

발간등록번호

11-15430000-001252-01

**말의 microRNA 지도 제작 및  
주요 질병 진단을 위한 활용법 개발**

Establishment of equine microRNA atlas and its  
application for diagnosis of major diseases.

서울대학교

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “말의 microRNA 지도 제작 및 주요 질병 진단을 위한 활용법 개발” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2016. 03. 25

주관연구기관명 : 서울대학교

주관연구책임자 : 김 용 백

1세부/협동연구기관명: 서울대학교

1세부/협동연구책임자: 김 용 백

참 여 연 구 원: 김 명 철, 최 봉 회, 권 미 영, 김 항 아, 김 나 연, 서 유 리

2세부/협동연구기관명: 서울대학교

2세부/협동연구책임자: 류 덕 영

참 여 연 구 원: 이 승 우, 이 승 현, 유 희 정, 오 다 영, 최 유 정

협동연구기관명 : 테 라 젠

협동연구책임자 : 김 태 형

참 여 연 구 원 : 박 종 화

협동연구기관명 : 프 로 첼 코 리 아

협동연구책임자 : 조 동 진

주관연구책임자: 김 용 백

주관연구기관장: 서울대학교 산학협력단장



# 요 약 문

## I. 제목

말의 microRNA 지도 제작 및 주요 질병 진단을 위한 활용법 개발

## II. 연구개발의 목적

본 연구는 말에서 발현되는 microRNA의 전체 지도를 작성하고 각종 장기에 특이적으로 존재하는 microRNA를 규명한다. 이를 바탕으로 말의 각종 생리적 및 병리적 상태를 진단하는 획기적인 방법을 개발한다. 개발된 microRNA 전체 지도를 기반으로 말의 제엽염과 운동 스트레스를 평가할 수 있는 획기적인 진단 기법에 대한 가능성을 타진한다.

## III. 연구 개발의 내용 및 범위

본 연구과제의 연구 내용은 크게 (1) 정상 말의 전체 microRNA 동정과 지도 제작 및 정량적 RT-PCR법 확립 (2) 대표적인 말 질병인 제엽염에 걸린 말의 제엽 조직 및 혈액 유래 microRNA 동정 및 지도 제작 (3) 정상 말의 혈장 및 각종 장기 내 piRNA 동정과 제엽염 진단을 위한 생체지표 piRNA 발굴 (4) 운동에 따른 혈액 내 백혈구 특이적인 microRNA 전체 지도 제작 (5) 말의 microRNA microarray 제작 및 검정과 선별 microRNA의 유용성 재확보 및 검증이라는 총 다섯 부분의 개발 연구로 구성 된다. microRNA의 발현 양상 분석을 위하여 전체 RNA에 대한 차세대 염기 서열 분석과 microarray 기법이 이용되었다.

## IV. 연구 개발의 결과

- (1) 정상 말의 근육, 간장, 그리고 결장에서 공통적으로 발현되는 292 종류의 microRNAs, 장기 특이적인 166 종류의 microRNAs, 기존에 보고되어 있지 않은 329 종류의 새로운 microRNAs 발굴, 정상 말의 혈장에서 공통적으로 발현되는 305 종류의 microRNAs 및 혈장 특이적인 6 종류의 microRNAs 발굴
- (2) microRNA의 정량적 RT-PCR 기법 확립
- (3) 제엽염 특이적인 혈장 및 제엽 유래 4 종류의 microRNAs 발굴
- (4) 정상 말의 혈장 및 각종 장기 및 제엽염이 걸린 말의 혈장 특이적인 piRNAs 발굴
- (5) 정상 말의 운동 전과 후에서 차별적인 발현을 보이는 229 종류의 microRNAs, 기존에 보고되어 있지 않은 326 종류의 새로운 microRNAs 및 운동 스트레스 특이적인 혈장 백혈구 유래의 114 종류의 mRNAs 발굴
- (6) 말의 microRNA microarray 제작 및 선별된 microRNA의 유용성 재확보 및 검증

## V. 연구 개발의 결과의 활용 계획

본 연구팀의 연구 과제는 말 질병에 대한 조기적이며 비침습적인 진단방법을 확보하고 전통적인 혈액 화학적 검사 방법의 대체할 수 있는 적용 타당성을 제시한다. 확보된 연구 결과는 기타 질병에 대한 진단법 개발에 토대가 되는 방법론과 기초자료들을 제공하며, 말의 생리 상태에 대한 혁신적인 판정법을 제시한다.

# SUMMARY

## I. Title

Establishment of equine microRNA atlas and its application for diagnosis of major diseases.

## II. Purpose

The present study was performed to identify the expression profiles of equine microRNAs in the major organs and establish the equine microRNA atlas. This study was carried out to examine the diagnostic potential to evaluate physiologic status, including exercise-induced stress, and pathologic conditions, including laminitis, in horse.

## III. Contents in the research & development process

The present study is categorized into 5 different goals, which consists of (1) identification and characterization of equine microRNAs in plasma/major organs in normal horses and establishment of quantitative RT-PCR technique for the microRNA expression, (2) identification of equine microRNAs that are differentially expressed in the plasma and laminae tissues of the laminitis-induced horse, (3) identification and characterization of equine microRNAs in plasma/major organs in normal and laminitis-induced horses, (4) identification of microRNAs induced by exercise in horse leukocytes, and (5) microarray production of equine microRNAs and its usability test for the specific microRNAs in laminitis-induced horse. Two methodologies, including Next generation sequencing and microarray, were mainly used for the analysis of microRNA expression.

## IV. Results

- (1) Identification of a total of a total of 292 known and 329 novel miRNAs in normal horse tissues including skeletal muscle, colon and liver, a total of 166 organ-specific microRNAs, a total of 305 microRNAs, including 6 plasma specific microRNAs, in normal horse blood.
- (2) Establishment of quantitative RT-PCR technique for the measurement of microRNA expression
- (3) Identification of a total of 4 microRNAs expressed in the laminae and plasma of the laminitis-induced horse.
- (4) Identification of piRNAs in major organs and plasma in the normal and laminitis-induced horse.

- (5) Identification of a total of a total of 229 known, 326 novel microRNAs, and 114 mRNAs in equine leukocytes induced by exercise.
- (6) Microarray production for the equine microRNAs and test for the usability of the selected microRNAs in laminitis-induced horse.

## **V. Research & developments output and application plan**

The present study provides innovative and non-invasive diagnostic tool to early examine the major equine diseases. The present study enriches the horse microRNA database and provides useful information for preliminary methodology and basic data for further research dissecting biological functions of microRNAs in horse with various physiologic and pathologic conditions.

## CONTENTS

- Chapter 1. Outline and performance goal of the research & development Task
- Chapter 2. The current trend of technical development in domestic and foreign studies
- Chapter 3. Contents and results of the research & development process
- Chapter 4. The goal achievement and its contribution to the development of related field industry
- Chapter 5. Research & developments output and its application plan
- Chapter 6. Scientific and technical information collected in the research & development process
- Chapter 7. The present condition of the research facilities and equipments
- Chapter 8. The performance of safety supervision in the laboratory
- Chapter 9. References

## 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표 .....	8
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	12
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	16
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	36
제 5 장 연구개발 성과 및 성과 활용계획 .....	44
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	45
제 7 장 연구 시설·장비 현황 .....	48
제 8 장 연구실 안전관리 이행실적.....	49
제 9 장 참고문헌 .....	51



# 제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

## 1절. 말의 제엽염

### 1. 운동기계 대표질병인 발굽 질환인 제엽염

말 발굽 속의 제엽은 발굽 외측의 각질부와 발굽 내부를 연결하는 조직으로서, 제엽으로의 혈액 순환이 일시적 혹은 지속적으로 저해될 때 제엽염이 발생한다. 염증이 발생하면 치밀하게 연결 되었던 조직이 괴사되면서 발굽뼈가 분리되며 아주 심한 경우에는 발굽 속에서 뼈가 선회하는 양상으로 나타난다.

### 2. 불명확한 기전과 낮은 치료 효과

제엽염이 발생하는 원인과 기전은 아직 정확하게 밝혀지지 않았지만, 탄수화물의 과다 급식, 세균 감염, 발굽의 과도한 충격, 발정과 관련된 호르몬 변화가 있거나 스테로이드를 과량 투여 했을 때 발생한다는 보고가 있다. 이 중 유력한 것이 탄수화물의 과량 섭취인데, 체내가 산성화되면서 세균 번식이 증가되어 독혈증이 뒤따르고 이로 인해 제엽에 혈액공급이 원활하게 이루어지지 않아 조직 괴사가 일어난다고 믿어진다. **일단 발병하면 치유하기 힘든 질병이다.** 제엽염에 걸렸던 말은 재발 가능성이 매우 높으며, 많은 경우 만성 제엽염으로 진행되는데 제 3지골이 변위되어 제엽이 원래의 상태로 돌아오지 않는다. **제엽염에 걸린 말은 심한 통증을 호소하며 치료는 신속히 시작 할 수록 예후가 좋다.**

### 3. 높은 제엽염 발생에 따른 경제적 손실

전국적으로 매일 많은 말들이 제엽염으로 고통 받고 있지만, 국내 발생에 대한 정확한 통계 자료는 없다. 미국의 28개 주를 대상으로 실시한 1998년도의 조사 자료에 따르면 **약 13%의 말 사육 농가에 제엽염을 가진 말이 있었다.** 조사 대상 **전체 말의 약 4%의 말이 보행 이상을 보였으며, 보행 이상 말의 7.5-15.7%가 제엽염을 가진 것으로** 확인되었다. 말의 제엽염의 진단, 치료 및 폐사에 따른 경제적 손실은 연간 1,300만불로 추정된다. 절반 정도의 제엽염 발생이 적절한 초지 및 사료 관리로 예방 할 수 있음이 알려져 있다. 하지만 일단 발생하면 임상적으로 제엽염은 응급 사태이며 때로는 **안락사**를 시켜야 할 상황이 발생하기도 하며, **보행 이상에 따른 건강관리 비용** 등 심각한 경제적 손실을 유발한다.

### 4. 임상 증상 및 혈액학적 소견에 의존한 비특이적 진단법

정확한 진단이 치료 가능성 및 예후를 판정하는데 필수적이지만, 말의 제엽염을 임상적으로 정확하게 조기 진단해내는 것은 매우 어려운 일이다. 현재까지는 임상 증상과 더불어 심박동수, Packed cell volume, 점막의 창백도, 혈량, 산염기 평형 정도, 혈장 염증지표 등의 지표를 진단과 예후 판정에 활용하여 왔다. 하지만 위에 열거한 이들 지표는 제엽염이외의 많은 질병 상태에서도 심하게 변화되는 지표이기 때문에, 말의 제엽염을 특이적으로 진단하거나 치료에 대한 예후를 판정하는데 이용하는 것은 한계가 있다.

## 2절. 운동 스트레스

### 1. 연구 배경

말은 고부가 가치 창출에 있어 중요한 동물이다. 국내 농, 어촌의 새로운 소득원으로 육성하기 위한 정부 차원의 지원 법안 (말 산업 육성법, 법률 제10451호, 2011. 3. 9. 공포, 9. 10. 시행)과 대책이 수립되어 세부 계획들이 시행되고 있으며, 성장 잠재력과 부가 가치가 높은 복합 산업으로서의 가능성 때문에 크게 주목 받고 있다. 2011년 기준, 약 3조 3,478억원의 총 산출규모를 가지고 있는 것으로 확인되며, 말 산업 육성법의 제정 이후 말 산업은 지속적인 성장을 할 것으로 예상 및 전망 되고 있다. 승마 및 경주마들의 건강은 마사회의 말 보건원 등과 같이 전문적인 시설이나 개개 수의사에 의하여 관리되고 있다. 환경적 요인이나 운동에 의하여 유발되는 심한 체력 손실에 노출된 말의 피로회복, 체력 관리, 질병에 걸린 말의 치료 및 회복 처치 등이 주요한 관리 분야이다.

말의 가치는 경주 또는 운동 등의 스포츠 능력에 따라 달라진다. 운동으로 인해 말에서 발생하는 스트레스는 말의 면역력을 저하시켜 다양한 병리학적 상태를 유발할 수 있으며, 운동에 따라 말이 받는 스트레스의 측정은 말의 가치 평가에 매우 중요할 것으로 보고 있다. 최근, 말의 운동에 따라 혈액 내 존재하는 유전자와 단백질 등 생체 지표들의 변화가 확인되었다. 하지만, 현재 경마나 승마 등에 있어 사용되는 말에서 운동에 따른 스트레스 수준과 회복 능력 측정과 관련된 민감도 및 특이도가 높은 스트레스 관련 생물지표는 없는 것으로 보고 있다.

그러므로 말의 병태생리학적 질병 이외 운동 전과 후의 스트레스를 대표하며 진단할 수 있는 고민감도 생물지표 개발의 중요성은 높을 것으로 판단한다.

### 2. 운동에 의한 스트레스 진단 및 생체지표 발굴의 필요성

경기력 향상을 위해 말의 건강 및 관리와 관련된 다양한 연구가 이루어지고 있으며 그에 따라 관리시스템도 발전하였다. 기온, 먹이, 청결상태 등 다양한 환경적 요인과 스트레스는 말의 건강과 관리에 직, 간접적으로 영향을 미친다. 그 중 스트레스 (Stress)는 생리학 또는 행동학적 측면에서 적응하기 어려운 환경에 처하였을 때 대처하기 위해 비정상적이거나 극단적인 조절이 필요한 상태를 말하며 말의 삶에 있어서 일상적인 요인이지만, 심한 경우 세균 감염을 일으켜서 대장염 (Colitis X) 등과 같은 질병 유발의 민감성을 증가시키고, 개체의 생명에 위협을 줄 수 있다.

말에 스트레스를 유발시키는 가장 큰 요인 중 하나인 운동에 대한 반응으로 발생하는 표현형, 생화학적 변화 등에 대한 연구가 광범위하게 이루지고 있다. 지속된 운동으로 인한 스트레스는 다양한 측면에서 면역기능을 일시적으로 떨어뜨릴 수 있으며, 이는 운동 시간과 강도를 반영한다. 그리고 운동에 의해 유발된 스트레스에 대한 반응은 유전자 발현 (Gene Expression), 대사 (Metabolism), 세포주기 진행 (Cell Cycle Progression)과 단백질 항상성 (Protein Homeostasis) 등의 변화를 가져오며, 스트레스 회복과 장기 적응을 위해 필수적이다. 그러므로 경마나 승마에 사용되는 말에 있어 이와 같은 운동에 의한 스트레스 정도를 평가하는 것은 경기력과 질병예방 등에 있어서 중요하다.

