



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

博士學位論文

제주마 모색 분포 특성과 얼루기  
모색의 분자유전학적 연구

濟州大學校 大學院

動物資源科學科

金 男 英

2015年 8月

제주마 모색 분포 특성과 얼루기  
모색의 분자유전학적 연구

指導教授 梁 榮 勳

金 男 英

이 論文을 農學 博士學位 論文으로 提出함

2015年 8月

金男英의 農學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_

委 員 \_\_\_\_\_

委 員 \_\_\_\_\_

委 員 \_\_\_\_\_

委 員 \_\_\_\_\_

濟州大學校 大學院

2015年 8月

# Distribution of Coat Colors and Molecular Genetic Study of White Patch in Jeju Horses

Nam-Young Kim

(Supervised by professor Young-Hoon Yang)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of Doctor of Philosophy

2015. 8.

This thesis has been examined and approved.

Department of Animal Biotechnology

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

## ABSTRACT

Jeju horses are the only horse genetic resource native to South Korea. The present study was conducted to determine the color of Jeju horses' coats and to ensure a basic data of coat color diversity by investigating the coat color characteristics and the molecular genetic characteristics of Jeju horses with white patch.

To characteristics the coat color of Jeju horses, the genotypes of *MC1R* and *ASIP* genes that are related to the basic black, bay, and chestnut coat colors of 1,465 heads of registered Jeju horses, 119 heads of thoroughbred, and 228 heads of crossbred (Jeju horse × thoroughbred) were analyzed. In addition, the genotypes of *STX17* and ECA3-inversion that are related to gray and white coat colors were also studied.

It was found that, the frequencies of genotypes  $E^+/E^+$ ,  $E^+/E^e$ , and  $E^e/E^e$  of the *MC1R* gene were identified 0.122, 0.447, and 0.429, respectively. Although thoroughbred and crossbred horses showed similar frequencies to those of Jeju horses, however thoroughbred horses has shown a lower frequency of genotype  $E^e/E^e$ .

Among Jeju horses, the frequencies of the genotypes  $A^A/A^A$ ,  $A^A/A^a$ , and  $A^a/A^a$  of the *ASIP* gene were found at 0.46, 0.448, and 0.091, respectively. The black coat color is expressed by the combination of genotype  $E^+/-$  of the *MC1R* gene and the genotype  $A^a/A^a$  of the *ASIP* gene. Because the frequency of the genotype  $A^a/A^a$  among Jeju horses was shown to be 0.091, the rate of expression of black coat color is estimated to be 5.1% or lower. Among three groups of horses, Jeju horses, crossbred horses, and thoroughbred horses, the frequencies of haplotype were found  $E^+-A^aA^a$  which indicates black coat color were shown to be 0.042, 0.079, and 0.025,

respectively, the highest frequency among of the crossbred horses. The frequency of bay coat color was the highest among thoroughbred horses, and Jeju horses and crossbred horses showed similar frequencies.

The frequencies of genotypes  $To/To$  and  $To/+$  that are expressed as phenotype Wolla (white patch) among Jeju horses were shown 0.1% and 11.9% respectively. Therefor 12% of Wolla coat color frequency stipulated among Jeju horses. The genotype  $To/To$  was not identified in crossbred horses, while the frequency of the genotype  $To/+$  was 3.9%, which is lower frequency of Wolla coat color compared to Jeju horses. On the other hand, the allele did not appear in the thoroughbred horses.

The frequencies of genotype  $G/g$  for the expression of gray coat color among thoroughbred and crossbred horses were shown to be low at 6.7% and 5.2%, respectively. On the counterpart, the homozygote frequency and heterozygote frequency of  $G$  allele among Jeju horses was shown to be 0.2% and 68%, respectively, indicating that gray coat color is prevalent among Jeju horses.

The genes *MC1R*, *ASIP*, and ECA3-inversion related with coat color maintained by Hardy-Weinberg equilibrium, however *STX17* in Jeju horses was not in the equilibrium state ( $p < 0.001$ ). It was thought to be responsible by selection of a gray coat color stallion for the maintenance of a group of Jeju horses

The allele and genotype frequencies of the *MC1R* and *ASIP* genes of Jeju horses have not changed very much with each generation. The frequency of the Wolla  $To$  allele decreased gradually from 0.126 to 0.034 within 0 to 2.5 generation. Thus it was assumed that the occurrence of the Wolla coat color in Jeju horses significantly decreased with each generation ( $p < 0.05$ ). The frequency of the  $G$  allele of the *STX17* gene that expresses gray significantly increased from 0.192 in generation 0 to 0.386 in generation 2.5 ( $p < 0.05$ ). In addition, the frequency of the genotype  $G/g$  of

*STX17* gene that expresses gray also increased by two times from 0.384 to 0.764 at 0 to 2.5 generation, indicating that the frequencies of allele and genotype that express gray rapidly increased with successive generations.

The genetic classification of Jeju horses' Wolla coat color was conducted using molecular genetic analysis methods to detect the presence of the tobiano, overo, and sabino genes. It was identified that in the case of Jeju horses' Wolla coat color, all *ECA3*-inversions that are related to the tobiano gene has the *To* allele, while all *EDNRB* related to the overo gene and the *KIT* intron 16 SNP related to the sabino gene were wild types. Therefore, Jeju horses' Wolla coat color is thought to be due to the tobiano gene.

According to the results of a genome-wide association study (GWAS) analysis of horses' white patch, 72 SNPs in the equine genome satisfied the significance level of  $p < 0.001$ . The significant SNPs were distributed widely from 21 Mbp to 85.1 Mbp in chromosome number 3. The most significant SNP was located at 48853535bp (BIEC2-819509), and its  $p$  value was shown to be  $1.01 \times 10^{-22}$ . To identify related genes in SNP loci significantly related to horses' white patch, regional plots were prepared. The *GPRIN3* gene and the *TIGD2* gene could be identified in the vicinity of the most significant SNP locus, and *MC1R* and *KIT* genes were also shown to exist in significant regions.

The *GPRIN3* gene's DNA sequence was analyzed and six SNPs were identified; no insertion/deletion mutation was found. Among the identified SNPs, c.1114G>A and c.1476G>A were identified as being synonymous, and c.1226C>T, c.1388C>T, and c.1790G>A were identified as substituting amino acid sequences with p.372V>I (Val>Ile), p.409S>L (Ser>Leu), and p.463T>M (Thr>Met), respectively. The correlation between SNPs and white patch in the *GPRIN3* gene was analyzed, and the result showed high LOD values in the range of 60.9 - 121.2. Four SNPs were identified in the *TIGD2* gene, and in the case of c.\*152G>A, differences between solid and

white patch base sequences could be identified. The correlation between *TIGD2* c.\*152G>A SNP and white patch was analyzed, and the result showed a very high LOD value of 206.6.

The present study shows that the diversity of Jeju horse coat colors has been decreasing. In particular, gray color-related gene frequencies were shown to be high to account for most coat colors, and the frequencies significantly increased with successive generations. Therefore, to maintain the diversity of Jeju horses' coat colors, coat color factors should be reviewed in the stage of selecting stallions. The spotted coat color appearing in Jeju horses was identified as genetically due to the tobiano gene. The third chromosome of horses was shown to be highly correlated with spotted coat color, and *TIGD2* c.\*152G>A, *GPRIN3* c.1114G>A, *GPRIN3* c.\*331A>G, and BIEC-819509 SNP are considered assistant markers to identify tobiano coat color.



# 목 차

ABSTRACT .....	i
목 차 .....	v
LIST OF FIGURES .....	vii
LIST OF TABLES .....	ix
I. 서론 .....	1
II. 연구사 .....	4
1. 포유류의 모색 관련 melanin 생합성 연구	
2. 말의 모색 관련 분자유전학적 연구	
3. 제주마의 모색 연구	
4. 가축에서 Genome Wide Association Study (GWAS) 분석 법의 이용	
III. 재료 및 방법 .....	15
1. 공시동물	
2. Genomic DNA 분리 및 중합효소연쇄반응	
3. 모색 유전자형 결정	
4. 토비아노(Tobiano) 모색 관련 후보 유전자 DNA 염기서열 결정	
5. Equine SNP Chip genotype assay	
6. 유전체 연관 분석(GWAS, Genome Wide Association Study)	
7. 통계분석	

IV. 결과 및 고찰 .....	27
1. 제주마, 더러브렛, 교잡종(제주마×더러브렛) 기본모색 유전자의 유전 특성	
2. 백반(월라) 및 회색(총마) 모색 유전자의 유전 특성	
3. 제주마의 세대 경과에 따른 모색 유전자 빈도 변화	
4. 제주마 월라(Wolla) 모색의 백반 형태 정의	
5. 말의 토비아노(Tobiano) 모색 관련 GWAS 분석	
6. <i>GPRIN3</i> 및 <i>TIGD2</i> 유전자의 구조 및 염기서열 분석	
7. 토비아노(Tobiano) 모색과 <i>GPRIN3</i> 및 <i>TIGF2</i> 유전자의 연관관계 분석	
V. 요약 .....	78
VI. 참고문헌 .....	81

## LIST OF FIGURES

Figure 1. Various coat colors in Jeju horses .....	11
Figure 2. Phenotypes of Wolla (white patch) coat color in Jeju horses .....	12
Figure 3. Flow chart of SNP genotyping using the EquineSNP50 BeadChip ..	24
Figure 4. Pyrogram showing the genotypes $E^+/E^+$ , $E^+/E^c$ , $E^c/E^c$ for <i>MC1R</i> ...	29
Figure 5. Pyrogram showing the genotypes $A^A/A^A$ , $A^A/A^a$ , $A^a/A^a$ for <i>ASIP</i> ...	30
Figure 6. Electrophoresis of PCR products for ECA3-inversion .....	36
Figure 7. Electrophoresis of PCR products for <i>STX17</i> .....	37
Figure 8. Gene and genotype frequency change of <i>MC1R</i> , <i>ASIP</i> , ECA3-inversion, <i>STX17</i> by generation .....	42
Figure 9. Pyrograms showing the genotypes for <i>EDNRB</i> 2bp missence mutation .....	45
Figure 10. Pyrograms showing the genotypes for <i>KIT</i> intron 16 SNP .....	46
Figure 11. Manhattan plot and Q-Q plot of Tobiano in horses .....	50
Figure 12. Regional plot on ECA3 .....	51

Figure 13. <i>GPRIN3</i> gene structure .....	53
Figure 14. Nucleotide sequences and mutations of the complete <i>GPRIN3</i> .....	54
Figure 15. Amino acid sequences of the <i>GPRIN3</i> .....	65
Figure 16. <i>TIGD2</i> gene structure .....	68
Figure 17. Nucleotide sequences and mutations of the complete <i>TIGD2</i> .....	69
Figure 18. Amino acid sequences of the <i>TIGD2</i> .....	72

## LIST OF TABLES

Table 1. Coat color genes and symbols of horses .....	8
Table 2. Primer sequences used in this study .....	20
Table 3. Distribution of genotype and allele frequencies of <i>MC1R</i> in three groups of horses .....	31
Table 4. Distribution of genotype and allele frequencies of <i>ASIP</i> in three groups of horses .....	32
Table 5. Haplotype distribution of <i>MC1R</i> and <i>ASIP</i> in three groups of horses .....	33
Table 6. Distribution of genotype and allele frequencies of ECA3-inversion in three groups of horses .....	38
Table 7. Distribution of genotype and allele frequencies of <i>STX17</i> in three groups of horses .....	39
Table 8. Genotypes of the ECA3-inversion, <i>EDNRB</i> and <i>KIT</i> intron 16 in Jeju horse Wolla(white patch) and solid .....	47
Table 9. Distribution of allele and genotype frequencies and association analysis of <i>GPRIN3</i> SNPs, BIEC2-819509 SNP and <i>TIGD2</i> SNP .....	76
Table 10. Haplotype frequencies and association of analysed SNPs .....	77

## I. 서론

국내 유일의 재래마인 제주마(Jeju Horse)는 역사적, 문화적 고유 가치를 인정받아 혈통 보존 및 멸종 방지를 위해 1986년 천연기념물 제347호로 지정되어 관리되어 오고 있다. 제주마 명칭은 과거 제주마, 조랑말, 재래마, 과하마 등 다양하게 불려왔으나 이를 통합하여 제주마로 불리게 됐다. 2000년대부터 제주마의 혈통관리를 위해 제주마 등록사업이 진행되어 2015년 총 등록두수는 2,900여두에 달하고 있다(제주도, 2015).

제주도는 말 사육에 적합한 지형적 기후적 조건을 갖추고 있으며 역사적으로도 국내 말 생산에 중요한 역할을 수행한 곳이다. 제주도의 말 사육 기록에 의하면 서기 145년 탐라국왕세기에 말은 교역 대상이었으며, 백제 무왕 10년(610년)과 후백제(918년) 시대에 공마 기록으로 보면 삼국시대 이전부터 제주지역에는 말이 적지 않은 두수가 사육되고 있었음을 알 수 있다(장, 2007). 또한 충렬왕 2년(1276년)에는 몽골에서 160두의 마필이 도입되어 몽골식 말 목장 형태로 사육되면서 제주도 목마장의 기원이 되기도 하였다.

고고학적인 연구와 분자유전학적 연구에서도 고려 시대 이전에 말이 존재하였음을 확인할 수 있다. 제주에 청동기시대에서 철기시대에 이르는 유적인 광지 유적과 종달리 유적에서 동물들의 뼈가 출토되었다. 광지 유적에서는 멧돼지, 사슴, 소, 갯과 동물 및 말의 뼈가 확인되었으며(신과 김, 1993), 종달리 유적에서는 사슴, 멧돼지, 소, 말의 뼈가 출토되었다(신, 2001). 이 두 유적에서 공통적으로 말의 뼈가 출토되어 청동기시대에서 철기시대에 말이 존재했음을 추정케한다. 광지 유적지에서 출토된 말 뼈에서 모계 기원을 분석하기 위해 mtDNA D-loop 염기서열을 분석한 결과 현재의 제주마와는 다른 형태가 나타나 몽골말이 제주에 도입되기 전에 제주에 말이 존재하고 있는 것으로 보고된 바 있으며(Jung 등, 2002), 제주마의 mtDNA D-loop 7종에 대해 다른 품종의 마필과 근연관계를 분석한 결과 몽골말, 더러브렛 외에 다른 품종과도 근연관계가 있는 것으로 분석된 바 몽골말이 제주에 들어오기 전에 제주에 말이 존재하고 있는 것으로 추정된 바 있다(Kim 등, 1999).

포유류의 모색은 세대 간 유전 양상을 나타내는 대표적인 형질로 다양한 종에서 활발히 연구돼 왔다(Kijas 등, 1998; Klungland 등, 1995; Schmutz과 Berryere, 2007; Valverde 등, 1995). 모색은 표현형이 쉽게 확인되어 개체 식별에 이용될 뿐만 아니라 세대 간 유전 양상 확인이 용이하여 유전자 작용이나 유전자 간의 상호 관계에 대한 연구를 위해 모델 형질로 관심 대상이 되어 왔다.

말의 모색은 바탕의 색상과 형태에 따라 다양하게 구분된다. 적색과 흑색을 기본으로 하는 기본모색(basic colors)과 기본모색 발현에 영향을 미치는 희색모색(diluted colors)이 있다. 또한 백모색(white-based colors)의 무늬 형태에 따라서도 구분된다. 기본 모색에는 흑모색(Black), 적갈색(Bay) 그리고 적색(Chestnut)으로 구분되며, 희색모색에는 크림(Cream), 던(Dun), 실버데플(Silver dapple), 샴페인(Champagne) 모색 등으로 구분된다. 백색모의 혼재 형태에 따라 회색(Gray), 조모색(Roan), 백색(White)으로 구분되며, 백반의 양상에 따라 토비아노(Tobiano), 오베로(Overo) 등의 형태로 구분된다(Thiruvankadan 등, 2008).

제주마의 모색은 더러브렛 등 다른 품종의 마필보다 다양하다. Lee (1971)는 제주마 모색 명칭을 고어(古語)로 불리는 것을 외국 모색 분류와 연관하여 40여 종으로 세 분류하였고, 남(2003)은 제주마 모색 명칭을 국문 명칭과 고어 명칭을 종합하여 49종으로 세분한 바 있다. 이런 제주마 모색 명칭을 고려해 볼 때 제주마의 모색은 다양한 형태를 갖고 있었던 것을 알 수 있다. 1960년대 제주마 모색 빈도는 가라(흑모색, Black), 총마(회색, Gray), 적다(적색, Chestnut), 유마(적갈색, Bay), 율라(얼루기, 백반, Tobiano)의 빈도는 각각 7.3%, 13%, 30.5%, 42.7%, 0.3%로 유마와 적다 모색 빈도가 높은 것으로 조사된 바 있으며(Lee, 1971), 1990년대에는 각각 5.5%, 10.1%, 34.9%, 29.4%, 7.3%로 조사되었고(남, 2003), 2011년에는 각각 0.16%, 60.2%, 10.8%, 16.5%, 10.9%로 보고된 바 있다(국립축산과학원, 2012). 가라, 적다, 유마 모색은 과거보다 비율이 감소하는 경향을 보이며, 총마 모색은 급격히 증가하여 제주마의 모색 빈도가 크게 변화된 것으로 나타났다. 제주마의 모색 다양성이 감소하게 되면 낮은 빈도의 모색은 점차 소실되어 제주마의 다양한 모색 특성은 없어지게 될 것이다. 한번 소실된 모색을 복원하기 위해서는 많은 시간과 경제적 비용을 지불할 우려도 있다.

