

발간등록번호

11-1543000 -003138-01

# 돼지에서 정자 전사체 마커를 활용한 산자수 향상 기술 개발

최종보고서

2020.07.10.

주관연구기관 / 중앙대학교 산학협력단  
협동연구기관 / 유나농장

**농 립 축 산 식 품 부**

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

## 제 출 문

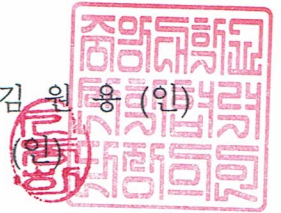
농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “돼지에서 정자 전사체 마커를 활용한 산자수 향상 기술 개발”(개발기간 : 2016. 12. ~ 2019. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020 . 07 . 10 .

주관연구기관명 : 중앙대학교 산학협력단 (대표자) 김 원 용 (인)

참여기관명 : 유나농장 (대표자) 신 동 하 (인)



주관연구책임자 : 방 명 결

참여기관책임자 : 신 동 하

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	116172-3	총 단 계 연구 기 간	2016.12 ~ 2019.12	단 계 구 분	총 단 계
연구 사업 명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구 과제 명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	돼지에서 정자 전사체 마커를 활용한 산자수 향상 기술 개발			
연구 책임자	방 명 결	총 연구기간 참여연구원 수	총: 14명 내부: 13명 외부: 1명	총 연구개발비	정부: 690,000천원 민간: 230,010천원 계: 920,010천원
연구기관명 및 소속부서명	중앙대학교 동문생명공학과			참여기업명  유나농장	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약

보고서 면수

연구개발의 목적

중돈 정자에서 우수 및 불량 산자생산능력 관련 전사체 마커 개발 및 이를 이용한 농장수준에서의 산자수 향상

연구 내용

우수(다산성) 정자 및 불량정자의 비교 차세대 염기서열 분석(RNA-seq) 및 정자 기능을 활용하여 GGP수준에서 이들 마커의 정확도 및 산자수 향상을 검증한 후 타당성이 입증된 마커를 농장에 적용하여 산자수를 향상시킴

연구성과

- 1) 정자에서 전사체 마커 스크리닝을 위한 전처리 및 RT-qPCR 방법 확립
- 2) EQTN, PRDX4, PSP-I, PSP-II, SLC9A3R1, ZP4 여섯 개의 마커 개발 (산자수 1두 이상 증가 전사체 마커)

연구성과활용 계획

- 1) 현장적용: 농장수준에서의 산자수 향상
- 2) 신산업 창출: 수태성관련 물질, 진단도구 및 피임후보물질 개발이라는 거대산업을 돌출하여 동물 및 인간을 위한 블루오션을 제시. 또한 이와 관련된 분석서비스 산업 창출.
- 3) 생산성 향상으로 중돈 및 모돈 수 감소로 인한 축산분뇨 감소
- 4) 기술이전 및 후속연구방안: 기 개발된 마커의 국제특허 및 다국적 기업에 기술이전, 기 개발된 마커를 이용한 kit 및 진단 tool 개발로 후속연구 및 산업화

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>가. 연구개발의 목적</p> <p>중돈 정자에서 우수 및 불량 산자생산능력 관련 전사체 마커 개발 및 이를 이용한 농가수준에서의 산자수 향상</p> <p>나. 연구 내용</p> <p>우수(다산성) 정자 및 불량정자의 비교 차세대 염기서열 분석(RNA-seq) 및 정자 기능을 활용하여 GGP수준에서 이들 마커의 정확도 및 산자수 향상을 검증한 후 타당성이 입증된 마커를 농장에 적용하여 산자수를 향상시킴</p>				
<p>연구개발성과</p>	<p>연구성과</p> <p>1) 정자에서 전사체 마커 스크리닝을 위한 전처리 및 RT-qPCR 방법 확립</p> <p>2) EQTN, PRDX4, PSP-I, PSP-II, SLC9A3R1, ZP4 여섯 개의 마커 개발 (산자수 1두 이상 증가 전사체 마커)</p>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>연구성과활용 계획</p> <p>1) 현장적용: 농장수준에서의 산자수 향상</p> <p>2) 신산업 창출: 수태성관련 물질, 진단도구 및 피임후보물질 개발이라는 거대산업을 돌출하여 동물 및 인간을 위한 블루오션을 제시. 또한 이와 관련된 분석서비스 산업 창출.</p> <p>3) 생산성 향상으로 중돈 및 모돈 수 감소로 인한 축산분뇨 감소</p> <p>4) 기술이전 및 후속연구방안: 기 개발된 마커의 국제특허 및 다국적 기업에 기술이전, 기 개발된 마커를 이용한 kit 및 진단 tool 개발로 후속연구 및 산업화</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>정자</p>	<p>마커</p>	<p>산자수</p>	<p>전사체</p>	<p>돼지</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>sperm</p>	<p>marker</p>	<p>litter size</p>	<p>transcriptome</p>	<p>pig</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	6
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	10
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	25
4. 연구결과의 활용 계획 등 .....	26

### <뒷면지>

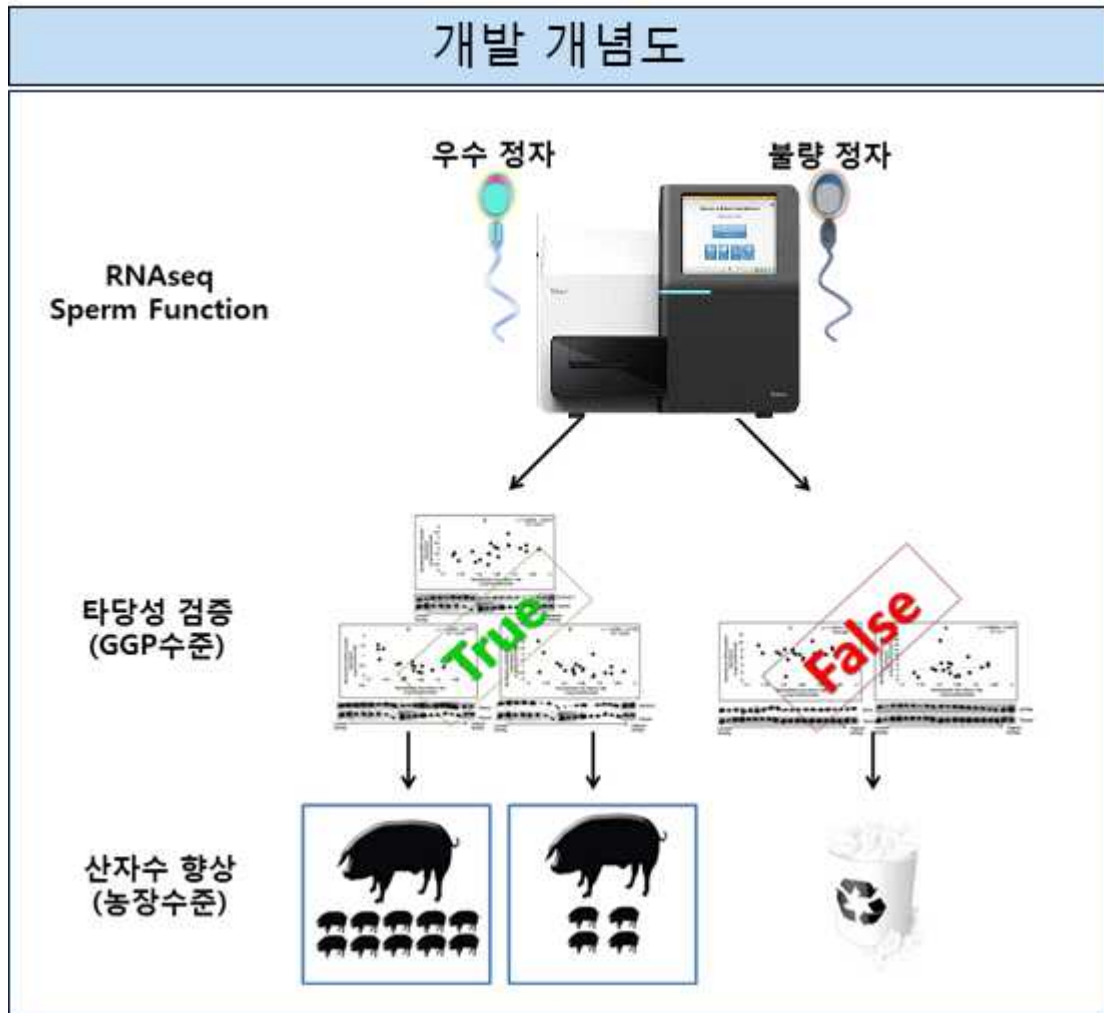
#### 주 의

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

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 목적

- 우수(다산성) 정자 및 불량정자의 비교 차세대 염기서열 분석(RNA-seq) 및 정자 기능을 활용하여 GGP수준에서 이들 마커의 정확도 및 산자 향상율을 검증한 후 타당성이 입증된 마커를 농장에 적용하여 산자수를 향상 시킨다



## 1-2. 연구개발의 필요성

1. 정부의 양돈산업에 대한 2022년 생산성 향상 정책목표는 MSY 24두임
2. 우리나라 양돈생산성(MSY)은 양돈선진국에 비해 크게 저조함: 그 원인은 낮은 실산자수 및 높은 폐사율임
3. 폐사율을 양돈선진국 수준으로 감소시켜도 양돈선진국 MSY에는 미치지 못함
4. 우리나라 인공수정용 씨수퇘지의 산자 생산능력이 4-19두로 차이가 매우 큼
5. 국내에서 씨수퇘지에서 산자수 관련 단백질 마커 5종이 개발됨: 이들 마커의 산자수 예측 정확성은 80%선 이며 실질적으로 GGP농장 적용시 평균 0.8~1두의 산자수가 향상됨

- 6. 따라서 다산성 마커의 정확성 및 육종체제에서의 적용을 위하여 기존 개발된 마커 외에 새로운 수의 마커를 이용한 종돈의 산자생산능력 예측 및 진단 기술의 개발이 절실히 필요함
- 7. 기존의 단백질체학 접근의 한계(낮은 해상력)를 차세대 염기서열 분석(RNA-seq)을 통하여 극복할 수 있음
- 8. 이들 마커는 일반농가 수준에서 철저한 현장적용 후 타당성이 입증되어야 함

