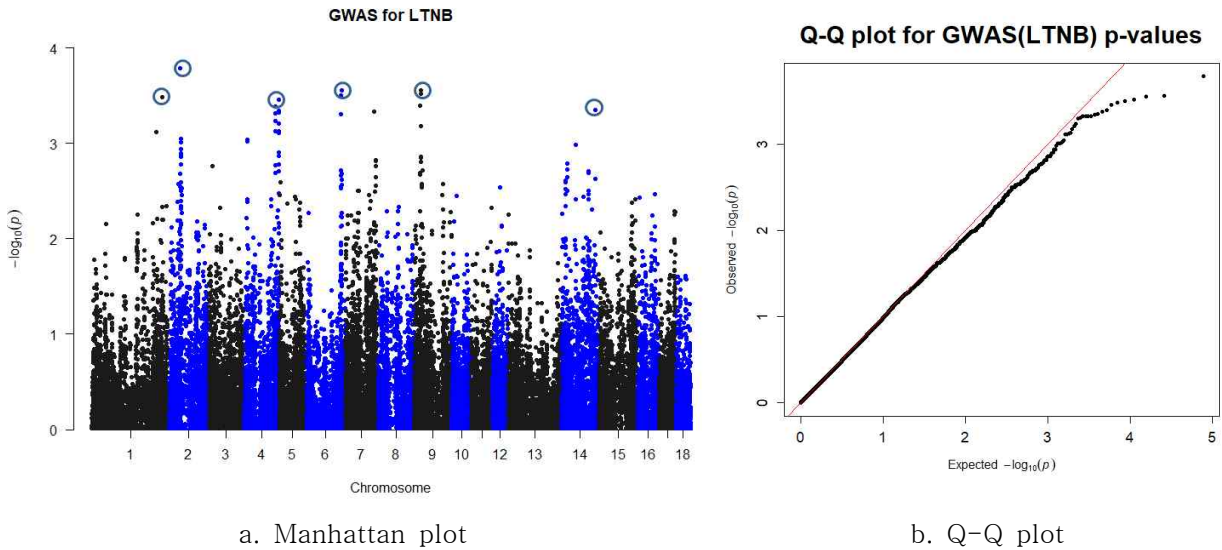


Figure 1-2-6. LTNB에 대한 GWAS결과

LTNB에 대한 GWAS결과 Top10 SNP에 대한 정보는 아래 Table 1-2-7과 같음. 2번염색체의 ALGA0013534가 가장 유의미한 것으로 보이며, 이는 앞선 FP와 LPL에 대한 GWAS결과 1위SNP임.

Table 1-2-7. LTNB에 대한 GWAS결과 Top10 SNP

No.	염색체	SNP	위치 (1000bp)	P-value	Significance		
					genome suggestive ¹	Chromosome significant ²	Chromosome suggestive ³
1	2	ALGA0013534	46,430	1.63.E-04	NS ⁴	NS	*
2	9	ALGA0116248	27,986	2.76.E-04	NS	NS	*
3	6	ASGA0095712	143,815	2.79.E-04	NS	NS	*
4	9	MARC0021762	28,170	3.02.E-04	NS	NS	*
5	6	ALGA0037357	141,283	3.18.E-04	NS	NS	*
6	1	ALGA0009695	288,523	3.29.E-04	NS	NS	NS
7	4	ALGA0029695	142,385	3.47.E-04	NS	NS	*
8	9	MARC0002499	24,626	4.02.E-04	NS	NS	*
9	4	H3GA0014363	128,678	4.14.E-04	NS	NS	NS
10	14	H3GA0042629	139,851	4.43.E-04	NS	NS	NS

¹1/38,665 = 2.59.E-05; ²0.05/염색체별 SNP갯수; ³1/염색체별 SNP갯수; ⁴non significant

생애총 실산자수(LNBA)에 대한 GWAS결과는 아래 Figure 1-2-7에서 확인할 수 있음. 모든 SNP의 염색체별 위치와 P-value를 Manhattan plot으로 표시했으며, P-value가 가장 낮은 10개의 SNP에 대해서 동그라미로 표시했음(Figure 1-2-7-a). 또한 P-value들의 Q-Q plot을 Figure 1-2-7-b에 나타냈음.

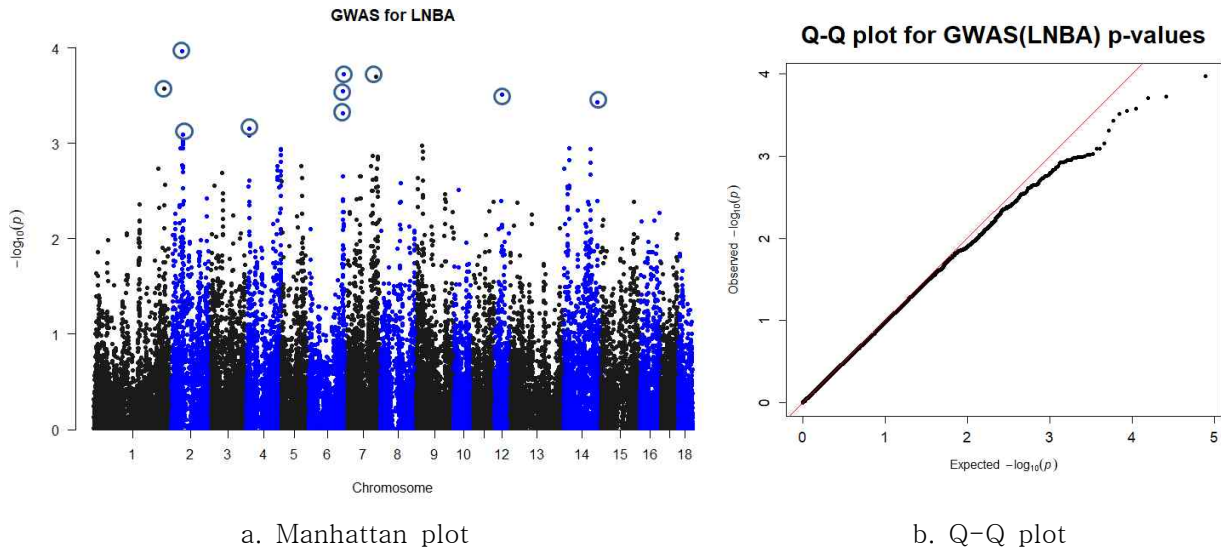


Figure 1-2-7. LNBA에 대한 GWAS결과

LNBA에 대한 GWAS결과 Top10 SNP에 대한 정보는 아래 Table 1-2-8과 같음. 가장 큰 차이를 보이는 SNP인 ALGA0013534는 2번염색체에 위치해 있으며, 1.08×10^{-4} 의 P-value를 보였음. 또한 6번염색체에서 10위권내 3개의 SNP가 발견되었음.

Table 1-2-8. LNBA에 대한 GWAS결과 Top10 SNP

No.	염색체	SNP	위치 (1000bp)	P-value	Significance		
					genome suggestive ¹	Chromosome significant ²	Chromosome suggestive ³
1	2	ALGA0013534	46,430	1.08.E-04	NS ⁴	NS	*
2	6	ASGA0095712	143,815	1.88.E-04	NS	NS	*
3	7	M1GA0010742	118,060	1.98.E-04	NS	NS	*
4	1	ALGA0009695	288,523	2.69.E-04	NS	NS	NS
5	6	ALGA0037357	141,283	2.82.E-04	NS	NS	*
6	12	ASGA0053947	30,711	3.08.E-04	NS	NS	*
7	14	H3GA0042629	139,851	3.70.E-04	NS	NS	NS
8	6	ALGA0117399	141,281	4.88.E-04	NS	NS	NS
9	4	CASI0009310	13,582	7.03.E-04	NS	NS	NS
10	2	ASGA0097814	50,036	8.14.E-04	NS	NS	NS

¹1/38,665 = 2.59.E-05; ²0.05/염색체별 SNP갯수; ³1/염색체별 SNP갯수; ⁴non significant

생애총 이유자돈수(LPW)에 대한 GWAS결과는 아래 Figure 1-2-8에서 확인할 수 있음. 모든 SNP의 염색체별 위치와 P-value를 Manhattan plot으로 표시했으며, P-value가 가장 낮은 10개의 SNP에 대해서 동그라미로 표시했음(Figure 1-2-8-a). 또한 P-value들의 Q-Q plot을 Figure 1-2-8-b에 나타냈음.

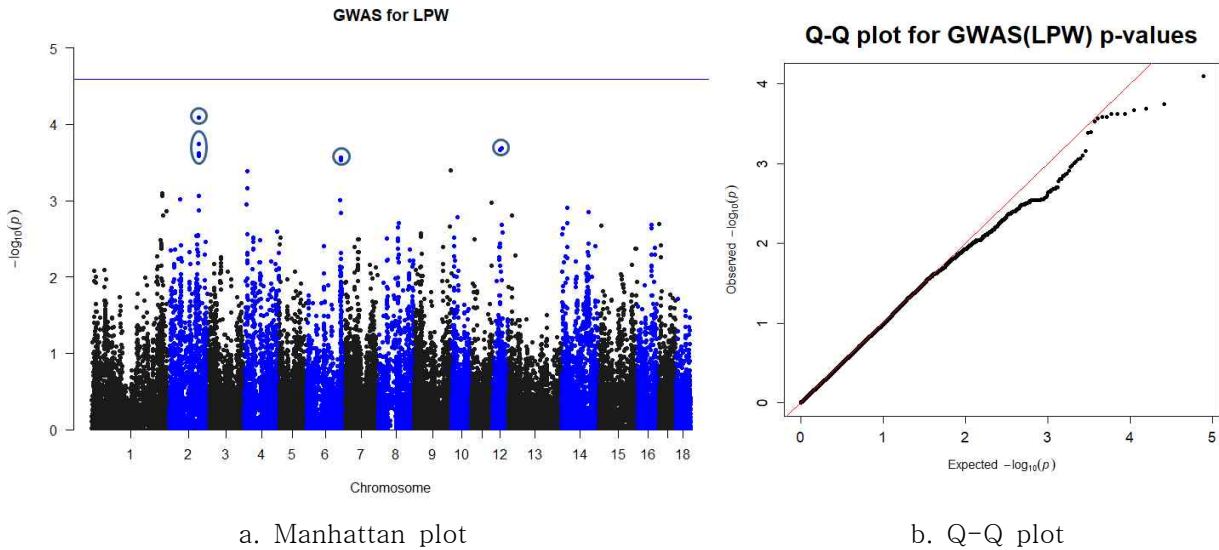


Figure 1-2-8. LPW에 대한 GWAS결과

LPW에 대한 GWAS결과 Top10 SNP에 대한 정보는 아래 Table 1-2-9와 같음. 가장 큰 차이를 보이는 SNP인 ALGA0013534는 2번염색체에 위치해 있으며, 8.08×10^{-5} 의 P-value를 보였음. 또한 그와 가까운 영역에 10위권 SNP가 총 7개 발견되었음.

Table 1-2-9. LPW에 대한 GWAS결과 Top10 SNP

No.	염색체	SNP	위치 (1000bp)	P-value	Significance		
					genome suggestive ¹	Chromosome significant ²	Chromosome suggestive ³
1	2	ALGA0015371	122,843	8.08.E-05	NS ⁴	NS	*
2	2	ASGA0011464	122,491	1.80.E-04	NS	NS	*
3	12	ALGA0102719	38,254	2.04.E-04	NS	NS	*
4	12	ASGA0053947	30,711	2.15.E-04	NS	NS	*
5	2	DIAS0001363	122,627	2.38.E-04	NS	NS	*
6	2	ALGA0015367	122,796	2.38.E-04	NS	NS	*
7	2	ALGA0015393	123,047	2.38.E-04	NS	NS	*
8	2	MARC0017171	123,240	2.61.E-04	NS	NS	*
9	2	ALGA0015416	123,383	2.61.E-04	NS	NS	*
10	6	ALGA0037357	141,283	2.72.E-04	NS	NS	*

¹1/38,665 = 2.59.E-05; ²0.05/염색체별 SNP갯수; ³1/염색체별 SNP갯수; ⁴non significant

LTNB365는 생애총 총산자수를 수명으로 나는 생애총생산효율을 확인할 수 있는 연간환산 총산자수형질임. 이에 대한 GWAS결과는 아래 Figure 1-2-9에서 확인할 수 있음. 모든 SNP의 염색체별 위치와 P -value를 Manhattan plot으로 표시했으며, P -value가 가장 낮은 10개의 SNP에 대해서 동그라미로 표시했음(Figure 1-2-9-a). 또한 P -value들의 Q-Q plot을 Figure 1-2-9-b에 나타냈음.

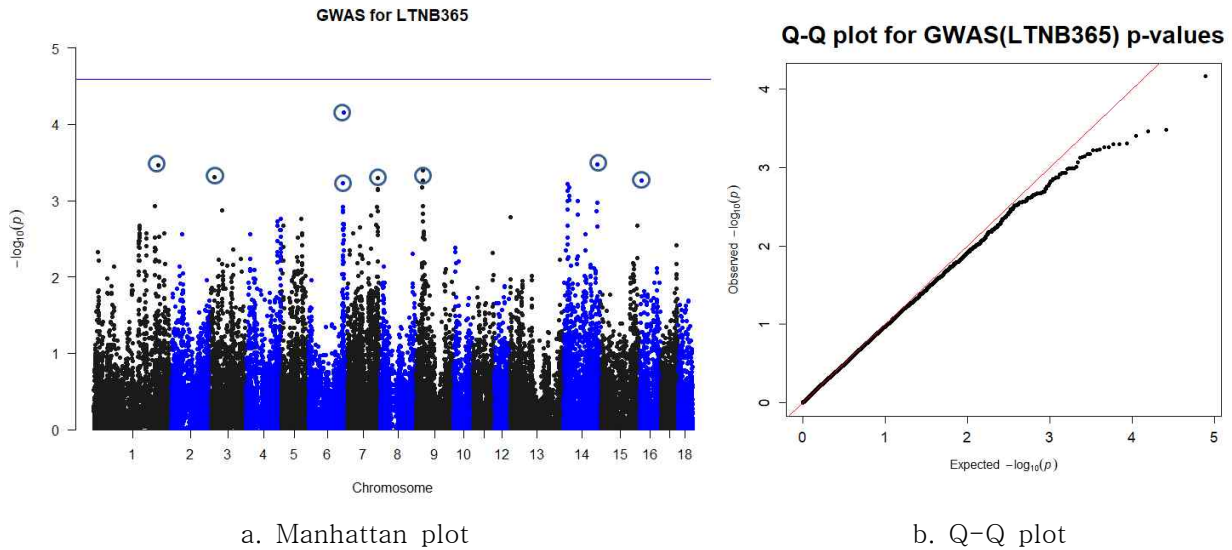


Figure 1-2-9. LTNB365에 대한 GWAS결과

LTNB365에 대한 GWAS결과 Top10 SNP에 대한 정보는 아래 Table 1-2-10과 같음. 가장 큰 차이를 보이는 SNP인 ASGA0095712는 6번염색체에 위치해 있으며, P -value는 6.93×10^{-5} 임.

Table 1-2-10. LTNB365에 대한 GWAS결과 Top10 SNP

No.	염색체	SNP	위치 (1000bp)	P -value	Significance		
					genome suggestive ¹	Chromosome significant ²	Chromosome suggestive ³
1	6	ASGA0095712	143,815	6.93.E-05	NS ⁴	NS	*
2	14	H3GA0042629	139,851	3.34.E-04	NS	NS	NS
3	1	H3GA0003922	264,608	3.44.E-04	NS	NS	NS
4	9	ALGA0116248	27,986	3.97.E-04	NS	NS	*
5	3	MARC0056315	13,800	4.97.E-04	NS	NS	NS
6	7	ASGA0036863	126,449	4.99.E-04	NS	NS	NS
7	7	ALGA0045353	124,596	5.07.E-04	NS	NS	NS
8	16	ASGA0072134	6,689	5.46.E-04	NS	NS	*
9	9	MARC0021762	28,170	5.52.E-04	NS	NS	NS
10	6	ASGA0029890	142,393	5.84.E-04	NS	NS	NS

¹1/38,665 = 2.59.E-05; ²0.05/염색체별 SNP갯수; ³1/염색체별 SNP갯수; ⁴non significant

LNBA365는 생애총생산효율을 확인할 수 있는 연간환산 총산자수형질로, LTNB365와는 다르게 LNBA에 대한 수치를 수명으로 나눈 수치임. 이에 대한 GWAS결과는 아래 Figure 1-2-10에서 확인할 수 있음. 모든 SNP의 염색체별 위치와 P-value를 Manhattan plot으로 표시했으며, P-value가 가장 낮은 10개의 SNP에 대해서 동그라미로 표시했음(Figure 1-2-10-a). 또한 P-value들의 Q-Q plot을 Figure 1-2-10-b에 나타냈음.

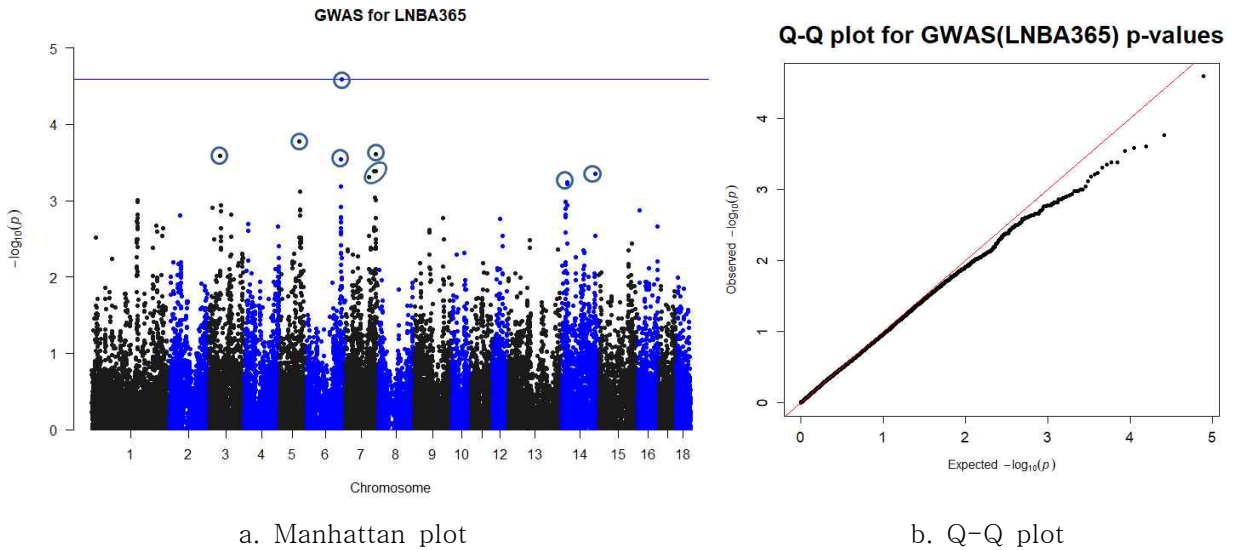


Figure 1-2-10. LTNB365에 대한 GWAS결과

LNBA365에 대한 GWAS결과 Top10 SNP에 대한 정보는 아래 Table 1-2-11과 같음. 가장 큰 차이를 보이는 SNP인 ASGA0095712 는 6번염색체에 위치해 있으며, P-value는 2.54×10^{-5} 임. 이 SNP는 genome-wide suggestive 수준에서 유의미한 변이임.

Table 1-2-11. LNBA365에 대한 GWAS결과 Top10 SNP

No.	염색체	SNP	위치 (1000bp)	P-value	Significance		
					genome suggestive ¹	Chromosome significant ²	Chromosome suggestive ³
1	6	ASGA0095712	143,815	2.54.E-05	*	NS	*
2	5	ASGA0100948	81,268	1.69.E-04	NS	NS	*
3	7	MARC0098637	126,028	2.44.E-04	NS	NS	*
4	3	DIAS0001014	48,378	2.60.E-04	NS	NS	*
5	6	ASGA0029890	142,393	2.86.E-04	NS	NS	*
6	7	ASGA0036863	126,449	4.12.E-04	NS	NS	NS
7	7	M1GA0010742	118,060	4.12.E-04	NS	NS	NS
8	14	H3GA0042629	139,851	4.45.E-04	NS	NS	NS
9	7	H3GA0022505	98,747	4.92.E-04	NS	NS	NS
10	14	M1GA0018418	24,232	5.76.E-04	NS	NS	NS

¹1/38,665 = 2.59.E-05; ²0.05/염색체별 SNP갯수; ³1/염색체별 SNP갯수; ⁴non significant

평균 비생산일수(LNDPP)에 대한 GWAS결과는 아래 Figure 1-2-11에서 확인할 수 있음. 모든 SNP의 염색체별 위치와 P -value를 Manhattan plot으로 표시했으며, P -value가 가장 낮은 10개의 SNP에 대해서 동그라미로 표시했음(Figure 1-2-11-a). 또한 P -value들의 Q-Q plot을 Figure 1-2-11-b에 나타냈음.

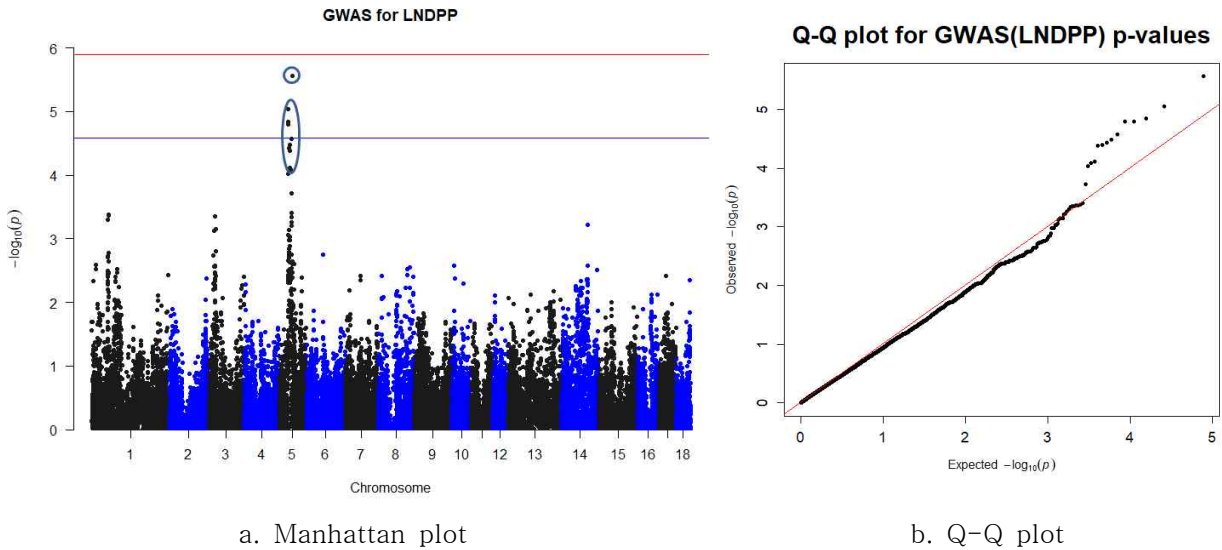


Figure 1-2-11. LNDPP에 대한 GWAS결과

LNDPP에 대한 GWAS결과 Top10 SNP에 대한 정보는 아래 Table 1-2-12와 같음. 가장 큰 차이를 보이는 SNP인 ALGA0031924는 5번염색체에 위치해 있으며, P -value는 2.76×10^{-6} 임. 흥미롭게도 상위10위 SNP가 모두 5번염색체의 37Mbp에서 52Mbp사이에 밀집해 있으며, 높은 유의수준을 보임

Table 1-2-12. LNDPP에 대한 GWAS결과 Top10 SNP

No.	염색체	SNP	위치 (1000bp)	P -value	Significance		
					genome suggestive ¹	Chromosome significant ²	Chromosome suggestive ³
1	5	ALGA0031924	52,580	2.76E-06	*	*	*
2	5	ALGA0031707	37,250	9.01E-06	*	*	*
3	5	ASGA0025400	36,750	1.45E-05	*	*	*
4	5	DIAS0000197	36,470	1.61E-05	*	*	*
5	5	ALGA0031690	36,545	1.61E-05	*	*	*
6	5	BGIS0004668	50,402	2.71E-05	NS	*	*
7	5	ASGA0025489	44,950	3.29E-05	NS	NS	*
8	5	ALGA0031750	40,357	3.75E-05	NS	NS	*
9	5	ASGA0025488	44,802	4.08E-05	NS	NS	*
10	5	DRGA0005757	44,791	4.15E-05	NS	NS	*

¹1/38,665 = 2.59.E-05; ²0.05/염색체별 SNP갯수; ³1/염색체별 SNP갯수; ⁴non significant

6산차이상 생존한 모돈은 장수성개체라 판단하고 장수성여부에 대해 case-control study를 실시한 GWAS결과는 아래 Figure 1-2-12에서 확인할 수 있음. 모든 SNP의 염색체별 위치와 P-value를 Manhattan plot으로 표시했으며, P-value가 가장 낮은 10개의 SNP에 대해서 동그라미로 표시했음(Figure 1-2-12-a). 또한 P-value들의 Q-Q plot을 Figure 1-2-12-b에 나타냈음.

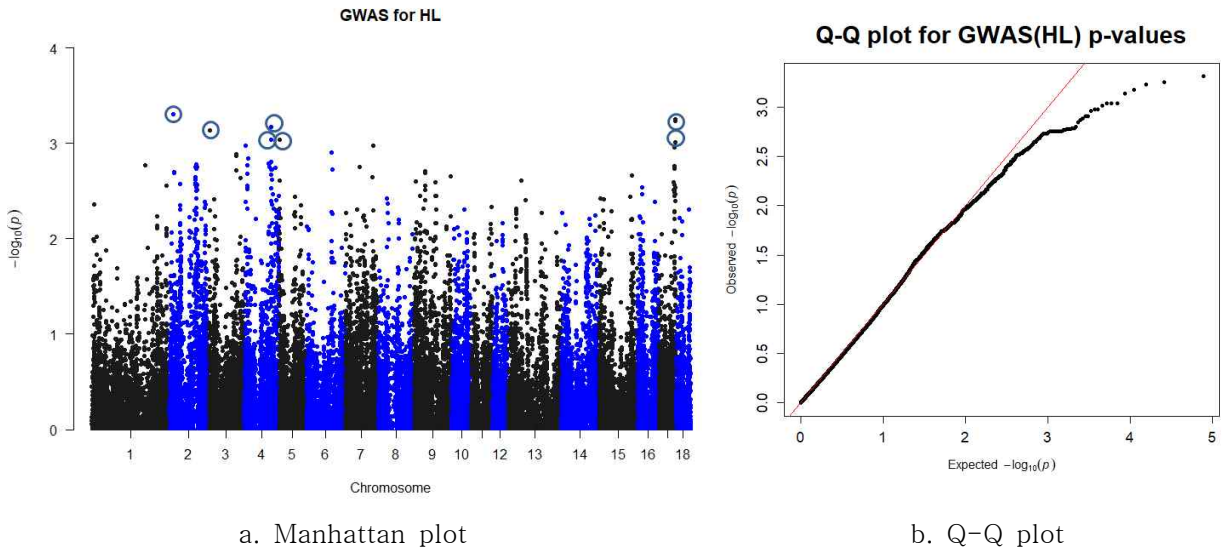


Figure 1-2-12. HL에 대한 GWAS결과

LNBA에 대한 GWAS결과 Top10 SNP에 대한 정보는 아래 Table 1-2-13과 같음. 가장 큰 차이를 보이는 SNP인 ASGA0009352 는 2번염색체에 위치해 있으며, Chromosome-wide suggestive 수준에서 유의미한 SNP는 17번염색체내 존재하는 MARC0002156와 ASGA0078354 두 개임을 확인함.

Table 1-2-13. HL에 대한 GWAS결과 Top10 SNP

No.	염색체	SNP	위치 (1000bp)	P-value	Significance		
					genome suggestive ¹	Chromosome significant ²	Chromosome suggestive ³
1	2	ASGA0009352	18,115	4.90.E-04	NS	NS	NS
2	17	MARC0002156	66,789	5.63.E-04	NS	NS	*
3	17	ASGA0078354	66,811	5.88.E-04	NS	NS	*
4	4	ALGA0027427	111,661	6.73.E-04	NS	NS	NS
5	3	ALGA0110704	5,299	7.30.E-04	NS	NS	NS
6	4	MARC0082004	111,994	9.10.E-04	NS	NS	NS
7	4	INRA0016084	112,041	9.10.E-04	NS	NS	NS
8	5	M1GA0007118	1,156	9.13.E-04	NS	NS	NS
9	17	M1GA0022624	65,865	9.65.E-04	NS	NS	NS
10	4	ALGA0022764	7,721	1.05.E-03	NS	NS	NS

¹1/38,665 = 2.59.E-05; ²0.05/염색체별 SNP갯수; ³1/염색체별 SNP갯수; ⁴non significant

LNBA365가 우수한 경우 생애총생산성의 효율성이 높은 개체라 판단하고, LNBA365 성적의 상위 25% 여부에 대한 case-control study를 실시한 GWAS결과는 아래 Figure 1-2-13에서 확인할 수 있음. 모든 SNP의 염색체별 위치와 P-value를 Manhattan plot으로 표시했으며, P-value가 가장 낮은 10개의 SNP에 대해서 동그라미로 표시했음(Figure 1-2-13-a). 또한 P-value들의 Q-Q plot을 Figure 1-2-13-b에 나타냈음.

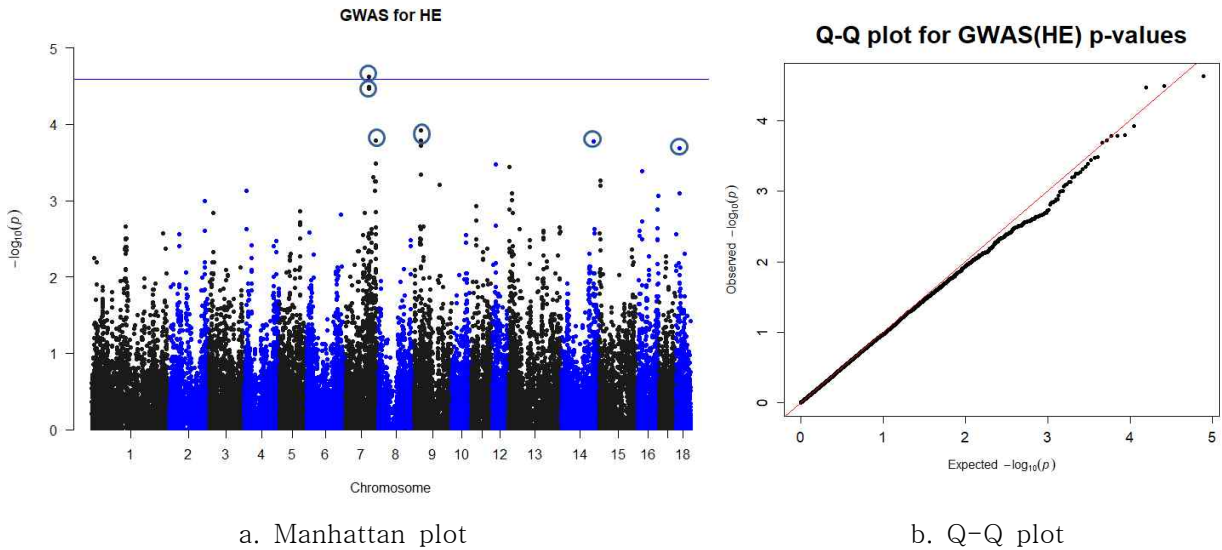


Figure 1-2-13. HE에 대한 GWAS결과

LNBA에 대한 GWAS결과 Top10 SNP에 대한 정보는 아래 Table 1-2-14와 같음. 가장 큰 차이를 보이는 SNP인 INRA0027470는 7번염색체에 위치해 있으며, 2.38×10^{-4} 의 P-value를 보였음. 또한 7번염색체에서 10위권내 5개의 SNP가 발견되었음.

Table 1-2-14. HE에 대한 GWAS결과 Top10 SNP

No.	염색체	SNP	위치 (1000bp)	P-value	Significance		
					genome suggestive ¹	Chromosome significant ²	Chromosome suggestive ³
1	7	INRA0027470	98,814	2.38.E-05	*	NS	*
2	7	ASGA0035316	98,779	3.22.E-05	NS	NS	*
3	7	H3GA0022505	98,747	3.39.E-05	NS	NS	*
4	9	ALGA0051937	26,514	1.20.E-04	NS	NS	*
5	7	ASGA0036667	124,092	1.62.E-04	NS	NS	*
6	9	ASGA0042095	26,138	1.63.E-04	NS	NS	*
7	14	H3GA0042296	132,715	1.67.E-04	NS	NS	*
8	9	ALGA0051950	26,701	1.91.E-04	NS	NS	*
9	18	ASGA0078925	13,886	2.04.E-04	NS	NS	*
10	7	MARC0073407	124,147	3.28.E-04	NS	NS	*

¹1/38,665 = 2.59.E-05; ²0.05/염색체별 SNP갯수; ³1/염색체별 SNP갯수; ⁴non significant

(가) 랜드레이스 집단의 GWAS결과

랜드레이스 집단에서 분석한 도태산차(FP)에 대한 GWAS결과는 아래 Figure 1-2-14와 같음. 모든 SNP의 염색체별 위치와 P-value를 Manhattan plot으로 표시했으며, P-value가 가장 낮은 10개의 SNP에 대해서 동그라미로 표시했음(Figure 1-2-14-a). 또한 P-value들의 Q-Q plot을 Figure 1-2-14-b에 나타냈음.

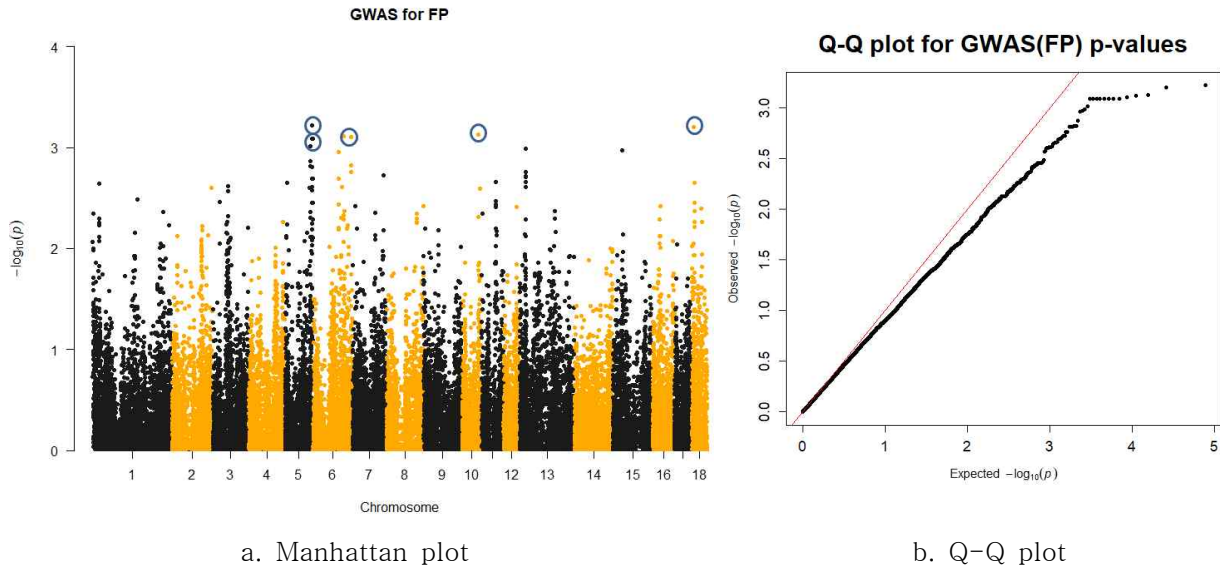


Figure 1-2-14. FP에 대한 GWAS결과

LTNB에 대한 GWAS결과 Top10 SNP에 대한 정보는 아래 Table 1-2-15과 같음. 상위 10위 SNP중 6개가 5번염색체 주변에 포진하고 있음을 확인할수 있음. 가장 유의성이 높은 SNP는 ASGA0027301로, P-value는 6.05×10^{-4} 임

Table 1-2-15. FP에 대한 GWAS결과 Top10 SNP

No.	염색체	SNP	위치 (1000bp)	P-value	Significance		
					genome suggestive ¹	Chromosome significant ²	Chromosome suggestive ³
1	5	ASGA0027301	108,647	6.05.E-04	NS	NS	NS
2	18	ASGA0078796	9,010	6.28.E-04	NS	NS	*
3	10	H3GA0030549	64,941	7.46.E-04	NS	NS	NS
4	6	MARC0019549	123,438	7.69.E-04	NS	NS	NS
5	6	ASGA0098375	152,400	7.92.E-04	NS	NS	NS
6	5	ALGA0034268	108,541	8.15.E-04	NS	NS	NS
7	5	CASI0010199	108,577	8.15.E-04	NS	NS	NS
8	5	ASGA0027314	108,768	8.15.E-04	NS	NS	NS
9	5	ASGA0027327	108,813	8.15.E-04	NS	NS	NS
10	5	ASGA0027245	108,924	8.15.E-04	NS	NS	NS

¹1/38,665 = 2.59.E-05; ²0.05/염색체별 SNP갯수; ³1/염색체별 SNP갯수; ⁴non significant

LPL 대한 GWAS결과는 아래 Figure 1-2-15에서 확인할 수 있음. 모든 SNP의 염색체별 위치와 P -value를 Manhattan plot으로 표시했으며, P -value가 가장 낮은 10개의 SNP에 대해서 동그라미로 표시했음(Figure 1-2-15-a). 또한 P -value들의 Q-Q plot을 Figure 1-2-15-b에 나타냈음.

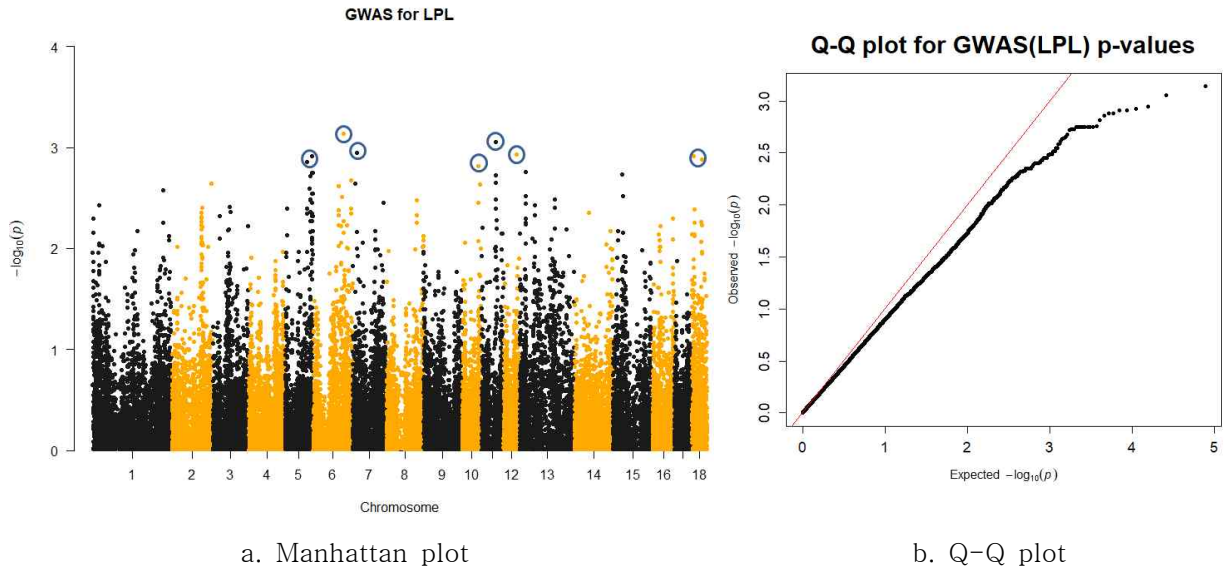


Figure 1-2-15. LPL에 대한 GWAS결과

LPL에 대한 GWAS결과 Top10 SNP에 대한 정보는 아래 Table 1-2-16과 같음. 통계적으로 유의미한 SNP는 없었으며, 가장 높은 유의성을 가진 SNP는 MARC0019549임 (P -value 7.27.E-04)

Table 1-2-16. LPL에 대한 GWAS결과 Top10 SNP

No.	염색체	SNP	위치 (1000bp)	P -value	Significance		
					genome suggestive ¹	Chromosome significant ²	Chromosome suggestive ³
1	6	MARC0019549	123,438	7.27.E-04	NS	NS	NS
2	11	MARC0048926	54,768	8.83.E-04	NS	NS	NS
3	7	ALGA0038878	16,185	1.14.E-03	NS	NS	NS
4	12	ALGA0066768	50,686	1.18.E-03	NS	NS	NS
5	5	ASGA0027301	108,647	1.22.E-03	NS	NS	NS
6	18	ASGA0078796	9,010	1.23.E-03	NS	NS	NS
7	18	ALGA0097969	40,211	1.32.E-03	NS	NS	NS
8	18	DIAS0003438	40,230	1.32.E-03	NS	NS	NS
9	5	DIAS0000383	86,823	1.39.E-03	NS	NS	NS
10	10	H3GA0030549	64,941	1.52.E-03	NS	NS	NS

¹1/38,665 = 2.59.E-05; ²0.05/염색체별 SNP갯수; ³1/염색체별 SNP갯수; ⁴non significant

생애총 총산자수(LTNB)에 대한 GWAS결과는 아래 Figure 1-2-16와 같음. 모든 SNP의 염색체별 위치와 P-value를 Manhattan plot으로 표시했으며, P-value가 가장 낮은 10개의 SNP에 대해서 동그라미로 표시했음(Figure 1-2-16-a). 또한 P-value들의 Q-Q plot을 Figure 1-2-16-b에 나타냈음.

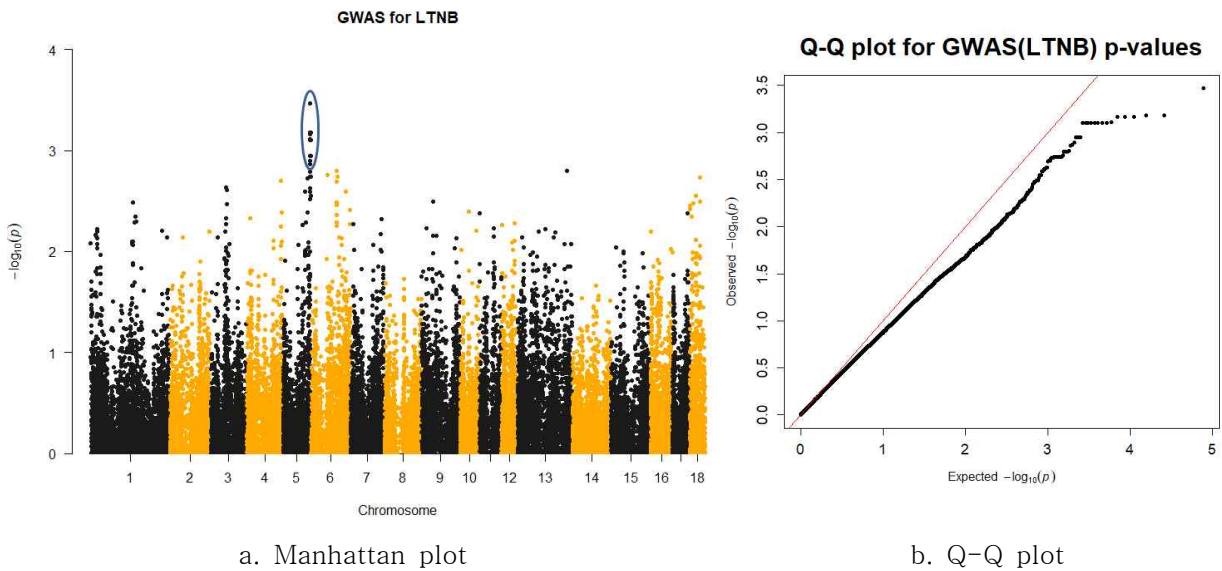


Figure 1-2-16. LTNB에 대한 GWAS결과

LTNB에 대한 GWAS결과 Top10 SNP에 대한 정보는 아래 Table 1-2-17과 같음. 통계적으로 유의미한 SNP는 Chromosome-wide suggestive 수준에서 하나뿐이었지만, 상위10위권 SNP들이 모두 5번염색체의 가까운 영역내에 밀집하고있는 것을 확인할 수 있음

Table 1-2-17. LTNB에 대한 GWAS결과 Top10 SNP

No.	염색체	SNP	위치 (1000bp)	P-value	Significance		
					genome suggestive ¹	Chromosome significant ²	Chromosome suggestive ³
1	5	ASGA0027301	108,647	3.41.E-04	NS	NS	*
2	5	ALGA0034215	109,015	6.59.E-04	NS	NS	NS
3	5	H3GA0017328	109,376	6.59.E-04	NS	NS	NS
4	5	ALGA0034250	107,778	6.86.E-04	NS	NS	NS
5	5	DRGA0006462	107,803	6.86.E-04	NS	NS	NS
6	5	CASI0009612	107,831	6.86.E-04	NS	NS	NS
7	5	ALGA0034244	107,724	7.69.E-04	NS	NS	NS
8	5	ALGA0034268	108,541	7.90.E-04	NS	NS	NS
9	5	CASI0010199	108,577	7.90.E-04	NS	NS	NS
10	5	ASGA0027314	108,768	7.90.E-04	NS	NS	NS

¹1/38,665 = 2.59.E-05; ²0.05/염색체별 SNP갯수; ³1/염색체별 SNP갯수; ⁴non significant

생애총 실산자수(LNBA)에 대한 GWAS결과는 아래 Figure 1-2-17에서 확인할 수 있음. 모든 SNP의 염색체별 위치와 P-value를 Manhattan plot으로 표시했으며, P-value가 가장 낮은 10개의 SNP에 대해서 동그라미로 표시했음(Figure 1-2-17-a). 또한 P-value들의 Q-Q plot을 Figure 1-2-17-b에 나타냈음.

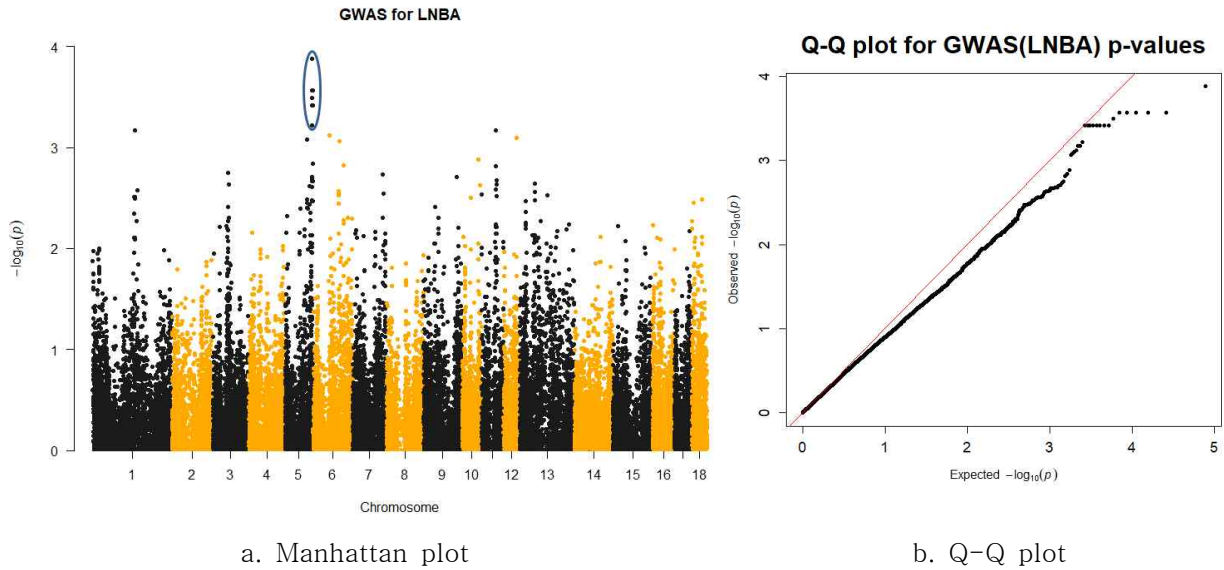


Figure 1-2-17. LTNB에 대한 GWAS결과

LNBA에 대한 GWAS결과 Top10 SNP에 대한 정보는 아래 Table 1-2-18과 같음. 상위10위권 SNP들이 모두 5번염색체의 가까운 영역내에 밀집하고있는 것을 확인할 수 있으며, LTNB 분석결과와 비슷한 결과를 보임.

Table 1-2-18. LNBA에 대한 GWAS결과 Top10 SNP

No.	염색체	SNP	위치 (1000bp)	P-value	Significance		
					genome suggestive ¹	Chromosome significant ²	Chromosome suggestive ³
1	5	ASGA0027301	108,647	1.33.E-04	NS	NS	*
2	5	ALGA0034250	107,778	2.71.E-04	NS	NS	*
3	5	DRGA0006462	107,803	2.71.E-04	NS	NS	*
4	5	CASI0009612	107,831	2.71.E-04	NS	NS	*
5	5	ALGA0034215	109,015	2.71.E-04	NS	NS	*
6	5	H3GA0017328	109,376	2.71.E-04	NS	NS	*
7	5	ALGA0034244	107,724	3.21.E-04	NS	NS	*
8	5	ALGA0034268	108,541	3.85.E-04	NS	NS	*
9	5	CASI0010199	108,577	3.85.E-04	NS	NS	*
10	5	ASGA0027314	108,768	3.85.E-04	NS	NS	*

¹1/38,665 = 2.59.E-05; ²0.05/염색체별 SNP갯수; ³1/염색체별 SNP갯수; ⁴non significant

생애총 실산자수(LNBA)에 대한 GWAS결과는 아래 Figure 1-2-18에서 확인할 수 있음. 모든 SNP의 염색체별 위치와 P-value를 Manhattan plot으로 표시했으며, P-value가 가장 낮은 10개의 SNP에 대해서 동그라미로 표시했음(Figure 1-2-18-a). 또한 P-value들의 Q-Q plot을 Figure 1-2-18-b에 나타냈음.

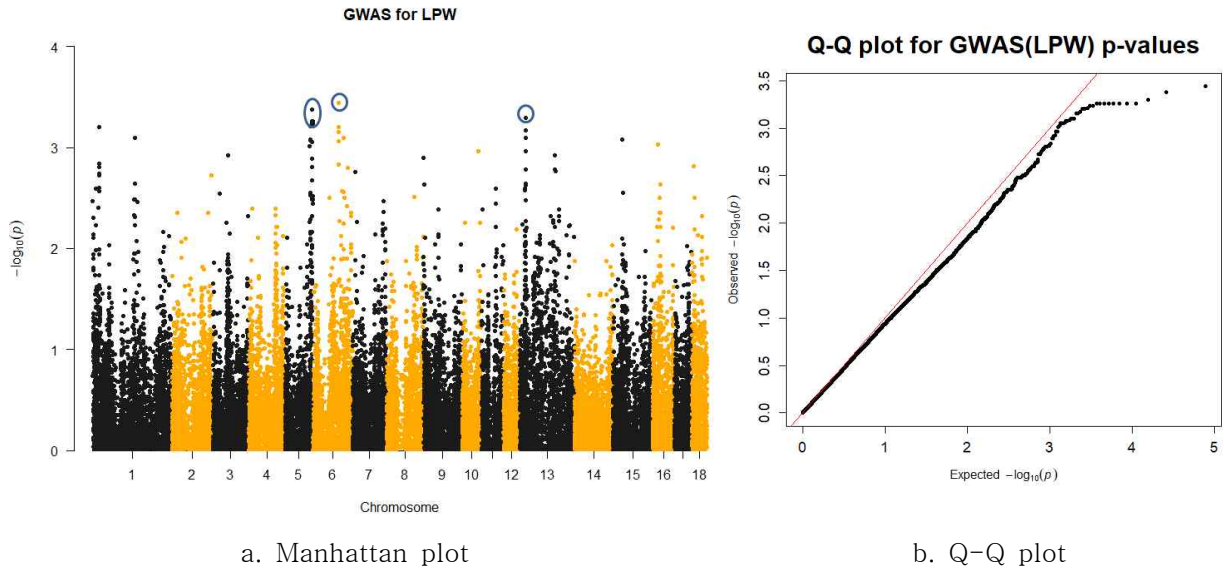


Figure 1-2-18. LPW에 대한 GWAS결과

LPW에 대한 GWAS결과 Top10 SNP에 대한 정보는 아래 Table 1-2-19와 같음. 가장 큰 차이를 보이는 SNP인 ALGA0013534 는 6번염색체에 위치해 있으며, 3.65×10^{-4} 의 P-value를 보였음. 또한 상위 10위권 SNP가 5번염색체내 가까운 영역내에서 총 7개 발견되었음.

Table 1-2-19. LPW에 대한 GWAS결과 Top10 SNP

No.	염색체	SNP	위치 (1000bp)	P-value	Significance		
					genome suggestive ¹	Chromosome significant ²	Chromosome suggestive ³
1	6	MARC0104837	100,713	3.65.E-04	NS	NS	*
2	5	ASGA0027301	108,647	4.22.E-04	NS	NS	*
3	13	ALGA0123888	24,391	5.07.E-04	NS	NS	NS
4	5	ALGA0034268	108,541	5.49.E-04	NS	NS	*
5	5	CASI0010199	108,577	5.49.E-04	NS	NS	*
6	5	ASGA0027314	108,768	5.49.E-04	NS	NS	*
7	5	ASGA0027327	108,813	5.49.E-04	NS	NS	*
8	5	ASGA0027245	108,924	5.49.E-04	NS	NS	*
9	5	ASGA0027256	109,205	5.49.E-04	NS	NS	*
10	5	M1GA0008200	109,267	5.49.E-04	NS	NS	*

¹1/38,665 = 2.59.E-05; ²0.05/염색체별 SNP갯수; ³1/염색체별 SNP갯수; ⁴non significant

LTNB365 에 대한 GWAS결과는 아래 Figure 1-2-19에서 확인할 수 있음. 모든 SNP의 염색체별 위치와 P -value를 Manhattan plot으로 표시했으며, P -value가 가장 낮은 10개의 SNP에 대해서 동그라미로 표시했음(Figure 1-2-19-a). 또한 P -value들의 Q-Q plot을 Figure 1-2-19-b에 나타냈음.

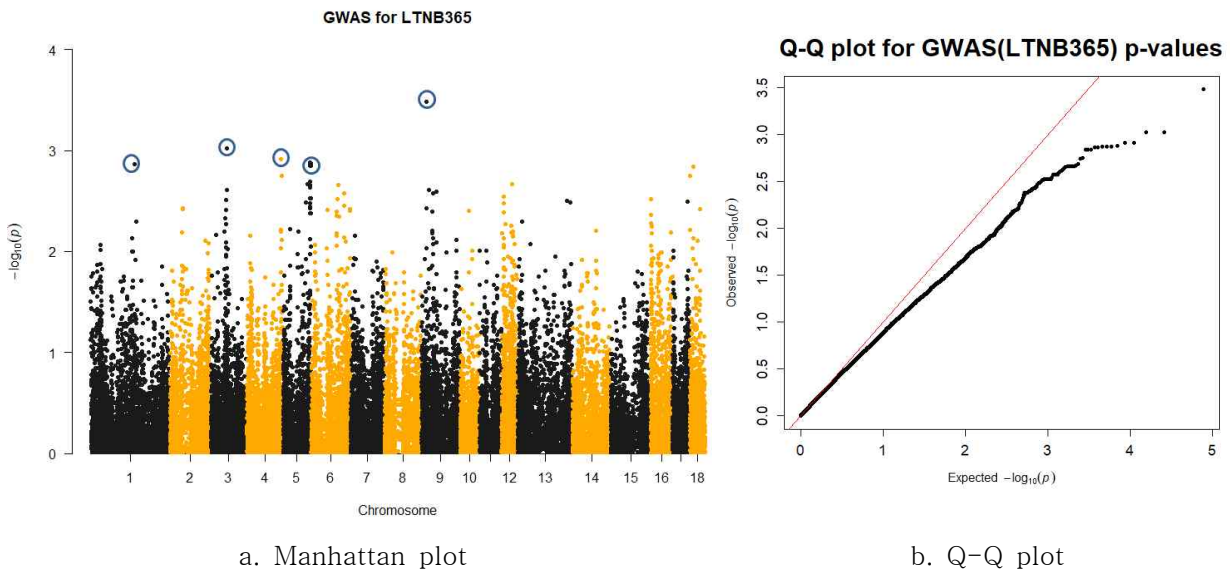


Figure 1-2-19. LTNB365에 대한 GWAS결과

LTNB365에 대한 GWAS결과 Top10 SNP에 대한 정보는 아래 Table 1-2-20과 같음. 가장 큰 차이를 보이는 SNP인 ALGA0051726는 9번염색체에 위치해 있으며, P -value는 3.29×10^{-4} 임. 상위 10위권 SNP중 ASGA0027301 은 앞서 서술한 형질 모두에서 상위10위권 내에서 공통적으로 발굴된 SNP로 주목할 필요가 있다고 판단됨.