말에서 백반이 나타나는 모색은 백반 형태에 따라 말의 몸통에 불규칙적이고

비대칭적인 백반이 나타나는 토비아노(Tobiano)와 오베로(Overo)가 있으며, 반점이 대칭 형태로 나타나는 호반(Leopard) 또는 아팔루사(Appaloosa)로 구분된다. Standardbred, Thoroughbred, Arabian, Quarter horses는 Tobiano 모색이 없으며, Paint, Pinto 등에서는 이런 Tobiano 모색을 갖는다(Thiruvankadan 등, 2008). 이런 백반 모색은 마필 생산자나 소비자들이 선호하는 경향을 보이고 있다. 미국에서는 1960년 American Paint Horse Association을 설립하여 약 35만두의 백반 모색을 갖는 말을 등록 관리하고 있다(Brooks 등, 2002). 국내에서도 백반을 갖고 있는 마필에 대한 소비자들의 선호도가 높아 단색인 마필보다 거래 가격이 높게 형성되고 있는 실정이다. 제주마에서 나타나는 율라모색은 말 모색유전학에서 구분하는 토비아노(Tobiano), 오베로(Overo), 사비노(Sabino) 형태 중 어떤 형태에 속하는지 찾을 수 없었다. 따라서 제주마 백반 모색에 대한 분자 유전학적 연구를 통해 제주마 백반 모색에 대한 유전학적 정립이 필요하다.

본 연구는 국내 유일의 재래마인 제주마의 모색 분포 특성과 얼루기(백반) 모색에 대한 분자 유전학적 특성 구명으로 제주마의 모색 정립 및 모색 다양성 확보와 보존을 위한 기술 개발과 기초자료 확보를 위해 수행되었다.



## II. 연구사

### 1. 포유류의 모색 관련 melanin 생합성 연구

포유류의 모색은 모색 관련 유전자에 의해 결정되며 이런 유전자의 돌연변이는 모발, 피부, 눈의 착색에 영향을 준다. 현재까지 마우스에서 알려진 모색 표현형은 800개 이상이며 관련 유전자는 127개로 보고되고 있다. 이 유전자 중 59개는 클로닝 되어 염기서열 분석 연구가 진행되었다(Bennett과 Lamoreux, 2003).

포유류의 모색은 피부나 털에 멜라닌 색소의 존재 여부에 따라 여러 가지 양상을 나타낸다. 모색을 결정하는 두 가지 색소인 eumelanin (black/brown)과 pheomelanin (yellow/ red)의 생합성에 대한 효소활성과 이들 색소가 침착되는 색소세포(melanocyte)의 분포에 따라 결정된다. 색소세포의 분포는 배 발생단계(embryogenesis)에서 색소세포(melanocyte)의 이주에 따라 결정된다. Melanin이 합성되기 위해서는 melanin 생합성을 조절하는 신호전달자와 수용체(*MC1R*, *ASIP*, *MITF* 등)의 작용, melanin의 생합성(*TYP*, *TYRP1*, *DCT*), 생성된 melanine의 저장체인 melanosome의 생성(*SILV*, *AP3* 등)과 이동(*MYO5A*, *RAB27A* 등) 등 여러 단계를 거쳐 모색으로 표현된다(Mackenzie 등, 1997; Sulaimon과 Kitchell, 2003; Thiruvankadan 등, 2008).

Melanin 색소를 생합성하는 melanocyte는 배발생 단계 중 낭배 형성 시에 neural crest (신경릉, 神經稜)에서 형성된 melanoblast로부터 분화된다(Thomas와 Erickson, 2008). Neural crest cell은 조직이 형성될 위치로 이동하여 말초신경 세포, 내분비세포, 골격, 연골, 결합조직과 melanocyte 등 다양한 조직 및 세포로 분화된다(Anderson, 2000). Neural crest에서 형성된 melanoblast는 복면(腹面)을 향해 배측면(背側面)을 따라 이동한다. 포유류에서는 대다수의 melanoblast가 표피층으로 침투해 들어가며, 표피층에서 증식하여 전체 피부에 분포된다(Steel 등, 1992; Wilkie 등, 2002). 이런 melanoblast의 분화와 이동에는 *PAX3*, *SOX10*,

*MITF*, *Endothelin 3*, *EDNRB*, *KIT* 등의 유전자들이 관여한다(Jennifer와 David, 2007).

Melanin 색소는 melanocyte 내에 존재하는 작은 소포체인 melanosome에서 합성된다. Melanosome에는 갈색과 흑색 색소를 합성하는 eumelanosome과 적색과 황색을 합성하는 pheomelanosome 2종류가 있다. 색소를 함유하고 있는 melanosome은 세포 중앙에서 microtubules의 도움으로 세포 외곽으로 이동하여 exocytosis를 통해 멜라닌 색소를 방출한다. eumelanin과 pheomelanin 두 색소는 tyrosine으로부터 합성이 시작된다. Tyrosine은 tyrosinase에 의해 3,4-dihydroxy-phenylalanine (DOPA)으로 변환된 후 다시 dopaquinone으로 변환된다. Eumelanin 합성을 위해서는 dopaquinone이 dopachrome으로 전환된 후 2가지 경로로 진행될 수 있으며 이 두 경로에서 *TYRP1*에 의해 quinones 복합체를 형성하여 eumelanin이 합성된다. pheomelanin 합성을 위해서는 dopaquinone이 2-S-cysteinyl-dopa와 5-S-cysteinyl-dopa로 전환되며 이들은 다른 중간 단계를 거쳐 pheomelanin을 합성한다(Jackson, 1994; Thiruvankadan 등, 2008).

## 2. 말의 모색관련 분자유전학적 연구

말의 모색명칭은 모색 및 형태 또는 혼합 형태에 따라 기본모색, 희색모색 그리고 백반모색으로 나뉜다(Table 1). 기본모색(basic coat color)은 흑색(Black), 적갈색(Bay), 적색(Chestnut) 그리고 회색(Gray)으로 분류되며, *Extension* (*E*), *Agouti* (*A*) 및 *Gray* (*G*) 유전자의 상호작용에 의해 발현된다. 희색모색은 *Cream* (*C*), *Dun* (*D*), *Champagne* (*CH*)과 *Silver* (*Z*)로 분류되며, 백색 패턴과 관련된 유전자는 *White* (*W*), *Roan* (*RN*), *Tobiano* (*TO*), *Overo* (*O*), *Leopard Spotting* (*LP*)으로 분류된다(Bowling, 2000).

말의 모색과 관련된 유전자 중 *Extension* (*E*)과 *Agouti* (*A*) 좌위에 대한 연구가 활발히 진행되었다. *Melanocortin-1-receptor* (*MC1R*)와 *agouti signaling protein* (*ASIP*)은 *Extension* (*E*)과 *Agouti* (*A*) 좌위에 암호화되어 있다. *Melanocortin-1-receptor* (*MC1R*)는 말에서 chestnut 모색에 대해 major candidate gene으로 single missense mutation (83Ser → Phe)이 연관되어 있다 (Marklund 등, 1996). *Extension* 좌위의  $E^+$ 와  $E^e$ , 두 개의 대립인자는 *MC1R*의 유전적 변이 중 g.901C>T 염기치환에 의해 결정되며, 적색(Chestnut) 또는 흑색(Black)/적갈색(Bay) 모색을 결정하는 주요 유전자로 알려져 있다. 우성 대립인자인  $E^+$ 는 eumelanin 합성과 침착을 통해 흑색 또는 갈색을 발현한다. 반면, 열성 대립인자인  $E^e$ 는 eumelanin 생합성이 결핍되고 pheomelanin만을 생합성하여 적색 또는 황색 계열 모색을 발현한다(Marklund 등, 1996; Rieder 등, 2001). 반면, *A* 좌위는 *ASIP* exon 2에서 11-bp 절편의 삽입/결실 돌연변이(insertion/deletion mutation)에 의해 결정되며, *MC1R*과 상호 길항작용을 통해 흑모색의 발현을 2차적으로 조절하게 된다(Rieder 등, 2001).

*Gray* (*G*) 유전자에 의해 나타나는 말의 표현형은 생시에는 유색으로 나타나나 점진적으로 모발이 탈색되기 시작하여 6~8세에는 백모색으로 변하게 된다. *Gray* (*G*) 유전자에 의한 백모색은 *White* (*W*) 유전자에 의한 백모색과는 다른 유전 양상을 갖는다(Haase 등, 2007; Pielberg 등, 2008; Pulos과 Hutt, 1969). 회색마의 표현형은 우성 *G*와 열성 *g* 대립인자의 유전자형에 따라 발현이 결정된다. 개체에

따라 백모색, 회색, 회색 반점 등 다양한 형태로 발현되며 *Gray (G)* 유전자 외에 다른 유전자가 관여하는 것으로 추정하고 있다(Pielberg 등, 2005; Pielberg 등, 2008). 회색마의 표현형은 *STX17 (syntaxin17)* 유전자의 intron 6번에 4.6-kb duplication에 의한 것으로 보고되었으며, *STX17*의 mutation에 의해 melanosome 생산이나 운반이 변하게 되어 착색에 영향을 주는 것으로 추정하였다(Pielberg 등, 2008).

말에서 백색을 기본으로 하는 모색에는 백색 털이 혼재된 모색인 Gray, Roan, White과 말의 몸통에 백반이 있는 형태로 구분된다. 백반 형태는 말의 몸통에 불규칙적이고 비대칭적인 백반이 나타나는 Tobiano와 Overo가 있으며, 반점이 대칭 형태로 나타나는 Leopard 또는 Appaloosa로 구분된다. Tobiano의 일반적인 형태는 네 다리의 구절(球節) 아랫부분이 백색이고 보통 귀부터 꼬리 사이의 등선을 가로지르는 백반을 갖는다(Thiruvankadan 등, 2008). Overo는 frame Overo, Sabino, Splashed white 3가지로 분류되며, Overo 모색의 백반 특징은 톱니 모양의 백반이 복부에서 시작되며, 다리의 백색은 사지백, 삼지백 등 다양하게 나타난다(Metallinos 등, 1998).

Tobiano와 Overo 같은 백반 모색의 원인을 찾기 위한 분자유전학적 연구들이 수행되었다. Tobiano 모색의 원인에 대해 *albumin-b (ALB-B)*와 *vitamin D binding factor-S (Fc-S)*와의 연관성(Bowling, 1987)과 *KIT* 유전자 intron 13번 내 염기치환에 대한 연관성이 보고되었다(Brooks 등, 2002). 최근에 Tobiano 형태를 갖는 말에서 3번 염색체의 inversion을 확인하였으며(Brooks 등, 2007), ECA3-inversion 분석을 통해 German horse breeds에서 Tobiano와 연관이 있는 것을 확인하였다(Haase 등, 2008). Metallinos 등(1998)은 *endothelin-B receptor (EDNRB)* 유전자의 missense mutation이 frame Overo의 Lethal White Foal Syndrome과 연관이 있는 것으로 보고하였으며, Brooks와 Bailey (2005)는 *KIT* 유전자의 exon skipping이 말에서 Sabino 모색의 원인으로 보고하였다.

Table 1. Coat color genes and symbols of horses

color	Locus (symbol)	Alleles (symbol)
Gray	<i>Gray (G)</i>	<i>gray (G)</i>
		<i>not gray (g)</i>
Chestnut	<i>Extension (E)</i>	<i>eumelanin (E)</i>
		<i>phaeomelanin (e)</i>
Bay/black	<i>Agouti (A)</i>	<i>bay (A)</i>
		<i>black (a)</i>
Palomino/buckskin/ cremello/perlino	<i>Cream (C)</i>	<i>color dilution (C<sup>cr</sup>)</i>
		<i>full color (C)</i>
Dun	<i>Dun (D)</i>	<i>color dilution (D)</i>
		<i>full color (d)</i>
Champagne	<i>Champagne (CH)</i>	<i>color dilution (CH)</i>
		<i>full color (ch)</i>
Silver	<i>Silver (Z)</i>	<i>color dilution (Z)</i>
		<i>full color (z)</i>
White	<i>White (W)</i>	<i>white (W)</i>
		<i>full color (w)</i>
Roan	<i>Roan (RN)</i>	<i>roan (RN)</i>
		<i>not roan (rn)</i>
Tobiano	<i>Tobiano (TO)</i>	<i>tobiano (TO)</i>
		<i>not tobiano (to)</i>
Overo	<i>Overo (O)</i>	<i>overo (O)</i>
		<i>not overo (o)</i>
Leopard spotting	<i>Leopard</i>	<i>leopard spotting (LP)</i>
	<i>Spotting (LP)</i>	<i>not leopard spotting (lp)</i>

### 3. 제주마의 모색 연구

제주마의 모색 명칭은 구전으로 전해 오다가 Lee (1971)에 의해 1960년대 제주마 모색의 전통 분류 명칭과 모색 빈도를 보고하였다. Lee (1971)는 제주마 모색을 12개로 대분류하였으며, 40여 종으로 세분류하였다. 12개 대분류 모색은 가라, 유마, 총마, 적다, 월라, 고라, 공골말, 백마, 부루, 자홀, 거홀, 범마로 분류하였다. 가라 모색은 전신 흑모색으로 유전학적으로는 Black에 해당되고, 유마는 몸통은 갈색이고 다리, 꼬리, 갈기가 흑색으로 Bay에 해당되는 것으로 보고하였다. 적다는 전신이 적색인 Chestnut, 총마는 회색으로 Gray에 해당되며, 월라는 원모색에 백색 횡반이 나타나는 것으로 보고하였다(Figure 1). Lee (1971)는 제주마에서 나타나는 백반 모색은 백색 횡반이 있는 것으로 서양의 Piebald~Skewbald와 일치한다고 하였으며, 기본 모색인 가라, 유마, 적다 모색에 백반이 있는 경우 가라월라, 유마월라, 적다월라로 구분하였다. Figure 2에는 제주마의 다양한 월라 모색을 나타내었다. A와 B는 적다월라로 확인되나 A는 유색과 백반의 경계면이 Overo 모색의 특징처럼 톱니 모양으로 형성되었으나 B는 전형적인 Tobiano 형태를 보였다. C는 월라 모색과 총마 모색이 동시에 발현된 형태로 추정되며, D는 월라 백반이 몸통 일부에서만 발현되는 형태를 보여 제주마 월라 모색의 형태가 다양한 것으로 나타났다.

김 등(2011)은 제주마의 기본 모색인 가라, 유마, 적다의 모색 표현형이 *MC1R*과 *ASIP* 유전자형 조합에 따른 발현 양상을 보고하였다. 제주마의 가라모색은 *MC1R*과 *ASIP* 유전자형 조합이  $E^+E^+A^aA^a$ 와  $E^+E^cA^aA^a$  형태로 나타나고, 유마는  $E^+E^+A^AA^A$ ,  $E^+E^cA^AA^A$ ,  $E^+E^+A^AA^a$ ,  $E^+E^cA^AA^a$  형태로 나타나는 것으로 보고하였다. 또한 적다는  $E^cE^cA^AA^A$ ,  $E^cE^cA^AA^a$ ,  $E^cE^cA^aA^a$  형태로 *ASIP* 유전자형에 상관없이 *MC1R* 유전자형이  $E^c$  동형접합체에서 나타나는 것으로 보고하였다.

제주마에서 회색과 관련된 모색은 총마에 해당되며 유색이 기본 모색이나 백모발이 혼재되어 있다. 총마 모색은 점차 모색이 퇴색되어 최종적으로 백화(whitening) 된다. 제주마의 모색 전통 분류에서 총마는 청총, 먹총, 보통총, 누룩총, 백총, 개파리총으로 세분류한 바 있다(Lee, 1971). Han 등(2009)은 제주마 총마의 유전특성 확인을 위해 *STX17* 유전자의 다형성을 보고하였다. 제주마에서 총마를

발현하는 개체는 *STX17* 유전자의 *G* 유전인자를 갖는 것으로 확인하였으며, 가계분석 결과 제주마 총마 모색은 멘델유전 양상을 보이는 것으로 보고하였다.