현재 말의 운동에 의한 스트레스 정도를 측정하기 위해서 심박수, 체중, 체온, 혈중 젖산 (Lactate), 카테콜아민 (Catecholamine), 베타엔도르핀 (Beta-endorphin)의 혈장 내 농도 등 다양한 생리학적 변수들을 사용되고 있으나, 그 민감도 및 특이도는 매우 낮은 편이며, 이는 보다 새로운 생체 지표의 발굴을 요한다.

### 3절. 질병 진단지표로서 microRNA의 활용 가능성

#### 1. MicroRNA

MicroRNAs는 19 ~ 25개의 염기 길이의 단백질을 전사하고 있지 않은 RNA로서, 전사 RNA에 결합하여 유전자 발현을 직접 조절하는 역할을 담당하고 있다. 영장류, 설치류, 어류 등의 척추동물 뿐 만 아니라 곤충 등의 무척추 동물 및 바이러스에서도 존재하며 진화론적으로 매우 잘 보존되어 있다. 최근의 연구에 따르면 microRNA는 발생 과정에서 매우 중요한 역할을 담당하며, 발현 양상이 조직 특이적인 것으로 알려져 있다. 사람의 경우 소장과 대장 유래 장 상피세포가 각각 독특한 microRNA 발현 양상을 보이며, 분화 정도에 따른 차이 또한 관찰되었다. 또 다른 연구는 쥐의 공장을 대상으로 장 점막에서 발현되는 microRNA 종류 및 양상을 보고 하였고, 형질전환 마우스를 이용하여 microRNAs가 상피세포의 분화, 조직화, 이동 및 보호 장벽 기능 부여 등 다양한 위장관계 생리학적 기능에 중요한 역할을 담당하고 있음을 증명하였다. 간, 공장, 췌장 등 내배엽 유래 장기의 microRNA 발현 양상을 분석한 보고에 따르면, 많은 수의 microRNA가 조직 특이성을 보이며, 또한 조직 특이적인 단백질 발현 양상과도 강한 상관관계가 있음이 제시되었다.

현재까지 질병 발생과 관련된 microRNA 연구는 주로 암을 대상으로 수행되어 왔다. 다양한 microRNA가 각종 암에서 특이적으로 발현되고 있으며 발암기전에 큰 역할을 담당하고 있음에 착안하여 암의 조기 진단 및 세분화에 활용하고자 하는 노력이 계속되고 있다. 위장관계 질병 중 염증성 및 자가 면역성 질병으로 알려진 궤양성 대장염 및 과 Chron's disease 환자의 혈액내 microRNA의 발현 양상이 서로 다름이 확인 되었으며, 말초 혈액 내에 발현 되고 있는 microRNA 유형을 이용한 장관 계 질병의 감별 진단에 대한 효용성과 가능성을 입증한 바 있다.

#### 2. 기존 검사법과 비교한 microRNA 검사법의 장점

microRNA는 정상 말의 혈장에서 매우 낮은 농도로 존재한다. 혈청 microRNA는 전사 RNA (mRNA)와는 달리 RNase A 등의 핵산 분해 효소, 동결과 해동의 반복, pH 변화 등의 외부 조건에 따라 분해되지 않고 안정적이며, microRNA의 시료 처리와 저장 과정에 있어 외부적 요인에 의하여 변질되지 않고 발현량이 반복적이고 일관되게 측정되는 것으로 알려져 있다. 이러한 microRNA는 실험실내에서 증폭을 통한 정량이 가능하므로 검체내에 미량이 존재해도 이를 검출할 수 있고, 또한 정상 및 병태생리학적 상황에 따라 미세한 변화 정도까지 감지할 수 있으므로 제염염의 조기 진단과 운동 스트레스의 측정이 가능한 생체 지표로 볼 수 있다.

#### 1장 4절. 연구 제안

본 연구는 말에서 발현되는 microRNA 전체 지도를 작성하고 각종 장기에 특이적으로 존재하는 microRNA를 규명하여, 이를 이용하여 각종 생리적 및 병리적 상태를 진단하는 획기적인 방법을 개발하고자 한다. 특히 국소 장기의 질병이며 경제적으로 매우 중요한

질병인 제엽염과 말의 운동 스트레스를 혈청 내에 존재하는 microRNA 발현 양상을 이용하여 측정 할 수 있는 특이적인 방법을 개발하고자 한다.

본 연구팀의 과제는 주요 말 질병에 대한 비침습적 진단방법 확보하고 전통적인 혈액 화학적 검사 방법의 대체하여 말 질병을 조기 진단하여 적절한 치료를 가능케 할 것으로 예상된다. 또한, 기타 질병에 대한 진단법을 개발할 수 있는 토대가 될 방법론과 기초자료들을 제공할 것이며, 말의 생리 상태에 대한 혁신적인 판정법 확보 (대표적으로 운동 스트레스에 대한 생체 지표)할 수 있을 것으로 보인다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1절. 국내 연구 현황

국내 말 산업이 점진적으로 발전되고 있는 가운데, 말의 병리학적, 생리학적 연구 등이 다수 이루어지고 있는 실정이다.

#### 1. 병리학적 연구

말의 병리학적 연구의 경우 **질병에 대한 진단 및 예측, 그리고 새로운 치료 물질 및 방법 등에 대한 연구는 다소 미흡한 실정이다.** 그 예로 글루코코르티코이드에 의해 유발된 제염염을 가진 말과 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD)을 가진 말 등을 임상적으로 단순히 치료한 사례에 대해서만 보고되었다 (Ryu et al., 2004; Jeong et al., 2010).

#### 2. 생리학적 연구

말의 생리학적 연구의 경우 대부분 경주마의 **운동에 의한 유전체 및 전사체 변화에 대한 연구에 집중되어 있으며, 최근 3~4년간 활발하게 이루어졌다.** 특히, 최신 NGS 기술을 적용한 유전체, 전사체, 그 외 메틸화 등에 대한 연구가 중점적으로 이루어지고 있으나, **miRNA, piRNA 등과 같은 small RNA 에 대한 연구는 미미한 실정이다.** 그에 대한 대표적 연구 사례는 다음과 같다.

	연구 내용
사례 1	NGS 기술을 적용한 RNA 시퀀싱 분석을 통해 운동 전/후 경주마의 전사체를 분석함. 말의 운동과 관련된 전사체에 대한 정보를 확보함 (Park et al., 2012).
사례 2	관절 질환과 연관된 ADAMTS4 유전자의 발현을 연골 및 타 장기에서 분석하였으며, 더불어 운동 전/후 근육 내 발현을 분석함. 경마와 관절 질환에 대한 유용한 자료를 제공함 (Moon et al., 2012).
사례 3	경주마에 대한 Genome 시퀀싱, RNA 시퀀싱, SNP칩 데이터를 종합 및 분석하여 발현 및 기타 정보를 포함하는 말의 유전체 변이에 대한 데이터베이스를 구축함. 말의 유전적 개선과 번식 전략에 기인함 (Lee et al., 2014).
사례 4	De novo-based analysis (DBA)를 통해 경주마의 운동에 의해 발현이 변화된 유전자를 식별함. 말의 운동 능력 발전과의 관련성을 규명함 (Park et al., 2014).
사례 5	MeDIP 시퀀싱을 통해 경주마의 운동 전/후 DNA 메틸화를 분석함. 운동에 의한 후생 유전학적 변화와 성별에 따른 DNA 메틸화에 대한 정보를 확보함 (Gim et al., 2015).

#### 3. miRNA 및 다른 small RNA 관련 연구

말과 관련된 miRNA 및 다른 small RNA에 대한 **국내 연구는 현재 전무할 실정이다.** 사

람에서 암, 심장질환, 간질환 등 병리학적 연구와 그 외 기초적인, 생리학적 연구들이 miRNA 및 다른 small RNA와 연관하여 활발히 이루어지고 있으나, 말을 포함한 가축에 대한 기초적, 병리학적, 생리학적 연구는 미미하며, 특히 말에 대한 연구는 현재까지 이루어지지 않았다.

## 2절. 국외 연구 현황

국외 말 관련 연구는 매우 활발하게 진행되고 있으며, 기초 연구와 더불어 병리학적, 생리학적 등 여러 측면에서 다수 이루어지고 있는 실정이다.

### 1. 병리학적 연구

말의 병리학적 연구의 경우 새로운 질병의 보고와 더불어 여러 질병 (제염염, 근골격계 질병, 골연골증 등)에 대한 진단 및 예측을 위한 새로운 생체지표의 발굴, 그리고 새로운 치료 물질 개발과 방법 등에 대한 연구가 매우 활발하게 이루어지고 있는 실정이다. 특히, 단백질, 유전체 및 전사체, 그리고 Small RNA 등을 이용한 질병에 대한 생체 지표 개발 사례가 다수 보고 되었다. 그에 대한 사례는 다음과 같다.

	연구 내용
사례 1	혈청 내 단백질 발현 분석을 통해 경주마의 근골격계 질병에 대한 생체지표를 발굴. 근골격 손상과 관련된 질병 유무를 사전 진단 가능함 (Frisbie et al., 2010).
사례 2	급성 복부 질병에 걸린 말에서 염증 반응을 모니터링하기 위한 새로운 생체지표로 혈청 내 Activin-A 단백질을 제시함. 말 산통과 내독소혈증 등에 활용 가능성을 제시함 (Forbes et al., 2011).
사례 3	프로테오믹스 기술을 이용하여 제염염에 걸린 말의 혈장 내 단백질을 비교 분석함. APOA-IV 단백질을 제염염 진단을 위한 생체지표로 제시함 (Steelman et al., 2012).
사례 4	NGS 기술을 적용한 small RNA 시퀀싱 분석을 통해 말의 골연골증 내 miRNA 발현를 분석함. 골연골증 병변에 대한 miRNA의 잠재적 역할과 생체지표 miRNA를 제시함 (Desjardin et al., 2014).
사례 5	NGS 기술을 적용한 RNA 시퀀싱 분석을 통해 제염염에 걸린 말의 제염 조직 내 전사체 발현을 분석함. 제염염 유발 기작에 대한 정보와 제염염에 진단을 위한 생체지표로서의 가능성을 제시함 (Holl et al., 2015).

### 2. 생리학적 연구

말의 생리학적 연구의 경우 경주마의 운동, 임신, 노화 등 다양한 생리학적 연구를 수행하고 있으며, 단백질체, 대사체 등을 중점적으로 연구가 이루어지고 있다. 그 예로 프로테오믹

스를 사용하여 경주마의 운동 전/후 혈장 단백질 발현을 비교분석하여 운동 강도와 양을 모니터링 할 수 있는 생체지표로서의 가능성을 제시한 사례가 보고되었다 (Scoppetta et al., 2012). 그러나 최신 NGS 기술을 적용한 유전체, 전사체, small RNA 등의 연구는 생리학적 연구에서 미미한 실정이다.

### 3. miRNA 및 다른 small RNA 관련 연구

말과 관련된 miRNA 및 다른 small RNA에 대한 국외 연구는 NGS와 생물정보학을 적용하여 기초적 연구부터 병리학적 연구까지 활발히 진행되고 있다. 그에 대한 사례는 다음과 같다.

	연구 내용
사례 1	In silico 분석을 통해 말의 miRNA 354개를 최초로 식별, 그 특징에 대해 서술함 (Zhou et al., 2009).
사례 2	근질환 (myopathic)을 가진 말과 정상 말의 근육에서 발현 차이를 보이는 miRNA를 선별함 (Barrey et al., 2010).
사례 3	말의 배란 및 무배란 모낭에서 발현 차이를 보이는 miRNA들을 선별함 (Donadeu and Schauer 2013).
사례 4	말 난소 난포액 내 cell-secreted vesicles은 miRNA를 포함하고 있으며, young mare과 old mare의 난포액에서 서로 다른 miRNA를 가지고 있다는 것을 확인 (Silveira et al., 2012)
사례 5	In vitro 상에서 연골원 분화 과정 동안 연골 특이적 miRNA의 발현 변화와 그 target 유전자 규명 (Buechli et al., 2013)

### 3절. 국내.외 기술개발현황에서 차지하는 본 연구의 위치

본 연구와 비교하였을 때 국내 연구는 주로 운동과 관련된 생리학적 연구가 다수를 차지하며, 병리학적 연구는 미미한 실정이다. 그리고 이에 대한 말의 miRNA 및 그 외 small RNA와 관련된 연구는 전무한 실정이다.

그리고 국외 연구는 주로 병리학적 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 생리학적 연구는 미미한 실정이다. 특히, 말의 miRNA 및 그 외 small RNA와 관련된 연구는 기초적인 연구를 제외하고는 병리학적, 생리학적 연구에서는 미미한 실정이다.

miRNA 및 그 외 small RNA에 대한 타 가축의 병리학적, 생리학적 연구가 거의 이루어지고 있지 않는 가운데, 본 연구는 최신 기술인 NGS를 적용하여 말의 miRNA 연구를 기초적인, 병리학적, 그리고 생리학적 측면에서 수행하였다.

기초적인 측면에서 본 연구는 최초로 말의 혈장, 간장, 근육, 결장, 제염 등에서 전체 miRNA의 존재를 실험적으로 규명하였으며, 각 조직 특이적인 miRNA를 확인 할 수 있었다. 그리고 miRNA 외의 다른 small RNA 중, piRNA를 각 조직에서 최초로 규명하였으며, 각

조직 특이적인 piRNA를 확인하였다. 그 외 기존에 알려지지 않은 새로운 miRNA를 발굴할 수 있었다. **병리학적 측면**에서는 제염염에 의한 miRNA 및 piRNA의 발현 변화를 최초로 규명하였으며, 더불어 제염염 진단을 위한 생체지표 miRNA와 piRNA를 제시하였다. 또한 전사체 및 단백질체 연구를 통해 상호보완적으로 사용가능한 생체지표 단백질을 발굴하였다. 그리고 **생리학적 측면**에서는 운동에 따른 생리학적 변화에 의한 miRNA의 발현 변화를 최초로 규명하였다. 더불어 운동에 의한 스트레스를 진단할 수 있는 새로운 생체지표 전사체를 발굴하였다.

이와 같이 본 연구는 다양한 측면에서 기존 연구들과 차별화되며, 말 관련 연구 분야 및 말 산업에 있어서 선구적 연구이고, 나아가 큰 이바지를 할 수 있을 것으로 기대된다.



## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 1절. 정상 말의 전체 및 장기 특이적 microRNA 동정과 발현 양상 조사 및 정량적 RT-PCR법 확립

#### 1. 말 각종 장기로부터 전체 miRNA 염기서열 분석

본 연구팀은 차세대 염기 서열 분석법을 이용하여 정상 말의 각종 장기 유래의 microRNAs의 리스트를 세계 최초로 확보하였음.

#### 가. 말의 각종 장기 적출 및 전체 RNA 및 Quality 분석

임상 검사 및 임상 병리학적 검사를 통하여 질병이 없는 건강한 말을 선정하여 신선한 조직 (결장, 간장, 근육)을 적출하였으며, 각각의 적출된 조직으로부터 순도 높은 total RNA를 분리함.