### 1-3. 연구개발 범위

#### 1. 1차년도

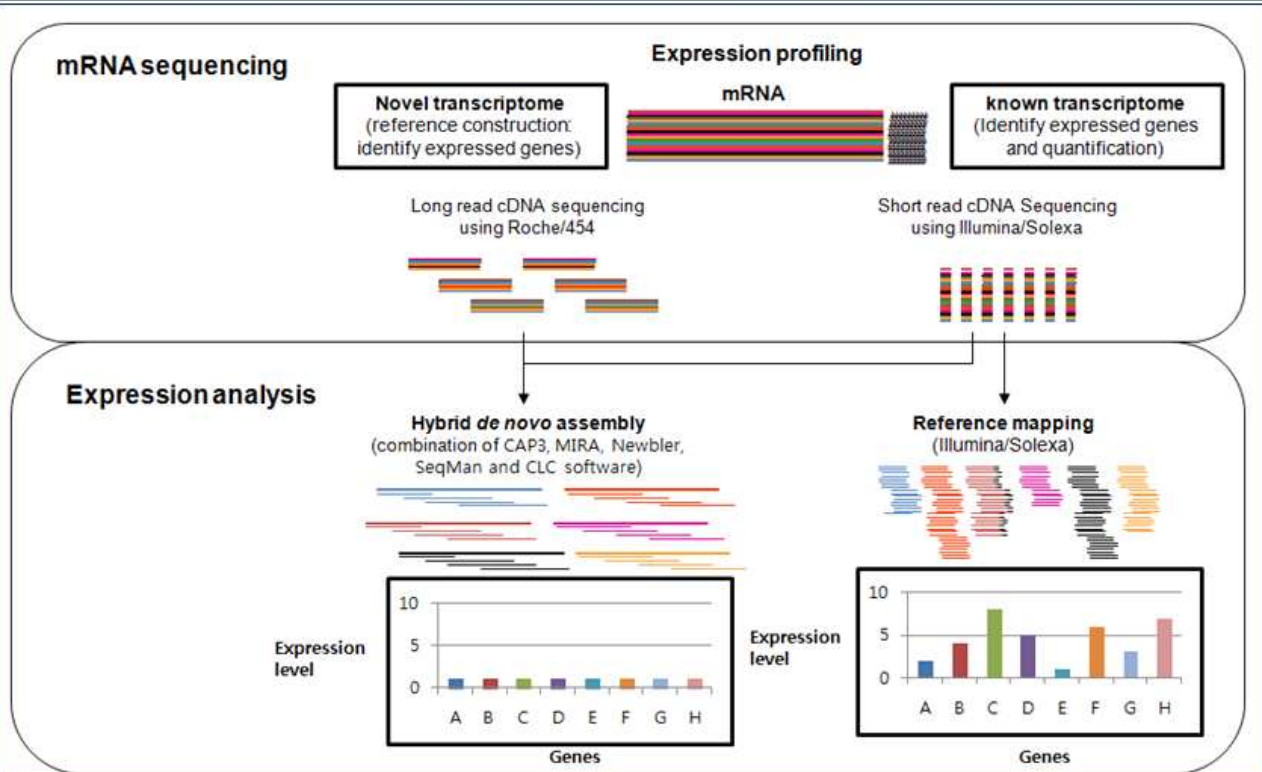
가. 산자생산능력이 상위 및 하위 부계 종돈 정액 샘플 및 번식성적 확보

- (1) GGP농장에서 랜드레이스 정액 확보 (30개체 이상)
- (2) 정자의 운동성, 운동역학변수, 정자의 수정능 획득 및 침체반응 분석
- (3) 수정능력획득 유도 전 및 후 샘플준비 및 -80℃ 냉동보존
- (4) 번식성적 확보
- (5) 번식성적에 따라 산자생산능력 상위 10% 및 하위 10% 정자 샘플 선발

나. 상위 및 하위 10% 정자 샘플의 비교 RNA-seq 시행

- (1) 산자생산능력관련 수태지 정자의 전사체(transcriptome) 발현차이 조사를 위해 RNA-seq 시행

### RNA-seq을 이용한 NGS방법



- (2) 만약 정자의 RNA-seq 불가능시 그간 프로테오믹스 연구에서 획득된 Calmodulin (CALM), Equatorin (EQTN), Cytosolic 5'-nucleotidase 1B (NT5C1B), Ras-related protein



Rab-2A (RAB2A), NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2 (NDUFS2), Triosephosphate Isomerase (TPI), Spermadhesin (AWN), Lysozyme-like protein 4 precursor (LYZL4), Carbohydrate-binding protein (AQN-3), L-amino acid oxidase (LAAO), Malate Dehydrogenase 2 (MDH2), Tubulin Beta Class I (TUBB), Ubiquinol-Cytochrome C Reductase Core Protein 1 (UQCRC1), Ubiquinol-Cytochrome C Reductase Core Protein 2 (UQCRC2), Shadow of prion protein precursor (SPRN), Seminal plasma sperm motility inhibitor precursor (SPMI), Glycoprotein 2 (GP2), Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Trifunctional Multienzyme Complex Subunit Alpha (HADHA), Heat Shock Protein Family D (Hsp60) Member 1 (HSPD1), Beta-actin (ACTB), Actin Related Protein T2 (ACTRT2), Actin Related Protein T3 (ACTRT3), Pyruvate Dehydrogenase E1 Beta Subunit (PDHB), Acrosin Binding Protein (ACRBP), Prohibitin (PHB), Glutathione S-Transferase Mu 3 (GSTM3), ATP synthase subunit d (ATP5H), Glutathione peroxidase 4 (GPx4), vasopressin V2 receptor (AVPR2), Chain B, crystal structure of bovine mitochondria, Homo sapiens CGI-104 protein mRNA, complete CDs, cytosolic 5' nucleotidase IB isoform 1, Porin의 전사체 분석으로 전환가능

(3) 유의적으로 차등 발현된 전사체 분석

(4) 차등 발현된 RNA의 identification

(5) 전사체 결과를 이용한 gene ontology와 signaling pathway 규명

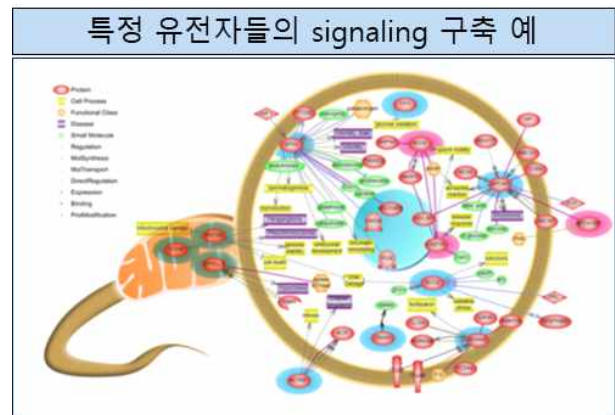
(6) 분석된 전사체와 산자수간의 상관관계 분석

다. 우수 및 불량 산자생산능력 진단 유용 마커 개발

(1) 무작위로 선발한 30마리의 개체에서 산자생산능력 진단 후보유전자의 발현도를 RT-PCR을 이용하여 측정

(2) 후보유전자의 발현도와 산자수와의 상관관계 분석

(3) 민감도 및 특이도를 고려하여 정확성이 70% 이상인 마커 선별



## 2. 2차년도

가. 차등 발현된 전사체의 수정능력과 관련된 수정능획득, 침체반응, 수정, 배발달 등의 생식관련 기능 규명

(1) 정자 운동성, 운동역학변수, 수정능획득 상태 분석

(2) Western blot을 이용한 티로신 인산화 측정

나. 랜드레이스 정액에 유용마커 적용

- 산자생산능력에 따른 상위 및 하위 중돈 선별

(1) RT-PCR 기법을 이용하여 무작위로 선발된 개체의 정자에서 유용마커의 발현도를 측정

(2) 유용마커의 발현도와 산자수의 상관관계 분석을 통해 산자생산능력에 따른 중돈 구분

다. GGP농장 적용을 통한 산자수 예측 및 마커로써의 기능검증

(1) 산자생산능력 관련 마커를 활용하여 산자능력을 진단 후 인공수정 시행

(2) 실제 산자수와 상관관계를 나타내는 마커 선별

(3) 기존 개발된 단백질 및 전사체 마커와 비교를 통한 마커 간 상관관계 규명

(4) Large White종에서 산자수 0.8두 이상 향상시키는 마커 선별

3. 3차년도

가. 유용 마커의 검사 민감도 개선

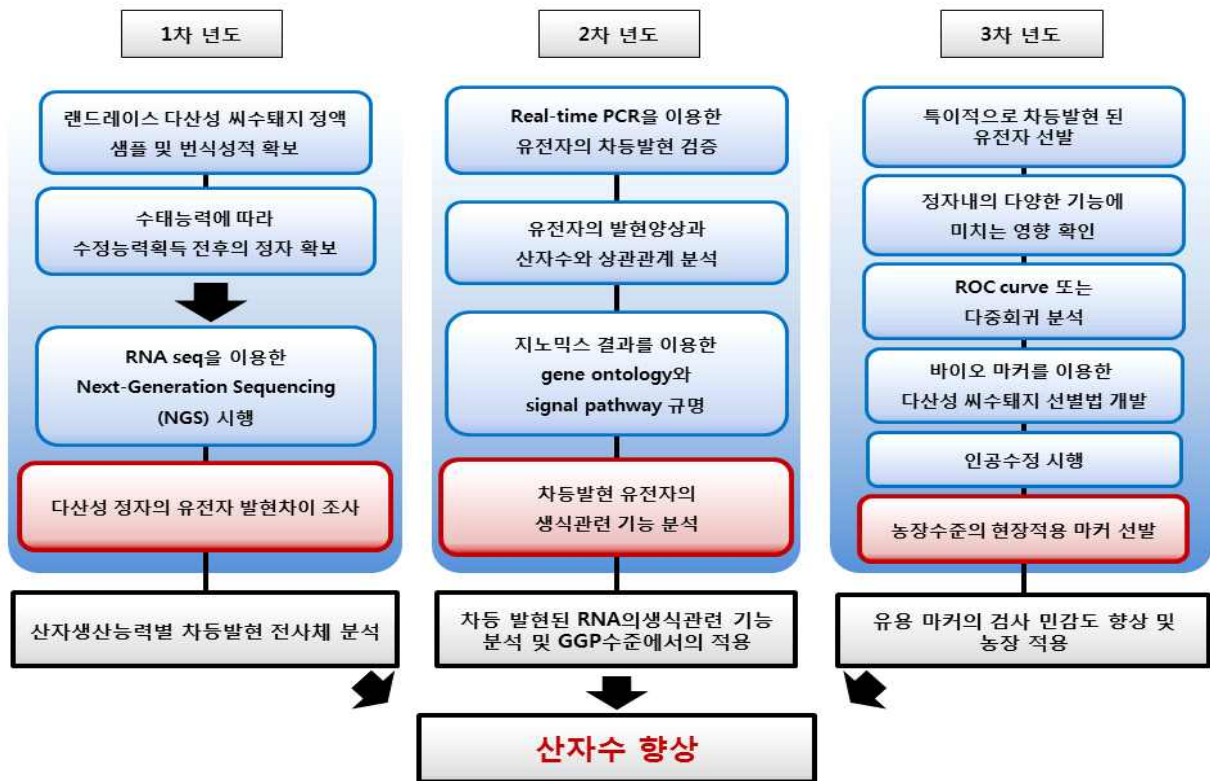
- (1) 우수 및 불량 산자생산능력 마커의 복합적용
- (2) 진단의 정확성을 높이기 위하여 유용한 단일 마커들을 복합적으로 적용

나. 농장 적용

- (1) 농가에 보급하는 인공수정용 듀록 정액 확보
- (2) 개발된 마커의 단일 및 복합 적용 후 듀록에서 인공수정 시행
- (3) 현장에서 얻어진 산자 데이터를 토대로 실산자수 향상 효과 분석
- (4) 현장에서 얻어진 산자 데이터, 일반 정액 성상 및 마커간의 상관관계 분석