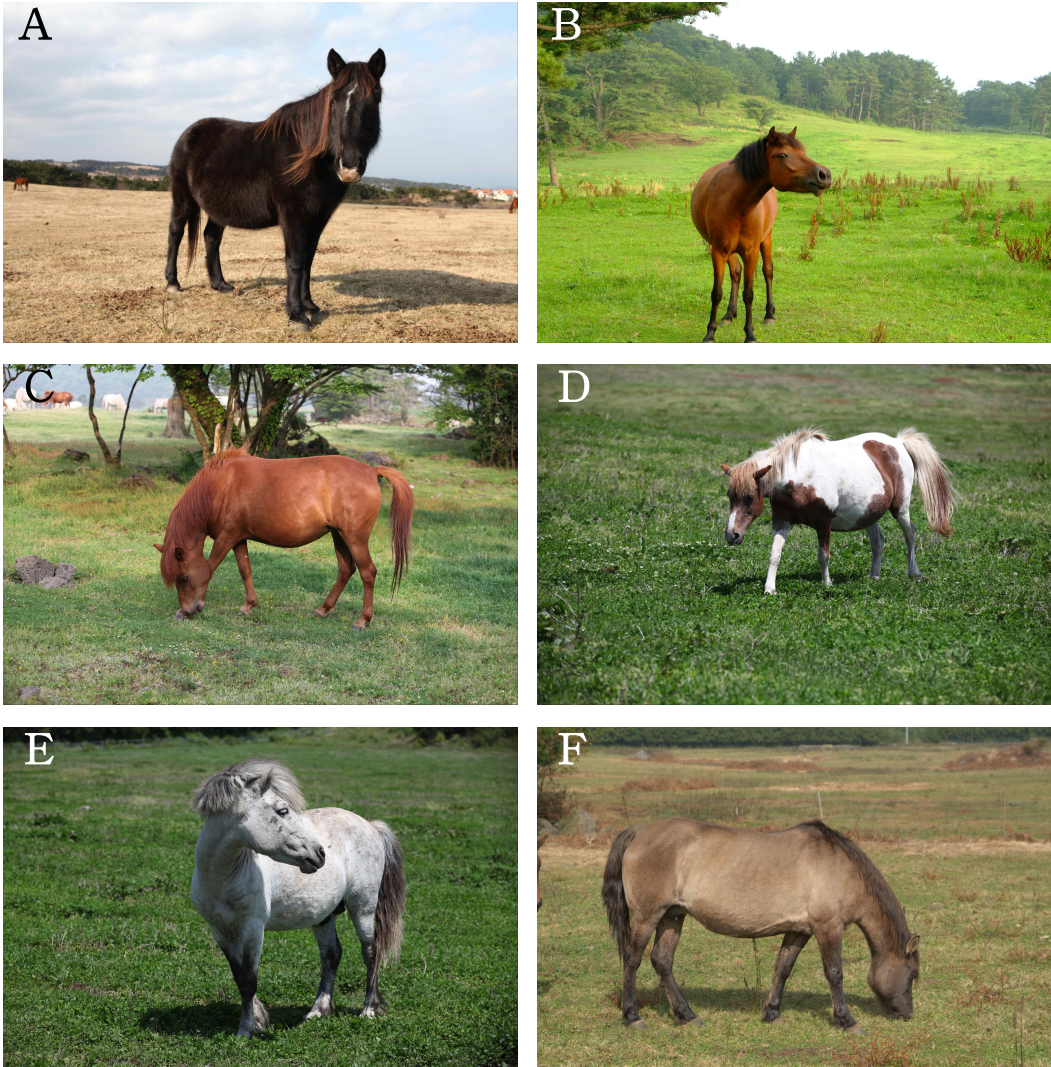


Figure 1. Various coat colors in Jeju horses. A (Black), B (Bay), C (Chestnut), D (Tobiano), E (Gray), F (Dun)



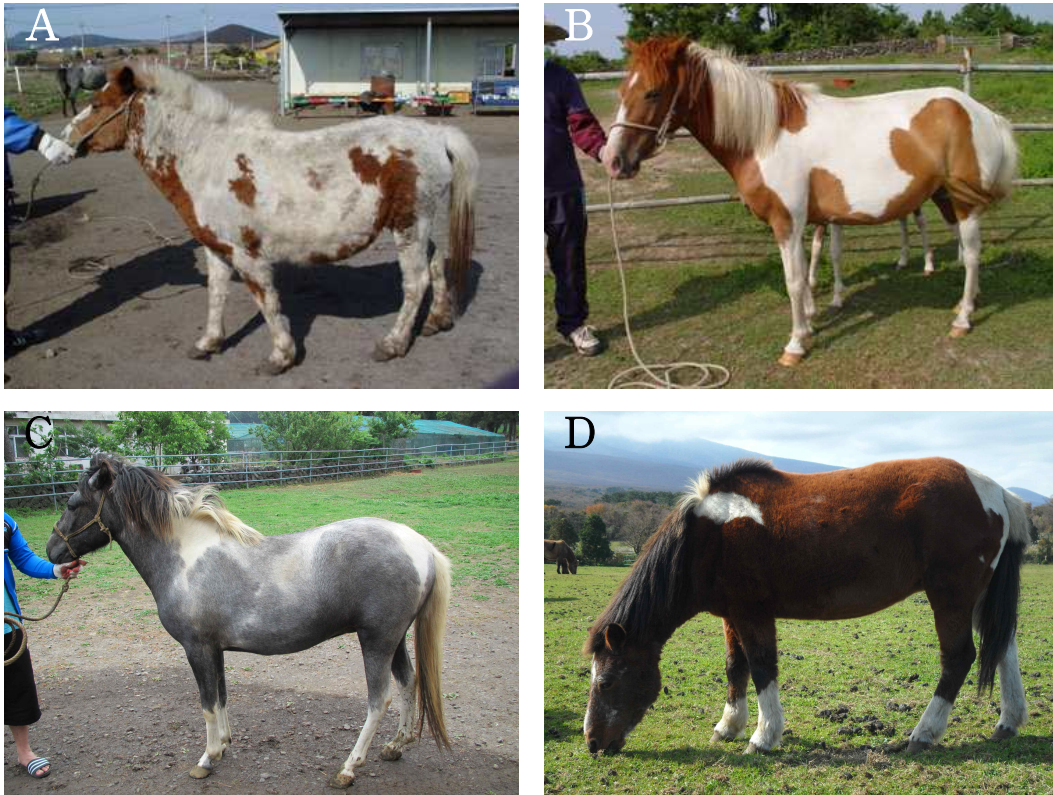


Figure 2. Phenotypes of Wolla (white patch) coat color in Jeju horses. Various patterns in shape and proportion of white patch on the trunk.

#### 4. 가축에서 Genome Wide Association Study (GWAS) 분석법의 이용

Human Genome Project (HGP)의 완성은 유전체 연구에 대한 상당한 진보를 가져왔다. HGP 과정에 의해 다양한 분석 방법론과 분석 기술이 개발돼 왔다. HGP 완료에 의한 결과물인 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) arrays를 이용한 GWAS 분석으로 인간 질환의 원인이 밝혀지기 시작하였다. GWAS 분석 이전에는 genome wide 수준에서 중요한 경제형질의 유전 변이를 검출하기 위해 QTL mapping 방법이 이용되었다. 현재까지 수 천 개의 QTL이 보고돼 왔으나 map resolution이 낮은 microsatellite를 이용함에 따라 형질의 주요 유전자를 검출하기 어려웠다. GWAS는 전통적인 QTL mapping 방법과 비교시 가장 효율적으로 원인 변이를 검출할 수 있으며, 원인 변이의 유전체 범위를 가장 좁게 줄일 수 있는 장점이 있다(Hirschhorn과 Daly, 2005). 또한 GWAS는 complex traits의 주요 유전자를 찾는 유효한 기술이며, complex traits의 유전 기작을 연구하는 새로운 방법이다. GWAS 분석 방법은 SNPs가 중요한 형질의 원인 돌연변이와 linkage disequilibrium (LD) 관계에 있는 경우 유의적 연관관계를 찾아 유전체내 원인 돌연변이의 위치를 확인하는 방법이다.

가축에서 GWAS 분석 방법을 통해 종의 진화, 가축화, 품종 형성 및 집단 유전학 분야에 새로운 연구 결과를 제시할 수 있으며, complex traits의 유전적 메커니즘을 분석할 수 있다. 또한 가축의 생산성 관련 유전형질을 개량하기 위한 선발 방법에도 이용할 수 있다. 소, 돼지, 닭, 말 등 가축에서 SNP chip이 개발되어 GWAS 분석을 통해 양적형질의 유전적 특성에 대한 연구가 진행되었다.

소에서는 경제적으로 중요한 형질인 유량, 유질, 수정률, 성장, 육질, 도체형질 등이 보고되었다(Bolormaa 등, 2010; Hayes 등, 2009; Jiang 등, 2010; Mai 등, 2010). 유량과 관련된 유의성 있는 734개 SNP는 소의 염색체 8, 9, 10, 11, 13, 25, 29번에서 확인됐고, *DGATI* 유전자는 유의성 있는 SNP 인접 지역에 위치하고 있었다. 지방산 조성, 유단백, 유지율 같은 유질과 관련된 형질에 대한 GWAS 분석 결과 *ABCG2*, *PPAGCIA*, *ACSS2*, *DGATI*, *ACLY*와 같은 유전자들이 확인되었다. 또한 수정률 같은 번식형질에 대한 GWAS 분석 결과 *collagen*

*type 1 alpa 2*와 *integrin beta 5* 유전자가 보고되었다. 또한 소의 도체형질에서 근내 지방도와 관련된 SNP는 87개가 보고됐으며, 배최장근과 관련된 SNP 127개가 보고되었다.

돼지에서는 번식, 체형, 도체형질 및 모색에 대해 보고되었다(Duijvesteijn 등, 2010; Fan 등, 2011; Grindflek 등, 2011a; Grindflek 등, 2011b; Ponsuksili 등, 2011; Ramos 등, 2011; Ren 등, 2010; Sironen 등, 2010). GWAS 분석을 통해 돼지의 도체형질 중 후보 유전자로 이전에 알려진 *MC4R* (등지방)과 *IGF2* (배최장근 단면적) 외에 새로이 등지방과 관련된 *CHCHD3*와 배최장근 단면적과 관련된 *BMP2* 유전자가 보고되었다.

닭에서는 비육, 체중, 성장률, 난생산 및 난질에 관한 보고가 있었으며(Abasht 등, 2007; Gu 등, 2011; Liu 등, 2011; Xie 등, 2012), 양에서는 뿔의 형태와 구루병에 대한 보고가 있었다(Johnston 등, 2011; Zhao 등, 2011).

말에서는 경주능력, 왜소증, 질병, 승용능력 및 체형에 대한 GWAS 연구 결과가 보고되었다(Brooks 등, 2010; Dupuis 등, 2011; Hill 등, 2010a; Hill 등, 2010b; Meira 등, 2014; Orr 등, 2010; Signer-Hasler 등, 2012; Tetens 등, 2013). 말에서 경주 거리와 관련된 것으로 보고된 18번 염색체 상의 *MSTN* 유전자로부터 690 kb 떨어진 지역에서 가장 유의성 있는 SNP가 보고되었으며, 말의 질병과 관련된 Dwarfism, Lavender Foal Syndrome과 Recurrent Laryngeal Neuropathy에 대한 보고가 있었다.

가축에서 이런 중요한 경제형질에 대한 연구가 진행되어 질적 형질 및 양적 형질의 원인 유전자 탐색이 가능하게 되었고 주요 형질의 개량을 위한 효과적인 방법을 제시하였다.

### Ⅲ. 재료 및 방법

#### 1. 공시동물

##### 1) 제주마, 더러브렛, 교잡종(제주마×더러브렛)

말 종류별 모색 특성 및 모색관련 유전자형의 집단 특성 분석을 위해 제주마와 농가에서 사육되고 있는 교잡마 및 더러브렛을 이용하였다. 제주마는 제주특별자치도 축산진흥원에서 등록 관리되고 있는 등록제주마 1,465두에 대한 DNA 시료를 분양받아 분석에 이용하였으며, 교잡마 228두와 더러브렛 119두는 한국마사회에서 전혈 형태로 확보하여 분석에 이용하였다.

##### 2) 백반(얼루기, 율라) 모색 분석

제주마의 율라 모색 특성을 분석하기 위해 제주마 1,465두 중 모색 표현형이 율라로 확인된 142두와 비율라 모색 234두를 분석에 이용하였다. 또한 율라 모색의 유전 양상 및 GWAS 분석을 위해 농촌진흥청 국립축산과학원 난지축산연구소에서 사육 중인 crossbred horses (Jeju horse × Thoroughbred) 승용마 165두를 분석에 이용하였다. 또한 Candidate gene association 분석을 위해 165두 외에 35두를 추가로 분석하였다.

## 2. Genomic DNA 분리 및 중합효소연쇄반응

### 1) Genomic DNA 분리

전혈에서 Genomic DNA 분리를 위해 G-DEXTM Iib Genomic DNA extraction kit (iNtRON BIOTECHNOLOGY, Korea)을 이용하였다. 경정맥에서 채혈한 전혈 5 ml을 RBC Lysis buffer 15 ml과 혼합하여 적혈구를 용해하여 2,000g에서 5분간 원심분리 후 상층액을 제거하였다. 다시 RBC Lysis buffer 5 ml을 이용하여 적혈구 용해를 2회 반복하여 백혈구를 회수하였다. 회수된 백혈구에 Cell lysis buffer 5 ml를 넣어 혼합 후 Protein Precipitation (PPT) buffer 1.6 ml를 넣어 20초간 교반 후 2,000g에서 5분간 원심분리하여 단백질을 침전시켰다. 단백질이 침전된 상층부를 isopropanol 5 ml가 들어있는 15 ml tube에 넣어 반전시킨 후 2,000g에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. DNA가 침전된 tube에 70% EtOH 5 ml를 넣어 반전한 후 다시 2,000g에서 5분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하여 실온에서 10~15분간 건조하였다. 건조된 DNA에 DNA Rehydration buffer 1 ml를 첨가하여 DNA를 용해하였다. 용해된 DNA는 NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA)로 흡광도를 측정하여 A260/A280 1.8 이상인 DNA 시료를 100 ng/ $\mu$ l로 희석하여 PCR 증폭을 위한 주형으로 이용하였다.

### 2) 중합효소연쇄반응

모색관련 유전자의 유전자형 결정을 위해 분리한 DNA를 주형으로 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 통해 유전자의 절편을 증폭하였다. PCR 반응은 1× reaction buffer, 20 mM dNTP, 각각의 유전자별 10 또는 7.5 pmol primer, 0.5 또는 0.75 units HS Prime Taq DNA Polymerase (GENETBIO, Korea), 25~50 ng genomic DNA를 혼합하였다. 유전자의 신장은 DNA Engine Tetrad 2 (Bio-Rad, USA)를 이용하여 94 °C 5분 초기 변성 후,

94 °C 30초간 변성, 각 primer 별 적정 결합 온도에서 30 또는 40초, 72 °C 30 또는 45초 신장 반응으로 구성된 연쇄반응을 31~41회 반복한 후 최종 5분간 신장하였다 (Table 2).

### 3. 모색 유전자형 결정

#### 1) Pyrosequencer를 이용한 모색 유전자형 결정

제주마 집단의 모색 특성을 확인하기 위해 기본모색(가라, 유마, 적다), 백반(월라) 및 회색(총마) 모색과 관련된 *MC1R*, *ASIP*, ECA3-inversion과 *STX17* 유전자의 유전자형을 결정하였다. 말에서 알려진 *Extention (E)* 좌위와 *Agouti (A)* 좌위는 기존에 보고된 *MC1R* g.901C>T 염기치환과 *ASIP* exon 2의 11-bp 절편의 삽입/결실 돌연변이(insertion/deletion mutation)의 유전자형 결정 위해 Pyrosequencing 방법을 이용하였다(Rieder 등, 2001; 김 등, 2011). 제주마에서 백반(월라) 모색이 Tobiano, Overo, Sabino 형태 중 어떤 형태에 속하는지를 확인 하기 위해 Overo와 관련 있는 *EDNRB* 유전자 exon 1의 2bp 염기치환 (TC/AG)과 Sabino와 관련 있는 *KIT* intron 16의 1037bp 위치의 T/A 염기변이 (Brooks와 Bailey, 2005; Metallinos 등, 1998)의 유전자형을 결정하였다. 또한 *GPRIN3*의 6개 SNPs, BIEC2-819509 SNP, 그리고 *TIGD2*의 1개 SNP에 대해 Pyrosequencing 방법을 이용하여 유전자형을 결정하였다.

Streptavidin Sepharose HP beads 3  $\mu$ l와 2 × PyroMark binding buffer (Qiagen, Germany) 37  $\mu$ l를 round bottom plate에 분주 후 biotin이 결합된 PCR product 20  $\mu$ l와 증류수 20  $\mu$ l를 각각 분주하여 총 80  $\mu$ l로 혼합하였다. 혼합물이 있는 plate를 1,400rpm으로 5분간 shaking 하여 PCR product를 bead에 부착하였다. 부착된 PCR product는 vacuum을 이용하여 filter probes에 흡착하고, 변성, 세척하여 준비하였다. filter probes에 흡착되어 있는 bead가 결합된 주형 DNA를 pyrosequencing 용 primer (10 pmol/ $\mu$ l) 1.2  $\mu$ l와 annealing buffer (Qiagen, Germany) 40  $\mu$ l가 혼합된

plat에 떨균 후 80℃로 2분간 가열하여 sequencing 용 primer를 주형 DNA에 annealing 하여 실온에서 냉각하였다. 준비된 반응물은 PyroMark Gold Reagents (Qiagen, Germany)를 이용하여 PyroMark Q96 ID (Qiagen, Germany) pyrosequencer로 유전자형을 분석하였다.

## 2) 자동전기영동 장치를 이용한 유전자형 결정

ECA3-inversion과 *STX17* 유전자형 분석을 위해 Table 2의 각 프라이머를 이용하여 PCR 증폭하였다. 각각의 PCR 증폭 산물은 QIAxcel Advanced (Qiagen, Germany) 자동전기영동 장치로 유전자형을 결정하였다.

QIAxcel Advanced 자동전기영동 장치의 buffer tray WP 위치에 wash buffer 8 ml와 mineral oil 2 ml을 넣고, BUF 위치에 separation buffer 18 ml와 mineral oil 4 ml을 넣었다. MARKER1 위치에 있는 0.2 ml tube 각각에 QX Alignment Marker (Qiagen, Germany) 15  $\mu$ l와 mineral oil 1 방울을 넣었다. PCR 증폭 산물은 0.2 ml plate에 15  $\mu$ l를 분주하였으며, QX DNA Size Marker FX174/HaeIII (Qiagen, Germany) 2  $\mu$ l와 DNA dilution buffer 18  $\mu$ l를 혼합하여 1 방울의 mineral oil을 분주하였다. PCR 증폭 산물과 size marker를 QIAxcel Advanced (Qiagen, Germany) 자동전기영동 장치에 장착하여 QIAxcel DNA High Resolution Kit (Qiagen, Germany)에 각 PCR 증폭 산물을 분주하여 전기영동을 수행하였다.