#### 나. Small RNA cDNA library 제작 및 NGS (Next Generation Sequencing)

Total RNA를 전기영동을 이용하여 특정 크기 (18-30 nucleotide size)를 추출 한 뒤, Illumina HiSeq 2000 machine을 이용하여 50 bp single-end로 읽어 차세대 염기 서열 분석법 (NGS; Next Generation Sequencing)을 수행함.

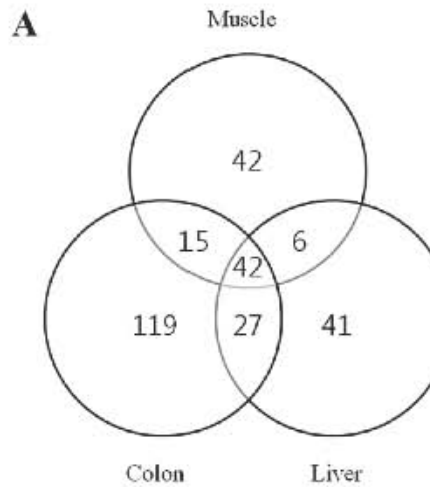
#### 다. Small RNA annotation

차세대 염기 서열 분석법을 이용하여 염기 서열이 결정된 small RNAs에 대한 정보를 기존에 알려져 있는 염기 서열 데이터 베이스 (Rfam/Genebank)에 일치시켜 microRNAs 서열을 확보하였으며, 이에 대한 데이터를 미국 NCBI SRA (Sequence Read Archive) database(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/>)에 등록 (Submission Number: SRA058805)을 함.

#### 라. Identification of microRNAs

본 연구팀은 차세대 염기 서열 분석법을 이용하여 정상 말의 근육, 간장, 그리고 결장에서 공통적으로 발현되는 292 종류의 microRNAs 리스트 (A) 를 확보하였으며, 기존 연구에 보고되어 있지 않은 329 종류의 새로운 microRNAs 리스트 (B) 를 발굴함.

- 또한, 본 연구팀은 정상 말의 근육, 간장, 그리고 결장에서 특이적인 발현을 보이는 166 종류의 microRNA의 리스트를 확보하였으며, 기존 연구에 보고되어 있지 않은 199 종류의 새로운 microRNAs 리스트를 발굴함.



doi: 10.1371/journal.pone.0098662.g002

**(1) 간장 특이적인 representative list of known and novel microRNAs**

Organ	known/novel	microRNA	Mature miRNA sequence
Liver	known	eca-mir-493b	UACAUGGUAGGCUUUCAUUCAUU
Liver	known	eca-mir-126	ACAUUAUUACUUUUGGUACGCGC
Liver	known	eca-mir-122	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGUGUC
Liver	known	eca-mir-532	CAUGCCUUGAGUGUAGGACCGUUGGC AU
Liver	known	eca-mir-374a	UUAUAAUACAACCUGAUAAGUGUU
Liver	known	eca-mir-19a	AAGAAGAAUGUAGUUGUGCAAU
Liver	known	eca-mir-424	CAGCAGCAAUUCAUGUUUUGAAG
Liver	known	eca-mir-148a	CACUCCGACUCUGAAUAUGAUGAAG
Liver	known	eca-mir-671	GCCUUGGAGGGCUGGAGGUGAUGG
Liver	known	eca-let-7g	GCUGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU
		.....	
Liver	novel	Novel_00540	GTCGTTCTCGCCGAGACTGAGGTC
Liver	novel	TG1204R4085-m0011_5p	TCTGGAGGACGTGGGGAGTAAGCT
Liver	novel	Novel_00594	AGCAGTAGGGGTAGATAGAGCTGT
Liver	novel	TG1204R4085-m0004_3p	CAGTGCAATGTTAAAAGGGCATT
Liver	novel	Novel_00070	ACTAGGACAAGGAAGCTGGCAGA
Liver	novel	Novel_00310	TAAGGGGGGGCAAGGGGCACGG
Liver	novel	Novel_00605	TACAGTACTGTGATAACTGAAGG
Liver	novel	Novel_00270	AAGGGGTGAGGAAGACATAGTGG
Liver	novel	Novel_00218	AGAGGTCTTCATGATGCATTTCG
Liver	novel	Novel_00246	AGCCTCAAGCAAGGGACTTTGA
		.....	

**(2) 근육 특이적인 representative list of known and novel microRNAs**

Organ	known/novel	microRNA	Mature miRNA sequence
Muscle	known	eca-mir-615	GGGGUCCCGGUGCUCGGAUCU
Muscle	known	eca-mir-1-2	AAGCUAUGGAAUGUAAAGAAGUAUG

			UAU
Muscle	known	eca-mir-489	GUGACAUCACAUAUACGGCGGCU
Muscle	known	eca-mir-29c-2	ACCGAUUUCUCCUGGUGUUCAGAGU
Muscle	known	eca-mir-190	UGAUAUGUUUGAUAUAUUAGGUUGU
Muscle	known	eca-mir-492-1	AGAACUCCAAGAUUGUUCUGCAGAU CGA
Muscle	known	eca-mir-133a-2	AAUGGAUUUGGUCCCCUUCAACCAGC UG
Muscle	known	eca-mir-652	ACAACCCUAGGAGAGGGUGCCAUUC
Muscle	known	eca-mir-208a	GAGCUUUUGGCCCGGUUAUACC
Muscle	known	eca-mir-188	CAUCCCUUGCAUGGUGGAGGGUGA
		.....	
Muscle	no vel	Novel_00640	GCCTTTTCCTCTCCAGTCTTGC
Muscle	no vel	Novel_00210	CTCTCCTGAGGTTCTGCTGACG
Muscle	no vel	Novel_00073	TGAGCACGCTGATGTCTGCTG
Muscle	no vel	Novel_00002	TGGGAGGTGGATGTTTACTT
Muscle	no vel	Novel_00462	AAGGATTGAGGGTGGCTAGGGTCT
Muscle	no vel	TG1204R4083-m0040_3p	TACGTAGATATATATGTATTTT
Muscle	no vel	Novel_00560	CGTGGTCGCTGTAGGGCACGTTT
Muscle	no vel	Novel_00278	TCCTCTTTCTTTGCTTCCTTCT
Muscle	no vel	TG1204R4090-m0006_3p	CCTGCAGATGACTGGACTCCAG
Muscle	no vel	TG1204R4083-m0018_3p	AATGATGGTAGAGAGTGTCT
		.....	

### (3) 결장 특이적인 representative list of known and novel microRNAs

Organ	known/novel	microRNA	Mature miRNA sequence
Colon	known	eca-mir-21	UCUCAUGGCAACAGCAGUCGAUGGGC U
Colon	known	eca-mir-155	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGUUUU U
Colon	known	eca-mir-150	CGGUCCUGGUACAGGCAUGGGGGGCA
Colon	known	eca-mir-106a	UCAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
Colon	known	eca-mir-124	UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCAA
Colon	known	eca-mir-500-2	UUAUCCUUGCUAACCUGGGUGAGAGUG C
Colon	known	eca-mir-539	AUCAUACAAGGACAAUUUCUUUUU
Colon	known	eca-mir-502	AAUCCUUGCUAUCUGGGUGCUAGUGC
Colon	known	eca-mir-501	CAUCCUUCGUCCUGGGUGAGAGUGC
Colon	known	eca-mir-500	UUAUCCUUGCUAACCUGGGUGAGAGUG UU
		.....	
Colon	no vel	Novel_00593	GGAGGACGGTGGCCAAGACAGCTT
Colon	no vel	Novel_00401	GGGCAGGATGAGAGGGCTGTCCCT
Colon	no vel	Novel_00168	TAGGAGTGGGAGAAGTACAGGGTG
Colon	no vel	Novel_00620	AAGTGTCTGGAGCCGTGTGTTGTA
Colon	no vel	Novel_00211	AGAGGTGGTAGTTCTGAGGATGGA
Colon	no vel	Novel_00410	CGGAACGTGAAGCTGGCGGCCTTG

Colon	novel	Novel_00279	AGGAGCAGCTGGGAGTGAGCAACT
Colon	novel	Novel_00148	TAGCACCATCTGAAATCGGTTATA
Colon	novel	Novel_00574	CCGAAGGGCTGGCAGGGATTGGGA
Colon	novel	Novel_00362	AAGGATCCTGGCTGCAGGTCACG
		.....	

## 2. microRNA의 정량적 RT-PCR법 확립

본 연구팀은 정상 말의 장기에서 유래한 microRNA의 발현량을 반복적이고 일관되게 측정할 수 있는 Stem-loop Real Time PCR 기법을 실험실 내에서 확립함.

### 가. Stem-loop Real Time PCR 방법용 microRNA 선정

NGS를 통한 선행 연구 결과를 바탕으로 말의 근육, 결장, 그리고 간장 조직에서 동시에 발현이 확인되며 그 발현 정도가 높은 microRNA인 miR-122 (Sequence: UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG) 를 검증 microRNA로 선별함.

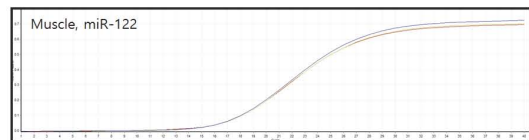
### 나. Stem-Loop RT-qPCR 을 이용한 microRNA 발현

miRNeasy Mini miRNA detection Kit 및 Applied system의 standard TaqMan PCR kit protocol를 이용하여 microRNA quantitative real time PCR을 진행함.

### 다. 결과 및 임상적 의의

Stem-loop quantitative real time RT-PCR을 이용하여 근육, 결장, 그리고 간장에서 miR-122의 증폭 곡선을 확인할 수 있었으며, 전반적으로 Ct값과 RPM값은 반비례하는 것을 확인하였으며 stem-loop quantitative real time RT-PCR 기법과 NGS를 통한 조직 내 miRNA의 발현 정도와의 전반적으로 상관관계를 보이는 것을 확인함.

	근육	결장	간장
Ct value	18.15	26.61	22.66
RPM	631,229	99,491	67,945



본 연구팀은 Stem-loop quantitative real time RT-PCR 기법의 확립을 통하여 광범위하게 보존된 miR-122의 발현을 탐지하고 정량할 수 있는 방법을 확립하였으며, 본 연구팀의 기법은 말의 정상 혹은 병태 생리학적 조건에 따라 microRNA를 조기 진단의 생물학적 지표로 활용 가능한 유용한 기법이 될 것으로 판단한다.

## 2절. 정상 말의 혈장 내 microRNA 동정과 발현 양상 조사

본 연구팀은 차세대 염기 서열 분석법을 이용하여 정상 말의 혈장 내 microRNAs의 리스트를 세계 최초로 확보하였음.

### 가. 말의 혈액/혈장 추출 및 전체 RNA 및 Quality 분석

임상 검사 및 임상 병리학적 검사를 통하여 질병이 없는 건강한 말을 선정하여 혈액/혈장을 추출하였으며, 그로부터 순도 높은 total RNA를 분리함.

### 나. Small RNA cDNA library 제작 및 NGS (Next Generation Sequencing)

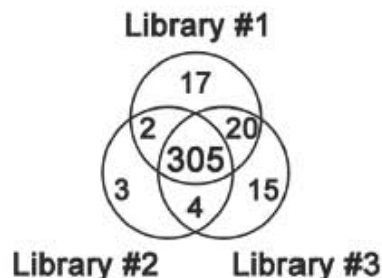
Total RNA를 전기영동을 이용하여 특정 크기 (18-30 nucleotide size)를 추출 한 뒤, Illumina HiSeq 2000 machine을 이용하여 50 bp single-end로 읽어 차세대 염기 서열 분석법 (NGS; Next Generation Sequencing)을 수행함.

### 다. Small RNA annotation

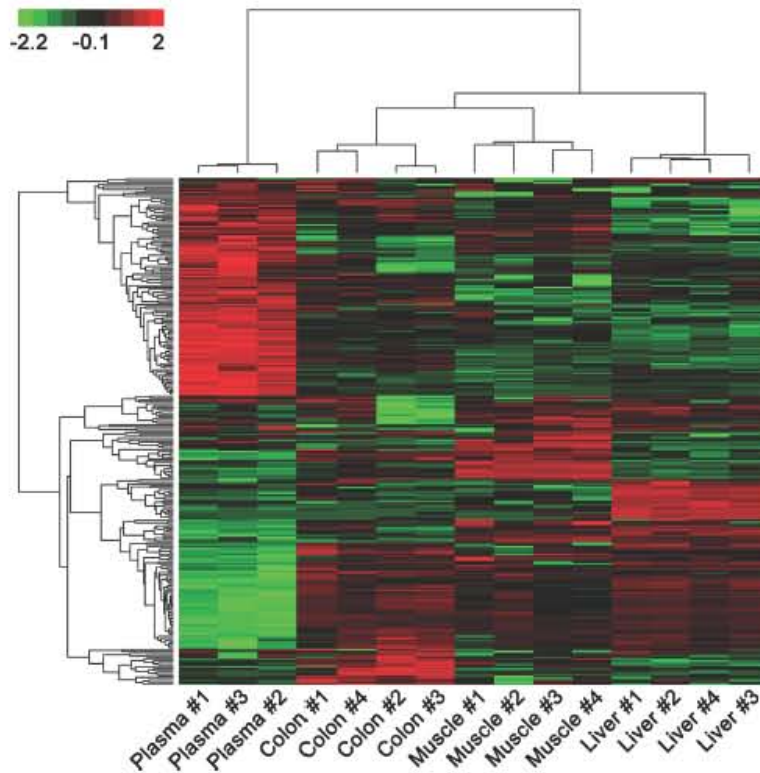
차세대 염기 서열 분석법을 이용하여 염기 서열이 결정된 small RNAs에 대한 정보를 기존에 알려져 있는 염기 서열 데이터 베이스 (Rfam/Genebank)에 일치시켜 microRNAs 서열을 확보하였으며, 이에 대한 데이터를 미국 NCBI SRA (Sequence Read Archive) database(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/>)에 등록 (Submission Number: SRA056221)을 함.

### 라. Identification of microRNAs

본 연구팀은 차세대 염기 서열 분석법을 이용하여 **정상 말의 3개의 혈장에서 공통적으로 발현되는 305 종류의 microRNAs 리스트를 확보**하였으며, 그 중 (1) 163개의 microRNAs가 타 장기와 다른 발현 수준을 나타냄. 그리고 (2) 혈장 내에서 고발현되는 상위 10개 microRNAs 중, 6개 microRNAs가 혈장 특이적이라는 것을 발굴함. 이외에 (3) 혈장 microRNAs만의 염기 구성 특징을 규명함 (Lee et al., 2016).