다. 개발된 산자생산능력 진단 마커를 표준화된 최적 사양체제하에서 적용

- (1) 새로 개발된 단일 또는 복합 마커를 이용하여 산자수 예측
- (2) 다산성 개체를 선별 후 농가에 직접 현장적용



## 2. 연구수행 내용 및 결과

### 2-1. 연구내용 및 결과

#### 1. 정액 샘플 및 번식성적 확보

가. 우리나라 양돈 생산체제인 LDY교잡에서 종돈으로 이용되는 랜드레이스 및 요크셔 종 정액 및 번식성적 확보, 정자 샘플에 대한 기본 척도 검사 수행

(1) 1,2,3차 년도 3년에 걸쳐 총 49개체의 정액 샘플 확보 (총 98개체의 정액 샘플 보유)

기존 보유량 - 랜드레이스 21두, 요크셔 26두/총 49두

1년차 - 랜드레이스 17두, 요크셔 18두/총 35두

2년차 - 랜드레이스 5두, 요크셔 9두/총 14두

(2) 수정능획득 유도

① 돼지 정자의 in vitro 수정능획득을 유도하는 heparin을 이용하여 수정능력을 획득

② CTC/Hoechst 33258 이중 염색을 이용 수정능력획득정도, 침체반응정도, 죽은정자, 일반정자를 구분하여 비율로 나타냄

(3) 수정능획득 전후의 정자의 운동성 및 역학 변수 측정

① 수정능획득 전 정자의 운동성 및 역학 변수

sample	MOT (%)	HYP (%)	VCL ( $\mu$ m/s)	VSL ( $\mu$ m/s)	VAP ( $\mu$ m/s)	LIN (%)	BCF (Hz)	WOB (%)	ALH ( $\mu$ m)
A	85.12	18.37	148.89	65.19	75.65	43.83	11.41	50.83	6.42
B	87.95	14.61	146.69	63.82	79.88	43.54	12.02	54.5	6.59
C	96.96	26.92	168.04	73.42	87.83	43.83	10.43	52.18	7.42
D	78.96	12.97	136.71	63.17	72.79	46.93	11.59	53.24	6.02
E	86.18	20.98	149.91	58.34	72.35	38.92	11.68	48.27	6.46
F	79.54	3.6	118.28	73.21	77.01	61.94	13.7	65.16	5.53
G	87.36	8.72	138.86	75.95	85.82	54.7	12.14	61.79	6.47
H	89.72	12.91	151.21	77.06	86.01	50.95	11.91	56.89	6.9
I	86.58	14.84	142.33	60.69	75.6	42.63	12.17	53.12	6.19
J	90.22	21.48	154.83	61.08	76.5	39.45	11.8	49.41	6.71
K	92.14	11.48	140.49	69.01	80.73	49.12	11.84	57.46	6.38
L	64.71	9.78	118.02	48.84	58.74	41.43	12.98	49.79	5.19
M	72.85	9.52	138.68	74.4	79.73	53.64	12.22	57.48	6.27
N	95.23	6.87	132.65	77.83	84.43	58.71	12.41	63.68	6.22
O	79.01	13.24	131.61	48.38	62.19	36.76	12.44	47.25	5.79
P	95.84	28.73	177.26	84.36	98.34	47.59	10.93	55.49	7.96
Q	94.88	36.64	181.87	75.25	91.22	41.38	10.51	50.16	7.88
R	91.44	10.55	143.24	75.7	86.82	52.84	11.93	60.62	6.55
S	83.41	18.35	147.15	62.25	74.05	42.31	11.7	50.34	6.42
T	90.28	16.81	152.34	72.24	85.54	47.41	11.7	56.15	6.75
U	91.52	24.25	173.22	90.14	100.44	52.05	10.26	57.99	7.72
V	74.3	11.33	130.75	52.09	63.48	39.79	12.17	48.52	5.67
W	91.8	14.13	162.3	101.14	103.35	62.29	11.06	63.7	7.61
X	82.44	11.47	149.21	85.71	92.52	57.46	10.96	62	7.02
Y	85.95	17.26	160.04	87.17	93.66	51.46	10.84	58.5	7.37
Z	74.23	12.28	126.78	49.74	61.25	39.23	12.61	48.3	5.54
a	89.43	25.89	164.8	75.82	85.12	45.97	10.88	51.62	7.22
b	61.76	5.07	109.76	53.12	60.61	48.23	13.02	55.13	4.89
c	72.04	12.16	141.91	72.14	81.69	50.82	11.7	57.56	6.36

d	80.21	13.11	133.35	55.34	67.64	41.43	11.94	50.7	5.83
e	85.58	20.78	153.32	65.99	78.8	42.97	11.49	51.02	6.61
f	73.63	23.08	150.28	63.76	76.59	42.43	11.9	50.98	6.57
g	80.14	12.23	128.21	47.87	62.2	37.3	12.48	48.49	5.7
h	74.41	15.93	141.99	67.23	75.49	47.31	11.69	53.16	6.23
i	72.75	5.31	120.81	63.12	72.13	52.23	13.46	59.68	5.61
j	74.25	8.65	119.74	49.1	60.32	40.98	12.95	50.37	5.3
k	94.69	33.32	181.42	83.63	96.4	46.11	10.42	53.15	8
l	78.41	15.47	136.84	53.57	64.09	39.15	11.84	46.85	5.8
m	89.93	18.69	156.23	71.81	83.42	45.95	10.94	53.4	6.8
n	71.48	7.19	136.56	80.39	82.48	58.83	12.29	60.38	6.26
o	80.42	16.45	146.51	67.26	76.15	45.9	11.67	51.97	6.38
p	87.02	23.7	156.78	64.33	77.43	41.04	11.19	49.39	6.81
q	85.56	13.87	138.77	59.28	70.9	42.69	11.48	51.06	6.06
r	93.57	19.81	160.95	77.89	90.58	48.38	11.05	56.27	7.2
s	89.04	30.66	169.87	66.46	82.33	39.1	11.05	48.46	7.33

② 수정능획득 후 정자의 운동성 및 역학 변수

sample	MOT (%)	HYP (%)	VCL ( $\mu$ m/s)	VSL ( $\mu$ m/s)	VAP ( $\mu$ m/s)	LIN (%)	BCF (Hz)	WOB (%)	ALH ( $\mu$ m)
A	90.61	15.98	150.05	74.71	84.66	49.87	11.16	56.6	6.75
B	86.95	9.07	133.01	72.38	79.67	54.5	11.5	59.93	6.1
C	79.89	2.06	111.36	75.14	75.86	67.46	13.28	68.11	5.31
D	75.66	1.63	112.77	74.75	75.67	66.34	13.31	67.18	5.32
E	94.98	24.52	164.18	73.85	87.36	45.02	10.8	53.25	7.32
F	78.19	3.88	111.97	63.06	69.09	56.37	12.77	61.74	5.17
G	67.64	1.89	106.01	78.08	77.23	73.68	15.55	72.87	5.28
H	74.41	0.71	109.09	84.09	81.05	77.11	14.68	74.32	5.45
I	75.27	7.29	116.36	52.35	63.89	45	12.54	54.92	5.25
J	96.05	35.26	182.05	75.11	91.13	41.27	10.38	50.07	7.88
K	49.47	1.74	94.69	52.45	56.64	55.46	12.98	59.85	4.31
L	69.5	7.68	121.48	51.37	61.6	42.27	12.61	50.71	5.3
M	84.33	1.28	111.58	77.72	77.8	69.61	14.01	69.73	5.48
N	62.93	0.78	99.28	68.19	68.14	68.82	14.73	68.81	4.84
O	83.89	8.54	127.65	63.23	71.54	49.54	12.39	56.05	5.8
P	71.77	2.98	118.16	82.68	83.11	69.91	13.09	70.3	5.73
Q	85.73	2.75	123.15	79.25	81.16	64.37	12.59	65.91	5.84
R	86.67	4.72	118.15	67.06	73.18	56.78	12.21	61.95	5.53
S	92.16	13.17	138.81	64.78	75.45	46.68	11.45	54.37	6.27
T	96.73	32.55	179.31	77.22	91.98	43.09	10.43	51.31	7.87
U	54.87	2.54	89.16	48.57	53.68	54.5	14.1	60.21	4.2
V	92.69	24.89	162.05	67.9	82.38	41.93	11.05	50.86	7.08
W	38.04	1.9	104.58	68.7	69.22	65.89	13.31	66.36	4.95
X	86.6	8.72	138.25	85.19	88.96	61.68	11.95	64.4	6.52
Y	85.22	10.95	150.58	91.42	94	60.68	10.87	62.41	6.85
Z	87.21	17.82	151.82	74.83	83.98	49.36	11.03	55.37	6.81
a	90.74	9.4	139.51	80.12	85.11	57.44	11.25	61.02	6.36
b	81.46	6	126.67	76.19	79.25	60.16	12.34	62.56	5.81
c	81.69	4.88	131.13	83.45	85.07	63.63	11.98	64.86	6.1
d	96.74	41.36	190.47	77.26	95.38	40.58	10.22	50.08	8.28
e	74.24	6	120.83	70.44	75.25	58.26	13.02	62.27	5.56
f	86.67	10.02	130.17	69.37	76.3	53.31	11.4	58.63	5.92
g	81.92	11.24	127.11	51.44	64.47	40.47	12.16	50.72	5.73

h	54.67	4.25	106.47	57.6	61.25	54.11	13.17	57.52	4.72
i	78.02	3.22	121.41	77.41	80.1	63.82	13.41	66	5.79
j	96.67	42.5	192.47	69.28	90.32	36	10.85	46.93	8.21
k	78.8	11.63	131.88	66.05	73.43	50.11	11.74	55.72	5.87
l	70.75	6.95	111.91	53.62	61.1	47.89	12.83	54.6	5.02
m	97.09	44.92	194.56	70.99	90.73	36.49	10.54	46.64	8.37
n	82.5	4.32	131.53	92.05	90.11	69.96	12.09	68.5	6.26
o	86.2	13.01	137.69	63.27	73.54	45.99	11.6	53.47	6.13
p	92.47	16.93	147.19	67.4	79.37	45.79	11.19	53.92	6.59
q	96.51	20.06	155.63	71.49	83.67	45.94	10.75	53.76	6.92
r	80.66	4.08	126.99	80.85	82.76	63.75	12.16	65.18	5.93
s	94.48	23.66	165.86	77.41	89.13	46.67	10.74	53.74	7.38