## 4. 토비아노(Tobiano) 모색 관련 후보 유전자 DNA 염기서열 결정

GWAS 분석 결과 말의 Tobiano 모색과 연관이 있을 것으로 추정되는 후보 유전자 *GPRIN3* (G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 3)와 *TIGD2* (Tigger transposable element derived 2)의 염기서열을 결정하였다. 분석에 이용된 DNA 샘플은 Tobiano 개체 5두, solid(단색) 개체 5두 그리고 Tobiano 개체 5두와 solid 개체 5두를 혼합하여 이용하였으며, *GPRIN3*와 *TIGD2* 유전자의 증폭

산물을 2~3K 단위로 주형을 복제한 후 내부에 primer를 제작하여 Direct sequencing에 이용하였다. 염기서열 분석은 BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems, USA) 반응 후 ABI 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 확인하였다. 염기서열 결정된 DNA 서열들은 GenBank Database 상에서 기존에 보고된 서열들과의 유사도 및 염기 변이를 조사하였다.



Table 2. Primer sequences used in this study

Target		Primer Sequence (5'→3')	PCR annealing Tem (°C)	PCR cycles
<i>MC1R</i> g.901C>T	Forward	CTGCACTCACCCATGTACTACTTC	55	35
	Reverse	CCTCCAGCAGCAGCAAGAT <sup>†</sup>		
	<sup>1</sup> Sequencing	CTGCTGCCTGGCCGT		
<i>ASIP</i> ex2 11-bp deletion	Forward	GGGGGAAAAGACCAGAAACA	58	35
	Reverse	CATGTAGGCCTGAAAAATCCTT <sup>†</sup>		
	<sup>1</sup> Sequencing	AAATCCAAAAAGATCAGC		
ECA3-inversion	ECA3F	TGATAGATCAGTGTAGACGTAGTGTGACAGAGAC	68	31
	ECA3toR	TCACCACAGAGTATCCAATTATGTCTTTCACATAATGC		
	ECA3xR	AACAGCTACTCCCCTCTAGCATAGGTTT		
<i>STX17</i> intron 6 4.6-kb duplication	eqSTX17F	GAGCCTGTTTCTGCTTATGCTTCTCTTAGGT	F+R 56 gF+R 58	41
	eqSTX17R	GAAGCAGAAAGCATCCTTGCAGTAATTGTT		
	eqSTX17gF	ACCAAAGGTTGTGCCCTTAATCCTATCATA		
<i>EDNRB</i> missense mutation	Forward	AGTAGTGTCCCTGCCTAGTGTTCG <sup>†</sup>	56	35
	Reverse	GATATTAGGGCCGTTCCGC		
	<sup>1</sup> Sequencing	TCAGCAGTGTGGAGTTT		
<i>KIT</i> intron 16 SNP	Forward	TTAAATGGCTTTCTTTTCTCCC <sup>†</sup>	56	35
	Reverse	GGATATTTCTGGCTGCCAAGTC		
	<sup>1</sup> Sequencing	CTATGAATACACTATTAGGA		
<i>GPRIN3</i> c.1114G>A	Forward	ACACGTTGGAGCTATCTG	55	35
	Reverse	GGGCTCACTGATTGACTT <sup>†</sup>		
	<sup>1</sup> Sequencing	GAGCTATCTGACAACACC		

<sup>†</sup> 5'-end biotinylated.

<sup>1</sup> Genotyping primers for pyrosequencing.

Table 2. (Continued)

Target		Primer Sequence (5'→3')	PCR annealing Tem (°C)	PCR cycles
<i>GPRIN3</i> c.1226C>T	Forward	TTCCAAGGAGAAAGTCAA†	55	35
	Reverse	AGGGTGGATGAGGTTTTA		
	<sup>1</sup> Sequencing	TTTAAGGACCTCAGCC		
<i>GPRIN3</i> c.1388C>T	Forward	AAGAGCCCACCTCTAAAC†	55	35
	Reverse	GTCCCCACTGAGAGAAAT		
	<sup>1</sup> Sequencing	CCACTGAGAGAAATCTGG		
<i>GPRIN3</i> c.1476G>A	Forward	ACCAAGTCGTCCGAGTTT†	55	35
	Reverse	TTTCTCTCGCATCTCCTT		
	<sup>1</sup> Sequencing	TGTGGTCATTTGTGGTT		
<i>GPRIN3</i> c.1790G>A	Forward	ATCCCCAGTTAGAAGGAA	55	35
	Reverse	GGTTGTCTTGGTCTGTCT†		
	<sup>1</sup> Sequencing	GGGCGCCGTGGAAGAA		
<i>GPRIN3</i> c.*331A>G	Forward	GGCTTGTA AAACTATCATAAT	55	35
	Reverse	GTGTTTTTGCTAATAGTGTTAT†		
	<sup>1</sup> Sequencing	CATTTTGTATTACTGCCTC		
BIEC2-819509	Forward	TTAAATCGCAAAATTGGT†	55	35
	Reverse	ATTAGCTAAGAGGATTGTAAAT		
	<sup>1</sup> Sequencing	GGGTCAAGCAAAGGC		
TIGD2 c.*152G>A	Forward	GCCAAATACATTTTATAAATGAT	51	35
	Reverse	TCAATGCTCATTTACTAGAGTT†		
	<sup>1</sup> Sequencing	TTTTGGATTACTGGAATTA		

† 5'-end biotinylated.

<sup>1</sup> Genotyping primers for pyrosequencing.

## 5. Equine SNP Chip genotype assay

말의 토비아노(Tobiano) 모색 유전 양상에 대한 GWAS 분석을 위해 EquineSNP50 BeadChip (Illumina, USA)을 이용하여 6만 5천 개의 SNP를 분석하였다. Figure 3은 SNP chip 분석을 위한 모식도를 나타내었다. MSA2 plate (Illumina, USA)에 MA1 (multi-sample amplification 1 mix) 20  $\mu$ l를 분주하고 4  $\mu$ l DNA (50 ng/ $\mu$ l) sample을 분주 후 0.1N NaOH 4 $\mu$ l를 넣어 DNA를 변성시켰다. MSA2 plate를 96-well cap mat로 밀봉하여 1,600 rpm에서 1분간 vortexing 후 280g에서 1분간 원심분리하였다. MSA2 plate를 실온 (22  $^{\circ}$ C)에서 10분간 배양 후 68  $\mu$ l의 MA2 (multi-sample amplification 2 mix) 용액을 넣어 중화시켰다. 샘플이 들어있는 MSA2 plate에 75  $\mu$ l의 MSM (multi-sample amplification master mix) 용액을 분주하고 96-well cap mat로 밀봉하여 10회 뒤집어 혼합한 후 280g에서 1분간 원심분리하였다. MSA2 plate를 Illumina Hybridization Oven (Illumina, USA)에서 20~24 시간 동안 37  $^{\circ}$ C로 배양하여 DNA 샘플을 증폭하였다. 배양이 완료된 MSA2 plate를 50g에서 1분간 원심분리 후 cap mat를 제거하여 50  $\mu$ l의 FMS (fragmentation solution)를 분주하여 DNA를 절단하였다. MSA2 plate를 96-well cap mat로 밀봉하여 1,600 rpm에서 1분간 vortexing 후 22  $^{\circ}$ C에서 50g로 1분간 원심분리하였다. 밀봉된 MSA2 plate를 37  $^{\circ}$ C heat block에서 1시간 동안 정지하였다. MSA2 plate를 22  $^{\circ}$ C에서 50g로 1분간 원심분리하여 cap mat를 제거 후 100  $\mu$ l의 PM1 (precipitation solution)을 분주하였다. 96-well cap mat로 MSA2 plate를 밀봉하여 1,600 rpm에서 1분간 vortexing 후 37  $^{\circ}$ C에서 5분간 배양하였다. MSA2 plate를 22  $^{\circ}$ C에서 50g로 1분간 원심분리하여 300  $\mu$ l의 100% 2-propanol을 분주 후 10회 반전하였다. propanol이 분주된 MSA2 plate를 4  $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하여 4  $^{\circ}$ C 3,000g로 20분간 원심분리 후 상층액을 제거하였다. pellet을 건조하기 위해 MSA2 plate를 뒤집어 실온(22  $^{\circ}$ C)에서 1시간 동안 건조하였다. 42  $\mu$ l의 RA1 (resuspension, hybridization, wash solution)을 DNA pellet이 있는 MSA2 plate에 분주하여 foil sealing 후 Illumina Hybridization Oven (Illumina, USA)에서 1 시간 동안 48  $^{\circ}$ C로 배양하여 DNA pellet을 재용해하였다. MSA2 plate를 1,800

rpm에서 1분간 vortexing 후 280g로 spin down 하였다. BeadChip Hyb Chamber (Illumina, USA)에 Hyb Chamber Gasket을 장착 후 200  $\mu$ l의 PB2 (humidifying buffer) 용액을 Hyb Chamber에 분주하였다. PB2 용액이 분주된 Hyb Chamber를 DNA 샘플이 BeadChip (Illumina, USA)에 분주되기 전까지 실온에 정치하였다. DNA 샘플을 변성하기 위해 MSA2 plate를 95 °C heat block에서 20분간 정치하였다. 280g로 MSA2 plate를 spin down 후 밀봉 foil을 제거하였다. BeadChip을 Hyb Chamber insert에 삽입 후 12  $\mu$ l의 DNA 샘플을 BeadChip 샘플 분주 위치에 분주하였다. Hyb Chamber insert를 Hyb Chamber에 장착 후 Hyb Chamber 뚜껑을 닫아 결합시켰다. Hyb Chamber를 48 °C로 설정된 Illumina Hybridization Oven에 넣어 회전을 시키면서 16~24시간 동안 배양하였다. 200 ml WB1 (wash solution) 용액이 들어 있는 wash rack에 wire handle을 장착하였다. Hyb Chamber에 들어있는 Hyb Chamber insert를 탈착 후 BeadChip을 제거하였다. BeadChip에 부착되어 있는 커버를 제거 후 wash rack에 장착하여 1분간 세척하였다. wash rack을 PB1 (wash buffer after hybridization) 용액이 들어있는 wash dish에 넣어 1분간 세척하였다. 세척이 완료된 BeadChip을 Flow-Through Chamber에 장착 후 44 °C로 설정된 Chamber Rack에 삽입하였다. 150  $\mu$ l의 RA1 용액을 Flow-Through Chamber에 분주하여 30분간 배양 과정을 6회 반복하였다. 각 BeadChip 염색용 XC1과 XC2 용액 450  $\mu$ l를 분주하여 10분간 배양 후 200  $\mu$ l의 TEM (two-color extension master mix) 용액을 분주하여 15분간 배양하였다. 450  $\mu$ l의 95% formamide/1 mM EDTA를 분주하여 1분간 배양하는 과정을 2회 반복하였다. Chamber Rack을 37 °C로 설정 후 LTM (labeling two-color master mix), XC3 (BeadChip 염색 용액), ATM (anti-stain two-color master mix) 용액을 각각 분주하여 배양하였다. 염색된 BeadChip을 PB1과 XC4 용액으로 세척 후 진공 상태에서 50~55분간 건조하였다. 준비된 BeadChip은 Illumina BeadArray Reader로 스캔하여 이미지화하였다. 스캔된 이미지는 Bead Studio v.3.0 (Illumina, USA)를 통해 각 SNP 별 대립유전자를 결정하였다.

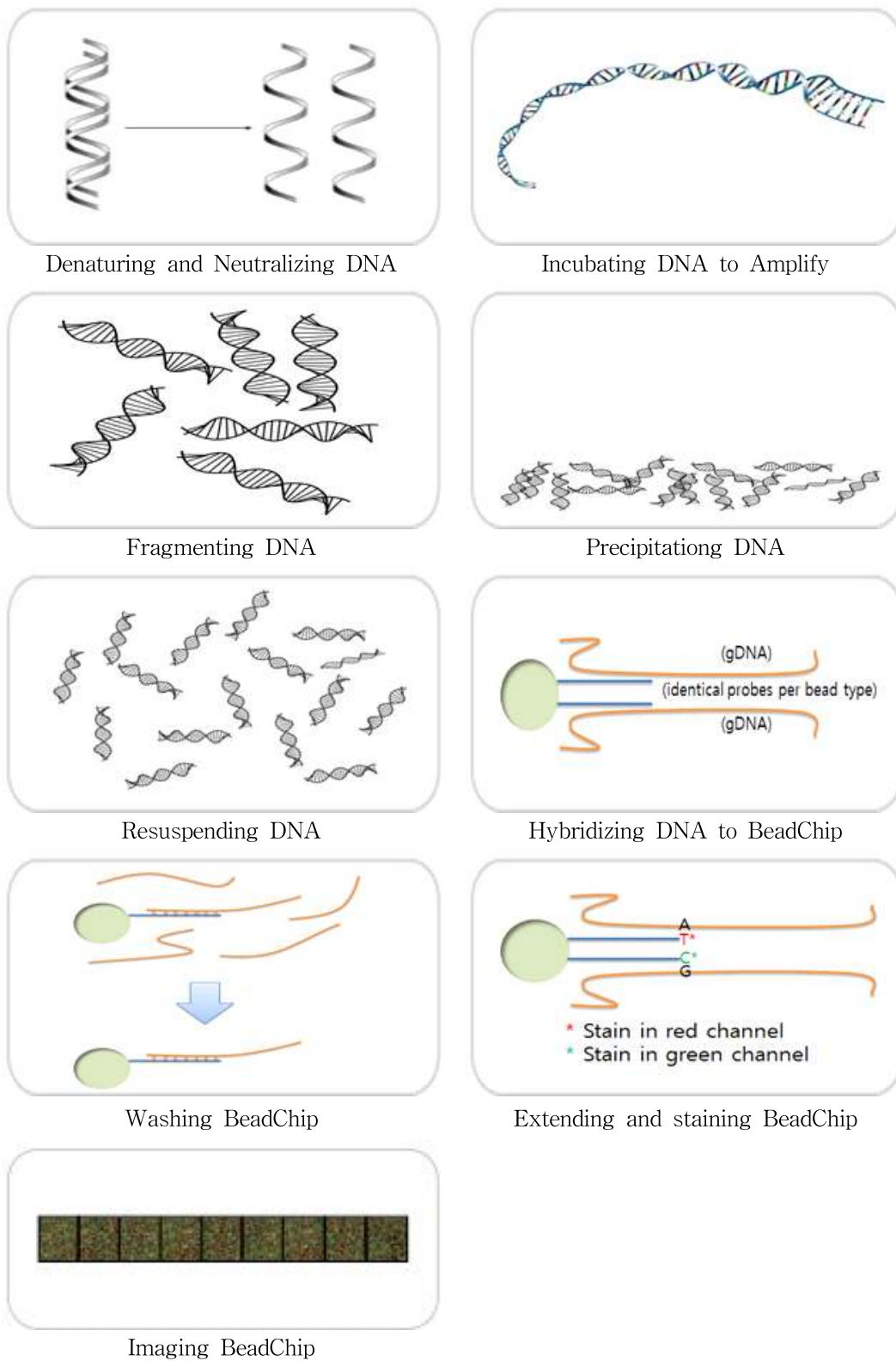


Figure 3. Flow chart of SNP genotyping using the EquineSNP50 BeadChip.

## 6. 유전체 연관 분석(GWAS, Genome Wide Association Study)

분석된 SNP chip data를 토비아노(Tobiano) 형질과 유전체 연관 분석을 위해 Plink v1.07 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>) (Purcell 등, 2007)을 이용하여 분석하였다. Plink 분석을 위해 minor allele frequency (MAF)는 0.1, genotype error는 0.1, low genotyping은 0.05, Hardy-Weinberg Equilibrium ( $p < 0.001$ )인 조건으로 filtering을 하였다. Plink filtering 결과 약 6만 5천 개의 SNPs 중 약 4만 5천 개의 유효한 SNP를 확인하여 분석에 이용하였다. Plink 연관분석을 위해 가계 자료와 Map file을 구성하였다. 가계 자료에는 가계명, 개체명, 부모명, 성별, 표현형과 각 SNPs의 유전자형 정보를 입력하였다. Map file에는 염색체 번호, SNP 명칭, 유전적 거리, 물리적 염기서열 위치를 구성하여 입력하였다. 말의 백반과 SNP 마커 간의 연관분석은 single marker regression linear model을 이용하였다. 통계적 모형은 아래와 같다.

$$y = Xb + Zu + e$$

$y$ 는 표현형 벡터,  $X$ 는 표현형 고정효과 행렬,  $b$ 는 고정효과 벡터,  $Z$ 는 SNP 마커 효과 행렬,  $u$ 는 마커의 효과,  $e$ 는  $N(0, \sigma_e^2)$ 의 분포로 가정하였다. 모형에서 마커의 효과는 고정효과로 처리하였다. 모형에서  $p$ -value를 산출하였으며,  $-\log(p\text{-value})$ 를 계산하여 Manhattan plot, Q-Q plot과 regional plot을 작성하였다.

## 7. 통계분석

제주마의 기본모색과 월라 및 총마 모색과 관련 있는 *MC1R*, *ASIP*, ECA3-inversion, *STX17* 유전자를 분석하였으며 각 유전자의 유전인자와 유전자형 빈도 그리고 Hardy-Weinberg Equilibrium은 Cervus (version 3.0.3) ([www.fieldgenetics.com](http://www.fieldgenetics.com))을 이용하여 분석하였다.

세대 경과에 따른 유전인자의 빈도 변화 검정을 위해 R 통계 패키지(version 3.0.3)

(R Core Team, 2014)를 이용하여 선형 회귀 분석하였다. 선형회귀 모형은 아래와 같다.

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i$$

독립변수  $x_i$ 는 각 세대(0, 1, 1.5, 2, 2.5), 종속변수  $y_i$ 는 각각  $E^*$ ,  $A^A$ ,  $Tb$ 와  $G$  유전인자의 빈도를 이용하였다. 모형의 계수는 t 검정을 이용하였고, 모형 검정은 F-ststistics를 이용하여 유의성을 나타내었다.