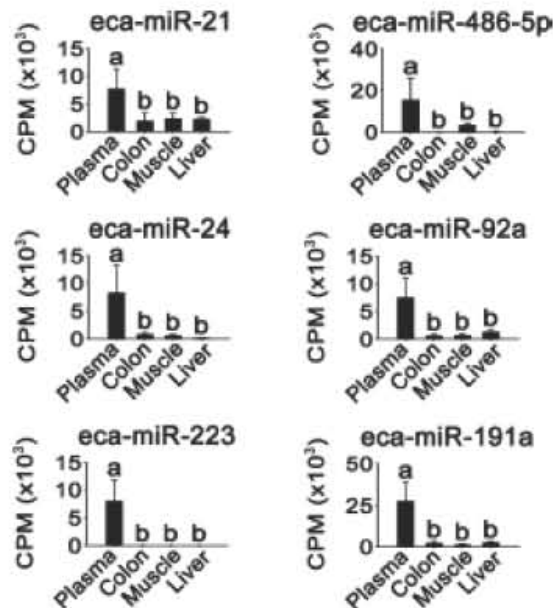


### (1) 타 장기 (결장, 근육, 간장)와의 발현 비교



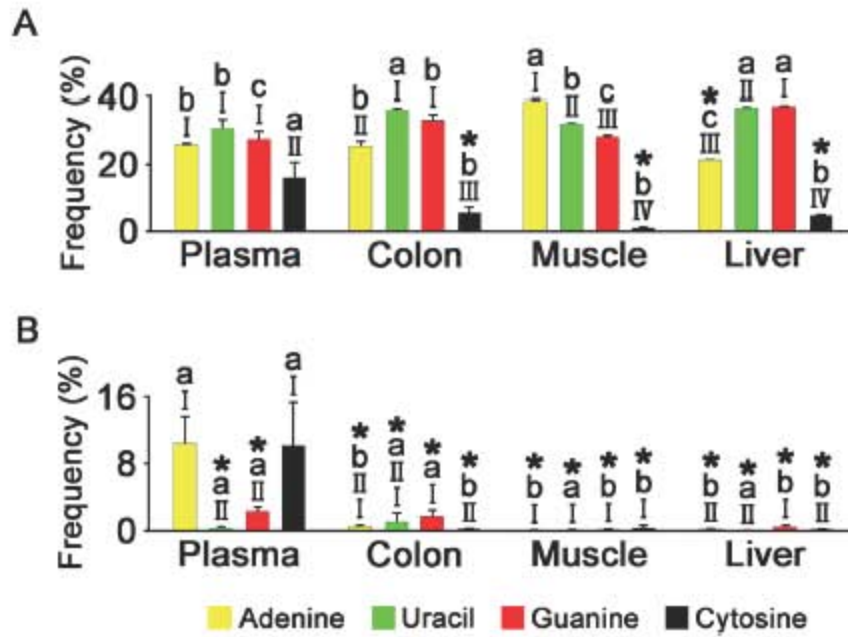
- 87개 microRNAs가 타 장기에 비해 혈장에서 발현이 2배 이상 높으며, 81개 microRNAs가 발현이 2배 이상 낮음.

(2) 혈장 특이적인 microRNAs



- eca-miR-21, -miR-486-5p, -miR-24, -miR-92a, -miR-223, miR-191a가 혈장 특이적으로 발현됨.

(3) 혈장 microRNAs 염기 구성



- 타 장기에 비해 혈장 microRNAs의 Cytosine 염기의 비중 (A)과 단일염기반복성 (MNR)이 높은 특징 (B)을 가진.

### 3절. 말 제엽염에 의한 miRNA 발현 변화 및 생체지표 miRNA 발굴

차세대 염기 서열 분석법을 이용하여 올리고 당에 의한 제엽염 유발 전/후 miRNA 발현 변화들 혈장과 각종 장기에서 분석, 더불어 제엽 특이적 제엽염의 생체지표 miRNA를 최초로 발굴함.

#### 가. 말 제엽염 모델 개발

올리고당 투여를 통해 말의 제엽염을 유발함. 제엽염 유발 평가는 임상적 증상, 혈액/혈청학적 검사, 조직학적 검사 소견을 기반으로 수행함 (Kwon et al., 2013).

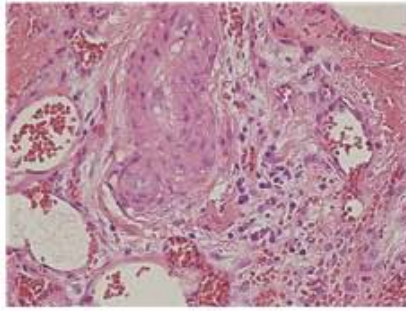
#### 나. 제엽염 유발에 의한 말 혈장, 제엽 및 주요 장기 내 miRNAs 발현 양상

차세대 염기 서열 분석법을 이용하여 제엽염이 유발 전/후 말 혈장과 제엽 조직, 그리고 그 외 주요 장기 내 miRNA의 발현 양상을 비교 분석함.

#### 다. 제엽 특이적 제엽염의 생체지표 miRNA 발굴

miRNA의 발현 양상으로 비교 분석함으로써 제엽염 유발에 의해 제엽 조직 특이적으로 방출되어 혈장 내에서 존재하는 miRNA를 조사함.

##### (1) 병리조직학적 검사



- 제엽 조직의 혈관은 충혈되어 있었으며, 염증 세포의 침윤이 관찰됨.

(2) 제엽과 그 외 주요 장기 내 microRNA 발현

	제엽 조직 (RPM)	제엽 외 주요 장기 조직 (RPM)	배수 변화
eca-miR-199b-5p	2,706	13	206.3
eca-miR-27a	2,278	239	9.5
eca-miR-27b	2,528	406	6.2
eca-miR-324-5p	9	2	3.3

- 제엽염이 유발된 말의 제엽 조직과 그 외 주요 8개 장기 내 miRNA의 발현을 비교하여, 4개 (eca-miR-199b-5p, -miR-27a, -miR-27b, -miR-324-5p)의 제엽 특이적 miRNA를 발굴함.

(3) 제엽염 유발 전/후 혈장 내 microRNA 발현

	제엽염 유발 후 혈장 (RPM)	제엽염 유발 전 혈장 (RPM)	배수 변화
eca-miR-199a-5p	40	5	7.1
eca-miR-27a	10,198	674	15.1
eca-miR-27b	5,170	9,245	4.8
eca-miR-324-5p	88	16	5.3

- 제엽 조직 특이적으로 발현되는 4개의 miRNA들은 제엽염 유발 전에 비해 유발 후 혈장에서 높은 양을 나타냄. 제엽 특이적 제엽염 진단을 위한 생체지표 miRNA 발굴.

4절. 정상 말의 혈장 및 각종 장기 내 piRNA 동정과 제엽염 진단을 위한 생체지표 piRNA 발굴

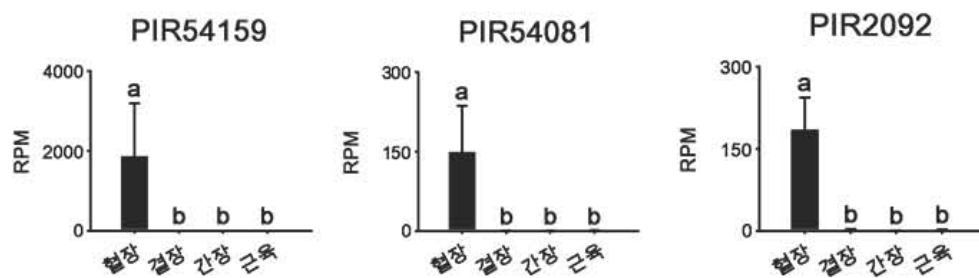
piRNA (Piwi-interacting RNA)는 miRNA와 같은 non-coding small RNA의 한 종류로서 miRNA 보다 더 긴 26~32 nt 길이를 가짐. Piwi 단백질과 상호작용하여 트랜스포존과 다른 유전자의 발현을 억제함. 여러 장기 조직과 혈액 등의 체액에서도 존재함. 그에 따라 최근 사람



의 몇몇 질병을 진단하기 위한 생체지표로서의 가능성이 제시됨. 하지만 현재 말에 대한 piRNA에 대한 정보는 전무한 실정임. 그에 따라 본 연구에서는 말의 혈장 및 각종 장기 내 piRNA를 동정하고, 더불어 제엽염 진단을 위한 생체지표로서의 가능성을 조사함.

### 가. Identification of piRNAs

말의 혈장과 각종 장기 조직 (결장, 근육, 간장)에 대한 small RNA 시퀀싱 데이터를 생물정보학을 적용하여 분석함. 각 조직에서 piRNA는 1% 이하의 낮은 발현량을 나타냄. 말의 간장에서는 37종의 piRNA가 동정되었고, 결장에서는 100종의 piRNA가, 근육에서는 68종의 piRNA가, 혈장에서는 101종의 piRNA가 동정됨. 조직 특이적 piRNA 선별 결과, 결장, 근육, 간장 내 piRNA는 조직 특이적인 발현 양상을 보이지 않았으나, 혈장은 다른 장기 조직에 비해 특이적 발현 양상을 나타냄.



- PIR54159, PIR54081, PIR2092가 혈장 특이적인 발현을 나타냄.

### 나. 제엽염 진단을 위한 생체지표 piRNA 발굴

차세대 염기 서열 분석법과 생물정보학 분석을 적용하여 올리고 당에 의해 유발된 제엽염 전/후 혈장 내 piRNA의 발현 변화를 조사, 더불어 제엽염 진단을 위한 생체지표 piRNA를 최초로 발굴함.

#### (1) 제엽염 유발에 의해 혈장 내 발현이 감소된 piRNA

	Sequence	RPM		배수 변화
		제엽염 유 발 전	제 엽 염 유발 후	
PIR65416	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGCG	112.54	100.40	1.12
PIR32051	AGCAGTTGAACATGGGTCAGTCGGTCCT	0.02	0.02	1.35
PIR60228	TAACCGAAAGGTTGGTGGTTCGAGCC	0.05	0.04	1.35
PIR65192	TCCCATATGGTCTAGCGGTTAGGATTCCTG	4.15	2.32	1.78
PIR65413	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATT	18.65	8.98	2.08
PIR36770	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGC	175.33	65.84	2.66
PIR36767	TCCCTGGTAGTCTAGTGGTTAGGATT	0.05	0.02	2.70

PIR75140	GCATGGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTC	0.05	0.02	2.70
PIR75142	GCATGGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCG C	82.49	28.36	2.91
PIR75141	GCATGGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCG	0.53	0.04	14.85
PIR82944	TAACGAACGAGACTCTGGCATGCTAA	0.02	0	-

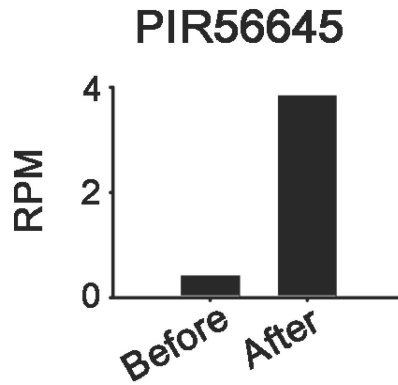
- 제엽염 유발에 의해 혈장 내 발현이 감소된 11종의 piRNA를 발굴함.

(2) 제엽염 유발에 의해 혈장 내 발현이 감소된 piRNA

	Sequence	RPM		배수 변화
		제엽염 유 발 전	제 엽 염 유발 후	
PIR51497	TGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCT	0	0.07	-
PIR56643	TTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCG	0	0.04	-
PIR56646	TTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCC TG	0	0.04	-
PIR8292	TGAGAGGTGTAGAATAAGTGGGAGGCC	0	0.02	-
PIR43413	CAGCAGTTGAACATGGGTTCAGTCGGTC	0	0.02	-
PIR61189	TACCAATGATGAGATTGGAGGGTGTC	0	0.02	-
PIR36771	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCTG GCA	0.07	0.98	13.58
PIR56645	TTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCC T	0.41	3.83	9.41
PIR56644	TTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCC	0.12	0.82	6.81
PIR84651	TACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGCATAT G	0.07	0.46	6.42
PIR56647	TTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCC TGC	0.07	0.23	3.21
PIR65415	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCTG	1.17	2.22	1.89
PIR65417	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCTG G	0.38	0.64	1.67
PIR65414	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTC	1.13	1.72	1.53
PIR252872	GCGCCGCTGGTGTAGTGGTATCATGCA	0.05	0.07	1.48
PIR36603	TCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATG	0.10	0.12	1.30

- 제엽염 유발에 의해 혈장 내 발현이 증가된 16종의 piRNA를 발굴함.

(3) 제엽염 진단을 위한 생체지표 piRNA 발굴



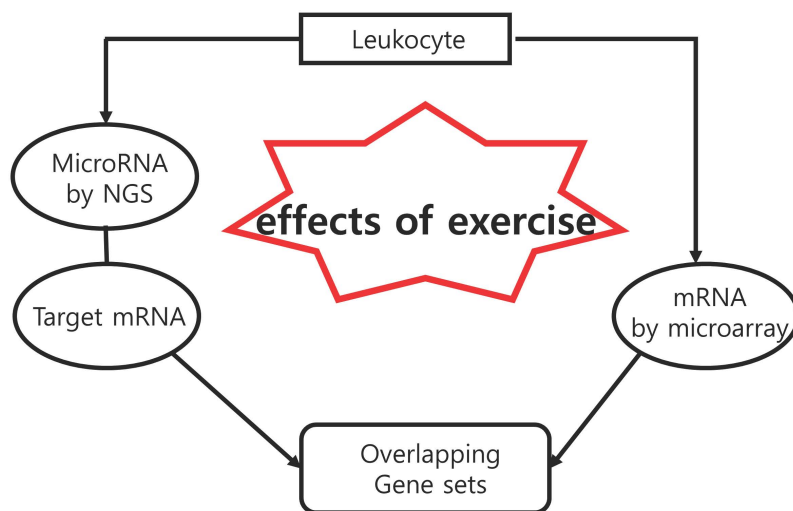
- 발현량이 높은 piRNA 가운데 배수 변화가 1.5배 이상인 piRNA 중, PIR56645를 제염염 진단을 위한 생체지표 piRNA로 제안함.

## 5절. 정상 말의 운동 스트레스와 관련된 혈액 내 microRNA 및 mRNA 발현 조사

현재 경마나 승마 등에 있어 사용되는 말에서 운동에 따른 스트레스 수준과 회복 능력 측정이 경기력 관리에 있어 중요함에도 불구하고 민감도 및 특이도가 높은 스트레스 관련 생물지표가 없음

본 연구팀은 정상 말을 이용하여 운동을 시킨 뒤, 차세대 염기 서열 분석법을 통하여 혈중 백혈구로부터 운동 및 스트레스 관련 후보 microRNA를 분리하여 그 발현 양상 분석하였음.