(4) 수정능획득 전 및 후 정상정자, 수정능획득, 침체반응, 죽은정자 비율 측정

sample	수정능획득 전			수정능획득 후		
	AR(%)	F(%)	B(%)	AR(%)	F(%)	B(%)
A	1.60	97.76	0.64	5.32	72.70	21.99
B	1.50	95.50	3.00	7.53	70.61	21.86
C	2.17	91.95	5.88	5.06	76.79	18.14
D	1.48	93.33	5.19	5.97	63.43	30.60
E	0.94	96.54	2.52	2.70	64.09	33.20
F	0.62	94.72	4.66	8.39	72.03	19.58
G	0.30	95.44	4.26	1.27	80.89	17.83
H	1.10	96.69	2.21	3.64	68.18	28.18
I	1.07	94.66	4.27	9.00	81.50	9.50
J	0.66	93.07	6.27	8.19	65.09	26.72
K	1.52	84.76	13.72	18.69	54.21	27.10
L	10.48	70.16	19.37	8.60	80.65	10.75
M	1.16	89.28	9.57	5.44	78.23	16.33
N	0.67	95.62	3.70	2.90	74.27	22.82
O	9.15	83.80	7.04	4.04	67.65	28.31
P	3.88	85.97	10.15	5.28	71.54	23.17
Q	1.05	88.95	10.00	4.37	53.35	42.27
R	2.43	88.11	9.46	1.11	59.61	39.28
S	1.88	92.23	5.90	1.36	58.54	40.11
T	2.03	95.64	2.33	1.62	64.72	33.66
U	1.57	83.70	14.73	5.04	61.15	33.81
V	3.90	83.77	12.34	4.72	71.65	23.62
W	0.69	91.72	7.59	2.31	60.77	36.92
X	2.28	89.17	8.55	1.56	68.87	29.57
Y	0.00	93.73	6.27	4.95	53.47	41.58
Z	0.86	87.68	11.46	5.36	56.55	38.10
a	1.99	80.34	17.66	2.96	61.58	35.47
b	0.00	93.87	6.13	1.68	59.66	38.66
c	0.00	92.46	7.54	1.30	59.57	39.13
d	0.29	96.81	2.90	3.31	69.54	27.15
e	0.00	93.08	6.92	0.84	56.96	42.19
f	0.61	96.05	3.34	2.36	60.85	36.79
g	0.00	93.13	6.87	5.06	50.00	44.94
h	0.00	74.01	25.99	3.94	42.52	53.54

i	0.00	90.30	9.70	1.55	41.09	57.36
j	0.43	95.24	4.33	4.35	60.87	34.78
k	0.00	61.15	38.85	3.57	60.27	36.16
l	0.00	97.57	2.43	3.31	80.11	16.57
m	0.31	94.14	5.56	1.86	46.51	51.63
n	0.31	91.28	8.41	2.73	58.18	39.09
o	0.00	85.08	14.92	1.89	50.94	47.17
p	0.00	77.35	22.65	3.15	48.20	48.65
q	0.00	92.88	7.12	2.06	58.44	39.51
r	0.00	54.90	45.10	2.69	47.98	49.33
s	0.00	81.72	18.28	2.63	46.99	50.38

(5) 샘플 채취한 개체의 정액을 이용한 인공수정을 통해 번식성적 획득

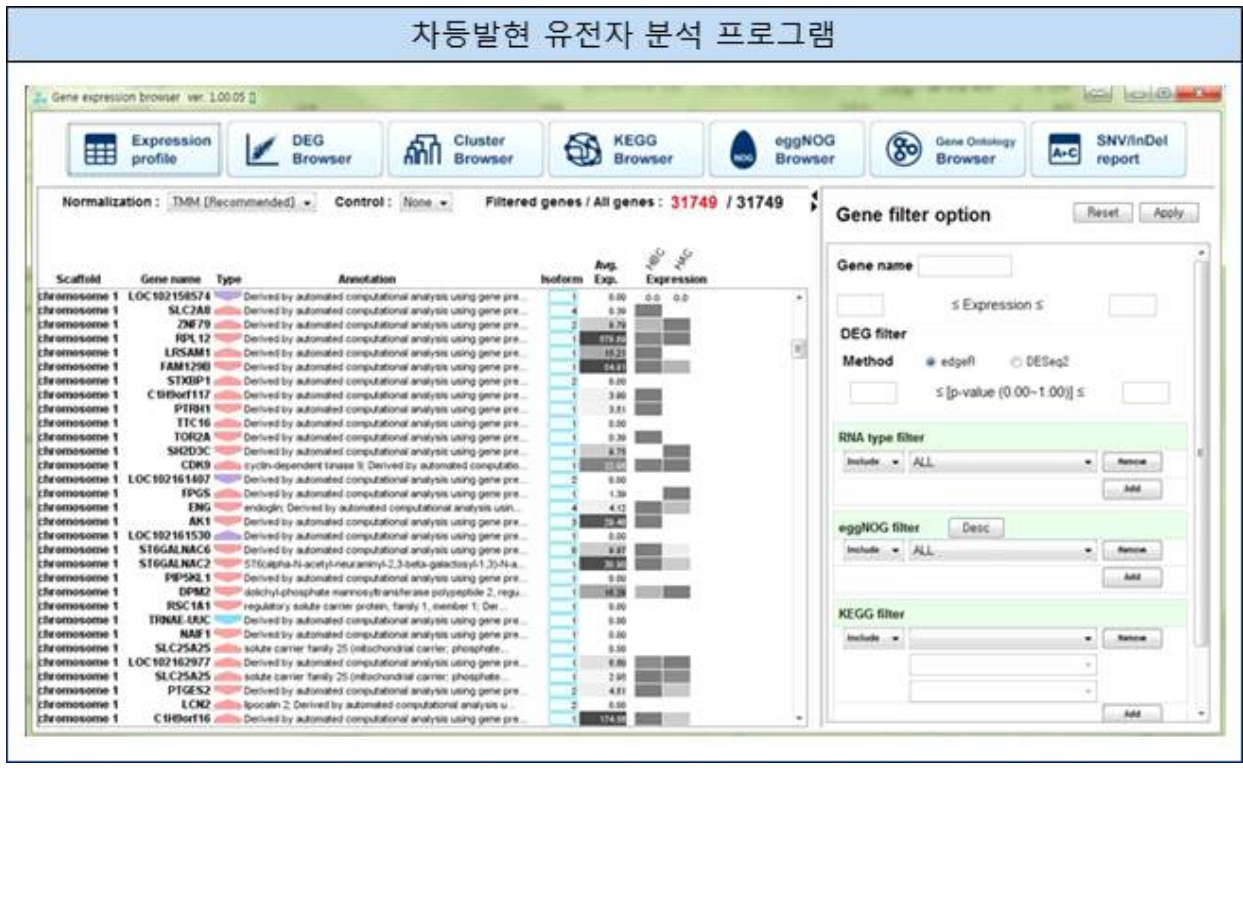
Sample	총교배 횟수	평균교배횟수 (평균산차)	단일교배모 돈수	재교배 두수	임신두 수	수태율 (%)	분만율 (%)	평균총 산
a	48	1.5 (3.4)	26	1	21	80.8	50	14.2
A	78	1.3 (2.8)	43	3	41	95.3	58.1	11.3
b	53	1.4 (3.3)	27	1	26	96.3	74.1	13.1
B	32	1.5 (2)	17	0	14	82.4	35.3	10.5
c	35	1.3 (2.3)	18	0	18	100	44.4	12.8
C	55	1.5 (4.6)	28	2	27	96.4	25	13.1
d	106	1.6 (3.3)	55	3	43	78.2	38.2	12.4
D	60	1.3 (3.6)	33	1	30	90.9	66.7	11.5
E	41	1.3 (2.5)	22	4	17	77.3	68.2	12.7
e	45	1.3 (2.3)	24	3	20	83.3	75	13.4
f	58	1.5 (2.7)	30	1	29	96.7	66.7	13.3
F	61	1.6 (3.7)	33	3	31	93.9	72.7	11
G	35	1.5 (3.7)	21	3	20	95.2	28.6	10.3
g	58	1.3 (3.1)	35	2	32	91.4	88.6	12.2
H	95	1.4 (2.9)	55	4	51	92.7	92.7	12.1
h	42	1.3 (3.2)	23	1	22	95.7	69.6	12.4
i	19	1.3 (2)	10	1	8	80	30	10.7
I	70	1.4 (3.3)	38	4	31	81.6	81.6	11.8
j	43	1.4 (3.4)	23	2	18	78.3	60.9	12.8
J	78	1.3 (3.2)	47	0	44	93.6	93.6	12.2
k	19	1.4 (0)	10	0	9	90	0	0
K	107	1.3 (3)	66	6	56	84.8	84.8	11.6
L	107	1.7 (3.2)	57	11	51	89.5	89.5	11.4
l	48	1.3 (2.8)	26	2	22	84.6	61.5	12.2
M	34	1.6 (3.2)	20	1	20	100	100	12.7
m	112	1.4 (2.6)	67	7	58	86.6	73.1	12.2
n	55	1.4 (3.5)	31	2	23	74.2	67.7	12.9
N	51	1.4 (4.7)	26	0	25	96.2	23.1	12.3
o	6	1.2 (0)	3	0	2	66.7	0	0
O	39	1.1 (2.9)	22	3	20	90.9	90.9	12.3
p	18	1.3 (2)	10	1	7	70	40	12.5
P	26	1.3 (4)	14	0	13	92.9	28.6	12.8
Q	89	1.4 (3)	46	4	43	93.5	52.2	13.3
q	57	1.6 (3.1)	30	0	29	96.7	56.7	14.1
r	65	1.3 (2.7)	40	6	34	85	75	12
R	21	1.4 (4.5)	12	3	10	83.3	66.7	13.9
s	12	1.1 (0)	6	1	6	100	0	0

S	44	1.8 (3.5)	22	1	21	95.5	50	12.8
t	20	1.4 (0)	10	0	8	80	0	0
T	89	1.4 (2.7)	51	4	43	84.3	84.3	11.4
u	17	1.1 (0)	9	1	9	100	0	0
U	53	1.1 (3.2)	30	2	28	93.3	66.7	10.8
V	44	1.4 (3.6)	25	4	24	96	96	12.5
v	58	1.3 (3.3)	34	2	31	91.2	79.4	12.6
W	42	1.5 (2.9)	21	2	19	90.5	33.3	11.9
X	60	1.6 (3.2)	30	1	26	86.7	20	10.3
Y	36	1.4 (4)	19	1	17	89.5	42.1	11.8
Z	28	1.4 (2.8)	15	1	15	100	66.7	12.8