*GPRIN3* 유전자의 5개 SNPs, *TYGD2* 유전자의 1개 SNP와 GWAS 분석 결과 유의성이 가장 높은 48853535bp (BIEC2-819509) SNP에 대한 Haplotype 추정과 형질과의 연관관계는 SNPAnalyzer 1.2A (<http://snp.istech.info/istech/board/1.2A/>)와 SNPAnalyzer 2.0 (Yoo 등, 2008)을 이용하여 분석하였다. Haplotype 추정은 EM-based 알고리즘을 이용하였고, SNP에 대한 형질 간 연관관계는 single locus regression model을 이용하여 LOD score를 산출하였다. Haplotype의 연관관계 분석은 goodness of fit 검정과 likelihood ratio 검정을 통해  $p$  value를 산출하였다.

## IV. 결과 및 고찰

### 1. 제주마, 더러브렛, 교잡종(제주마×더러브렛) 기본모색 유전자의 유전 특성

제주마, 교잡마, 더러브렛에서 확보한 샘플을 대상으로 모색과 관련된 *MC1R*, *ASIP*, ECA3-inversion 및 *STX17* 유전인자 빈도와 유전자형 빈도를 분석하였다. *MC1R*과 *ASIP*는 말의 기본모색인 흑색, 적색, 적갈색 발현을 결정하는 주요 유전자다. *MC1R*은 유전자형에 따라  $E^+/-$  유전자형은 흑색 및 적갈색을 발현하며,  $E^e/E^e$  유전자형은 적색을 발현한다. 또한 *MC1R*과 함께 길항적으로 작용하는 *ASIP*는 *MC1R*이  $E^+/-$  유전자형인 경우  $A^A/-$ 는 적갈색,  $A^a/A^a$ 는 흑색으로 발현한다.

Figure 4, Figure 5, Table 3과 Table 4는 *MC1R* 및 *ASIP* 유전자의 Pyrogram 및 3 그룹의 말에서 유전인자 빈도와 유전자형 빈도를 나타내었다. 제주마에서 *MC1R* 유전자의  $E^+/E^+$ ,  $E^+/E^e$  및  $E^e/E^e$  유전자형 빈도는 각각 0.122, 0.447 및 0.429로 확인되었고, 더러브렛과 교잡마에서도 제주마와 유사한 빈도를 보여주고 있으나 더러브렛에서  $E^e/E^e$  유전자형이 다소 낮게 나타났다. 제주마에서 *ASIP* 유전자의  $A^A/A^A$ ,  $A^A/A^a$  및  $A^a/A^a$  유전자형 빈도는 각각 0.46, 0.448 및 0.091로 확인되었다. *MC1R* 유전자의  $E^+/-$  유전자형과 함께 *ASIP* 유전자의  $A^a/A^a$  유전자형의 조합에 의해 흑모색이 발현되게 되며 제주마에서  $A^a/A^a$  유전자형이 0.091로 나타나 흑모색이 5.1% 이하로 발현될 것으로 추정된다. 교잡마에서는  $A^a/A^a$  유전자형이 가장 높게 나타났고 더러브렛에서는 가장 낮게 나타났다. 3 그룹의 말에서 *MC1R* 및 *ASIP* 유전자의 빈도를 이용한 Hardy-Weinberg equilibrium을 분석한 결과 두 유전자는 평형상태를 유지하는 것으로 확인됐다( $p>0.05$ ).

Table 5는 말의 기본모색인 흑색, 적색, 적갈색을 결정하는 *MC1R* 및 *ASIP* 유전자의 유전자형 haplotype 빈도를 나타내었다. 말의 흑색, 적색, 적갈색 모색을



발현하는 유전자 조합은 각각  $E^+ - A^a A^a$ ,  $E^c E^c -$  및  $E^+ - A^A -$  으로 나타낼 수 있다. 3 그룹의 말에서 흑모색을 나타내는  $E^+ - A^a A^a$  haplotype의 빈도는 제주마, 교잡마, 더러브렛에서 각각 0.042, 0.079, 0.025로 나타나 교잡마에서 빈도가 가장 높은 것으로 확인되었다. 그리고 적갈색 모색에서는 더러브렛이 높았고 제주마와 교잡마는 유사한 빈도를 나타냈다. Rieder 등(2001)은 22개 품종 120두에 대해 모색별 *MC1R* 및 *ASIP* 유전자의 유전자형 분포에 대해 보고하였다. 흑모색(Black)을 발현하는 말에서 *MC1R* 유전자형이  $E^+/E^+$ 와  $E^+/E^c$  만 출현했고, *ASIP*에서는  $A^a$  동형접합체만 나타났다. 적갈색(Bay)을 발현하는 말에서는 *MC1R* 유전자형이  $E^+/E^+$ 와  $E^+/E^c$  만 출현했고, *ASIP*에서는  $A^A/A^A$ 와  $A^A/A^a$  만 출현하여  $A^a$  동형접합체는 나타나지 않았다. 또한 적색(Chestnut)을 발현하는 말에서는 *MC1R* 유전자형이  $E^c$  동형접합체만 출현했고, *ASIP*에서는 모든 유전자형이 나타났다(Rieder 등, 2001). 이는 제주마에서 가라(흑색), 유마(적갈색), 적다(적색)에서 *MC1R* 및 *ASIP* 유전자형이 출현 양상과 동일한 결과를 나타내어 제주마 가라, 유마, 적다는 유전학적으로 Black, Bay, Chestnut에 해당하는 것으로 사료된다.

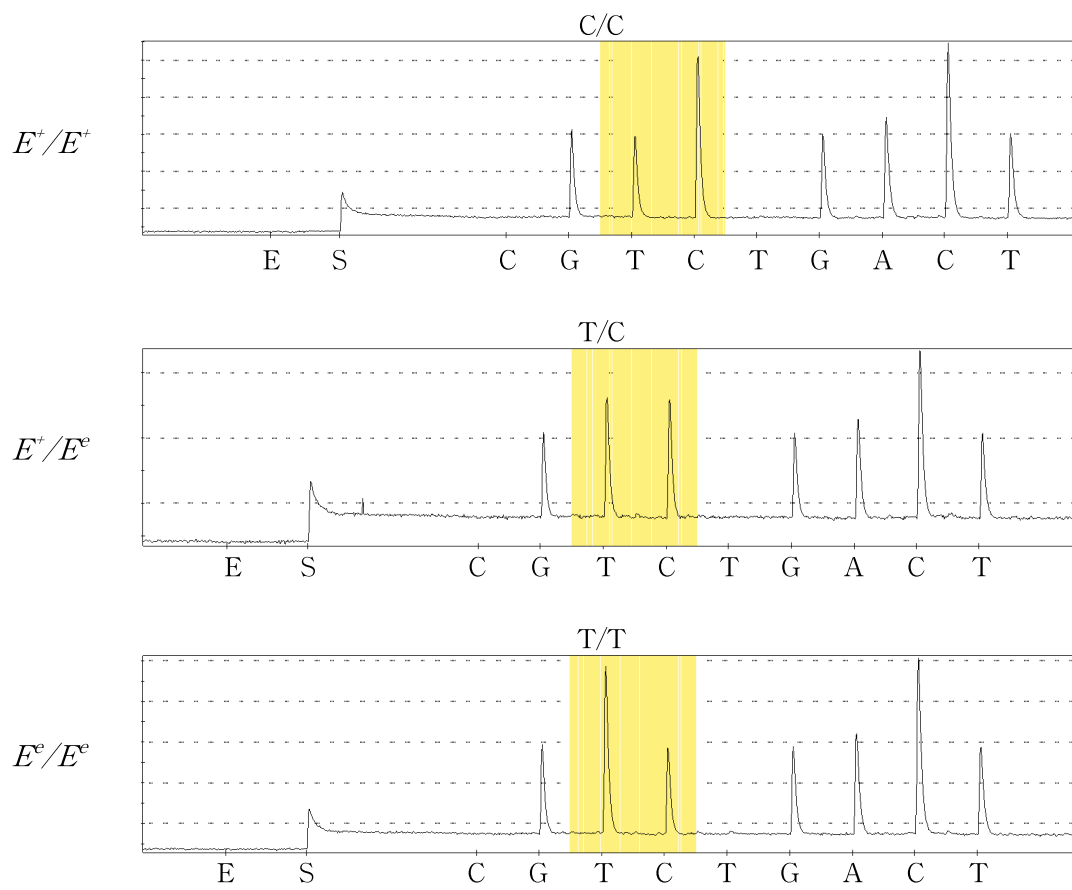


Figure 4. Pyrogram showing the genotypes  $E^+/E^+$ ,  $E^+/E^e$ ,  $E^e/E^e$  for *MC1R*.

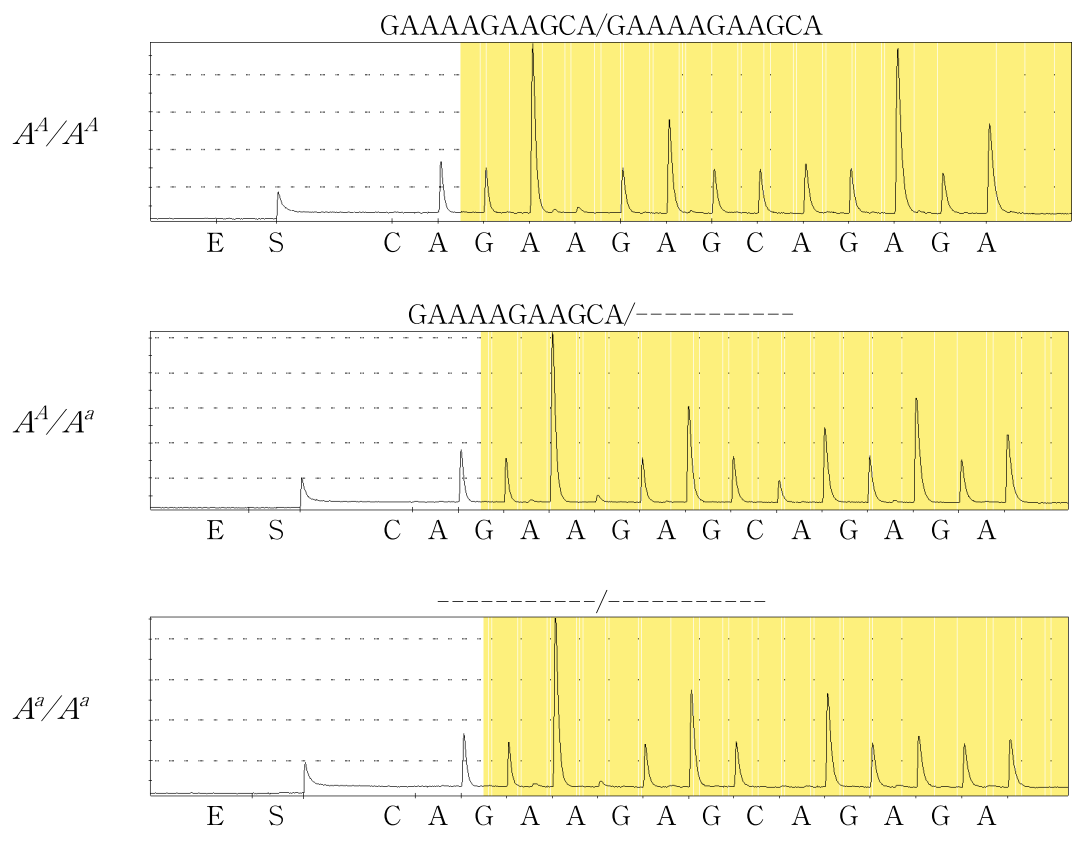


Figure 5. Pyrogram showing the genotypes  $A^A/A^A$ ,  $A^A/A^a$ ,  $A^a/A^a$  for *ASIP*.

Table 3. Distribution of genotype and allele frequencies of *MC1R* in three groups of horses

<i>MC1R</i>	No. of horse	Genotype No. (frequency)			Allele No. (frequency)		H-W $p$ value
		$E^+/E^+$	$E^+/E^e$	$E^e/E^e$	$E^+$	$E^e$	
Jeju horse	1452	178(0.122)	650(0.447)	623(0.429)	1006(0.346)	1896(0.653)	0.6969
Crossbred*	226	28(0.123)	106(0.469)	92(0.407)	162(0.358)	290(0.641)	0.8747
Thoroughbred	119	21(0.176)	62(0.521)	36(0.302)	104(0.437)	134(0.563)	0.6472

\* None registered and family unknown.

Table 4. Distribution of genotype and allele frequencies of *ASIP* in three groups of horses

<i>ASIP</i>	No. of horse	Genotype No. (frequency)			Allele No. (frequency)		H-W <i>p</i> value
		$A^A/A^A$	$A^A/A^a$	$A^a/A^a$	$A^A$	$A^a$	
Jeju horse	1374	672(0.460)	654(0.448)	133(0.091)	1998(0.684)	920(0.315)	0.1619
Crossbred*	228	83(0.364)	109(0.478)	36(0.157)	275(0.603)	181(0.396)	0.9511
Thoroughbred	119	63(0.529)	50(0.420)	6(0.050)	176(0.739)	62(0.260)	0.4513

\* None registered and family unknown.

Table 5. Haplotype distribution of *MC1R* and *ASIP* in three groups of horses

	No. of horse	Haplotype No. (frequency)								
		<i>EE<sup>+</sup>AA<sup>A</sup></i>	<i>EE<sup>+</sup>AA<sup>Aa</sup></i>	<i>EE<sup>+</sup>A<sup>a</sup>A<sup>a</sup></i>	<i>EE<sup>e</sup>AA<sup>A</sup></i>	<i>EE<sup>e</sup>AA<sup>Aa</sup></i>	<i>EE<sup>e</sup>A<sup>a</sup>A<sup>a</sup></i>	<i>E<sup>e</sup>EA<sup>A</sup></i>	<i>E<sup>e</sup>EA<sup>Aa</sup></i>	<i>E<sup>e</sup>EA<sup>a</sup>A<sup>a</sup></i>
Jeju horse	1452	101 (0.070)	71 (0.049)	6 (0.004)	316 (0.218)	280 (0.193)	55 (0.038)	253 (0.174)	298 (0.205)	72 (0.050)
Crossbred*	226	8 (0.035)	17 (0.075)	3 (0.013)	42 (0.186)	49 (0.217)	15 (0.066)	32 (0.142)	42 (0.186)	18 (0.080)
Thoroughbred	119	13 (0.109)	7 (0.059)	1 (0.008)	28 (0.235)	32 (0.269)	2 (0.017)	22 (0.185)	11 (0.092)	3 (0.025)

\* None registered and family unknown.

## 2. 백반(월라) 및 회색(총마) 모색 유전자의 유전 특성

3 그룹의 말에서 백반(월라)과 관련된 ECA3-inversion 분석 결과는 Figure 6과 Table 6에 나타내었다. 제주마에서는 월라 표현형이 발현되는  $To/To$ 와  $To/+$  유전자형이 각각 0.1%와 11.9%로 나타나 전체적으로 제주마에서 월라 모색은 12%로 존재하는 것으로 확인되었다. 교잡마에서는  $To/To$  유전자형은 나타나지 않았으며,  $To/+$  유전자형은 3.9%로 나타나 제주마에 비해 월라 모색 빈도가 낮게 나타났다. 반면에 더러브렛에서 백반 모색 유전인자인  $To$ 는 확인되지 않았다.

Figure 7과 Table 7에서는 말에서 총마(회색) 모색을 나타내는 유전자인  $STX17$  분석 결과를 나타내었다. 총마 모색 표현형을 발현하는  $G$  유전인자는 우성 형질로서 homozygote나 heterozygote에서 모두 회색 모색을 발현하게 된다. 더러브렛과 교잡마에서는 총마 모색을 나타내는  $G/g$  유전자형이 각각 6.7%와 5.2%로 나타나 두 집단에서는 총마의 빈도는 낮게 나타났다. 반면 제주마 집단에서  $STX17$  유전자형  $G/G$ ,  $G/g$  및  $g/g$ 의 빈도는 각각 0.002, 0.68, 0.317로 나타나 회색 모색을 나타내는 유전자형  $G/G$ 와  $G/g$ 의 빈도 합이 0.682로 제주마 집단에서 회색 모색의 빈도가 높은 것을 확인할 수 있었다. Lee (1971)가 1960년대에 조사한 제주마 모색 빈도에서 회색 모색인 총마의 빈도가 13%였던 것과 비교할 때 제주마의 회색 유전인자 빈도가 크게 증가된 것으로 확인 되었다. 회색 모색의 증가는 지정된 종마로 세대를 이어가는 제주마의 혈통관리 집단에서 회색 유전인자가 있는 종마 선정으로 회색 유전인자가 과도하게 집단에 전파되었음을 의미한다.

Pielberg 등(2008)은 Gray 모색을 발현하는 8품종 727두와 Non-Gray 마필 14품종 131두에 대해  $STX17$  intron 6 4.6kb 중복을 분석한 결과 Gray 모색에서는 4.6kb 중복이 모두 나타났으나 Non-Gray 마필에서는 4.6kb 중복이 나타나지 않는 것으로 보고하였다. 이는 제주마에서  $STX17$  분석 결과와 일치하여 제주마의 회색 모색인 총마는 유전학적으로 Gray에 속하는 것으로 사료된다.

제주마 집단에서 ECA3-inversion 및  $STX17$ 에 대한 Hardy-Weinberg equilibrium을 검정한 결과 ECA3-inversion에서는 평형상태를 유지하는 것으로

나타났으나( $p>0.05$ ), 반면에 *STX17*에서는 평형상태를 이루지 않는 것으로 확인되었다( $p<0.001$ ). 이는 제주마 집단 유지를 위해 종마 선정시 총마 모색의 종마를 선정하여 교배한 결과 총마 유전인자의 증가에 의한 것으로 사료되었다.