Table 1-2-20. LTNB365에 대한 GWAS결과 Top10 SNP

No.	염색체	SNP	위치 (1000bp)	P -value	Significance		
					genome suggestive ¹	Chromosome significant ²	Chromosome suggestive ³
1	9	ALGA0051726	20,235	3.29.E-04	NS	NS	*
2	3	MARC0100038	63,127	9.44.E-04	NS	NS	NS
3	3	MARC0081247	63,131	9.44.E-04	NS	NS	NS
4	4	ASGA0023015	135,553	1.22.E-03	NS	NS	NS
5	4	ASGA0023010	135,691	1.22.E-03	NS	NS	NS
6	5	ASGA0027301	108,647	1.31.E-03	NS	NS	NS
7	5	ASGA0083005	108,556	1.33.E-03	NS	NS	NS
8	5	MARC0049338	109,042	1.33.E-03	NS	NS	NS
9	5	ASGA0090075	109,555	1.33.E-03	NS	NS	NS
10	1	ALGA0006539	173,263	1.37.E-03	NS	NS	NS

¹1/38,665 = 2.59.E-05; ²0.05/염색체별 SNP갯수; ³1/염색체별 SNP갯수; ⁴non significant

LNBA365에 대한 GWAS결과는 아래 Figure 1-2-20에서 확인할 수 있음. 모든 SNP의 염색체별 위치와 P -value를 Manhattan plot으로 표시했으며, P -value가 가장 낮은 10개의 SNP에 대해서 동그라미로 표시했음(Figure 1-2-20-a). 또한 P -value들의 Q-Q plot을 Figure 1-2-20-b에 나타냈음.

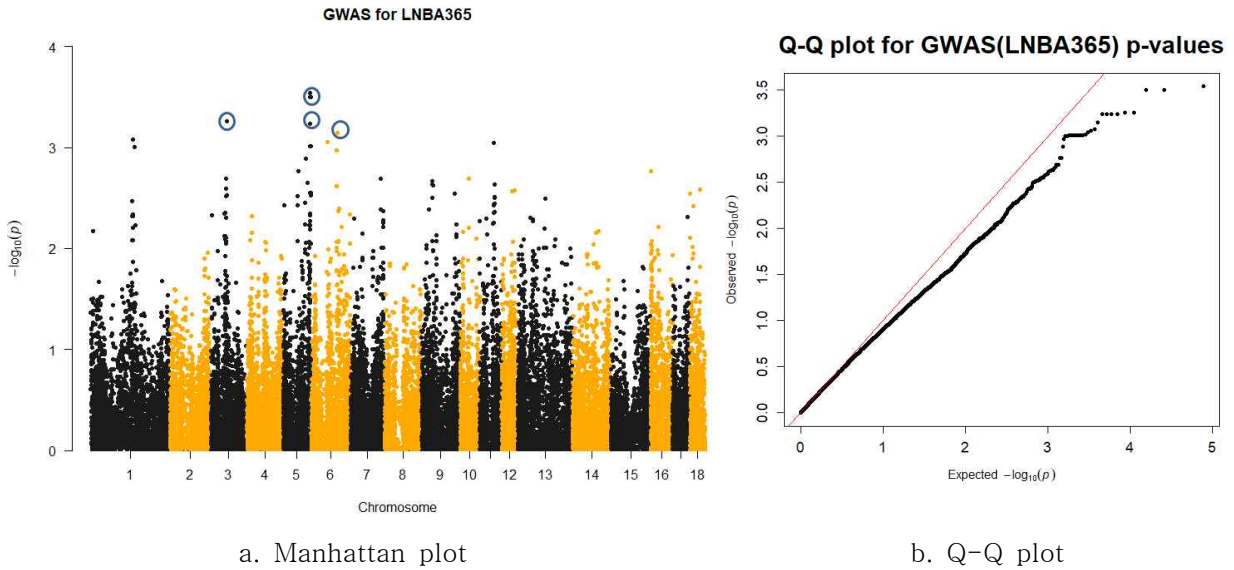


Figure 1-2-20. LNBA365에 대한 GWAS결과

LNBA365에 대한 GWAS결과 Top10 SNP에 대한 정보는 아래 Table 1-2-21과 같음. 가장 큰 차이를 보이는 SNP인 ASGA0027301는 5번염색체에 위치해 있으며, P -value는 2.88×10^{-4} 임. 또한 동일한 염색체의 영역내에 상위 10위권 SNP가 7개 발굴됨.

Table 1-2-21. LNBA365에 대한 GWAS결과 Top10 SNP

No.	염색체	SNP	위치 (1000bp)	P -value	Significance		
					genome suggestive ¹	Chromosome significant ²	Chromosome suggestive ³
1	5	ASGA0027301	108,647	2.88.E-04	NS	NS	*
2	5	ALGA0034215	109,015	3.15.E-04	NS	NS	*
3	5	H3GA0017328	109,376	3.15.E-04	NS	NS	*
4	3	MARC0100038	63,127	5.54.E-04	NS	NS	NS
5	3	MARC0081247	63,131	5.54.E-04	NS	NS	NS
6	5	ALGA0034244	107,724	5.77.E-04	NS	NS	*
7	5	ALGA0034250	107,778	5.78.E-04	NS	NS	*
8	5	DRGA0006462	107,803	5.78.E-04	NS	NS	*
9	5	CASI0009612	107,831	5.78.E-04	NS	NS	*
10	6	MARC0020136	104,186	7.10.E-04	NS	NS	NS

¹1/38,665 = 2.59.E-05; ²0.05/염색체별 SNP갯수; ³1/염색체별 SNP갯수; ⁴non significant

평균 비생산일수(LNDPP)에 대한 GWAS결과는 아래 Figure 1-2-21에서 확인할 수 있음. 모든 SNP의 염색체별 위치와 P -value를 Manhattan plot으로 표시했으며, P -value가 가장 낮은 10개의 SNP에 대해서 동그라미로 표시했음(Figure 1-2-21-a). 또한 P -value들의 Q-Q plot을 Figure 1-2-21-b에 나타냈음.

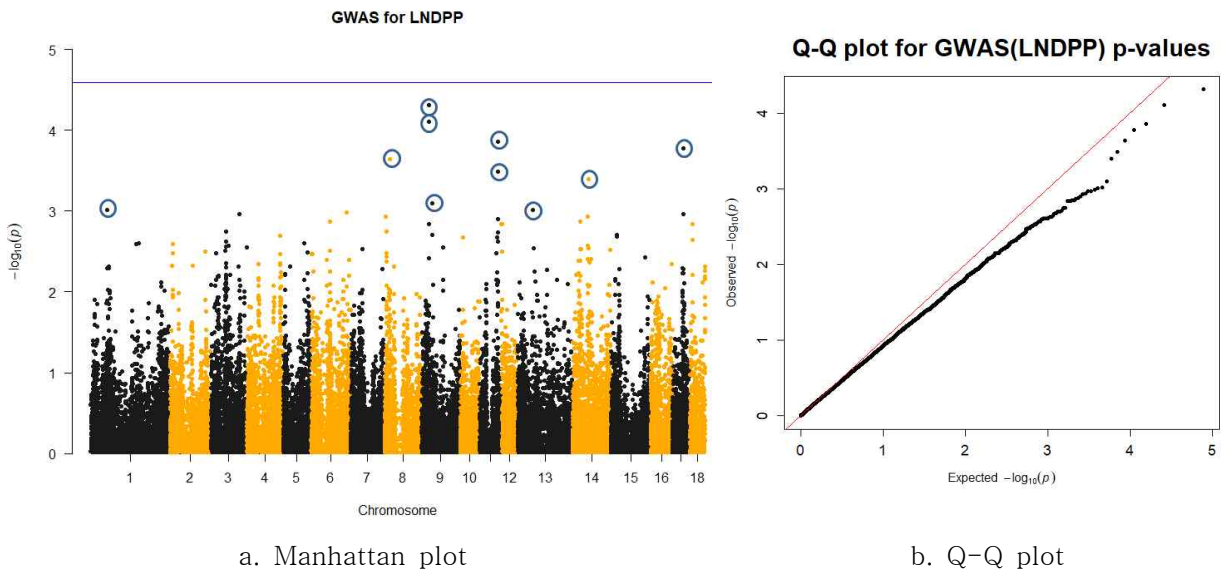


Figure 1-2-21. LNDPP에 대한 GWAS결과

LNDPP에 대한 GWAS결과 Top10 SNP에 대한 정보는 아래 Table 1-2-22와 같음. 가장 큰 차이를 보이는 SNP인 MARC0021762 는 9번염색체에 위치해 있으며, P -value는 4.89×10^{-5} 임. 상위 10위권 SNP들 중 3개가 9번 염색체에 존재함.

Table 1-2-22. LNDPP에 대한 GWAS결과 Top10 SNP

No.	염색체	SNP	위치 (1000bp)	P -value	Significance		
					genome suggestive ¹	Chromosome significant ²	Chromosome suggestive ³
1	9	MARC0021762	28,170	4.89.E-05	NS	NS	*
2	9	ASGA0105299	28,075	7.80.E-05	NS	NS	*
3	11	ALGA0063147	71,901	1.40.E-04	NS	NS	*
4	17	ALGA0095021	45,427	1.68.E-04	NS	NS	*
5	8	ALGA0046861	21,174	2.30.E-04	NS	NS	*
6	11	H3GA0032245	72,032	3.26.E-04	NS	NS	*
7	14	MARC0029824	64,026	4.02.E-04	NS	NS	NS
8	9	ALGA0056075	40,925	7.95.E-04	NS	NS	NS
9	13	MARC0051919	61,914	9.67.E-04	NS	NS	NS
10	1	ASGA0083328	64,533	9.78.E-04	NS	NS	NS

¹1/38,665 = 2.59.E-05; ²0.05/염색체별 SNP갯수; ³1/염색체별 SNP갯수; ⁴non significant

6산차이상 생존한 모돈은 장수성개체라 판단하고 장수성여부에 대해 case-control study를 실시한 GWAS결과는 아래 Figure 1-2-22에서 확인할 수 있음. 모든 SNP의 염색체별 위치와 P-value를 Manhattan plot으로 표시했으며, P-value가 가장 낮은 10개의 SNP에 대해서 동그라미로 표시했음(Figure 1-2-22-a). 또한 P-value들의 Q-Q plot을 Figure 1-2-22-b에 나타냈음.

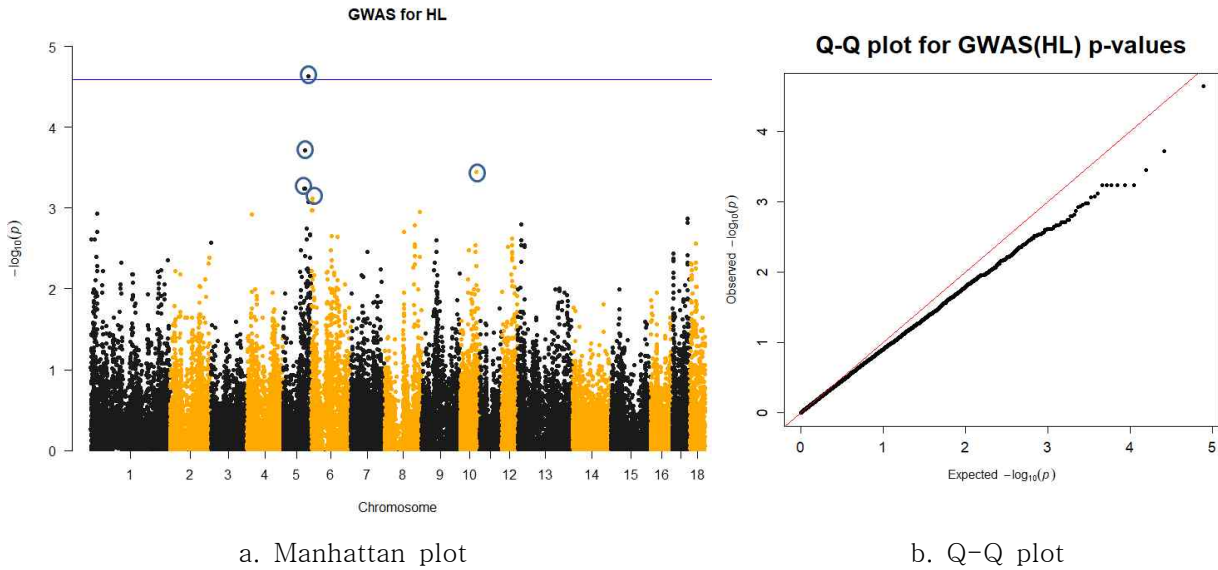


Figure 1-2-22. HL에 대한 GWAS결과

LNBA에 대한 GWAS결과 Top10 SNP에 대한 정보는 아래 Table 1-2-23와 같음. 가장 큰 차이를 보이는 SNP인 H3GA0017166 는 5번염색체에 위치해 있으며, genome-wide suggestive 수준에서 유의미함. 상위 10위권 SNP중 8개가 모두 5번염색체의 비슷한 영역 주위에 포진해있음을 확인가능함.

Table 1-2-23. HL에 대한 GWAS결과 Top10 SNP

No.	염색체	SNP	위치 (1000bp)	P-value	Significance		
					genome suggestive ¹	Chromosome significant ²	Chromosome suggestive ³
1	5	H3GA0017166	99,793	2.32.E-05	*	*	*
2	5	CASI0010198	88,766	1.94.E-04	NS	NS	*
3	10	H3GA0030549	64,941	3.60.E-04	NS	NS	*
4	5	DBNP0001816	85,947	5.81.E-04	NS	NS	*
5	5	ALGA0033204	86,095	5.81.E-04	NS	NS	*
6	5	MARC0028672	86,390	5.81.E-04	NS	NS	*
7	5	MARC0064789	86,402	5.81.E-04	NS	NS	*
8	5	DRGA0006108	86,460	5.81.E-04	NS	NS	*
9	5	DRGA0006105	86,480	5.81.E-04	NS	NS	*
10	6	ALGA0111780	5,361	7.64.E-04	NS	NS	NS

¹1/38,665 = 2.59.E-05; ²0.05/염색체별 SNP갯수; ³1/염색체별 SNP갯수; ⁴non significant

LNBA365가 우수한 경우 생애총생산성의 효율성이 높은 개체라 판단하고, LNBA365 성적의 상위 25% 여부에 대한 case-control study를 실시한 GWAS결과는 아래 Figure 1-2-23에서 확인할 수 있음. 모든 SNP의 염색체별 위치와 P-value를 Manhattan plot으로 표시했으며, P-value가 가장 낮은 10개의 SNP에 대해서 동그라미로 표시했음(Figure 1-2-23-a). 또한 P-value들의 Q-Q plot을 Figure 1-2-23-b에 나타냈음.

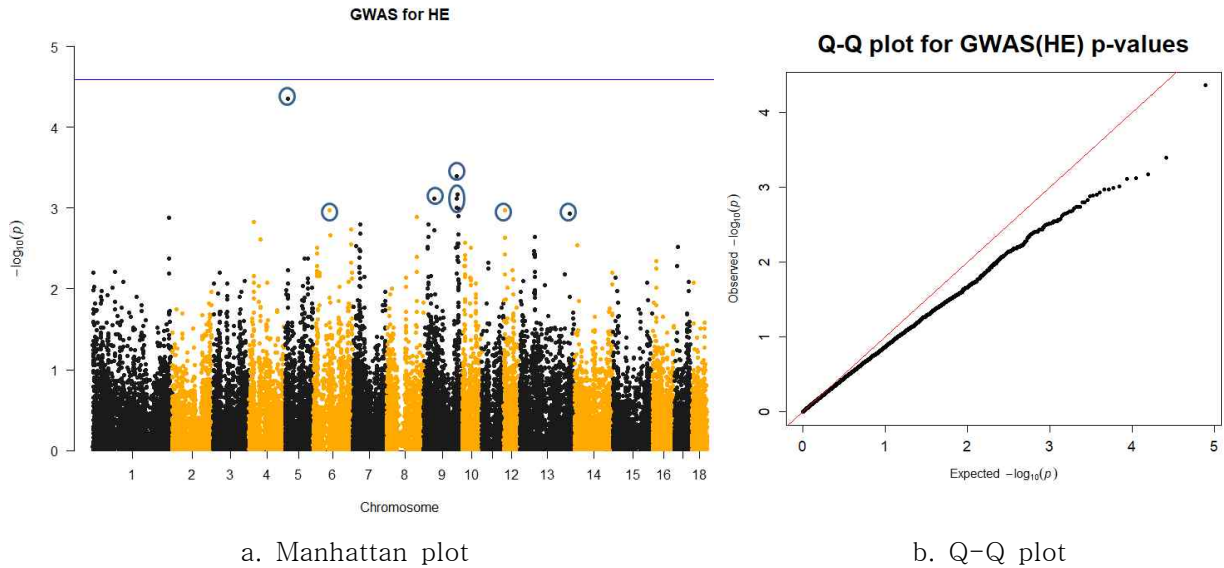


Figure 1-2-23. HE에 대한 GWAS결과

LNBA에 대한 GWAS결과 Top10 SNP에 대한 정보는 아래 Table 1-2-24와 같음. 가장 큰 차이를 보이는 SNP인 MARC0002168는 5번염색체에 위치해 있으며, 4.38×10^{-5} 의 P-value를 보였음. 또한 9번염색체에서 10위권내 6개의 SNP가 발견되었음.

Table 1-2-24. HE에 대한 GWAS결과 Top10 SNP

No.	염색체	SNP	위치 (1000bp)	P-value	Significance		
					genome suggestive ¹	Chromosome significant ²	Chromosome suggestive ³
1	5	MARC0002168	10,619	4.38.E-05	NS	NS	*
2	9	ASGA0101051	133,026	4.04.E-04	NS	NS	NS
3	9	MARC0015336	135,492	6.74.E-04	NS	NS	NS
4	9	MARC0010417	133,008	7.58.E-04	NS	NS	NS
5	9	DRGA0009996	41,344	7.66.E-04	NS	NS	NS
6	9	ASGA0105796	132,594	9.80.E-04	NS	NS	NS
7	9	H3GA0055164	138,437	1.03.E-03	NS	NS	NS
8	6	ASGA0028382	65,411	1.06.E-03	NS	NS	NS
9	12	INRA0038415	6,257	1.07.E-03	NS	NS	NS
10	13	INRA0041487	199,380	1.17.E-03	NS	NS	NS

¹1/38,665 = 2.59.E-05; ²0.05/염색체별 SNP갯수; ³1/염색체별 SNP갯수; ⁴non significant

다. 위치기반 후보유전자탐색 및 해당 후보유전자의 구조분석과 기능조사

GWAS 분석결과, genome-wide suggestive 수준에서 유의미한 SNP를 대상으로 선택하여 주변 ±500,000bp을 기준으로 Ensembl 서버에서 검색을 하여 위치기반 후보유전자 탐색을 실시함. 예를들어 ALGA0013534는 2번염색체의 46,429,654 위치에 있으며, FP, LPL, LTNB, LNBA, LPW, LTNB365, LNBA365, HL 형질에 $P < 0.001$ 수준을 가지고 있으며, HE 형질에도 $P < 0.05$ 수준으로, 다양한 형질에 유의미하게 분석된 SNP임. 이 SNP의 위치에 대해 주변 1Mb 영역을 탐색한 결과는 아래 Figure 1-2-24과 같음.

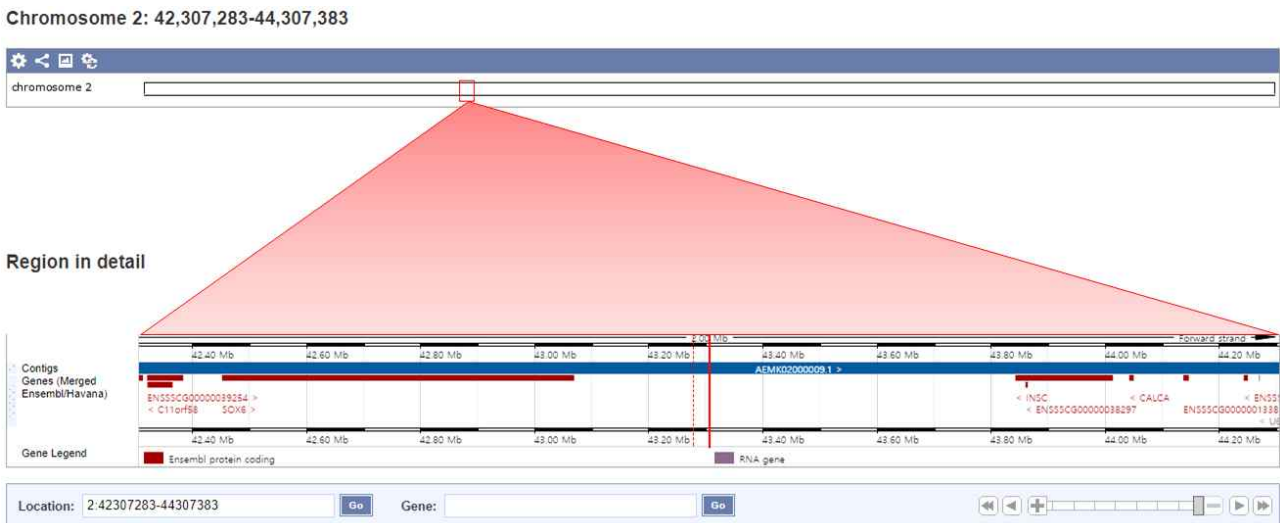


Figure 1-2-24. SNP주변 1Mb 영역의 유전자 탐색

ALGA0013534 SNP의 주변 1Mb는 염색체 1번내에서 윗부분의 그림에서 확인할 수 있고, 이를 확대해보면 주변에 위치하고 있는 유전자가 사각형으로 표시되어 있음. 위 그림에서 확인할 수 있는 유전자 중 가까우며 기능이 확인된 유전자는 SOX6임. 이와 같은 방식으로 모든 SNP들에 대해 탐색하여 주변의 유전자에 대한 목록을 작성함.

Table 1-2-25. 주요 SNP의 주변 유전자와 형질별 *P*-value

SNP(rs_번호)	염색체:위치	유전자 (길이)	거리	FP	LPL	LTNB	LNBA	LPW	LTNB365	LNBA365	LNDPP	HL	HE
INRA0027470 (rs335597043)	7:92500500	<i>ZFP36L1</i> (5,795)	뒤쪽 4,636	7.16.E-02	2.39.E-01	8.84.E-03	5.72.E-03	1.17.E-01	4.30.E-03	2.88.E-03	1.98.E-02	9.39.E-02	2.38.E-05
ASGA0095712 (rs81315189)	6:143814685	<i>PPAP2B</i> (91,993)	뒤쪽 80,604	1.22.E-02	9.35.E-03	2.79.E-04	1.88.E-04	5.53.E-02	6.93.E-05	2.54.E-05	8.36.E-01	5.93.E-02	7.33.E-03
ALGA0031924 (rs80949260)	5:48896828	<i>BCAT1</i> (89,683)	intron	8.86.E-01	3.63.E-01	5.85.E-01	5.47.E-01	8.76.E-01	6.72.E-02	8.07.E-02	2.76.E-06	2.58.E-01	1.44.E-01
BGIS0004668 (rs80971849)	5:46850803	<i>INTS13</i> (36,806)	Exon	3.93.E-01	9.14.E-01	3.30.E-01	4.86.E-01	4.95.E-01	7.99.E-02	2.53.E-01	2.71.E-05	6.94.E-01	1.70.E-01
ALGA0031707 (rs81000718)	5:37249647	<i>PTPRB</i> (98,316)	intron	5.54.E-01	6.77.E-01	2.37.E-01	2.78.E-01	9.40.E-01	2.15.E-02	5.08.E-02	9.01.E-06	6.76.E-01	1.76.E-01
ASGA0025400 (rs81383713)	5:34151822	<i>MYRFL</i> (150,645)	intron	4.55.E-01	8.25.E-01	1.86.E-01	2.19.E-01	8.46.E-01	2.08.E-02	4.82.E-02	1.45.E-05	5.21.E-01	1.67.E-01
ALGA0031690 (rs81383713)	5:36544839	<i>TRHDE</i> (396,325)	intron	4.68.E-01	8.15.E-01	2.10.E-01	2.44.E-01	8.94.E-01	2.61.E-02	5.80.E-02	1.61.E-05	5.62.E-01	2.05.E-01
DIAS0000197 (rs345043801)	5:33871482	<i>CCT2</i> (15,082)	intron	4.68.E-01	8.15.E-01	2.10.E-01	2.44.E-01	8.94.E-01	2.61.E-02	5.80.E-02	1.61.E-05	5.62.E-01	2.05.E-01
ALGA0013534 (rs81358495)	2:43307333	<i>SOX6</i> (621,433)	뒤쪽 238,509	1.74.E-04	2.26.E-05	1.63.E-04	1.08.E-04	9.48.E-04	2.73.E-03	1.57.E-03	7.91.E-01	2.69.E-03	4.97.E-02

핵심SNP 9개 중 우선분석유전자를 선정하기 위해 아래와 같은 기준으로 우선분석유전자를 선정하기로 함

1. LNDPP관련 SNP 5개중 가장 *P*-value 가 우수한 ALGA0031924를 선정
2. LNBA365 와 HE는 모두 번식효율관련형질이므로,
가장 가까운 유전자와의 거리가 더 짧은 INRA0027470를 선정

→ 아래 3개의 SNP가 걸러짐

SNP(rs_번호)	염색체:위치	유전자 (길이)	거리	LPL	LNDPP	HE
INRA0027470 (rs335597043)	7:92500500	<i>ZFP36L1</i> (5,795)	뒤쪽 4,636	2.39.E-01	1.98.E-02	<i>2.38.E-05</i>
ALGA0031924 (rs80949260)	5:48896828	<i>BCAT1</i> (89,683)	intron	3.63.E-01	<i>2.76.E-06</i>	1.44.E-01
ALGA0013534 (rs81358495)	2:43307333	<i>SOX6</i> (621,433)	뒤쪽 238,509	<i>2.26.E-05</i>	7.91.E-01	4.97.E-02

3. 길이가 짧아 Full-gene sequencing이 가능한 유전자를 선정

→ *ZFP36L1* 을 우선 분석대상으로 선정함

HE에서 genome-wide suggestive 수준에서 유의적으로 검출된 SNP인 INRA0027470 주변에 있는 *ZFP36L1* (zink finger protein 36, C3H type-like 1) 는 zinc finger 36 단백질 패밀리에 속해있는 CCCH tandem zinc finger protein을 코딩하는 유전자임. 쥐에서 이 유전자를 녹아웃 시킨 실험 대한 두가지 연구결과가 있는데, 임신초기 배아에서 장노막이 융합실패하며 영양막의 위축, 태반발달 실패로 사망에 이르거나, 임신중기에 이르더라도 비정상적인 관 발달로 인한 심장결함으로 사망에 이르게 됨(DJ Stumpo 등 2004, Deborah J Stumpo & Perry J Blackshear, 2008). 이를 종합할 때 *ZFP36L1*의 유전자변이는 태아발달에 영향을 끼쳐 궁극적으로 모든의 생애총생산성에 영향을 줄 수 있다고 판단하고 본 연구진은 이 유전자를 후보유전자로 선정함. 유전자의 크기는 5,796bps로, exon의 variant가 2개로 예측되며(Figure 1-2-25), 유전자 전 영역에 대해 SNP 탐색을 실시하여 새로운 마커발굴을 하기로 계획함.



Figure 1-2-25. NCBI에 공개된 ZFP36L1 유전자 구조

3. 개발된 모든생애총생산성관련 DNA마커의 효과검증 및 최적마커조합 설정

가. 발굴된 후보유전자 영역내 유효 SNP 발굴 및 유전자형진단기법 개발

유전자의 크기는 5,796bps로, exon의 variant가 2개로 예측되며, 유전자 전 영역에 대해 SNP 탐색을 실시함. 돼지 ZFP36L1 유전자에 대한 실험집단내 염기다형성발굴을 위해 총 9개의 앰플리콘(P1-P9)을 대상으로 염기서열분석을 실시하였음(Figure 1-3-1).

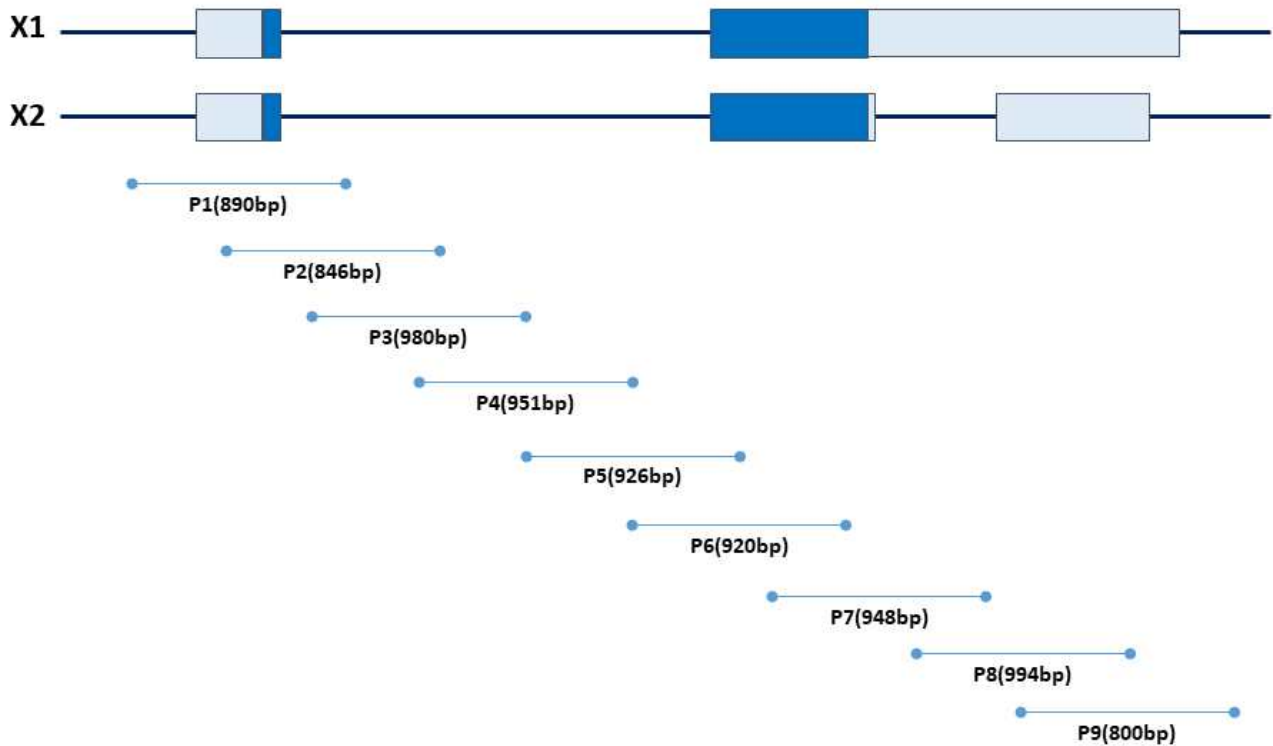


Figure 1-3-1. ZFP36L1 유전자의 변이탐색을 위한 Primer 제작결과

실험집단내 염기서열 변이를 탐색하기 위해서 요크셔 순종돼지의 DNA를 이용하였음. 부모 정보가 겹치지 않도록 10두의 DNA를 혼합한 pooling DNA sample을 4세트 조성하여 염기서열 분석을 실시함. 각 돼지의 DNA는 EDTA를 처리한 혈액표본에서 Sambrook 등(1989)의 방법 또는 kit (G-DexTMIIb, Intronbio. korea)를 통해 추출함. PCR은 총 부피 20 μ L로 100ng의 돼지 DNA와 각 10pmol의 primer(Table 1-3-1), 0.25mM의 dNTP, 10x PCR buffer 및 1.25U의 DNA polymerase (i-MaxTMII, Intronbio., Korea)를 넣고 Mastercycler gradient (Eppendorf Co., Germany)를 이용하여 수행함. 염기서열분석은 ABI PRISM[®]3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)로 실시함. 이를 통해 얻어진 amplicon 각각의 염기서열 분석결과에 대해 SeqMan 7.0 program (DNASTAR, USA)을 이용하여 peak분석 및 alignment 분석을 실시하여 polymorphisms을 확인함.

Table 1-3-1. *ZFP36L1* 유전자의 변이탐색용 sequencing을 위한 Primer set

Primer set	Primer sequence	Size (bp)	Annealing temperature (°C)
P1	5'-CCGAGTGCGAAAGAAAACCTC-3'	890	60
	5'-TCCCAGTCTTCCCAGACCTA-3'		
P2	5'-GCATGGCTGATTCAACTTCA-3'	846	60
	5'-ATCCCAGCAAAACACTGTCC-3'		
P3	5'-CCATAACGTGCTGCTTTTGA-3'	980	60
	5'-AGCCTGTTCCCAACAATGAG-3'		
P4	5'-AAAGAGGGAAGCTGCTAGGC-3'	951	60
	5'-TTTCCTGACAGCCTTTGCTT-3'		
P5	5'-AGCAGTGAATGGTGGGAGAG-3'	926	60
	5'-GGTTCTGGTGGAACTTGGAG-3'		
P6	5'-GGTGGATGGTCTTTGTCACC-3'	920	60
	5'-TGGTCCGAGAGAGAATCCTG-3'		
P7	5'-CAATAACCCCTTCGCCTTCT-3'	948	60
	5'-GTTTCCCCAAAACCCAAGT-3'		
P8	5'-AGAAACCCAGACCCAGAACC-3'	994	60
	5'-TTTGCAGTCCAACACAAAGG-3'		
P9	5'-TTGCTTGTCACACTGCACATCA-3'	800	60
	5'-TACAGGCAGAGGGAAAGTGC-3'		

염기서열분석결과 현재 DNA보유집단에서 *ZFP36L1* 유전자내 염기서열중 변이가 단 1개 발견되었음 (Figure 1-3-2-a). Exon에 위치하고 있으며, 엑손내 존재하지만 단백질의 변형은 야기하지 않는 synonymous SNP로, NCBI에 rs328206516 로 보고되어있는 변이임 (Figure 1-3-2-b). 본 SNP에 대해 실험집단의 개체별 유전자형 진단을 진행하기로 했으며, Direct sequencing 방법을 선정하여 유전자형 분석을 실시하기로 함.

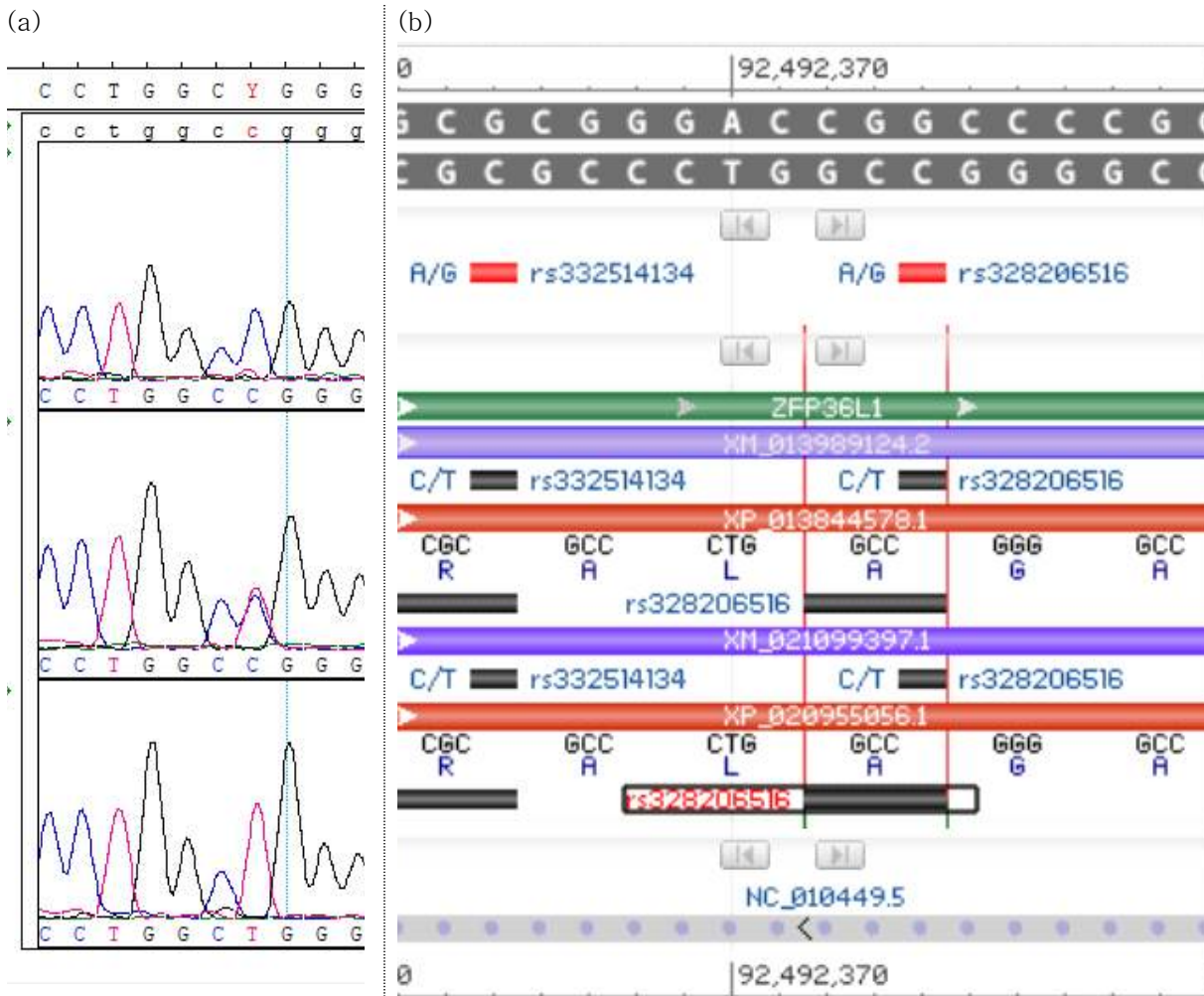


Figure 1-3-2. 돼지 *ZFP36L1* 내 SNP인 rs328206516 유전자형분석결과.
 (a) 직접염기서열분석을 이용한 유전자형분석 결과, (b) NCBI 검색결과

나. 연관성분석을 통한 생애총생산성관련 DNA마커 효과 확인

검증집단은 유전체분석을 실시한 농장내 모든 84두에 대해 유전자분석을 실시하였으며, reference allele인 C allele이 0.67, 발굴된 변이인 T allele이 0.33 로 나타났으며, 하디와인버그 평형에 어긋나지 않음을 확인함 (Table 1-3-2).

Table 1-3-2. *ZFP36L1* 유전자내 SNP인 rs328206516 의 유전자형,유전자빈도

N	Genotype			Allele	
	CC	CT	TT	C	T
84	0.49 (41)	0.36 (30)	0.15 (13)	0.67	0.33

본 모돈들의 생애총생산성형질을 대상으로 유전자형과의 관계를 확인하고자 함. 통계분석 프로그램으로는 SAS 9.4 package에서 제공되는 GLM procedure를 이용하였고, 통계분석모델에서 Genotype, 출생년도, 출생계절, 출생지를 고정효과로 분석하였으며, 초산일령, 1산차 실산자수(NBA)를 공변량으로 설정함. 각 유전자형의 최소제곱평균(Least Square Means)을 구하여 유의차를 평가함. 유전자형에 따른 연관성분석결과 CC유전자형이 비교적 TC, TT유전자형에 비해 LTNB, LNBA, LPW 의 생애총산자수형질과 LTNB365, LNBA365 와 같은 생애총생산성 효율성 형질이 우수한 것으로 보이지만 통계적으로 유의미하지 않음(Table 1-3-3).

Table 1-3-3. *ZFP36L1* 내 SNP의 유전자형과 생애총생산성관련 형질과의 연관성 분석

Traits	CC (n=41)	TC (n=30)	TT (n=13)	P-value
FP	4.40 (0.31)	4.35 (0.37)	4.41 (0.44)	NS
LPL	551.63 (42.23)	550.67 (50.74)	534.77 (60.18)	NS
LNDPP	19.77 (5.86)	19.98 (7.04)	9.63 (8.35)	NS
LTNB	72.45 (5.66)	69.63 (6.80)	68.60 (8.06)	NS
LNBA	61.71 (5.13)	60.63 (6.16)	60.25 (7.30)	NS
LPW	51.41 (3.62)	51.09 (4.33)	50.44 (5.12)	NS
LTNB365	26.91 (1.50)	25.99 (1.81)	25.77 (2.15)	NS
LNBA365	22.77 (1.39)	22.64 (1.68)	22.61 (1.99)	NS

ZFP36L1 유전자의 변이가 생애총생산성형질에 통계적으로 유의미하지 않지만 어느정도 유전자형에 따른 능력의 경향성을 보이고 있었기 때문에 산차에 따른 생존곡선을 통해 집단의 특성을 확인하고자 함 (Figure 1-3-3). TT유전자형은 타 유전자형과는 확연히 다르게 400일, 500일의 도태비율이 높았으며, 특히 1000일부근에 집단의 대부분이 도태된 것을 확인할 수 있음. 이를 보았을 때 TT유전자형은 장수성에 취약한 유전자형일 것으로 예상되며, 보다 확실한 분석을 위해 분석집단을 6산차이상 생존한 집단과 아닌 집단으로 나누어 분석하기로 함.

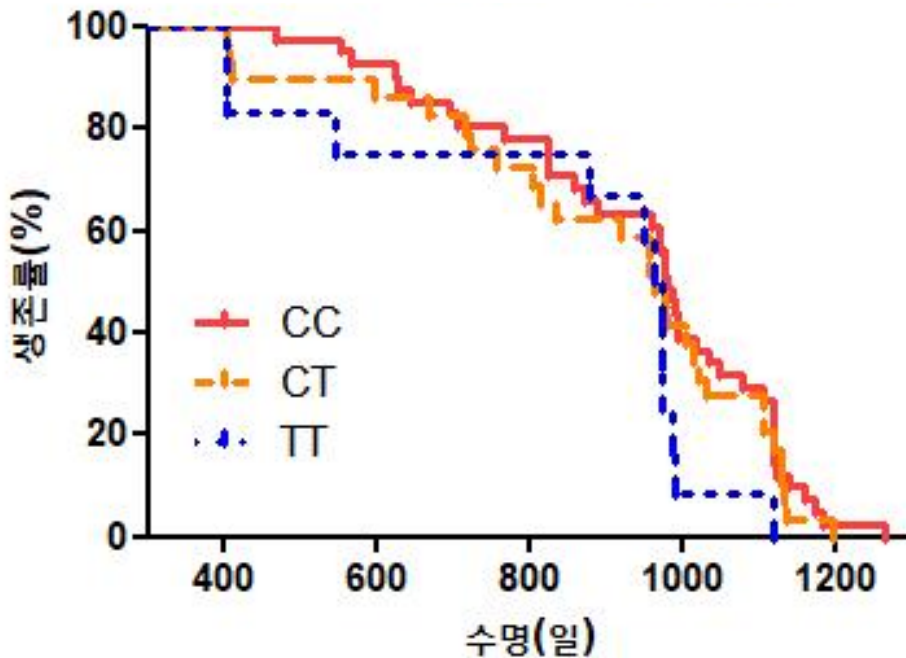


Figure 1-3-3. 돼지 *ZFP36L1* 내 SNP인 rs328206516 유전자형에 따른 생존률

두 집단의 유전자형빈도 차이를 카이제곱검정을 실시해 보았을 때 통계적으로 유의미한 수준에는 도달하지 못했지만 6산차 이상 생존한 장수성 모돈집단에는 TT유전자형이 고작 1마리 (전체의 5%)밖에 되지 않는 것을 확인했음. 반대로, CC유전자형과 TC유전자형은 장수집단에서 유전자형빈도가 비장수집단에서보다 높은 것을 확인할 수 있었음 (Table 1-3-4).

Table 1-3-4. 6산차이상 생존한 장수성 여부에 따른 *ZFP36L1* 내 SNP의 유전자형빈도차이

Genotype	Group		χ^2	P-value
	장수(6산이상)	비장수(6산미만)		
CC	12 (57%)	29 (48%)	3.244	0.072
TC	8 (38%)	21 (34%)		
TT	1 (5%)	11 (18%)		
Total	21	61		

조금더 구체적인 분석을 위해 유전자형간 6산차이상 생존개체/6산차미만 도태개체 집단별 분포정보로 Odds ratio 비교를 실시하였음. Odds ratio 와 신뢰구간 (confidence interval)은 chi-square 테스트로 구함. 그 결과, rs328206516 유전자의 TC 유전자형은 TT 유전자형에 비해 6산차 이상 생존확률이 9.4배 높은 것으로 나타났음 (P<0.05). CC유전자형은 TT유전자형에 비해 통계적으로 유의미하지는 않으나 6산차 이상 생존할 확률이 4.55배 높은 경향을 보임 (Table 1-3-5).

Table 1-3-5. *ZFP36L1* 유전자내 SNP의 유전자형을 기준으로 한 모돈의 장수(6산이상)여부에 대한 통계분석결과

	odds ratio	95% CI	Z	sig(P)
CC/TC	0.4828	0.1921 to 1.2131	1.549	0.1214
CC/TT	4.5517	0.5276 to 39.2664	1.378	0.1681
TC/TT	9.4286	1.1074 to 80.2798	2.053	0.04

검증에 사용된 모돈은 84두 뿐이었지만 유전자형에 따른 생애총생산성 형질의 특성차이가 분명히 드러난 것으로 보아 *ZFP36L1* 유전자가 생애총생산성형질에 미치는 영향이 충분히 있다고 판단됨. 그러나 다른집단에서의 검증 또는 다른품종에서의 새로운 변이발굴을 통한 추가마커 개발작업이 필요하다고 판단됨.

추후 본 과제가 지향하는 조기선발을 위한 최적마커조합설정을 위해서는 검증용 집단이 충분히 커야 할 것으로 생각되며, 본 집단(84두)에서 GWAS분석에서 개발한 분석결과를 조합하기에는 무리가 있다고 봄. 따라서 GWAS분석시 발굴한 주요마커 3종에 대해서만 추가 검증과 마커조합의 효용성에 대해 검증하고자 함.

다. 임의회귀(random regression)분석을 통한

모든의 산차별 반복측정된 산자수와 DNA마커의 관련성 검증

(1) 마커1. ALGA0013534 (LPL관련)

Genome-wide suggestive 수준에서 LPL(생산수명)에 대해 유의미한 마커인 ALGA0013534에 대한 GWAS결과는 아래 Table 1-3-6과 같음. major allele은 G 이며, minor allele 인 A의 유전자빈도는 0.3임. 생산수명에 대한 SNP effect는 G 유전자형으로 변화시 54.88일 생산수명이 증가한다는 의미임. SOX6 유전자와 가장 가까이 있으며, 약 4.6kb 뒤에 존재하고 있음.

Table 1-3-6. ALGA0013534 유전자형의 GWAS결과

SNP (SNP의 rs_id)	A1	A2	LPL_GWAS result			Closest gene		
			FREQ	SNP effect	S.E.	P-value	유전자 (길이)	거리
ALGA0013534 (rs81358495)	G	A	0.30	54.88	12.95	2.26E-05	SOX6 (621,433)	뒤쪽 4,636

ALGA0013534 이 생산수명에 주요하게 영향을 끼치기 때문에 산차별 번식능력의 변화가 아닌 생존분석을 실시해봄. Figure 1-3-4 의 좌측은 수명에 대한 생존곡선으로, GG유전자형이 600일부터 800일까지 1마리도 도태되지 않았으며, 1000일부근까지도 다른 유전자형에 비해 매우 높은 생존률을 보이고 있음. 반대로 AA유전자형은 1000일부터 1100일까지의 생존률이 타 유전자형에 비해 급격하게 줄어들고 있음. 또한 우측의 산차에 따른 생존률 곡선에서 이 차이가 명확히 드러나는데, GG유전자형이 3산차까지 100%가 생존해있으며, AA유전자형은 5산차에서 생존비율이 급격히 줄어드는 것을 확인할 수 있음.

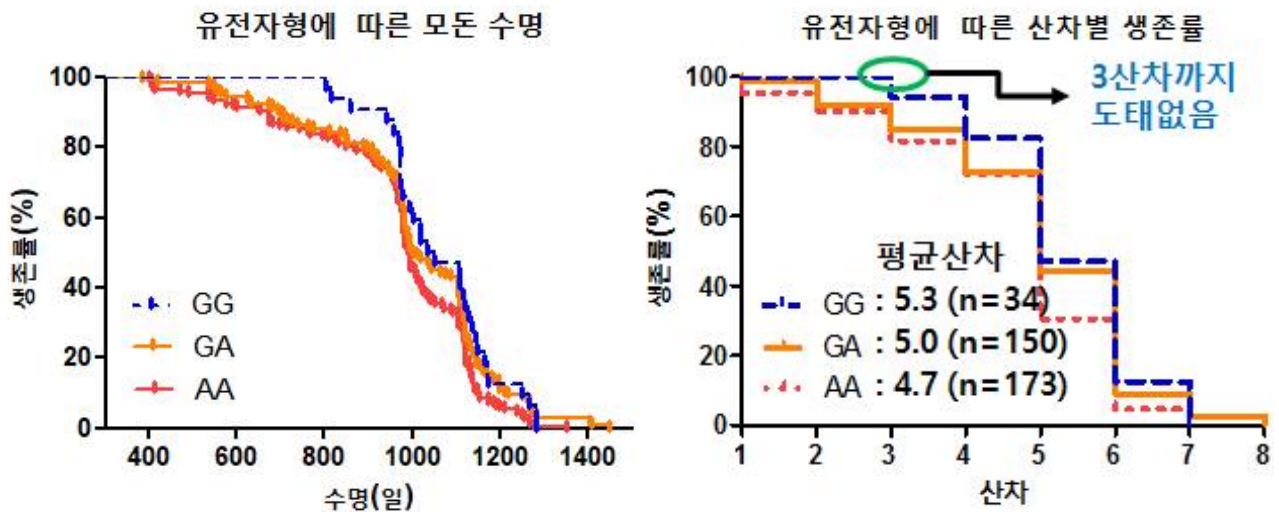


Figure 1-3-4. ALGA0013534 유전자형에 따른 생존분석

(2) 마커2. INRA0027470 (HE관련)

Table 1-3-7. INRA0027470 유전자형의 GWAS결과

SNP (SNP의 rs_id)	A1	A2	HE_GWAS result			Closest gene		
			FREQ	SNP effect	S.E.	P-value	유전자 (길이)	거리
INRA0027470 (rs335597043)	A	G	0.13	0.20	0.05	2.38.E-05	<i>ZFP36L1</i> (5,795)	뒤쪽 4,636

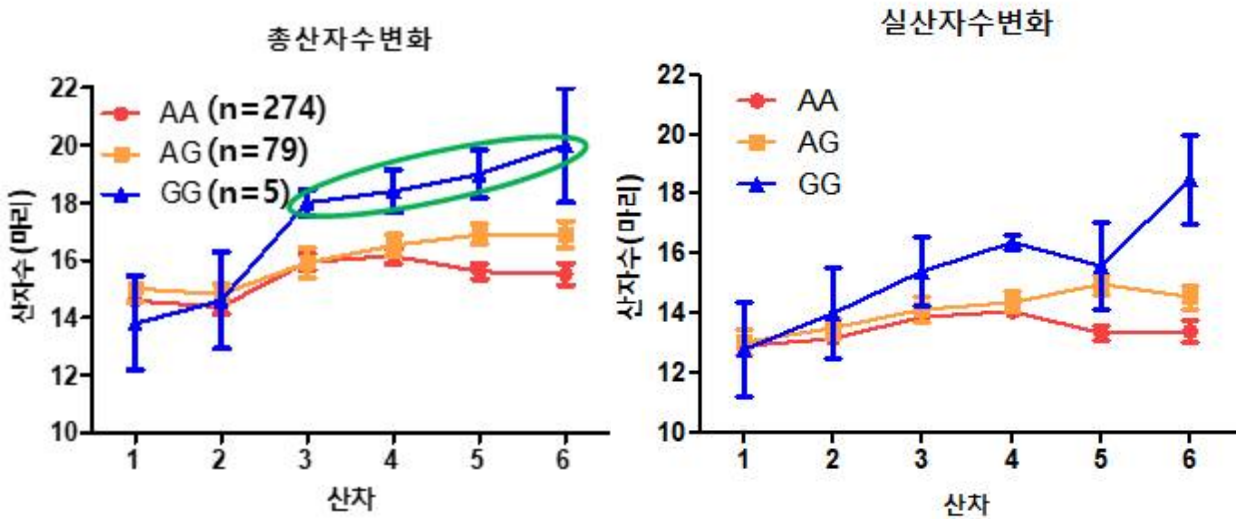


Figure 1-3-5. INRA0027470 유전자형에 따른 산차별 번식능력변화추이

(3) 마커3. ALGA0031924 (LNDPP관련)

Table 1-3-8. ALGA0031924 유전자형의 GWAS 결과

SNP (SNP의 rs_id)	A1	A2	LNDPP_GWAS result				Closest gene	
			FREQ	SNP effect	S.E.	P-value	유전자 (길이)	거리
ALGA0031924 (rs80949260)	A	C	0.39	4.38	0.93	2.76E-06	<i>BCAT1</i> (89,683)	intron

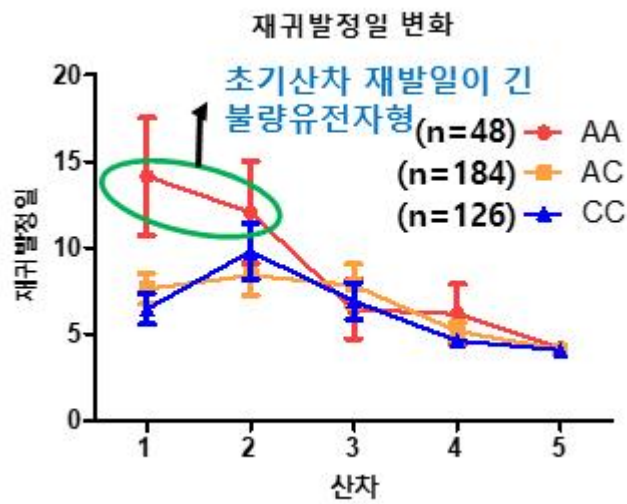


Figure 1-3-6. INRA0027470 유전자형에 따른 산차별 비생산일수

라. 유효 DNA마커들의 최적 조합 설정 및
현장에서 이용가능한 분자유종가 추정용 최적통계모형 제시

앞서 선정된 핵심마커 3종인 LPL관련마커 ALGA0013534과 HE관련마커 INRA0027470, LNDPP관련마커 ALGA0031924는 서로 다른 염색체에 존재하여 linkage-disequilibrium 등의 분석을 실시할 수 없으며, 각 마커의 유전자형이 생애총생산성 능력에 다른마커 둘에 어떤 영향을 끼치는지 알아보기 위해 유전자형조합에 따른 능력분석을 계획함.

Genotype 조합은 이론상 총 3×3×3=27개이지만 실제 유전자조합은 20종이었으며, 유전자형빈도가 적은 유전자형(10두 이내)을 제외하고 분석하기로 실시함. 다만 우량 Allele 2개를 가진 집단과 3개를 가진 집단은 우량유전자의 개수에 따른 경향을 알아보기 위함이기 때문에 각각 한 그룹으로 묶어 분석하기로 함 (Table 1-3-9).

Table 1-3-9. Genotype combination

No.	genotype	N	비율	분석여부	우량Allele
1	AAAAAA	18	5.0%	O	0
2	AAAAAC	70	19.5%	O	1
3	AAAACC	45	12.5%	O	2
4	AAGAAC	22	6.1%	O	2
5	AAGACC	11	3.1%	O	3
6	GAAAAA	19	5.3%	O	1
7	GAAAAC	56	15.6%	O	2
8	GAAACC	38	10.6%	O	2
9	GAGAAC	16	4.5%	O	2
10	GAGACC	13	3.6%	O	4
11	GGAAAC	15	4.2%	O	3
12	GGAACC	11	3.1%	O	4
13	AAGAAA	2	0.6%	10개미만, 제거	
14	AAGGAC	1	0.3%	10개미만, 제거	
15	AAGGCC	3	0.8%	10개미만, 제거	
16	GAGAAA	8	2.2%	10개미만, 제거	
17	GGAAAA	1	0.3%	10개미만, 제거	
18	GGGAAC	2	0.6%	10개미만, 제거	
19	GGGACC	3	0.8%	10개미만, 제거	
20	GGGGCC	1	0.3%	10개미만, 제거	
21	missing	4	1.1%	10개미만, 제거	
	계	359			

마커유전자형의 조합에 따른 생애총생산성형질의 차이는 Table 1-3-10과 같음. 우량유전자의 개수가 0개인 AAAAAA유전자형과 우량유전자가 4개인 유전자형 중 특히 GAGACC 유전자형과의 생애총생산성 성적의 차이는 통계적으로도 유의미하지만 눈에 확연히 났 정도로 차이를 보임. AAAAAA 유전자형에 비해 GAGACC 유전자형은 도태산차(FP)가 약 1산차 높음에도 불구하고 수명(LL)은 고작 104일만큼만 긴 것으로 보임. 돼지의 임신일수가 114일, 이유기간이 28일로 생각할때 비생산일수에서 충분한 이득을 보았을 것으로 보이며, 이는 평균 비생산일수 (LNDPP)에서 확연히 차이가 남 (24.4 vs 7.94). 또한 1산차 차이임에도 불구하고 생애총 자돈수가 총산자수(LTNB) 기준으로 27두, 실산자수(LNBA) 기준으로 24두 차이가 나는데, 이는 평균적으로 생산하는 자돈 역시 차이가 크다는 것을 의미함. LTNB,를 산차로 나눈 AAAAAA의 평균 TNB는 13.7두, GAGACC의 평균 TNB는 16.2두로, 평균적으로 2.5두가량 성적차이가 나며, 연간환산 산자수도 총산자수(LTNB365)는 4두, 실산자수(LNBA365)는 6두가량 우수한 것으로 나타남.