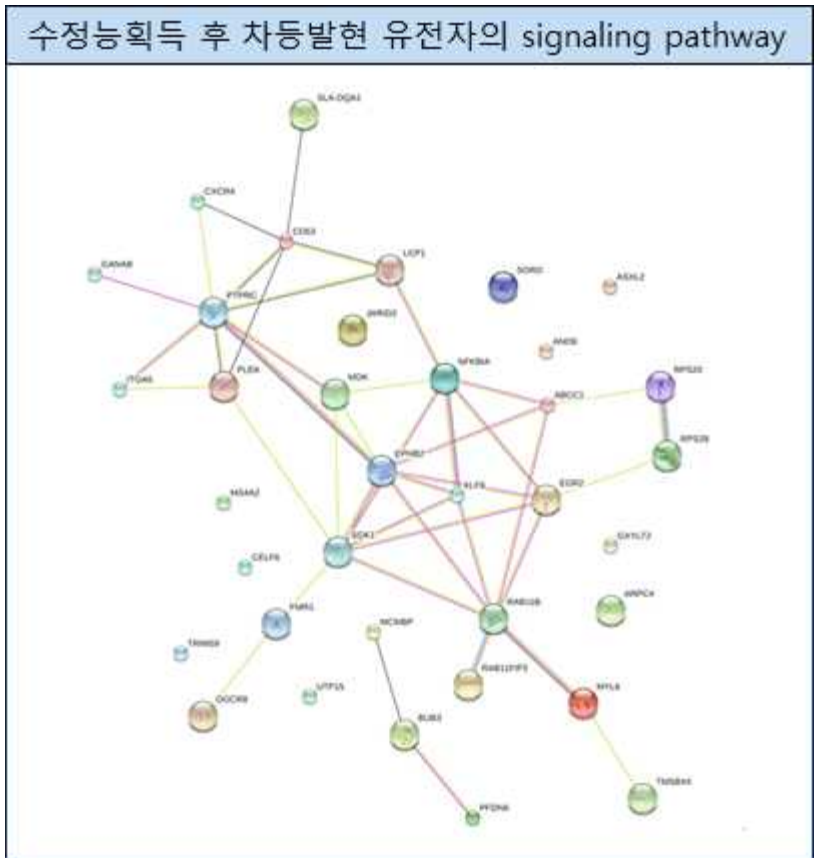
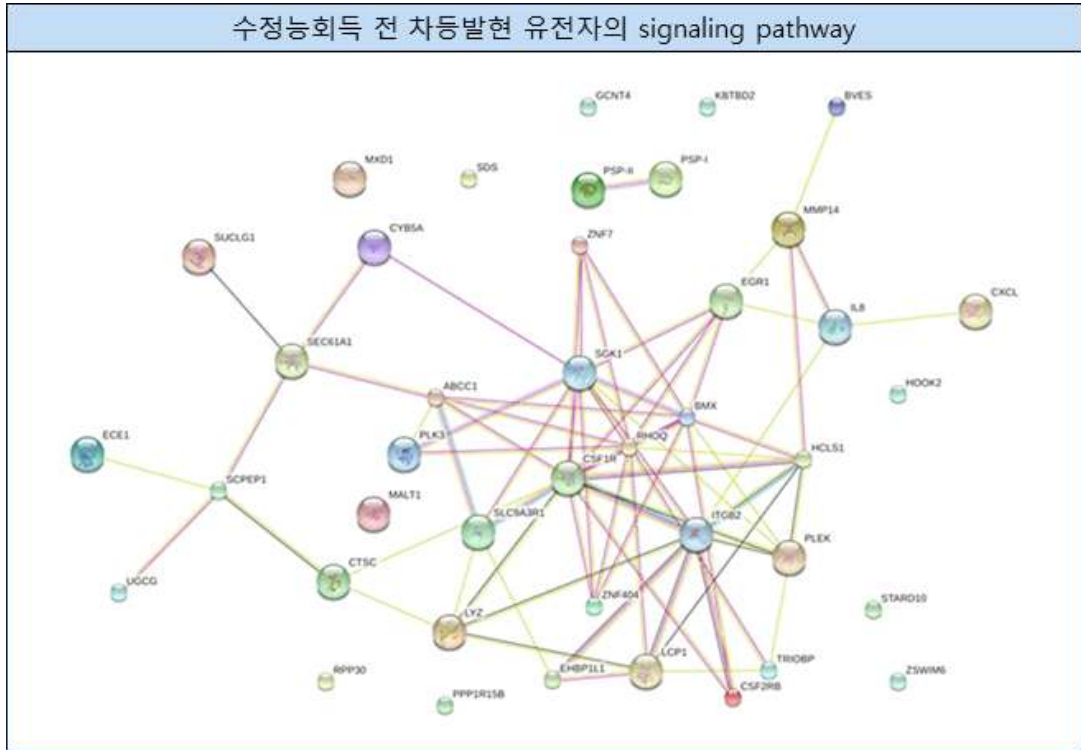
## 2. RNA-seq

가. 고산자와 저산자 개체 대표샘플의 RNA-seq 및 관련 gene ontology 와 signaling pathway 규명

- (1) 번식 성적중 평균 총산정보를 기준으로 하여 상위 및 하위 10% 정자 샘플을 pooling하여 대표샘플의 비교 RNA-seq 수행
  - Illumina HiSeq platform을 이용한 유전체 전체단위의 전사체 발현량 분석으로 다양한 실용 가능한 전사체마커 발견을 타겟으로 진행함
- (2) 상위 10% (HBC, HAC)와 하위 10% (BC,AC)의 RNA-seq결과 Total mapped reads는 15.1%가 나왔고, 평균적으로 64,253,246개의 전사체 조각을 해독
- (3) RNA-seq을 통해 총 31,749개의 전사체가 해독되었으며, 추가 생체정보학 분석 결과 선행 프로테오믹 연구에서 획득된 단백질 후보 마커 중 17종의 단백질의 전사체 발견 및 13,851개의 차등 발현 전사체 발견



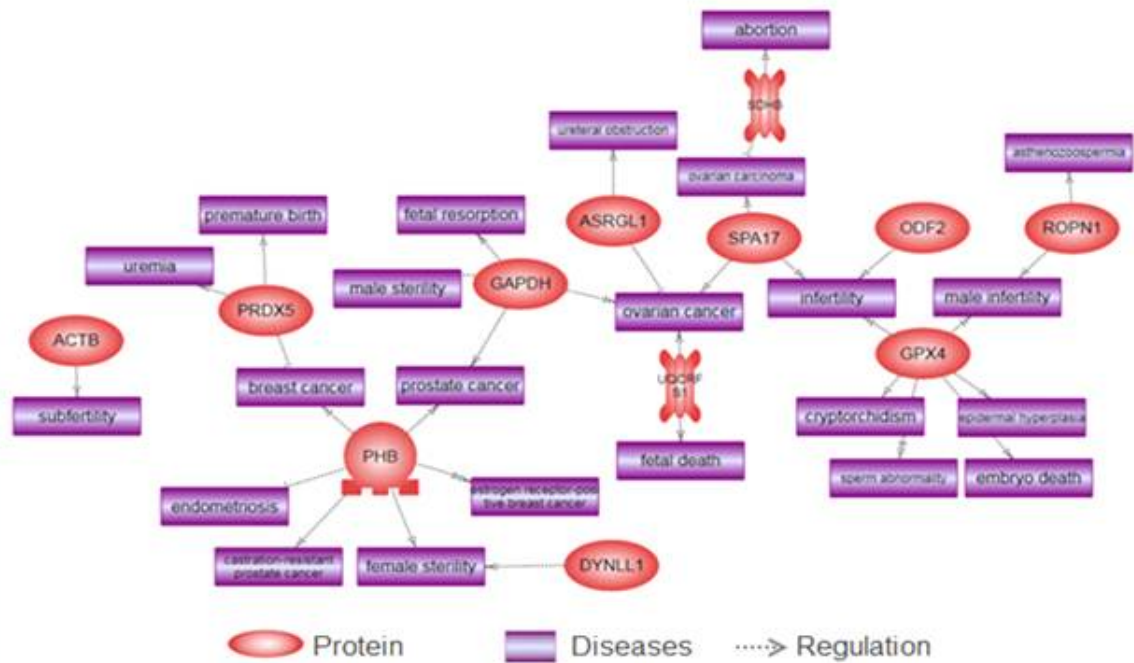
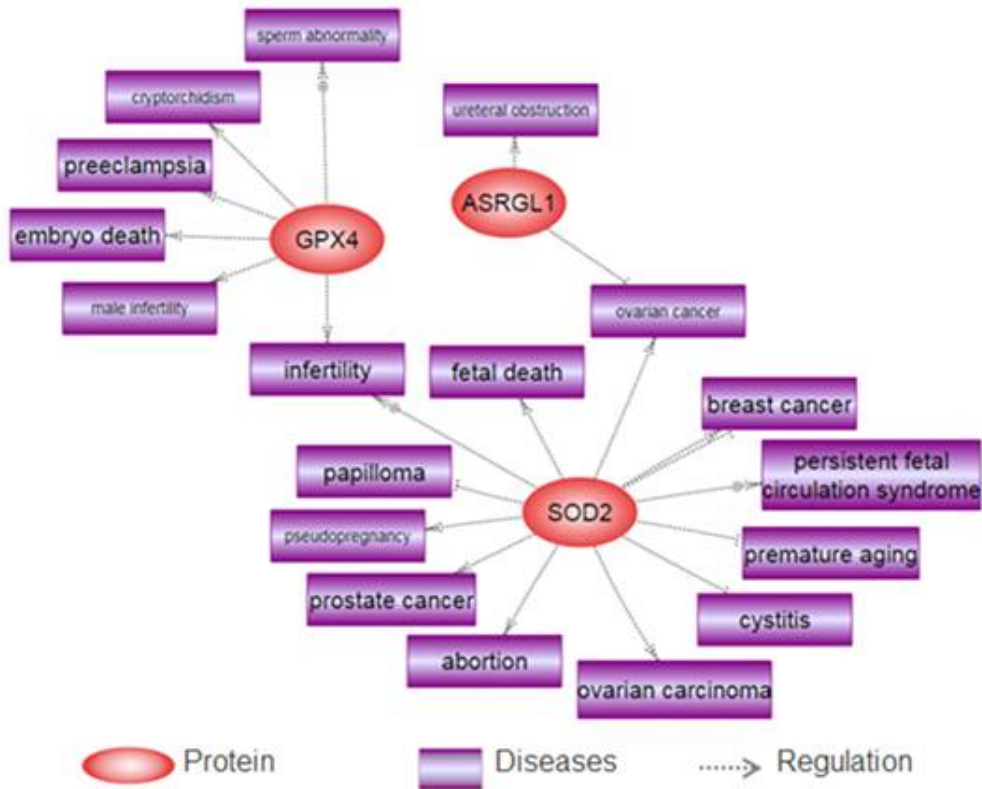
(4) 차등 발현 전사체중 발현도 차이가 많은 유전자 순으로 상위 50개의 유전자를 선발, 수정능력 획득 전, 후 각각 유전자의 signaling pathway를 구축함



수정능력 획득 전후 차등발현 유전자의 signaling pathway가 전혀 다른 양상을 띠고 있었으며, 이를 통해 정자가 수정능 획득 전, 후에 전사체가 변함에 따라 그 기능에도 변함이 있을 것으로 예상됨



유전자 변화에 따른 질병들에 대한 분석

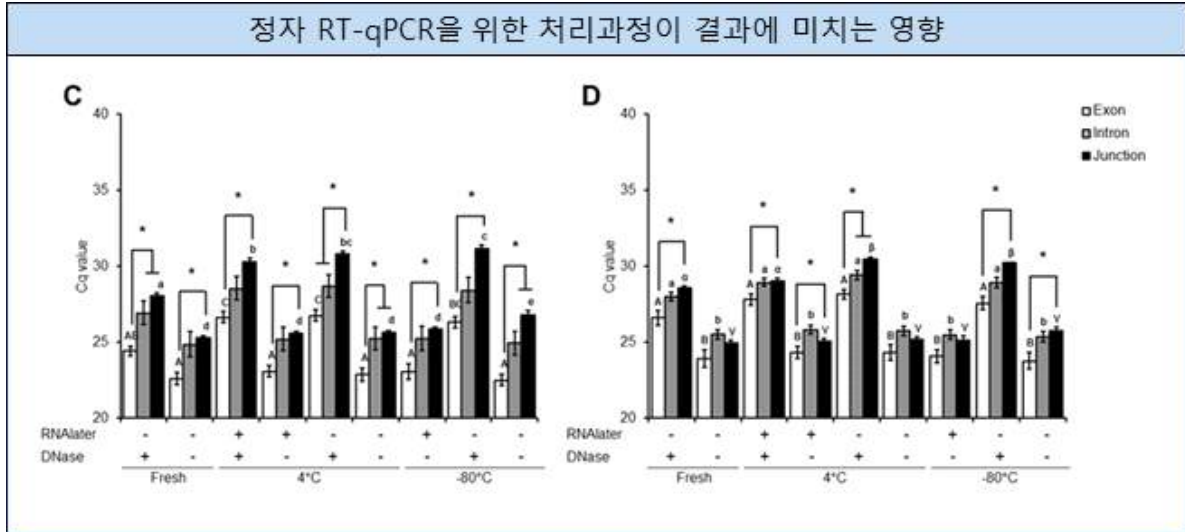


다양한 유전자들을 protein-protein interaction을 이용한 reference 기반의 pathway studio 프로 그램을 이용한 결과 실제 생식력과 관련된 여러 질병들과의 연관성이 분석됨