또한, 본 연구팀은 microRNA의 기능을 증용한 역할을 할 것으로 판단되는 microRNA의 target gene를 microarray를 통해 발굴하였음.



### 1. 말의 혈장 백혈구 유래 microRNAs

가. 운동 전과 후의 말 혈액 확보 및 전체 RNA 및 Quality 분석

임상병리학적으로 건강한 warmblood 품종의 거세마 (8-13세)를 이용하여 1 시간 동안 실내 운동을 실시하였으며, 운동이 끝난 직후 채혈을 하여 혈장과 혈액 백혈구 층을 분리하여 적절한 방법으로 순수한 total RNA를 추출함.

나. Small RNA cDNA library 제작 및 NGS (Next Generation Sequencing)

Total RNA를 전기영동하여 특정 크기 (18-30 nucleotide size)를 추출 한 뒤, Illumina HiSeq 2000 machine을 이용하여 50 bp single-end로 읽어 차세대 염기 서열 분석법 (NGS; Next Generation Sequencing)을 수행함.

다. Small RNA annotation

차세대 염기 서열 분석법을 이용하여 염기 서열이 결정된 small RNAs에 대한 정보를 기존에 알려져 있는 염기 서열 데이터 베이스 (Rfam/Genebank)에 일치시켜 microRNAs 서열을 확보 하였으며, 이에 대한 데이터를 미국 NCBI SRA (Sequence Read Archive) database(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/>)에 등록 (Submission Number: SRA058805)을 함.

라. Identification of microRNAs

본 연구팀은 차세대 염기 서열 분석법을 이용하여 정상 말의 운동 전과 후에서 차별적인 발현을 보이는 229 종류의 microRNAs 리스트를 확인하였으며, 기존 연구에 보고되어 있지 않은 326 종류의 새로운 microRNAs 리스트를 추가적으로 발굴하였음.

특히, 본 연구팀은 모든 말에서 운동 전에 비교하여 운동 후에 통계적으로 유의성이 있으며 차별적인 발현을 보이는 6 종류의 microRNA의 리스트를 다음과 같이 확보할 수 있었음

이 중 novel\_mir\_14와 novel\_mir\_95의 microRNA는 기존에 보고되어 있지 않았으며, 본 연구팀에서 운동 스트레스 관련 microRNA로 세계 최초로 보고하였음.

발굴된 microRNAs는 특히 세포 대사와 연관성이 높은 것으로 보고되어 있었으며, 본 연구에서 운동 스트레스에 보다 특이적인 생체 지표와 관련이 있을 것으로 판단함.

miRNA	Pre exercise: reads mean	Post exercise: reads mean	log <sub>2</sub> FC	p-value	Clinical relevance
<b>Known miRNAs</b>					
eca-miR-144	23264.66	1081.66	-3.72	4.00E-05	- cholesterol metabolism
eca-miR-423-5p	841.66	13131	5.03	8.00E-08	- heart failure - myocardial infarction
eca-miR-545	55.66	1.33	-4.51	1.00E-04	- Alzheimer's disease - lung cancer
eca-miR-33a	118	3	-4.39	2.00E-05	- lipid metabolism
<b>Novel miRNAs</b>					
novel_mir_14	246	0	-17.51	8.00E-06	- fat metabolism - insulin production - steroid hormone signaling
novel_mir_95	0	143.66	-16.6	1.00E-04	- cell proliferation and radio-resistance in cancers

또한, 말의 운동 스트레스 microRNA 중 일부는 사람 의학에서 보고된 바 있으며, 특히 다음과 같은 microRNA는 혈중 백혈구에서 보다 중요한 기능을 하는 것으로 조사되었다.

miR_name	Pre 1	Pre 2	Pre 3	Post 1	Post 2	Post 3	P-value
<b>Blood natural killer cells</b>							
eca-miR-130a	210	62	219	61	43	114	0.1744
eca-miR-151-5p	5246	1489	3571	1094	765	2291	0.1574
eca-miR-199a-5p	4	2	2	1	0	0	0.0351
eca-miR-199a-3p	171	26	118	14	13	29	0.1131
eca-miR-221	2731	626	2043	485	551	766	0.1276
<b>Blood mononuclear cells</b>							
eca-miR-130a	210	62	219	61	43	114	0.1744
eca-miR-199b-3p	170	26	118	14	13	29	0.1125
eca-miR-23b	738	274	620	272	145	607	0.3593
eca-miR-221	2731	626	2043	485	551	766	0.1276
eca-miR-199a-5p	4	2	2	1	0	0	0.0351
eca-miR-151-5p	5246	1489	3571	1094	765	2291	0.1574
<b>Neutrophils</b>							
eca-miR-20b	21	4	21	1	1	2	0.0692
eca-miR-93	20116	7998	41161	9781	7706	32752	0.6405
eca-miR-130a	210	62	219	61	43	114	0.1744
eca-miR-151-5p	5246	1489	3571	1094	765	2291	0.1574
eca-miR-22	39610	14095	52463	14317	9806	45707	0.49
eca-miR-363	644	141	386	84	133	187	0.1596

## 2. 말의 혈장 백혈구 유래 mRNAs

### 가. 운동 전과 후의 말 혈액 확보 및 전체 RNA 분리

임상병리학적으로 건강한 warmblood 품종의 거세마 (8-13세)를 이용하여 1 시간 동안 실내 운동을 실시하였으며, 운동이 끝난 직후 채혈을 하여 혈장과 혈액 백혈구 층을 분리하여 적절한 방법으로 순수한 total RNA를 추출하였음.

### 나. 운동 전/후 혈청학적 분석

말 운동 전/후 혈액으로부터 혈청을 분리한 후, 전해질 분석, CBC 검사, 호르몬 검사 등을 실시하여 운동에 의한 변화를 확인함. 기존 스트레스 지표의 혈중 변화도 확인.

### 다. PCR을 통한 mRNA 발현 분석 및 Microarray chip analysis of mRNAs

Real-time PCR 및 RT-PCR 기법을 통해 말 운동 전/후 혈액 내 특정 유전자의 mRNA 발현

량을 비교 분석함. 기존 스트레스 지표와의 연관성을 통계학적으로 분석, 이를 말 운동 스트레스에 대한 생체지표 mRNA로 제안함. 또한, Affymetrix Gene Chip® Equus caballus mRNA microarray를 사용하여 연구를 수행하였음.

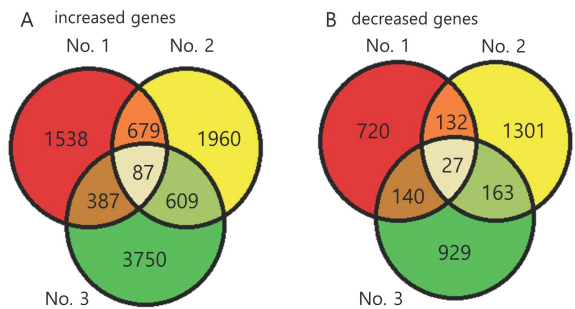
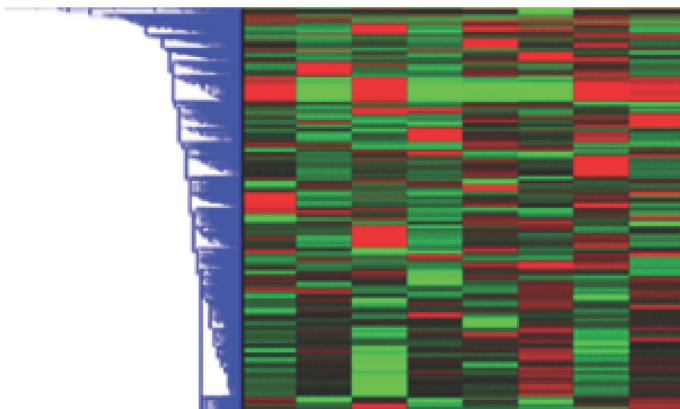
라. 운동 전과 후 혈장 백혈구에서 차별적인 발현을 보이는 mRNAs

본 연구팀은 microarray chip analysis를 이용하여 정상 말의 운동 전과 후 차별적이며 통계적으로 유의적인 발현 양상을 보이는 운동 스트레스 관련 후보 mRNAs 리스트를 확보하였음.

차별적인 발현은 “Cutoff value =  $\text{Log}_2(\text{Fold change}) \geq 1$  or  $\leq -1$ ”로 정의하였고, 통계적 유의성은 “p-value < 0.05”로 정의하였음.

총 3마리의 말에서 운동 전과 후의 차별적으로 높은 발현을 보이는 9,010개의 유전자를 확인하였으며, 차별적으로 낮은 발현을 보이는 3,412개의 유전자를 확인하였음

특히, 87개의 유전자는 실험에 이용된 모든 말의 혈액 백혈구에서 공통적으로 그 발현이 상승되어 있는 것이 확인할 수 있었으며, 27개의 유전자는 그 발현이 감소되어 있는 것을 확인할 수 있었음.



**C**

Number (before VS after exercise)	Up-regulated gene	Down-regulated gene
No. 1	2691	1019
No. 2	3335	1623
No. 3	4833	1259

(1) 모든 말에서 운동 전과 비교하여 운동 후에 발현이 증가하는 대표적인 mRNAs

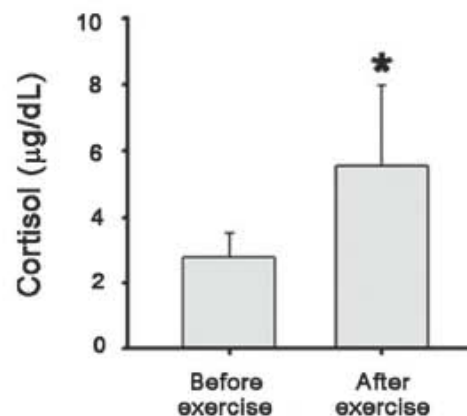
Gene Symbol	Gene name	Mean of $\text{Log}_2$ (Fold Change)
LOC100073221	protein limb expression 1 homolog	2.39
LOC100067725	olfactory receptor 10W1-like	2.47
ADAMTS6	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 6	2.353333
TF	transferrin	3.476667
LOC100050742	transmembrane 4 L6 family member 1-like	2.556667
LOC100066473	similar to wax synthase	2.316667
SLC8A1	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger),	2.273333

	member 1	
LOC100061578	hypothetical protein LOC100061578	3.376667
GRIN1	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1	2.693333
MYO1H	myosin IH	2.823333
LOC100069504	similar to transmembrane leptin receptor	2.34
SLFN11	schlafen family member 11	3.453333
HAPLN2	hyaluronan and proteoglycan link protein 2	2.673333
GALNTL2	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 2	3.09
PLCE1	phospholipase C, epsilon 1	2.223333
LOC100629443	uncharacterized LOC100629443	2.456667
LAMA4	laminin, alpha 4	2.243333
LOC100630298	uncharacterized LOC100630298	2.86
PRSS35	protease, serine, 35	2.286667
LOC100629125	uncharacterized LOC100629125	2.516667

(2) 모든 말에서 운동 전과 비교하여 운동 후에 발현의 감소를 보이는 대표적인 mRNAs

Gene Symbol	Gene name	Mean of Log <sub>2</sub> (Fold Change)
LOC100051632	similar to c-Fos	-2.50333
LOC100067425	hypothetical LOC100067425	-1.92667
LOC100062643	tetratricopeptide repeat protein 39A-like	-2.06
LOC100054003	similar to chromosome transmission fidelity factor 8 protein	-1.76333
TRPM3	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 3	-2.52667
LOC100147630	similar to DDB1- and CUL4-associated factor 15	-1.65
LOC100056508	protein Smaug homolog 1-like	-2.99333
LOC100064195	hypothetical protein LOC100064195	-2.12333
EEF1A2	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	-1.65667
ADAM12	ADAM metallopeptidase domain 12	-2.02667

(3) 말 운동 전/후 혈중 코르티솔 농도 분석

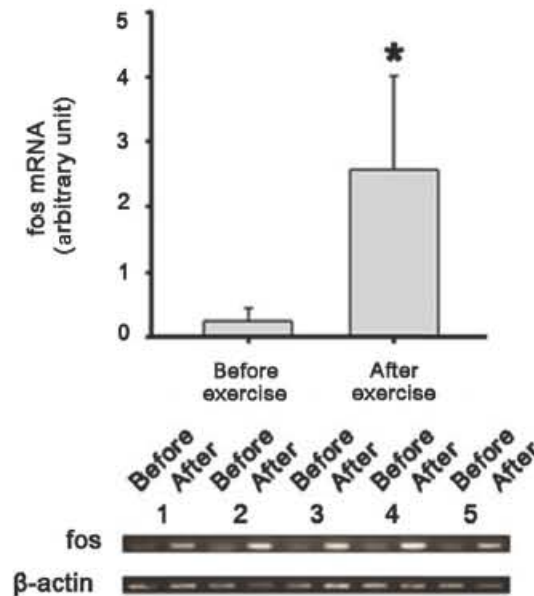


- 기존에 스트레스 지표로 알려진 코르티솔의 농도를 말 운동 전/후 비교, 운동에 의해 코르티솔의 농도가 증가.

(4) 말 운동 전/후 혈중 fos mRNA 발현 분석

- 스트레스 관련 유전자인 fos mRNA의 발현이 말 운동에 의해 혈중에서 증가함. 코르티솔과

의 연관성이 또한 입증됨. 그에 따라 Fos 유전자를 말의 운동 스트레스를 평가하기 위한 생체 지표 mRNA로 제안함.



### 3. 말의 혈장 백혈구 유래 microRNAs 및 mRNAs의 통합 분석

microRNA의 생물학적 기능은 타겟 유전자의 발현 조절을 통해 결정이 되며, 단백질을 코딩하는 대부분의 유전자들은 microRNA의 seeding region과 상보적인 서열의 3' untranslated region (conserved or non-conserved microRNA binding site)을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구팀은 차세대 염기 서열 분석을 통해 확보한 “**운동 전/후 통계적 유의성 및 차별적 발현을 보이는 6 종류의 microRNAs**”에 대하여 **target mRNAs 탐색 분석을 수행**하였다.

#### 가. Identification of mRNAs for the microRNAs

(1) Bioinformatic tools: TargetScan, miRanda, and KEGG pathway by DAVID

(2) Subset of microRNAs: eca-miR-144, 423-5p, 545, and 33a, novel-miR-14 and 95

(3) potential target mRNAs

TargetScan 및 miRanda의 microRNA target prediction 프로그램을 이용하여 6 종류의 microRNAs에 대한 target mRNAs를 탐색하였으며, 그 결과 총 2,530개의 유전자들이 선별되었음.