Table 1-3-10. 마커유전자형조합이 생애총생산성형질에 미치는 영향 (우량Allele:밑줄)

Genotype	AAAAAA	GAAAAA	AAAAAC	<u>GAAAAC</u>	<u>GAAACC</u>		
				AAAACC	GAGAAC		
우량allele	0	1		2	3	4	
(n)	(18)	(19)	(70)	(123)	(80)	(11)	(13)
Parity	4.16 (0.30)	4.46 (0.27)	4.24 (0.16)	4.54 (0.13)	4.90 (0.15)	4.64 (0.37)	5.18 (0.33)
LL	917.97 (41.15)	975.70 (37.97)	901.01 (22.61)	935.63 (18.20)	990.17 (21.53)	965.21 (51.67)	1024.74 (45.11)
LNDPP	24.40 (2.88)	25.46 (2.66)	12.74 (1.58)	10.29 (1.27)	9.41 (1.51)	13.11 (3.62)	7.94 (3.16)
LTNB	57.04 (5.60)	66.76 (5.17)	65.44 (3.08)	69.58 (2.48)	77.43 (2.93)	69.44 (7.03)	83.97 (6.14)
LNBA	51.01 (4.93)	60.09 (4.53)	57.28 (2.73)	60.77 (2.23)	68.54 (2.61)	63.17 (6.15)	74.53 (5.37)
LPW	50.53 (3.59)	53.31 (3.38)	51.28 (2.10)	53.34 (1.68)	60.05 (1.93)	56.54 (4.48)	61.53 (4.25)
LTNB365	21.93 (1.30)	23.85 (1.20)	25.37 (0.71)	25.99 (0.57)	27.74 (0.68)	25.73 (1.63)	25.73 (1.63)
LNBA365	19.23 (1.19)	21.42 (1.09)	21.89 (0.65)	22.91 (0.52)	24.32 (0.62)	22.92 (1.49)	25.66 (1.30)

위 결과를 종합할 때 주요마커3종은 우량유전자들이 서로 능력을 저하시키는 현상은 일어나지 않는 것으로 보이며, 농장내 우량유전자형으로의 고정을 위해 조기선발체계를 갖춘다면 생산성에 큰 이득을 볼 것으로 기대됨. 다만 GGAACC유전자형이 GAGACC유전자형에 비해 능력이 비교적 열등한 것으로 보아 LPL관련마커 ALGA0013534과 HE관련마커 INRA0027470의 유전자빈도 조절시 한쪽의 Homotype 고정화보다는 집단내 두 유전자의 우량유전자 빈도를 함께 고려해 선발하여 유전자빈도를 올리는 것이 바람직하다고 봄.

마. 모든 생애총생산성관련 DNA마커 적용에 따른 경제성 분석

(1) 모든 감가상각비 상승에 따른 경제효과 분석

$$\text{산차당 감가상각비} = \left(\frac{\text{모든구입비} - \text{도태후 판매수익}}{\text{입식+사육+기타비용}} \right) \div \text{이용산차}$$

$\frac{1,050,000\text{원} - 250,000\text{원}}{=750,000+200,000+100,000}$

이용산차	1	2	3	4	5	6	7
감가상각비	800,000	400,000	266,667	200,000	160,000	133,333	114,286
경제효과				66,667 약 7만원	106,667 약 11만원	133,333	152,381

※경제효과는 우리나라 평균 이용산차(3산차)와의 차액으로 분석함

1) 3산차→4산차 이용시 이익

$$\text{감가상각비 } 70,000 \times \text{모든두수 } 95\text{만두} = 665\text{억원}$$

2) 3산차→5산차 이용시 이익

$$\text{감가상각비 } 110,000 \times \text{모든두수 } 95\text{만두} = 1,045\text{억원}$$

(2) 모든이용산차에 따른 이유자돈생산단가 이익 분석

$$\text{이유자돈 1두 생산단가} = \left[\text{모든구입비 (고정비용)} + \left\{ \text{매산차 비용 (정액+사료)} \times \text{이용산차} \right\} \right] \div \text{총 이유자돈수}$$

$\frac{105\text{만원} + 21.4\text{만원}}{\text{총 이유자돈수}}$

↳ 모든 : 2.25kg×120일×450원 = 121,500원/산차
 자돈 : 5kg×28일×500원 = 70,000원/산차
 정액 : 7,500원×3회 = 22,500원/산차

이용산차	1	2	3	4	5	6	7
생산단가	128,700	76,200	58,700	49,950	44,700	41,200	38,700
경제효과				8,750	14,000	17,500	20,000

※ 산차마다 이유자돈 10두로 동일하게 계산
 ※ 경제효과는 우리나라 평균이용산차와의 차액으로 계산

1) 3산차→4산차 이용시 이익

$$\text{생산단가차이 } 8,750 \times \text{연간 도축두수 } 1,300\text{만두} = 1,138\text{억원}$$

2) 3산차→5산차 이용시 이익

$$\text{생산단가차이 } 14,000 \times \text{연간 도축두수 } 1,300\text{만두} = 1,820\text{억원}$$

(3) 최적마커조합 적용에 따른 경제효과 분석

Table 1-3-11. 마커조합에 따른 능력차이

Genotype	AAAAAA	GAGACC
우량allele	0	4
(n)	(18)	(13)
도태산차	4.16 (0.30)	5.18 (0.33)
생애총 이유자돈	50.53 (3.59)	61.53 (4.25)
연간생산 생존자돈	19.23 (1.19)	25.66 (1.30)

최적마커조합인 GAGACC유전자형은 5.18산차로, 우량유전자를 하나도 가지지 않은 AAAAAA 유전자형에 비해 1산차가 우수함 (4.16산차). 협력농장의 모돈규모가 1000마리라고 가정할 때, 감가상각비에서 연간 37,867,538 원의 경제효과를 예상할 수 있음 (Table 1-3-12).

Table 1-3-12. 마커조합에 따른 감가상각비 차이

유전자형	AAAAAA(불량형)	GAGACC(우량형)	차액(마리)	차액(×1000마리)
이용산차	4.16	5.18		
감가상각비 (원)	192,308	154,440	37,868	37,867,538

또한, 모돈 1000두규모인 본 농장의 모돈의 유전자형이 모두 GAGACC로 고정되어 있다면 이용산차의 증가와 이유자돈수의 증가로 이유자돈 생산비가 마리당 35,098원이 되며, 두당 차액은 3,323원으로, 1만4천두를 연간 출하하게 된다면 이유자돈생산단가에서 연간 45,468,634원의 경제효과를 예상할 수 있음. 따라서 감가상각비, 이유자돈생산단가에서만 본 농장 기준으로 약 8천3백만원의 경제효과를 볼 수 있으며, 국가적인 규모로 생각했을 때는 그 효과는 더 커질 것으로 보임.

Table 1-3-13. 마커조합에 따른 생산비 차이

	[모돈구입비 (고정비용)	{매산차비용 (정액+사료)	× 이용산차}	÷ 이유자돈	= 생산비(두당)
AAAAAA	[1050000+	{214000	× 4.16}	÷ 50.5	= 38,421
GAGACC	[1050000+	{214000	× 5.18}	÷ 61.5	= 35,098
두당 차액	3,323	→	×14,000마리	= 45,468,634	

제 2 절 모든의 산차별 유전자발현 네트워크분석을 통한 착상률 증진기술 개발

1. 모든의 산차별 차등발현 영양물질 수용체 선별

(1) 산차별 모든의 자궁내막내 수용체유전자 발현양상 대응량 분석

1) 산차별 모든의 개체군 확립 및 임신 유도

모든의 산차수 증가에 따른 산자수 감소에 대한 유전학적 연구는 국내외 지속적으로 연구가 진행되고 있지만 수정란의 착상 및 임신 관련 모체 환경과 태아의 유전적 변이에 대한 연구는 미흡함. 이에 본 세부과제에서는 수정란의 착상 및 배아 발달이 이루어지는 모든의 자궁 내막 조직 내 유전학적, 내분비학적, 후생 유전학적 연구 진행을 위해 산차별 모든 (1산차, 출산 경험이 없는 모든; 3산차, 2번의 출산 경험이 있는 모든; 6산차, 5번의 출산 경험이 있는 모든)을 그룹별 5개체씩 확보함 (Table 2-1-1).

Table 2-1-1. 산차별 동정된 모든의 샘플 표식

1산차	1-1	1-2	1-3	1-4	1-5
3산차	3-1	3-2	3-3	3-4	3-5
6산차	6-1	6-2	6-3	6-4	6-5

모든은 모두 Yorkshire 품종이 사용되었으며, 각 산차별 모든의 임신을 유도하기 위하여 발정 체크 이후 인공 수정을 실시하였으며, 인공 수정 후 23-24일째 재발정 유무를 통하여 모든의 임신을 확인하였음. 임신이 확인된 산차별 모든은 임신 28-29일째 희생하여 자궁 내막 조직을 동정함.

2) 모든 자궁 내막 조직의 total RNA library 구축

1산차, 3산차, 6산차 모두의 자궁 내막 조직 내 total RNA를 확보함. 총 3단계를 거쳐 total RNA를 추출. 1단계에서는 조직 균질기 (homogenizer)를 이용, 각 산차 모두의 자궁 내막 조직을 물리적 힘으로 파쇄함. 2단계에서는 TRIzol reagent에 담긴 파쇄된 조직에 Chloroform을 처리하고 원심분리하여 상분리 (phase separation)를 통해 RNA층을 분리함. 3단계에서는 100% isopropanol을 처리하여 total RNA를 침전시키고 70% EtOH를 처리하여 불순물을 수세함. 추출된 total RNA는 nanodrop으로 농도를 측정해 결과를 확인하였음. 105.5-289.3 μg 의 total RNA를 추출하였고, purity는 1.96-2.00으로 높은 순도를 보였음 (Table 2-1-2).

Table 2-1-2. 자궁 내막 조직의 total RNA 정량

ID	ng/ μl .Av	260/280	260/230	Yield. μg
1-1	1057.8	1.99	2.24	211.6
1-2	1270.1	1.99	2.27	254.0
1-3	1163.8	2.00	2.16	232.8
1-4	1269.4	2.00	2.22	253.9
1-5	1505.0	1.98	2.30	150.5
3-1	1032.6	1.99	2.24	206.5
3-2	1054.8	1.96	2.25	105.5
3-3	1104.9	1.97	2.28	221.0
3-4	1646.4	2.00	2.15	164.6
3-5	1708.4	2.00	2.25	170.8
6-1	1320.9	1.99	2.34	132.1
6-2	1446.4	2.00	2.28	289.3
6-3	1737.5	2.00	2.33	173.8
6-4	1080.9	1.98	2.28	216.2
6-5	1817.2	2.00	2.23	181.7

추출한 total RNA에 대해 1.2% formaldehyde agarose(FA) gel을 이용하여 전기영동을 수행한 결과 순도 높은 total RNA임을 알 수 있었음 (Figure 2-1-1).

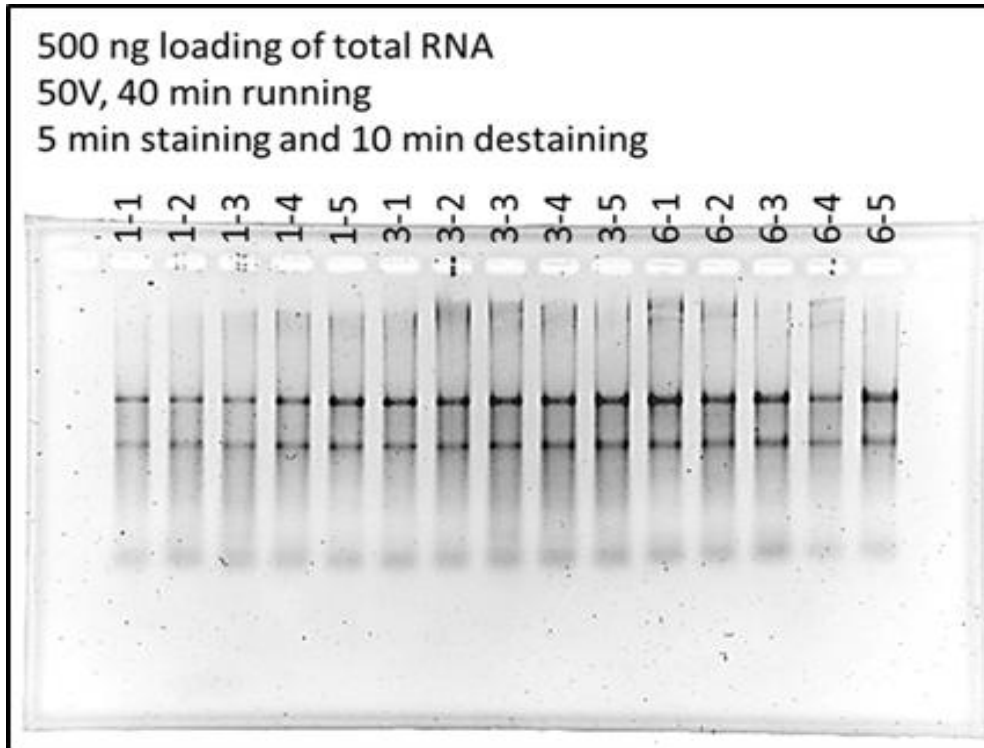


Figure 2-1-1. FA gel을 통한 RNA integrity

3) GeneChip® WT PLUS Reagent Protocol 수행

Affymetrix에서 권장하는 WT PLUS Amplification and Labeling Protocol을 따라 serial enzyme reaction을 통해 total RNA를 이용하여 array hybridization target preparation 과정을 수행함 (Figure 2-1-2). 각 산차의 모든 자궁 내막 조직에서 추출된 total RNA 100 ng을 이용하여 first-strand cDNA로 역전사 시킨 후, DNA polymerase I을 이용하여 second-strand cDNA를 만들어 ds-DNA로 제작함. ds-DNA를 주형으로 하여 IVT(in vitro transcript) 반응을 시켜 cRNA로 증폭시킴. IVT 결과 얻어진 cRNA는 bead purification 과정을 통해 순수한 상태로 얻게 되고 nanodrop 및 1.2% FAgel 전기영동을 통해 그 양과 질을 측정함. cRNA 15 μ g을 이용하여 dTTP를 dUTP로 치환시킨 ss-cDNA로 역전사 반응을 일으킴. 확보한 ss-cDNA는 bead purification 과정을 통해 순수한 상태로 얻게 되고 nanodrop으로 그 양과 질을 측정함. ss-cDNA 5.5 μ g에 UDG 및 APE1 enzyme을 이용하여 fragmentation 반응을 일으킴. Fragmented ss-cDNA는 TdT와 DNA labeling reagent를 이용하여 biotin labeling이 되고 각 과정이 정상적으로 수행되었는지에 대해 2% agarose gel에서 gel shift assay를 수행하여 확인함. Gel shift assay를 통해 정상으로 판별된 샘플은 Porcine Gene 1.0 ST Array에 주입되어 hybridization에 사용함.

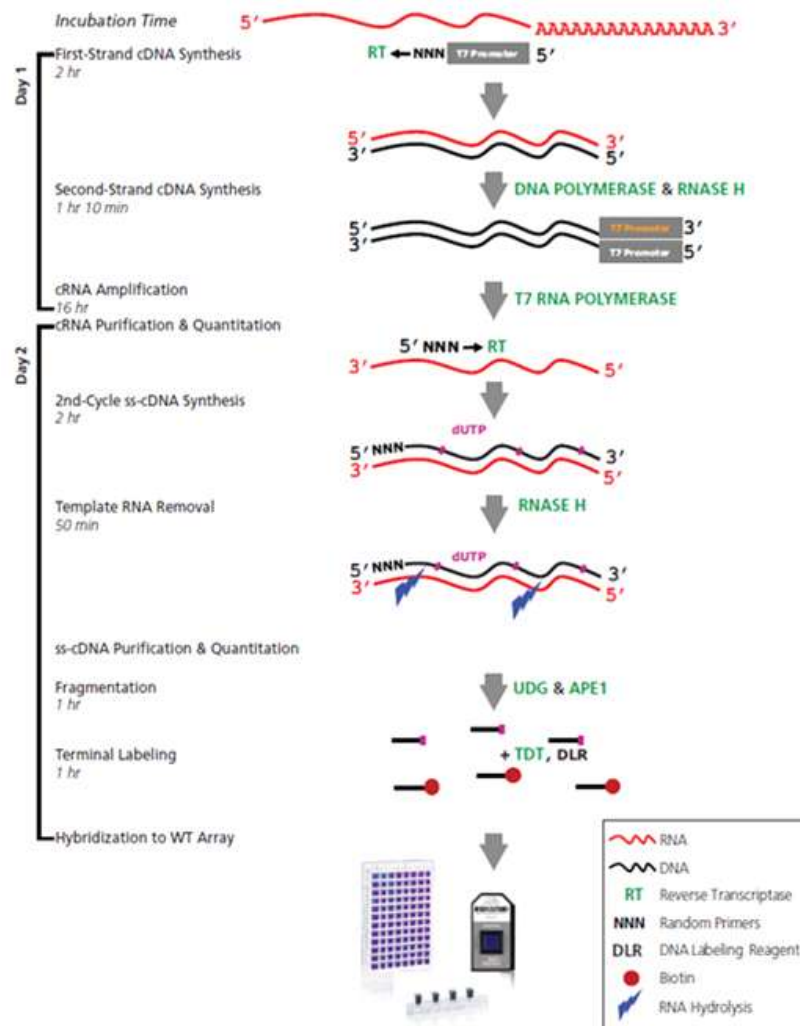


Figure 2-1-2. GeneChip WT PLUS Reagent Kit Protocol

Total RNA 100 ng을 사용하여 Affymetrix WT PLUS Amplification을 실시한 결과 cRNA 30.4-45.5 μg 을 얻어냈음 (약 300배 증폭됨, Figure 2-1-3).

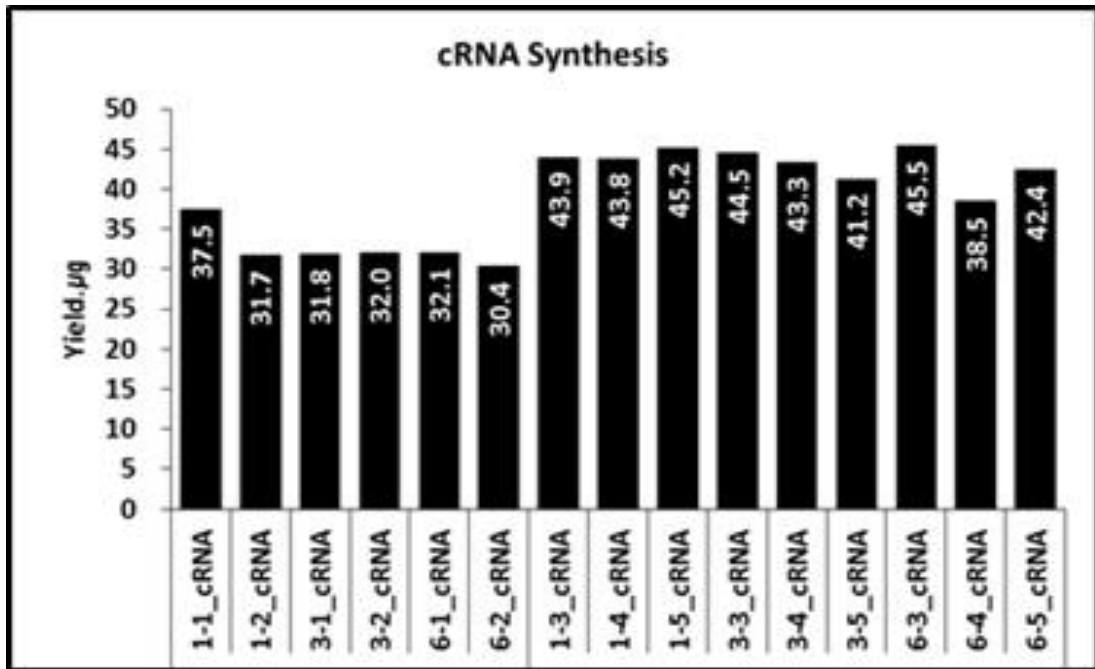


Figure 2-1-3. IVT 반응으로부터 산출된 cRNA의 농도

15 μg 의 cRNA를 이용하여 single strand-cDNA(ss-cDNA)를 얻은 결과 15.1-17.1 μg 을 확보함(Figure 2-1-4).

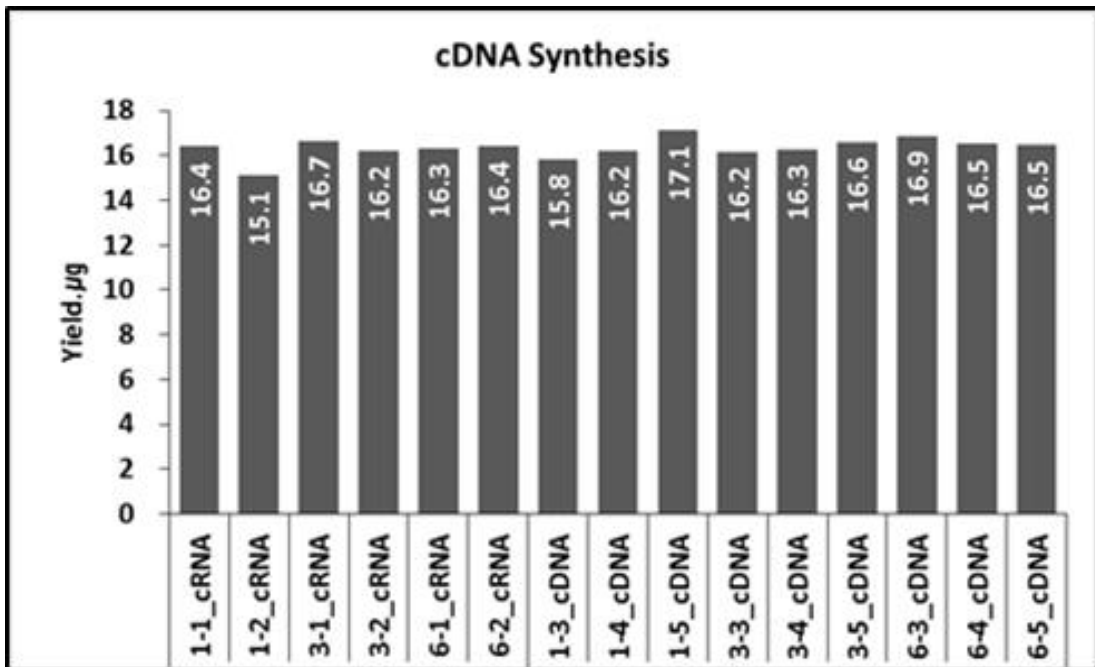


Figure 2-1-4. ss-cDNA 산출물의 농도

5.5 μg 의 ss-cDNA로부터 Affymetrix Labeling Protocol을 이용해 fragmented and biotin-labeled ss-cDNA를 생산하였음. 생산된 fragmented and biotin-labeled ss-cDNA는 NeutrAvidin과 반응시킨 뒤 2% agarose gel에 전기영동 하는 Gel-shift assay를 통해 시료를 체크한 결과 모든 시료가 양호한 상태임을 확인하였음 (Figure 2-1-5).

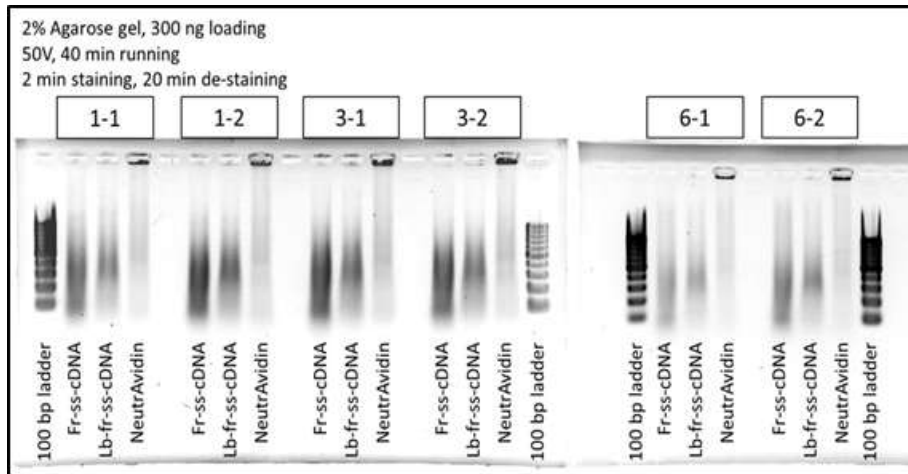


Figure 2-1-5. Gel-shift assay

준비된 시료는 GeneChip® Hybridization Oven 640을 이용하여 array hybridization에 사용하였음.

4) Fluidics Protocol 수행 및 Array scan

Fluidics를 이용한 array wash and stain protocol은 Porcine Gene 1.0 ST array의 library file을 필요로 함. Affymetrix® GeneChip® Command Console (AGCC) Portal에 통제되는 Library file의 FS_0002 protocol에 따른 array wash and stain protocol이 끝난 array는 GeneChip® Scanner 3000을 이용하여 스캔 과정을 수행했음 (Figure 2-1-6).

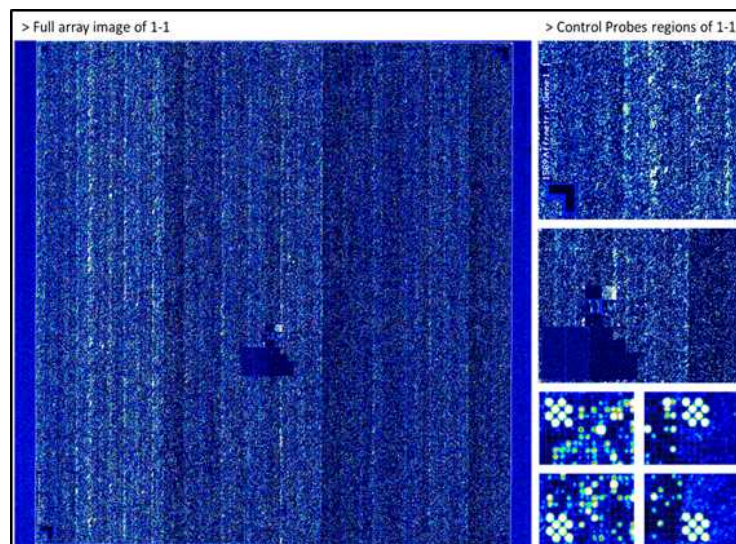


Figure 2-1-6. Array scan 이미지

5) Array Image QC 및 transcriptome DB 구축

Scan 결과 생성된 각 array image는 Affymetrix® GeneChip® Expression Console에서 DAT파일, CEL파일, CHP파일 순으로 변환하고 이를 이용하여 결과 평가(QC)를 실시함. Affymetrix® GeneChip® Expression Console에서 CHP파일을 이용해 전체 signal 분포가 RMA에 의해 정상적으로 normalization 된 것을 확인함 (Figure 2-1-7).

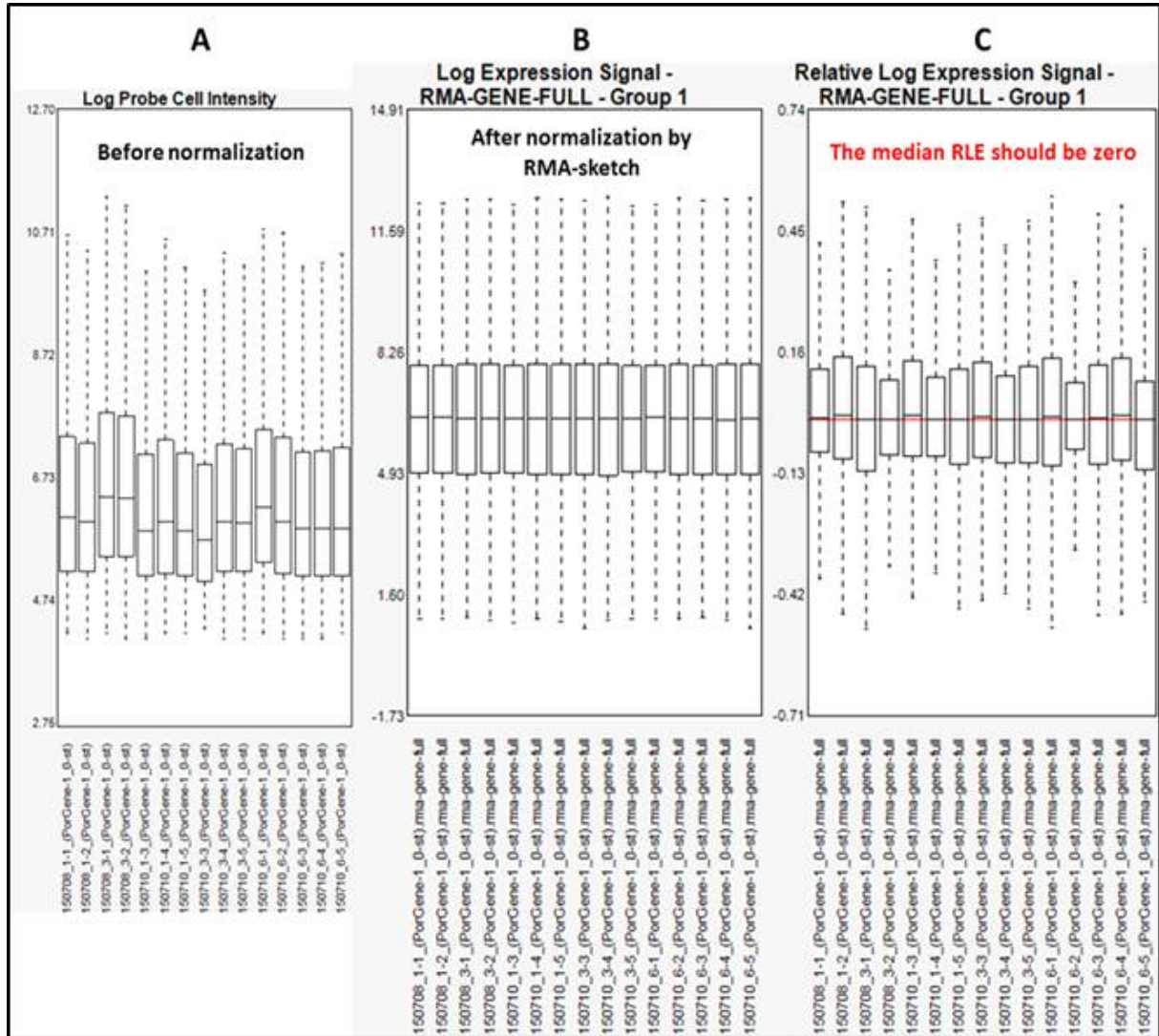


Figure 2-1-7. Array QC 결과: 전체 probeset 신호 분포.

(A) Normalization 이전 probe cell의 intensity

(B) RMA-sketch에 의한 normalization 이후 유전자 레벨 시그널 intensity

(C) Normalization 이후 유전자 레벨의 상대적 log 발현 값

Array 내부에 심어진 positive and negative control probeset signal을 확인한 결과 예상되는 정상 범주의 값을 확인함 (Figure 2-1-8).

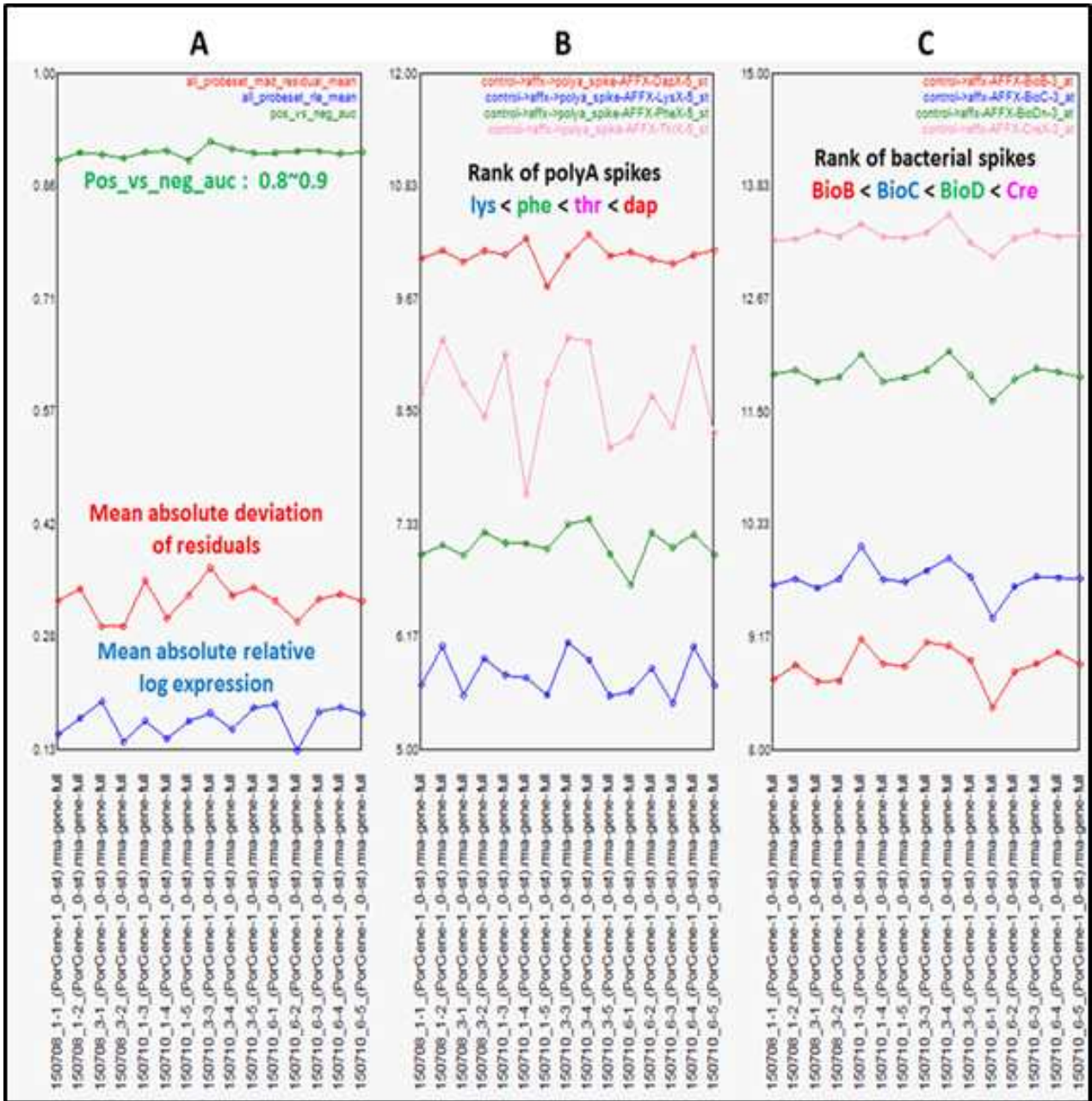


Figure 2-1-8. Array QC result: 내부 컨트롤의 probeset 신호.

(A) 각 array의 Pos vs neg auc 값

(B) polyA spikes, lys, phe, thr and dap의 신호 강도 순위

(C) Bacterial spikes, BioB, BioC, BioD and Cre의 신호 강도 순위

최종적으로 모든 array가 QC에 정상적으로 통과하였으며 이들을 이용하여 산차별 모든 자궁 내막 조직의 전사체(transcriptome) 데이터베이스를 구축 완료함.

(2) 생물정보학적 분석을 통한 모체분비인자 및 태아 발달, 태반형성관련 수용체선발

1) 산차수 증가에 따른 자궁 내막 조직 내 유용 유전자 선별

산차별 자궁 내막 조직을 사용하여 실시한 대용량 유전체 분석을 통해 구축된 모든 자궁 내막 조직 전사체 데이터베이스에서 유용유전자를 선별하기 위해 각 산차별 유전자 발현도에 대해 분산분석(ANOVA)를 실시하였음. 그 결과 산차별 모든의 자궁 내막 조직에서 유의적인 발현차이를 나타내는 유전자는 총 1,442개로 나타남 (p -value<0.05). 통계적으로 유의하게 변한 유전자 1,442개 중 1산차 대비 fold change가 가장 극명하게 증가한 유전자를 선별함 (Table 2-1-3).

Table 2-1-3. 산차수 증가에 따라 자궁 내막 조직 내 증가되는 유전자

Probeset_ID	Gene Symbol	Gene Description	Fold Change_3	Fold Change_6	P-value
15195767	SERPINB2	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	2.2	3.2	0.017
15249930	CYP24A1	cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1	1.1	2.7	0.021
15326817	FMO1	flavin containing monooxygenase 1	2.4	1.8	0.031
15335816	FIGF	c-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)	1.6	2.3	0.004
15229543	STC1	stanniocalcin 1	1.1	2.1	0.044
15203973	CPB2	carboxypeptidase B2 (plasma)	1.9	1.7	0.035
15337712	CHRDL1	chordin-like 1	1.9	1.5	0.029
15244423	FGF10	fibroblast growth factor 10	1.7	1.9	0.049
15263581	C3	complement component 3	1.3	1.8	0.013
15233305	DKK1	dickkopf 1 homolog (Xenopus laevis)	1.8	1.6	0.001
15290726	LOC100628231	sodium-dependent neutral amino acid transporter B(0)AT2-like	-1.1	1.8	0.011
15320429	KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	1.6	1.8	0.014
15331506	AGR2	anterior gradient 2 homolog (Xenopus laevis)	1.6	1.7	0.035
15247956	SLC7A2	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2	1.2	1.7	0.025
15254726	LOC100515469	olfactory receptor 1009-like	1.1	1.6	0.007
15289482	A2M	alpha-2-macroglobulin	1.6	1.6	0.002
15308688	C4	complement C4	1.5	1.6	0.039
15217345	NLGN1	neuroligin 1	1.5	1.6	0.010

산차수가 증가하는 모든의 자궁내막에서 감소하는 발현을 보인 유전자들을 대상으로 clustering 분석하여 heat map으로 도식화하였음 (Figure 2-1-9).

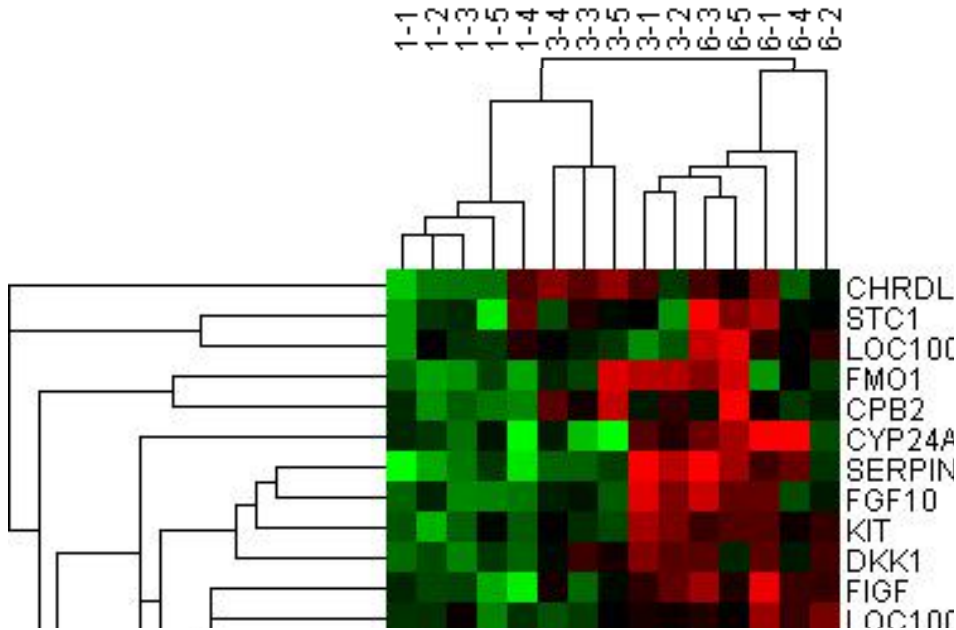


Figure 2-1-9. 산차수 증가에 따라 자궁내막에서 증가되는 유전자의 clustering과 heat map

또한 산차수가 증가함에 따라 1산차 대비 fold change가 극명하게 감소한 유전자를 추가 선별하였음 (Table 2-1-4).

Table 2-1-4. 산차수 증가에 따라 자궁 내막 조직 내 감소하는 유전자

Probeset_ID	Gene Symbol	Gene Description	Fold Change_3	Fold Change_6	P-value
15251143	AOAH	acyloxyacyl hydrolase (neutrophil)	-2.5	-3.1	0.005
15254513	PGA	pepsinogen A	-1.8	-2.2	0.018
15220905	ATP2B2	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 2	-1.4	-1.9	0.022
15279419	SELE	selectin E	-1.2	-1.9	0.019
15257012	LOC100522302	olfactory receptor 7E24-like	-1.2	-1.8	0.004
15249953	GCNT7	glucosaminyl (N-acetyl) transferase family member 7	-1.8	-1.6	0.036
15242268	KIF1A	kinesin family member 1A	-1.7	-1.7	0.005
15312214	LOC100514909	olfactory receptor 4F15-like	-1.3	-1.7	0.026
15319558	LOC100516985	olfactory receptor 4L1-like	-1.6	-1.7	0.012

15188576	ESR2	estrogen receptor 2 (ER beta)	-1.4	-1.7	0.038
15264754	LOC100525034	olfactory receptor 7A17-like	-1.7	-1.4	0.035
15270688	NKL	NK-lysin	-1.2	-1.6	0.004
15288202	LOC100517586	11-cis retinol dehydrogenase-like	-1.6	-1.5	0.003
15226627	ADAMTS14	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 14	-1.6	-1.3	0.001
15294636	LOC100517469	olfactory receptor 8S1-like	-1.6	-1.4	0.034
15269931	UTXG1F1A015	chromosomes plus unplaced and unlocalized scaffolds	-2.7	-3.1	0.002
15345109	UTMH6DK3015	---	-1.8	-1.6	0.001
15341049	UTM63Z7H014	---	-1.2	-1.8	0.031
15269931	UTXG1F1A015	chromosomes plus unplaced and unlocalized scaffolds	-2.7	-3.1	0.002

산차수가 증가하는 모든의 자궁내막에서 감소하는 발현을 보인 유전자들을 대상으로 clustering 분석하여 heat map으로 도식화하였음 (Figure 2-1-10).

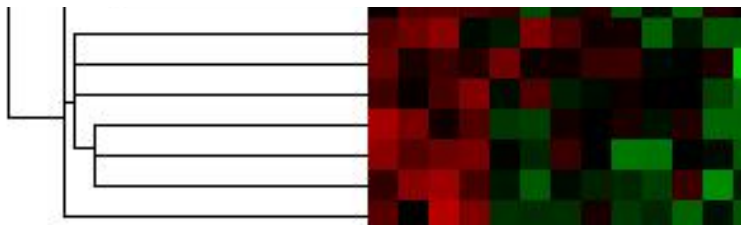


Figure 2-1-10. 산차수 증가에 따라 자궁내막에서 감소하는 유전자의 clustering과 heat map

(3) 산차별 주요 선발수용체 발현유무 및 후성유전학적 변화 분석

1) 자궁 내막 조직 내 후보 유전자 발현 검증을 위한 cDNA 합성

산차별 모돈의 자궁 내막 조직으로부터 추출한 total RNA를 사용하여 reverse transcriptase, oligodT, random hexamer를 이용하여 cDNA를 합성하였음. 합성된 cDNA는 Nanodrop으로 농도와 순도를 측정하였으며 이 후 진행될 quantitative RT-PCR 또는 cloning PCR을 위해 60ng/μl로 희석하여 -20℃에 보관하였음 (Table 2-1-5).

Table 2-1-5. 산차별 모돈의 자궁 내막 조직으로부터 합성된 cDNA 농도 및 순도

Sample ID	Ratio		Conc.(ng/μl)
	260 / 280	260 / 230	
1-1	1.69	2.29	60.83
1-2	1.71	2.32	62.22
1-3	1.72	2.30	61.99
1-4	1.69	2.31	59.82
1-5	1.69	2.16	61.41
3-1	1.71	2.30	60.88
3-2	1.68	2.31	61.56
3-3	1.70	2.28	61.69
3-4	1.69	2.01	61.72
3-5	1.68	2.16	60.59
6-1	1.72	2.30	60.24
6-2	1.68	2.24	61.56
6-3	1.70	2.20	61.66
6-4	1.72	2.00	61.72
6-5	1.68	2.18	60.82

합성된 cDNA는 RT-PCR을 위해 디자인 된 GAPDH 프라이머 (Foward, ACC CAG AAG ACT GTG GAT GG; Reverse, ACC AGG AAA TGA GCT TGA CG)를 이용하여 RT-PCR을 수행하여 House keeping gene의 발현을 통해 cDNA합성 결과를 재확인하였음. RT-PCR의 산출물은 브로민화 에티듐(ethidium bromide, EtBr)을 포함하는 1% agarose gel로 전기영동하여 확인하였음 (Figure 2-1-11).



Figure 2-1-11. 모돈의 자궁 내막 조직으로부터 합성한 cDNA에서 GAPDH의 발현

Gel 확인 결과 합성한 cDNA는 농도 및 순도와 마찬가지로 추후 실험을 진행하는데 이상이 없을 것으로 사료하고 본 cDNA를 바탕으로 quantitative RT-PCR 및 cloning PCR을 수행하였음.

2) 모든 자궁 내막 조직 내 수태의 초기 착상 유지를 위한 유전자의 mRNA 발현 분석

모든의 산차가 증가함에 따라 감소하는 산자수에 대한 자궁 내막 조직의 생리학적, 분자생물학적 기작을 규명하기 위해 먼저 본 연구진의 선행연구를 통해 임신 초기 착상과 관련 연관 성장인자 및 수용체인 *EGFR*, *IGFR*, *VEGF*를 선별하였음. 이 외에도 돼지의 착상에 있어 중요한 수용체로서 보고되고 있는 *ADIPOR2* (adiponectin receptor 2), *LRP2* (low density lipoprotein-related protein 2), *RXRA* (retinoid X receptor alpha), *RXRB* (retinoid X receptor beta)를 추가적으로 선별하여 산차에 따른 임신 초기 모든의 자궁 내막 조직에서 그 발현을 quantitative RT-PCR을 통해 확인하였음. 프라이머는 Primer 3 프로그램을 이용하여 약 80-150 bp로 디자인하였으며, SYBR green (Sigma-Aldrich)을 이용한 real-time PCR 검출 시스템 (Applied Biosystems)을 실시함. 각 유전자 및 GAPDH 유전자의 분석은 세 번에 걸쳐서 반복 수행되었으며 발현량을 확인하기 위해 표준 곡선 및 Ct 값을 GAPDH 유전자의 발현량으로 표준화 시켜 분석함. PCR 조건: 94°C, 3분 (변성 단계) 및 40 사이클 (94°C, 20초-변성; 60°C, 40초-어닐링; 72°C, 1분-연장하는 것으로 구성된 사이클)을 실시하는 단계. 온도가 10초 당 0.5°C의 속도로 55°C에서 95°C까지 증가시켜 연속적인 형광 측정을 획득함으로써 용해곡선 프로그램 분석을 실시함. Ct 값에 의해 얻어진 용해곡선에 따라 quantitative RT-PCR 산물을 동정하였고 상대적인 유전자 발현양상을 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법에 따라 분석함. 그 결과, 6가지 수용체 및 혈관내피세포성장인자는 모두 모든의 산차가 증가함에 따라 자궁 내막 조직에서 점진적으로 감소하는 양상을 나타내었음 (Figure 2-1-13).

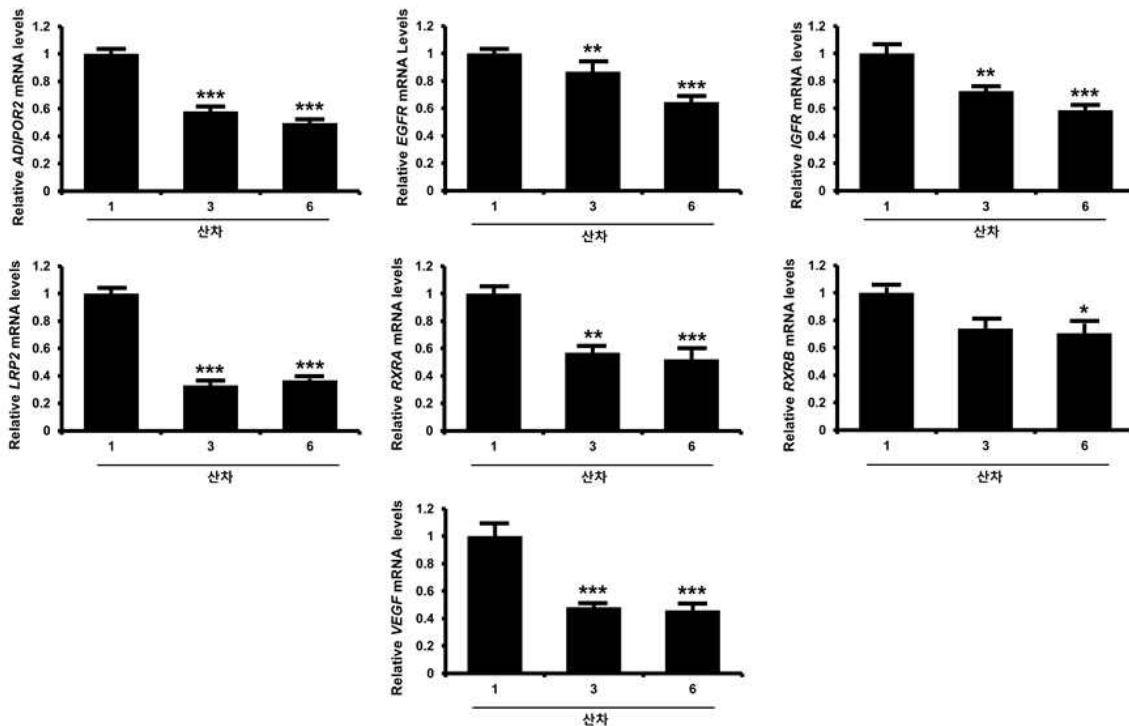


Figure 2-1-13. 자궁 내막 내 임신 초기 수태의 착상 관련 인자들의 산차별 mRNA 발현 변화

이를 통하여 본 연구진은 7가지 유전자가 모든의 산차수 증가에 따른 산자수 감소와 연관성이 있을 것으로 예상하고 조직학적 분석을 진행하였음.

3) 산차수 증가에 따른 자궁 내막의 조직학적 변화 분석

산차수의 증가에 따른 모든 자궁 내막의 조직학적 변화를 분석하기 위해 파라핀-임베드 된 조직을 5 μm 로 절단하여 슬라이드에 올려 헤마토실린과 에오신 염색을 수행함. Xylene으로 파라핀을 제거하고 100, 95, 70% 알코올을 이용하여 수화 과정을 수행 후, 증류수를 통해 잔여 알코올을 제거하고 헤마토실린(haematoxylin)으로 4분간 염색함. 이 후, 흐르는 증류수에 염색된 슬라이드를 8분간 수세하고 에오신 (eosin) 염색을 1분간 수행함. 염색된 조직을 영구적으로 보관하기 위해 알코올을 이용한 탈수과정을 거쳐 마운팅미디엄을 사용하여 커버글라스로 조직을 덮어줌. 각 자궁 내막 조직 내 내강 상피세포(luminal epithelium)와 선상피세포(glandular epithelium)가 두드러지게 발달되어 있었으며 혈관 또한 자궁 내막 조직 내 발달을 이루며 분포되어 있었음. 하지만 산차별 모든의 자궁 내막 조직 내 특이적인 변화는 확인되지 않았음 (Figure 2-1-14).

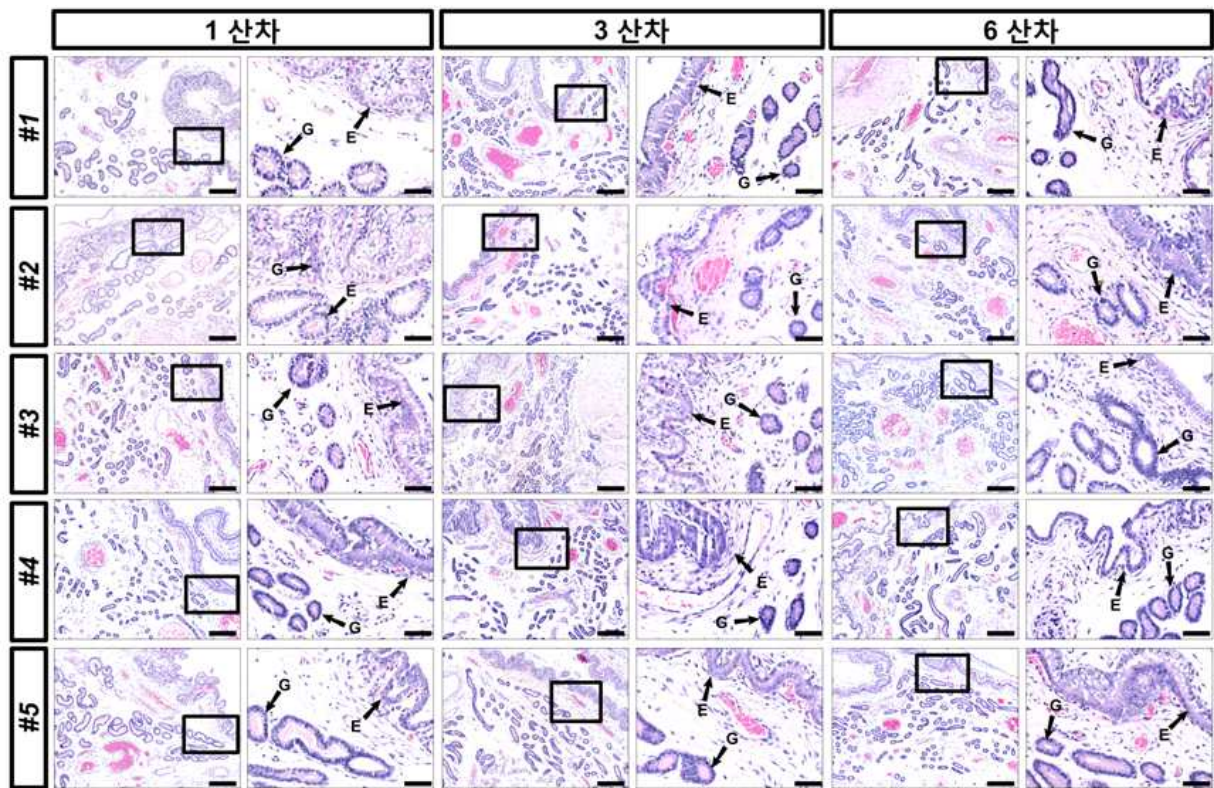


Figure 2-1-14. 헤마토실린-에오신 염색(H&E staining)을 통한 모든 자궁 내막의 조직학적 분석

4) *In situ* hybridization을 통한 후보 유전자의 모든 자궁 내막 조직 내 발현 위치 분석

앞서 quantitative RT-PCR을 통해 산차별 모돈의 자궁 내막 조직에서 발현이 확인된 7가지 유전자(*ADIPOR2*, *EGFR*, *IGFR*, *LRP2*, *RXRA*, *RXRB*, *VEGF*)가 자궁 내막 조직상에서 각 유전자의 mRNA 발현 위치를 검증하기 위하여 *in situ* hybridization 분석을 진행하였음. 산차별 자궁 내막 조직 내 선발 유전자의 mRNA 발현 위치를 검출하기 위하여 cRNA hybridization probe를 제작함. 모돈의 자궁 내막 조직으로부터 얻은 cDNA를 각 유전자들의 상보적인 방향의 프라이머를 이용하여 증폭함. 증폭된 단편들을 1% agarose gel에 로딩 후 100V로 30분간 전기영동을 실시하여 분리함. 각 유전자들의 DNA를 Wizard SV gel 및 PCR Clean-up 시스템 (Promega)으로 분리 정제함. TOPO TA cloning dual vector (Invitrogen)에 유전자 삽입 후 plasmid DNA를 추출하여 sequencing을 진행함. 각 서열에 대한 재조합 플라스미드를 선형화 (linearization) 하여 T7, SP6 polymerase에 의해 디옥시게닌(DIG)이 labeling 된 anti-sense, sense cRNA 프로브를 합성함. 파라핀에 포매된 산차별 모돈의 자궁 내막 조직을 5 μ m로 박절하여 슬라이드를 형성함. Xylene으로 슬라이드 위 조직 주위의 파라핀을 제거하고 100, 95, 70% 알코올로 수화시킴. 1X PBS로 잔여 알코올을 제거하고 10 mM의 glycine이 포함된 1X PBS에 10분간 인큐베이션 함. 1% Triton X-100과 20분 동안 반응시킨 후, 1X PBS로 두 번에 걸쳐서 세척함. 이 후, proteinase K가 첨가된 TE buffer를 처리하고 4% paraformaldehyde를 녹인 1X PBS로 조직을 고정함. 고정 된 조직을 50% 포르말라이드 및 4XSSC (standard saline citrate)를 포함하는 전-혼성화 (prehybridization) 혼합물과 상온에서 15분 이상 반응시킴. 전-혼성화 후, 절편들을 40% 포르말라이드 및 4XSSC, 10% dextran sodium sulfate salt, 100 μ g/ml fish sperm DNA, 100 μ g/ml yeast tRNA 및 타겟 유전자에 대해 DIG-labeled RNA probe를 포함하는 혼성화 (hybridization) 혼합물과 42 $^{\circ}$ C에서 18시간 동안 습도 유지 챔버에서 반응시킴. 혼성화 이후, 슬라이드를 포르말라이드 및 SSC를 포함하는 일련의 용액들로 엄격 조건 (stringency) 하에서 세척함. 조직을 Alkaline phosphatase conjugated sheep-anti-DIG 항체 (Roche)와 하룻밤 동안 반응 시킨 후, 시그널을 0.4 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (Sigma), 0.4 mM nitrobluetetrazolium (Sigma) 및 2 mM levamisole (Sigma)을 포함하는 시각화 용액으로 검출함. 이를 통해 모든 자궁 내막 조직에서 성장인자 및 영양물질 수용체 등 유용 유전자들의 발현 위치를 확인하였음. *In vivo* 실험을 통해 각 유전자의 발현은 처음 임신한 모돈 즉, 1산차 모돈의 자궁 내막 조직의 내강상피세포(endometrial luminal epithelium, E)와 선상피세포 (glandular epithelium, G)에서 강한 발현을 나타내었음 (Figure 2-3-4). 하지만 선별된 모든 착상 관련 유전자는 산차가 증가함에 따라 자궁 내막의 내강상피세포와 선상피세포에서 발현이 점차 감소하는 경향을 나타내었음. 본 결과는 후보 유전자의 mRNA 발현뿐만 아니라 mRNA 발현의 조직학적 분석을 통하여 선발 유전자가 산차가 증가함에 따른 산자수 감소에 주요한 영향을 미칠 것으로 예상 할 수 있으며 추후 각 유전자의 기능 분석을 위한 연구가 요구됨.