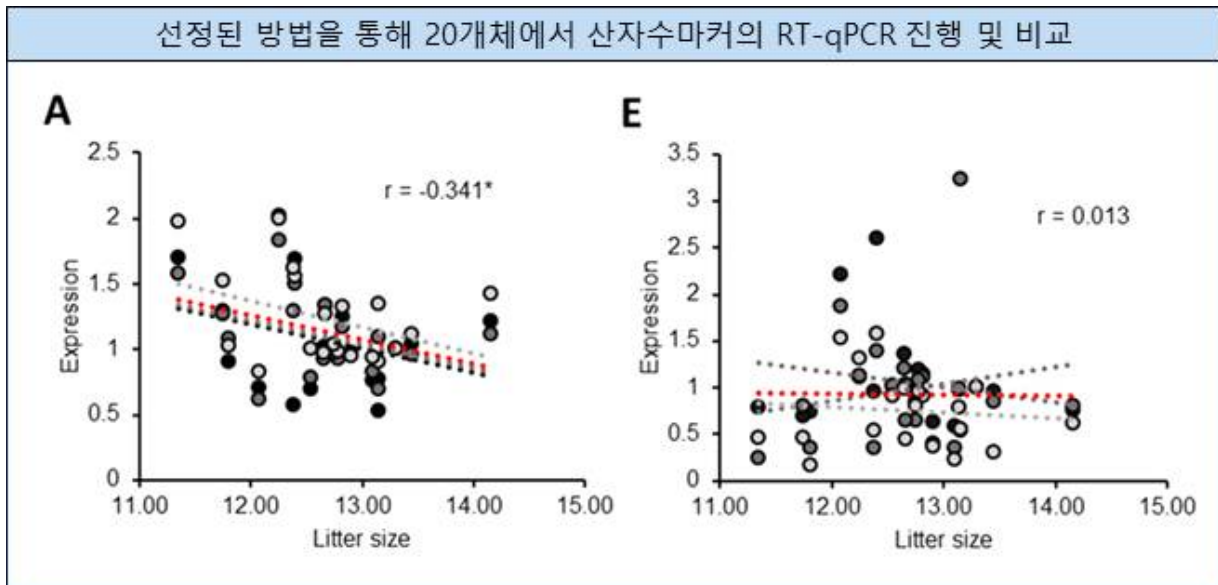
### 3. 정자 전처리 및 RT-qPCR 최적화

가. 정자에서 mRNA의 RT-qPCR을 위해서는 현재 정립된 방법이 없음. 따라서 차등발현 검증 이전에 RT-qPCR 방법 확립을 위한 선행실험을 진행함

- 샘플의 저장환경, RNA 추출방법, cDNA 생성방법, RT-qPCR을 위한 primer비교 단계에서 대표적으로 쓰이는 방법과 그에 상응하는 변형 방법을 비교하여, 최종적으로 정자의 mRNA 차등발현 테스트를 위한 RT-qPCR 프로토콜 확립. 확립된 프로토콜은 액체질소를 이용한 snap freezing을 정자 저장방법으로, RNA 추출과정 중에는 DNase를 처리하지 않는 방법으로, cDNA 생성에는 Oligo dT primer를 이용하는 방법으로, RT-qPCR에는 exon primer를 이용한 방법으로 차등발현을 안정적으로 분석할 수 있음을 발견



Oligo dT를 이용하는 방법 (C) 이 random hexamer를 이용한 방법보다 (D) mRNA 발현량이 으며, snap freezing과 DNase를 처리하지 않은 방법에서 gDNA의 발현량과 mRNA의 발현량이 현저히 차이가 나 mRNA를 분석하기 가장 적합한 방법으로 선정함



EQTN mRNA 마커를 이용하여 무작위선발된 20개체의 Yorkshire 샘플에서 산자수와 비교 한 결과 DNase 처리 시 (E) 정자의 소량 RNA가 악영향을 받아 분석결과의 상관성이 관찰되지 않음

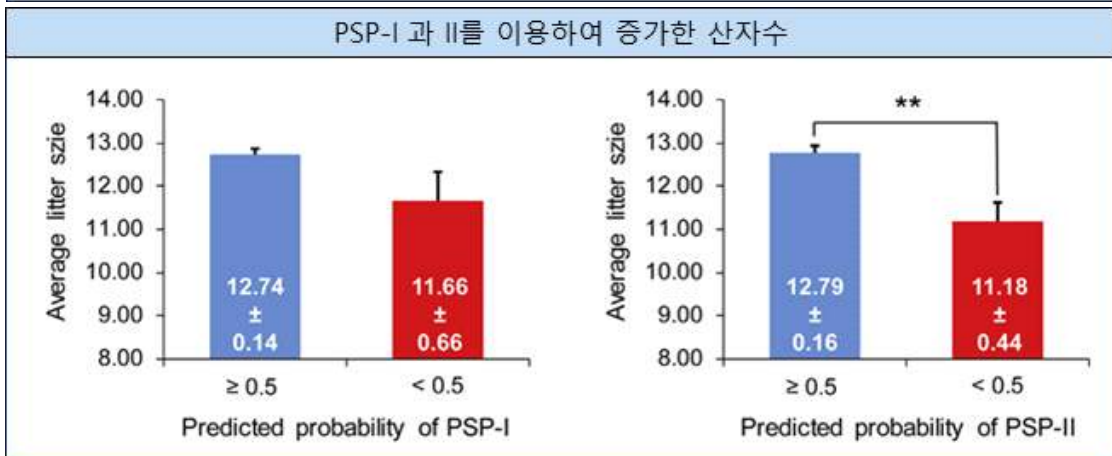
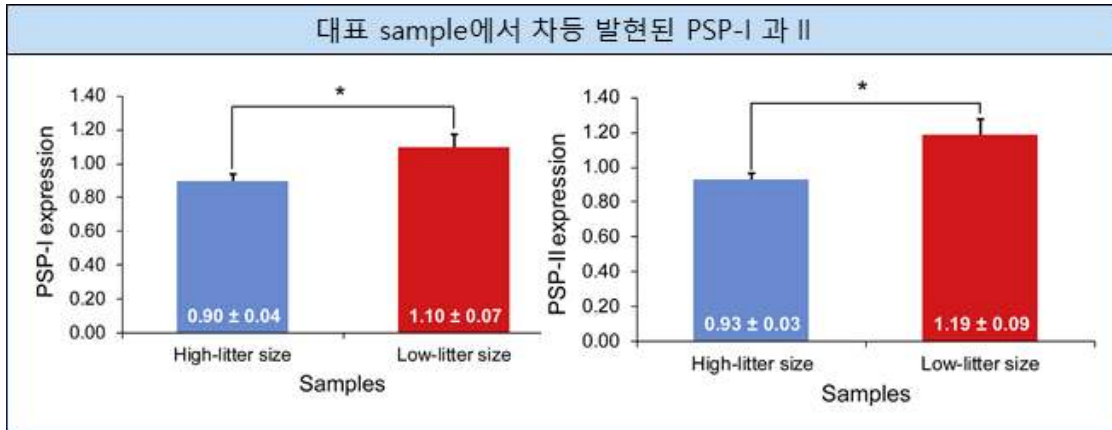


나. 검증된 우수 및 불량 산자생산능력 진단 유용 마커의 GGP 농장 적용을 통한 검증

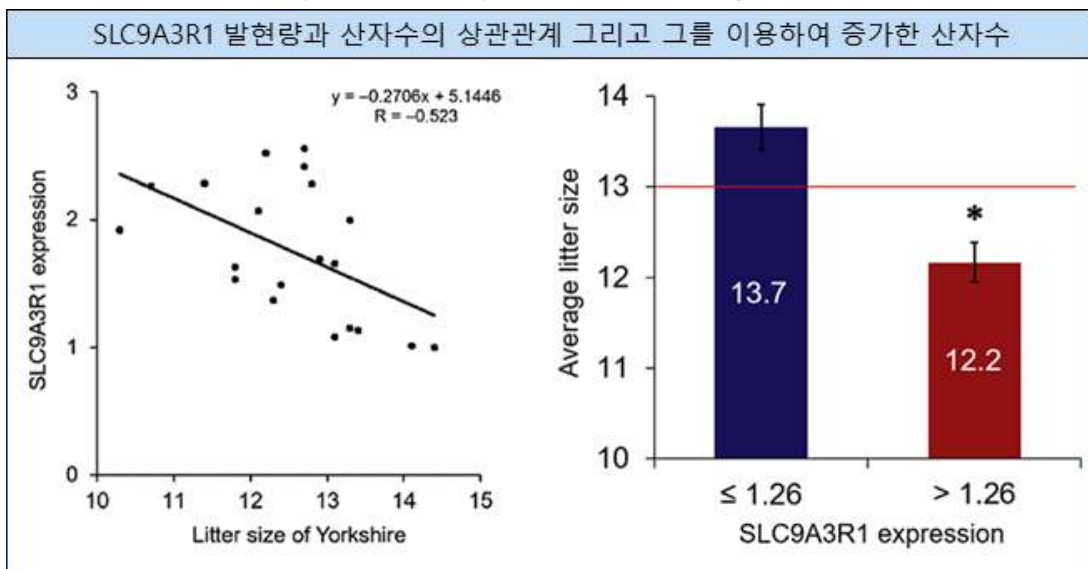
(1) GGP농장 적용 및 검증을 위해 무작위로 선별된 20 개체의 Yorkshire에서 정액을 채취 후 정자에서 앞서 선별된 모든 마커들의 발현도를 측정 한 후, 인공수정 후 산자수와 비교를 통해 산자수 예측의 정확도를 파악함

- 그 중 RNA-seq data를 통해 나온 유전자 3종(PSP - I, II, SLC9A3R1)과 선행 단백질 연구를 통해 발견된 마커의 전사체 2종 (EQTN, PRDX4) 총 5종의 마커가 산자수와 유의적인 상관관계를 나타내어 GGP 농장 적용 가능한 유용 마커로 검증됨