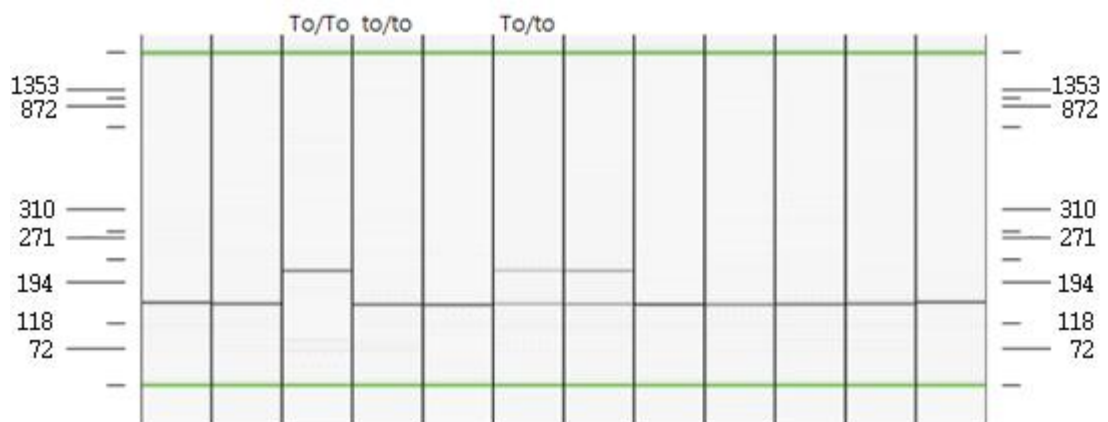


Figure 6. Electrophoresis of PCR products for ECA3-inversion. Both ends are size markers. Upper band is *To* allele and lower band is *to* allele.

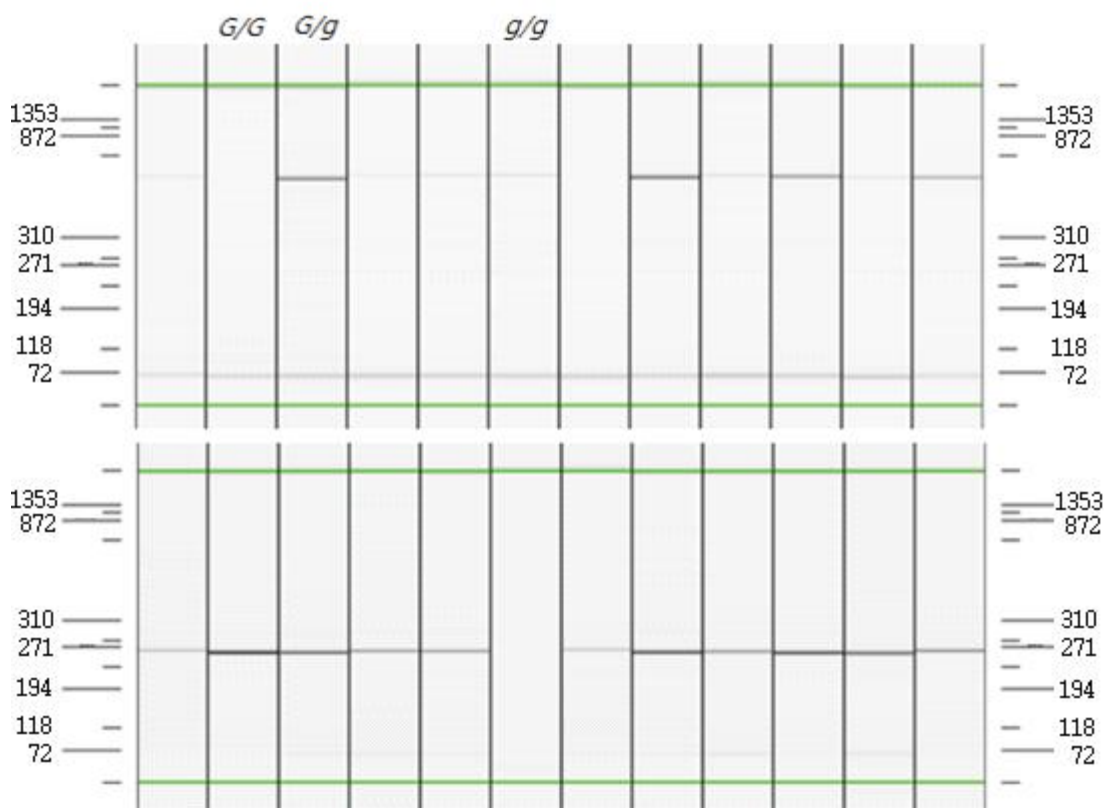


Figure 7. Electrophoresis of PCR products for *STX17*. Both ends were size markers. Upper band is *G* allele and lower band is *g* allele.

Table 6. Distribution of genotype and allele frequencies of ECA3-inversion in three groups of horses

ECA3-inversion	No. of horse	Genotype No. (frequency)			Allele No. (frequency)		H-W $p$ value
		$To/To$	$To/+$	$+/+$	$To$	$+$	
Jeju horse	1462	2(0.001)	174(0.119)	1284(0.879)	178(0.061)	2742(0.939)	0.1799
Crossbred*	228	0(0)	9(0.039)	219(0.960)	9(0.019)	447(0.980)	N. D.
Thoroughbred	119	0(0)	0(0)	119(1.0)	0(0)	238(1.0)	N. D.

\* None registered and family unknown.

Table 7. Distribution of genotype and allele frequencies of *STX17* in three groups of horses

<i>STX17</i>	No. of horse	Genotype No. (frequency)			Allele No. (frequency)		H-W <i>p</i> value
		<i>G/G</i>	<i>G/g</i>	<i>g/g</i>	<i>G</i>	<i>g</i>	
Jeju horse	1462	3(0.002)	994(0.680)	463(0.317)	1000(0.342)	1920(0.657)	<0.001
Crossbred*	228	0(0)	12(0.052)	216(0.947)	12(0.026)	444(0.973)	N. D.
Thoroughbred	119	0(0)	8(0.067)	111(0.932)	8(0.033)	230(0.966)	N. D.

\* None registered and family unknown.

### 3. 제주마의 세대 경과에 따른 모색 유전자 빈도 변화

제주마 집단에서 세대 경과에 따른 모색유전자 변화 양상을 확인하고자 세대별 유전자 빈도 변화를 분석하였다. 가계를 알고 있는 제주마에 대해 0세대(181두), 1세대(30두), 1.5세대(578두), 2세대(197두) 그리고 2.5세대(272두)로 분류하여 분석하였다(Figure 8).

*MC1R* 유전자의  $E^+$  유전인자와  $E^e$  유전인자의 세대 간 경과는 0세대에서는 각각 0.259와 0.74로 나타났으며, 1세대에서는  $E^+$  유전인자는 0.433으로 증가하고  $E^e$  유전인자는 0.566으로 감소하는 경향이 있으나 1.5, 2, 2.5세대를 지나면서 세대 간 큰 변화 없이 유지되는 것으로 나타났다. *MC1R* 유전자의 유전자형 빈도 변화는 0세대, 1.5세대, 2세대, 2.5세대에서는 큰 변화를 찾아볼 수 없었으나  $E^+/E^e$  유전자형은 0세대 0.419에서 1세대 0.666으로 증가하였고,  $E^e/E^e$  유전자형은 0세대 0.53에서 1세대 0.233으로 감소하는 것으로 나타났다. 이런 증감은 1세대 분석두수가 30두로 분석에 이용된 샘플 수가 적어 발생한 것으로 추정된다.

*ASIP* 유전자의 세대별 유전인자 빈도 및 유전자형 빈도 변화도 *MC1R* 유전자의 빈도 변화와 유사하게 0세대, 1.5세대, 2세대, 2.5세대에서는 큰 변화는 없는 것으로 확인되었다. 그러나 1세대에서의 유전인자 빈도 및 유전자형 빈도 변화도 *MC1R*처럼 증감이 있는 것으로 나타났으나 이는 분석 샘플 수가 적어 발생한 것으로 추정된다.

제주마에서 ECA3-inversion의 세대별 변화는 비윌라 유전인자인  $to$ 는 0세대 0.873에서 2.5세대 0.965로 점진적으로 증가하는 것으로 확인됐으며, 윌라 유전인자인  $To$ 는 0세대 0.126에서 2.5세대 0.034로 감소되었다. 세대 경과에 따른  $To$  유전인자의 회귀분석 결과  $\beta_1$ 이 -0.039로 나타나 세대 경과에 따라  $To$  유전인자 빈도는 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ ). 윌라를 발현하는 유전자형인  $To/to$ 의 빈도 변화는 0세대 0.241에서 2.5세대 0.062로 감소하였다. 본 결과에 의하면 제주마 집단에서 얼룩기 모색은 세대가 경과됨에 따라 점진적으로 감소되는 것으로 확인되어 종마 선정 시점에 얼룩기 유전자의 도입을 고려하지 않으면 얼룩기 모색은

지속적으로 감소될 것으로 사료된다.

제주마 총마 모색의 세대별 변화를 확인하기 위해 *STX17* 유전자의 인자 빈도 및 유전자형 빈도를 분석하였다. 총마를 발현하는 *STX17* 유전자의 *G* 유전인자 빈도 변화는 0세대 0.192에서 2.5세대 0.386으로 증가되는 것을 확인하였으며, 회귀분석 결과  $\beta_1$ 이 0.081로 세대 경과에 따라 *G* 유전인자 빈도는 유의적으로 증가하였다 ( $p < 0.05$ ). 또한 *STX17* 유전자형 빈도에는 총마 발현 유전자형인 *G/g* 빈도는 0세대 0.384에서 2.5세대 0.764로 2배가 증가하였으며, 비총마 유전자형인 *g/g*의 빈도는 0세대 0.615에서 2.5세대 0.231로 감소하였다. 본 연구결과 세대 경과에 따라 총마 발현 유전인자와 유전자형 빈도가 급격히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 총마 발현 유전자인 *STX17*의 *G* 유전인자 배제를 위한 교배조합 설정 등 관리 방안을 수립해야 하며 현 관리체계를 계속 유지할 경우 제주마에서 총마 모색이 대다수를 차지할 것으로 사료된다.

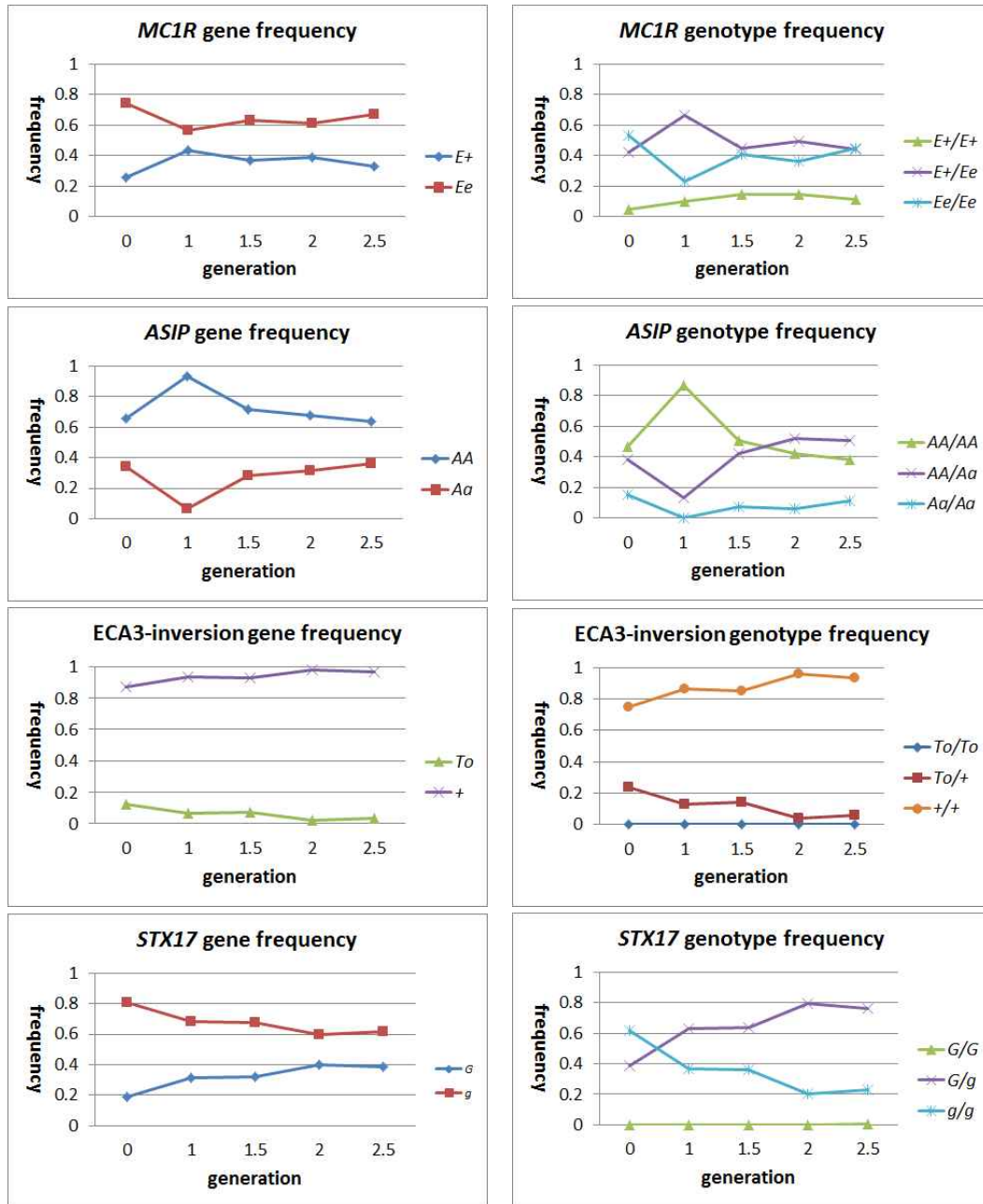


Figure 8. Gene and genotype frequency change of *MC1R*, *ASIP*, ECA3-inversion, *STX17* by generation.

#### 4. 제주마 율라(Wolla) 모색의 백반 형태 정의

Thiruvenskadan 등(2008)은 말의 백반을 분류할 때 백반의 발현 패턴에 따라 Tobiano, Overo, Sabino로 분류하였다. Tobiano는 일반적으로 사지는 백색이며 백반이 등선을 가로지르는 형태로 타원형이나 원형의 형태가 뚜렷이 나타난다. Overo는 사지가 삼지백, 사지백 등 다양하게 나타나며, 백반은 주로 복부에서 시작되고 형태는 톱니 모양으로 나타난다. Sabino는 얼굴과 사지로부터 백반이 시작되며 백반과 유색의 경계는 뚜렷하게 나타나지 않는다. 제주마에서 나타나는 백반은 율라(Wolla)라고 통칭하여 분류하고 있으며, 제주마 율라 모색에 대한 분자유전학적 모색 분류는 찾아보기 어려웠다. 따라서 제주마 백반 모색의 분류를 위해 Tobiano, Overo, Sabino와 관련된 유전자를 분석하였다.

제주마에서 나타나는 다양한 율라 표현형을 Figure 2에 제시하였다. 제주마에서 백반의 발현 양은 약 90% ~ 10% 내외로 추정되며 일부 극히 적은 백반을 표현하는 개체들도 있었다. 기본모색인 가라, 유마, 적다에서 율라 모색이 발현하게 되면 기본모색과 백반의 경계가 뚜렷하게 나타난다(A, B, D). 그러나 총마와 율라는 기본모색에 각각 우성으로 작용하며 두 모색이 동시에 발현될 경우 백반의 경계가 뚜렷하지 않은 경우도 있다(C). 또한 총마와 율라가 동시에 발현되는 개체에서 나이가 들면서 유색 부분이 탈색되어 율라 백반과 구분이 되지 않는 경우도 있다.

제주마 율라 모색이 Tobiano, Overo 또는 Sabino 형태에 속하는지를 확인하기 위해 ECA3-inversion, *EDNRB*, *KIT* intron 16 SNP를 분석한 결과를 Figure 9, Figure 10 및 Table 8에 나타내었다. Brooks 등(2007)이 보고한 방법을 이용하여 ECA3-inversion 분석으로 Tobiano 마필을 확인하였다. Tobiano 마필에서는 *To* 유전인자가 동형접합체 또는 이형접합체 형태로 나타나며 Non-Tobiano 개체에서는 *+* 동형접합체 형태로 나타난다. 제주마 율라 142두와 비율라 234두를 분석한 결과 *+/To*, *To/To* 유전자형이 각각 140두와 2두가 나타나 제주마 율라에서는 모두 *To* 유전인자가 존재하는 것을 확인하였으며, 비율라에서는 모두 *+/+* 유전자형으로 확인되었다. Metallinos 등(1998)이 frame Overo 개체에서 *EDNRB* 유전자 내 2bp 염기치환을 확인한 방법을 이용하여 제주마 율라 142두와 비율라 234두를 분석한



결과 월라와 비월라 모두에서 *EDNRB* 유전자형이  $+/+$  동형접합자만 출현되어 Overo 유전인자는 확인할 수 없었다. 제주마에서 Sabino 모색 유전자형 확인을 위해 Brooks와 Bailey (2005)가 보고한 *KIT* intron 16번 내의 *T/A* 염기치환을 분석한 결과 제주마 월라와 비월라 모두에서 Sabino 유전인자는 확인되지 않았다. Haase 등(2007)은 Tobiano 모색을 갖는 마필과 Non-Tobiano 마필에 대해 ECA3-inversion에 대해 분석한 결과 Tobiano 마필에서는 적어도 1개의 *To* 유전인자를 갖고 있었으며, Non-Tobiano 마필에서는 *To* 유전인자가 없는 것으로 보고한 바 있다. 이는 제주마 월라 모색에서 적어도 1개의 *To* 유전인자를 갖고 있어 동일한 결과로 확인되어 제주마의 월라 모색은 Tobiano 형태에 속하는 것으로 사료된다.