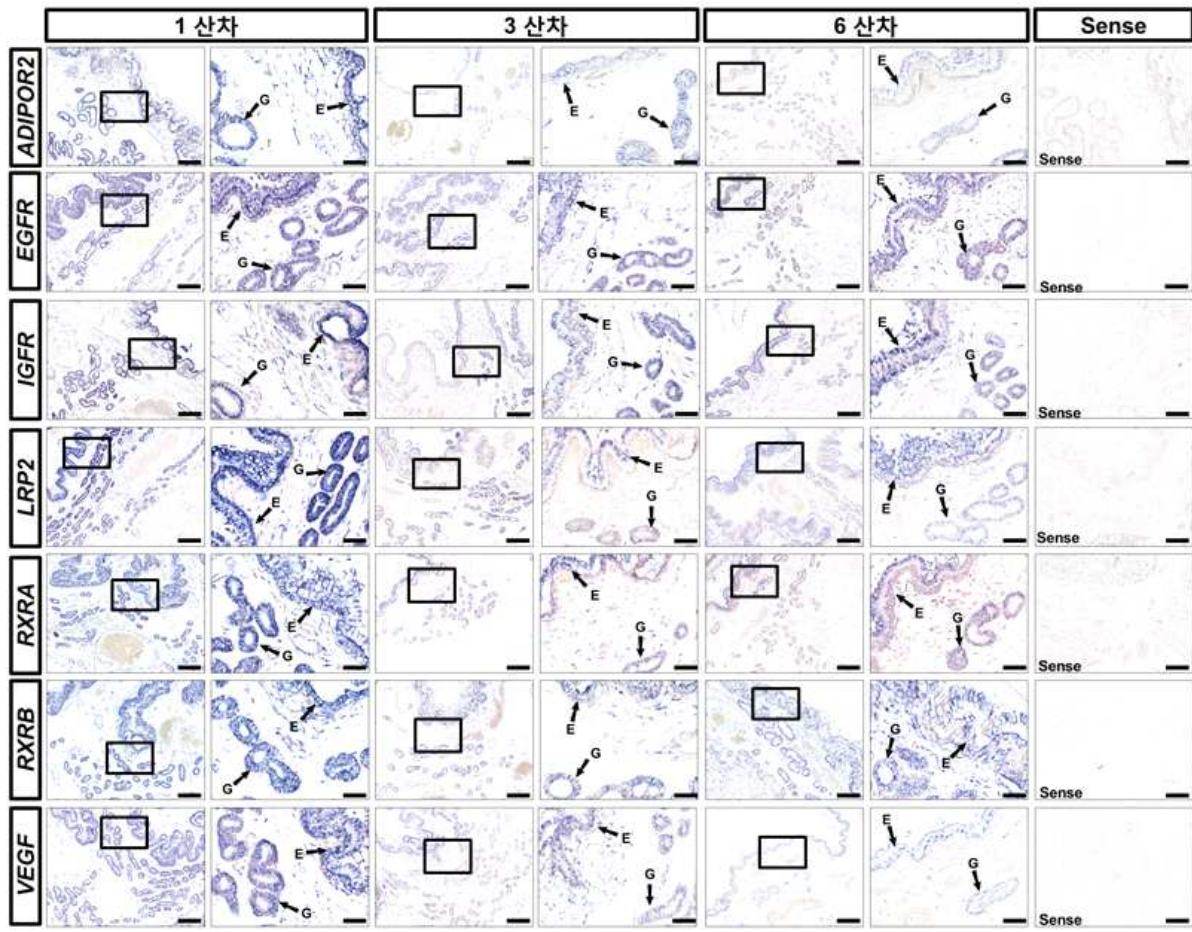


Figure 2-1-15. 산차별 모든의 자궁 내막 조직에서 선발 유전자의 발현 검증

5) 산차수 증가에 따라 유의적인 발현 차이를 보이는 microRNA의 선별

1산차 모돈의 자궁 내막 조직과 비교하여 산차가 증가함에 따라 통계적으로 유의적인 발현 차이를 보이는 microRNA를 선별함 (Table 2-1-6).

Table 2-1-6. 산차별 모돈의 자궁 내막 조직에서 microRNA의 변화

Gene Symbol	Gene Description	Fold Change_3	Fold Change_6	P-value
MIR365-2	microRNAmir-365-2	-1.39609	-1.97346	0.00455
MIR1296	microRNAmir-1296	1.22981	-1.20884	0.00525
MIR107	microRNAmir-107	1.42390	-1.20828	0.01463
MIR152	microRNAmir-152	-1.30696	-2.49724	0.02144
MIR17	microRNAmir-17	-1.23238	-1.56241	0.02245
MIR345	microRNAmir-345	-1.00505	-2.32796	0.02532
MIR345	microRNAmir-345	-1.00505	-2.32796	0.02532
MIR23B	microRNAmir-23b	-1.02012	-1.21112	0.03179
MIR885	microRNAmir-885	-1.31645	-3.72177	0.04714
MIR199A-2	microRNAmir-199a-2	-1.23557	-2.03861	0.04724

선별된 microRNA가 산차가 증가함에 따라 자궁 내막 조직에서 발현 차이를 나타내는 것을 바탕으로 자궁 내막의 발달과 태아의 착상 및 발달에 주요한 후생유전학적 조절 인자로서 역할을 할 것으로 예상되며 이를 규명하기 위해서는 차년도 추가적인 연구가 요구됨. 확립된 microRNA 리스트를 바탕으로 microRNA 발현도를 clustering 분석하여 heat map으로 도식화하였음 (Figure 2-1-16).

Figure 2-1-16. 산차별 자궁 내막 조직 내 microRNA heat map

2. 착상률 증진을 위한 유용물질 발굴 및 세포수준 검증

(1) 고산차 모돈의 자궁내막 세포에서 선발된 수용체의 기능성 분석

1) 모돈의 임신기·비임신기 자궁내막에서 선발된 수용체 발현 분석

모돈의 임신 초기에 자궁내막은 태아에 대한 수용력과 착상을 위하여 급격한 발달과 증식이 일어나게 되고, 선발된 수용체의 발현 변화를 확인하기 위하여 임신 초기와 비임신기의 자궁내막 조직으로부터 합성한 cDNA를 대상으로 quantitative RT-PCR을 수행하였음. 프라이머는 Primer 3 프로그램을 이용하여 약 80-150 bp로 디자인하였으며, SYBR green (Sigma-Aldrich)을 이용한 real-time PCR 검출 시스템 (Applied Biosystems)을 실시함. 각 유전자 및 GAPDH 유전자의 분석은 세 번에 걸쳐서 반복 수행되었으며 발현량을 확인하기 위해 표준 곡선 및 Ct 값을 GAPDH 유전자의 발현량으로 표준화 시켜 분석함. PCR 조건: 94°C, 3분 (변성 단계) 및 40 사이클 (94°C, 20초-변성; 60°C, 40초-어닐링; 72°C, 1분-연장하는 것으로 구성된 사이클)을 실시하는 단계. 온도가 10초 당 0.5°C의 속도로 55°C에서 95°C까지 증가시켜 연속적인 형광 측정을 획득함으로써 용해곡선 프로그램 분석을 실시함. Ct 값에 의해 얻어진 용해곡선에 따라 quantitative RT-PCR 산물을 동정하였고 상대적인 유전자 발현양상을 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법에 따라 분석함. 그 결과 아디포넥틴 리셉터 (ADIPOR1, 2), 에프린 리셉터 (EPHA1, 2, 4, 7), 섬유아세포 증식인자 수용체 (FGFR1, 2), 트로포마이오신 수용체 키나아제B (NTRK2)의 mRNA 발현이 착상이 발생하는 임신 14~21일, 30일에서 모돈의 자궁내막에서 증가하는 것을 확인하였음 (Figure 2-2-1).

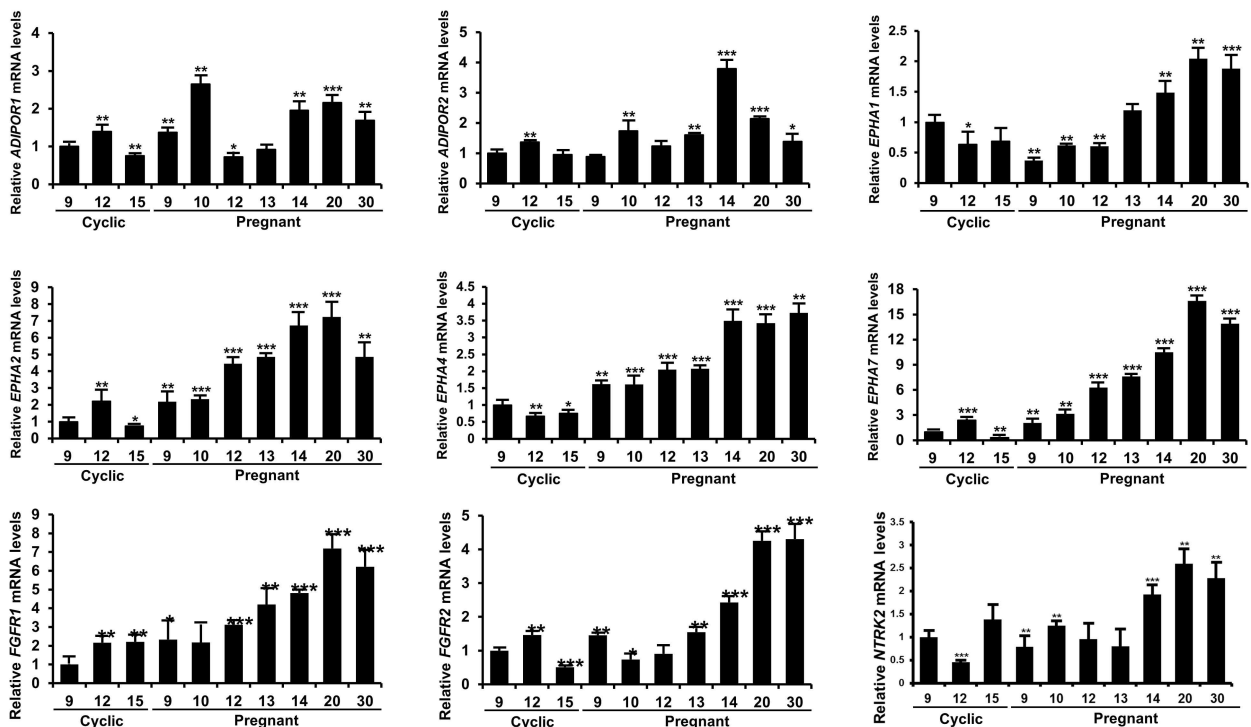


Figure 2-2-1. 자궁내막에서 영양물질 수용체의 발현 분석

이를 통하여 본 연구진은 9가지 유전자가 모돈의 자궁내막에서 임신초기에 자궁내막의 발달과 착상에 연관성이 있을 것으로 예상하고 조직학적 분석을 진행하였음. 임신기·비임신기 기간에 따른 모돈 자궁 내막에서 선발된 수용체의 조직학적 발현 변화를 분석하기 위해 앞서 quantitative RT-PCR을 통해 임신 초기 모돈의 자궁 내막 조직에서 유의적 발현 차이가 확인된 9가지 유전자 *ADIPOR1, 2, EPHA1, 2, 4, 7, FGFR1, 2, NTRK2*를 대상으로 *in situ* hybridization 분석을 진행하였음. 비임신기와 임신초기 기간별 자궁 내막 조직 내 선발 수용체의 mRNA 발현 위치를 검출하기 위하여 cRNA hybridization probe를 제작함. 모돈의 자궁 내막 조직으로부터 얻은 cDNA를 각 유전자들의 상보적인 방향의 프라이머를 이용하여 증폭함. 증폭된 단편들을 1% agarose gel에 로딩 후 100V로 30분간 전기영동을 실시하여 분리함. 각 유전자들의 DNA를 Wizard SV gel 및 PCR Clean-up 시스템 (Promega)으로 분리 정제함. TOPO TA cloning dual vector (Invitrogen)에 유전자 삽입 후 plasmid DNA를 추출하여 sequencing을 진행함. 각 서열에 대한 재조합 플라스미드를 선형화 (linearization) 하여 T7, SP6 polymerase에 의해 디옥시게닌(DIG)이 labeling 된 anti-sense, sense cRNA 프로브를 합성함. 파라핀에 포매된 산차별 모돈의 자궁 내막 조직을 5 μ m로 박절하여 슬라이드를 형성함. Xylene으로 슬라이드 위 조직 주위의 파라핀을 제거하고 100, 95, 70% 알코올로 수화시킴. 1X PBS로 잔여 알코올을 제거하고 10 mM의 glycine이 포함된 1X PBS에 10분간 인큐베이션 함. 1% Triton X-100과 20분 동안 반응시킨 후, 1×PBS로 두 번에 걸쳐서 세척함. 이 후, proteinase K가 첨가된 TE buffer를 처리하고 4% paraformaldehyde를 녹인 1×PBS로 조직을 고정함. 고정 된 조직을 50% 포르말마이드 및 4×SSC (standard saline citrate)를 포함하는 전-혼성화 (prehybridization) 혼합물과 상온에서 15분 이상 반응시킴. 전-혼성화 후, 절편들을 40% 포르말마이드 및 4×SSC, 10% dextran sodium sulfate salt, 100 μ g/ml fish sperm DNA, 100 μ g/ml yeast tRNA 및 타겟 유전자에 대해 DIG-labeled RNA probe를 포함하는 혼성화 (hybridization) 혼합물과 42°C에서 18시간 동안 습도 유지 챔버에서 반응시킴. 혼성화 이후, 슬라이드를 포르말마이드 및 SSC를 포함하는 일련의 용액들로 엄격 조건 (stringency) 하에서 세척함. 조직을 Alkaline phosphatase conjugated sheep-anti-DIG 항체 (Roche)와 하룻밤 동안 반응 시킨 후, 시그널을 0.4 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (Sigma), 0.4 mM nitrobluetetrazolium (Sigma) 및 2 mM levamisole (Sigma)을 포함하는 시각화 용액으로 검출함. 이를 통해 모돈 자궁 내막 조직에서 선발된 수용체 유전자 *ADIPOR1, 2, EPHA1, 2, 4, 7, FGFR1, 2, NTRK2*의 mRNA 발현이 임신초기 즉, 착상이 일어나는 14일~21일과 30일에서 자궁 내막 조직의 내강상피세포(endometrial luminal epithelium, LE)와 선상피세포 (glandular epithelium, GE)에서 강한 발현을 나타내었음 (Figure 2-2-2). 본 결과는 선발된 수용체 유전자의 mRNA 발현뿐만 아니라 mRNA 발현의 조직학적 분석을 통하여 선발 수용체 유전자가 임신초기 자궁내막의 발달과 태아 착상에 주요한 영향을 미칠 것으로 예상 할 수 있으며 추후 각 유전자의 기능 분석을 위한 연구가 요구됨.

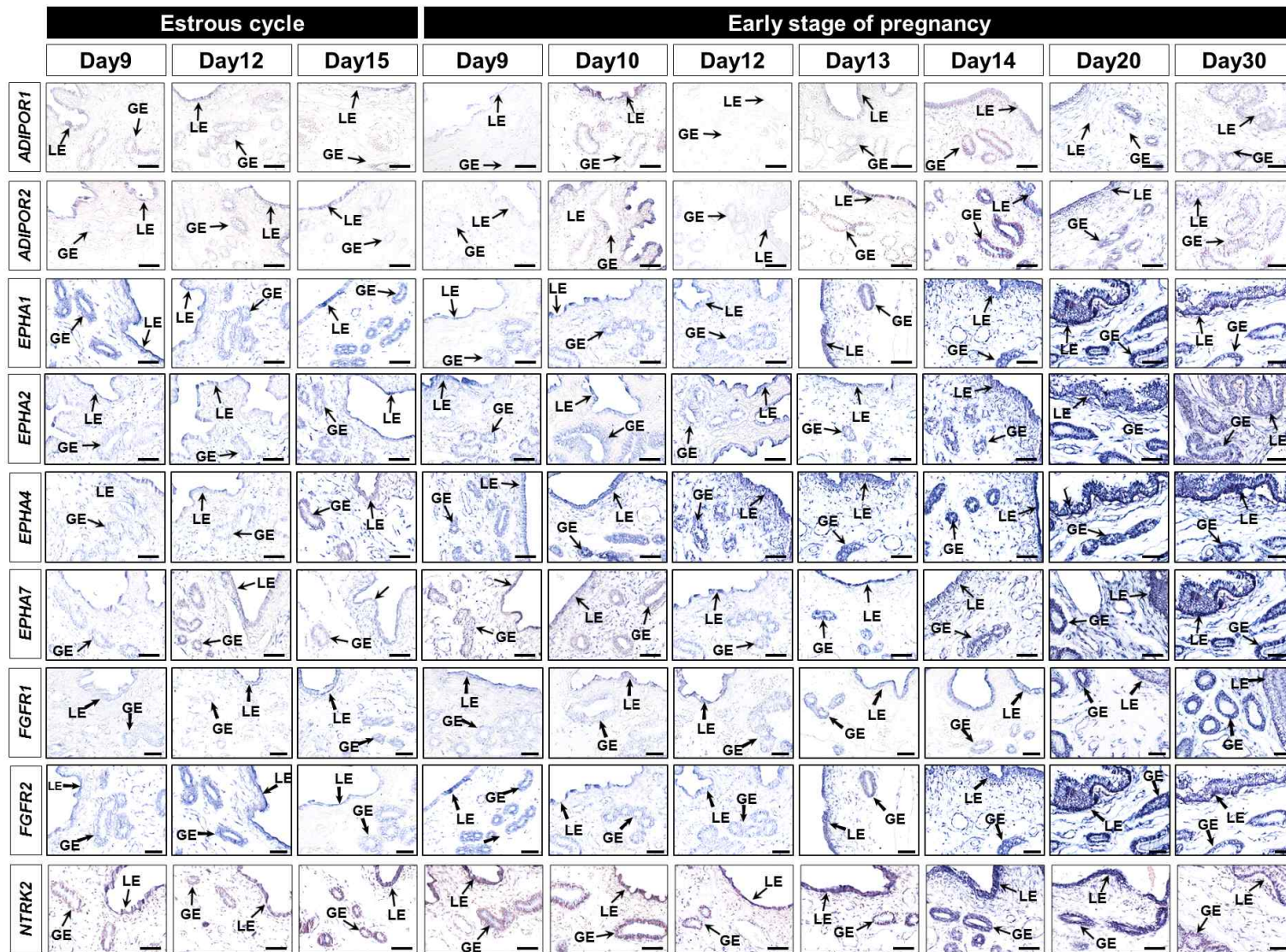


Figure 2-2-2. 모든 자궁내막 조직에서 수용체 mRNA 발현 위치 확인

2) 선발된 수용체의 리간드에 의한 기능성 확인

선발된 수용체를 활성화하기 위하여 해당 수용체에 대하여 직접적으로 작용하는 각각의 리간드를 자궁내막 세포에 처리한 다음 리간드-수용체 상호작용에 의해 발생하는 기능성을 분석하였음. 우선 아디포넥틴 리셉터 (ADIPOR1, 2)의 리간드로 재조합 아디포넥틴 (1065-AP, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)을 사용하였으며, 에프린 리셉터(EPHA1, 2, 4, 7)의 리간드로 재조합 에프린 (6417-A1, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)을 사용하였고, 섬유아세포 증식인자 수용체 (FGFR1, 2)의 리간드로는 재조합 섬유아세포 증식인자2 (233-FB/CF, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하였음. 96-well plate에 자궁내막세포를 3×10^3 cells/well로 분주하여 배양한 다음 serum-free DME/F12 1:1 medium으로 24시간 동안 배양하여 starvation을 진행한 다음 유용물질을 처리하고 48시간을 배양하여 10 μ M BrdU를 첨가해 2시간 배양한 뒤 cell Proliferation ELISA, BrdU kit (Cat No. 11647229001, Roche)를 사용하여 세포 증식 정도를 확인한 결과, 아디포넥틴, 에프린, 섬유아세포 증식인자2를 농도 의존적으로 처리하였을 때 자궁내막 세포의 증식도 함께 증가하는 것을 확인하였음 (Figure 2-2-3).

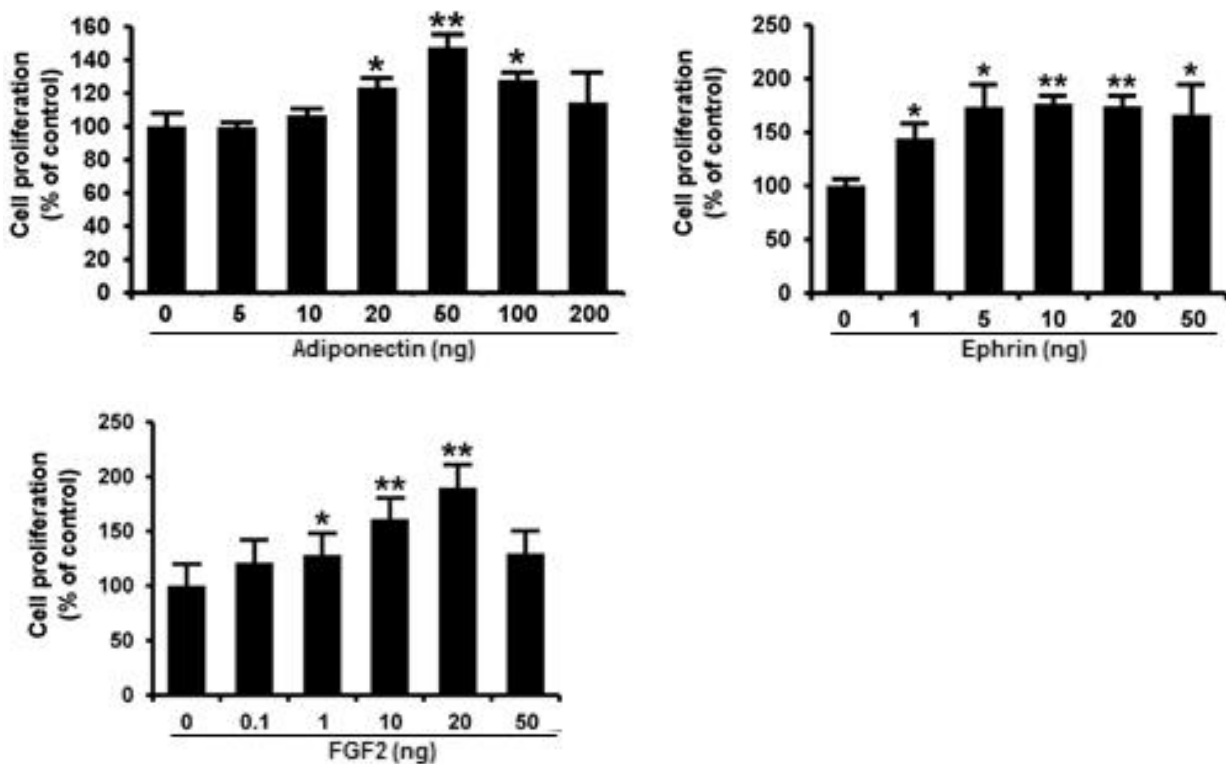


Figure 2-2-3. 선발된 수용체의 리간드에 의한 자궁내막 세포 증식 효과 확인

선발된 수용체의 리간드에 의해 자궁내막 세포의 증식이 증가하는 것을 확인하였으므로, 추가적으로 세포내에서 DNA중합효소의 δ 활성을 촉진하는 복제인자인 Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)의 발현에도 변화를 미치는지 확인하기 위하여 PCNA 항체를 이용한 Immunofluorescence assay를 수행하였으며, 자궁내막세포 (3×10^4 cells/300 μ l)를 confocal dish(catalog number : 100350 , SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 다음 serum-free DME/F12 1:1medium에서 24시간 배양하여 starvation과정을 거친 후, 각각의 선발된 리셉터의 리간드인 아디포넥틴, 에프린, 섬유아세포 증식인자2와 함께 24시간 배양한 다음 메탄올을 이용하여 세포를 고정한 뒤 PCNA 항체를 1:100으로 희석하여 상온에서 1시간 배양하고 0.1% BSA-PBS로 상온에서 10분간 3차례 배양해주고, goat anti-mouse IgG Alexa 488 (catalog number: A11017, Invitrogen)을 1:200으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 배양하고 다시 0.1% BSA-PBS로 상온에서 10분간 3차례 배양해주고 DAPI도 1:1000으로 배양한 다음, LSM710 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) 공초점현미경으로 세포를 관찰한 결과, 아디포넥틴, 에프린, 섬유아세포 증식인자2가 자궁내막세포의 핵내에서 PCNA의 발현을 증가시키는 것을 확인하였음 (Figure 2-2-4).

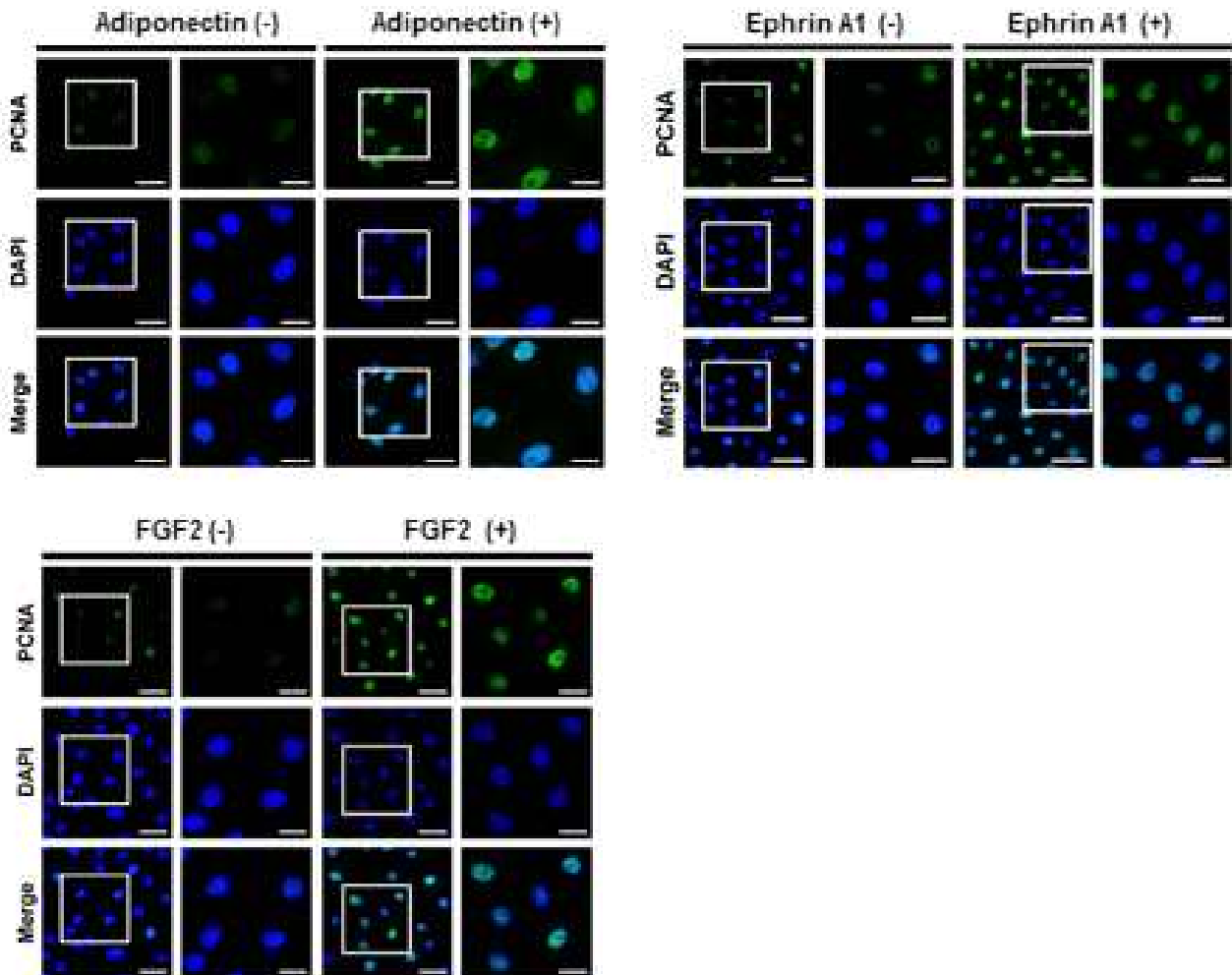
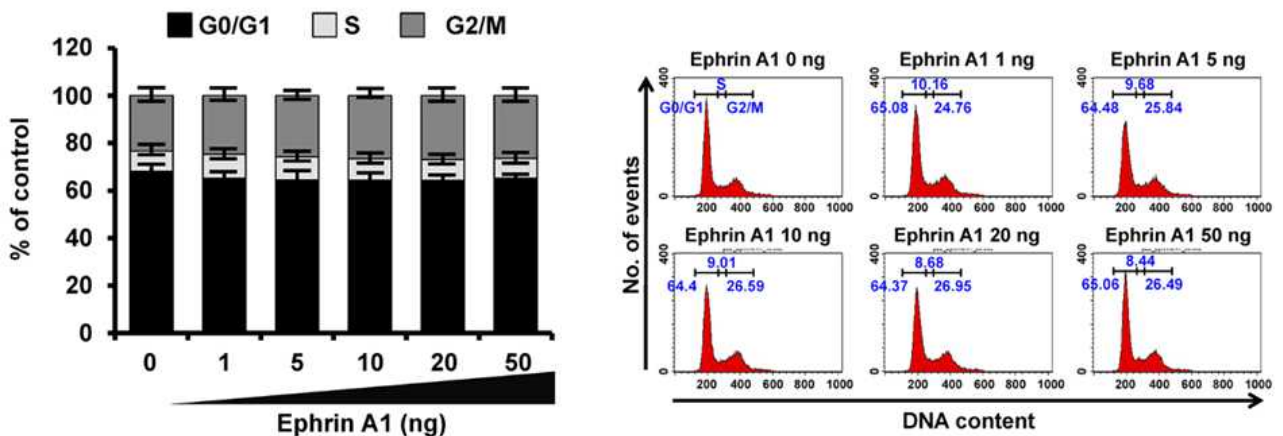


Figure 2-2-4. 선발된 수용체의 리간드에 의한 자궁내막세포 내의 PCNA 발현의 변화

선발된 수용체의 리간드에 의해 자궁내막 세포내 복제인자 발현의 변화를 확인하였으므로 전체적인 세포주기의 변화를 확인하기 위하여 cell cycle assay를 수행하였음. 자궁내막세포를 6-well plate에 배양하여 serum-free DME/F12 1:1 medium으로 24시간동안 starvation을 진행하고 농도 의존적으로 리간드를 처리하여 48시간 동안 배양한 뒤 세포를 원심분리 하여 모아주고 0.1% BSA-PBS로 세포를 두 차례 씻어주고 70% 에탄올로 4°C에서 24시간동안 세포 고정을 해준 다음 세포를 원심분리 하여 모아주고 0.1% BSA-PBS로 세포를 두 차례 씻어주고 RNase A (Sigma-Aldrich)가 100 µg/mL 포함 된 propidium iodide (PI; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)으로 빛이 들어오지 않는 조건에서 30분 동안 염색한 뒤 Cytometer (BD Biosciences)를 이용하여 형광을 측정함. 0ng - 20ng의 에프린 처리에서 자궁내막세포주기의 G₀/G₁기가 감소하였으며 G₂/M기는 점차적으로 증가하는 것이 확인되었음 (Figure 2-2-5. A). 섬유아세포 증식인자2를 처리한 경우 자궁내막세포의 세포주기에서 0ng - 20 ng의 처리에서 G₁과 S기에서는 큰 변화가 없었지만, 50 ng의 처리에서는 G₂/M기가 증가하였음. 반면 섬유아세포 성장인자2가 처리되지 않은 자궁내막세포의 G₁기와 S기는 감소함을 확인하였음. 이러한 결과들은 에프린과 섬유아세포 증식인자2가 자궁내막세포의 세포주기를 조절하여 세포의 증식을 증가시킨다는 것을 확인하였음 (Figure 2-2-5. B).

(A) 에프린이 처리된 자궁 내막 세포의 세포 주기 변화



(B) 에프린이 처리된 자궁 내막 세포의 세포 주기 변화

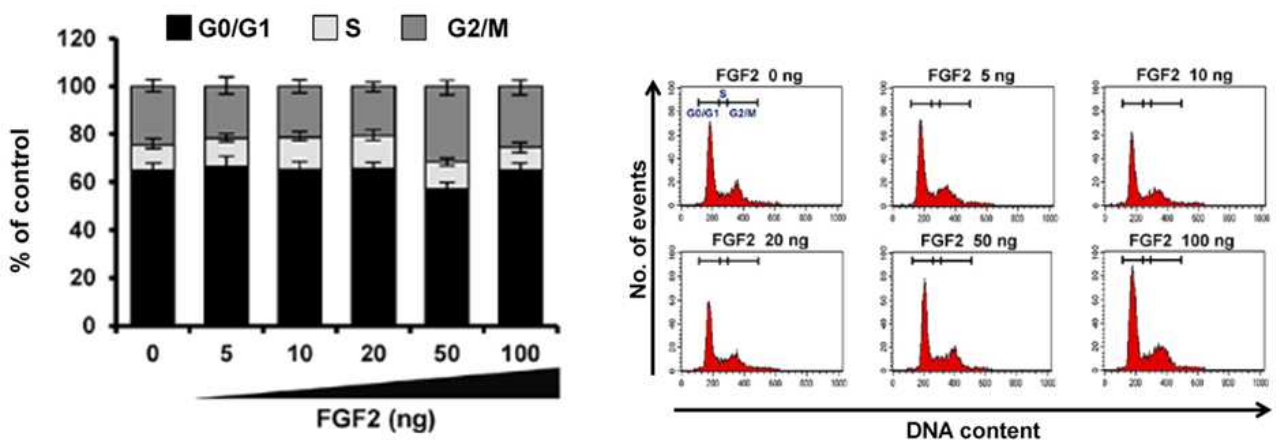


Figure 2-2-5. 선발된 수용체의 리간드에 의한 자궁내막세포의 세포 주기 변화 (A-B)

선발된 수용체의 리간드가 자궁내막세포의 증식뿐만 아니라 세포 이주에도 관여하는지 확인하기 위하여 Ibbidi migration culture dish(Ibbidi, Munich, Germany)를 사용하였으며, 2×10^5 cells/ml의 자궁내막 세포를 70 μ l씩 각 well에 분주하여 16시간 동안 배양하고 serum-free DME/F12 1:1 medium으로 24시간 동안 starvation을 시켜준 다음 부착되어 있는 culture inserts를 제거하여 500 μ m의 세포가 없는 공간을 확보하여 유용물질이 첨가된 medium으로 배양해 세포 이주를 유도하고 500 μ m의 공간에 세포가 얼마나 이주하였는지 광학현미경 DM3000 (Leica)으로 관찰 및 촬영한 결과, 에프린, 섬유아세포 증식인자2를 처리한 자궁내막 세포에서 세포 이주 능력이 증가하는 것을 확인하였음. 자궁내막세포에 에프린을 처리하였을 때 330% 증가한 세포 이주 능력을 확인할 수 있었으며, 섬유아세포 성장인자2 처리에서는 220%의 세포 이주 능력이 향상됨을 확인하였음 (Figure 2-2-6).

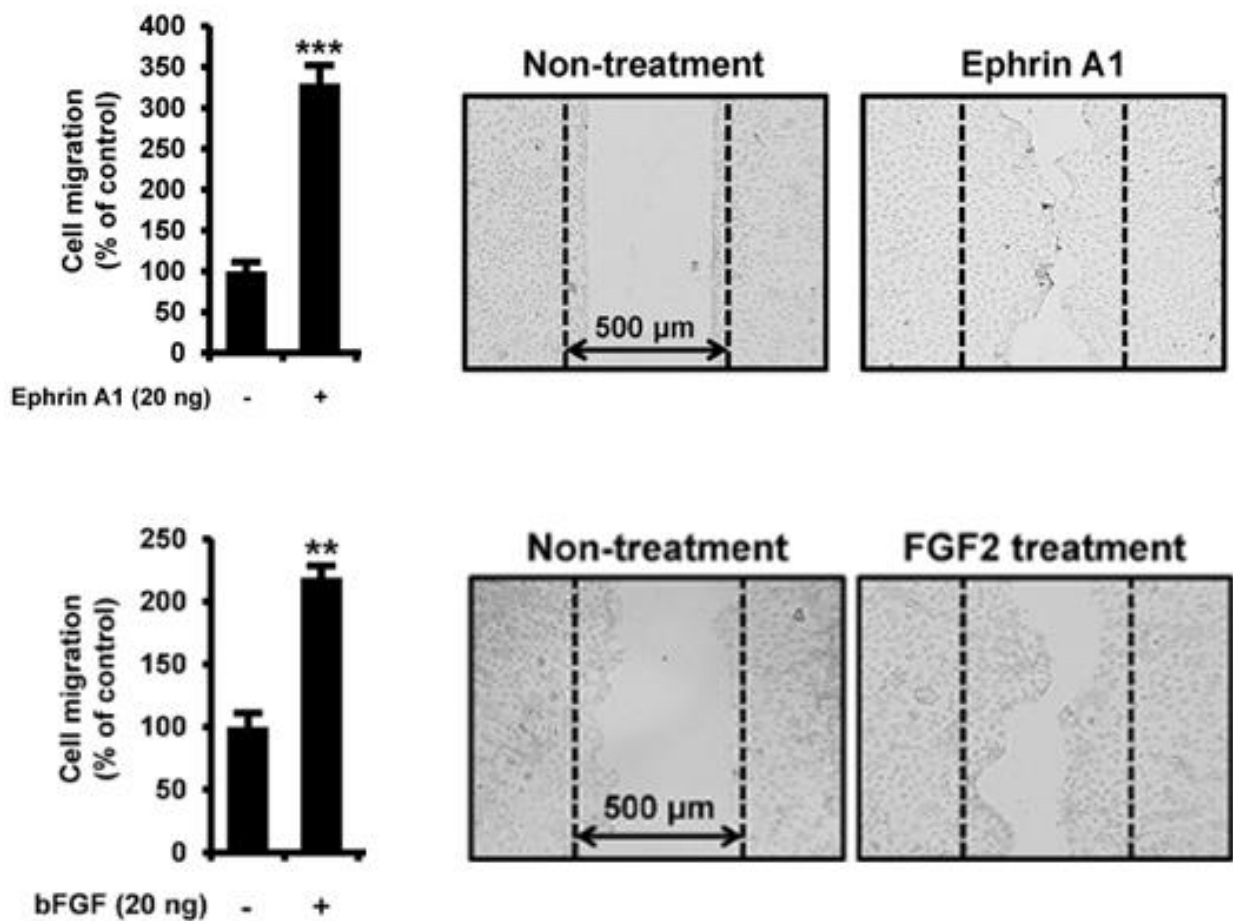
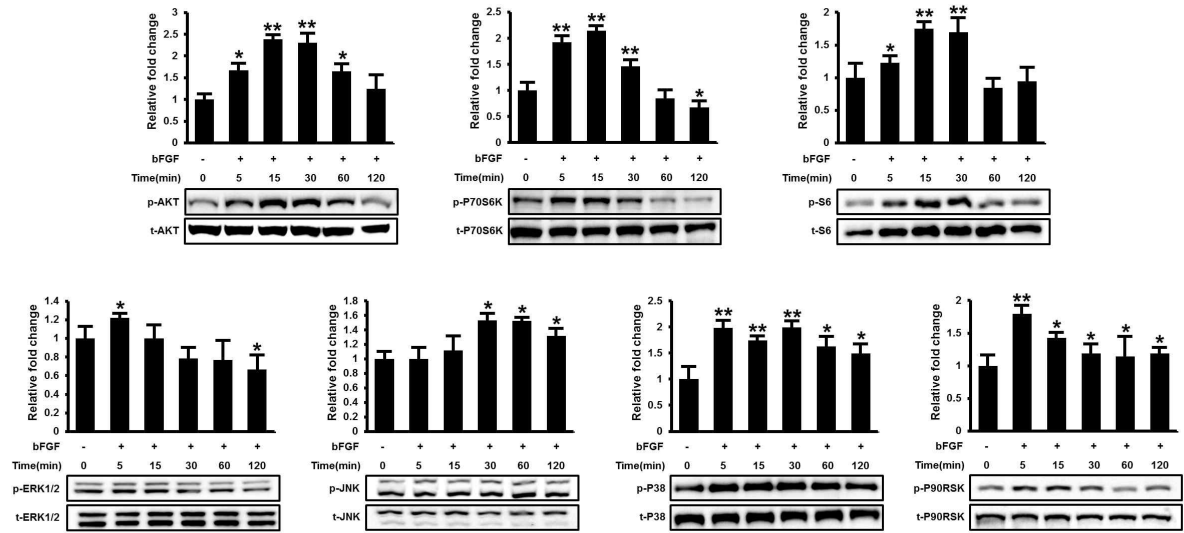


Figure 2-2-6. 선발된 수용체의 리간드에 의한 자궁내막세포의 세포 이주 능력 변화

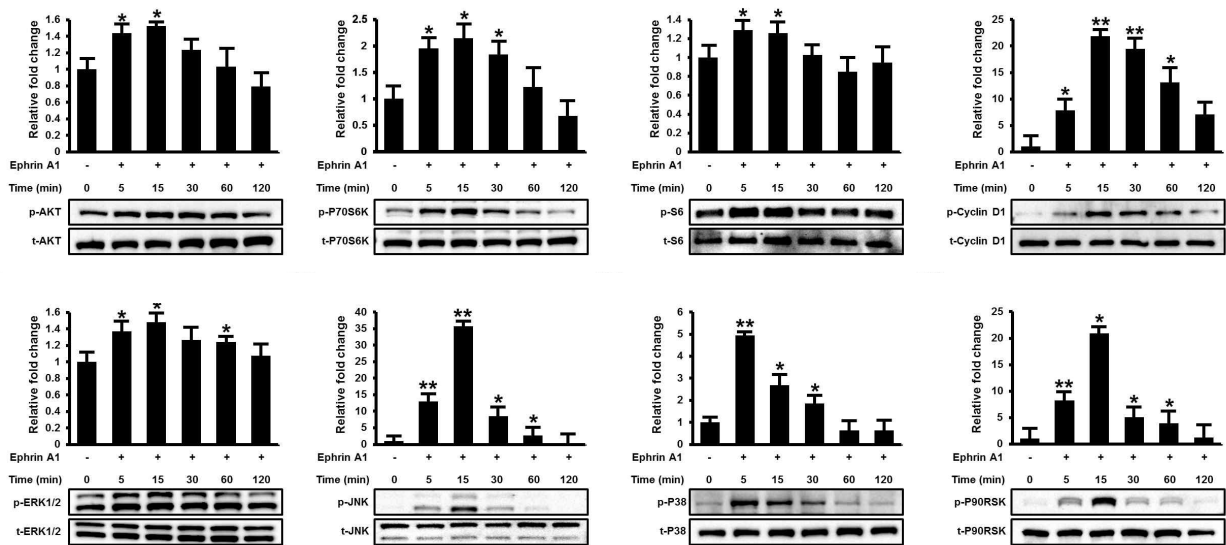
3) 선발된 수용체의 리간드에 의한 분자적 기전 분석

선발된 수용체의 리간드에 의한 자궁내막 세포의 증식과 이주 능력의 증가가 구체적으로 어떠한 리간드-수용체 상호작용에 의한 기전인지를 분석하기 위하여 western blot 분석을 수행하였음. 자궁내막세포에서 선발된 수용체의 리간드를 시간 의존적으로 처리하여 배양한 뒤 자궁내막 세포에서 단백질을 추출하여 bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 농도 측정 및 정량을 수행하고, 95°C에서 변성 및 10% SDS/PAGE gel를 이용한 전기영동으로 단백질을 kDa별로 나누고 nitrocellulose에 옮겨준 1차 항체를 4°C에서 16시간 동안 붙여준 다음, 2차 항체를 상온에서 1시간 동안 붙여준 뒤, chemiluminescence detection (SuperSignal West Pico, Pierce, Rockford, IL, USA)으로 luminol 발색을 유도하여 ChemiDoc EQ system 장비로 측정함. Quantity One software (Bio-Rad)를 이용해 발색의 강도로 정량화를 수행함. 면역반응성의 항체들은 goat anti-rabbit polyclonal 항체를 이용하여 phospho-단백질과 total-단백질을 1:1000으로 희석하여 관찰하였으며, total-단백질로 정규화를 수행하였음. 모든 항체들은 Cell Signaling Technology 제품이며 3반복 실험을 수행한 결과, 자궁내막세포에서 phospho-AKT는 아디포넥틴 처리 후 60분 까지 1.5배 정도 증가하였다가 120분에서 감소하였음. phospho-P70S6K는 아디포넥틴 처리 후 15분 까지 2.6배까지 증가하였다가 120분까지 점차적으로 감소하는 것을 확인하였음. phospho-S6는 아디포넥틴 처리 후 5분에서 2배까지 증가하였다가 120분까지 점차적으로 감소하였음. phospho-ERK1/2는 5분에서 1.4배까지 증가하였다가 30분까지 점차적으로 감소하였음. phospho-JNK는 5분에서 4.2배까지 증가하였다가 120분까지 점차적으로 감소하였음. phospho-P38은 아디포넥틴 처리이후 5분에서 4.2배까지 증가하였다가 120분까지 점차적으로 감소하였음 (Figure 2-2-7. A). 또한 자궁 내막세포에 에프린을 처리하였을 때, phospho-AKT가 15분에서 1.5배까지 점차적으로 증가하였다가 120분까지 점차적으로 감소하였음. phospho-P70S6K는 15분에서 2.1배까지 점차적으로 증가하였다가 120분까지 점차적으로 감소하였음. phospho-S6는 5분에서 1.25배까지 증가하였다가 60분까지 점차적으로 감소하였음. phospho-cyclin D1은 15분에서 22배까지 점차적으로 증가하였다가 120분까지 점차적으로 감소하였음. phospho-ERK1/2는 15분에서 1.4배까지 증가하였다가 120분까지 점차적으로 감소하였음. phospho-JNK는 15분에서 34배까지 증가하였다가 120분까지 점차적으로 감소하였음. phospho-P38은 5분에서 5배까지 증가하였다가 120분까지 점차적으로 감소하였음. phospho-P90RSK는 15분에서 21배까지 증가하였다가 120분까지 점차적으로 감소하였음(Figure 2-2-7. B). 자궁내막세포에 섬유아세포 성장인자2를 시간 의존적으로 처리한 결과, phospho-AKT는 15분에서 2.4배까지 증가하였다가 120분까지 점차적으로 감소하였음. phospho-P70S6K는 15분에서 2.1배까지 증가하였다가 120분까지 점차적으로 감소하였음. phospho-S6는 15분에서 1.7배까지 증가하였다가 60분까지 점차적으로 감소하였음. phospho-ERK1/2는 5분에서 1.2배까지 증가하였다가 120분까지 점차적으로 감소하였음. phospho-JNK는 30분에서 1.5배까지 증가하였다가 120분까지 점차적으로 감소하였음. phospho-P38은 5분에서 2배까지 증가하였다가 120분까지 점차적으로 감소하였음. phospho-P90RSK는 5분에서 1.8배까지 증가하였다가 120분까지 점차적으로 감소하였음(Figure 2-2-7. C). 이러한 실험 결과들을 통하여 선발된 수용체의 리간드에 의해 자궁내막세포의 세포증식과 관련된 신호전달 체계인 PI3K/MAPK의 신호 전달 인자들이 활성화되는 것을 확인하였음 (Figure 2-2-7).

(A) 아디포넥틴이 처리된 자궁 내막 세포의 신호 전달 분자 변화



(B) 에프린1이 처리된 자궁 내막 세포의 신호 전달 분자 변화



(C) 섬유아세포 증식인자2가 처리된 자궁 내막 세포의 신호 전달 분자 변화

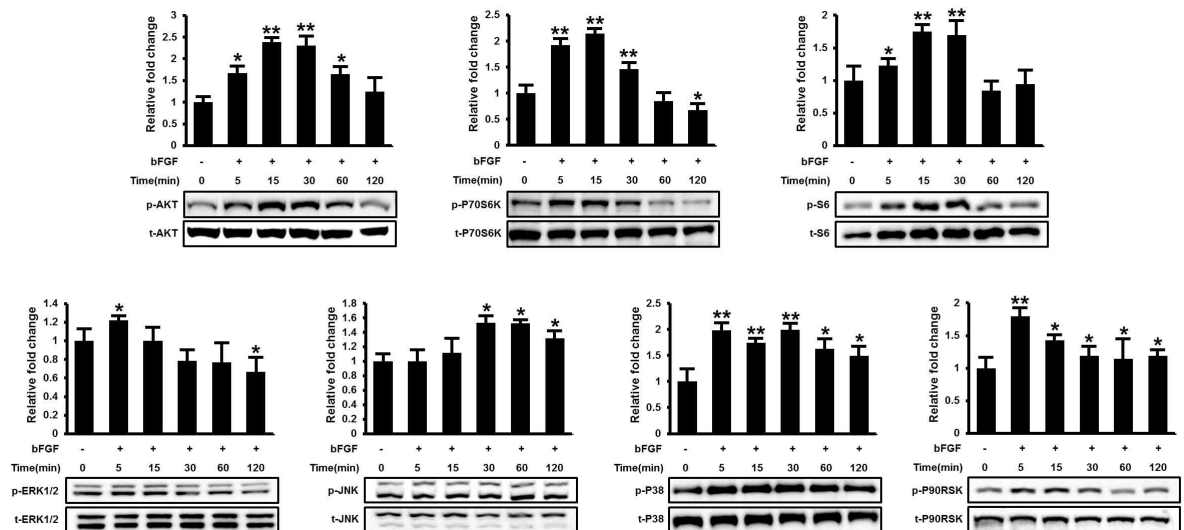


Figure 2-2-7. 선발된 수용체의 리간드에 의한 자궁내막세포의 신호전달 분자 변화 (A-C)

선발된 수용체의 리간드인 아디포넥틴, 에프린, 섬유아세포 증식인자2가 자궁내막세포의 PI3K/MAPK 신호전달 분자를 증가시키는 것을 확인하였으므로, 이들 리간드의 신호전달 체계 조절 효과를 확인하기 위하여 리간드 처리 2시간 전 자궁내막세포에 1 μ M의 wortmannin (PI3K inhibitor), 20 μ M의 U0126 (MEK1/2 inhibitor), 20 μ M의 SP600125 (JNK inhibitor), 20 μ M의 SB203580 (P38 inhibitor)을 처리하여 신호전달 경로를 억제한 뒤 리간드를 처리하였음. 아디포넥틴에 의한 phospho-AKT, phospho-P70S6K, phospho-S6는 wortmannin, U0126에 의해 거의 억제되는 것을 확인하였고, phospho-ERK1/2도 U0126에 의하여 완전히 억제되며, SB203580 처리에서는 약간의 감소를 확인하였음. 또한 아디포넥틴에 의한 phospho-JNK는 U0126, SB203580에 의해 강력하게 억제되었음. phospho-P38은 SB203580에 의해 대부분 감소하였음. phospho-P90RSK는 wortmannin, U0126, SB203580에 의해 완벽히 억제되는 것을 확인하였음 (Figure 2-2-8. A). 에프린에 의한 phospho-AKT, phospho-P70S6K, phospho-S6, phospho-cyclin D1은 wortmannin, U0126, SB203580에 의해 억제 되었으며, phospho-AKT, phospho-P70S6K, phospho-cyclin D1은 SP600125에 의해 억제되지 않았음. phospho-ERK1/2는 U0126에 의해 완전히 억제되었음. phospho-JNK는 U0126와 SP600125에 의해 감소하였음. phospho-P38은 wortmannin, U0126, SB203580에 의해 억제되었으나, SP600125에 의해 증가하였음. phospho-P90RSK는 wortmannin, U0126, SB203580에 의해 감소하였음, 하지만 SP600125에 의해 증가함 (Figure 2-2-8. B). 자궁내막세포에서 섬유아세포 증식인자2에 의해 증가한 phospho-AKT, phospho-P70S6K, phospho-S6는 wortmannin과 U0126에 의해 대부분 억제되었으나 SP600125에 의해 증가하였음. phospho-AKT, phospho-P70S6K는 SB203580처리에서 변화가 없었음. phospho-ERK1/2, phospho-JNK, phospho-P38은 U0126에 의해 억제됨. phospho-P90RSK는 U0126과 SB203580에 의해 억제되었으나 SP600125 의해 증가되었음 (Figure 2-2-8. C). 이러한 결과들은 선발된 수용체의 리간드인 아디포넥틴, 에프린, 섬유아세포 성장인자2가 직접적으로 PI3K/MAPK 신호전달 분자를 활성화 시키며 이들 신호전달 체계 간에 cross-talk이 이뤄짐을 확인하였음 (Figure 2-2-8).