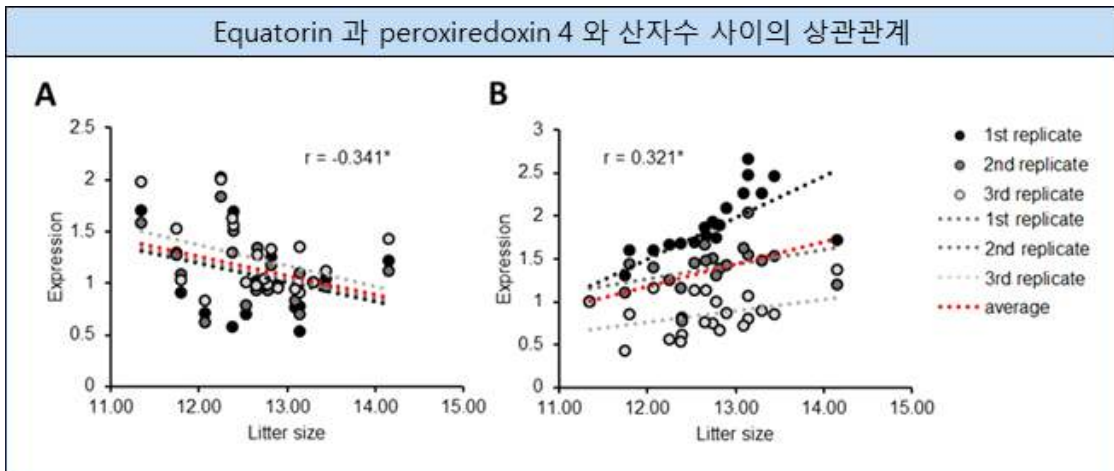
① Procine seminal protein-I 과 II



② Solute carrier family 9, subfamily A, member 3 regulator 1



③ Equatorin 과 peroxidexin 4

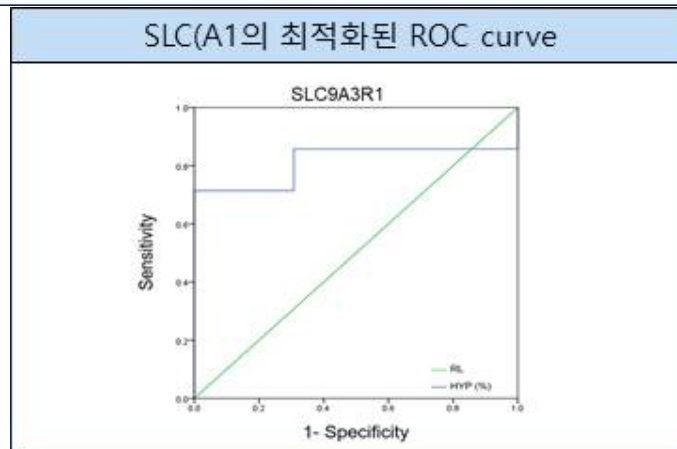
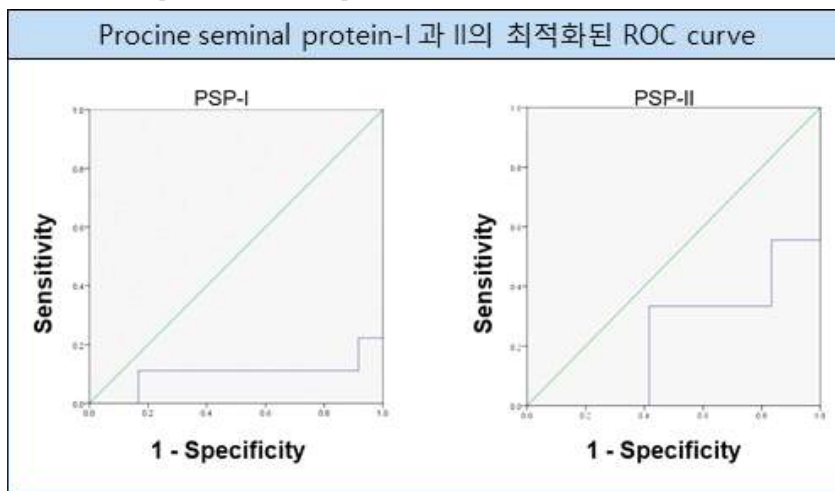


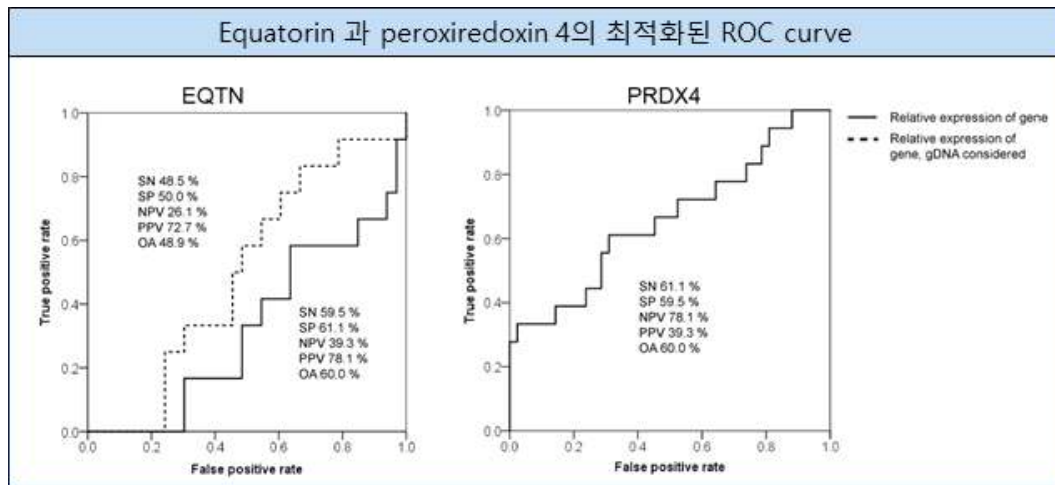
산자수와 음의 상관관계를 나타내는 EQTN (A)와 양의 상관관계를 나타내는 PRDX4 (B). 두 마커 모두 실험반복시 마다 안정된 발현패턴을 보여 안정적인 마커임이 입증됨

5. 개별 mRNA 마커의 수태율 예측능력 개선

가. 각 마커의 실제 현장적용 이전 민감도 개선을 위해 의학분야에서 질병을 예측하는데 많이 사용하는 통계방법인 ROC curve를 이용하여 각 마커의 민감도, 전체적인 진단의 정확성을 향상시키는 작업을 수행함

- 각각의 마커가 최적으로 산자수를 예측할 수 있는 적합한 발현도를 Cut-off value로 설정 하여 이후 실제로 litter size prediction chip에 이용할 수 있게 함

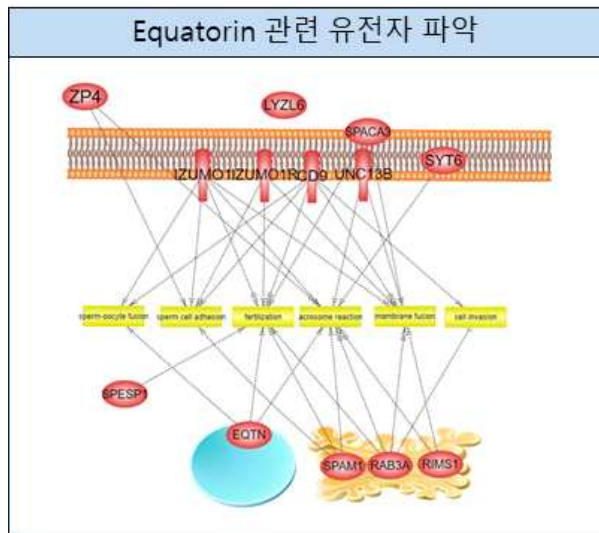




## 6. 새로운 마커 발견

### 가. 새로운 마커 발견을 위한 접근법

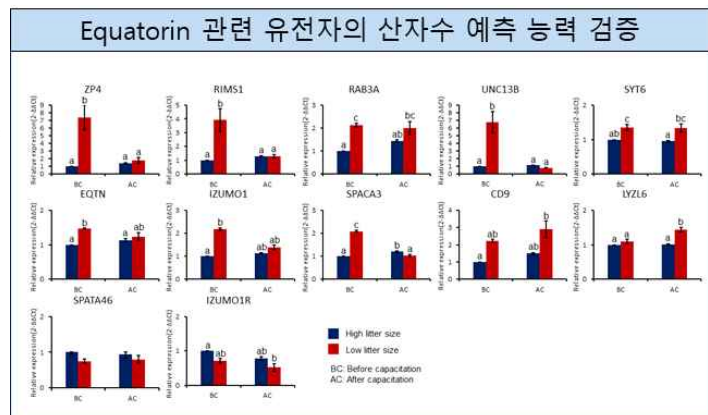
- (1) 기존 발견된 마커들의 생물학적 기능을 각종 database (Gene Ontology, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, GeneCards)를 이용하여 판별 및 관련 유전자 정보 수집
- (2) 기존 마커들과 같은 category, biological pathway에 해당하는 유전자들의 산자수 예측 능력을 검증



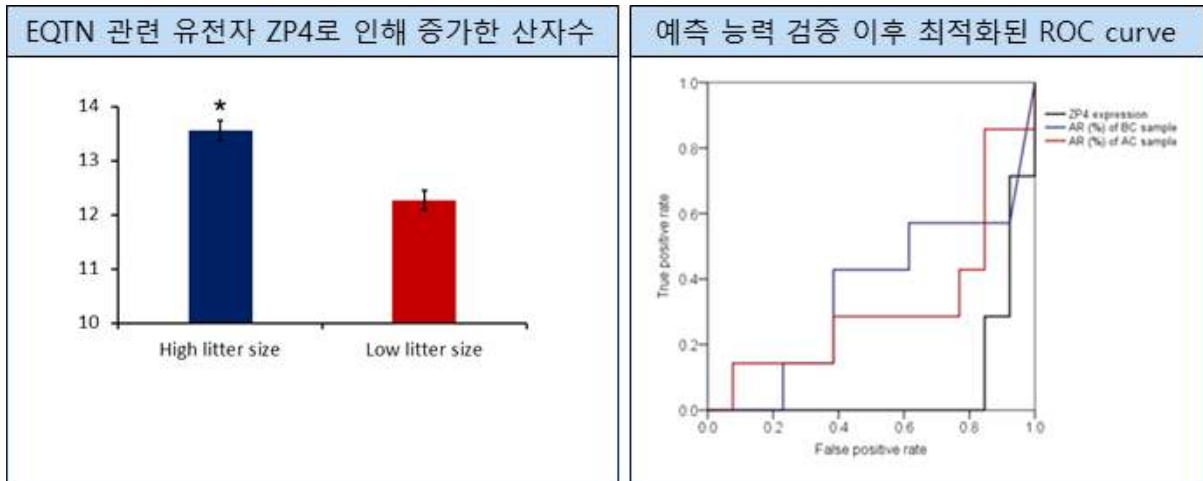
Gene Ontology database 에서 EQTN의 기능인 acrosomal vesicle exocytosis 와 fusion of sperm to egg plasma membrane involved in single fertilization에 해당하는 유전자들을 Protein-protein interaction을 이용하여 생식기능에 관련된 기능 파악