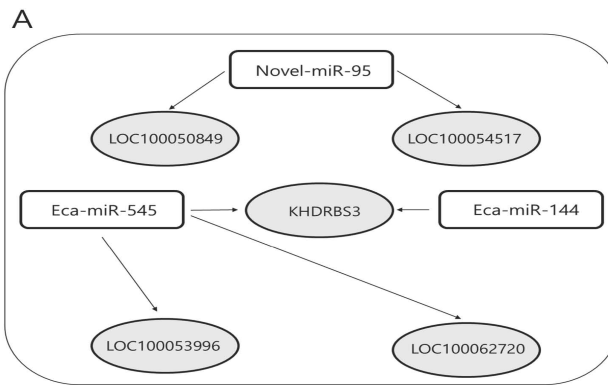
특히 본 연구팀에서 확보한 다음의 target mRNAs는 운동 스트레스와 보다 밀접한 관련이 있을 것으로 판단함.

Gene symbol	Log <sub>2</sub> FC (pre2 vs post2)	Log <sub>2</sub> FC (pre3 vs post3)	Log <sub>2</sub> FC (pre4 vs post4)	Differential Regulation
<b>Muscle strength and composition</b>				
ACTN3	0.1073504	0.900885	1.336878	UP
IGF1R	0.1684833	0.060797	1.208437	UP
<b>muscle metabolism and exercise intolerance</b>				



HIF1A	-0.47435	-1.20888	-0.528215	DOWN
GYS1	-0.178074	-1.376169	-1.028878	DOWN
<b>Haemodynamic and aerobic metabolism capacity</b>				
VEGFA	-1.450016	-0.532534	-0.421213	DOWN
LOC100055952	0.6696425	0.548272	3.835264	UP
AMPD1	0.3681717	0.046904	1.22941	UP
<b>Tendon and ligament physiology</b>				
DRD1	0.5742254	0.143991	1.244536	UP
DRD3	1.1515098	1.231298	0.012099	UP
5HTT	0.1302824	0.662432	1.27192	UP

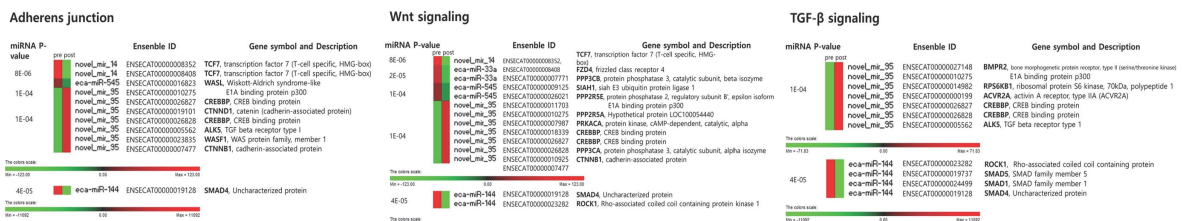
후보 유전자 리스트 중, 본 연구팀 microarray 분석에서 그 발현이 실제 존재하며 차별적인 후보 유전자들 (Log (fold change)  $\geq 1$  or  $\leq -1$ )을 추가적으로 선별하였으며, 최종적으로 3가지 microRNA에 대하여 5가지의 타겟 유전자들이 확인됨.



miRNA	UP/DOWN of miRNA	Gene symbol	UP/DOWN of mRNA
novel_mir_95	UP	LOC100050849	DOWN
		LOC100054517	DOWN
eca-miR-545	DOWN	LOC100053996	UP
		LOC100062720	UP
eca-miR-144	DOWN	KHDRBS3	UP

#### (4) Biological function of the potential target mRNAs

차세대 염기 서열 분석 기법을 통해 발굴한 운동 전과 후 발현 차이를 보이는 microRNAs의 target mRNAs를 대상으로 KEGG pathway (DAVID, <http://david.abcc.ncifcrf.gov>) 분석을 수행하였으며, 최종적으로 Wnt, TGF-beta, and Adherens junction 신호 전달계가 통계적으로 유의적인 것을 확인함.



## 6절. 말의 microRNA microarray 제작 및 검증

본 연구팀의 microRNA microarray kit 및 microRNA 분석을 위한 microRNA kit 시제품을 개발하는 것을 목표로 세웠으나, 연구개발 착수 이후 국외 다른 기관 (Illumina microarray chip, Affymetrix Gene Chip® Equus caballus miRNA 4.0 Array)에서 동일한 기술이 개발되어 당초 연구 계획 변경이 불가피하였으므로 본 연구팀은 1) 제엽염에 걸린 질병 상태의 말을 대상으로 microarray를 이용한 microRNA의 발현 조사 및 2) microRNA 시료의 분석을 통한 선별 microRNA 유용성 재확보 및 검증을 수행하였음.

1. 제엽염에 걸린 질병 상태의 말을 대상으로 microarray를 이용한 microRNA의 발현 조사가. 정상 말의 결장 조직에 비하여 제엽염이 유발된 말의 제엽 조직에서 차별적인 발현을 보이는 miRNA 리스트

(1) 총 152 종류의 microRNAs (127 종류의 miRNA들은 결장 대비 제엽 조직에서 높은 발현을 보이고 있었으며, 25 종류의 miRNA들은 결장 대비 제엽 조직에서 낮은 발현)가 정상 말의 결장 조직에 비하여 제엽 조직에서 차별적인 발현을 보이고 있는 것을 확인함.

microRNAs	Sequence	Log <sub>2</sub> Ratio
eca-miR-205	UCCUUCAUCCACCGGAGUCUG	11.52
eca-miR-182	UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACUG	8.22
eca-miR-200c	UAAUACUGCCGGGUAUAUGAUGGA	7.85
eca-miR-200b	UAAUACUGCCUGGUAUAUGAUGA	7.81
eca-miR-31	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU	7.75
	.....	
eca-miR-885-5p	UCCAUUACACUACCCUGCCUCU	-6.75
eca-miR-1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU	-9.27
eca-miR-133a	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG	-9.36
eca-miR-133b	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUA	-9.41
eca-miR-206	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG	-10.89
	.....	

나. 정상 말의 간장 조직에 비하여 제엽염이 유발된 말의 제엽 조직에서 차별적인 발현을 보이는 miRNA 리스트

(1) 총 152 종류의 microRNAs (109 종류의 miRNA들은 간장 대비 제엽 조직에서 높은 발현을 보이고 있었으며, 43 종류의 miRNA들은 간장 대비 제엽 조직에서 낮은 발현)가 정상 말의 간장 조직에 비하여 제엽 조직에서 차별적인 발현 (Fold change > 1.5) 을 보이고 있는 것을 확인함.

microRNAs	Sequence	Log <sub>2</sub> Ratio
eca-miR-205	UCCUUCAUCCACCGGAGUCUG	12.03
eca-miR-149	UCUGGCUCGUGUCUUCACUCCC	6.12
eca-miR-146b-5p	UGAGAACUGAAUCCAUAGGCU	6.00
eca-miR-486-3p	CGGGG CAGCUCAG UACAGGAU	5.87
	.....	
eca-miR-379	UGGUAGACUAUGGAACGUAGG	-3.67
eca-miR-10a	UACCCUGUAGAUCGAAUUUGUG	-4.17
eca-miR-194	UGUAACAGCAACUCCAUGUGGA	-5.60
eca-miR-192	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	-5.93
eca-miR-215	AUGACCUAUGAAUUGACAGAC	-6.81
	.....	

다. 정상 말의 근육 조직에 비하여 제엽염이 유발된 말의 제엽 조직에서 차별적인 발현을 보이는 miRNA 리스트

(1) 총 154 종류의 microRNAs (90 종류의 miRNA들은 결장 대비 제엽 조직에서 높은 발현을 보이고 있었으며, 64 종류의 miRNA들은 근육 대비 제엽 조직에서 낮은 발현)가 정상 말의 근육 조직에 비하여 제엽 조직에서 차별적인 발현을 보이고 있는 것을 확인함.

microRNAs	Sequence	Log <sub>2</sub> Ratio
eca-miR-205	UCCUUCAUCCACCGGAGUCUG	12.22
eca-miR-10b	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG	7.04
eca-miR-132	UACAGUCUACAGCCAUGGUCG	6.60
eca-miR-196a	UAGG UAGUUUCAUGUUGUUGGG	6.33
eca-miR-200c	UAAUACUGCCGGUAAUGAUGGA	6.11
	.....	
eca-miR-503	UAGCAGCGGGAA CAGUACUGCAG	-4.40
eca-miR-194	UGUAACAGCAACUCCAUGUGGA	-4.66
eca-miR-192	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	-5.35
eca-miR-885-5p	UCCAUUACACUACCCUGCCUCU	-5.38
eca-miR-122	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUG	-8.55
	.....	

## 2. MicroRNA 시료의 분석을 통한 선별 microRNA 유용성 재확보 및 검증

본 연구팀은 차세대 염기 서열 분석 기법을 통하여 제엽염이 유발된 말의 제엽 4개 조직에서 발현되는 microRNA를 제엽염이 유발된 말의 제엽 외 8개 주요 장기에서 발현되는 microRNA와 비교 분석함으로써, 제엽 조직 특이적으로 발현 (Fold change > 2)되는 40 종류의 microRNA 선별하였음.

그 결과, 총 58 종류의 정상 장기 대비 제엽염 특이적인 microRNA 리스트를 확보하였으며 특히, 21 종류의 microRNA는 기존 제엽염 특이 miRNA로 선별되었던 것과 그 서열이 서로 일치하는 것으로 확인됨.

microRNAs	Sequence	Log <sub>2</sub> Ratio
eca-miR-205	UCCUUCAUCCA CCGGAGUCUG	11.930
eca-miR-182	UUUGGCAAUGGUAGAA CUCA CACUG	5.808
eca-miR-183	UAUGGCACUGGUAGAAUUCACU	5.351
eca-miR-31	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU	4.953
eca-miR-199b-5p	CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC	4.165
eca-miR-184	UGGACGGAGAACUGAUAAGGGU	3.987
eca-miR-140-5p	CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG	2.969
eca-miR-874	CUGCCCUGGCCCGAGGGACCGA	2.360
eca-miR-27a	UUCACAGUGGCUAAGUUCGCG	2.088
eca-miR-27b	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC	2.038
eca-miR-199a-5p	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC	1.874
eca-miR-324-5p	CGCAUCCCUAGGGCAUUGGUGU	1.837
eca-miR-129b-3p	AAGCCCUUACCCAAAAAGCAU	1.704
eca-miR-23b	AUCACAUUGCCAGGGAUUACC	1.669
eca-miR-140-3p	UACCACAGGGUAGAACCACGG	1.620
eca-miR-98	UGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUU	1.593
eca-miR-214	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU	1.493
eca-miR-23a	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	1.484
eca-miR-671-3p	UCCGGUUCUCAGGGCUCACC	1.330
eca-miR-204b	UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCU	1.213
eca-miR-222	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	1.170

본 연구팀은 차세대 염기 서열 분석법을 통해 확보한 제엽 특이 microRNA와 microarray 기법을 통해 확보한 제엽염 특이 microRNA의 발현 양상을 비교 분석함으로써 제엽 특이 유전자의 유용성을 재검증함.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1절. 목표 달성도

#### 1. 말의 miRNA library 확립

- 가. 건강한 말의 각종 장기와 혈장 내 miRNA 분리 후 library 제작 수행.
- 나. 제염염 및 운동 스트레스 유발된 말의 혈액 내 miRNA 분리 후 library 제작 수행
- 다. miRNA 동정 및 염기 서열 규명, 말의 염색체 내 위치 정보 확보
- 라. 정량적 qRT-PCR을 사용하여 miRNA의 정량 기술 확보
- 마. 그 외 piRNA를 포함한 small RNA 동정 및 정보 확보

#### 2. 말 질병 진단에 유용한 miRNA 선별 및 기초기술 확립

- 가. 생물정보학적 분석을 사용하여 진단에 유용한 miRNA군 선별
- 나. 생물정보학적 분석을 통한 말 miRNA의 특성 평가
- 다. 조직 특이적 질병 진단을 위해 조직 특이적인 miRNA 선별
- 라. 말의 병리학적, 생리학적 상태를 평가하기 위한 miRNA 정보 확보

#### 3. miRNA microarray을 통한 miRNA 발현 조사

- 가. 말을 포함한 여러 포유류에 대한 miRNA의 발현 연구가 가능한 miRNA microarray를 사용하여 말의 생리학적 상태를 평가
- 나. 운동에 의해 혈액 내 발현이 변화되는 miRNA 군 선별

#### 4. NGS를 이용한 생체지표 발굴

- 가. 말의 제염염 진단을 위한 제염염 특이적 생체지표 mRNA/단백질 발굴
- 나. 말의 제염염 진단을 위한 생체지표 miRNA 및 piRNA 발굴
- 다. 말의 운동 스트레스 진단을 위한 생체지표 mRNA 발굴

구분	연도	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차년도	2012년	말의 전체 microRNA library 확립 및 발현 분석 기초 기술 확립	100 %	○ [제 1 세부] 다양한 breed의 말 병리적 평가 및 치료 확보
			100 %	○ [제 1 세부] 말의 각종 장기 및 혈액으로부터 microRNA를 포함한 전체 RNA를 분리 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 임상 검사 및 임상 병리학적 검사를 통하여 질병이 없는 건강한 말을 선정한다.</li> <li>• 정상 말의 각종 장기로부터 Trizol을</li> </ul>

				<p>이용한 방법 또는 RNA extract kit를 이용하여 순수한 전체 RNA를 분리하여 quality 평가한다.</p>
			100 %	<p>○ [제 1 / 2 세부] 전체 microRNA 염기서열 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>추출한 전체 RNA로부터 Size-fractionation방법을 이용 22nt 크기의 순수한 microRNA를 분리한다.</li> <li>microRNA에 adapter 부착 RT-PCR 그리고 cDNA cloning의 일련 과정을 거쳐 Size-fractionated cDNA library 제작한다.</li> <li>제작된 cDNA library를 가지고 NGS 염기서열 분석한다.</li> </ul>
			100 %	<p>○ [제 1 / 2 세부] 염기서열 분석결과를 토대로 microRNA의 발현 양상 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Bioinformatics tool을 이용하여 분석된 microRNA의 발현 양상 분석</li> <li>10개의 말 시료에 대한 microRNA library를 확립함으로써 정량적 목표를 달성한다.</li> </ul>
			100 %	<p>○ [제 2 세부] 정량적 microRNA RT-PCR 법 개발 착수</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>정량을 위해 동정된 microRNA 염기서열 자체를 정량을 위해 고안된 Forward primer를 이용하여 정량적 RT-PCR기법을 확립한다.</li> <li>30가지 종류의 정량적 microRNA RT-PCR기법을 확립한다.</li> </ul>
2차년도	2013년	질병진단에 유용한 microRNA 선별 및 진단 응용을 위한 기초기술 확립	100 %	<p>○ [제 1 세부] 정상 및 병리적 상태 (제염염)에 말의 장기 내 microRNA 발현 양상을 조사하여 진단에 유용한 microRNA 군을 선별</p> <p>○ 장기 내 전체 microRNA 염기서열 분석 (Next Generation Sequencing)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>추출한 전체 RNA로부터 Size-fractionation방법을 이용 22nt 크기의 순수한 microRNA를 분리한다.</li> <li>microRNA에 adapter 부착 RT-PCR 그리고 cDNA cloning의 일련 과정을 거쳐 Size-fractionated cDNA library 제작한다.</li> <li>제작된 cDNA library를 가지고 NGS 염기서열</li> </ul>