(A) 아디포넥틴과 inhibitors가 처리된 자궁 내막 세포의 신호 전달 분자 변화

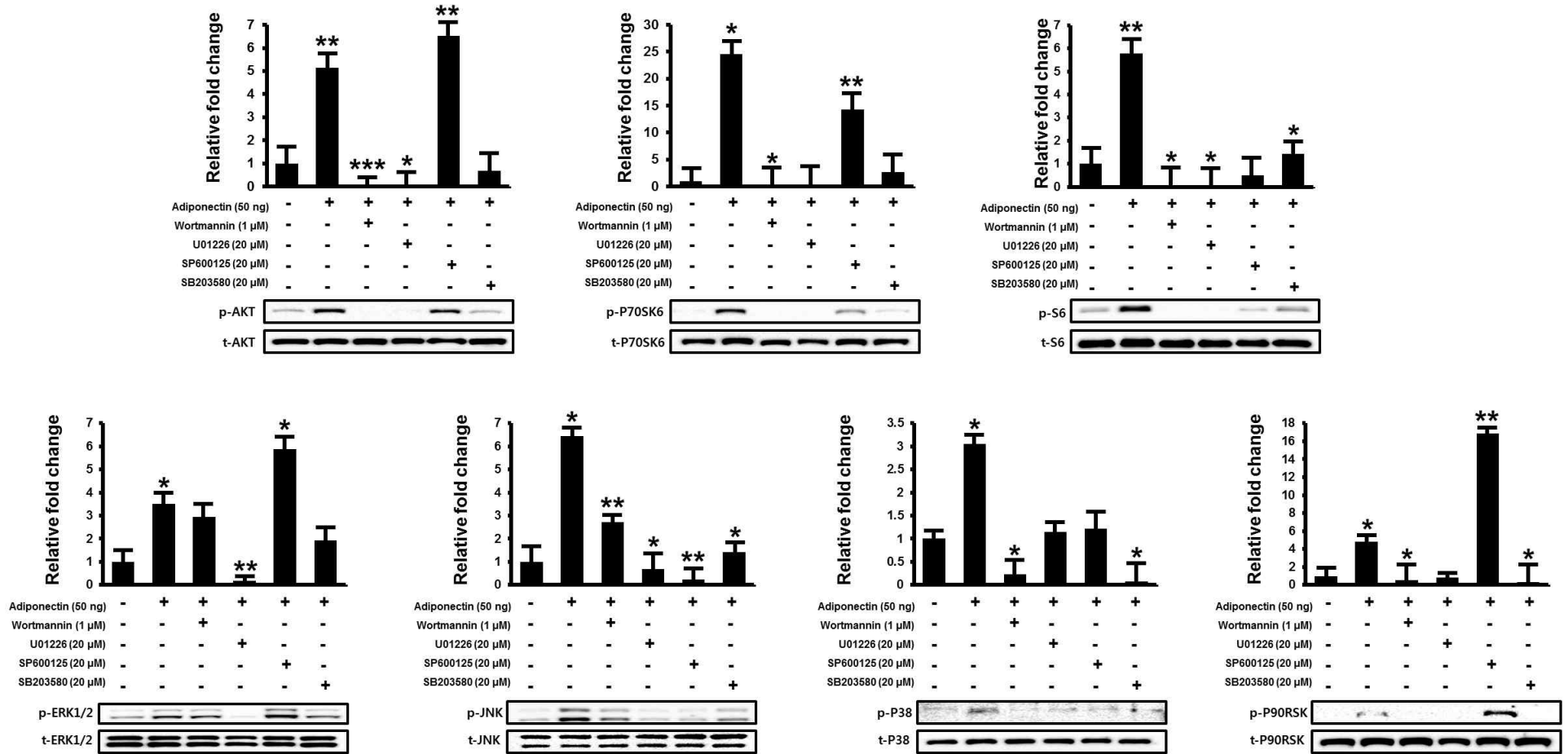


Figure 2-2-8. 선발된 수용체의 리간드와 inhibitors에 의한 자궁내막세포의 신호전달 분자 변화 (A)

(B) 에프린과 inhibitors가 처리된 자궁 내막 세포의 신호 전달 분자 변화

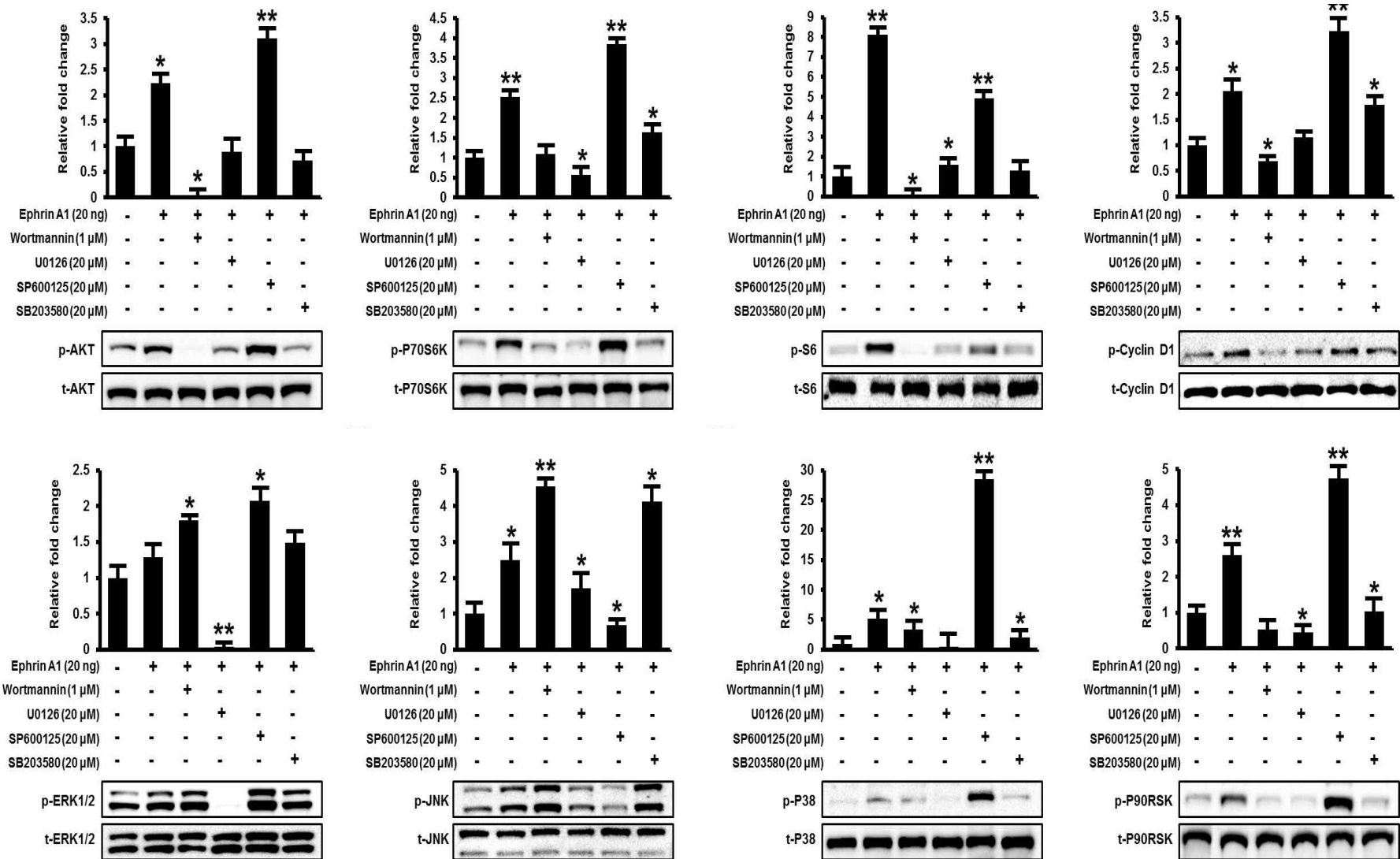


Figure 2-2-8. 선발된 수용체의 리간드와 inhibitors에 의한 자궁내막세포의 신호전달 분자 변화 (B)

(C) 섬유아세포 성장인자2와 inhibitors가 처리된 자궁 내막 세포의 신호 전달 분자 변화

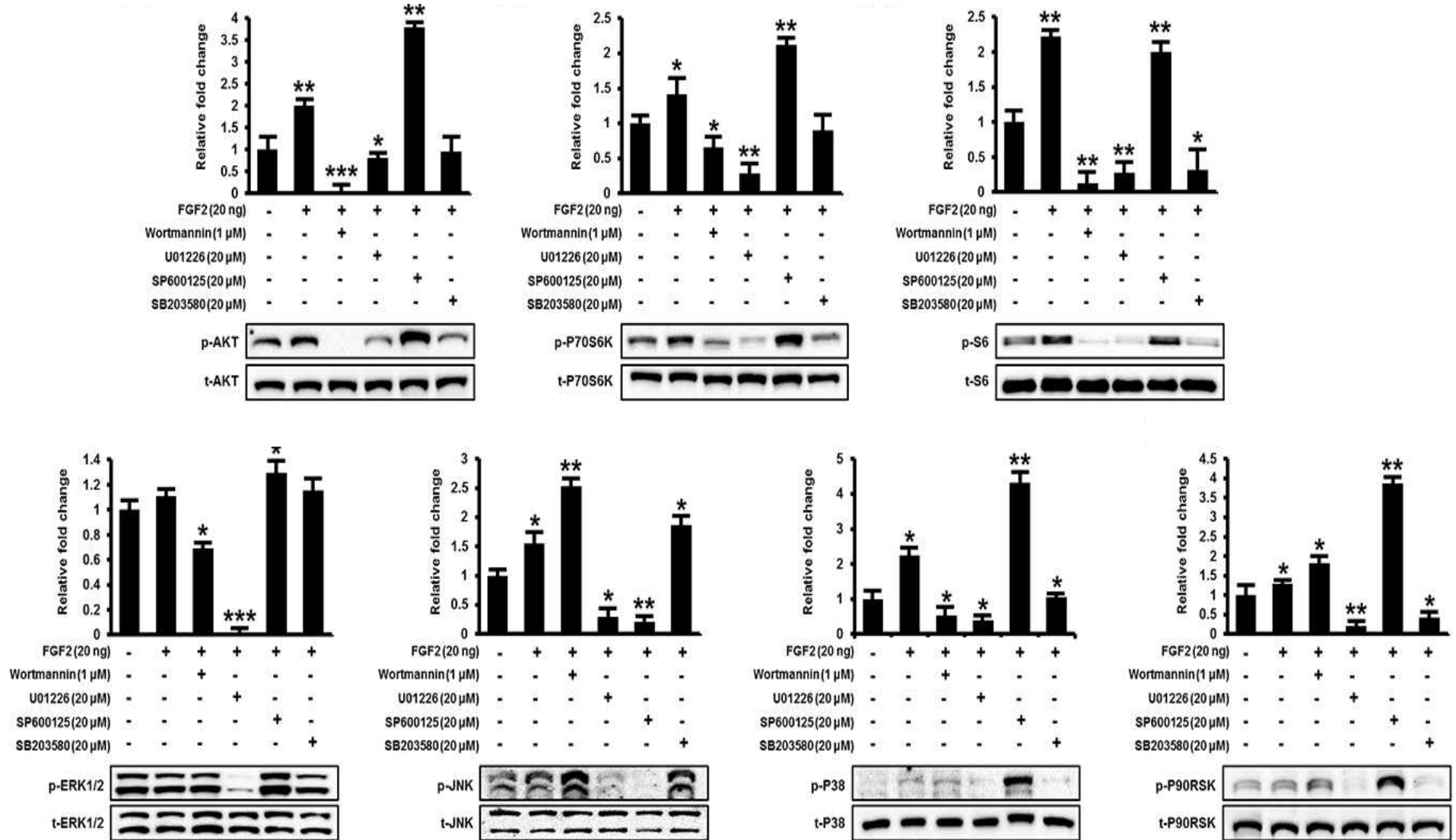
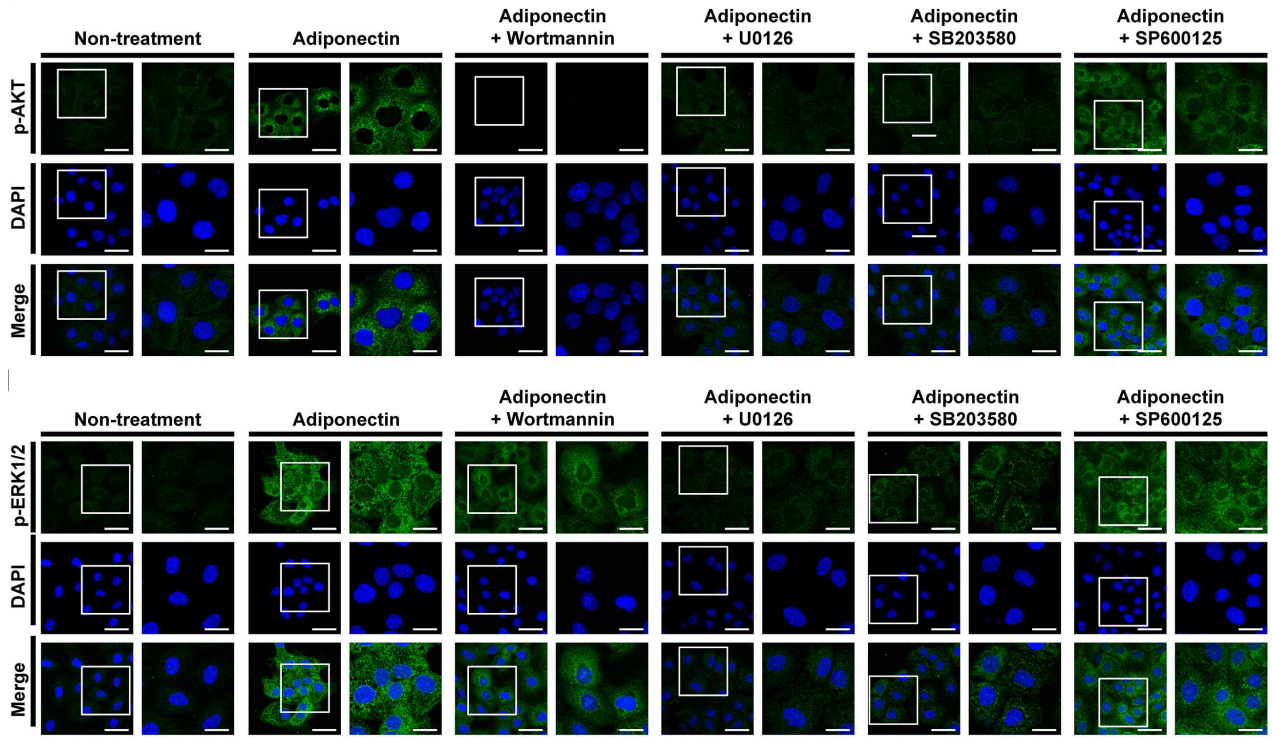


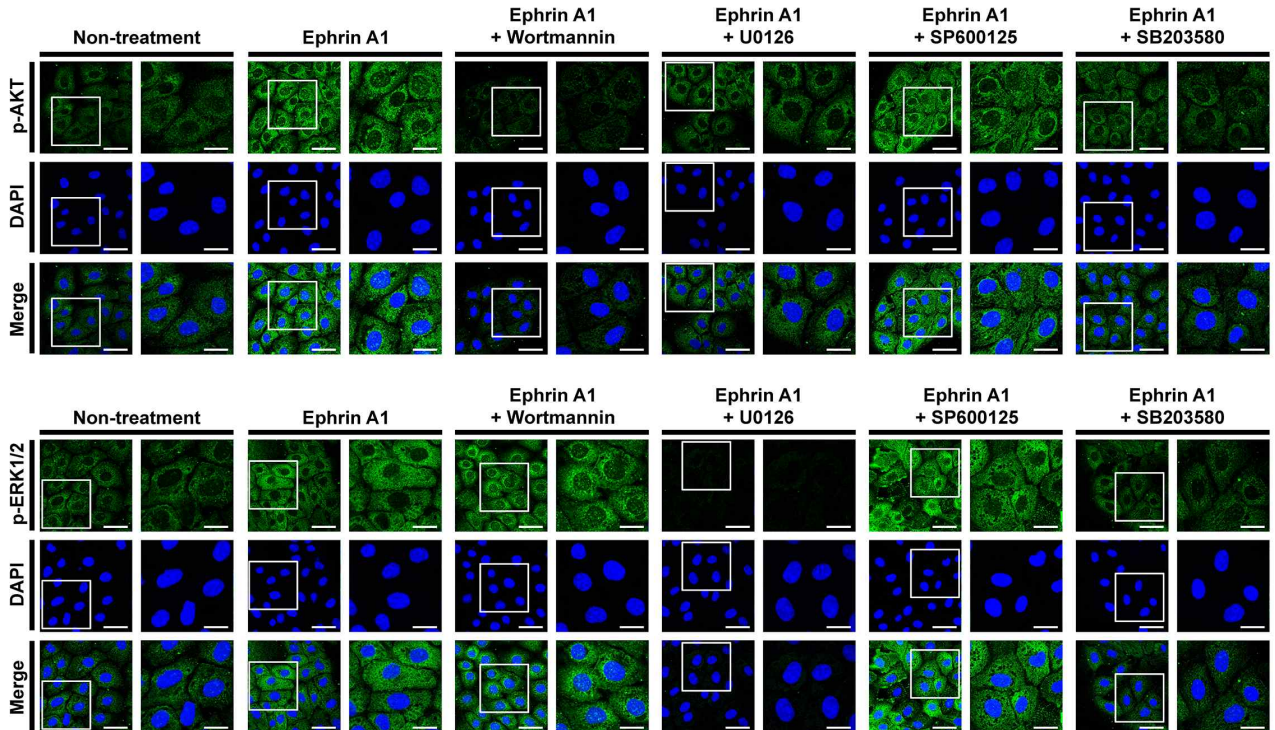
Figure 2-2-8. 선발된 수용체의 리간드와 inhibitors에 의한 자궁내막세포의 신호전달 분자 변화 (C)

앞선 실험 결과를 바탕으로 아디포넥틴, 에프린, 섬유아세포 증식인자2에 의한 신호전달 경로 분자 변화를 세포수준에서 형태학적으로 관찰하기 위하여 Immunofluorescence assay를 수행하였으며, 자궁내막세포 3×10^4 cells/300 μ l을 confocal dish(catalog number : 100350 , SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 다음 serum-free DME/F12 1:1medium에서 24시간 배양하여 starvation과정을 거친 후, 각각의 선발된 리셉터의 리간드인 아디포넥틴, 에프린, 섬유아세포 증식인자2와 함께 배양해줌. 특이적 신호전달 경로 inhibitors의 경우 리간드 배양 2시간 전에 미리 배양하였음. 메탄올을 이용하여 세포를 고정한 뒤 phospho-AKT, phospho-ERK1/2 항체를 1:1000으로 희석하여 상온에서 1시간 배양하고 0.1% BSA-PBS로 상온에서 10분간 3차례 배양해주고, goat anti-rabbit IgG Alexa 488 (Invitrogen)을 1:200으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 배양하고 다시 0.1% BSA-PBS로 상온에서 10분간 3차례 배양해주었음. DAPI는 1:1000으로 농도로 사용한 뒤, LSM710 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) 공초점현미경으로 세포를 관찰하였음. 아디포넥틴 처리에서 phospho-AKT의 발현이 세포질에서 증가하는 것을 확인하였으며, phospho-ERK1/2의 발현은 세포질과 핵에서 발현이 증가하는 것을 확인하였음. 또한 아디포넥틴에 의한 phospho-AKT의 증가는 wortmannin, U0126, SB203580에 의해 대부분 억제되었으나, SP600125에 의해서는 세포핵에서도 발현이 되어 오히려 발현위치가 늘어났음을 확인하였음. 아디포넥틴에 의한 phospho-ERK1/2의 증가는 U0126에 의해 대부분 감소하였으며, wortmannin과 SB203580에 의해 약간 감소하였으나 SP600125에 의해서는 오히려 발현이 증가하는 양상을 확인하였음. 이는 이전의 western blot의 실험결과와도 일치함을 확인 (Figure 2-2-9. A). 에프린 처리에서 자궁내막세포의 phospho-AKT, phospho-ERK1/2가 세포질과 핵에서 증가하는 것을 확인하였음. 에프린 유도인 phospho-AKT 증가는 wortmannin에 의해 대부분 억제되었으며, U0126과 SB203580에 의해 감소하였으며 SP600125에서는 전혀 감소하지 않는 것을 확인. 에프린 유도인 phospho-ERK1/2의 증가는 U0126에서 완벽히 억제되었으며, wortmannin, SP600125, SB203580에서는 큰 차이가 없거나 오히려 증가되는 것을 확인하였음 (Figure 2-2-9. B). 섬유아세포 성장인자2에 의한 phospho-AKT, phospho-ERK1/2의 증가는 주로 세포질에서 관찰되었으며, phospho-AKT는 wortmannin과 U0126에 의해 대부분 억제되는 것을 확인하였고, phospho-ERK1/2의 증가는 U0126에 의해 대부분 억제되었고, wortmannin에 의해서는 소폭 감소하였음 (Figure 2-2-9. C).

(A) 아디포넥틴과 inhibitors가 처리된 자궁 내막 세포의 신호 전달 분자 관찰



(B) 에프린과 inhibitors가 처리된 자궁 내막 세포의 신호 전달 분자 관찰



(C) 섬유아세포 성장인자2와 inhibitors가 처리된 자궁 내막 세포의 신호 전달 분자 관찰

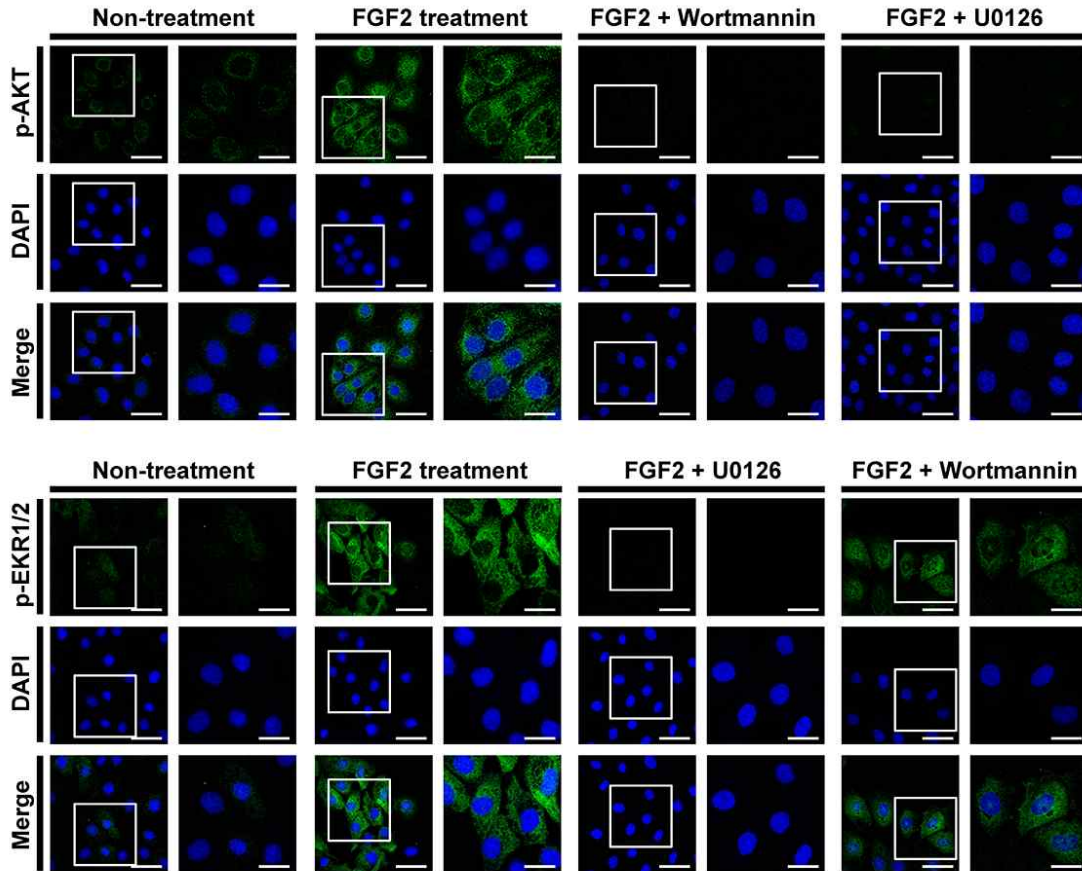
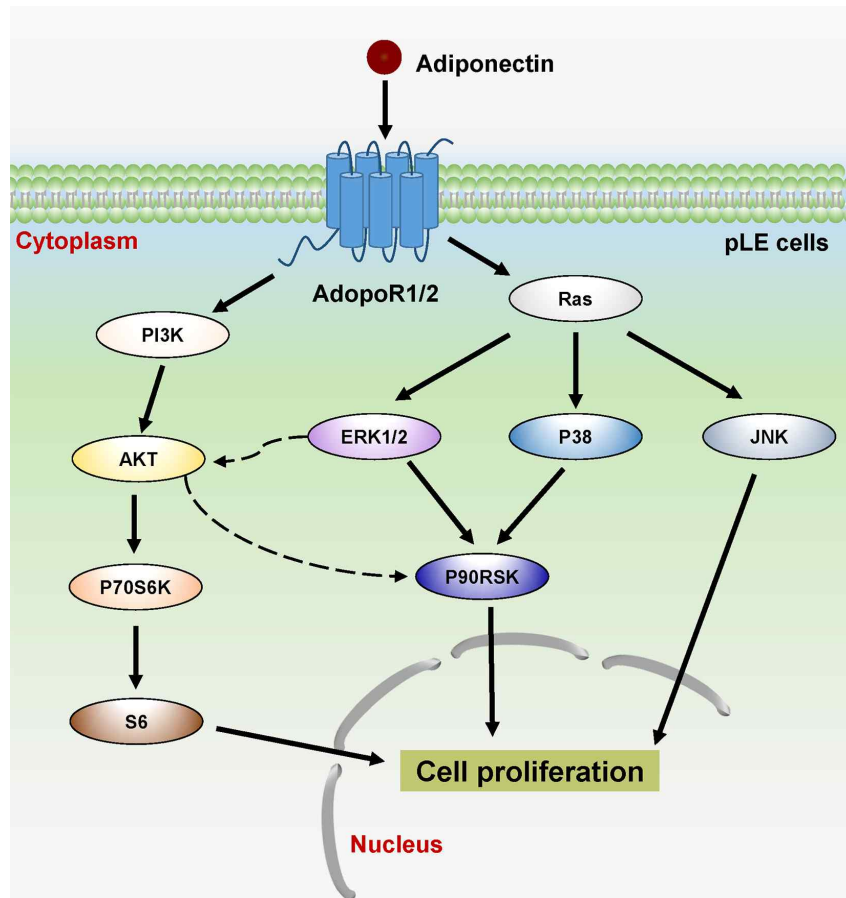


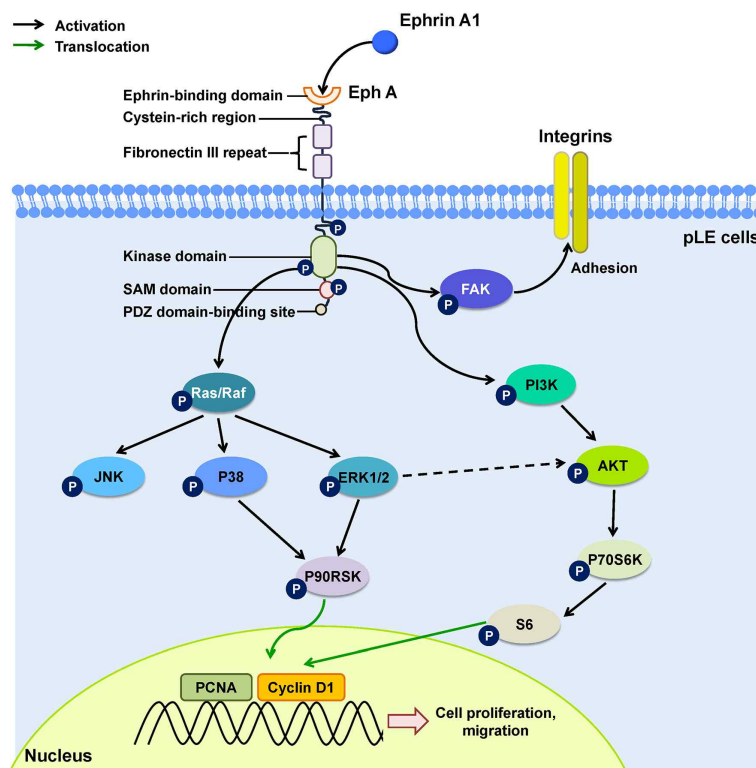
Figure 2-2-9. 선발된 수용체의 리간드와 inhibitors가 처리된 자궁내막세포의 형태학적 분석 (A-C)

본 실험 결과들과 이미 연구된 내용을 바탕으로 자궁내막세포에서 선발된 수용체와 그 리간드에 의한 신호 전달 경로 모식도를 제작하였음. 아디포넥틴 수용체에 리간드인 아디포넥틴이 결합하여 PI3K의 하위 신호인 phospho-AKT, phospho-P70S6K, phospho-S6를 유도하였으며, RAS의 하위 신호인 phospho-ERK1/2, phospho-P38, phospho-JNK를 유도하였음. phospho-ERK1/2가 phospho-AKT의 상위에 있으며 서로 cross-talk을 한다는 것을 확인하였으며, 이러한 신호 전달 경로가 전사인자를 활성화 하고 자궁 내막세포의 성장과 발달을 유도할 것이라는 가설을 바탕으로 모식도를 제작하였음 (Figure 2-2-10. A). 에프린은 에프린 수용체에 결합하여 PI3K의 하위 신호인 phospho-AKT, phospho-P70S6K, phospho-S6를 유도하였으며, RAS의 하위 신호인 phospho-ERK1/2, phospho-P38, phospho-JNK를 유도하였음. 이러한 신호 전달 경로는 자궁내막세포 핵의 PCNA와 cyclin D1을 증가시켜 자궁내막세포의 성장과 발달을 유도할 것이라는 가설을 바탕으로 모식도를 제작하였음 (Figure 2-2-10. B). 섬유아세포 증식인자 수용체(FGFR1, 2)에 리간드인 섬유아세포 증식인자2가 결합하여 PI3K의 하위 신호인 phospho-AKT, phospho-P70S6K, phospho-S6를 유도하였으며, RAS의 하위 신호인 phospho-ERK1/2, phospho-P38, phospho-JNK를 유도하였음. phospho-ERK1/2, phospho-P38은 phospho-AKT를 조절하며 phospho-JNK과 cross-talk한다는 것을 확인하였음. 섬유아세포 증식인자 수용체(FGFR1, 2)와 섬유아세포 증식인자2는 이러한 신호 전달 경로를 통하여 전사인자를 활성화하고 자궁내막세포의 성장과 발달을 유도함 (Figure 2-2-10. C).

(A) 아디포넥틴 리셉터(ADIPOR1, 2)와 아디포넥틴에 의한 자궁내막세포의 신호전달 경로



(B) 에프린 리셉터(EPHA1, 2, 4, 7)와 에프린에 의한 자궁내막세포의 신호전달 경로



(C) 섬유아세포 증식인자 수용체(FGFR1, 2)와 섬유아세포 증식인자2에 의한 자궁내막세포의 신호전달 경로

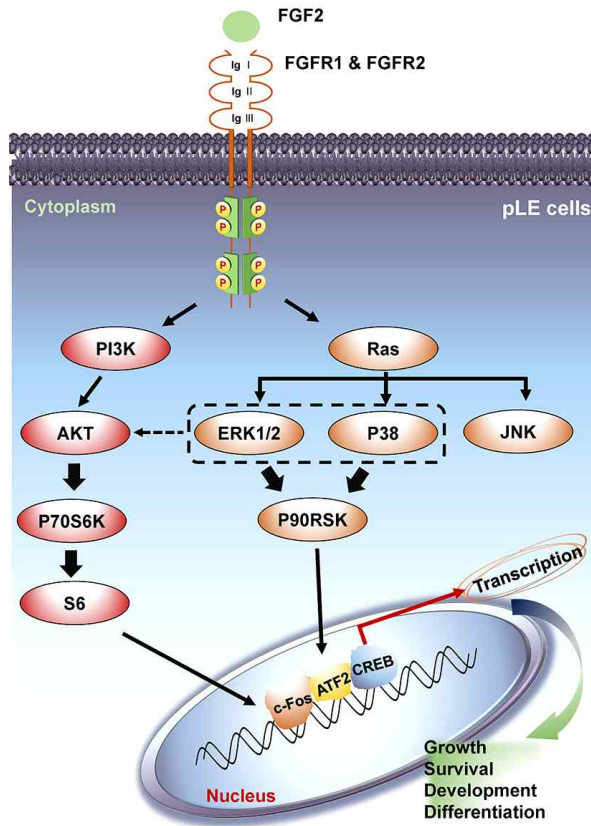


Figure 2-2-10. 선발된 수용체와 리간드에 의한 자궁내막세포에서의 신호 전달 경로 (A-C)

(2) 영양외배엽 세포의 발달 및 분화를 유도하는 유용물질 발굴

1) 영양외배엽 세포의 증식을 향상 시키는 유용물질 발굴

돼지의 영양외배엽 세포를 배양하여, 세포증식을 향상시킬 것으로 예상되는 유용물질을 처리하여 세포 수준에서 일어나는 증식의 변화를 관찰하기 위하여 proliferation assay를 진행하였음. 96-well plate에 영양외배엽 세포를 3×10^3 cells/well로 분주하여 배양한 다음 serum-free DME/F12 1:1 medium으로 24시간 동안 배양하여 starvation을 시켜준 다음 유용물질을 처리하고 48시간을 배양하여 10 μ M BrdU를 첨가해 2시간 배양한 뒤 Cell Proliferation ELISA, BrdU kit (Cat No. 11647229001, Roche)를 사용하여 세포 증식 정도를 확인한 결과, Lysophosphatidic Acid (LPA)를 농도 의존적으로 처리하였을 때 LPA의 양이 증가하면서 영양외배엽 세포의 증식도 함께 증가하는 것을 확인하였음 (Figure 2-2-11).

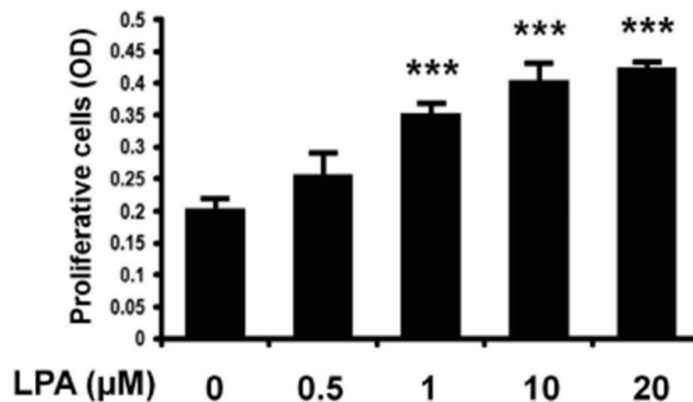


Figure 2-2-11. LPA를 처리하여 영양외배엽 세포의 증식 정도를 Proliferation assay로 분석

2) 영양외배엽 세포의 세포 이주 능력을 향상 시키는 유용물질 발굴

세포 이주 능력의 분석은 Ibidi migration culture dish(Ibidi, Munich, Germany)를 사용하였으며, 2×10^5 cells/ml의 영양외배엽 세포를 70 μ l씩 각 well에 분주하여 16시간 동안 배양하고 serum-free DME/F12 1:1 medium으로 24시간 동안 starvation을 시켜준 다음 부착되어 있는 culture inserts를 제거하여 500 μ m의 세포가 없는 공간을 확보하여 유용물질이 첨가된 medium으로 배양하여 세포 이주를 유도하고 500 μ m의 공간에 세포가 얼마나 이주하였는지 광학현미경 DM3000 (Leica)으로 관찰 및 촬영한 결과, LPA를 농도 의존적으로 처리하였을 때 영양외배엽세포의 세포 이주는 LPA 농도 20 μ m에서 220% 증가된 세포 이주를 확인하였음. 나린제닌을 농도 의존적으로 처리하였을 때 영양외배엽세포의 세포 이주는 나린제닌 농도 20 μ m에서 170% 증가된 세포 이주를 확인하였음. 쿠메스트롤을 농도 의존적으로 처리하였을 때 영양외배엽세포의 세포 이주는 쿠메스트롤 농도 100 μ m에서 200% 증가된 세포 이주를 확인하였음. 섬유아세포 성장인자4를 농도 의존적으로 처리하였을 때 영양외배엽세포의 세포 이주는 섬유아세포 성장인자4 농도 20 μ m에서 220% 증가된 세포 이주를 확인하였음 (Figure 2-2-12).

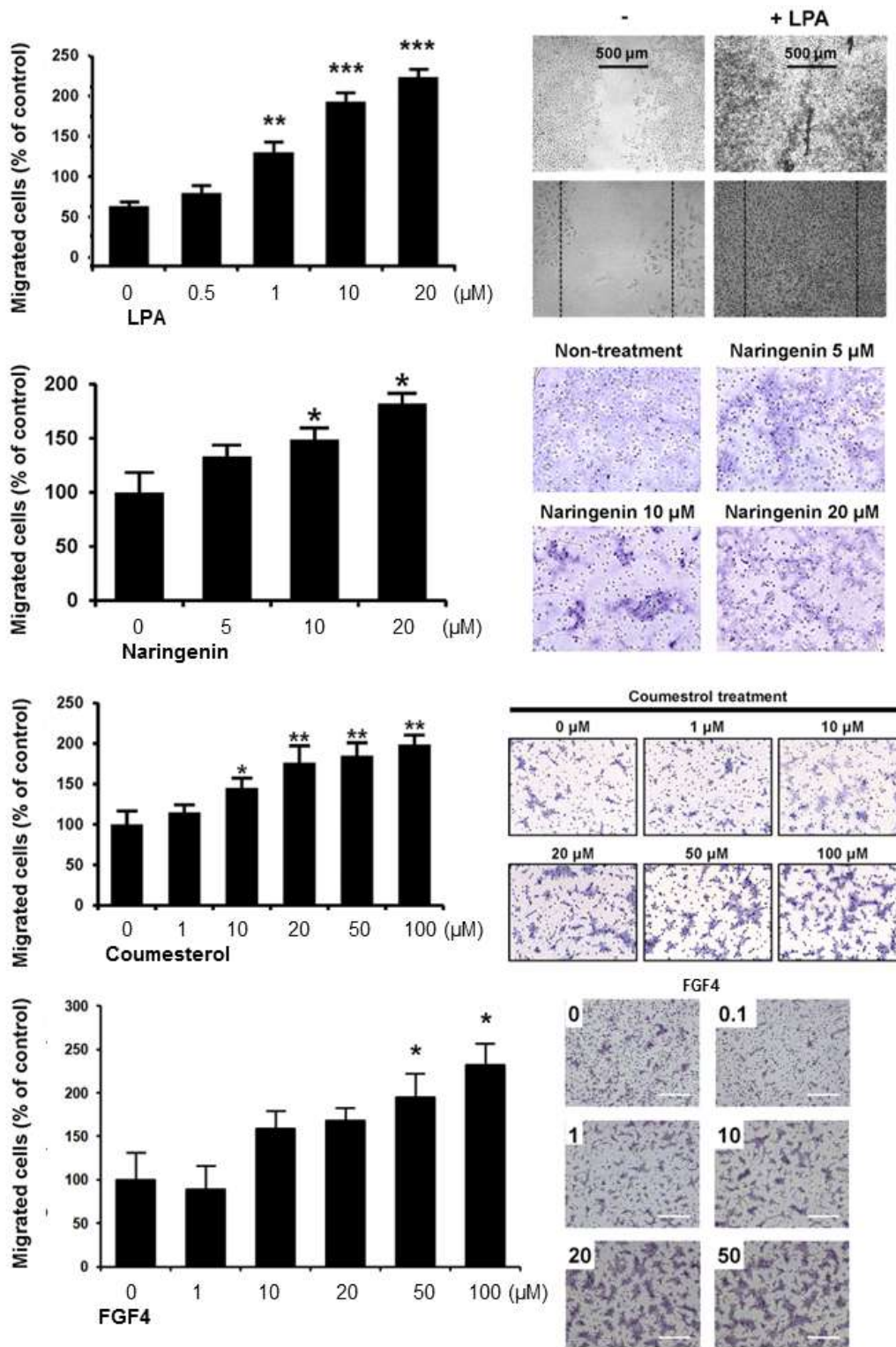


Figure 2-2-12. 유용물질이 영양외배엽세포의 이주능력에 미치는 영향

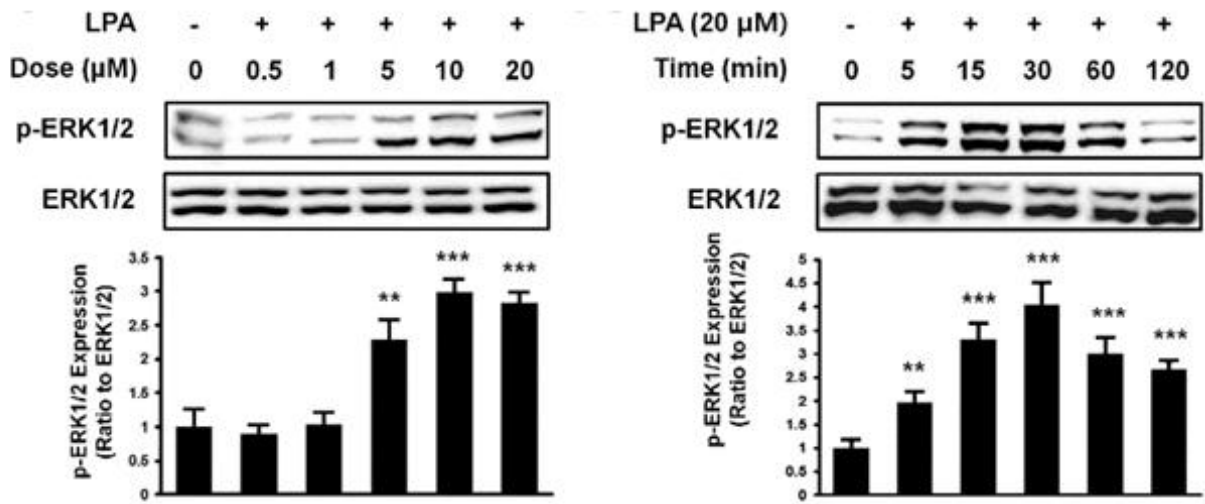
세포의 증식과 이주 능력의 증가는 세포의 발달 및 분화를 확인하는 지표로서 실험결과와 같이 LPA, 나린제닌, 쿠메스트롤, 섬유아세포 증식인자4가 영양외배엽세포의 세포 증식 또는 이주 능력을 향상시키는 것을 확인하였으므로, 이들 유용물질이 영양외배엽세포의 발달 및 분화에 중요한 역할을 할 것으로 예상되며, 추가적으로 유용물질들의 기전을 밝히기 위한 연구가 요구됨.

(3) 영양외배엽 세포에서 유용물질과 수용체간의 분자적 기전 연구

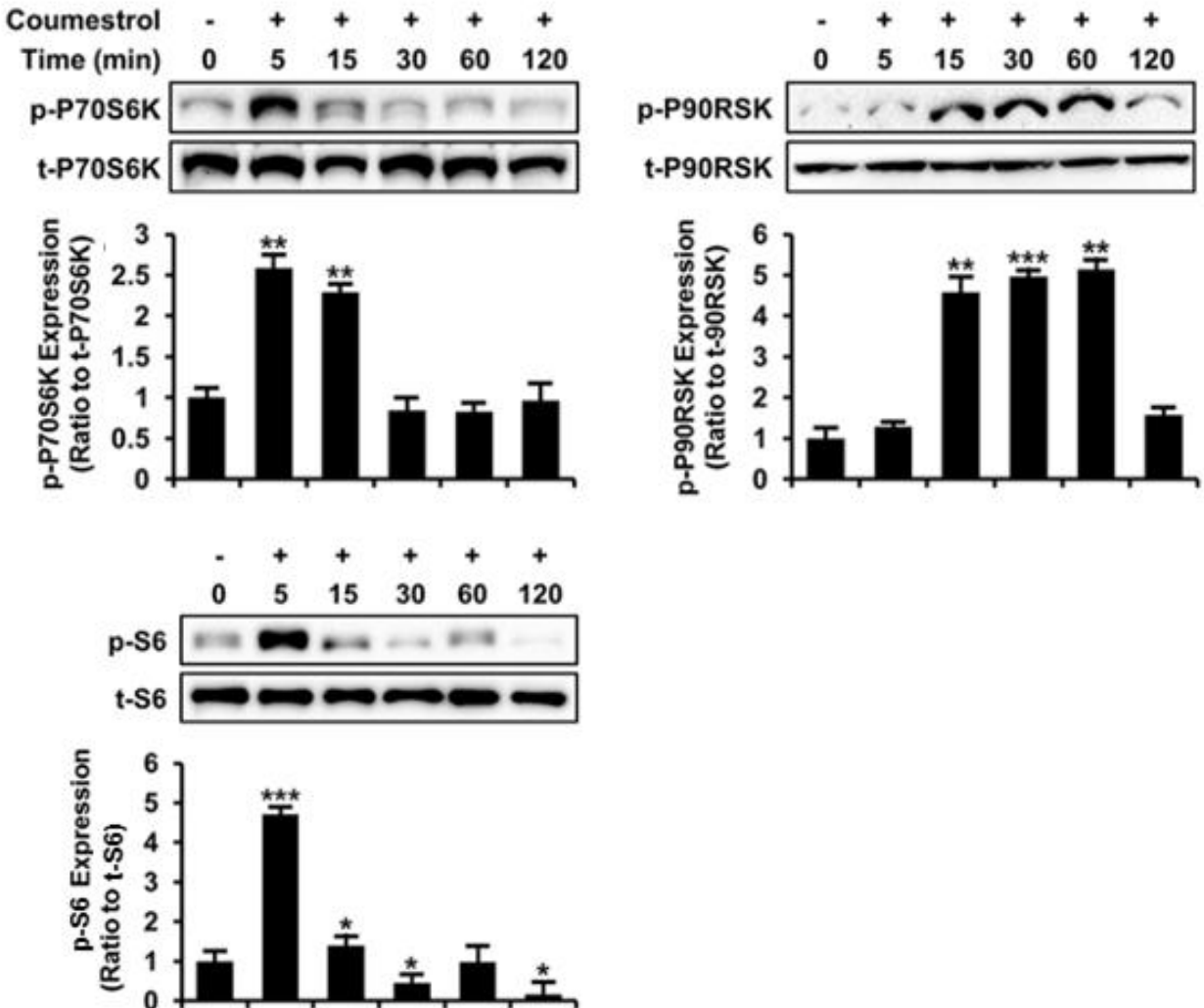
1) 영양외배엽 세포에서 유용물질 유도의 분자적 기전 분석

유용물질이 영양외배엽 세포의 수용체와 상호작용하여 어떠한 신호전달 경로를 통하여 세포의 증식, 이주, 발달에 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 농도 의존적·시간 의존적으로 유용물질을 처리한 뒤 영양외배엽 세포에서 단백질을 추출하여 Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 농도 측정 및 정량을 수행하고, 95°C에서 변성 및 10% SDS/PAGE gel를 이용한 전기영동으로 단백질을 kDa별로 나누고 nitrocellulose에 옮겨준 다음 chemiluminescence detection (SuperSignal West Pico, Pierce, Rockford, IL, USA)으로 특정 신호전달 분자를 관찰 할 수 있는 luminol 발색을 유도하여 ChemiDoc EQ system 장비로 측정된 다음 Quantity One software (Bio-Rad)를 이용해 발색의 강도로 정량화를 수행함. 면역반응성의 항체들은 goat anti-rabbit polyclonal 항체를 이용하여 phospho-단백질과 total-단백질을 1:1000으로 희석하여 관찰하며, total-단백질로 정규화를 수행하였음. 모든 항체들은 Cell Signaling Technology 제품이며 3반복 실험을 수행한 결과, 영양외배엽 세포에 LPA를 농도 의존적으로 으로 처리하였을 때 10 μ m에서 phospho-ERK1/2가 3배까지 증가하였음. 시간 의존적으로 처리하였을 때는 30분에서 4배까지 phospho-ERK1/2가 증가하는 것을 확인하였음 (Figure 2-2-13. A). 영양외배엽 세포에 쿠메스테롤을 시간 의존적으로 처리하였을 때 phospho-P70S6K는 5분에서 2.5배까지 증가하였다가 30분까지 점차적으로 감소하였고 phospho-P90RSK는 60분에서 5배까지 증가하였다가 120분에서 감소하였으며, phospho-S6는 5분에서 4.9배까지 증가하였다가 감소하였음 (Figure 2-2-13. B). 영양외배엽 세포에 나린제닌을 시간 의존적으로 처리하였을 때 phospho-AKT는 120분에서 3.8배까지 증가하였으며, phospho-ERK1/2는 5분에서 1.6배로 증가하였다가 120분까지 점차적으로 감소하였음. phospho-P70S6K는 나린제닌 처리후 5분에서 3.8배까지 증가하였다가 120분까지 점차적으로 감소하였음. phospho-P90RSK는 나린제닌 처리후 15분에서 1.6배까지 증가하였다가 120분까지 점차적으로 감소하였음 (Figure 2-2-13. C). 영양외배엽 세포에 섬유아세포 증식인자4를 농도 의존적으로 처리하였을 때 phospho-AKT는 섬유아세포 증식인자4 농도 20 μ m에서 2.7배의 증가를 확인하였고 50 μ m에서는 다시 감소하였음. 시간 의존적으로 영양외배엽 세포에 섬유아세포 증식인자4를 처리하였을 때 phospho-AKT는 30분에서 2.1배까지 증가하고 120분까지 점차적으로 감소하였음. phospho-P90RSK는 15분에서 5배까지 증가하였다가 120분까지 점차적으로 감소하였음. phospho-S6는 30분에서 3.1배까지 증가하였다가 120분까지 점차적으로 감소하였음 (Figure 2-2-13. D). 이러한 실험 결과들을 통하여 유용물질이 영양외배엽세포의 세포증식과 관련된 신호전달 체계인 PI3K/MAPK의 신호 전달 인자들이 활성화되는 것을 확인하였음 (Figure 2-2-13).

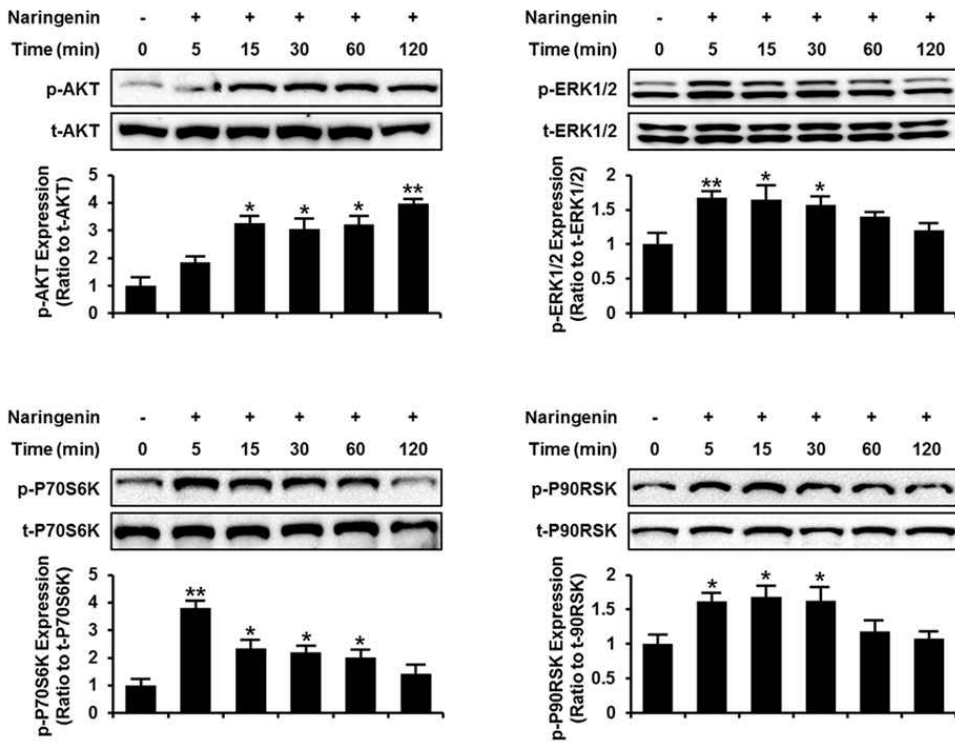
(A) 영양외배엽 세포에서 농도 의존적·시간 의존적 LPA 처리와 신호 전달 분자



(B) 영양외배엽 세포에서 시간 의존적 쿠메스트롤 처리와 신호 전달 분자



(C) 영양외배엽 세포에서 시간 의존적 나린제닌 처리와 신호 전달 분자



(D) 영양외배엽 세포에서 농도의존적·시간의존적 섬유아세포 성장인자처리와 신호 전달 분자

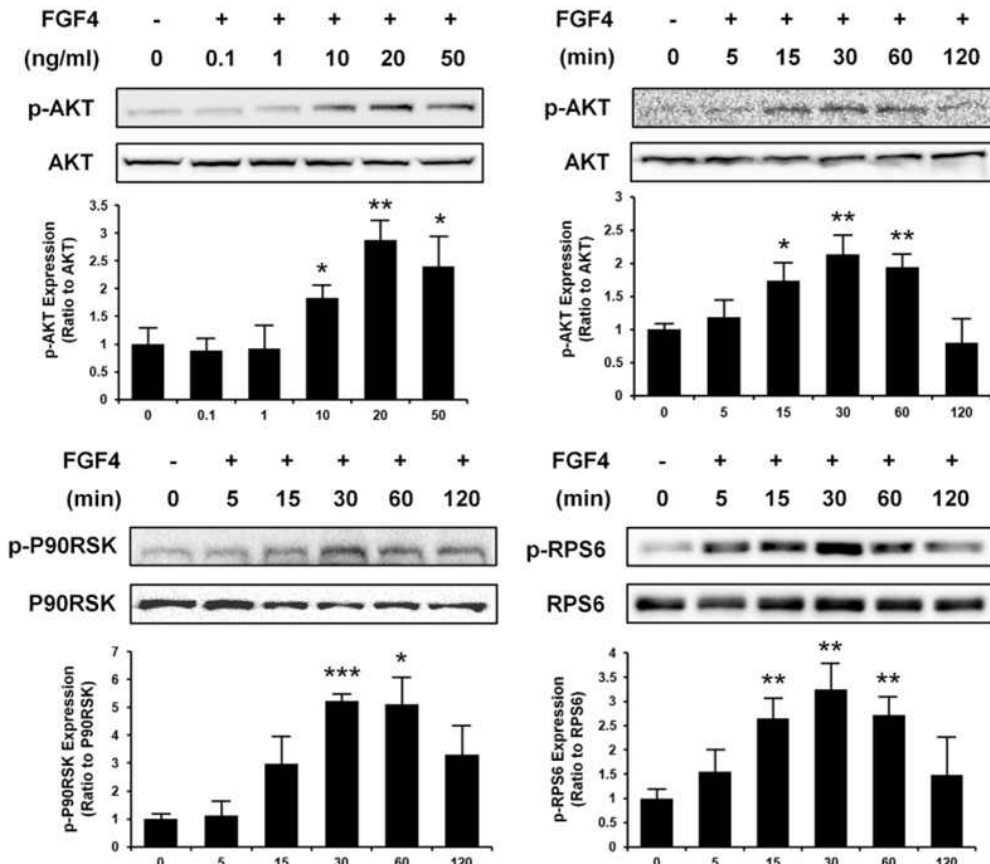
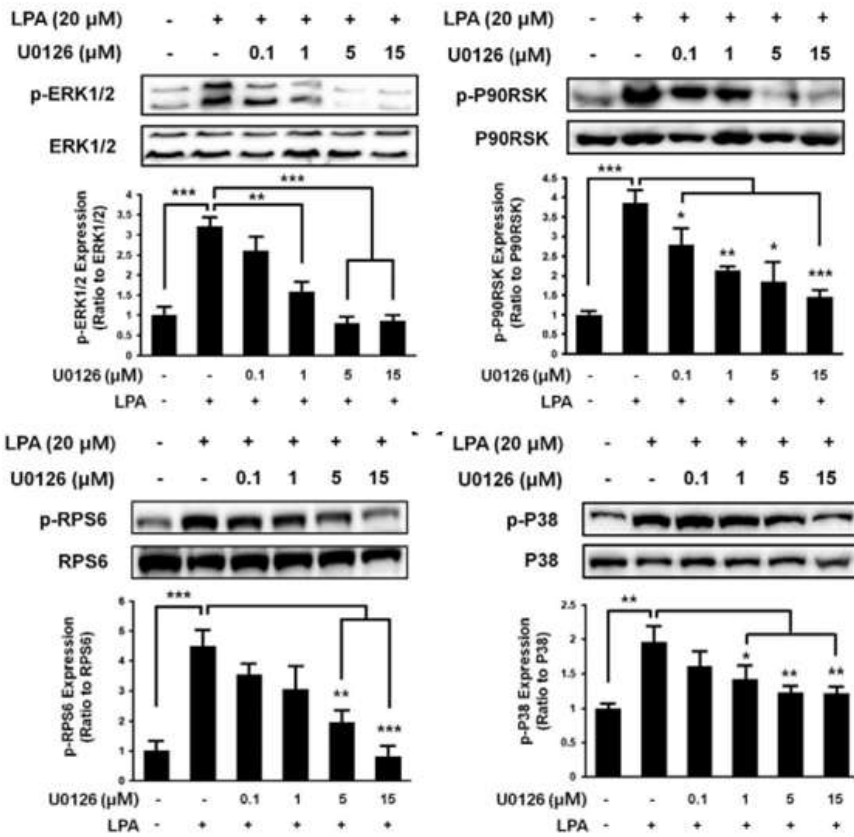


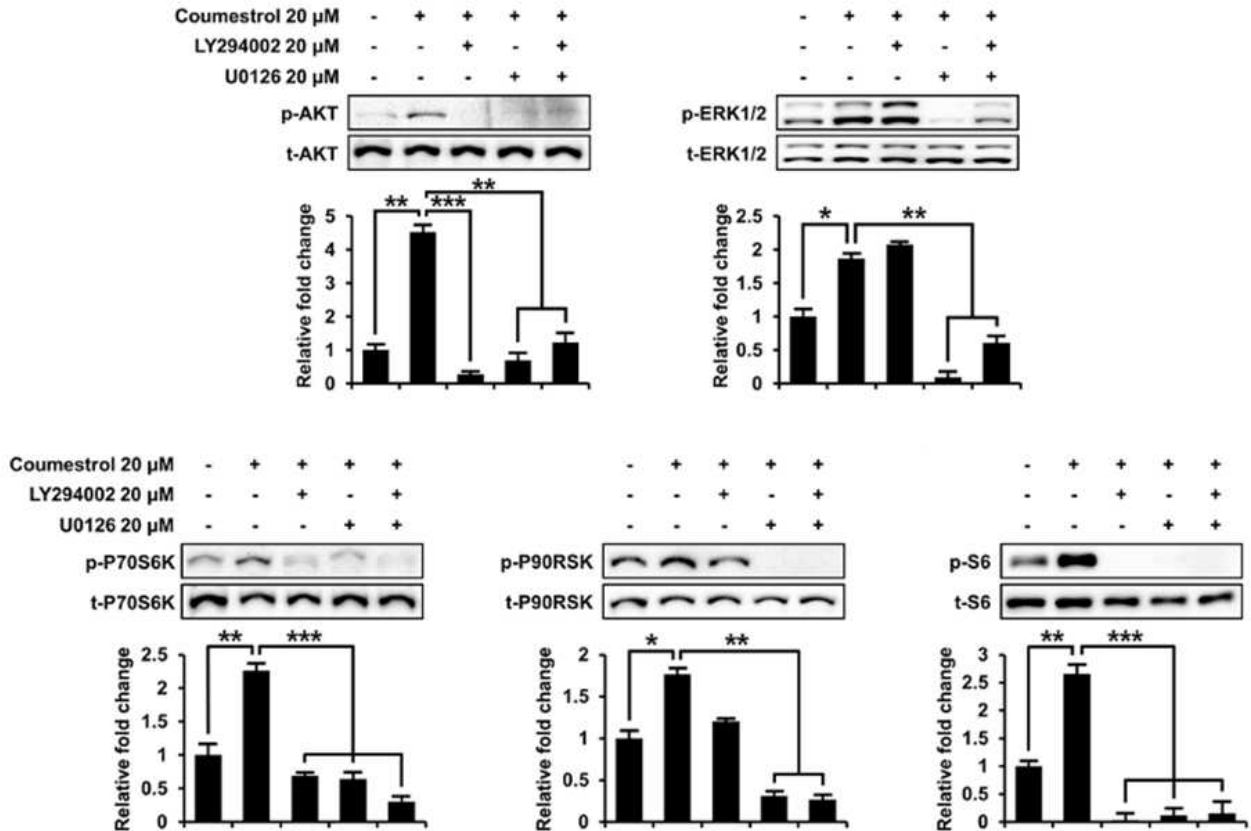
Figure 2-1-13. 영양외배엽세포에서 농도의존적·시간의존적 유용물질 처리와 신호전달분자 분석 (A-D)

유용물질인 LPA, 나린제닌, 쿠메스테롤, 섬유아세포 성장인자4가 영양외배엽세포에 미치는 신호전달 체계 조절을 확인하기 위하여 특정의 신호전달 경로를 억제하는 inhibitor를 유용물질 처리 2시간 전 영양외배엽세포에 U0126 (MEK1/2 inhibitor), SP600125 (JNK inhibitor), SB203580 (P38 inhibitor)을 처리하여 신호전달 경로를 억제한 뒤 유용물질을 처리하였음. 영양외배엽 세포에 U0126을 농도 의존적으로 처리해준 다음 20 μ M의 LPA를 처리하였을 때 U0126 농도 5 μ M에서 LPA에 의한 phospho-ERK1/2의 증가가 가장 많이 억제되었으며, 15 μ M의 U0126에서 LPA에 의한 phospho-P90RSK의 증가가 가장 많이 억제되었음. 또한 LPA에 의한 phospho-RPS6의 증가는 U0126 농도 15 μ M에서 가장 많이 억제되었고, phospho-P38의 증가는 U0126 농도 5 μ M에서 가장 많이 억제되었음 (Figure 2-1-14. A). 영양외배엽세포에 쿠메스테롤과 LY294002를 처리하였을 때 phospho-AKT의 증가가 가장 많이 감소하였으며, 쿠메스테롤과 U0126을 처리하였을 때에는 phospho-AKT의 증가가 많이 감소하였으나, 쿠메스테롤과 LY294002, U0126을 함께 처리하였을 때 오히려 억제효과가 조금 떨어지는 것을 확인하였음. 쿠메스테롤과 LY294002를 처리하였을 때 phospho-ERK1/2의 증가는 전혀 감소하지 않았으며, U0126 처리에서는 완전히 억제되었고, LY294002와 U0126를 함께 처리한 경우 그보다 덜한 억제 효과를 확인하였음. 쿠메스테롤과 LY294002 또는 U0126을 함께 처리하였을 때 phospho-P70S6K의 증가는 대부분 억제 되었고, 쿠메스테롤과 LY294002, U0126을 모두 처리하였을 때 더 많은 억제 효과를 확인하였음. 쿠메스테롤과 LY294002를 함께 처리한 경우 phospho-P90RSK 증가 억제 효과를 확인하였으며, 쿠메스테롤과 U0126을 함께 처리하였을 때 보다 더 많은 억제 효과를 확인하였음. 영양외배엽세포에 쿠메스테롤과 LY294002, U0126을 함께 또는 각각 처리한 경우 phospho-S6 증가가 거의 완전히 억제되는 것을 확인하였음 (Figure 2-2-14. B). 영양외배엽세포에 나린제닌 20 μ M과 LY294002를 농도 의존적으로 처리하였을 때 LY294002 농도 20 μ M에서 phospho-AKT의 증가가 가장 많이 억제되었으며, phospho-P70S6K의 증가는 LY294002 농도 1 μ M에서 가장 많이 감소하였고. phospho-P90RSK와 phospho-S6의 증가는 LY294002 농도 10 μ M에서 가장 많이 억제되었음. 영양외배엽세포에 나린제닌과 U0126을 함께 처리하였을 때 phospho-ERK1/2와 phospho-P70S6K의 증가는 U0126 농도 20 μ M에서 가장 많이 억제되었음. phospho-P90RSK의 증가는 U0126 농도 0.1 μ M에서 가장 많이 억제되었다가 농도가 올라갈수록 그 억제 효과가 오히려 떨어지는 것을 확인하였고, phospho-S6의 증가는 U0126 농도 10 μ M에서 가장 많이 억제 되었음 (Figure 2-2-14. C). 영양외배엽 세포에 섬유아세포 성장인자4와 LY294002를 농도 의존적으로 처리하였을 때 phospho-AKT, phospho-P90RSK, phospho-RPS6의 증가는 LY294002 농도 50 μ M에서 가장 많이 억제되는 것을 확인하였음 (Figure 2-2-14. D). 이러한 결과들은 유용물질인 LPA, 쿠메스테롤, 나린제닌, 섬유아세포성장인자4가 직접적으로 영양외배엽세포의 PI3K/MAPK 신호전달 분자를 활성화 시키며 이들 신호전달 체계 간에 cross-talk이 이뤄짐을 확인하였음 (Figure 2-2-14).