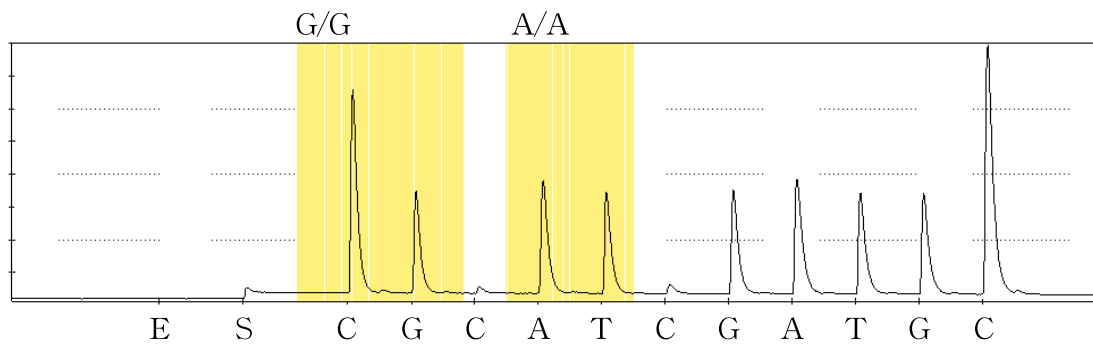


Figure 9. Pyrograms showing the genotypes for *EDNRB* 2bp missense mutation. Pyrosequences were analyzed using reverse compliment sequence.

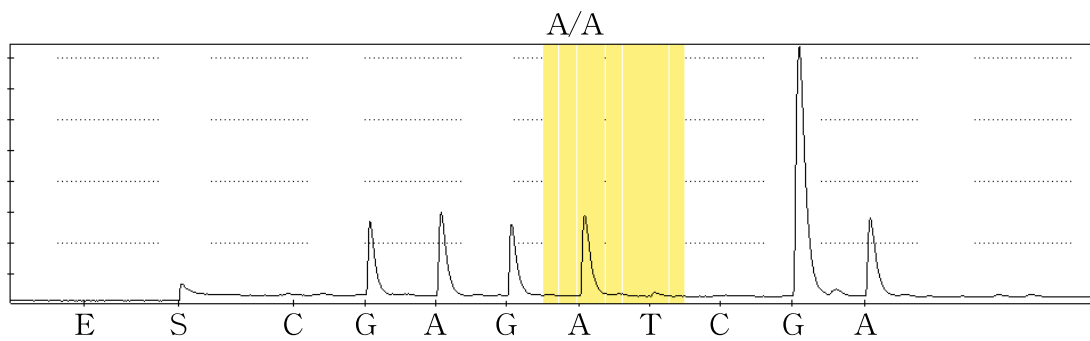


Figure 10. Pyrograms showing the genotypes for *KIT* intron 16 SNP. Pyrosequencing was analyzed using reverse complement sequence.

Table 8. Genotypes of the ECA3-inversion, *EDNRB* and *KIT* intron 16 in Jeju horse Wolla (white patch) and solid

Genetic variation	Genotype	Wolla No. of horse (frequency)	solid No. of horse (frequency)
ECA3-inversion	<i>+/+</i>	–	234(1.000)
	<i>+/To</i>	140(0.986)	–
	<i>To/To</i>	2(0.013)	–
<i>EDNRB</i> 2-bp missense mutation	<i>+/+</i>	142(1.000)	234(1.000)
	<i>+/O</i>	–	–
	<i>O/O</i>	–	–
<i>KIT</i> intron 16 SNP	<i>T/T</i>	142(1.000)	234(1.000)
	<i>A/T</i>	–	–
	<i>A/A</i>	–	–

## 5. 말의 토비아노(Tobiano) 모색 관련 GWAS 분석

말의 토비아노(Tobiano) 관련 GWAS 분석을 위해 농촌진흥청 국립축산과학원 남지축산연구소에서 사육 중인 crossbred horses (Jeju horse × Thoroughbred) 승용마 165두에 대해 EquineSNP50 BeadChip을 이용하여 분석하였다. 분석에 이용된 165두는 가계가 확인되는 개체로 이 중 Tobiano 개체는 52두, Non-Tobiano 개체는 113두였다. Plink를 이용하여 분석된 SNP chip 데이터를 필터링 한 결과 65,157개 SNP 중 19,953개의 SNP가 필터링 되어 총 45,204개의 SNP가 남았다. 45,204개의 SNP 마커에 대한 LD 분석 결과를 이용하여 LD가 25% 이상으로 높게 나타나는 인접한 SNP 마커를 제거하여 최종 11,420개의 SNP 마커를 연관 분석에 이용하였다. Figure 11에서는 GWAS 분석 결과에 의한 Manhattan plot과 Q-Q plot을 나타내었다. 분석에 이용된 유의수준( $p < 0.001$ )은  $-\log(8.75 \times 10^{-8})$ 으로 설정하였다. 말의 토비아노에 대한 GWAS 분석 유의수준( $p < 0.001$ )을 만족하는 SNP는 말의 염색체 내에 72개로 확인되었다. 유의성 있는 SNP 들은 3번 염색체 21Mbp 부터 85.1Mbp까지 넓게 분포하였으며, 가장 유의성이 높은 SNP는 48853535bp (BIEC2-819509)에 위치하였고  $p$  value는  $1.01 \times 10^{-22}$ 으로 확인되었다. Q-Q plot에서는 관측치  $p$  value가 null 분포선에 위치하지 않고 예측치  $p$  value 보다 더 높은 값을 갖는 것을 확인할 수 있었다.

말의 토비아노(Tobiano)와 유의성 있는 SNP 좌위내 관련 유전자를 확인하기 위해 regional plot을 작성하였다(Figure 12.). 유의성이 가장 높은 SNP 좌위 주변 인접한 지역에 *GPRIN3* (G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 3)와 *TIGD2* (Tigger transposable element-derived gene 2) 유전자를 확인할 수 있었으며, 또한 *MC1R*과 *KIT* 유전자도 유의성 있는 지역에 존재하는 것으로 확인되었다. *GPRIN3*은 *GPRIN* super family에 속하며 *GRIN*이라고도 불린다. *GPRIN*은 Neurite의 확장을 조절하는 것으로 알려진  $G\alpha_{o/i}$ 의 작동인자로 알려져 왔다. 또한 *GPRIN*에서 나온 Sprouty에 의해  $G\alpha_o$ 의 활성화로 색소세포 발현과 관련 있는 *MAPK* 경로를 억제하는 것으로 보고(Hwangpo 등, 2012)가 있었으며, Hemesath (1998) 등은 MAP kinase가 색소세포에서 Microphthalmia를 활성화시켜

*c-Kit* 신호전달에 관련되어 있다고 보고하였다. 따라서 *GPRIN*이 토비아노 발현에 중요한 원인 유전자로 추정된다. *TIGD2* 유전자는 DNA mediated transposon의 tigger subfamily에 속해 있는 것으로 보고되었다(Smit와 Riggs, 1996). Transposable element는 게놈의 구조를 변경하거나 돌연변이 생성 등 게놈의 기능과 진화에 중요한 역할을 수행한다. 말의 토비아노 모색은 3번 염색체의 inversion에 의한 것으로 보고되었으므로 *TIGD2* 유전자도 토비아노 모색에 대한 주요 원인 유전자로 추정된다.

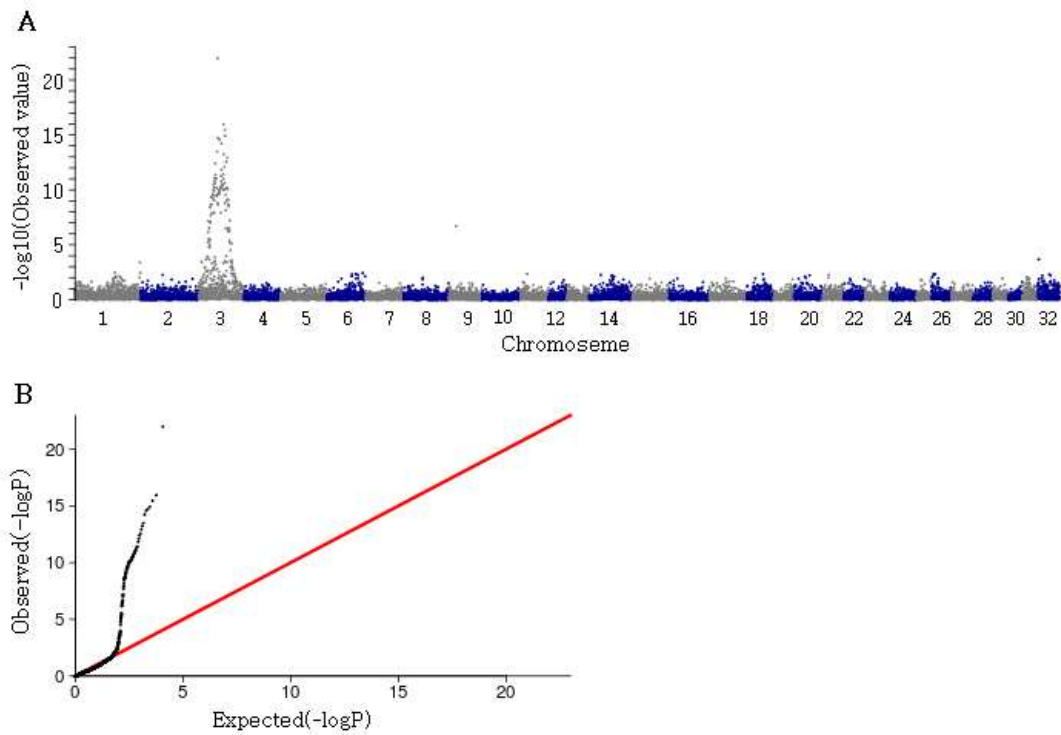


Figure 11. Manhattan plot (A) and Q-Q plot (B) of Tobiano in horses. (A) The  $-\log$  values estimated for each polymorphism is plotted in the y-axis. Chromosome number is plotted in the x-axis. The Bonferroni-corrected significance level ( $p < 0.001$ ) is  $-\log(8.75 \times 10^{-8})$ . (B) The red line represents the 95% concentration band under the null hypothesis of no association. The black dot represents the  $p$ -values of SNP marker.

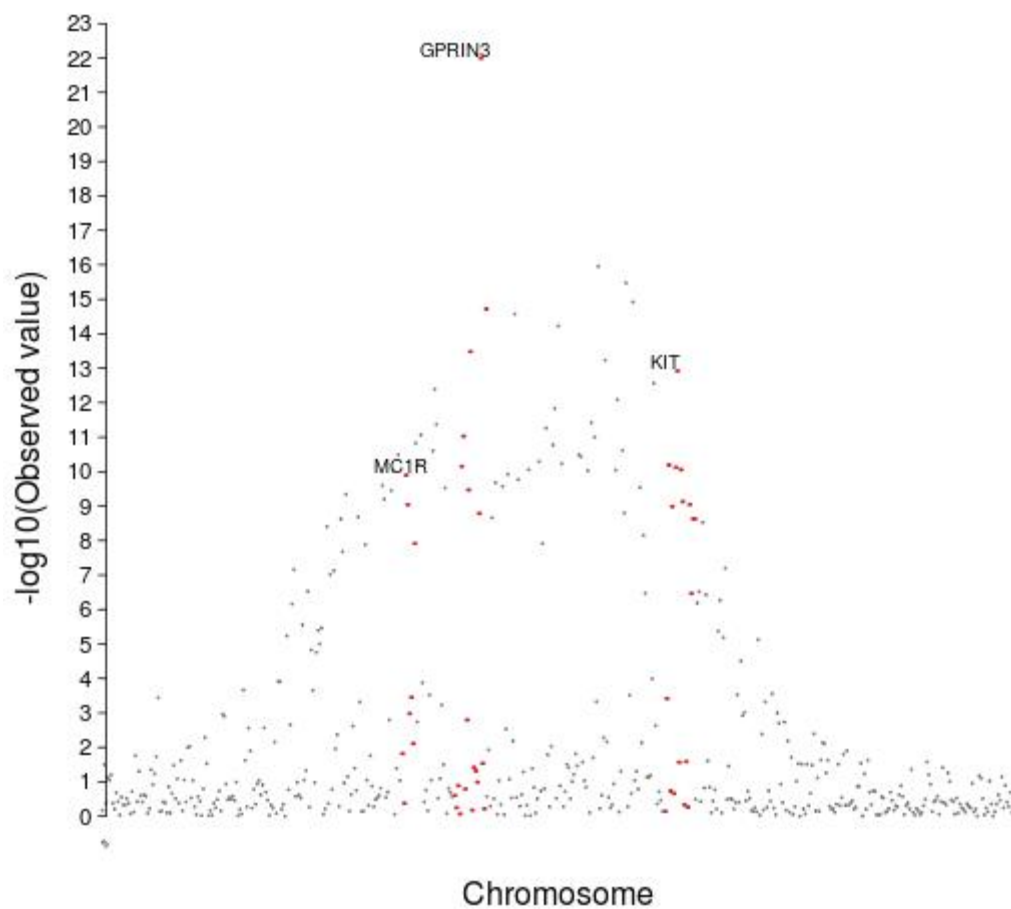


Figure 12. Regional plot on ECA3. The significant SNPs associated with Tobiano are distributed from 21Mbp to 85Mbp. The most significant SNP is located on 48.8Mbp and the  $p$  value is  $1.01 \times 10^{-22}$ . The *GPRIN3* gene and the *TIGD2* gene are located in an area adjacent of the most significant SNP.



## 6. *GPRIN3* 및 *TIGD2* 유전자의 구조 및 염기서열 분석

말의 *GPRIN3* 유전자는 3번 염색체 48,815,395bp에서 48,817,728bp에 forward strand 방향으로 위치하고 있다(Figure 13). *GPRIN3* 유전자는 2개의 coding exon으로 구성되어 있으며 770개의 아미노산 서열을 암호화한다. 단색(solid) 모색과 토비아노(Tobiano) 모색에서 얻은 *GPRIN3* 유전자의 DNA 서열을 기존에 보고된 Throughbred *GPRIN3* 서열(NC\_009146.2)과 비교했을 때, 총 6개의 SNP들 (c.1114G>A, c.1226C>T, c.1388C>T, c.1476G>A, c.1790G>A, c.\*331A>G)이 확인되었고 삽입/결실 돌연변이는 발견되지 않았다(Figure 14). 확인된 SNP 중 c.1114G>A와 c.1476G>A는 침묵 돌연변이이며, c.1226C>T, c.1388C>T와 c.1790G>A는 아미노산 서열을 각각 p.372V>I (Val>Ile), p.409S>L (Ser>Leu), p.463T>M (Thr>Met)로 치환하는 것으로 확인되었다(Figure 15).