				분석한다.
			100 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ [제 2 세부] 정상 및 병리적 상태 (제염염)에 말의 혈장 내 microRNA 발현 양상을 조사하여 진단에 유용한 microRNA 군을 선별</li> <li>○ 혈장 내 전체 microRNA 염기 서열 분석 (Next Generation Sequencing) <ul style="list-style-type: none"> <li>• 추출한 전체 RNA로부터 Size-fractionation방법을 이용 22nt 크기의 순수한 microRNA를 분리한다.</li> <li>• microRNA에 adapter 부착 RT-PCR 그리고 cDNA cloning의 일련 과정을 거쳐 Size-fractionated cDNA library 제작한다.</li> <li>• 제작된 cDNA library를 가지고 NGS 염기서열 분석한다.</li> </ul> </li> </ul>
			100 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ [제 1 / 2 세부] 다양한 정상 또는 질병상태의 말에 대한 적용을 통한 선별 microRNA의 질병 진단을 위한 specificity확립 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Bioinformatics과 RT-PCR기법을 토대로 조사된 유용한 microRNA군을 정상, 질병상태 그리고 다양한 생리학적 상태의 말에 각 장기로부터 발현되는 가장 대표성 있는 microRNA 리스트를 선별하여 질병 진단을 위한 specificity를 확립한다.</li> </ul> </li> </ul>
			100 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ [제 1 세부] 정량적 microRNA RT-PCR 법 개발 착수 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 정량을 위해 동정된 microRNA 염기서열 자체를 고안된 Stem loop primer를 이용하여 장기 내 microRNA의 정량적 RT-PCR 기법을 확립한다.</li> </ul> </li> </ul>
2차년도	2013년	말의 전체 mRNA 발현 분석 및 질병 진단에 유용한 단백질 선별	100 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ [제 2 세부] 병리적 상태 (제염염)에 말의 조직 내 messenger RNA 발현 양상을 조사하여 제염 조직 특이적 messengerRNA 군 선별 ; 제염 조직과 그 외 12개 장기 조직 비교, 분석</li> <li>○ 조직 내 전체 mRNA 염기 서열 분석 (Next Generation Sequencing) <ul style="list-style-type: none"> <li>• 추출한 전체 RNA로부터 poly(A) RNA를 분리한 후 random hexamer primer로 first-strand cDNA를 합성한다.</li> <li>• Double stranded cDNA 합성 후 DNase I으로 fragmentation 을 실시한다. 이후 cDNA 말단 repair 및 adapt ers ligation을 하다.</li> </ul> </li> </ul>

				<ul style="list-style-type: none"> <li>• 제작된 cDNA library를 가지고 NGS 염기서열 분석한다.</li> </ul>
			100 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ [제 2 세부] 병리적 상태 (제염염)에 말의 혈장 내 단백질 발현 양상을 조사하여 제염염 유발 후 혈장 내 특이적 단백질 군 선별 ; 제염염 유발 전 혈장과 제염염 유발 후 혈장 비교, 분석</li> <li>○ 혈장 내 전체 단백질 발현 분석 (Mass Spectrometry) <ul style="list-style-type: none"> <li>• 제염염 유발 전, 후 말의 혈장 단백질을 SDS-PAGE로 size fractionation 및 정제한 후 trypsin으로 digestion 한다.</li> <li>• Tryptic peptide은 Nano-LC-ESI-MS/MS mass spectrometry 이용하여 protein identification 분석을 실시한다.</li> </ul> </li> </ul>
			100 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ [제 2 세부] 병리학적 상태 (제염염)에 말의 제염 조직 특이적 messengerRNA이면서, 제염염 유발 후 혈장 내 특이적으로 발현되는 단백질 선별 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Bioinformatics과 mass spectrometry법을 토대로 조사된 유용한 단백질을 선별하여 질병 진단을 위한 specificity를 확립한다.</li> </ul> </li> </ul>

3차년도	2014년	말의 microRNA microarray 시 제품 제작 및 검정	100 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ [제 1 세부] 다양한 microRNA, messengerRNA 시료의 분석을 통한 선별 유전자 유용성 확보 (NGS, microarray 적용) <ul style="list-style-type: none"> <li>• 운동 전/후 말의 혈액으로부터 혈청 및 백혈구 시료 확보</li> <li>• 백혈구로부터 Total RNA (miRNA, mRNA) 추출</li> </ul> </li> </ul>
------	-------	-------------------------------------	-------	---



			<ul style="list-style-type: none"> <li>• 추출한 전체 RNA를 fractionation, adapter ligation, RT-PCR, cloning 등의 전처리를 사용하여 cDNA library 제작</li> <li>• NGS와 microarray 분석 수행</li> </ul> <p>○ [제 1 세부] 운동 전/후 말의 백혈구 microRNA 염기 서열 분석 (Next Generation Sequencing)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 운동 전/후 말의 백혈구 Total RNA의 NGS 분석 수행</li> <li>• Bioinformatics를 적용하여 운동 전/후 말 백혈구 miRNA의 발현 및 특성 분석 수행</li> <li>• miRNA의 target mRNA 예측 및 그에 대한 GO ontology, KEGG Pathway 분석 수행</li> </ul> <p>○ [제 1 세부] 운동 전/후 말의 백혈구 messenger RNA microarray 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 운동 전/후 말의 백혈구 Total RNA의 microarray 분석 수행</li> <li>• Bioinformatics를 적용하여 운동 전/후 말 백혈구 mRNA의 발현 분석 수행</li> <li>• mRNA의 GO ontology, KEGG Pathway 분석 수행</li> </ul>
		100 %	<p>○ [제 1 세부] 병리적 상태 (골연골증, 산통)에 따른 microRNA 발현 변화 분석 - 진행중</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 골연골증의 골편, 산통 등의 병리학적 상태에 따른 여러 말 시료를 확보하여 miRNA 발현</li> </ul>

			<p>분석 수행  중 (NGS, microarray 적용)  • 골연골증, 산통 진단을 위한 생체지표  miRNA 발  굴</p> <p>○ [제 2 세부] 병리적 상태 (제엽염)에  따른 protein 발현 변화 분석  • 자연적 제엽염 유발된 말과 정상 말의  혈장 시료를  확보하여 혈장 protein 발현 분석 수행  (Proteomics 적용)  • Bioinformatics를 적용하여 protein을  target하는  miRNA 예측  • 자연적 제엽염 진단을 위한 생체지표  protein,  miRNA 발굴</p> <p>○ [제 2 세부] 운동 스트레스에 따른  mRNA 발현 변화, 혈청화학적 분석  • Bioinformatics를 적용하여 운동 전/후  말의 혈액  mRNA 발현 변화 분석  • 운동 전/후 혈청화학적 분석, RT-PCR  을 적용하여  mRNA 발현 변화 검증  • mRNA에 대한 target miRNA 예측  • 운동 스트레스 측정 생체지표 mRNA,  miRNA 발  굴</p>
		100 %	<p>○ [제 2 세부] 말 microRNA  microarray 제작을 위한 과학적 기반  자료 확보  • 말 이외의 다른 동물 (사람, 마우스) 혈  장 miRNA  발현 분석  • 말 이외의 다른 동물 (사람, 마우스) 혈  장 miRNA</p>

				<p>특성 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>말 혈장 내 새롭게 발견된 miRAN의 구조적 특성 분석</li> </ul> <p>○ [제 2 세부] 말 microRNA microarray 제작 및 정량적 분석법을 적용한 품질 검증 - 진행중</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>제작 및 품질 검증을 위한 과학적 연구 계획 설정</li> <li>품질 검증을 위한 정량적 miRNA 분석법 (Taqman assay) 기술 확보</li> <li>miRNA microarray 제작 기술 확보 및 업체 선정</li> </ul>
--	--	--	--	---

4차년도	2015년	microRNA를 이용한 진단 기법의 실제 적용 및 산업화 기술 확립	60%	<p>○ [제 1 세부] 임상검사 및 실험실 검사를 통하여 제엽염과 산통으로 확진된 말의 혈액 채취 및 microRNA 분리</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>임상 검사 및 임상 병리학적 검사를 통하여 각각 제엽염과 산통으로 확진된 각각 40마리의 말을 선정한다.</li> <li>제엽염과 산통으로 확진된 말의 혈청 및 골격 근육을 시료로 확보한다.</li> </ul>
			30%	<p>○ [제 1 / 2 세부] microarray법 및 정량적 RT-PCR을 이용한 microRNA 발현 조사</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>각 시료로부터 microRNA를 분리하여 microarray법을 이용하여 microRNA 발현 양상을 조사한다.</li> <li>결과의 신빙성을 위해 정량적 RT-PCR 기법을 이용하여 micro -array기법으로 조사된 결과를 확인하고 품질을 확립한다.</li> <li>Microarray법과 정량적 RT-PCR기법을 토대로 각각의 질병상태의 말의 각 장기로 부터 발현되는 가장 대표성 있는</li> </ul>

				microRNA 리스트를 선별한다.
			60%	<p>○ [제 2 세부] 진단 기준 품질 조정으로 진단 민감도 및 특이도가 높은 진단법 확정.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Microarray 분석법으로 조사된 질병 상태의 말의 microRNA의 발현양상을 정상말의 microRNA의 발현양상과 비교하여 가장 대표성있는 microRNA 리스트를 선별한다.</li> <li>• 진단 기준 및 대상 microRNA 리스트를 조정하여 특이도와 민감도가 향상된 새로운 검사법을 확립한다.</li> <li>• 진단 민감도, 진단특이도 및 진단정확도를 조합하여 최상의 결과가 생산될 수 있는 microRNA 리스트와 양성판정 기준을 조정한다.</li> </ul>

## 2절. 관련 분야에의 기여

1. 말의 건강 상태를 평가할 수 있는 혁신적인 관리 체계 구축에 기여
2. 농가 수입 증대 및 경마 산업 육성에 기여
3. 생체지표의 산업화를 통해 국가적 이익창출에 크게 공헌
4. 전 세계 말 연구 분야에 있어서 우선적 지식재산권 확보
5. 말 이외의 가축과 국내 동, 식물 보전 및 관리에 기여

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 1절. 연구 개발 성과

본 연구팀은 세계 최초로 차세대 염기 서열 분석 기법을 이용하여 (1) 정상 말의 장기 조직별 특이적인 microRNA 리스트, (2) 제엽염 제엽 조직 및 혈장 특이적인 microRNA 리스트, (3) 말의 운동 스트레스별 microRNA 리스트를 확보하였으며 (4) 말 microRNA 발현 분석을 위한 microarray 법 및 기타 정량법을 확립하였고, 이에 대한 연구 성과물을 논문과 특허의 지식 재산권으로 창출하였음.

### 2절. 연구 활용 계획

본 연구팀에서 확보한 결과는 미래의 성장 잠재력과 부가가치가 높은 복합 산업으로의 국내 말 산업을 발전시키기 위한 수단으로 활용될 것이며, 국내 사육되고 있는 말에 대한 다양한 건강 및 질병 상태를 판단하는데 필수적이며 새로운 진단 모델 확립에 공헌할 것으로 기대함. 특히, 본 연구의 결과물은 기존 제엽염 치료 및 진단의 큰 장애물로 평가되는 비특이적인 임상병리학적 제엽염 진단에 있어 이를 극복할 수 있는 획기적인 전략으로 크게 활용될 것임.

본 연구에서 확보된 지식, 방법론, 그리고 논문과 특허의 지식 재산권 및 여타 연구 성과물은 말의 각종 생리 상태와 산통을 포함한 기타 질병 등을 정의할 수 있는 생체 지표로 microRNA가 실용화·산업화될 것이며, 그 하위 기전을 추가적으로 연구함으로써 말 산업 발전에 이바지할 수 있는 말 건강 관리 방안 확립에 기여할 것으로 기대함. 특히, 본 연구팀의 결과물은 사용하고 쉽고 진단적 민감도와 정확도가 높은 분자생물학적 진단 키트 개발의 상용화로 산업화 전략이 이루어질 것으로 평가함. 또한, 본 연구는 기타 산업 동물 및 사람에도 확대 적용하여 다양한 진단 분야에 있어 획기적인 방법을 개발하는데 연구 기반을 확보할 것으로 평가됨.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 1절. miRNA 및 piRNA 선별

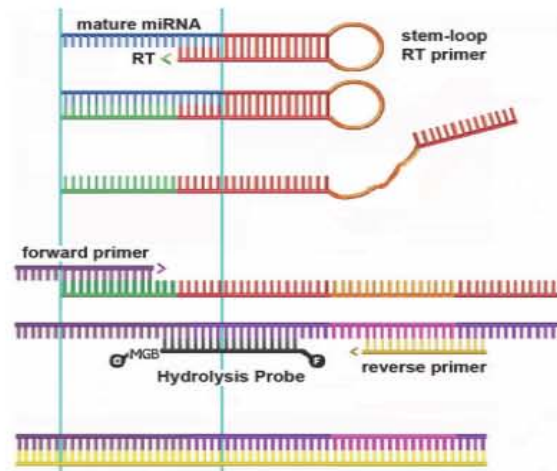
본 연구에서 수행된 말의 miRNA 및 piRNA 관련 연구를 위해 NGS를 통해 생성된 Raw data (FASTA 파일)의 분석이 요구되었다. 그에 따라 기존 해외과학기술정보를 활용하여 small RNA 시퀀싱을 통해 생성된 FASTA 파일의 분석을 다음과 같이 실시하였다 (Williams et al., 2013; Gu et al., 2014). 전체 small RNA read들 중에 quality가 낮거나 사이즈가 다소 작거나 긴 read들을 제거하였다. 남은 read들은 miRbase (<http://www.mirbase.org>) 상의 기존에 알려진 말 mature miRNA 시퀀스와 대조하여 일치할 경우 말의 miRNA로 1차적으로 선별하였으며, 일치하지 않을 경우 SOAP 프로그램을 이용하여 말의 유전체의 시퀀스와 비교하였다 (Li et al., 2008). 유전체 시퀀스와 일치하는 read들은 기존에 알려진 piRNA 시퀀스와 대조하여 말의 piRNA를 2차적으로 선별하였다. 새로운 miRNA를 최종적으로 선별하기 위해 miRNA를 포함한 다른 small RNA 시퀀스와 일치하지 않는 read들을 Mireap 프로그램 (<http://sourceforge.net/projects/mireap/>) 을 사용하였다.