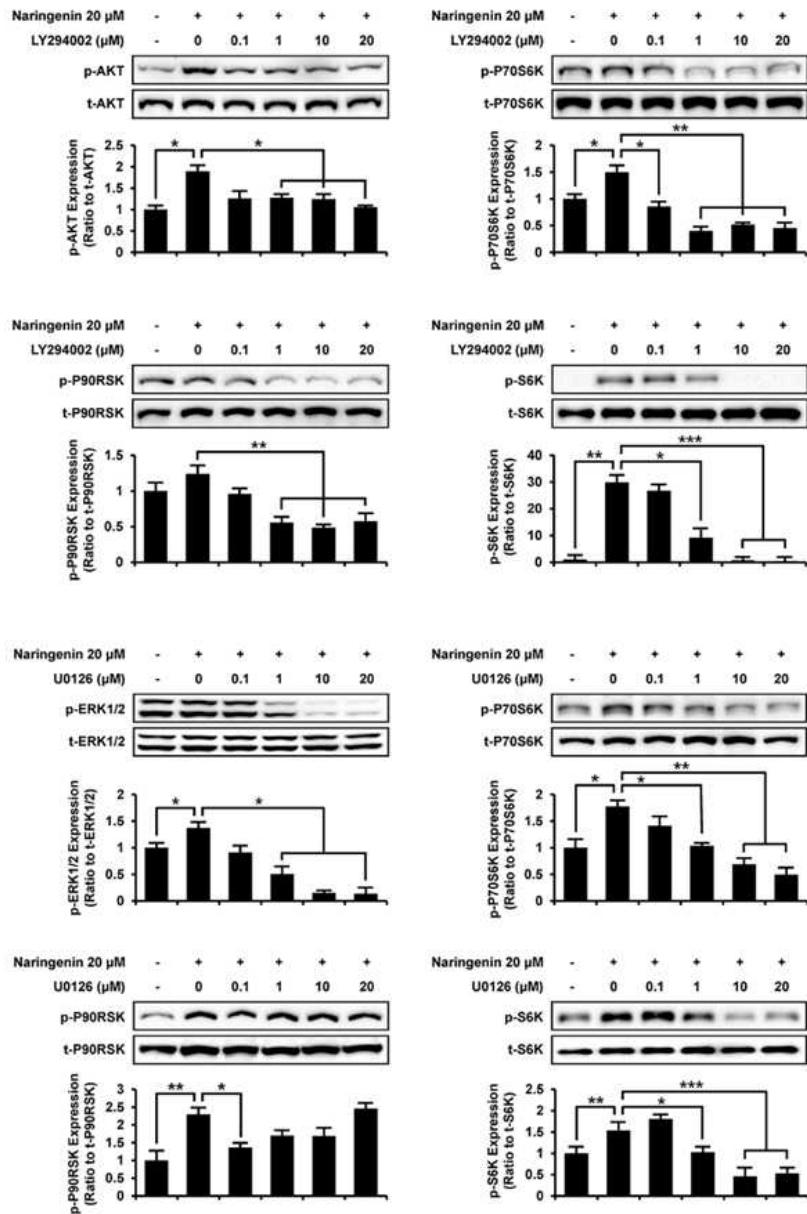
(A) LPA와 inhibitors 처리된 영양외배엽 세포의 신호전달 분자 분석



(B) 쿠메스트롤과 inhibitors 처리된 영양외배엽 세포의 신호전달 분자 분석



(C) 나린제닌과 inhibitors 처리된 영양외배엽 세포의 신호전달 분자 분석



(D) 섬유아세포 성장인자4와 inhibitors 처리된 영양외배엽 세포의 신호전달 분자 분석

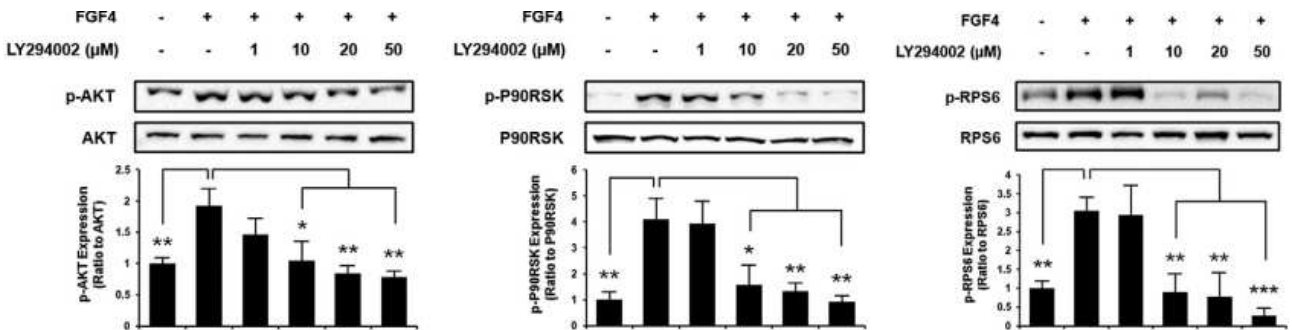
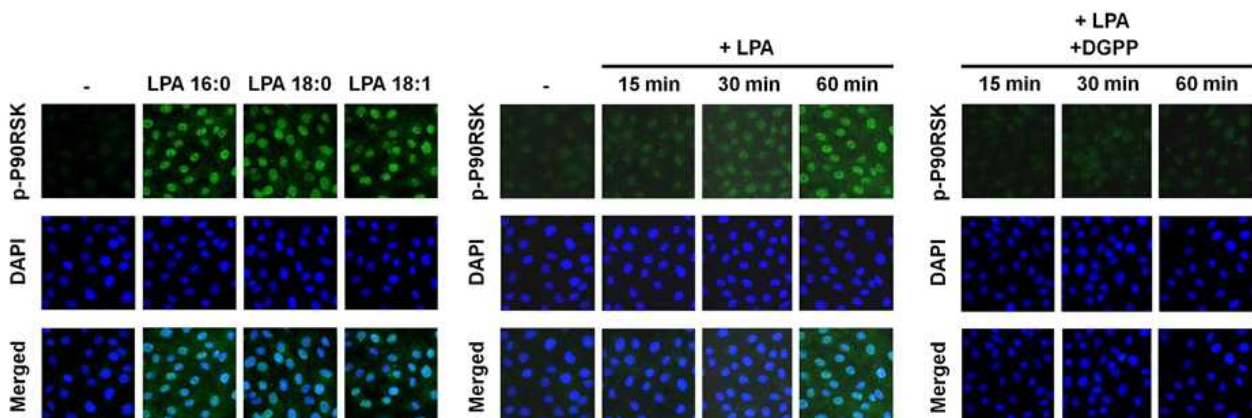


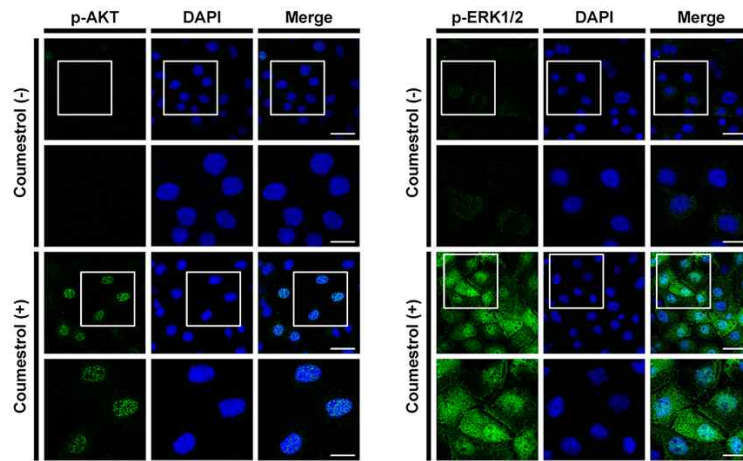
Figure 2-2-14. 영양외배엽 세포에서 유용물질과 inhibitors 처리에 의한 신호전달 경로 분석 (A-D)

유용물질이 영양외배엽 세포에서 어떠한 신호전달 경로를 통하여 세포의 증식, 발달에 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 유용물질과 특정 분자 신호전달 경로를 억제하는 inhibitors를 함께 처리한 뒤 영양외배엽 세포에서 immunofluorescence assay를 통하여 신호전달 분자의 발현 변화를 분석함. 영양외배엽 세포 3×10^4 cells/300 μ l을 confocal dish(catalog number : 100350 , SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 다음 serum-free DME/F12 1:1medium에서 24시간 배양하여 starvation과정을 거친 후, 각각의 영양외배엽 세포 유용물질인 LPA, 쿠메스테롤, 나린제닌, 섬유아세포 증식인자4를 처리하여 24시간 배양한 다음 메탄올을 이용해 세포를 고정한 뒤 신호전달 분자의 항체를 1:100으로 희석하여 상온에서 1시간 배양하고 0.1% BSA-PBS로 상온에서 10분간 3차례 배양해주고, goat anti-rabbit IgG Alexa 488 (Invitrogen)을 1:200으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 배양하고 다시 0.1% BSA-PBS로 상온에서 10분간 3차례 배양해주고 DAPI는 1:1000으로 희석하여 배양한 다음, LSM710 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) 공초점현미경으로 세포를 관찰한 결과, LPA, 쿠메스테롤, 나린제닌, 섬유아세포 증식인자4가 영양외배엽 세포에서 세포증식과 관련된 신호전달 체계인 PI3K/MAPK의 신호 전달 분자의 발현을 증가시키는 것을 형태학적으로 확인하였음. 영양외배엽세포에 LPA를 시간 의존적으로 처리하였을 때 phospho-P90RSK의 발현이 60분에 영양외배엽세포의 핵에서 가장 많이 증가하는 것을 확인하였으며, LPA 수용체의 억제제인 DGPP와 LPA를 함께 처리한 경우 LPA에 의한 phospho-P90RSK의 증가가 억제되는 것을 확인하였음 (Figure 2-2-15. A). 영양외배엽세포에 쿠메스테롤을 처리하였을 때 phospho-AKT가 핵에서 증가하였으며, phospho-ERK1/2는 세포질과 핵에서 증가하는 것을 확인하였음 (Figure 2-2-15. B). 영양외배엽세포에 나린제닌을 처리하였을 때 phospho-AKT와 phospho-ERK1/2는 주로 세포질에서 증가하는 것을 확인하였음 (Figure 2-3-3. C). 영양외배엽세포에 섬유아세포 성장인자4를 처리하였을 때 주로 세포질에서 phospho-RPS6가 증가되는 것을 확인하였으며, 섬유아세포 성장인자4와 LY294002를 함께 처리하였을 때 phospho-RPS6의 증가가 감소되는 것을 확인하였음 (Figure 2-2-15. D).

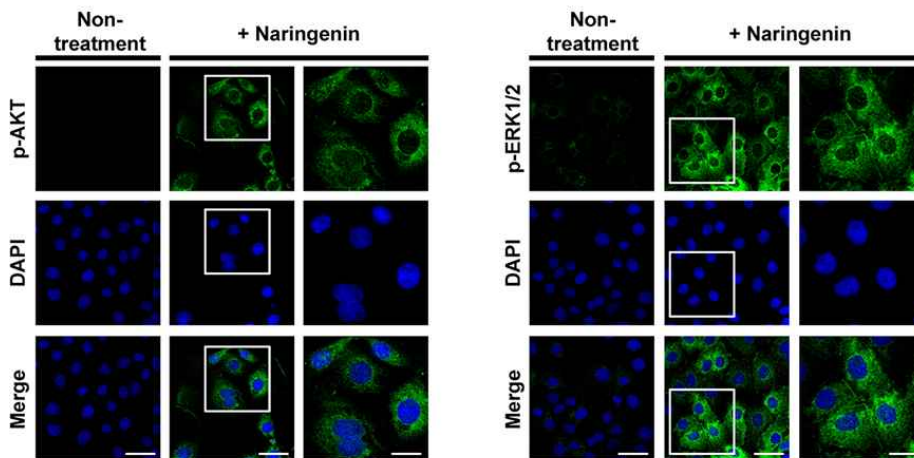
(A) 영양외배엽세포에 LPA와 DGPP 처리 후 immunofluorescence 관찰



(B) 영양외배엽세포에 쿠메스테롤 처리 후 immunofluorescence 관찰



(C) 영양외배엽세포에 나린제닌 처리 후 immunofluorescence 관찰



(D) 영양외배엽세포에 섬유아세포 증식인자4와 LY294002 처리 후 immunofluorescence 관찰

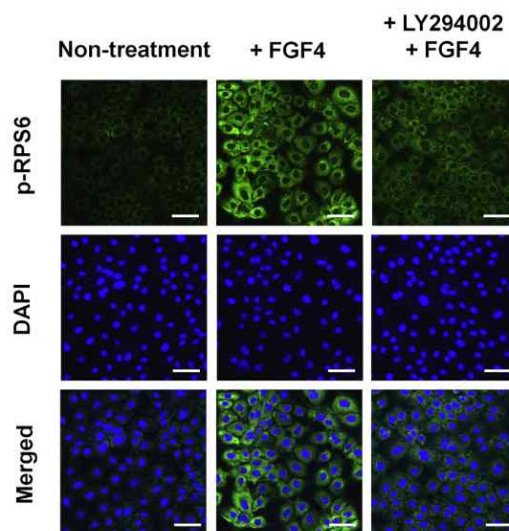


Figure 2-2-15. 영양외배엽 세포에서 유용물질과 inhibitors 처리에 의한 신호전달 분자 관찰 (A-D)

2) 영양외배엽 세포에서 유용물질과 siRNA처리에 의한 기전 억제

LPA의 수용체인 LPAR3 (GenBank accession no. NM_001162402.1)의 mRNA 서열을 목표로 하는 small interfering RNA (siRNA)를 Invitrogen design program을 통해 제작하였음. LPAR3의 Down-regulation은 western blot 분석을 통하여 확인하였으며, 영양외배엽세포에 특이적인 LPAR3 siRNA 또는 컨트롤 siRNA를 처리하고 Lipofectamine 2000(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA)을 처리하여 Silencer negative control 1 siRNA (Ambion, Austin, TX)는 negative control로 사용하였으며 30분간 배양한 뒤 red fluorescein-labeled control siRNA duplexes (Invitrogen)를 사용하여 95%이상의 처리 효율을 확인하였음. 그 결과 특이적인 LPAR3 siRNA 처리에서 LPAR3의 현저한 발현 저하를 확인하였으며, 또한 LPA를 함께 처리하였을 때 신호전달 분자인 phospho-ERK1/2, phospho-P90RSK, phospho-P38의 발현 증가를 억제하는 것을 확인하였으며, 유용물질인 LPA가 그 수용체인 LPAR3와 상호작용하여 PI3K/MAPK 신호 전달 분자의 발현을 증가시켰다가 특이적 siRNA에 의해 LPAR3의 발현이 줄어들어 유용물질과 수용체간의 상호작용이 같이 억제되는 실험 결과로 유용물질과 수용체간의 직접적인 상호작용을 검증하였음 (Figure 2-2-16).

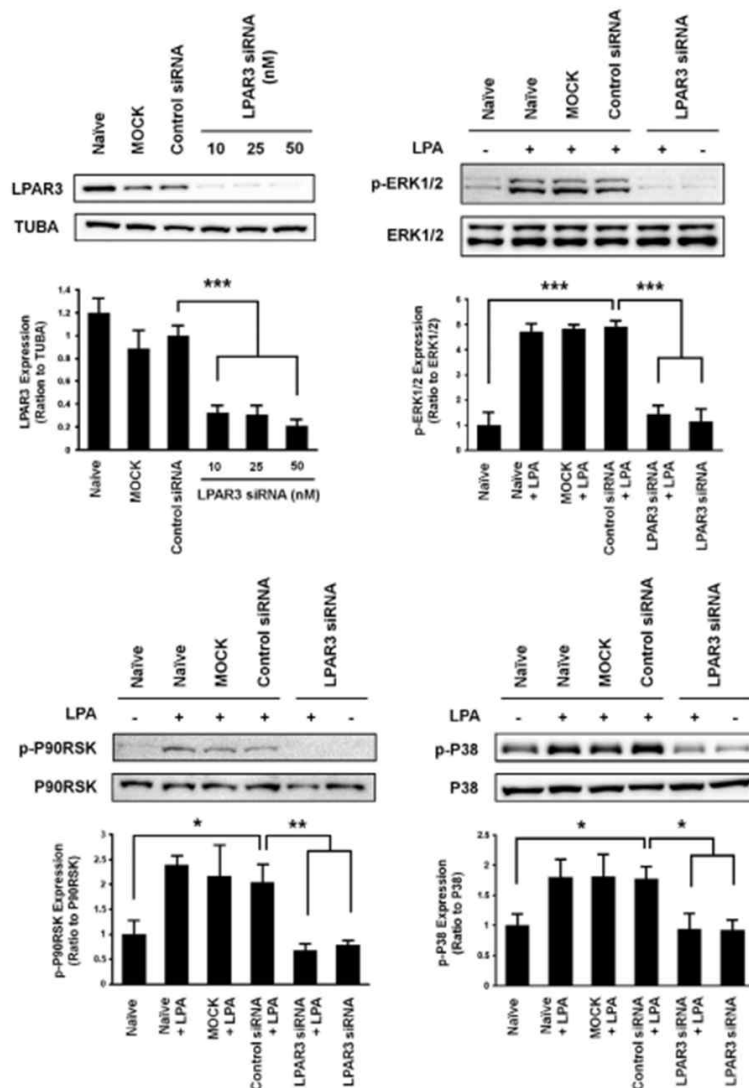
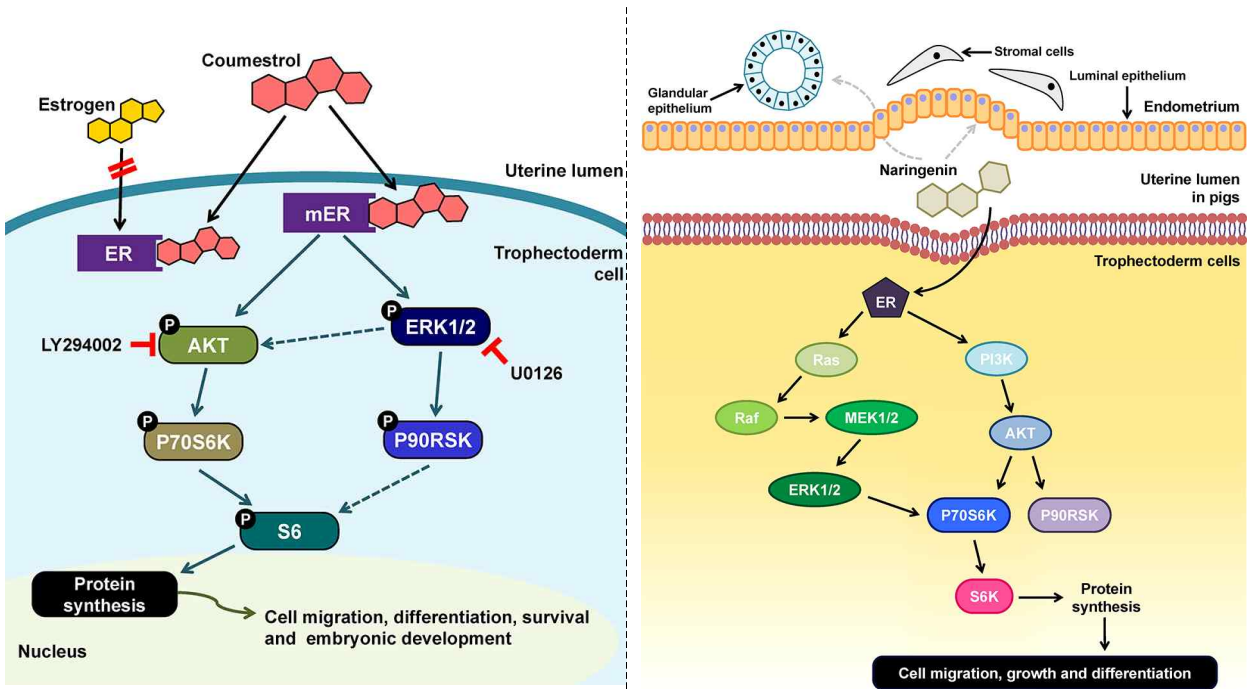


Figure 2-2-16. 유용물질 및 siRNA를 처리하여 신호전달 경로 분석

이러한 영양외배엽세포에 유용물질이 작용하는 분자적 기전을 모식도로 제작함. 쿠메스트롤은 영양외배엽세포의 mER과 결합하여 PI3K의 하위 신호인 phospho-AKT, phospho-P70S6K, phospho-S6를 유도하였으며, RAS의 하위 신호인 phospho-ERK1/2, phospho-P90RSK를 유도하였음. 이들 신호 전달 체계는 phospho-ERK1/2가 phospho-AKT의 상위에 있어 그 하위 인자들을 조절한다는 것을 확인하였고, phospho-P90RSK이 phospho-S6를 조절하여 상호간에 cross-talk이 있음을 확인하였음. 쿠메스테롤에 의한 영양외배엽세포의 신호전달은 단백질합성과 세포 이주, 분화, 생존, 태아 발달을 유도 할 것이라는 실험결과와 가설을 바탕으로 모식도를 제작하였음 (Figure 2-2-17. A). 나린제닌은 피토에스트로젠으로 ER에 결합하여 RAS-RAF-MEK1/2를 통해 phospho-ERK1/2, phospho-P70S6K, phospho-S6K를 증가 시켰으며, PI3K를 통해 phospho-AKT, phospho-P70S6K, phospho-P90RSK를 증가시켜 단백질합성과 세포 이주, 성장 분화를 촉진 할 것이라는 가설을 바탕으로 모식도를 제작하였음 (Figure 2-2-17. B)



(A) 쿠메스테롤이 영양외배엽세포에 미치는 분자적 기전

(B) 나린제닌이 영양외배엽세포에 미치는 분자적 기전

Figure 2-2-17. 유용물질이 영양외배엽세포에 미치는 분자적 기전 모식도 (A-B)

3. 고산차 모돈의 착상효율 증대에 대한 사료첨가물의 효용성 검증

(1) 유용물질의 효과적인 전달을 위한 사료첨가물 선정

앞서 in vitro 상에서 돼지 영양외배엽세포를 대상으로 진행한 실험에서 확인한 유용물질인 LPA, 나린제닌, 쿠메스테롤, 섬유아세포 성장인자4의 4가지 후보물질 중 참고 문헌 조사를 통하여 식물유래 천연물질인 나린제닌을 착상효율 증대에 대한 사료첨가물로 선정

Table 2-3-1. 나린제닌 관련 참고 문헌

나린제닌 관련 연구 진행 내용	
①	나린제닌을 마우스(Mouse)의 임신기간 중 경구 투여하여 산자수 증가를 확인
	참고 문헌 (Rózewska E <i>et al.</i> , Cent Eur J Immunol, 2014)
②	랫트(Rat)를 대상으로 한 실험 결과에서 나린제닌이 호르몬 유사 역할을 하여 자궁의 무게 및 mRNA 발현을 조절한다는 것을 확인
	참고 문헌 (Vollmer G <i>et al.</i> , Mol Cell Endocrinol, 2008)
③	나린제닌이 PGF2(alpha)에 의한 자궁 수축을 억제하는 것을 확인
	참고 문헌 (Wang PS <i>et al.</i> , Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008)
④	사람의 태반과 자궁내막에서 나린제닌의 항염증 효과를 확인
	참고 문헌 (Lappas M <i>et al.</i> , Mol Hum Reprod, 2013)
⑤	여성의 모유 성분을 분석한 결과 나린제닌 (64.1-722.0 nmol/L)이 포함 된 것을 확인
	참고 문헌 (Ferruzzi MG <i>et al.</i> , Nutrition, 2013)

참고 문헌들을 통해 나린제닌이 사람과 동물모델에서 자궁내막 발달 및 수축억제, 항염증 효과가 있는 것을 확인되었으며, 마우스(Mouse)를 대상으로 한 실험에서는 산자 수 증가를 확인하였음. 또한 나린제닌이 모유를 통하여 산자에게 전달되는 것을 확인.

(2) 사료첨가물의 효능 극대화를 위한 급여방법 모색

나린제닌의 사료첨가물 효능을 극대화하기 위하여 농장 실무진과 회의를 통하여 사료 첨가물의 편이성 및 효용성을 동시에 만족시키는 최적의 사료 첨가물 급여 방법과 시기를 선정

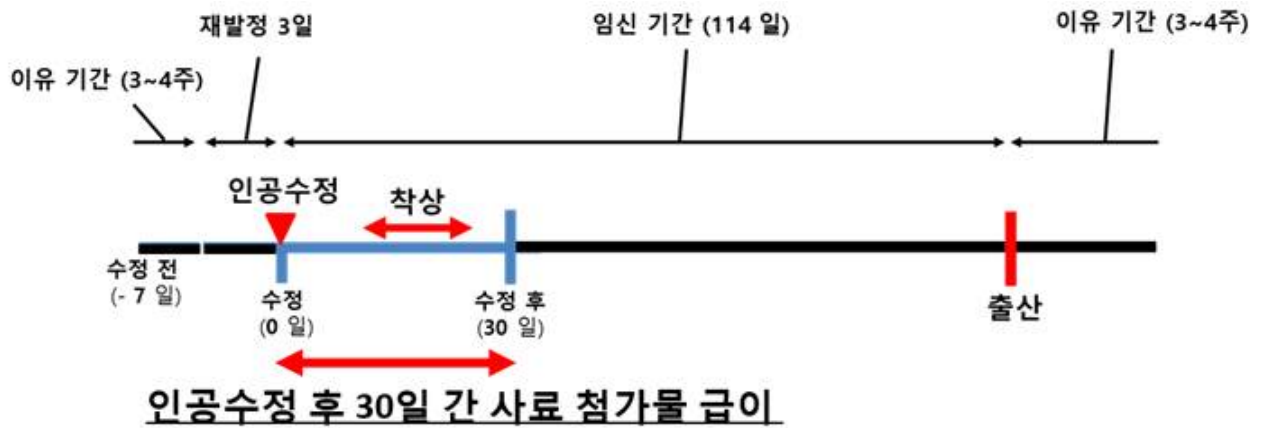


Figure 2-3-1. 사료 첨가물 급여 모식도

나린제닌의 경우 돼지의 영양외배엽 발달 및 착상, 태반 형성의 시기인 인공수정 후 30일간을 사료첨가물 급여 기간을 선정하여 모든 사료의 1%를 첨가하여 매일 급여 하였음.

Table 2-3-2. 기존 특허들에서 사용되고 있는 사료첨가물 예시

돼지의 사료첨가물 함유량 관련 특허	
①	오배자나무 추출물을 이용한 돼지의 사료첨가물 실험에서는 사료 전체 중량대비 0.1%~3%의 함유량과 오배자 분말 사용
	참고 문헌 (특허 출원번호 : 1020080083523)
②	돼지 사료첨가물로 사용되는 소브르산의 경우 0.875%를 사용
	참고 문헌 (특허 출원번호 : 1020020005574)
③	담즙산, 감초, 마늘, 켈라야 껍질 추출물의 돼지 사료첨가물은 0.01%~1%를 사용
	참고 문헌 (특허 출원번호 : 1019900021698)

기준에 돼지 사료에 사용되고 있는 식물유래 추출물의 사료첨가물 특허를 참고하여 나린제닌의 급여량을 사료량의 1%로 선정

(3) 사료첨가물 급여개체와 비급여개체간의 자돈수 비교 분석을 통한 착상축진제 효능검증



Figure 2-3-2. 나린제닌 분말 가루(좌측), 포장 배송 상태(중간, 우측)

나린제닌의 경우 중국에 본사를 가진 Shaanxi Teng Yun에서 구입하였으며, 모든 사료 1kg 당 10g의 나린제닌을 사료 교반기를 이용하여 잘 섞어 준 뒤, 모돈에게 급여하였으며, 자율급여 방법을 이용하여 급여하였음.

나린제닌 급여, 비급여 그룹간 변화를 산차별로 분석한 결과 자돈의 총산자수가 1~2 산차와 3~4산차에는 크게 변화가 없었지만, 5~7 산차 모돈에서는 나린제닌 급여 시에 총산자수가 감소하는 것을 확인하였음. 그러나 3~4 산차와 5~7 산차 모돈에서 실산자수가 증가하는 것을 확인하였으며, 이는 총산자수는 감소하였지만 최종 생존에 이르는 건강한 자돈이 나린제닌 급여 시에 3~4 산차와 5~7 산차에서 증가하는 경향을 확인한 결과이다. 자돈의 생시체중 분석에서는 1~2 산차에서는 나린제닌 급여 시에 감소하지만, 3~4 산차, 5~7 산차에서는 생시체중이 증가하는 것을 확인하였고, 미이라돈, 사산돈, 도태돈을 그룹 별로 분석한 결과 1~2 산차, 3~4 산차에서는 큰변화가 없거나 소폭 감소하는 것을 확인하였으나, 5~7 산차 모돈에서는 자돈의 미이라, 사산, 도태가 감소하는 것을 확인하였음. 이러한 결과는 5~7 산차의 임신초기 모돈에게 나린제닌 급여가 보다 건강한 자돈을 생산하게 하여 실산자수를 증가시키는 효과를 확인한 것이며, 고산차 모돈의 실산자수 증대에 대한 사료첨가물로서 나린제닌의 효과를 검증한 결과이다.

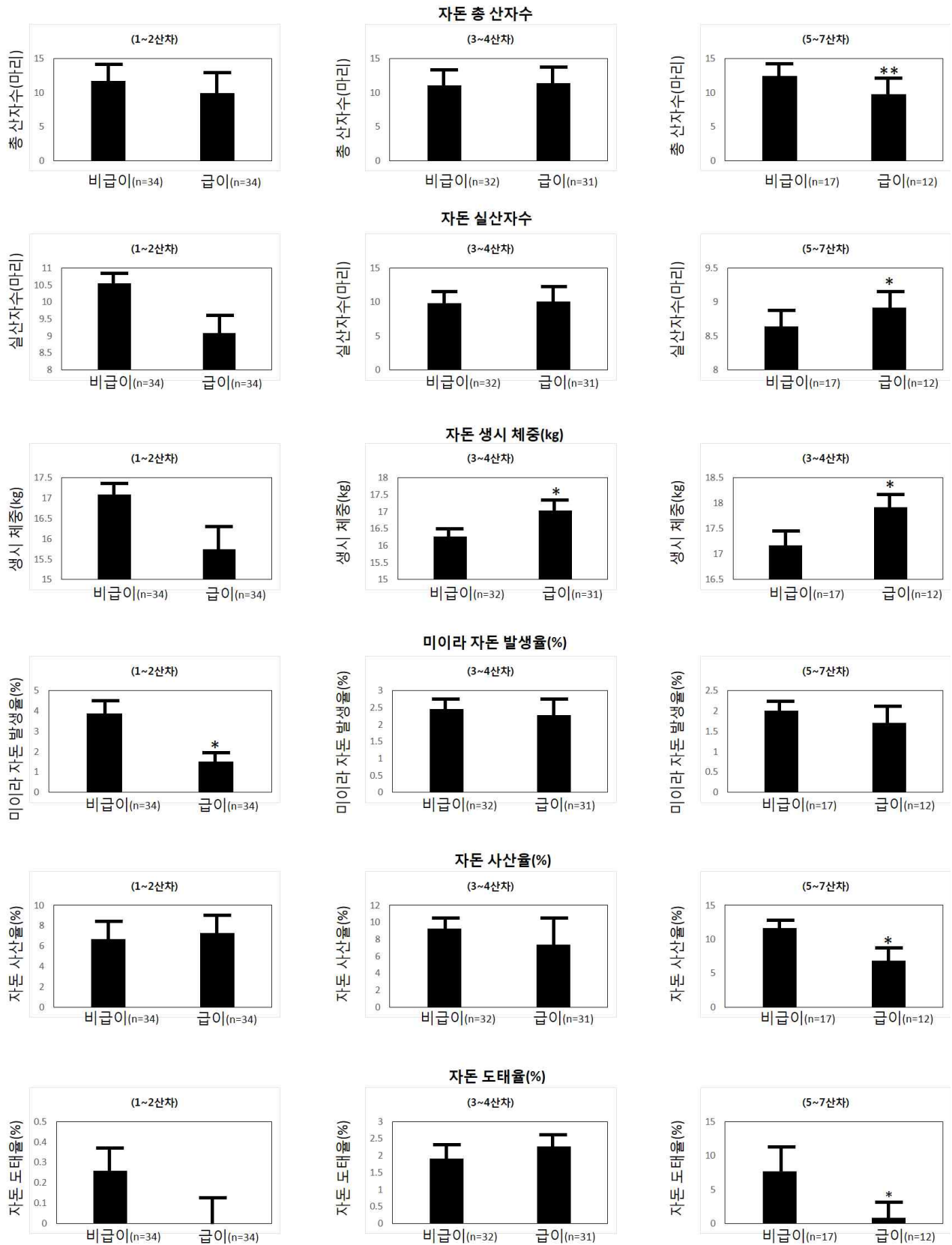


Figure 2-3-2. 나린제닌 급이, 비급이 그룹 간 자돈 분석

제 3 절 모든 면역조절을 통한 자돈생존율 개선기술 개발

1. 모든의 산차별 면역수준 차이 구명

본 과제에 이용된 실험돈은 Yorkshire 품종으로 동일 농장에서 조성하였음.

Table 3-1-1. 실험용 모든 정보

개체번호	산차	임신 기간	이전 산차 실산자수	모든 생애 실산자수 평균
9803	1	28일	-	-
9899	1	29일	-	-
0091	1	29일	-	-
0224	1	28일	-	-
0141	1	28일	-	-
6836	3	27일	12	11
6901	3	27일	14	15
6911	3	29일	13	14
6869	3	28일	11	10.5
6797	3	28일	12	12.5
2169	6	27일	12	11.4
2746	6	27일	15	12.25
2559	6	27일	15	14.25
2074	6	27일	14	13
2493	6	27일	9	10

실험 그룹은 1, 3, 6 산차 각각 5마리의 모돈을 그룹으로 하여 인공수정 후 27~29일 후 대구에 위치한 축산물도매시장에서 도축하여 자궁내막 조직과 혈액 샘플을 채취하였음.

(1) 산차별 모돈의 자궁 내 번식관련 면역기관의 면역세포 분석

산차별 모돈의 자궁내막에서 면역세포를 분석하기 위하여 자궁 내막 조직을 가로 세로 1cm 크기로 적출하여 -80℃에 보관하였음. 이 후 조직에서 RNA를 분리하기 위하여 트리졸 (Trizol, Invitrogen) 1ml에 조직을 넣고 균질화(homogenization)시킨 후 200µl의 chloroform(Sigma)을 넣어 전체 RNA를 분리하였고, 이 때 추출한 5µg의 mRNA를 주형으로 Superscript III(Invitrogen) 역전사 효소(Reverse transcriptase)를 이용하여 역전사 연쇄중합반응에 의해 cDNA를 합성하였음. 상기 cDNA를 주형으로 하여 유전자 database에서 얻은 염기 서열에 따라 프라이머를 제작한 후, SybrGreen realtime PCR을 이용하여 VEGF, HIF-1α, Fas, FasL, IFN-γ, TNF-α, IL-4, IL-10 유전자 발현을 측정하였음. 이 때 사용되어진 primer set는 Table 3-1-2에 나타냄. 본 실험을 위한 혼합물에는 각각 cDNA 1µl, 프라이머 300nM, 2X SybrGreen qPCR Master Mix(CellSafe), D.W를 추가하여 최종부피가 15µl가 되도록 하였으며, 반응조건은 95℃에서 3분 반응한 후, '95℃에서 10초, 55℃에서 15초, 72℃에서 30초'를 한 cycle로 하여 총 40 cycle을 반복하였음.

Table 3-1-2. Realtime PCR에 사용되어진 primer set¹

primer sequence	product size(bp)	GeneBank Access number
<i>pVEGF</i>		
F: 5'-ACGAAGTGGTGAAGTTCATGGACG	203	JF831364
R: 5'-CTGCATGGTGATGTTGAACTCCTC		
<i>pHIF-1α</i>		
F: 5'-GAGAAGTCTAGAGATGCAGCCAG	132	NM_001123124
R: 5'-GGTAAGCCTCATAACAGAAGCCT		
<i>pIFN-γ</i>		
F: 5'-CTCAGATGTACCTAATGGTGGACCTC	172	NM_213948
R: 5'-GTCTTGCTTGATCACATCCATGCTC		
<i>pFasL</i>		
F: 5'-ACCAACACTCCTGCCATCAAGACC	99	NM_213806
R: 5'-TTGGCTGGCAGACTCTCTGAGTTC		
<i>pFas</i>		
F: 5'-GATGGAGAACACGGCCTAGAAG	162	NM_213839
R: 5'-GCTGGTTGGTGTGCAATTCTCA		
<i>pTNF-α</i>		
F: 5'-ATGAGCACTGAGAGCATGATCC	171	X57321
R: 5'-GCCGATAACCTCGAAGTGCAGTAG		
<i>pIL-4</i>		
F: 5'-CATGTACCAGCAACTTCGTCCA	155	NM_214123
R: 5'-TTCCTTCTCCGTCGTGTTCTCT		
<i>pIL-10</i>		
F: 5'-CTCTATTGCCTGATCTTCCTGG	234	NM_214041
R: 5'-CTGGATCATCTCTGACAAGGCT		
<i>pGAPDH*</i>		
F: 5'-AAGCTCACTGGCATGGCCTT	168	NM_001206359
R: 5'-CACAACTGGTCCTCAGTGTAG		

¹p, porcine; F, forward (sense); R, reverse (antisense) primer; *housekeeping gene

그 결과, 모체 태아 접촉면에서 혈관형성에 관여하는 유전자인 VEGF와 HIF-1 α 의 발현을 비교했을 때, VEGF의 경우 1산차와 3산차에 비해 6산차에서 유의적으로 감소하는 경향을 보였으며, VEGF를 조절하는 HIF-1 α 의 경우 1산차에 비해 3산차에서 유의적으로 증가하고 3산차에 비해 6산차에서 유의적으로 감소하는 경향을 보임(Figure 3-1-1).

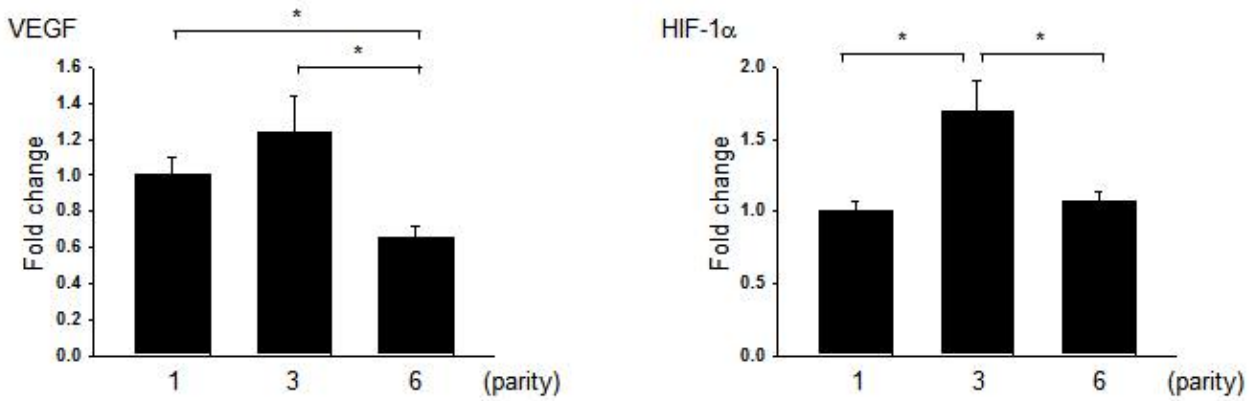


Figure 3-1-1. 산차별 자궁내막 조직 내 VEGF, HIF-1 α mRNA 발현 비교

또한, 세포자멸사(Apoptosis) 관련 유전자인 Fas, FasL의 발현이 산차에 따라 증가하는 경향을 보였으며 1산차에 비해 6산차에서의 발현이 유의적으로 증가하였음을 확인함(Figure 3-1-2).

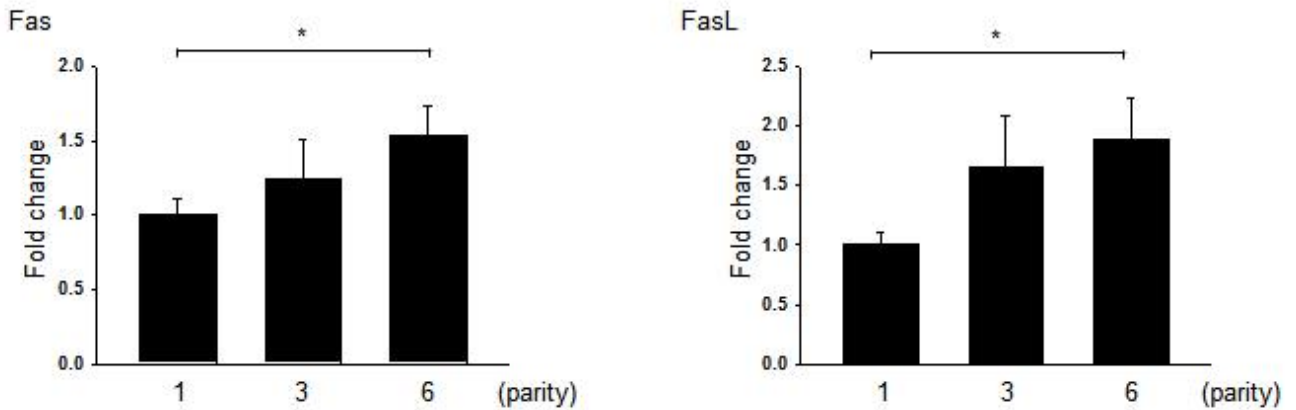


Figure 3-1-2. 산차별 자궁내막 조직 내 Fas, FasL mRNA 발현 비교

모체 태아 접촉면의 사이토카인은 태아의 성공적인 착상을 위해 매우 중요함. IFN- γ 및 TNF- α 와 같은 Th₁ type의 사이토카인이 높을 시 모체가 태아를 비자기로 인지하여 공격하게 됨. 실험결과 산차가 높아질수록 Th₁ type 사이토카인인 IFN- γ 와 TNF- α 의 증가가 보이지만 TNF- α 만 유의적인 차이를 보임. Th₂ type 사이토카인인 IL-4와 IL-10은 유의적인 차이를 보이지 않음(Figure 3-1-3).

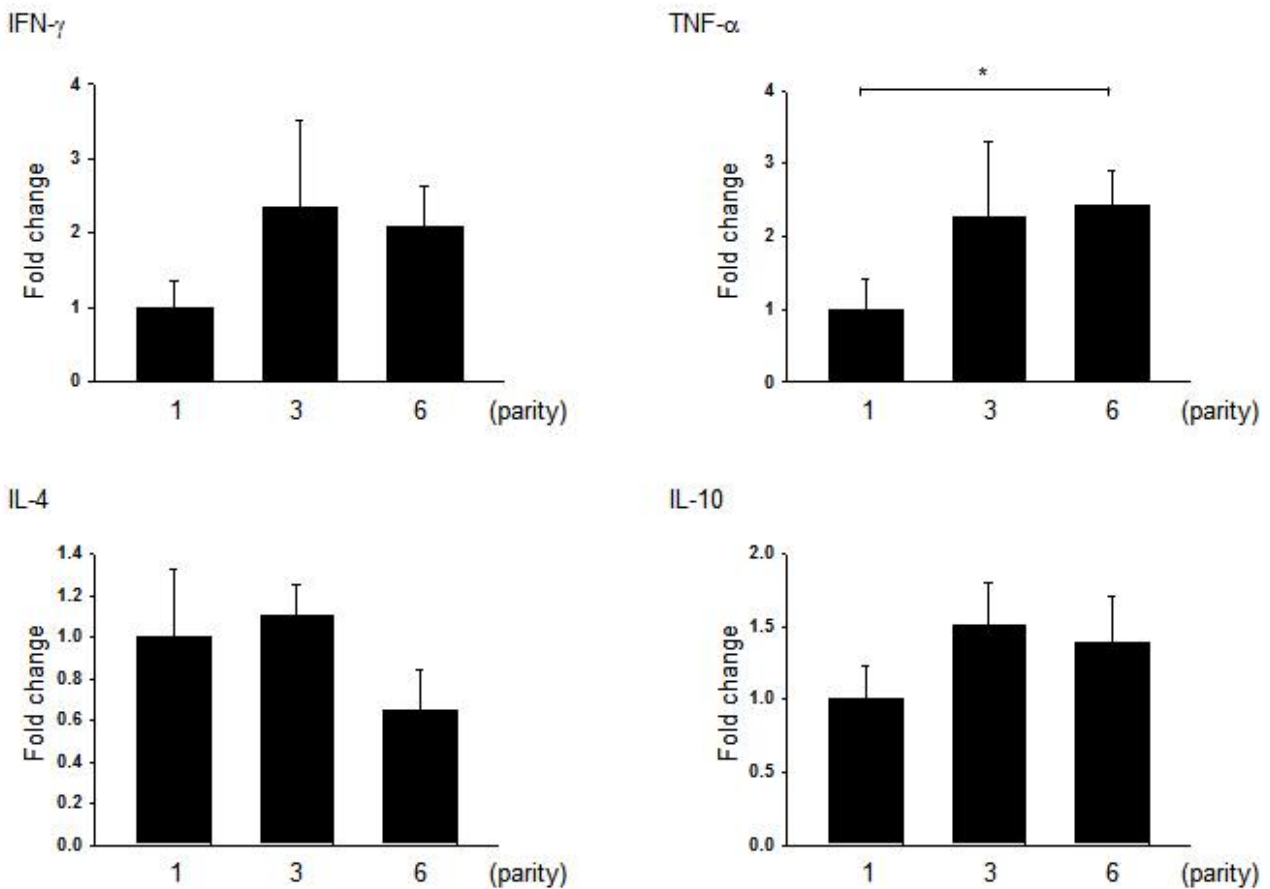


Figure 3-1-3. 산차별 자궁내막 조직 내 사이토카인 mRNA 발현 비교

(2) 저산차모돈과 고산차모돈의 면역관련지표 분석

저산차모돈과 고산차모돈의 면역관련지표를 분석하기 위하여 산차별 혈액샘플을 채취하였음. 모돈 혈액샘플로부터 Ficoll-Paque PLUS(GE Healthcare)를 이용하여 밀도구배원심분리(Density gradient centrifugation)를 시행함. 이 후 맨 위 층의 플라즈마와 Ficoll 층 사이의 PBMCs(Peripheral blood mononuclear cells)를 분리함. 분리한 PBMCs를 96 well 세포배양배지에 5×10⁵/well 농도로 10% 우태아 혈청(FBS), 1% 페니실린/스트렙토마이신과 25mM HEPES를 함유한 RPMI-1640(Invitrogen) 배지에서 배양함. 이 때 생체 외(*In vitro*) 자극 신호를 주기 위해서, PHA(Phytohaemagglutinin)를 10 μ g/ml의 농도로 24시간 및 72시간 처리한 하여 배양함. 배양이 끝난 세포의 RNA를 분리하기 위하여 트리졸(Trizol, Invitrogen) 1ml로 풀

어준 후 200 μ l의 chloroform(Sigma)을 넣고 전체 RNA를 분리하였고, 이 때 추출한 2 μ g의 mRNA를 주형으로 Superscript III(Invitrogen) 역전사 효소(Reverse transcriptase)를 이용하여 역전사 연쇄증합반응에 의해 cDNA를 합성하였음. 이 후, 상기 cDNA를 주형으로 하여 유전자 database에서 얻은 염기서열에 따라 프라이머를 제작한 후, Sybr Green realtime PCR을 이용하여 Th₁ type 사이토카인인 IFN- γ , TNF- α , Th₂ type 사이토카인인 IL-4, IL-10 유전자 발현을 측정하였고, 이에 따른 Th₂ type cytokine 대비 Th₁ type 사이토카인의 비율을 측정함. 이 때 사용되어진 primer set는 Table 3-1-2에 나타내었음. 본 실험을 위한 혼합물에는 각각 cDNA 1 μ l, 프라이머 300nM, 2X SybrGreen qPCR Master Mix(CellSafe), D.W를 추가하여 최종부피가 15 μ l가 되도록 하였으며, 반응조건은 95 $^{\circ}$ C에서 3분 반응한 후, 95 $^{\circ}$ C에서 10초, 55 $^{\circ}$ C에서 15초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초'를 한 cycle로 하여 총 40 cycle을 반복하였음.

PHA로 24시간 동안 생체 외 자극신호를 준 결과 Th₁ type 사이토카인인 IFN- γ 와 TNF- α 가 산차가 올라감에 따라 발현양이 증가하는 경향을 보였으며 1산차에 비해 6산차에서 유의적으로 증가함을 확인함. 반면 Th₂ type 사이토카인인 IL-4와 IL-10의 경우 유의적으로 차이가 없었음(Figure 3-1-4).

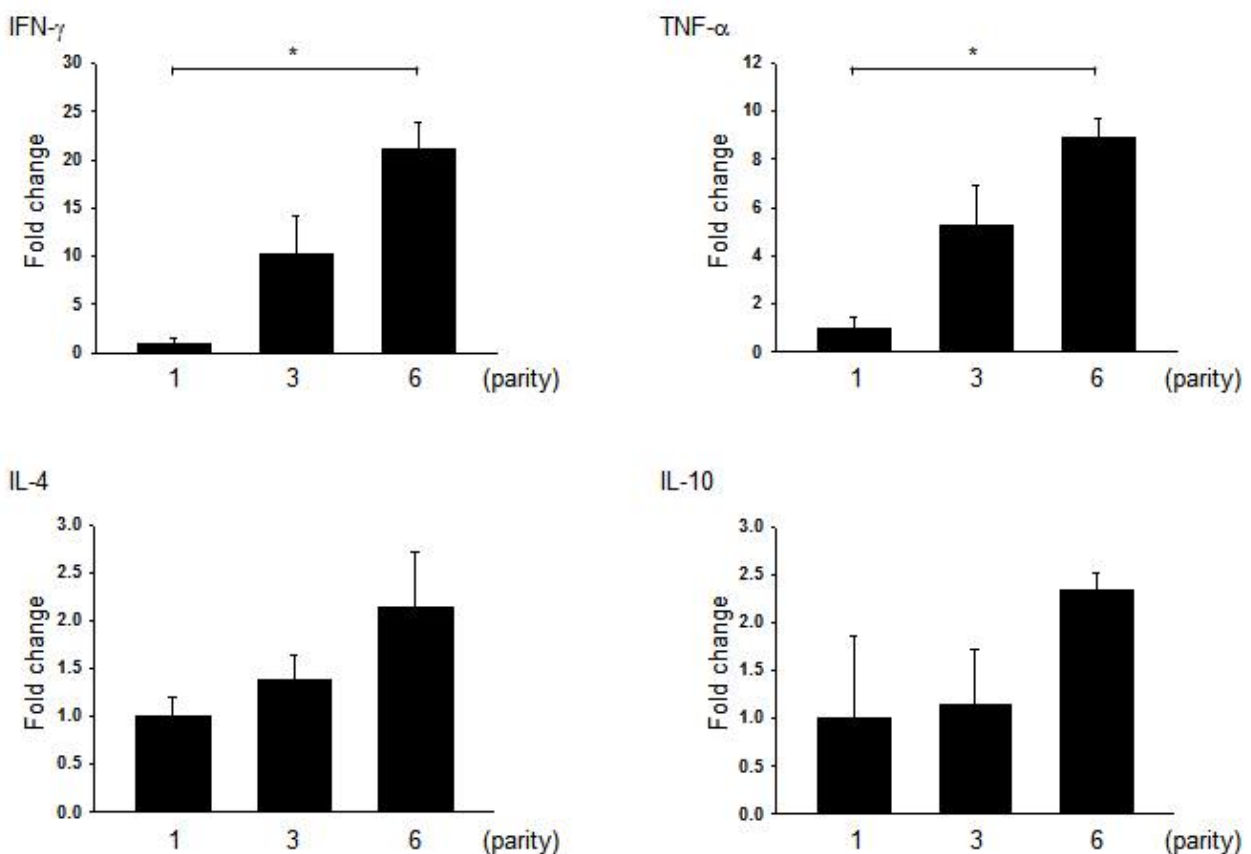


Figure 3-1-4. PHA로 24시간 자극을 준 PBMCs의 사이토카인 발현 비교

면역관련 지표를 확인하기 위하여 Th₁ type 사이토카인과 Th₂ type 사이토카인의 비율을 GAPDH로 평균화한 사이토카인의 평균값으로 구한 결과 IL-4 대비 IFN- γ 와 IL-10대비 IFN- γ 의 비율이 증가하는 경향을 보이며 IL-4 대비 IFN- γ 는 1산차에 비해 6산차에서 유의적으로 증가하였으며 IL-10 대비 IFN- γ 는 1산차에 비해 3산차 6산차 모두 유의적으로 증가하는 것을 확인함. 반면 IL-4대비 TNF- α 와 IL-10 대비 TNF- α 의 경우 1산차에 비해 3산차 6산차가 증가하는 경향은 보였으나 유의적인 차이는 보이지 않음(Figure 3-1-5).