### ② 관련 유전자의 산자수 예측 능력 검증

Acrosomal vesicle exocytosis 관련 유전자 5개(ZP4, RIMS1, RAB3A, UNC13B, SYT6)와 fusion of sperm to egg plasma membrane involved in single fertilization 관련 유전자 6개(IZUMO1, SPACA3, CD9, LYZL6, SPATA46, IZUMO1R) 및 두 기능 모두에 포함되는 EQTN을 고-저 산자수 대표샘플을 이용한 RT-qPCR을 통해 유전자의 차등발현 검증. Acrosomal vesicle exocytosis이 연관되어 있으므로, 수정능획득 유도 후에 유전자 발현양상 분석



③ Equatorin 관련 유전자의 산자수 예측 능력 검증



해당 샘플군에서는 ZP4의 발현 외에도 정자의 침체반응(Acrosomal vesicle exocytosis) 관련 지표도 산자수 예측능력을 보여줌

7. 다중 마커 방법을 이용한 산자생산능력 진단 현장 적용을 위한 방법 개발

- 개발된 마커들의 다중 적용을 통해 더 높은 산자수 예측성과 산자수 향상을 시키는 방법의 개발. 산자수는 polygenic trait으로서 한 개의 유전자가 영향을 미치는 형질이 아닌 여러 종류의 유전자가 협동으로 이루어내는 결과로서 이러한 접근을 통해 더 나은 마커는 물론 마커간의 상관성, 유전자의 signaling을 연구 가능함

**다중 Peroxiredoxin 마커를 이용한 산자수 예측 모델**

Models	Markers	UMA		Models	Markers	UMA	
		Standardized $\beta$ Value	P value			Standardized $\beta$ Value	P value
Y1	HYP	0.173	0.011	Y3	PRDX 1	0.342	0.005
	PRDX 1	0.426			PRDX 3	-0.599	
	PRDX 2	-0.162			PRDX 4	0.822	
	PRDX 3	-0.487			PRDX 5	-0.559	
	PRDX 4	0.698			PRDX 6	-0.226	
	PRDX 5	-0.547					
Y2	HYP	0.157	0.005	Y4	PRDX 1	0.267	0.001
	PRDX 1	0.360			PRDX 3	-0.646	
	PRDX 3	-0.567			PRDX 5	-0.621	
	PRDX 4	0.727		Y5	PRDX 3	-0.462	0.001
	PRDX 5	-0.557			PRDX 4	0.814	
	PRDX 6	-0.198			PRDX 5	-0.537	

PRDX1-6 모두 발현량을 산자수와 비교하였을 때 PRDX4만 산자수 예측능력을 보였으며, 다른 종류의 PRDX와 다중마커방법을 이용하여 산자수를 예측하여본 결과 큰 성과를 얻지는 못함

2-2. 연구개발 성과

1. 기술실시

가. "티로신 인산화 측정을 통한 정액의 수정능 획득도 측정법" 노하우(know-how) 이전 계약

- (1) 농장에서의 희석 정액 생산 시 정액의 질을 평가하여 우수한 정액을 인공수정에 이용
- (2) 티로신 인산화 측정을 통한 정자의 수정능 획득 정도 측정
- (3) 확보된 정자의 수정능 획득 및 침체반응 비율 자료를 근거로 정액의 질을 평가

(4) 불량개체 선발 및 양질의 정액을 선발

2. 특허 등록

가. 수태능력 예측을 위한 전사체 바이오 마커 (등록번호 10-1974264)

나. 수태능력 예측을 위한 전사체 바이오 마커 (등록번호 10-1978612 분할)

(1) 특허 청구범위

- ① 수정능력 획득 후 고수태성 정자와 저수태성 정자에서 차등 발현하는 유전자의 발현을 확인할 수 있는 체제를 포함하는 것을 특징으로 하는, 동물의 수태능력 예측을 위한 전사체 바이오 마커 조성물
- ② 상기 동물은 돼지인 것을 특징으로 하는, 동물의 수태능력 예측을 위한 전사체 바이오 마커 조성물
- ③ 상기 조성물은 PLEK(pleckstrin), CD53(CD53 molecule), ABCC1(ATP Binding Cassette Subfamily C Member 1), RAB7L1(RAB7, member RAS oncogene family-like 1), MCMBP(minichromosome maintenance complex binding protein), CRIM1(cysteine rich transmembrane BMP regulator 1), TAF12(TATA-box binding protein associated factor 12), PTPRC(protein tyrosine phosphatase, receptor type C), STRIP2(striatin interacting protein 2), DGCR8(microprocessor complex subunit DGCR8), ASXL2(additional sex combs like 2), RAB11FIP2(RAB11 family interacting protein 2), JARID2(jumonji and AT-rich interaction domain containing 2), CXCR4(C-X-C motif chemokine receptor 4), DUSP2(dual specificity phosphatase 2), RAB11B(Ras-related protein Rab-11B), LCP1(lymphocyte cytosolic protein 1), SLA-DQA1(MHC class II, DQ alpha 1), HOMER2(homer scaffolding protein 2), ANO6(anoctamin 6), EPHB2(EPH receptor B2), CELF6(CUGBP, Elav-like family member 6), EGR2(early growth response 2), CNPY1(canopy FGF signaling regulator 1), MYL6(myosin light chain 6), GANAB(glucosidase II alpha subunit), RMDN1(regulator of microtubule dynamics 1), GIPC2(GIPC PDZ domain containing family member 2), MS4A2(membrane spanning 4-domains A2), BUB3(mitotic checkpoint protein BUB3), ITGA6(integrin subunit alpha 6), FMR1(fragile X mental retardation 1), GXYLT2(glucoside xylosyltransferase 2), PFDN6(prefoldin subunit 6), RPS28(ribosomal protein S28), RPS20(ribosomal protein S20), SSR4(signal sequence receptor subunit 4), SGK1(serum/glucocorticoid regulated kinase 1), SORD(sorbitol dehydrogenase), ZDHHC2(zinc finger DHHC-type containing 2), MDK(midkine), NFKBIA(NF- $\kappa$ B inhibitor alpha), TMEM170B(transmembrane protein 170B), KLF6(kruppel like factor 6), TRIM59(tripartite Motif Containing 59), CYFIP2(cytoplasmic FMR1 interacting protein 2), UTP15(U3 small nucleolar RNA-associated protein 15), ST13(suppression of tumorigenicity 13), 및 ARPC4(actin related protein 2/3 complex subunit 4)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 발현을 확인할 수 있는 체제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 동물의 수태능력 예측을 위한 전사체 바이오 마커 조성물
- ④ 수정능력 획득 후 고수태성 정자와 저수태성 정자에서 차등 발현하는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 프라이머와 안티센스 프라이머를 포함하는 프라이머 세트, 또는 프로브를 포함하는, 동물의 수태능력 예측용 키트

3. 논문

가. Elevated aminopeptidase N affects sperm motility and early embryo development (PLoS One, 2017)

나. Comprehensive analysis on the homology, interaction, and miRNA regulators of human



deleted in azoospermia proteins: updated evolutionary relationships with primates (Genes & Genomics, 2017)

- 다. Peroxiredoxin activity is a major landmark of male fertility (Scientific Reports, 2017)
- 라. Determination of Highly Sensitive Biological Cell Model Systems to Screen BPA-Related Health Hazards Using Pathway Studio (International Journal of Molecular Sciences, 2017)
- 마. Clinical assessment of the male fertility (Obstetrics Gynecology Science, 2018)
- 바. Effect of Aminopeptidase N on functions and fertility of mouse spermatozoa in vitro (Theriogenology, 2018) \*JCR 상위 10%
- 사. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin can alter the sex ratio of embryos with decreased viability of Y spermatozoa in mice (Reproductive Toxicology, 2018)
- 아. Applications of capacitation status for litter size enhancement in various pig breeds (Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2018)
- 자. Effect of endocrine disruptors on the ratio of X and Y chromosome-bearing live spermatozoa (Reproductive Toxicology, 2018)
- 차. Fms-like tyrosine kinase 3 is a key factor of male fertility (Theriogenology, 2019) \*JCR 상위 10%
- 카. Sperm solute carrier family 9 regulator 1 is correlated with boar fertility (Theriogenology, 2019) \*JCR 상위 10%
- 파. Porcine seminal protein-I and II mRNA expression in boar spermatozoa is significantly correlated with fertility (Theriogenology, 2019) \*JCR 상위 10%

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 3-1. 목표

구분	내용
최종목표	중돈 정자에서 우수 및 불량 산자생산능력 관련 전사체 마커 개발 및 이를 이용한 농가 수준에서의 산자수 향상
세부목표	산자수 1두 이상 향상, 관련마커 4종 이상 개발

#### 3-2. 목표 달성여부

1. 정량적 성과																			
(단위 : 백만원, 건수)																			
성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과		교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (수상 실적)	
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문				학술 발표	정책 활용		홍보 전시
												SCI	비SCI						
최종목표	2	1		1	5							5		6	4		3		
달성도	5	3		1	5							10	1	13	4		22	4	

기존 과제 시작시 제시하였던 모든 정량적 성과 목표대비 100% 이상 목표를 달성함. 특히, 연구기반 지표에서 뛰어난 연구성과로 SCI 논문은 200%, 학술발표 216%, 홍보전시 733%를 달성하였음. 또한, 수상 실적으로 '현장중심 우수 연구개발 기술 10선'에 선정되어 농림축산식품부장관 표창을 수여받음

2. 연구개발의 최종목표 달성도  
 연구개발의 계획 최종목표: 산자수 1두 이상 향상, 관련마커 4종 이상 개발  
 - 본 연구를 통해 관련 마커 6종을 개발함

유전자명	약자	단일 마커 사용시 산자수 증가량 두수 (정확도%)
Equatorin	EQTN	1.01 (60%)
Peroxiredoxin-4	PRDX4	1.55 (95%)
Porcine seminal protein I	PSP-I	1.08 (90.5%)
Porcine seminal protein 2	PSP-II	1.61 (88.2%)
Solute carrier family 9 regulator 1	SLC9A3R1	1.5 (90%)
Zona pellucida binding proetin 4	ZP4	1.3 (85%)

RNA-seq을 통해 발견한 마커 PSP-I, II, SLC9A3R1 3종, 기존 프로테옴 마커중 전사체도 산자수에 영향을 주는 마커 EQTN, PRDX4 2종, 발견한 마커와의 연관성으로 개발한 마커 ZP4 1종, 총 6종의 산자수 1두이상 향상 마커를 개발하였으며, 농가에 적용 검증까지 완료됨

## 4. 연구결과의 활용 계획 등

<활용방안>

1. GGP 및 개인 농장수준의 현장적용
2. 신산업 창출: 수태성관련 물질, 진단도구 및 피임후보물질 개발이라는 거대산업을 돌출하여 동물 및 인간을 위한 블루오션을 제시. 또한 이와 관련된 분석서비스 산업 창출
3. 환경분야: 생산성 향상으로 종돈 및 모돈 수 감소로 인한 축산분뇨 감소 가능
4. 기술이전 및 후속연구방안: 기 개발된 마커의 국제특허 및 다국적 기업에 기술이전, 기 개발된 마커를 이용한 kit 및 진단 tool 개발로 후속연구 및 산업화