이와 같이 생물정보학 활용하여 miRNA와 piRNA 그리고 기존에 알려지지 않은 새로운 miRNA까지 발굴할 수 있었다.

### 2절. miRNA target 예측

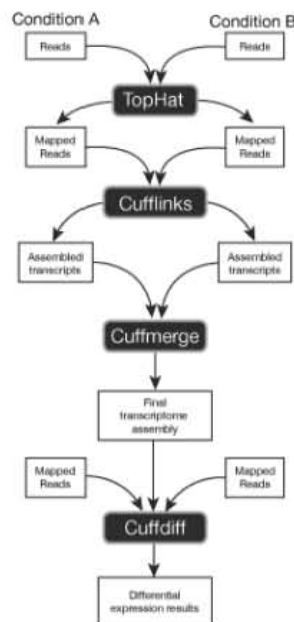
본 연구에서 동정한 말 miRNA에 대한 mRNA target 예측은 Target-align 프로그램을 사용하여 예측하였다 (Xie et al., 2010). 말의 유전체 중 5' 그리고 3' UTR 시퀀스를 확보한 후, 생물정보학을 기반으로 target mRNA를 예측하였다. 예측에 사용된 옵션은 다음과 같았다. 1) miRNA와 mRNA target 간에 4개 이상의 mismatch는 허용하지 않았다. 2) 2개의 연속된 mismatch는 허용하지 않았다. 3) 10~11번째 시퀀스에 대한 mismatch는 허용하지 않았다. 4) miRNA의 5'말단 1번 12번 염기 서열에서 2.5개 이상의 mismatch는 허용하지 않았다.

### 3절. Taqman assay를 통한 miRNA qRT-PCR



본 연구에서 수행된 말의 miRNA 정량화는 Stem-loop primer를 이용한 Taqman assay를 통해 수행하였다 (Kramer et al., 2011). mature miRNA의 3' 말단의 6개 염기와 상보적으로 stem-loop primer를 제작한 후, 역전사 반응을 실시하였다. 상보적 결합을 변성 과정을 통해 절단한 후, mature miRNA의 서열의 5' 말단 서열이 포함된 정방향 프라이머와 stem-loop primer의 loop 부분 서열에 대한 역방향 프라이머를 사용하여 PCR 증폭과정을 수행하였다. 이때, 5' 말단에 FAM이 3' 말단에 MGB가 달린 Hydrolysis probe를 함께 반응시켜 형광을 인지함에 따라 miRNA의 양을 측정하였다.

#### 4절. Tuxedo 프로토콜



본 연구에서 수행된 말의 병리학적, 생리학적 상태에 대한 생체지표 mRNA를 발굴하기 위해 Tuxedo 프로토콜을 적용한 RNA 시퀀싱 분석을 수행하였다 (Trapnell et al., 2012). RNA 시퀀싱에 의해 생성된 Raw data (FASTAQ) 파일은 조각난 mRNA 서열들로 구성되었다. 이를 말의 전체 Genome 서열에 Tophat을 사용하여 alignment한 후, 각 유전자 annotation이 들

어있는 파일에 cufflinks를 사용하여 다시 annotation 시켰다. 이 후, Cuffmerge를 통해 annotation된 read들을 조립한 후, 각 그룹끼리 통계적으로 유의적 차이가 발생하는지를 Cuffdiff를 이용하여 분석하였다.

이러한 Tuxedo 프로토콜을 기반으로 하는 Galaxy project (<https://galaxyproject.org/>)와 CLC Genome work bench 등과 같은 프로그램을 통해 보다 효율적으로 RNA 시퀀싱 분석에 사용되었다.



## 제 7 장 연구시설·장비 현황

- 해당 사항 없음.

## 제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

연구실 안전환경 조성에 관한 법률, 유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률, 수질 환경보전법, 서울대학교 환경안전관리규정에 근거하여 연구실 안전조치를 실시하였음.

### 가. 연구실 안전 점검 체계 및 실시

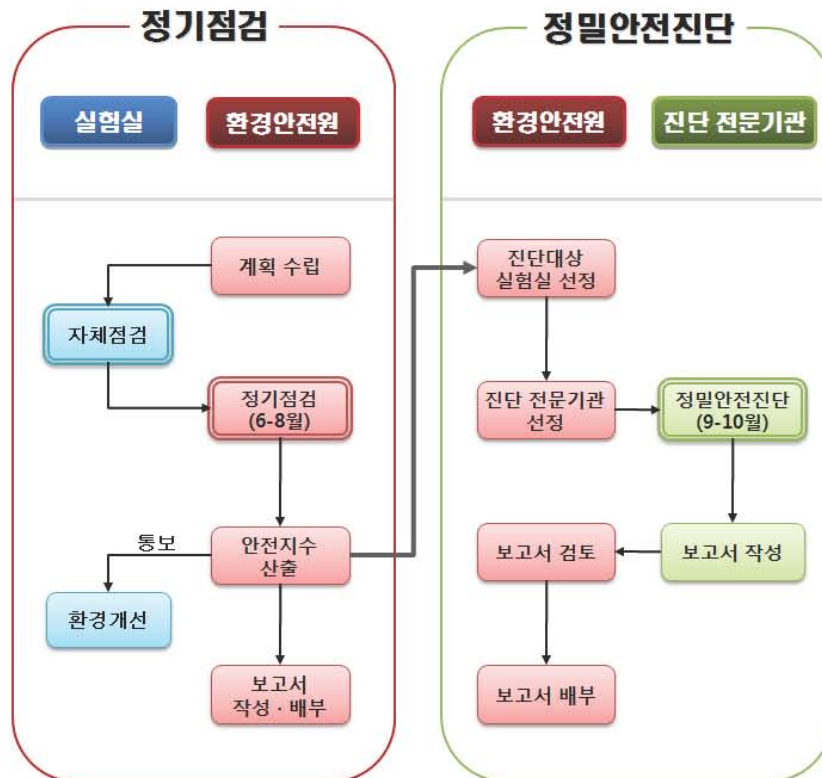
연구실 안전환경 조성에 관한 법률에 의거 실험실을 일상점검, 정기점검, 특별안전점검, 정밀안전진단을 실시할 예정임.

#### 1) 일상점검: 전 연구 활동에 사용되는 실험 약품 및 장비의 이상 유무 점검

- 기간 : 년중
- 실시자 : 연구활동 종사자
- 내용 : 점검표 작성 후 점검 실시

#### 2) 정기점검: 실험실 안전점검 체계 (아래 그림)에 따라 매년 정기점검 실시하고, 부적합 사항에 대하여 개선 조치할 예정임.

- 실시자 : 환경안전원
- 내용 : 실험실 안전점검 프로그램을 사용하여 분야별 항목 점검



#### 3) 정밀안전진단: 정기점검 실시 후 도출된 위해요인에 대하여 외부 전문기관에 진단을 의뢰하여 위해요인의 개선방향 및 안전관리방안 수립

- 실시자 : 외부전문 진단기관
- 내용 : 정기점검 후 선정된 중점 점검항목 및 연안법에 규정된 점검항목 진단

나. 교육 훈련

1) 개요 : 실험실의 안전을 확보하고 종사자의 건강을 보호하여 실험 및 연구활동에 기여하고, 또한 연구실 안전환경조성에 관한 법률에 의거하여 실험실의 환경안전교육이 의무화된 실험실 대학원생 및 관련자 전원은 환경안전교육을 의무적으로 수강할 것임.

2) 교육대상 : 교수, 대학원생, 소속연구원, 실험참여 학부생 등

3) 교육

- 정기교육 : 최소 연 2회 출석 수업 수강

- 기타 수시 교육 및 온라인 교육을 통하여 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 및 「환경안전관리규정」에 의거 연구활동종사자를 대상으로 한 환경안전교육 수강.

다. 연구활동종사자 보험가입

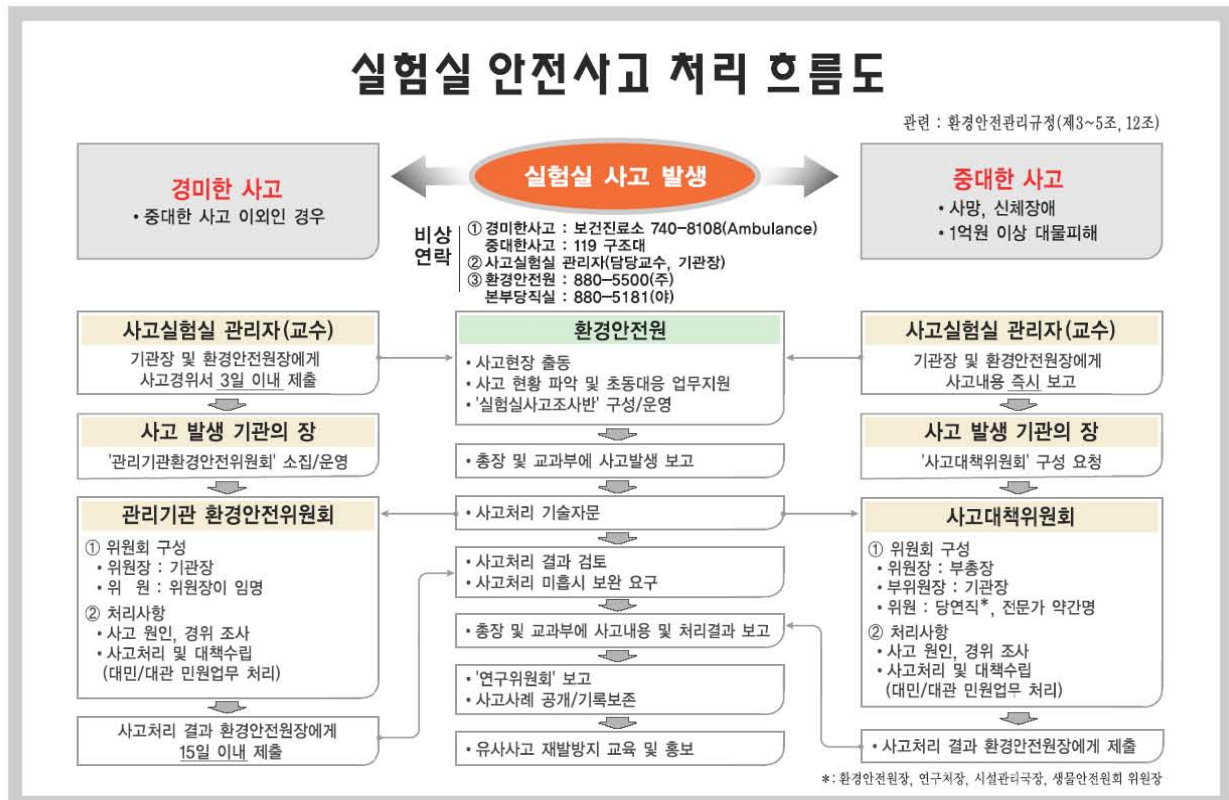
- 매년 정기적으로 보험가입 및 갱신처리를 지속적으로 이행함

- 연구실 안전환경 조성에 관한 법률 제14조 제1항 및 시행령 제15조 제1항에 의거 의무적으로 가입함.

- 가입회사 : 교육시설 재난공제회

- 가입대상 : 학부생, 대학원생, 연구원(보조연구원 포함)

라. 실험실 안전사고시 처리 흐름도 (서울대학교)



## 제 9 장    참고문헌

- Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X: Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell research* 2008, 18(10):997-1006.
- Laterza OF, Lim L, Garrett-Engele PW, Vlasakova K, Muniappa N, Tanaka WK, Johnson JM, Sina JF, Fare TL, Sistare FD: Plasma MicroRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury. *Clinical chemistry* 2009, 55(11):1977-1983.
- Barrey E, Bonnamy B, Barrey E, Mata X, Chaffaux S, Guerin G: Muscular microRNA expressions in healthy and myopathic horses suffering from polysaccharide storage myopathy or recurrent exertional rhabdomyolysis. *Equine veterinary journal* 2010, 42(s38):303-310.
- Ambros V (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature* 431: 350-355.
- Zhou M, Wang Q, Sun J, Li X, Xu L, et al. (2009) In silico detection and characteristics of novel microRNA genes in the *Equus caballus* genome using an integrated ab initio and comparative genomic approach. *Genomics* 94: 125-131.
- Das PJ, McCarthy F, Vishnoi M, Paria N, Gresham C, et al. (2013) Stallion Sperm Transcriptome Comprises Functionally Coherent Coding and Regulatory RNAs as Revealed by Microarray Analysis and RNA-seq. *PLoS One* 8: e56535.
- Yang H, Ma Y, Li B, Dugarjaviin M (2010) Progress on horse genome project. *Yi chuan* 32: 211-18.
- McKenzie E (2011) Muscle physiology and nutrition in exercising horses. *Equine Vet J* 43: 637-639
- Wade C, Giulotto E, Sigurdsson S, Zoli M, Gnerre S, et al. (2009) Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science* 326: 865-867.
- Levine MA (1999) Investigating the origins of horse domestication. *Equine Vet J Suppl*: 6-14.
- Emmeline W (2013) Genomics of performance. *Equine genomics* 1: 265-283.
- Gaffney B, Cunningham EP (1988) Estimation of genetic trend in racing performance of thoroughbred horses. *Nature* 332: 722-724.
- Flynt AS, Lai EC (2008) Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity. *Nat Rev Genet* 9: 831-842.
- McGivney BA, Eivers SS, MacHugh DE, MacLeod JN, O'Gorman GM, et al. (2009) Transcriptional adaptations following exercise in thoroughbred horse skeletal muscle highlights molecular mechanisms that lead to muscle hypertrophy. *BMC Genomics* 10: 638.
- Tonevitsky AG, Maltseva DV, Abbasi A, Samatov TR, Sakharov DA, et al. (2013) Dynamically regulated miRNA-mRNA networks revealed by exercise. *BMC Physiol* 13:

9.

- Radom-Aizik S, Zaldivar F, Jr., Leu SY, Adams GR, Oliver S, et al. (2012) Effects of exercise on microRNA expression in young males peripheral blood mononuclear cells. *Clin Transl Sci* 5: 32-38.
- Radom-Aizik S, Zaldivar F, Jr., Oliver S, Galassetti P, Cooper DM (2010) Evidence for microRNA involvement in exercise-associated neutrophil gene expression changes. *J Appl Physiol* (1985) 109: 252-261.
- Gim JA, Ayarpadikannan S, Eo J, Kwon YJ, Choi Y, et al. (2014) Transcriptional expression changes of glucose metabolism genes after exercise in thoroughbred horses. *Gene* 547: 152-158.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 「 농생명산업기술개발사업 」의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 「 농생명산업기술개발사업 」의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.