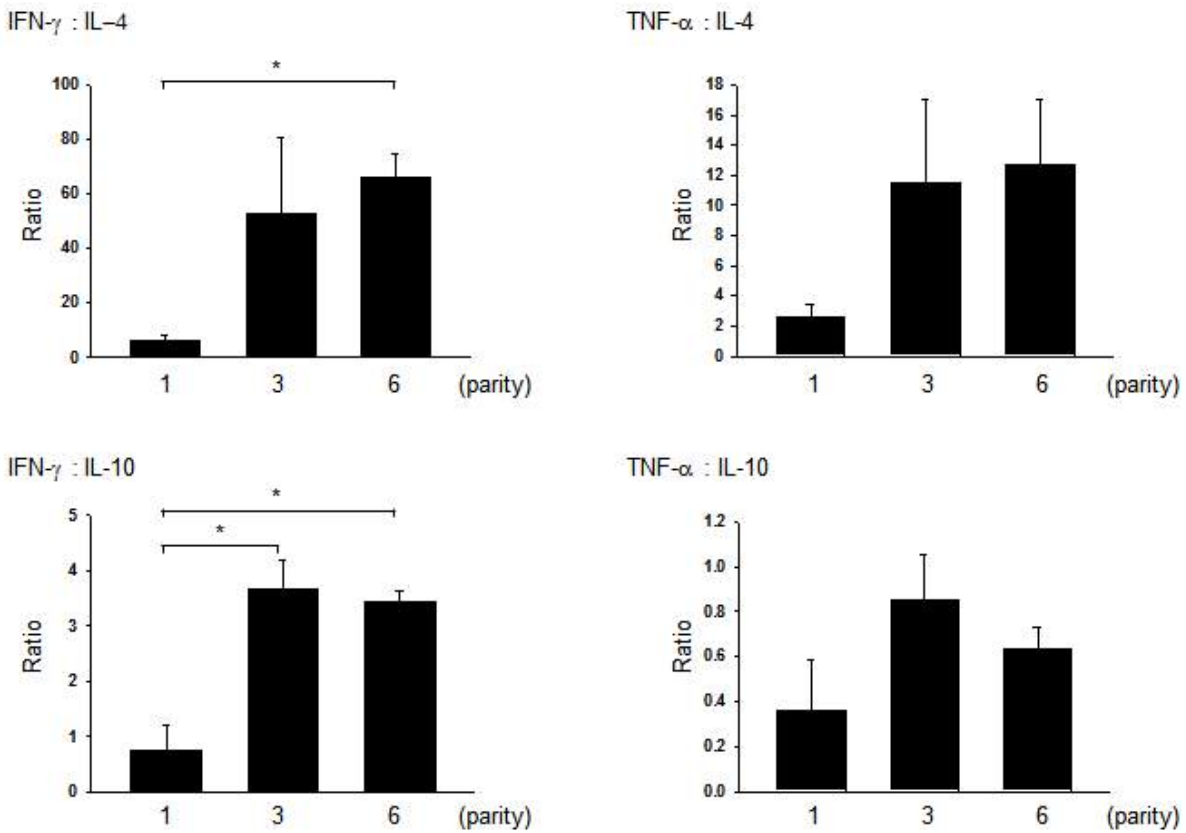


Figure 3-1-5. PHA로 24시간 자극을 준 PBMCs의 Th₁/Th₂ 사이토카인 비율

PHA로 72시간 동안 생체 외 자극신호를 준 경우에는 24시간 처리 결과에 비해 Th₁ type 사이토카인이 더욱 뚜렷한 증가경향을 보였으며 IFN- γ 와 TNF- α 모두 1산차에 비해 3산차, 6산차가 유의적으로 증가경향을 보임. 반면 Th₂ type 사이토카인인 IL-4와 IL-10은 유의적인 차이가 없었음(Figure 3-1-6).

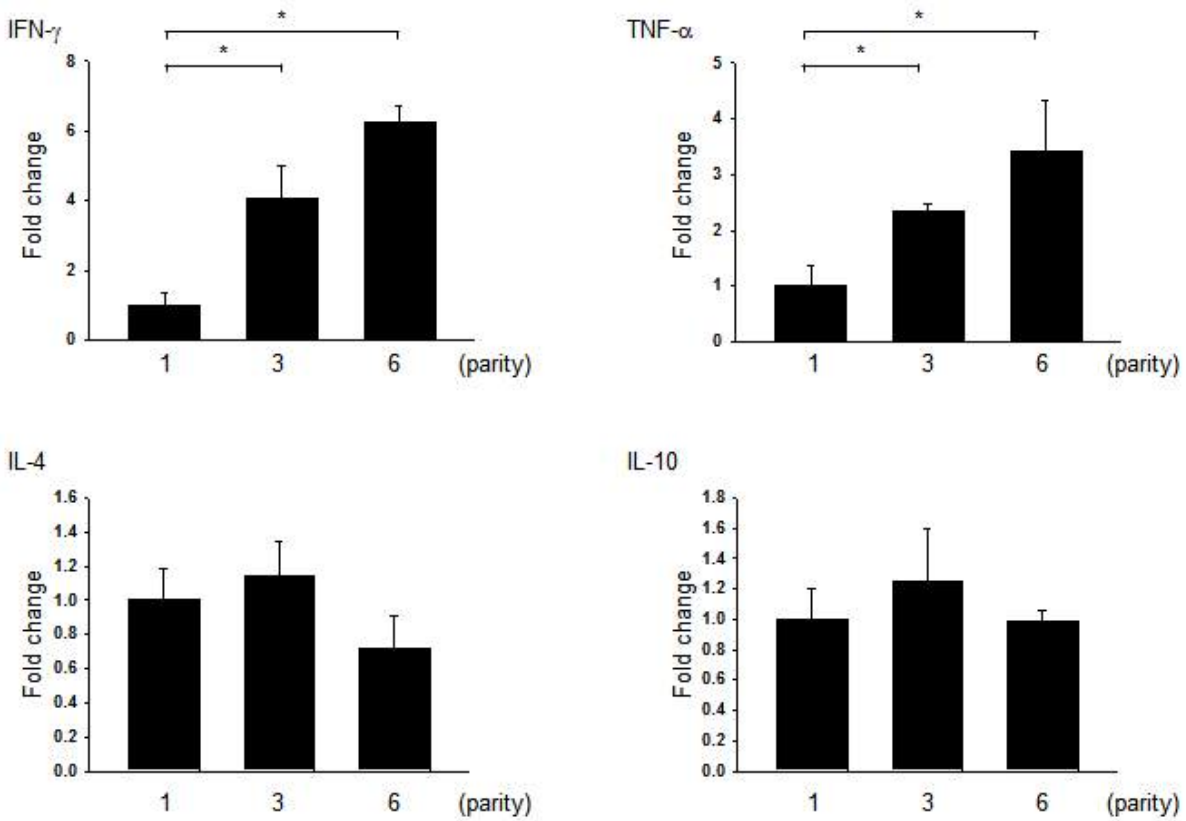


Figure 3-1-6. PHA로 72시간 자극을 준 PBMCs의 사이토카인 발현 비교

72시간 처리 그룹의 경우 Th₁ type 사이토카인과 Th₂ type 사이토카인의 비율이 24시간에 비해 더욱 뚜렷하게 나타나는 것을 확인함. IL-4대비 IFN- γ 의 경우 1산차에 비해 3산차, 6산차가 유의적으로 증가하였으며, IL-4대비 TNF- α 의 경우에는 1산차에 비해 3산차, 6산차가 유의적으로 증가하였고, 3산차에 비해 6산차 또한 유의적인 증가를 확인함. 또한 IL-10 대비 IFN- γ 와 TNF- α 모두 산차가 높은 그룹에서 유의적으로 증가하는 경향을 보임(Figure 3-1-7).

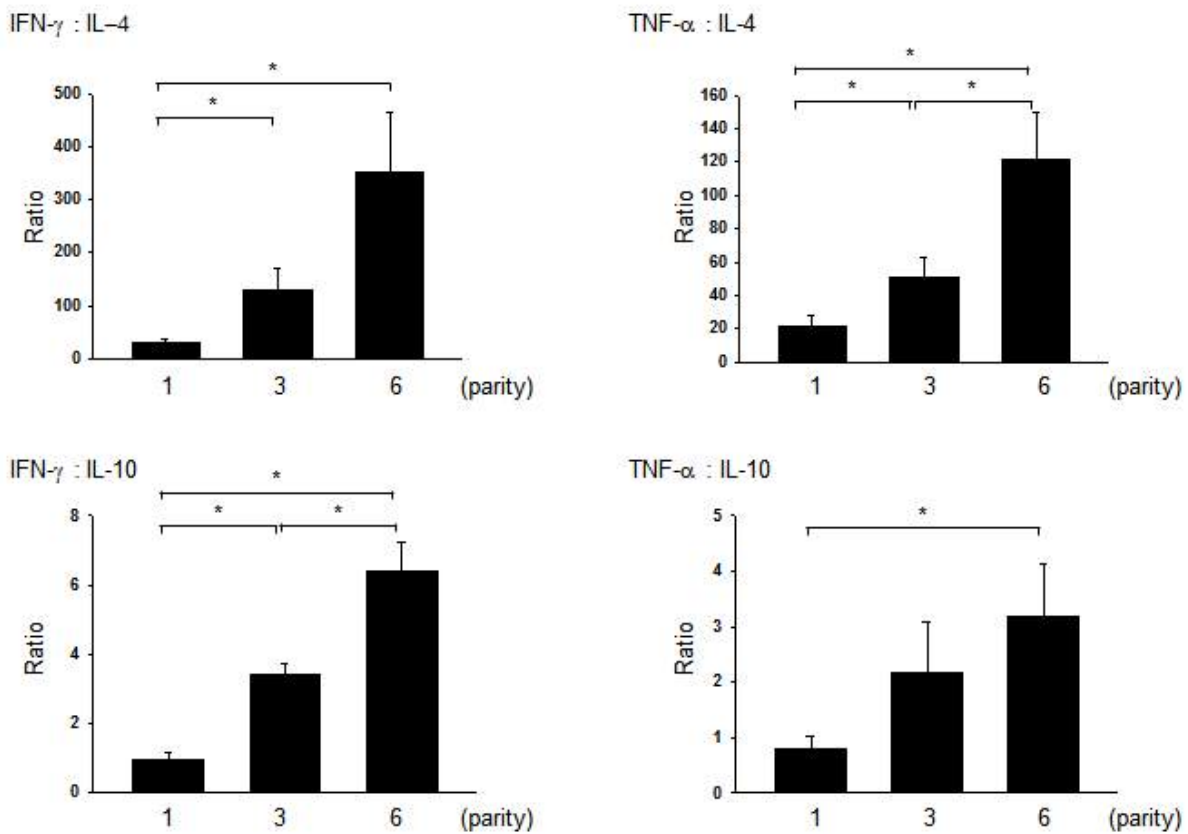


Figure 3-1-7. PHA로 72시간 자극을 준 PBMCs의 Th₁/Th₂ 사이토카인 비율

Figure 3-1-5와 Figure 3-1-7에 나타난 Th₁ type 사이토카인과 Th₂ type 사이토카인의 비율은 Table 3-1-3에 수치화함.

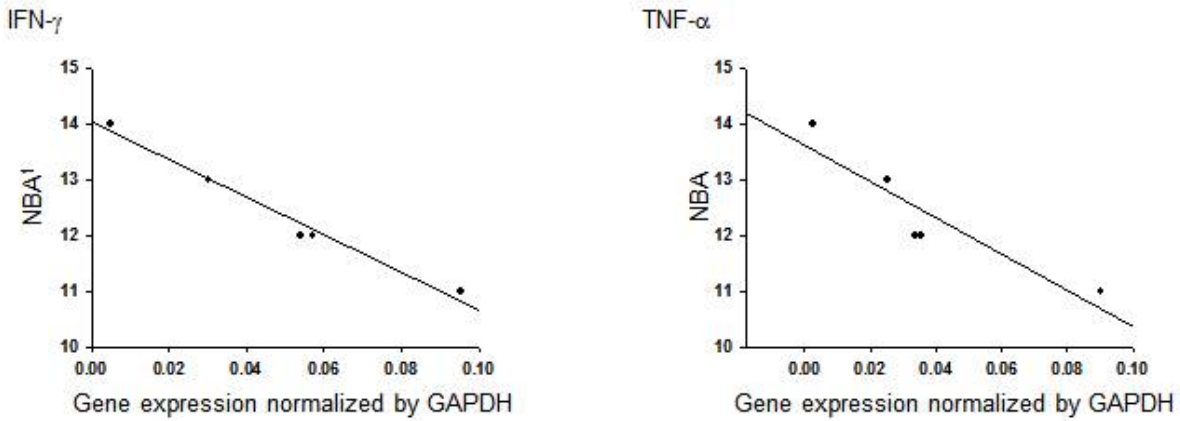
Table 3-1-3. PHA로 자극을 준 PBMCs의 Th₁/Th₂ 사이토카인 비율

Cytokine ratio	parity		
	1	3	6
24h culture			
IFN-g : IL-4	5.98±2.19	52.63±28.38	65.97±9.08
TNF-a : IL-4	2.61±0.78	11.55±5.48	12.68±4.35
IFN-g : IL-10	0.77±0.45	3.66±0.54	3.43±0.20
TNF-a : IL-10	0.36±0.23	0.85±0.20	0.63±0.10
72h culture			
IFN-g : IL-4	31.40±6.07	129.89±39.29	351.30±111.87
TNF-a : IL-4	21.31±6.55	50.78±11.96	121.56±28.43
IFN-g : IL-10	0.95±0.21	3.43±0.31	6.41±0.81
TNF-a : IL-10	0.81±0.21	2.18±0.91	3.18±0.94

결과적으로 모돈의 산차가 증가할수록 Th₁ type 쪽으로 이동하는 경향을 보임. 따라서 산차에 따른 모돈의 산자수 감소는 이러한 Th₁ type의 사이토카인이 활성화되어 태아의 착상시에 악영향을 주는 것으로 예상됨.

(3) 면역관련지표에 의한 자돈생존율 변화 측정

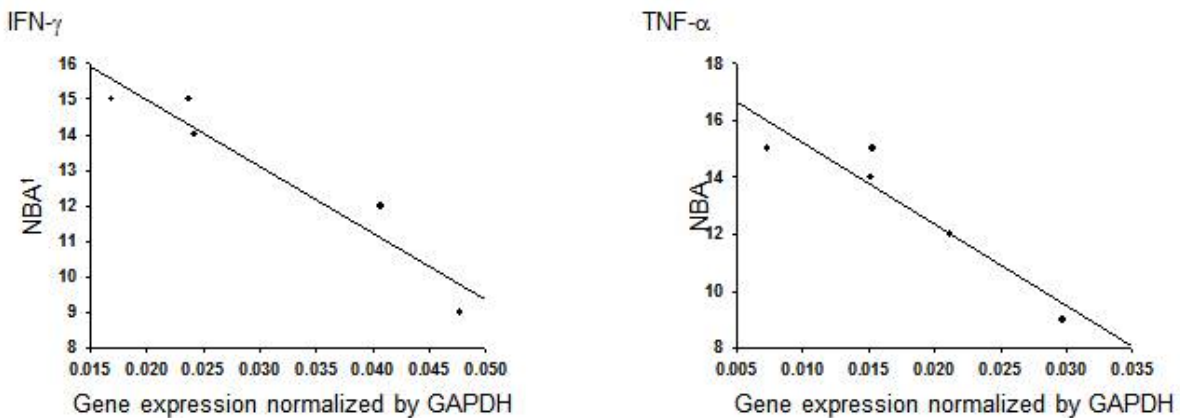
면역관련지표인 Th₁ type 사이토카인인 IFN- γ 와 TNF- α 의 발현정도와 3산차 모돈의 이전 산차에서 실산자수와와의 연관성을 확인한 결과 자궁내막에서의 Th₁ type의 사이토카인의 발현이 높은 개체들의 실산자수가 감소하는 경향을 확인함(Figure 3-1-8).



¹ NBA, number of piglets born alive

Figure 3-1-8. 3산차 모돈의 면역관련지표와 실산자수의 연관성

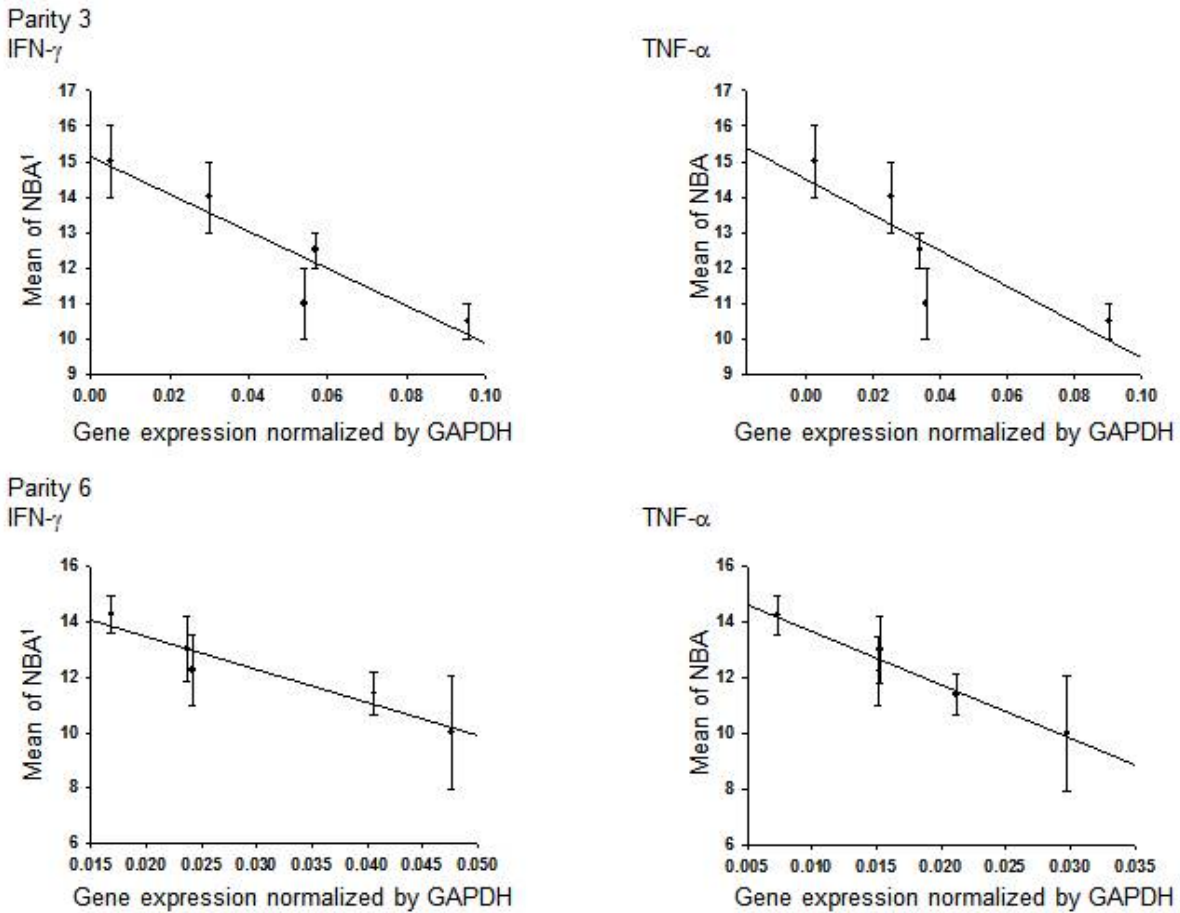
마찬가지로 6산차에서도 이전 산차의 실산자수와 임신 시 자궁내막의 Th₁ type의 사이토카인 발현이 음성적으로 연관성이 있음을 확인(Figure 3-1-9).



¹ NBA, number of piglets born alive

Figure 3-1-9. 6산차 모돈의 면역관련지표와 실산자수의 연관성

또한 모든의 생애 실산자수의 평균과 Th₁ type 사이토카인의 발현과의 연관성을 확인한 결과 개체별로 Th₁ type의 사이토카인의 발현이 높은 개체일수록 모든의 생애 산자수 평균이 감소하는 경향을 보임(Figure 3-1-10).



¹ NBA, number of piglets born alive

Figure 3-1-10. 모든의 변역관련지표와 생애 실산자수 평균과의 연관성

2. 면역관련지표의 조절이 가능한 사료 첨가물 발굴

(1) 모든의 면역관련지표를 조절할 수 있는 유용물질 screening

1차년도 모돈을 대상으로 한 면역관련지표 분석 시 Th₁ 면역반응과 산자수와의 음성적 상관관계를 확인하였음. 따라서 모든의 면역관련 지표를 조절하기 위한 유용물질로는 Th₁ 면역반응을 억제 시킬 수 있는 물질을 대상으로 screening함. 그 중 동아시아에서 주로 한약재로 쓰이는 다년생 초본식물인 백선 뿌리껍질에서 추출한 단일화합물을 대상으로 면역억제 효과를 실험실 이전 연구에서 확인하였음. 그 중 Dictabretol A가 면역억제의 효과가 있어 본 연구에서는 백선 뿌리 껍질에서 추출한 단일 화합물 중 Dictabretol A를 대상으로 면역억제 효과와 더불어 분자적 기전을 분석하였음. 대상으로 한 단일 화합물을 Figure 3-2-1에 표시하였음.

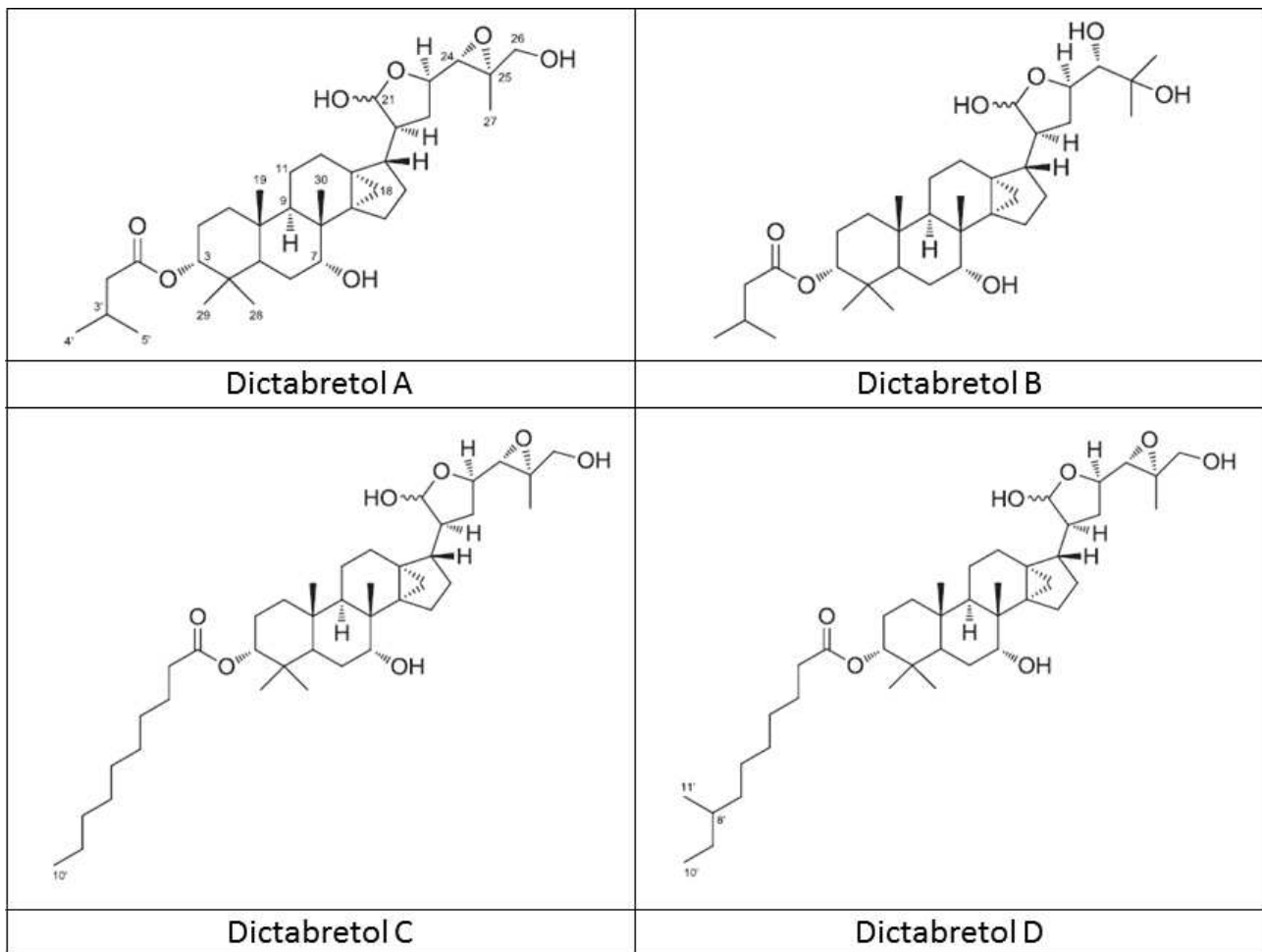


Figure 3-2-1. 백선피에서 추출한 단일 화합물의 구조

(2) 유용물질에 대한 세포수준의 효능검증

(가) 백선 추출물의 면역세포에 대한 세포독성 측정

백선피에서 추출한 단일화합물의 세포독성을 확인하기 위하여 RMA (생쥐 T 세포주), A20 (생쥐 B 세포주)와 B6 splenocyte를 RMA 세포주와 A20 세포주는 6 well 세포배양배지에 5×10^5 /well의 농도로 B6 splenocyte의 경우 96well 세포배양배지에 5×10^5 /well의 농도로 10% 우태아 혈청(FBS), 1% 페니실린/스트렙토마이신과 25mM HEPES를 함유한 RPMI-1640 (Wellgene) 배지에서 배양함. J774 (생쥐 대식세포) 세포주는 6 well 세포배양배지에 5×10^5 /well의 농도로 10% 우태아 혈청(FBS), 1% 페니실린/스트렙토마이신을 함유한 DMEM (Wellgene) 배지에서 배양함. 이 때 Dictabretol A를 10% DMSO(sigma)를 포함한 PBS에 녹인 후, 총 배양액 부피의 1/100을 취하여 각각 0, 0.5, 1, 2 μ M의 농도로 24시간 처리하여 배양함. 배양이 끝난 세포를 PI(Propidium Iodide) staining 후 유세포 분석기로 분석하였음. 이때 생존한 세포의 측정은 PI^{low} 세포를 생존한 것으로 간주하였음.

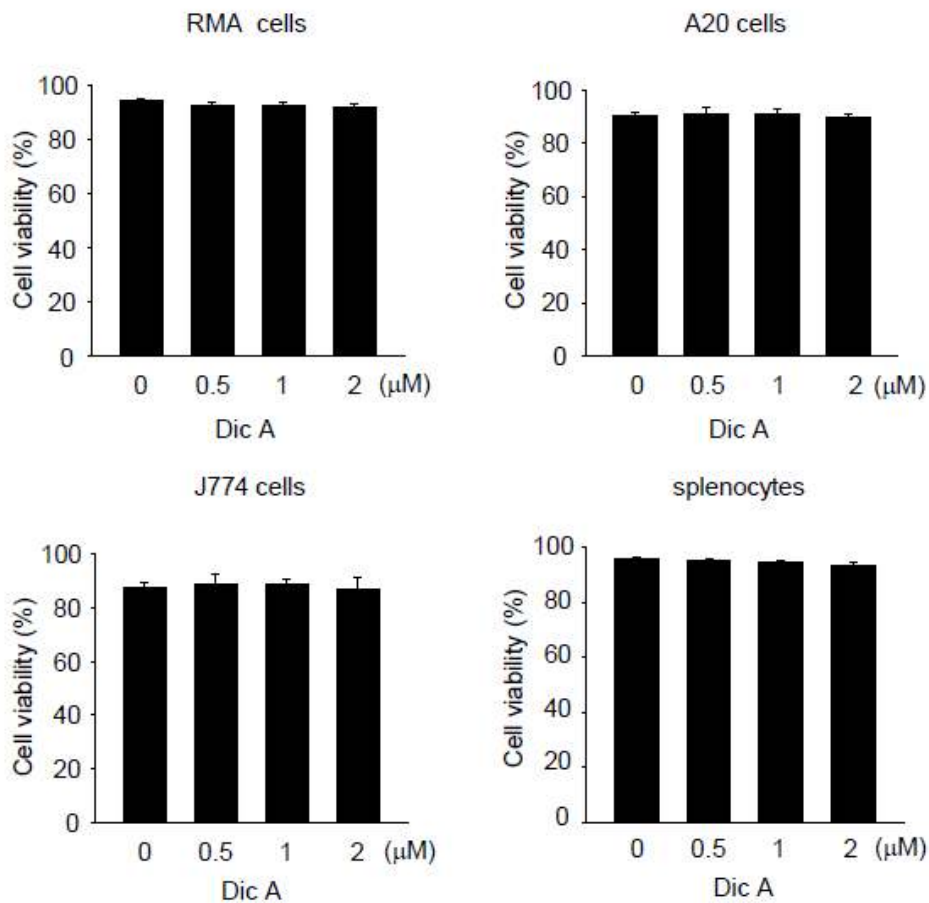


Figure 3-2-2. 백선 추출물의 세포독성 측정

그 결과, RMA, A20, J774 세포주와 B6 생쥐의 비장세포에 0, 0.5, 1, 2 μ M 처리 시 모두 유의적 차이가 없음을 확인하였음. 이는 Dictabretol A가 2 μ M까지 처리 시에는 면역세포에 세포독성이 없음을 의미함(Figure 3-2-2).

(나) 백선 추출물 처리에 의한 면역세포의 세포증식능력 억제효과 분석

백선 추출물 처리에 의한 면역세포의 세포 증식(cell proliferation)에 미치는 영향을 측정하기 위하여 CFSE [Carboxyfluorescein succinimidyl ester] proliferation assay를 이용하여 세포 증식을 측정하였음. 세포주 실험으로는 세포독성 실험과 동일한 세포주를 각각 1×10^7 을 0.1% 우태아 혈청이 함유된 PBS에 1.5uM CFSE로 상온에서 8분간 1ml에 혼합한 후 100% 우태아 혈청을 1ml 혼합하고 37°C에서 10분 동안 인큐베이션 진행함. 이어 1500rpm에 5분 동안 원심분리 후 상층액을 버리고, 세포들을 2% 우태아 혈청이 함유된 PBS로 3회 세척하여 CFSE staining을 한 후 다시 count하여 6well 조직배양 플레이트에 1×10^5 /well의 농도로 staining된 세포를 세포독성 실험과 동일한 조건의 배지에서 배양하였다. 이 때 Dictabretol A의 최종농도가 0.1% DMSO로 2uM 농도가 되도록 처리하고 1일, 3일, 5일 후에 유세포 분석기를 이용하여 세포의 형광 감소정도를 측정하여 세포의 증식능력 정도를 측정하였음. 또한 primary cell 에서 세포증식에 미치는 영향을 측정하기 위하여 8주령에서 10주령 형질전환 생쥐(trnasgenic mouse)인 OT II 생쥐의 비장(spleen)을 분리하여 세포 5×10^7 을 위와 동일한 방법으로 스케일업 하여 CFSE staining한 후 96well round 조직 배양 플레이트에 5×10^5 /well 농도로 10% 우태아 혈청(FBS), 1% 페니실린/스트렙토마이신과 25mM HEPES를 함유한 RPMI-1640(wellgene) 배지에서 배양하였음. 비장 세포를 생체 외 (*in vitro*) 자극 신호를 주기 위해서, OVA323-339 peptide (323ISQAVHAAHAEINEAGR329; AnaSpec, Fremont, CA, USA)를 1uM/ml 처리하였음. 이 때 Dictabretol A의 최종농도가 0.1% DMSO로 0.5uM 농도가 되도록 처리하고 1일, 3일, 5일 후에 유세포 분석기를 이용하여 세포의 형광 감소정도를 측정하여 세포의 증식능력 정도를 측정하였음.

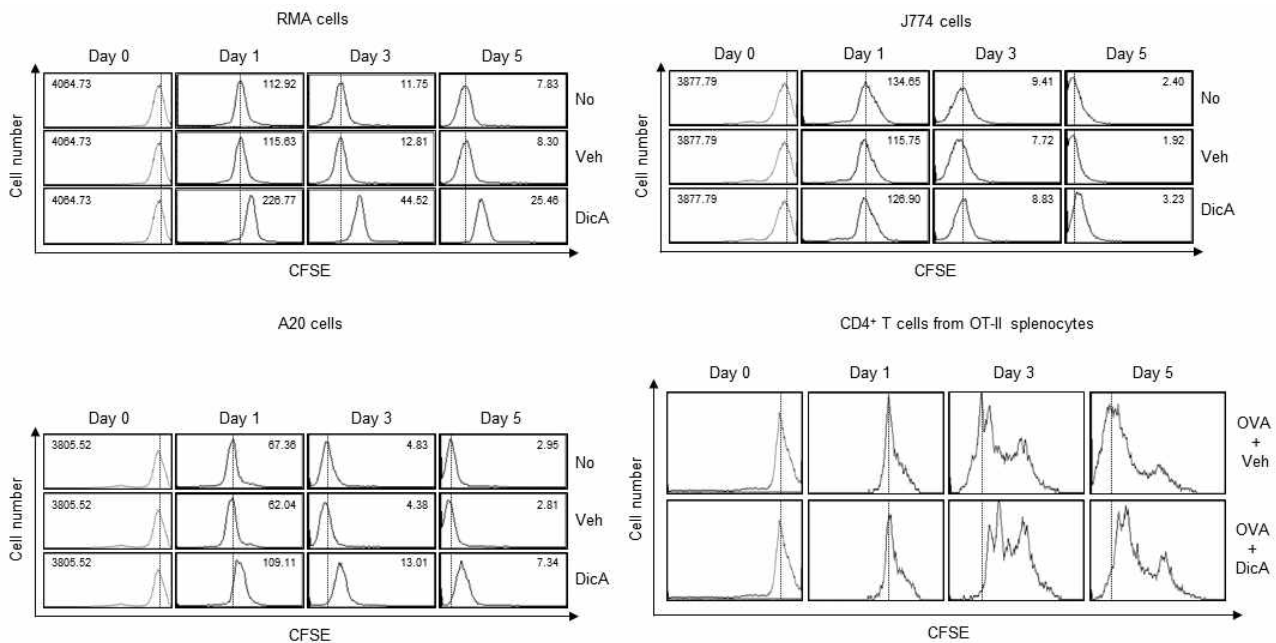


Figure 3-2-3. 백선 추출물 처리에 의한 면역세포의 세포증식능력 억제효과

그 결과, RMA 세포주와 A20 세포주의 경우 세포증식이 억제됨을 확인하였지만 J774 세포주는 세포증식에 억제효능을 보이지 못함을 확인하였음. 또한, OVA 항원으로 자극을 준 생쥐 비장세포 또한 RMA세포주, A20 세포주와 마찬가지로 세포증식이 억제됨을 확인하였음. 따라서 Dictabretol A는 림프구만 선택적으로 세포증식 억제효과를 가짐을 알 수 있었음(Figure 3-2-3).

(다) 백선 추출물 처리에 의한 면역세포의 세포주기 활성억제효과 분석

세포증식 억제효과가 어떤 이유로 발생하는지 알아보기 위하여, PI(Propidium iodide) cell cycle analysis를 유세포 분석기를 이용하여 세포주기 분석을 실시하였음. RMA 세포주, A20 세포주, J774 세포주를 이용하여 6 well 조직 배양 플레이트에 5×10^5 /well 농도의 세포를 RMA 세포주와 A20 세포주는 10% 우태아 혈청(FBS), 1% 페니실린/스트렙토마이신과 25mM HEPES를 함유한 RPMI-1640(wellgene) 배지에서 배양하였고, J774 세포주는 10% 우태아 혈청(FBS), 1% 페니실린/스트렙토마이신을 함유한 DMEM(wellgene) 배지에서 배양하였음. 이 때 Dictabretol A를 10% DMSO(sigma)를 포함한 PBS에 녹인 후, 총 배양액 부피의 1/100을 취하여 세포에 처리하여, 최종농도가 0.1% DMSO로 2uM 농도가 되도록 처리하고 24시간 후에 세포를 수확하여 PBS로 washing 한 후 70% 에탄올로 -20°C에 12시간 고정시켰음. 이후 1500 rpm으로 5분 동안 원심분리 후 상층액을 버리고 50ug/ml의 PI(Propidium Iodide), 0.1mg/ml의 RNaseA, 0.05% Triton X-100을 넣은 PBS 500ul 로 세포를 풀어서 37°C에서 40분간 인큐베이션 시키고 PBS로 washing해 준 후 유세포 분석기를 이용하여 분석을 실시하였음.

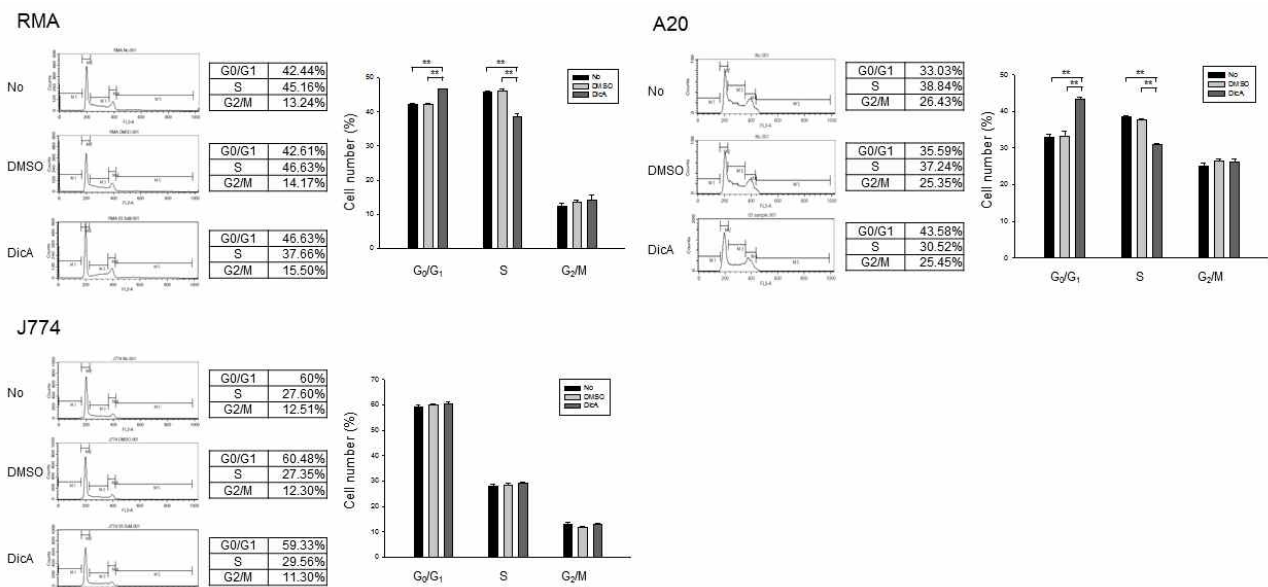


Figure 3-2-4. 백선 추출물 처리에 의한 면역세포의 세포주기 활성억제효과

그 결과, 세포 증식과 마찬가지로 RMA 세포주와 A20 세포주의 경우 Dictabretol A 처리 시에 G₁기에서 S기로 넘어가는 단계에서 세포주기가 멈추어 G₀/G₁기가 증가하고 S기가 감소하는 경향을 보였음. 반면 J774 세포주의 경우 Dictabretol A 처리 시에도 세포주기에 변화가 없는 것을 확인할 수 있었음. (Figure 3-2-4.)

(라) 백선 추출물 처리에 의한 면역세포 세포주기 관련 조절 단백질 분석

백선 추출물 처리에 의해 RMA 세포주와 A20 세포주에서 세포주기 중 S기로의 이행이 억제되는 것을 확인하였기음. 따라서 백선 추출물이 세포주기 양성조절자인 cyclin D₁과 cyclin E와 세포주기 음성조절자인 p27^{KIP1}, p21^{CIP1} 그리고 p27^{KIP1}과 p21^{CIP1}을 상위에서 억제하는 c-Myc의 발현량에 미치는 효과를 알아보기 위해, 단백질 수준과 mRNA 수준에서 발현을 비교하였음. Western blot은 anti-cyclin D₁ (Santa-cruz), anti-cyclin E (Santa-cruz), anti-p27^{KIP1} (Santa-cruz), anti-p21^{CIP1} (Santa-cruz) 와 anti- c-Myc (Santa-cruz) 항체를 이용하였고, Realtime PCR에 사용된 primer set은 Table 3-2-1에 표시함.

Table 3-2-1. Realtime PCR에 사용되어진 primer set¹

primer sequence	product size (bp)	GeneBank Access number
<i>mp27</i>		
F: 5'-GACAATCAGGCTGGGTTAGC	94	U10440
R: 5'-TTCTGTTGGCCCTTTTGTTT		
<i>mp21</i>		
F: 5'-CAGATCCACAGCGATATCCA	94	NM_007669
R: 5'-GGCACACTTTGCTCCTGTG		
<i>mcyclinD1</i>		
F: 5'-TCTTTCCAGAGTCATCAAGTGTG	126	NM_007631
R: 5'-TCCTCCTCAGTGGCCTTG		
<i>mcyclinE</i>		
F: 5'-CTGAGAGATGAGCACTTTCTGC	104	X75888
R: 5'-TGGAGCTTATAGACTTCGCACA		
<i>mcmyc</i>		
F: 5'-TTTTTGTCTATTTGGGGACAGTG	130	NM_001177352
R: 5'-CATCGTCGTGGCTGTCTG		
<i>mGAPDH*</i>		
F: 5'-CCAGCCCTTCCCCTATGTAT	79	NM_008084
R: 5'-GTACTGGAAGCCCACTCTCCT		

¹m, mouse; F, forward (sense); R, reverse (antisense) primer; *housekeeping gene

Western blot은 세포주기 실험과 동일한 조건으로 수행하였으며, 배양 1일 후 세포를 수확하여 proteinase inhibitor cocktail이 포함된 RIPA lysis buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1.0% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS)로 lysis 시킨 후, 10% 또는 12% SDS polyacrylamide gel에 전기 영동시켜 Hybond-P PVDF membrane (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)에 transfer하였음. 그 후 antibody를 이용 immunoblot을 실시하였음. immunoreactive band는 ECL system을 이용, Biomolecular imaging system(ImageQuant™ LAS4000mini Bio-molecular Imager, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)으로 시각화 하였음.

Realtime PCR은 RMA 세포주를 이용하여 세포주기 실험과 동일한 조건으로 수행하였으며, RNA를 분리하기 위하여 트리졸(Trizol, Invitrogen) 1ml로 풀어준 후 200µl의 chloroform(Sigma)을 넣고 전체 RNA를 분리하였고, 이 때 추출한 1µg의 mRNA를 주형으로 Superscript III(Invitrogen) 역전사 효소(Reverse transcriptase)를 이용하여 역전사 연쇄증합반응에 의해 cDNA를 합성하였음. 이 후, 상기 cDNA를 주형으로 하여 유전자 database에서 얻은 염기서열에 따라 프라이머를 제작한 후, Sybr Green realtime PCR을 이용하여 mRNA의 발현을 측정하였음. 본 실험을 위한 혼합물에는 각각 cDNA 1µl, 프라이머 300nM, 2X SybrGreen qPCR Master Mix(CellSafe), D.W를 추가하여 최종부피가 15µl가 되도록 하였으며, 반응조건은 95°C에서 3분 반응한 후, '95°C에서 10초, 55°C에서 15초, 72°C에서 30초'를 한 cycle로 하여 총 40 cycle을 반복하였음.

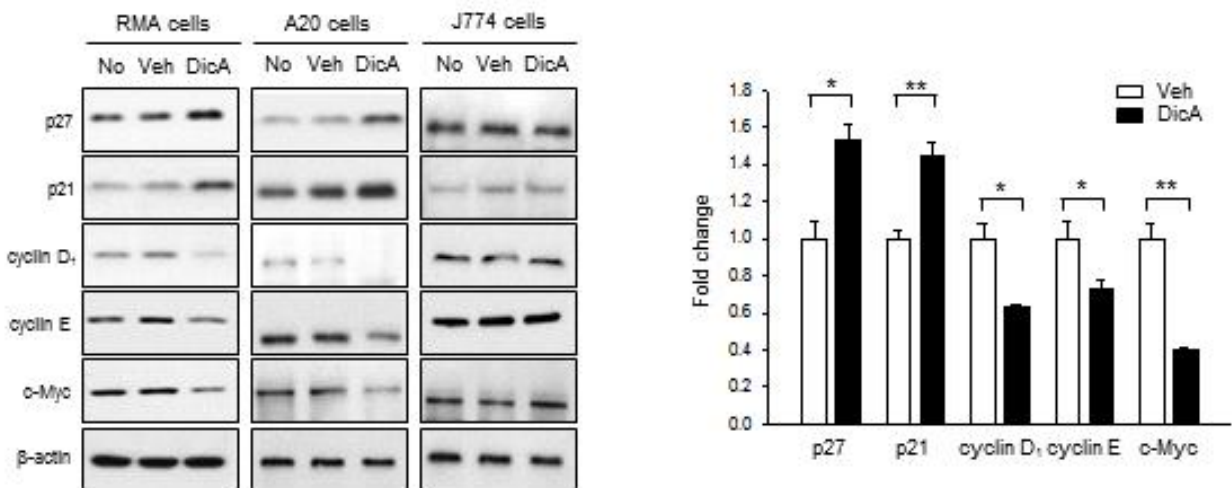


Figure 3-2-5. 백선 추출물 처리에 의한 면역세포의 세포증식능력 억제효과

Western blot 결과, RMA와 A20 세포주의 경우 종양억제자인 p27^{KIP1}과 p21^{CIP1}의 경우 Dictabretol A 처리 시 증가하는 경향을 확인하였고, 세포주기 양성조절자인 cyclin D₁과 cyclin E의 경우 감소하는 경향을 보였음. 또한, p27^{KIP1}과 p21^{CIP1}을 상위에서 억제하는 c-Myc의 발현량도 감소하는 경향을 보였음. 반면 J774의 경우 Dictabretol A 처리 시에도 세포주기 관련 단백질의 변화를 보이지 않음을 확인하였음. 이러한 경향은 mRNA 수준에서도 RMA 세포주에서 realtime PCR로 확인한 결과 단백질 수준과 동일한 결과를 확인할 수 있었음(Figure 3-2-5).

(3) 유용물질의 효능에 대한 분자기전 분석

(가) 백선 추출물 처리 시 세포주기 조절에 대한 분자적 기전 분석

Dictabretol A 처리 시 RMA 세포주에서 p27^{KIP1}과 p21^{CIP1}을 상위에서 억제하는 c-Myc의 mRNA 발현량 감소를 확인하였으므로 c-Myc의 mRNA 발현을 조절하는 분자적 기전을 분석하였음. c-Myc의 mRNA 발현은 성장 신호(Growth stimulus)에 따라 NfκB에 의해 조절되는 메커니즘을 가지는 것을 참고문헌에서 확인하여 NfκB의 Nuclear transfer와 c-Myc 유전자 좌위에 NfκB가 결합하는지 Chromatin immunoprecipitation(ChIP) assay를 이용하여 확인하였음. 세포는 RMA 세포주를 이용하여 세포주기 실험과 동일한 방법으로 배양하였고, Nuclear transfer를 확인하기 위하여 핵단백질과 세포질단백질을 Nuclear/Cytosol Fractionation Kit(Biovision)을 이용하여 분리하였음. 각각의 lysate를 10% SDS polyacrylamide gel에 전기영동시켜 Hybond-P PVDF membrane (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)에 transfer한 후 IκBa, p65 antibody를 이용 immunoblot을 실시하였음. 이 때 inner control은 β-actin과 Lamin B를 이용하였음. immunoreactive band는 ECL system을 이용, Biomolecular imaging system(ImageQuant™ LAS4000mini Bio-molecular Imager, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)으로 시각화 하였음.

ChIP assay는 formaldehyde solution을 final 농도가 1%가 되도록 세포배양배지에 넣어준 후 37°C에 10분 인큐베이션하여 크로스링킹 시킨 후 세포를 scrapper로 긁어 15ml 튜브에 4000rpm에 5분 동안 원심분리 후 상층액을 버리고 proteinase inhibitor cocktail이 포함된 cell lysis buffer(5mM Pipes, 85mM KCl, 0.5% NP40)로 lysis 시켰음. 이 후 proteinase inhibitor cocktail이 포함된 Nucler lysis buffer(1% SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH8.1)로 세포를 풀어준 후 DNA가 0.3-1.5kb 내에 있도록 sonication 시킨 후 Protein A/G bead, 항체와 함께 인큐베이션 한 후 c-Myc 유전자 좌위에 프라이머를 이용하여 semi-qPCR을 진행하였음. 이 때 사용된 Primer는 Table 3-2-2에 표시하였음.

Table 3-2-2. ChIP assay에 사용되어진 primer set¹

primer sequence	product size (bp)	GeneBank Access number
<i>mcmyc URE (promoter)</i>		
F: 5'-GGTTGGCAATTCACCTCCTCC	359	M12345
R: 5'-CACACACACACTCCAGCACCT		
<i>mcmyc IRE (exon1)</i>		
F: 5'-CTAAGAAGGCAGCTCTGGAGTG	376	L00038
R: 5'-CGGCCGCTACAATTCAAGACG		

¹m, mouse; F, forward (sense); R, reverse (antisense) primer

semi-qPCR 위한 혼합물에는 각각 DNA 1 μ l, 프라이머 300nM, dNTP 1mM, Taq polymerase μ l, D.W를 추가하여 최종부피가 50 μ l가 되도록 하였으며, 반응조건은 95 $^{\circ}$ C에서 5분 반응한 후, '95 $^{\circ}$ C에서 30초, 58 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초'를 한 cycle로 하여 총 35 cycle을 반복하였으며 마지막 cycle 시 72 $^{\circ}$ C에서 10분 반응시켰음.

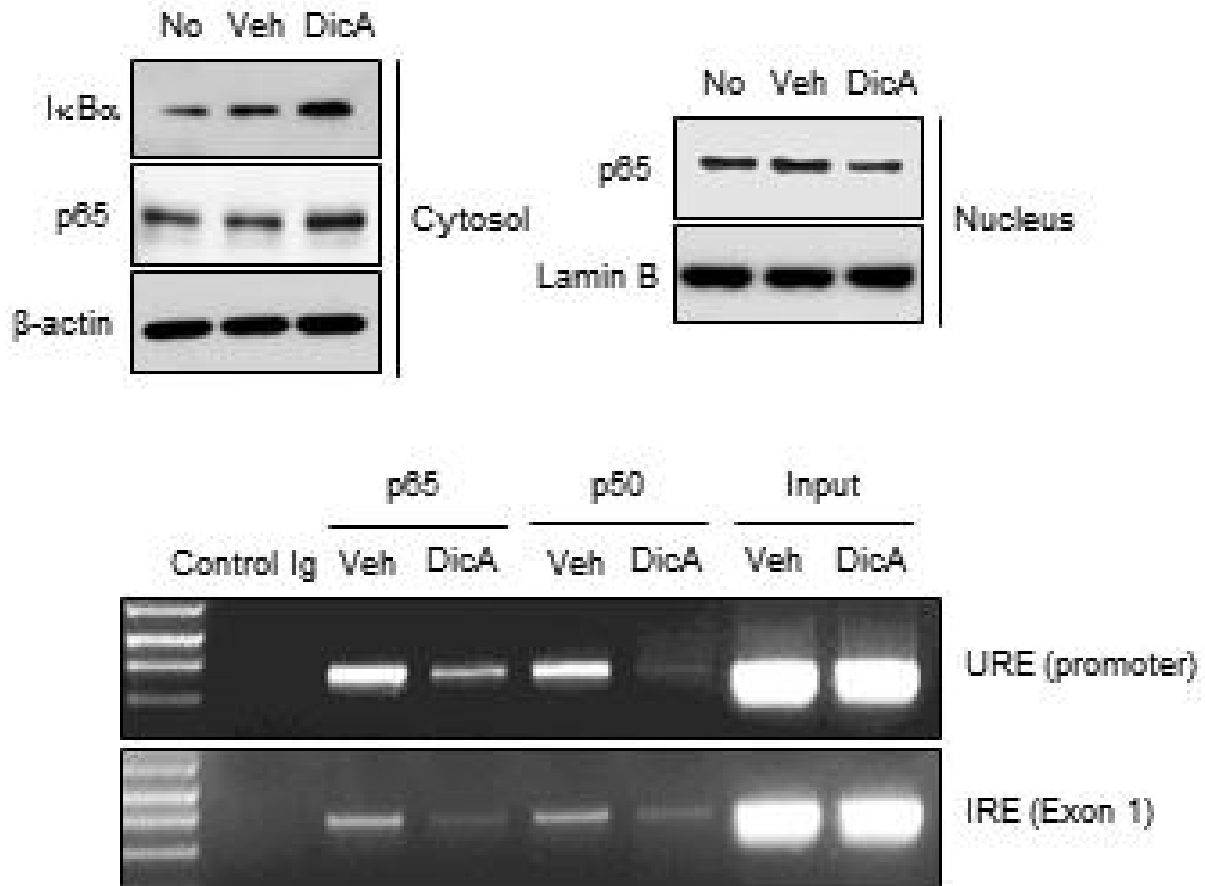


Figure 3-2-6. 백선 추출물 처리 시 c-Myc 전사 조절 기전 확인

그 결과, c-Myc의 전사를 조절하는 Nf κ B의 경우 Dictabretol A를 처리하였을 때 핵단백질과 세포질 단백질을 분리하여 확인한 결과 Nf κ B를 억제하는 I κ B α 의 경우 세포질에서 증가하였으며 Nf κ B의 subunit인 p65의 경우 세포질에서는 증가 핵에서는 감소하여 Nf κ B의 핵으로의 이동이 저해하는 것을 확인하였음. 또한 c-Myc유전자 좌위에 Nf κ B의 binding 능력을 확인한 결과 Nf κ B의 subunit인 p65와 p50 모두 Dictabretol A를 처리한 결과 binding 이 저해됨을 확인하였음(Figure 3-2-6).

c-Myc 유전자를 조절하는 NfκB의 핵으로의 이동을 저해하는 메커니즘을 확인하기 위하여 NfκB의 핵으로의 이동의 양성조절자인 IκK와 세포 성장 신호에 대표적인 신호전달 물질인 Akt, Erk를 확인하였음.

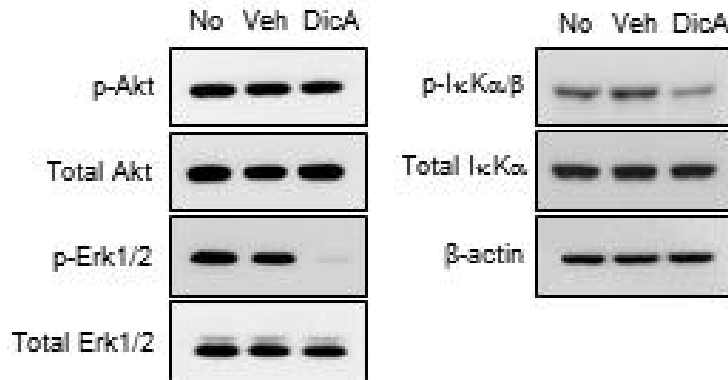


Figure 3-2-7. 백선 추출물 처리 시 NfκB의 핵으로 이동 저해 기전 확인

그 결과, Dictabretol A 처리 시 NfκB의 핵으로 이동을 조절하는 IκK의 인산화가 저해되는 것을 확인하였고, 이는 성장신호에 따라 활성화되는 Akt와 Erk의 인산화 중 Erk의 인산화의 저해로 인한 것임을 확인하였음(Figure 3-2-7).

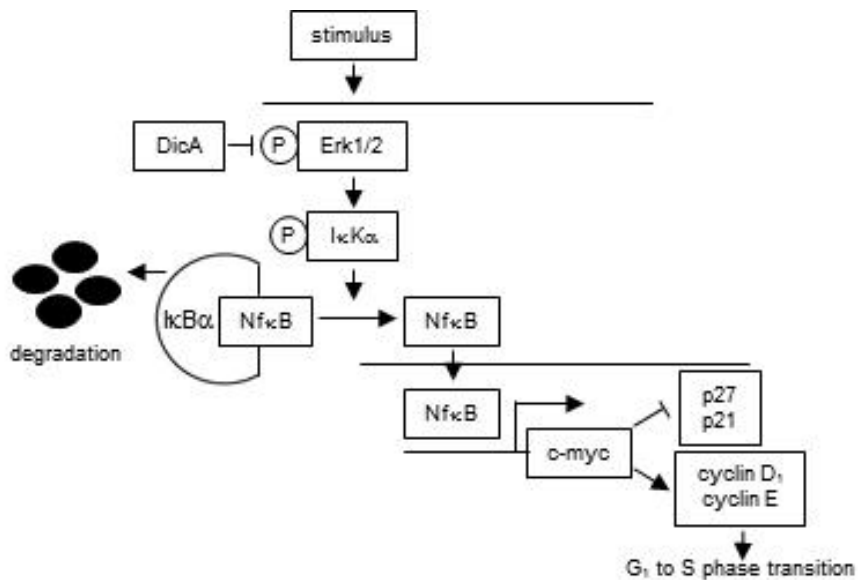


Figure 3-2-8. 백선 추출물의 세포 주기 억제 메커니즘

Dictabretol A는 세포 성장 신호에 반응하는 Erk의 인산화를 억제하고 이는 IκK의 인산화를 억제하였음. 이는 NfκB의 핵으로의 이동을 저해하는 IκB의 분해를 억제하여 NfκB의 핵으로의 이동이 저해되었음. 따라서 NfκB의 핵으로 이동이 저해되어 c-Myc의 mRNA 발현이 감소하고 이로 인해 p27^{KIP1}, p21^{CIP1}과 같은 중앙억제인자의 발현이 증가되고 세포주기의 양성조절자인 cyclinD₁과 cyclinE의 발현 감소로 인하여 세포주기가 G₁기에서 S기로 넘어가지 못해 멈추는 기작을 확인하였음(Figure 3-2-8)

(나) 백선 추출물의 In vivo 면역 억제 효능 확인(Collagen induced arthritis model)

세포 수준 실험에서 림프구의 세포 주기 억제를 통한 면역 억제 효능을 확인하였으므로, 동물 모델에서도 효과적인 면역 억제 효능이 있는지를 확인하기 위해 콜라겐으로 유도한 류마티스성 관절염 동물모델을 이용하여 In vivo 수준에서 효능을 확인하였음. 동물 실험은 DBA1/J 생쥐를 이용하였으며 실험 하루 전에, 제2형 콜라겐 용액 (2.5 mg/ml)을 0.05M 아세트산으로 제조하여 4°C에서 보관하였음. 면역화 직전에, 동일한 부피의 CFA(Complete Freund's Adjuvant)을 쓰리웨이 스탬프를 이용하여 혼합하였음. 이 혼합액을 생쥐의 꼬리 아랫부분에 140 ul 피하 주사하였음. 3주가 지난 후 다시 콜라겐 용액을 동일한 부피의 IFA(Incomplete Freund's Adjuvant)와 혼합하여 꼬리에 100 ul 피하 주사하였음. 2차 접종 후 10일 후부터 치료 투여를 2일에 한번씩 3주 동안 지속시켰음. 음성 대조군을 비히클 (0.5% DMSO)로 처리하고 백선 추출물 Dictabretol A는 10 mg/kg 로 시험하였음. 관절염의 임상평가는 4개의 각 발의 부종 및 발적을 관절염 점수로 순위를 매겼음. 평가 기준은 Table 3-2-3에 표시하였음.

Table 3-2-3. 관절염의 임상평가 기준

관절염 임상 평가 점수	증상
0	증상 없음
1	하나의 발가락 및 관절에 국한된 경한 부종과 발적
2	관절의 2 가지 이상 유형의 보통의 발적 및 부종
3	발가락을 포함한 전체 발의 심한 발적 및 부종
4	다수의 관절을 포함한 최대로 염증을 일으킨 사지의 발적 및 부종

동물 당 최대의 누적 임상 관절염 점수는 16점으로 하였음.

관절염의 임상평가 기준에 따라 24일 동안 임상평가를 실시하였고 그 이후 생쥐를 희생시켜 조직학적 분석 및 혈청학적 분석을 실시하였음.

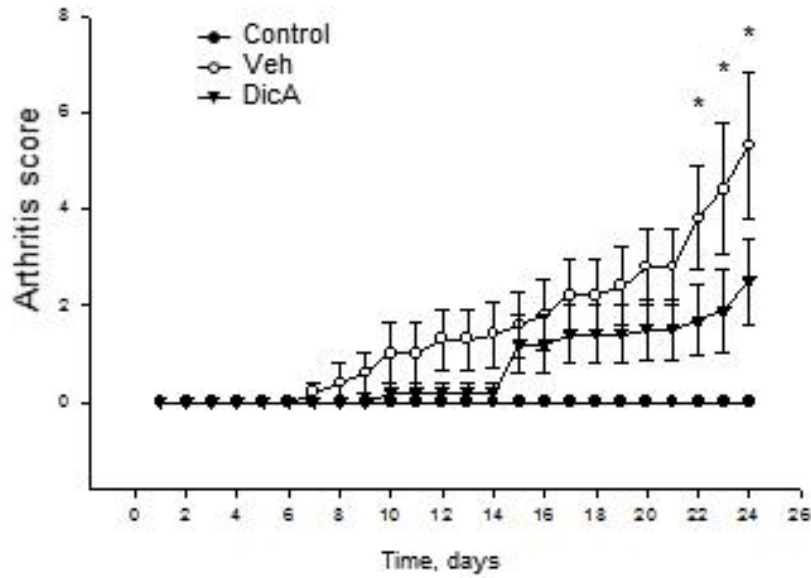


Figure 3-2-9. 백선 추출물 투여 시 관절염의 임상평가 결과

그 결과, Dictabretol A를 투여한 그룹의 경우 비히클 음성 대조군에 비하여 관절염의 증상이 나타나는 6일 이후부터 유의적인 차이는 없지만 발적 및 부종이 덜 진행 되었으며 22일 이후에는 유의적으로 발적 및 부종상태가 차이를 확인하였음. 따라서 Dictabretol A가 효과적으로 관절염의 증상을 억제함을 확인하였음(Figure 3-2-9).

관절염의 임상평가가 끝난 24일 후 생쥐를 희생시켜서 조직학적 분석을 실시하였음. 조직학적 분석을 위하여 생쥐의 발 관절 부위를 적출하여 10% formalin으로 고정시킨 후, 파라핀 블록 제작 및 5uM 간각으로 관절부위 조직을 종단면으로 절편 함. 그 후 절편을 hematoxylin and eosin으로 염색하여 현미경을 통해 조직학적 검사를 실시하였음.

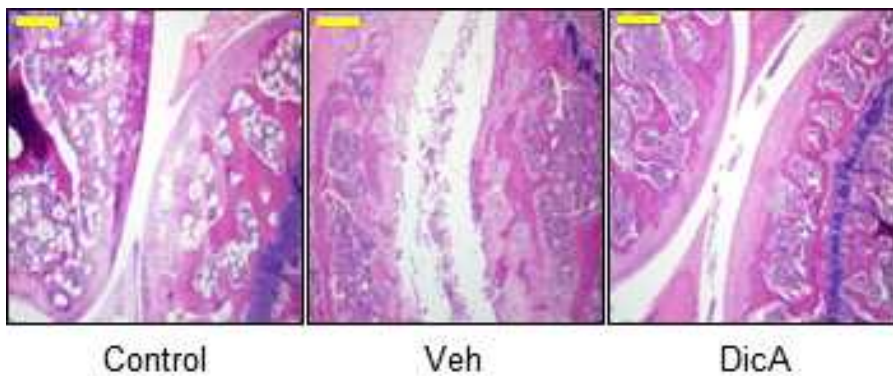


Figure 3-2-10. 백선 추출물 처리 시 관절염의 조직학적 평가

그 결과, 음성 대조구인 비히클 처리 그룹의 경우 관절 부위의 조직이 무너짐을 확인하였으며 Dictabretol A를 투여한 생쥐의 관절 부위는 상대적으로 덜 무너짐을 관찰할 수 있었음 (Figure 3-2-10).

백선 추출물 처리 시 관절염의 혈청학적 분석을 위하여 임상평가가 끝난 24일 후, 생쥐의 눈에서 각각 100ul의 혈액을 채혈하였음. 채혈한 혈액을 4°C에 30분 인큐베이션 후, 원심분리를 통해 혈청을 분리하였음. 각각의 혈청을 100배 희석하여 sandwich ELISA 기법을 통해 serum에 함유된 콜라겐 특이적인 항체와 관절염의 조직 파괴에 주요하게 작용하는 사이토카인인 TNF- α 와 IL-1 β 를 측정하였음.

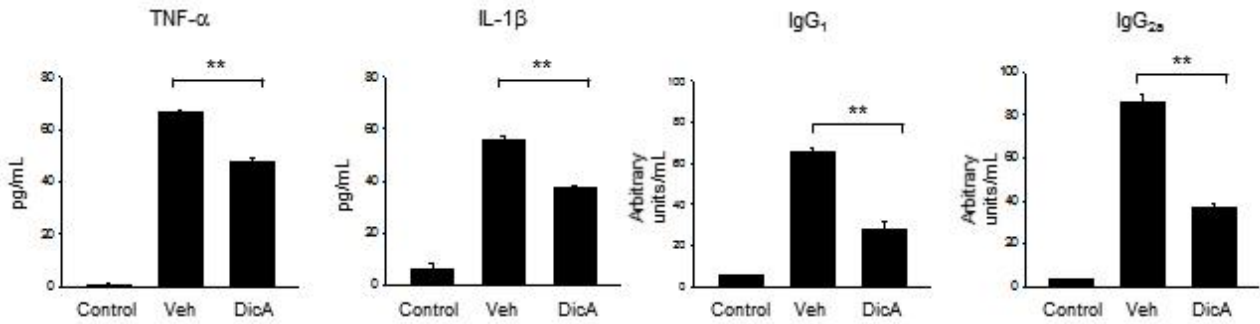


Figure 3-2-11. 백선 추출물 처리 시 관절염의 혈청학적 분석

그 결과, 관절염의 병의 발병에 주요한 역할을 하는 사이토카인인 TNF- α 와 IL-1 β 의 경우 Dictabretol A를 투여한 생쥐에서 음성대조구인 비히클에 비해 감소함을 확인하였음. 또한 혈청에 포함하고 있는 콜라겐(항원) 특이적인 항체의 양도 감소함을 확인하였음. 이는 혈청학적으로 관절염을 평가했을 시에도 Dictabretol A가 효과적으로 관절염의 증상을 억제함을 증명하였음(Figure 3-2-11).

3. 임신모돈 사료 첨가물 급여에 의한 자돈생존율 증가검증

(1) 다양한 사료 배합에 의한 사료첨가물의 효과적인 전달 시스템 모색

본 실험은 2차년도 실험으로 면역억제 효능을 가진 백선펜피를 사료첨가물로 만들어 임신초기 모돈에게 급여함으로써 자돈생존율을 확인한 실험임. 사료첨가제로 사용한 백선펜피는 경동시장에서 구매 및 분쇄하여 제조하였으며 1일분을 소포장하여 사료위에 뿌려줘 사료와 같이 섭취할 수 있게 하였음.

(가) 사료첨가물의 급여량

2차년도 생쥐 대상 면역억제 실험시 10mg/kg으로 복강주사 시 효능을 확인하였으므로 경구로 급여 시 농도를 모돈의 몸무게에 따라 10-20배의 농도로 급여하여 1일 25g의 농도로 급여하였으며 실험농장은 전라북도 장수에 위치한 성암농장에서 실시하였음.

(나) 사료첨가물의 급여기간

돼지 초기 태아발달시 수정 10일경부터 자궁내막으로 면역세포의 이동이 있으며 이후 30일까지 돼지 태아 사망률이 25-35%에 이르는 것으로 알려짐(Figure 3-3-1). 따라서 모돈용 사료첨가제의 급여기간을 인공수정 후 30일까지로 설정함.

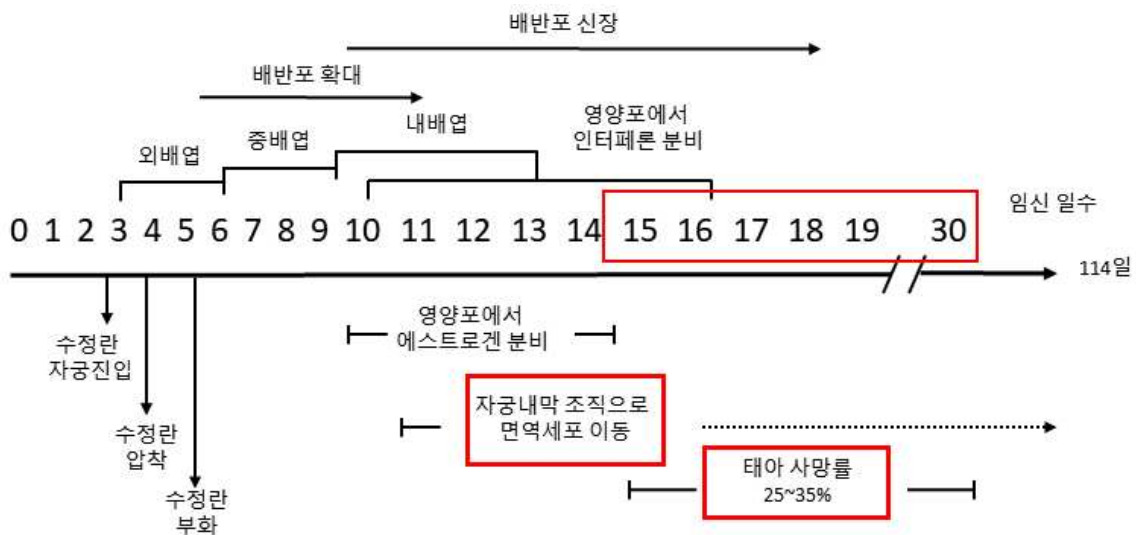


Figure 3-3-1. 돼지 초기 태아발달 시 주요사건

(다) 사료첨가물 급여 축군 조성

실험용 축군은 급여그룹과 비급여그룹으로 나누어 초산(0산차)부터 7산차까지 급여그룹 100마리 분량으로 준비하였으며 초산부터 4산차까지 그룹은 10마리 이상씩으로 설정하였고 5산차부터 7산차까지 그룹은 가용한 범위내에서 실시하였음. 급여그룹과 비급여그룹간 비교를 위하여 이전 산차의 성적을 확인하여 성적이 비슷한 모돈을 대상으로 급여 비급여 그룹으로 나누어 실험을 실시하였음. 최종적으로 임신실패 및 데이터누락을 제외하고 급여그룹 73마리를 이용하여 데이터 분석을 실시하였음.

(2) 사료첨가물 급여개체와 비급여개체간의 자돈생존율 비교

(가) 산차별 모돈의 실산율 및 사산/미라 비율 분석

산차별 모돈의 실산율 및 사산/미라 비율을 분석하기 위하여 실산율의 경우 산차별 비급여 급이 모돈의 실산수를 총 산자수로 나누었으며 사산/미라 비율을 분석하기 위하여 산차별 급이 비급여 그룹간 사산/미라 자돈의 수를 총 산자수로 나누어 분석을 실시하였음.

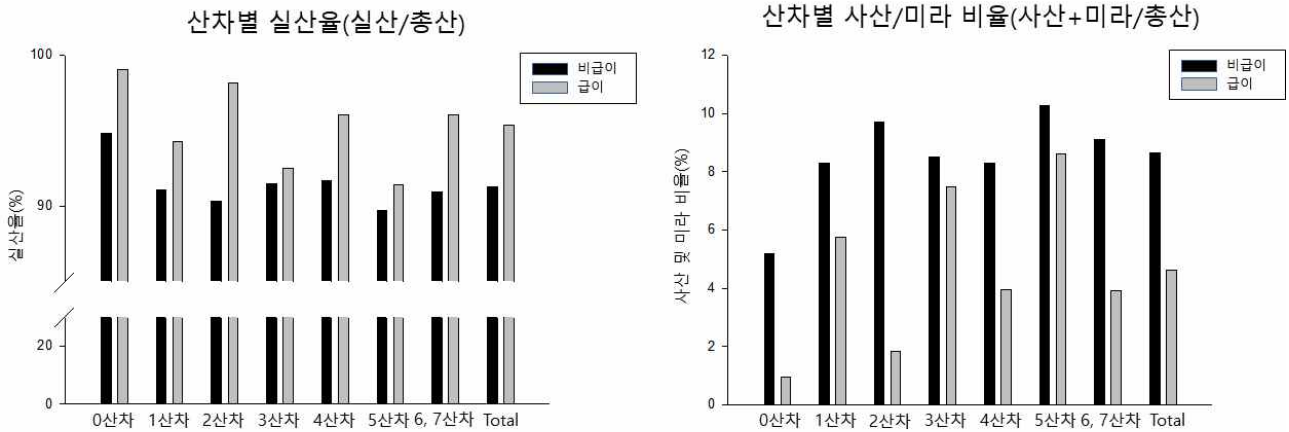


Figure 3-3-2. 급이 비급여 그룹 간 산차별 실산율 및 사산/미라 비율

그 결과, 산차별로 급여 그룹이 비급여 그룹에 비해 실산율이 증가한 것을 확인하였으며 사산 및 미라의 비율이 감소한 것을 확인하였음(Figure 3-3-2). 이 비율을 Table 3-3-1에 표기하였음.

Table 3-3-1. 급이 비급여 그룹 간 산차별 실산율 및 사산/미라 비율

		산차별 실산율							
		0 산차	1 산차	2 산차	3 산차	4 산차	5 산차	6, 7 산차	Total
비급여		94.81481	91.0828	90.30837	91.50327	91.70984	89.71963	90.90909	91.26298
급여		99.03846	94.25287	98.14815	92.51701	96.0452	91.39785	96.07843	95.37445

		산차별 사산/미라 비율							
		0 산차	1 산차	2 산차	3 산차	4 산차	5 산차	6, 7 산차	Total
비급여		5.185185	8.280255	9.69163	8.496732	8.290155	10.28037	9.090909	8.650519
급여		0.961538	5.747126	1.851852	7.482993	3.954802	8.602151	3.921569	4.625551

(나) 이전 산차 대비 자돈 총 생산 분석

이전 산차대비 자돈 총산을 비교하기 위하여 초산을 제외하고 저산차(1-2산차), 중산차(3-4산차), 고산차(5-7)산차로 나누어 이전 산차대비 총산 증가율 및 증가량을 확인하였음. 총산 증가율을 현 산차 총산을 이전 산차 총산으로 나누어 분석하였으며, 총산 증가량은 현 산차 총산에서 이전 산차 총산을 빼서 분석하였음.

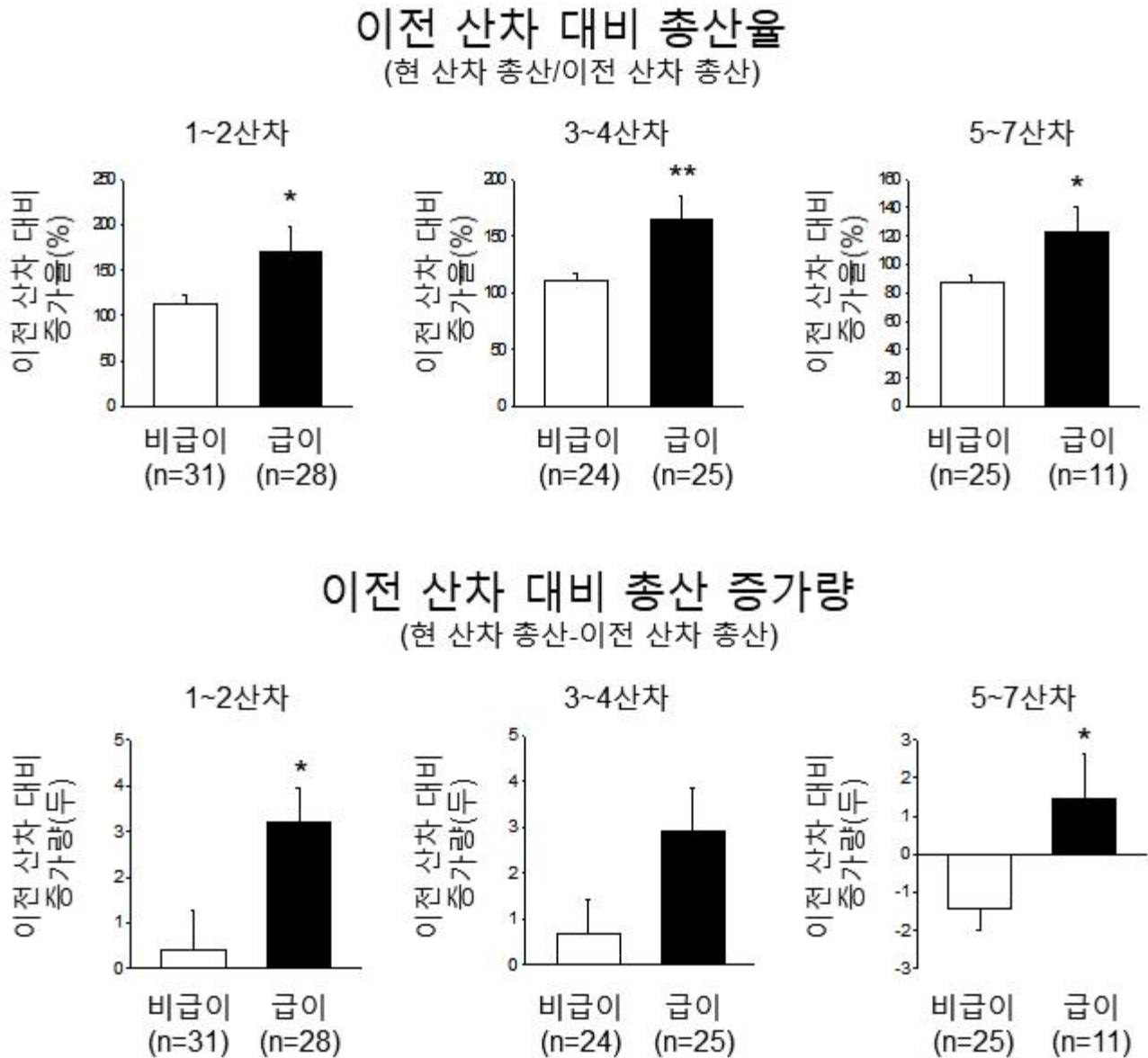


Figure 3-3-3. 비급이 급이 그룹간 이전 산차 대비 총산 증가율 및 증가량

그 결과, 총산 증가량의 경우 세 그룹 모두 증가하였으며 저산차 및 고산차 모돈의 경우 유의적으로 증가함을 확인하였음. 또한 총산율의 경우에도 세 그룹 모두 유의적으로 증가함을 확인하였음.

(다) 이전 산차 대비 자돈 실산 분석

이전 산차대비 자돈 실산을 비교하기 위하여 이전 산차대비 실산 증가율 및 증가량을 확인 하였음. 실산 증가율을 현 산차 실산을 이전 산차 실산으로 나누어 분석하였으며, 실산 증가량은 현 산차 실산에서 이전 산차 실산을 빼서 분석하였음.

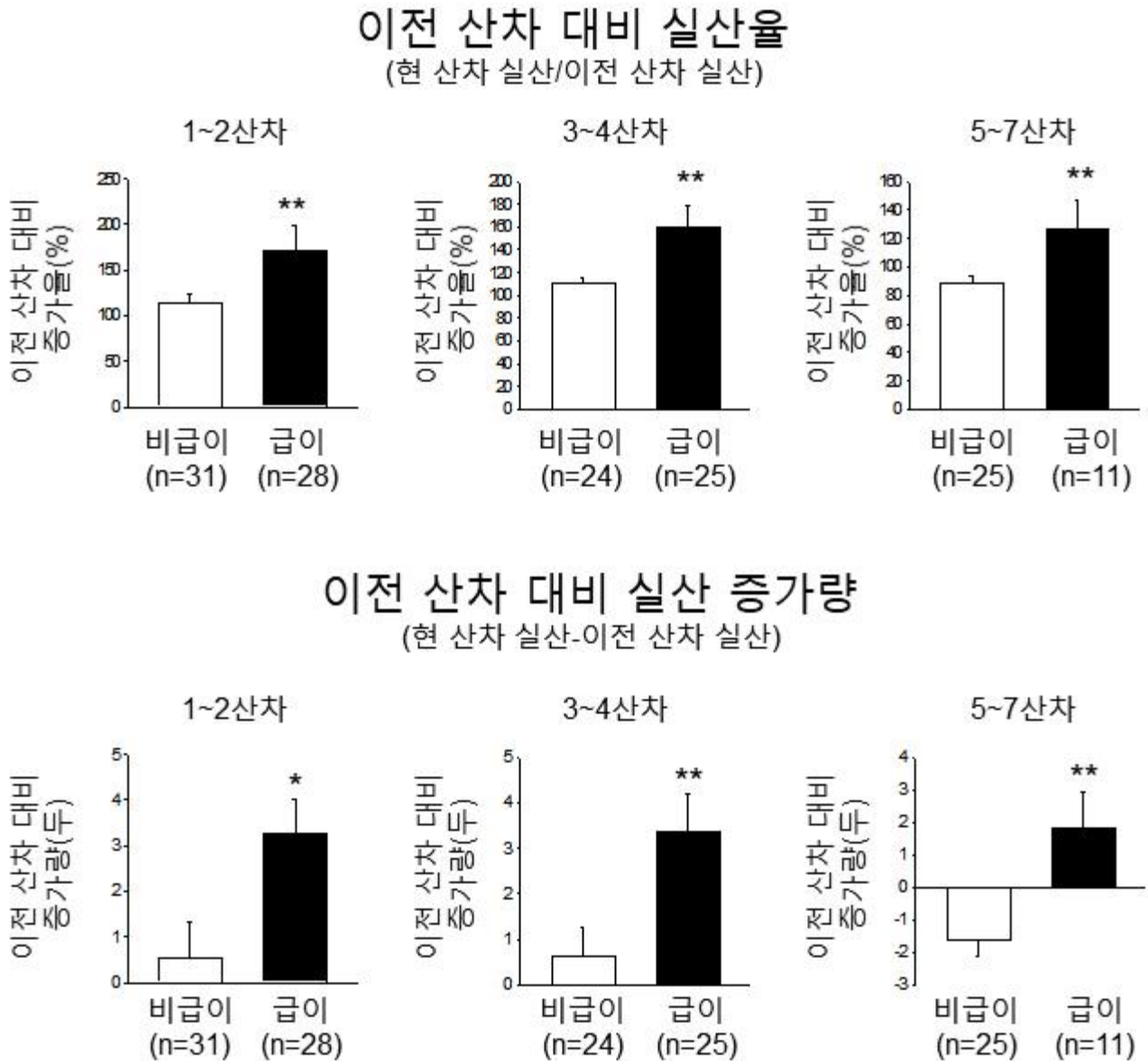


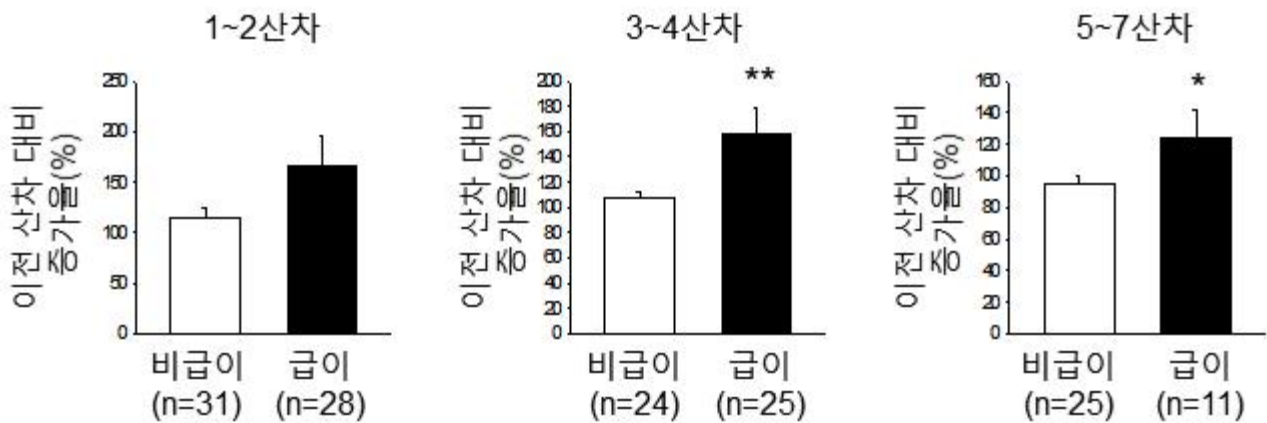
Figure 3-3-4. 비급이 급이 그룹간 이전 산차 대비 실산 증가율 및 증가량

그 결과, 이전 산차 대비 실산 증가율 및 증가량은 세 그룹 모두 비급이 그룹에 비해 급이 그룹에서 유의적으로 증가하는 것을 확인하였음.

(라) 이전 산차 대비 자돈 몸무게 분석

이전 산차대비 자돈 몸무게 증가를 비교하기 위하여 이전 산차대비 몸무게 증가율 및 증가량을 확인하였음. 몸무게 증가율을 현 산차 몸무게를 이전 산차 몸무게로 나누어 분석하였으며, 실산 증가량은 현 산차 몸무게에서 이전 산차 몸무게를 빼서 분석하였음.

이전 산차 대비 몸무게 증가율 (현 산차 몸무게/이전 산차 몸무게)



이전 산차 대비 몸무게 증가량 (현 산차 몸무게-이전 산차 몸무게)

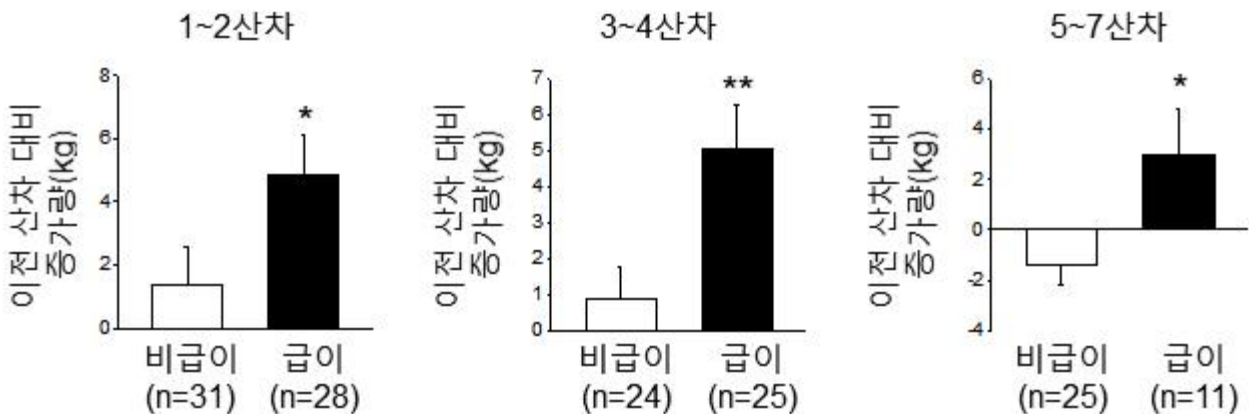


Figure 3-3-5. 비급이 급이 그룹간 이전 산차 대비 몸무게 증가율 및 증가량

그 결과, 세 그룹 모두 몸무게 증가율이 증가하였으며 중산차 및 고산차 모돈에서 유의적으로 증가함을 확인하였음. 또한 세 그룹 모두 이전 산차 대비 몸무게 증가량이 유의적으로 증가함을 확인하였음.

제 4 절 연구개발성과

1. 정성적성과

- 모든의 생애총생산성관련 유용 유전자원 선점
- 모든 임신초기 착상촉진용 유용물질에 대한 원천기술 확보
- 모든 임신초기 면역조절용 유용물질에 대한 원천기술 확보

2. 정량적성과

(1) 논문게재 (SCI 8편, SCIE 1편, 한국연구재단등재지 1편)

- Wooyoung Jeong, Gwonhwa Song, Jinyoung Kim (2015) Mitogen activated protein kinase pathway-dependent effects of platelet-derived growth factor on migration of trophectoderm cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 463(4); 575-581
- Sang-Pil Choi, Chang-Yong Choi, Kyungmin Park, Nahyun Kim, Hyun-Seuk Moon, Dongho Lee, Taehoon Chun (2016) Glabretal-type triterpenoid from the root bark of *Dictamnus dasycarpus* ameliorates collagen-induced arthritis by inhibiting Erk-dependent lymphocyte proliferation. *Journal of ethnopharmacology*. 178; 13-16
- Whasun Lim, Gwonhwa Song (2016) Stimulatory Effects of Coumestrol on Embryonic and Fetal Development through AKT and ERK1/2 MAPK Signal Transduction. *Journal of Cellular Physiology*. 231(12); 1-8
- Whasun Lim, Gwonhwa Song (2016) Naringenin-induced migration of embryonic trophectoderm cells is mediated via PI3K/AKT and ERK1/2 MAPK signaling cascades. *Molecular and cellular endocrinology*. 428; 28-37
- Whasun Lim, Hyocheol Bae, Fuller W. Bazer, Gwonhwa Song (2016) Stimulatory effects of fibroblast growth factor 2 on proliferation and migration of uterine luminal epithelial cells during early pregnancy. *Biology of reproduction*. 96(1); 185-198
- Whasun Lim, Myung Jin Choi, Hyocheol Bae, Fuller W. Bazer, Gwonhwa Song (2017) A critical role for adiponectin mediated development of endometrial luminal epithelial cells during the peri implantation period of pregnancy. *Journal of cellular physiology*. 232(11); 3146-3157

- Whasun Lim, Hyocheol Bae, Fuller W. Bazer, Gwonhwa Song (2017) Functional Roles of Eph A-Ephrin A1 System in Endometrial Luminal Epithelial Cells During Early Pregnancy. *Journal of cellular physiology*. 232(6); 1527-1538
- Whasun Lim, Hyocheol Bae, Fuller W. Bazer, Gwonhwa Song (2017) Brain derived neurotrophic factor improves proliferation of endometrial epithelial cells by inhibition of endoplasmic reticulum stress during early pregnancy. *Journal of cellular physiology*. 232(12); 3641-3651
- Wooyoung Jeong, Hyocheol Bae, Whasun Lim, Fuller W.Bazer, Gwonhwa Song (2017) Differential expression and functional roles of chemokine (C-C motif) ligand 23 and its receptor chemokine (C-C motif) receptor type 1 in the uterine endometrium during early pregnancy in pigs. *Developmental and comparative immunology*. 76; 316-325
- 김연희, 최창용, 전태훈 (2017) 프로바이오틱스의 면역조절을 통한 알레르기 예방 및 치료효과. *한국식품위생안전성학회지*. 31(3); 141-152

(2) 특허 (출원 5건, 등록 1건)

- 2015년도 대한민국 출원, 높은 산자 수를 갖는 모든 판별용 조성물, 고려대학교 산학협력단, 10-2015-0128580,
- 2017년도 대한민국 출원, 쿠메스트롤을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 조성물, 고려대학교 산학협력단, 10-2017-0015668
- 2017년도 대한민국 출원, 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 조성물, 고려대학교 산학협력단, 10-2017-0015667
- 2017년도 대한민국 출원, MEGF11 유전자로부터 유래된 단일염기다형성을 이용한 높은 생애총생산성을 갖는 모든의 판별방법, 고려대학교 산학협력단, 10-2017-0122701
- 2017년도 대한민국 출원, STAT2, MYF6, TFCEP2L1 유전자로부터 유래된 단일염기다형성을 이용한 높은 생애총생산성을 갖는 모든의 판별방법, 고려대학교 산학협력단, 10-2017-0122656
- 2017년도 대한민국 등록, 높은 산자 수를 갖는 모든 판별용 조성물, 고려대학교 산학협력단, 10-178268

(3) 기술이전 (1건)

- 모든의 생애총생산성 향상을 위한 임신모돈의 면역조절 및 착상촉진용 사료첨가물 급이기법 노하우에 대한 기술이전 실시

(4) 학술발표 (국제학술대회 2편, 국내학술대회 3편)

- Sang-Pil Choi (2016) Dictabretol A from the root bark of *Dictamnus dasycarpus* alleviates collagen-induced arthritis by inhibiting lymphocyte proliferation via Erk-dependen. KSBMB International Conference 2016, 서울, 대한민국
- JH.kang (2016) Application of DNA marker-assisted selection using SNPs of reproduction related genes and their genotype combination effects on litter size in black pigs. 35th international society for animal genetics conference. 솔트레이크시티, 미국
- Hyocheol Bae (2016) Fibroblast Growth Factor 2 Induces Development of Porcine Endometrial Luminal Epithelial Cells during Early Gestational Period. The 1st DIP Asia-Pacific (DIPAP) Symposium on Diabetes, Hypertension, 콜롬보, 스리랑카
- Hyocheol Bae (2016) Basic Fibroblast Growth Factor Promotes Cell Proliferation of Porcine Endometrial Luminal Epithelium during Early Pregnancy. 2016 KFN International Symposium and Annual Meeting. 제주, 대한민국
- Sang Pil Choi, Taehoon Chun (2017) Glabretal type Triterpenoid from the *Dictamnus dasycarpus* Alleviates Collagen-induced Arthritis by Inhibiting Lymphocyte Proliferation via Erk-dependent Pathway. 한국생물과학협회 정기학술대회. 서울, 대한민국

(5) 우수인력 양성

- 석사 1명
- 취업성과 2명

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

1. 모든의 생애총생산성 향상을 위한 조기선발지표 개발

구분	연구개발목표 및 평가착안점	연구목표 달성도	기술발전 기여도
최종 목표	국내 모든의 생애총생산성의 실태를 조사한다. porcine 60k SNP chip분석을 통해 모든의 생애총생산성 형질에 미치는 주요 염기변이를 Screening하고, 유효DNA마커들의 최적 유전자형 조합을 선정하여 생애총생산성이 우수한 종돈선발에 활용할 수 있는 조기선발기법을 개발하고자 한다.	100	매우크다
1 차 년도	<p>◎ 연구목표 기초돈군조성을 통한 시료확보 및 모든 생애총생산성 자료조사</p> <p>◎ 평가 착안점</p> <ul style="list-style-type: none"> - 산차별 번식기록을 보유한 기초돈군 조성 및 모든생애총생산성관련 형질자료 조사 - 실험돈의 유전체분석용 혈액시료채취 및 Genomic DNA 추출 - 산차에 따른 모든의 번식능력 변화 양상 구명 및 도태요인 분석 	100	매우크다
2 차 년도	<p>◎ 연구목표 GWAS분석을 통한 후보유전자 발굴 및 유전자구조 분석</p> <p>◎ 평가 착안점</p> <ul style="list-style-type: none"> - 실험돈에 대한 porcine 60K SNP chip 유전자형 결정 - 전장유전체연관성(GWAS)분석 수행을 통한 모든생애총생산성 연관 genomic region 동정 및 SNP 확보 - 위치기반 후보유전자탐색 및 해당 후보유전자의 구조분석과 기능조사 	100	매우크다
3 차 년도	<p>◎ 연구목표 모든 생애총생산성관련 DNA마커의 효용성 검증 및 최적마커조합 설정을 통한 조기선발지표 개발</p> <p>◎ 평가 착안점</p> <ul style="list-style-type: none"> - 발굴된 후보유전자 영역내 유효 SNP 발굴 - 연관성분석을 통한 생애총생산성관련 DNA마커 효과 확인 - 임의회귀(random regression)분석을 통한 모든의 산차별 반복측정된 산자수와 DNA마커의 관련성 검증 - 유효 DNA마커들의 최적 조합 설정 	100	매우크다

2. 모든의 산차별 유전자발현 네트워크분석을 통한 착상률 증진기술 개발

구분	연구개발목표 및 평가착안점	연구목표 달성도	기술발전 기여도
최종 목표	모든의 산차에 따른 임신초기 착상과정동안 태아의 발달 및 분화와 태반 형성에 있어 유용물질의 효과 및 기능성을 검증하고 그에 관련된 조절 네트워크를 다각적으로 분석함으로써 모든의 착상률 증진 및 산자수 손실 방지를 통하여 양돈생산성 향상에 기여하고자 한다	100	매우크다
1 차 년도	<p>◎ 연구목표</p> <p>모든의 산차별 차등발현 영양물질 수용체 선별</p> <p>◎ 평가 착안점</p> <ul style="list-style-type: none"> - 산차별 모든의 자궁내막내 수용체유전자 발현양상 대용량 분석 - 생물정보학적 분석을 통한 모체분비인자 및 태아 발달, 태반형성관련 수용체선발 - 산차별 주요 선발수용체 발현유무 및 후성유전학적 변화 분석 	100	매우크다
2 차 년도	<p>◎ 연구목표</p> <p>착상률 증진을 위한 유용물질 발굴 및 세포수준 검증</p> <p>◎ 평가 착안점</p> <ul style="list-style-type: none"> - 고산차 모든의 자궁내막 세포에서 선발된 수용체의 기능성 분석 - 영양외배엽 세포의 발달 및 분화를 유도하는 유용물질 발굴 - 영양외배엽 세포에서 유용물질과 수용체간의 분자적 기전 연구 	100	매우크다
3 차 년도	<p>◎ 연구목표</p> <p>고산차 모든의 착상효율 증대에 대한 사료첨가물의 효용성 검증</p> <p>◎ 평가 착안점</p> <ul style="list-style-type: none"> - 유용물질의 효과적인 전달을 위한 사료첨가물 개발 - 사료첨가물의 효능 극대화를 위한 급여방법 모색 - 사료첨가물 급여개체와 비급여개체간의 자돈수 비교 분석을 통한 착상촉진제 효능검증 	100	매우크다

3. 모든의 면역조절을 통한 자돈생존율 개선기술 개발

구분	연구개발목표 및 평가착안점	연구목표 달성도	기술발전 기여도
최종 목표	모든의 Th1/Th2 면역상태를 조절할 수 있는 유용물질을 screening하고 생쥐 면역세포를 이용하여 유용물질의 효과 및 분자적 기전을 연구한다. 또한, 이러한 유용물질을 사료첨가물로 사용함으로써 임신모든의 사료첨가물 급여에 의한 자돈생존율을 측정하여 유용성을 평가하고자 한다.	100	매우크다
1 차 년도	<p>◎ 연구목표 모든의 산차별 면역수준 차이 구명</p> <p>◎ 평가 착안점</p> <ul style="list-style-type: none"> - 산차별 모든의 자궁 내 번식관련 면역기관의 면역세포 분석 - 저산차모든과 고산차모든의 면역관련지표 분석 - 면역관련지표에 의한 자돈생존율 변화 측정 	100	매우크다
2 차 년도	<p>◎ 연구목표 면역관련지표의 조절이 가능한 사료 첨가물 발굴</p> <p>◎ 평가 착안점</p> <ul style="list-style-type: none"> - 모든의 면역관련지표를 조절할 수 있는 유용물질 screening - 유용물질에 대한 세포수준의 효능검증 - 유용물질의 효능에 대한 분자기전 분석 	100	매우크다
3 차 년도	<p>◎ 연구목표 임신모든 사료첨가물급여에 의한 자돈생존율 증가 검증</p> <p>◎ 평가 착안점</p> <ul style="list-style-type: none"> - 다양한 사료 배합에 의한 사료첨가물의 효과적인 전달 시스템 모색 - 사료첨가물 급여개체와 비급여개체간의 자돈생존율 비교 	100	매우크다

제 2 절 관련분야 기술발전예의 기여도

1. 기술적 측면

- 학문적·기술적 국제경쟁력의 우위 선점
- 모돈 임신초기 착상촉진용 유용물질에 대한 원천기술 확보
- 모돈 임신초기 면역조절용 유용물질에 대한 원천기술 확보
- 모돈의 생애총생산성관련 유용 유전자원 선점

2. 경제적·산업적 측면

- 모돈의 이용가능산차 증가를 통한 모돈생애총생산성 향상
- 고산차 모돈의 임신초기 착상효율 증대를 통한 수태율 향상
- 고산차 모돈용 면역조절제 개발로 이유전 자돈폐사율 감소
- DNA마커를 이용하여 고산차까지 다산성을 유지할 수 있는 모돈을 조기선발 가능
- 생애총생산성특화 종돈자원 개발로 수입종돈 대체효과
- FTA대비 종돈의 국제경쟁력 강화
- 고능력 신품종개발 기반마련을 통한 양돈산업의 국제경쟁력 강화
- 양돈산업의 국제경쟁력 확보에 의한 시장의 다양화
- 독점지식 및 기술력 확보에 의한 국내 양돈산업의 부가가치 제고
- 수입종돈 대체를 통한 질병유입차단 및 방역비용 절감

제 5 장 연구결과의 활용계획

1. SCI 국외학술지에 3편의 논문 투고

- Regulatory gene network from a genome-wide association study for sow lifetime productivity traits (Animal genetics, Accepted.)
- C-C motif chemokine ligand 23 abolishes ER stress- and LPS-induced reduction in proliferation of bovine endometrial epithelial cells (Journal of Cellular Physiology, EARLY_VIEW)
- effects of th1/th2 cytokine balance from pregnant gilts according to parity on litter size (작성중)

2. 특허등록 4건

- 쿠메스트롤을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 조성물
- 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 조성물
- MEGF11 유전자로부터 유래된 단일염기다형성을 이용한 높은 생애총생산성을 갖는 모돈의 판별방법
- STAT2, MYF6, TFCEP2L1 유전자로부터 유래된 단일염기다형성을 이용한 높은 생애총생산성을 갖는 모돈의 판별방법

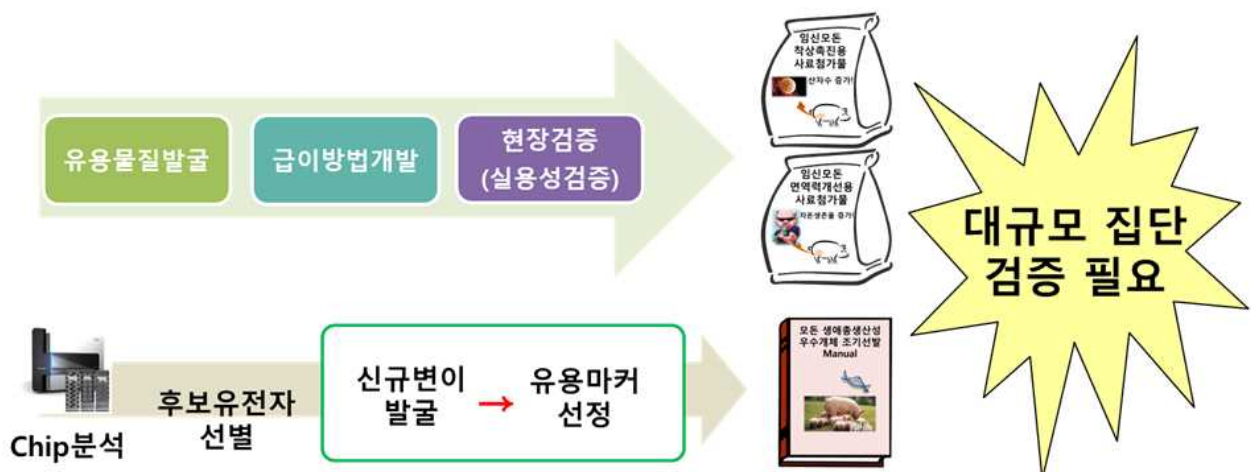
3. 추가 연구의 필요성

- 모돈의 생애총생산성 개량을 위한 사료첨가물 및 DNA 마커의 검증을 위하여 대규모 집단을 대상으로 하는 추가 연구가 필요하다고 판단됨

■ **번식** - 모돈의 임신초기 착상촉진용 **사료첨가물**

■ **면역** - 자돈생존율 향상을 위한 모돈의 면역조절용 **사료첨가물**

■ **육종** - 모돈의 생애총생산성 개량을 위한 **우수개체 조기선발기법**



제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

Bazer, F. W., T. E. Spencer, G. A. Johnson, R. C. Burghardt and G. Wu (2009). "Comparative aspects of implantation." Reproduction138(2): 195-209.

Bazer, F. W., G. Wu, T. E. Spencer, G. A. Johnson, R. C. Burghardt and K. Bayless (2010). "Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals." MolecularHumanReproduction16(3): 135-152.

Bono, C., C. Cornou and A. R. Kristensen (2012). "Dynamic production monitoring in pig herds I: Modeling and monitoring litter size at herd and sow level." LivestockScience149(3): 289-300.

Engelhardt, H., B. A. Croy and G. J. King (2002). "Conceptus influences the distribution of uterine leukocytes during early porcine pregnancy." Biologyofreproduction66(6): 1875-1880.

Gao, K., Z. Jiang, Y. Lin, C. Zheng, G. Zhou, F. Chen, L. Yang and G. Wu (2012). "Dietary l-arginine supplementation enhances placental growth and reproductive performance in sows." AminoAcids42(6): 2207-2214.

Geisert, R., J. Brookbank, R. Roberts and F. Bazer (1982). "Establishment of pregnancy in the pig: II. Cellular remodeling of the porcine blastocyst during elongation on Day 12 of pregnancy." BiologyofReproduction27(4): 941-955.

Guerin, L. R., J. R. Prins and S. A. Robertson (2009). "Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment?" Humanreproductionupdate15(5): 517-535.

Hill, J. A., K. Polgar and D. J. Anderson (1995). "T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion." Jama273(24): 1933-1936.

Kim, J., G. Song, G. Wu and F. W. Bazer (2012). "Functional roles of fructose." ProceedingsoftheNationalAcademyofSciences109(25): E1619-E1628.

Kwak-Kim, J., K. M. Yang and A. Gilman-Sachs (2009). "Recurrent pregnancy loss: a disease of inflammation and coagulation." JournalofObstetricsandGynaecologyResearch35(4): 609-622.

Le Floc'h, N., D. Melchior and B. Sève (2008). "Dietary tryptophan helps to preserve tryptophan homeostasis in pigs suffering from lung inflammation." Journalofanimalscience86(12): 3473-3479.

Niu, B., F. Li, Y. Xiong and X. Wang (2013). "Characterization and Association Analysis with Litter Size Traits of Porcine Matrix Metalloproteinase-9 Gene (pMMP-9)." AppliedBiochemistryandBiotechnology171(3): 786-794.

Rothschild, M. F., L. Messer, A. Day, R. Wales, T. Short, O. Southwood and G. Plastow (2000). "Investigation of the retinol-binding protein 4 (RBP4) gene as a candidate gene for increased litter size in pigs." MammalianGenome11(1): 75-77.

Singer-Sam, J. and A. D. Riggs (1993). X chromosome inactivation and DNA methylation. DNAMethylation, Springer: 358-384.

Su, L., R. Liu, W. Cheng, M. Zhu, X. Li, S. Zhao and M. Yu (2014). "Expression Patterns of MicroRNAs in Porcine Endometrium and Their Potential Roles in Embryo Implantation and Placentation." PloSone9(2): e87867.

Verhaak, R. G., P. Tamayo, J.-Y. Yang, D. Hubbard, H. Zhang, C. J. Creighton, S. Feraday, M. Lawrence, S. L. Carter and C. H. Mermel (2013). "Prognostically relevant gene signatures of high-grade serous ovarian carcinoma." TheJournalofclinicalinvestigation123(1): 517.

Vincent, A., C. Tuggle, M. F. Rothschild, G. Evans, T. Short, O. Southwood and G. Plastow (1998). "The prolactin receptor gene is associated with increased litter size in pigs."

제 7 장 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
○ 일반과제	

제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

코드번호	D-10
해당없음	

**제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의
안전조치 이행실적**

제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부 /인용횟수 등)
1	특허	높은 산자 수를 갖는 모든 판별용 조성물	고려대학교 산학협력단	발명인	대한민국		2017.09.20	단독사사	
2	논문	A critical role for adiponectin-mediated development of endometrial luminal epithelial cells during the peri-implantation period of pregnancy	고려대학교 산학협력단	교신 저자	Journal of cellular physiology	4.08	2017.04.10	단독사사	SCI
3	논문	Naringenin-induced migration of embryonic trophectoderm cells is mediated via PI3K/AKT and ERK $\frac{1}{2}$ MAPK signaling cascades	고려대학교 산학협력단	교신 저자	Molecular and cellular endocrinol ogy	3.859	2016.03.13	단독사사	SCI
4	논문	Glabretal-type triterpenoid from the root bark of Dictamnus dasycarpus ameliorates collagen-induced arthritis by inhibiting Erk-dependent lymphocyte proliferation	고려대학교 산학협력단	교신 저자	Journal of ethnophar macology	3.055	2016.02.01	단독사사	SCI
5	논문	Stimulatory Effects of Coumestrol on Embryonic and Fetal Development through AKT and ERK1/2 MAPK Signal Transduction	고려대학교 산학협력단	교신 저자	Journal of Cellular Physiology	4.08	2016.03.13	중복사사	SCI

제 11 장 기타사항

코드번호	D-13
<input type="radio"/> 해당없음	

제 12 장 참고문헌

Bazer, F. W., T. E. Spencer, G. A. Johnson, R. C. Burghardt and G. Wu (2009). "Comparative aspects of implantation." Reproduction138(2): 195-209.

Bazer, F. W., G. Wu, T. E. Spencer, G. A. Johnson, R. C. Burghardt and K. Bayless (2010). "Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals." MolecularHumanReproduction16(3): 135-152.

Bono, C., C. Cornou and A. R. Kristensen (2012). "Dynamic production monitoring in pig herds I: Modeling and monitoring litter size at herd and sow level." LivestockScience149(3): 289-300.

Engelhardt, H., B. A. Croy and G. J. King (2002). "Conceptus influences the distribution of uterine leukocytes during early porcine pregnancy." Biologyofreproduction66(6): 1875-1880.

Gao, K., Z. Jiang, Y. Lin, C. Zheng, G. Zhou, F. Chen, L. Yang and G. Wu (2012). "Dietary l-arginine supplementation enhances placental growth and reproductive performance in sows." AminoAcids42(6): 2207-2214.

Geisert, R., J. Brookbank, R. Roberts and F. Bazer (1982). "Establishment of pregnancy in the pig: II. Cellular remodeling of the porcine blastocyst during elongation on Day 12 of pregnancy." BiologyofReproduction27(4): 941-955.

Guerin, L. R., J. R. Prins and S. A. Robertson (2009). "Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment?" Humanreproductionupdate15(5): 517-535.

Hill, J. A., K. Polgar and D. J. Anderson (1995). "T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion." Jama273(24): 1933-1936.

Kim, J., G. Song, G. Wu and F. W. Bazer (2012). "Functional roles of fructose." ProceedingsoftheNationalAcademyofSciences109(25): E1619-E1628.

Kwak-Kim, J., K. M. Yang and A. Gilman-Sachs (2009). "Recurrent pregnancy loss: a disease of inflammation and coagulation." JournalofObstetricsandGynaecologyResearch35(4): 609-622.

Le Floc'h, N., D. Melchior and B. Sève (2008). "Dietary tryptophan helps to preserve tryptophan homeostasis in pigs suffering from lung inflammation." Journalofanimalscience86(12): 3473-3479.

Niu, B., F. Li, Y. Xiong and X. Wang (2013). "Characterization and Association Analysis with Litter Size Traits of Porcine Matrix Metalloproteinase-9 Gene (pMMP-9)." AppliedBiochemistryandBiotechnology171(3): 786-794.

Rothschild, M. F., L. Messer, A. Day, R. Wales, T. Short, O. Southwood and G. Plastow (2000). "Investigation of the retinol-binding protein 4 (RBP4) gene as a candidate gene for increased litter size in pigs." MammalianGenome11(1): 75-77.

Singer-Sam, J. and A. D. Riggs (1993). X chromosome inactivation and DNA methylation. DNAMethylation, Springer: 358-384.

Su, L., R. Liu, W. Cheng, M. Zhu, X. Li, S. Zhao and M. Yu (2014). "Expression Patterns of MicroRNAs in Porcine Endometrium and Their Potential Roles in Embryo Implantation and Placentation." PloSone9(2): e87867.

Verhaak, R. G., P. Tamayo, J.-Y. Yang, D. Hubbard, H. Zhang, C. J. Creighton, S. Feraday, M. Lawrence, S. L. Carter and C. H. Mermel (2013). "Prognostically relevant gene signatures of high-grade serous ovarian carcinoma." TheJournalofclinicalinvestigation123(1): 517.

Vincent, A., C. Tuggle, M. F. Rothschild, G. Evans, T. Short, O. Southwood and G. Plastow (1998). "The prolactin receptor gene is associated with increased litter size in pigs."

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.