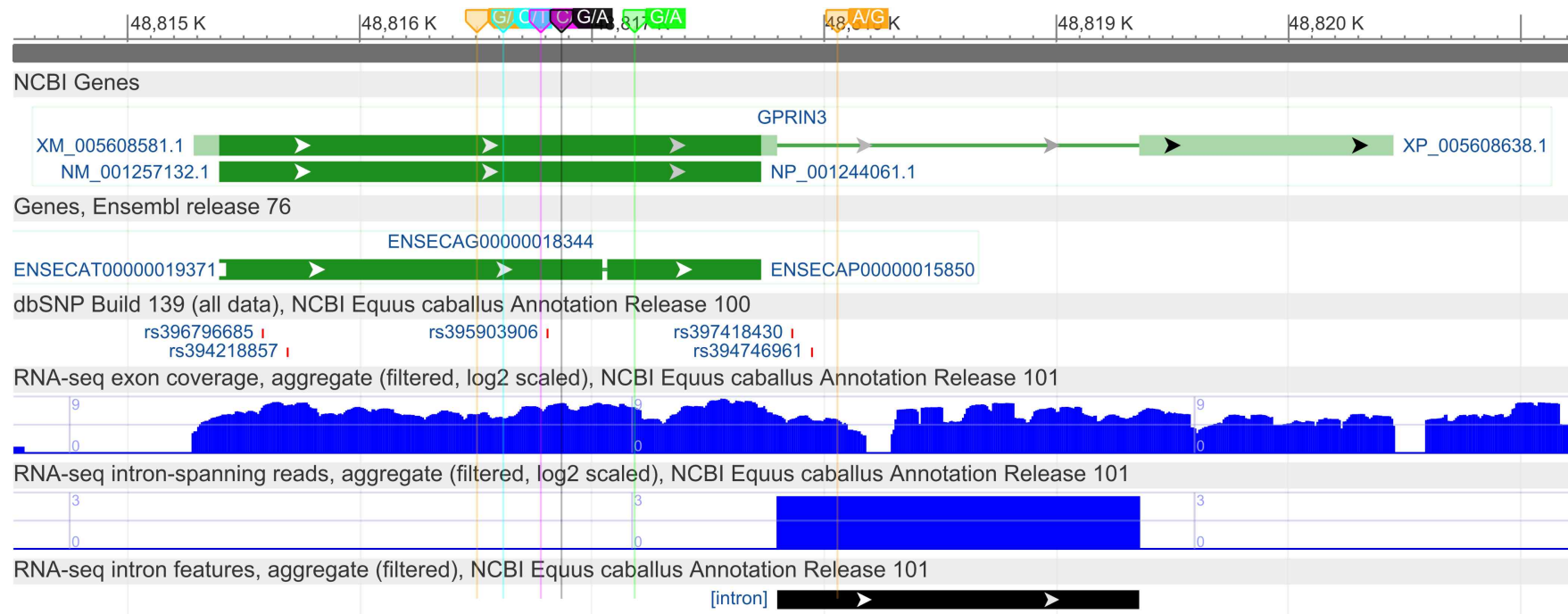


Figure 13. *GPRIN3* gene structure. *GPRIN3* gene has two coding exon and include the 770 amino acid sequence. Six SNPs are identified (c.1114G>A, c.1226C>T, c.1388C>T, c.1476G>A, c.1769G>A, c.\*331A>G).

```

*           20           *           40           *           60
NC_009146. : ..... : 60
GPRIN3-mRN : ..... : 60
Solid      : ..... : 60
WhitePatch : ..... : 60
          ATGGGGACTGTACCTGACCCCTCTAAGATCAGCTACAACCTCCCTGATTGCAGCTTCTGGA

*           80           *           100          *           120
NC_009146. : ..... : 120
GPRIN3-mRN : ..... : 120
Solid      : ..... : 120
WhitePatch : ..... : 120
          AAAGAAGAGGTGCCAGCTGTCTCACCTCCGCCTCAATCAGCCCTCCTGTGCGAGAACACC

*           140          *           160          *           180
NC_009146. : ..... : 180
GPRIN3-mRN : ..... : 180
Solid      : ..... : 180
WhitePatch : ..... : 180
          AATGGCCTTTCAGACGCTCCTGCAGAACCAGACCTCAGCCCCAGGGCAGCTACCAAGGCC

*           200          *           220          *           240
NC_009146. : ..... : 240
GPRIN3-mRN : ..... : 240
Solid      : ..... : 240
WhitePatch : ..... : 240
          CTGATGCACGCCTGTGAGCATGAGACCACCCAGCCAGACATGTCTTCTCCTGGCATCTTC

*           260          *           280          *           300
NC_009146. : ..... : 300
GPRIN3-mRN : ..... : 300
Solid      : ..... : 300
WhitePatch : ..... : 300
          AATGAGGTGGAGAAGGCATCTCCACACTCAACTCTCCTGGCAATACCTGCTGCCGGGA

*           320          *           340          *           360
NC_009146. : ..... : 360
GPRIN3-mRN : ..... : 360
Solid      : ..... : 360
WhitePatch : ..... : 360
          AGCAGCGAGCCACAGCCCCAGGCCCGCATTCTGCAGCAGGAAAGGATCTTATAAACACA

*           380          *           400          *           420
NC_009146. : ..... : 420
GPRIN3-mRN : ..... : 420
Solid      : ..... : 420
WhitePatch : ..... : 420
          GCATTTATAATGCCAGCCACTCAACACACCCACCAGGCCATCCCAGGTGACCAGCCCAAT

*           440          *           460          *           480
NC_009146. : ..... : 480
GPRIN3-mRN : ..... : 480
Solid      : ..... : 480
WhitePatch : ..... : 480
          GCCAGCCCTCATCAGGACCTGAAGATATGCTGGTGAAATCACAGGGAACCTCAGATGGA

```

Figure 14. Nucleotide sequences and mutations of the complete *GPRIN3*. Reference sequences was from GenBank (accession number NC\_009146.2). Dotes indicate identical sequence to Thoroughbred.

```

*           500           *           520           *           540
NC_009146. : ..... : 540
GPRIN3-mRN : ..... : 540
Solid       : ..... : 540
WhitePatch : ..... : 540
GAGCAACCTGAGAAGTCAACTTGTCTGTGGGAGGCACCCTTAGCAGCAGCAACGATCAA

*           560           *           580           *           600
NC_009146. : ..... : 600
GPRIN3-mRN : ..... : 600
Solid       : ..... : 600
WhitePatch : ..... : 600
GTGCCCTGTGATTTTCCTTCCAAGAAACAATCCAGGGAGCAGTGCCACTGCCAAGGCA

*           620           *           640           *           660
NC_009146. : ..... : 660
GPRIN3-mRN : ..... : 660
Solid       : ..... : 660
WhitePatch : ..... : 660
GCCACCAAGGCGTTCAGTCACGCACCTTCTCCAGAAGGGCAGAGGCAGCCAGCTGTCTGC

*           680           *           700           *           720
NC_009146. : ..... : 720
GPRIN3-mRN : ..... : 720
Solid       : ..... : 720
WhitePatch : ..... : 720
GGCTCCCAGGCCAGGTCTCGGAATCTCCAGCAAGAGAAGATGGATGTTCCAGGGACCAAA

*           740           *           760           *           780
NC_009146. : ..... : 780
GPRIN3-mRN : ..... : 780
Solid       : ..... : 780
WhitePatch : ..... : 780
CAGCCCTCTGCCACTGCCTCAGACGCCAGCCCGTGACTTCTGTGACGCCTCCACCATCT

*           800           *           820           *           840
NC_009146. : ..... : 840
GPRIN3-mRN : ..... : 840
Solid       : ..... : 840
WhitePatch : ..... : 840
CACCTCACTAGCAAAGGTTCCCTTTCCTGCAGATCCGGAGAAGGTGCTGCTGCCAGCACAG

*           860           *           880           *           900
NC_009146. : ..... : 900
GPRIN3-mRN : ..... : 900
Solid       : ..... : 900
WhitePatch : ..... : 900
CACCAGGCATCAAGGTTCAAAGAAGCGGGCACCATGACCAGCCAAGGTGAGGAGGGTGAG

*           920           *           940           *           960
NC_009146. : ..... : 960
GPRIN3-mRN : ..... : 960
Solid       : ..... : 960
WhitePatch : ..... : 960
ATCAGGGAGGTTCCAGCAGGGCTCGGCAAGATGCTGAGGTGCAGGCAGTGGCGAGTGTC

*           980           *           1000          *           1020
NC_009146. : ..... : 1020
GPRIN3-mRN : ..... : 1020
Solid       : ..... : 1020
WhitePatch : ..... : 1020
GAGAGCAGGTCGGTCTCCACCAGCCCCAGCATCTCACTGCACTCCTGAAGGAAACGCC

```

Figure 14 (Continued)

```

*      1040      *      1060      *      1080
NC_009146. : ..... : 1080
GPRIN3-mRN : ..... : 1080
Solid      : ..... : 1080
WhitePatch : ..... : 1080
GCTCCTGAGCGTTTCGAAACAGCAAGAGCAGCTGCGTGTCAATTTGCCACGGCCGCGGCAGC

*      1100      *      1120      *      1140
NC_009146. : ..... : 1140
GPRIN3-mRN : ..... : 1140
Solid      : ..... : 1140
WhitePatch : .....A..... : 1140
GGGAGCCACACGTTGGAGCTATCTGACAACACCgTAGCCCCCGAGGAGTCGGGTCAGTGC

*      1160      *      1180      *      1200
NC_009146. : ..... : 1200
GPRIN3-mRN : ..... : 1200
Solid      : ..... : 1200
WhitePatch : ..... : 1200
CCCAGCATGATGCCAGAGGTGCGCATCCAGGCTGCTGCGGCTGTTTCCACAGCTTTCCAA

*      1220      *      1240      *      1260
NC_009146. : ..... : 1260
GPRIN3-mRN : ..... : 1260
Solid      : ..... : 1260
WhitePatch : .....T..... : 1260
GGAGAAAGTCAATCAGTGAGCCCATcGGCTGAGGTCTTAAAACCTCATCCACCCTTGTG

*      1280      *      1300      *      1320
NC_009146. : ..... : 1320
GPRIN3-mRN : ..... : 1320
Solid      : ..... : 1320
WhitePatch : ..... : 1320
GCATCCAGTAAGGCCCAGGATACGGGTAAGAAGATGGGAGGTCAGCAGGAGTGACCCCA

*      1340      *      1360      *      1380
NC_009146. : ..... : 1380
GPRIN3-mRN : ..... : 1380
Solid      : ..... : 1380
WhitePatch : ..... : 1380
GTGAGGGAAGAGCCCACCTCTAAACAGCTTTTCGGGAACATAATTCTAGCTCCCTGAAAGCT

*      1400      *      1420      *      1440
NC_009146. : ..... : 1440
GPRIN3-mRN : ..... : 1440
Solid      : ..... : 1440
WhitePatch : .....T..... : 1440
AGCCCCAcGGACCAGATTTCTCTCAGTGGGGACAATCAAGCTGAAACGAGTCGTGGCTTA

*      1460      *      1480      *      1500
NC_009146. : ..... : 1500
GPRIN3-mRN : ..... : 1500
Solid      : ..... : 1500
WhitePatch : .....A..... : 1500
GGGAAACCTGAAACCAAGTCGTCCGAGTTTGCAGTgAAAACCACAAATGACCACAAAACA

*      1520      *      1540      *      1560
NC_009146. : ..... : 1560
GPRIN3-mRN : ..... : 1560
Solid      : ..... : 1560
WhitePatch : ..... : 1560
GACCCAGATTGCAAATTCGCCGGCTCTTGTGGCCCTGCCAGCAAAGCTGACCCGCTGGG

```

Figure 14 (Continued)

```

*      1580      *      1600      *      1620
NC_009146. : ..... : 1620
GPRIN3-mRN : ..... : 1620
Solid      : ..... : 1620
WhitePatch : ..... : 1620
AGCTTGGATCCCAATAATAAAGGAGATGCGAGAGAAAAGAGCCTGCGTCCCCTCAGATA

*      1640      *      1660      *      1680
NC_009146. : ..... : 1680
GPRIN3-mRN : ..... : 1680
Solid      : ..... : 1680
WhitePatch : ..... : 1680
GTAAAAGAACAAGAATCTAGCGGCACCGATGTCCTCGATGCAAGAGCAAAGGCAGAGGGC

*      1700      *      1720      *      1740
NC_009146. : ..... : 1740
GPRIN3-mRN : ..... : 1740
Solid      : ..... : 1740
WhitePatch : ..... : 1740
AAAACCCTACTGCTCAACCCTAGATCTCAAGAAAGTGGAGGCACGGGATCAGCTGCCAGC

*      1760      *      1780      *      1800
NC_009146. : ..... : 1800
GPRIN3-mRN : ..... : 1800
Solid      : ..... : 1800
WhitePatch : ..... : 1800
CCCACCCCATCCCCAGTTAGAAGGAACCAGGAGGGCGCCGTGGAAGAAAgCAGACAGACC

*      1820      *      1840      *      1860
NC_009146. : ..... : 1860
GPRIN3-mRN : ..... : 1860
Solid      : ..... : 1860
WhitePatch : ..... : 1860
AAGACAACCGCCAGCCTGAGCCTGCCGTCTGATTCCTGGGCGACTCCAGTCCAAGTTCT

*      1880      *      1900      *      1920
NC_009146. : ..... : 1920
GPRIN3-mRN : ..... : 1920
Solid      : ..... : 1920
WhitePatch : ..... : 1920
GGCAAGAAGACCCCTTCTCGCTCGGTCAAAGCCAGCCCGCCGCGGCAGCCGGGTCAGC

*      1940      *      1960      *      1980
NC_009146. : ..... : 1980
GPRIN3-mRN : ..... : 1980
Solid      : ..... : 1980
WhitePatch : ..... : 1980
GAGTTCCTCAAGGAGCAGAAGCTCAACGTGACCGGGCTGCGGCTCAGGTGGGACTCACG

*      2000      *      2020      *      2040
NC_009146. : ..... : 2040
GPRIN3-mRN : ..... : 2040
Solid      : ..... : 2040
WhitePatch : ..... : 2040
CCCGGGGAGAAGAAAAGCAGCTCGGTGCCGACGCCAAGCTCCAGCTGAAGCAGTCCAAG

*      2060      *      2080      *      2100
NC_009146. : ..... : 2100
GPRIN3-mRN : ..... : 2100
Solid      : ..... : 2100
WhitePatch : ..... : 2100
CGTGTCAGGGACGTCGTGTGGGATGAGCAGGGCATGACCTGGGAAGTGTACGGCGCCTCG

```

Figure 14 (Continued)

```

*      2120      *      2140      *      2160
NC_009146. : ..... : 2160
GPRIN3-mRN : ..... : 2160
Solid      : ..... : 2160
WhitePatch : ..... : 2160
CTGGACCCCGAGTCCCTGGGGATCGCCATCCAGAACCATTTACAAAGACAAATCAGAGAA

*      2180      *      2200      *      2220
NC_009146. : ..... : 2220
GPRIN3-mRN : ..... : 2220
Solid      : ..... : 2220
WhitePatch : ..... : 2220
CACGAGAAATTAGTCAAAGCTCAAAACAGCCAGACCCGGAGATCCATTTCTCAGATGCT

*      2240      *      2260      *      2280
NC_009146. : ..... : 2280
GPRIN3-mRN : ..... : 2280
Solid      : ..... : 2280
WhitePatch : ..... : 2280
TCTTCAAATAAAAAGCTCAAAGGAAGGCAGCACAGCGTTTCCAGTCCATGCTGCAGAAC

*      2300      *      2320      *      2340
NC_009146. : ..... : 2340
GPRIN3-mRN : ..... : 2334
Solid      : ..... : 2340
WhitePatch : ..... : 2340
TTCCGTCGCCCAACTGCTGTGTTCGTCCCGCCCTTCTTCTGTGTTAGATTGAAaagaa

*      2360      *      2380      *      2400
NC_009146. : ..... : 2400
GPRIN3-mRN : ..... : -
Solid      : ..... : 2400
WhitePatch : ..... : 2400
cgtgtgtggagcccttgtatgcattttcggtcttcgtgggtgttggtctctgtcaagct

*      2420      *      2440      *      2460
NC_009146. : ..... : 2460
GPRIN3-mRN : ..... : -
Solid      : ..... : 2460
WhitePatch : ..... : 2460
taggtaggtttttttctgagaccaggaagagaagcaagtattaactatagaaaattgct

*      2480      *      2500      *      2520
NC_009146. : ..... : 2520
GPRIN3-mRN : ..... : -
Solid      : ..... : 2520
WhitePatch : ..... : 2520
attgagaactatggggctcccttgattgggcctccataaataaaaaatatcatttcaattag

*      2540      *      2560      *      2580
NC_009146. : ..... : 2580
GPRIN3-mRN : ..... : -
Solid      : ..... : 2580
WhitePatch : ..... : 2580
aaagaactagagaagagaagcaagtttcactgagggtttatgaccttaattaagaggaaa

*      2600      *      2620      *      2640
NC_009146. : ..... : 2640
GPRIN3-mRN : ..... : -
Solid      : ..... : 2640
WhitePatch : ..... : 2640
caatattcactgggttttttaatatgggtgtggcttgtaaaactatcataatcggtataca

```

Figure 14 (Continued)

```

*      2660      *      2680      *      2700
NC_009146. : ..... : 2700
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 2700
WhitePatch : .....G..... : 2700
           tgtgtcattttgtattactgcctca tttatcacactgtggtgtttccattaaggtccct

*      2720      *      2740      *      2760
NC_009146. : ..... : 2760
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 2760
WhitePatch : ..... : 2760
           gctttatattaaaaatagtaataaacactattagcaaaaacactgttatactttctagtcc

*      2780      *      2800      *      2820
NC_009146. : ..... : 2820
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 2820
WhitePatch : ..... : 2820
           tgttgcaataagaatgctgttaccacataaaaatttaagtagatgataagaactataatgt

*      2840      *      2860      *      2880
NC_009146. : ..... : 2880
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 2880
WhitePatch : ..... : 2880
           aaaaagttgaacaaatctgactcagatgatattcagtaaaagcatttaaatgcataaaa

*      2900      *      2920      *      2940
NC_009146. : ..... : 2940
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 2940
WhitePatch : ..... : 2940
           tagcaaatatgaattaatatttgtaaacatctgtagagaacccttttataaacgttgtt

*      2960      *      2980      *      3000
NC_009146. : ..... : 3000
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 3000
WhitePatch : ..... : 3000
           atacctgttaataaatgtaagaaagtatattaggaaaattagctaagcttttgactgcc

*      3020      *      3040      *      3060
NC_009146. : ..... : 3060
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 3060
WhitePatch : ..... : 3060
           cacataaaacatgaattttatttatataggttttcctgcactgaaggcgaggtgcatctct

*      3080      *      3100      *      3120
NC_009146. : ..... : 3120
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 3120
WhitePatch : ..... : 3120
           gtgattatgaccagattaaatccatatttccttaccggagaggaaggacaggccactgaa

*      3140      *      3160      *      3180
NC_009146. : ..... : 3180
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 3180
WhitePatch : ..... : 3180
           ttcttgaagagatcatcgaaattattgataatgctaaaattttacggaggtgttctccact

```

Figure 14 (Continued)



```

*      3200      *      3220      *      3240
NC_009146. : ..... : 3240
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 3240
WhitePatch : ..... : 3240
           gacattctactgagaatgttaaggttctggtgaggaatcataaatagccaattaccaaac

*      3260      *      3280      *      3300
NC_009146. : ..... : 3300
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 3300
WhitePatch : ..... : 3300
           actctttttctggttgaaaaaacgaaagcatcctgagtaacaaaaacagtatgtttaa

*      3320      *      3340      *      3360
NC_009146. : ..... : 3360
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 3360
WhitePatch : ..... : 3360
           tttagacttgtaaacaggatgtagttttctcttgcttggttcagtagcttctaataga

*      3380      *      3400      *      3420
NC_009146. : ..... : 3420
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 3420
WhitePatch : ..... : 3420
           aaatgaagtcagcaccacagtaggacatgagctttctcacagtttttgtgtgtagactggg

*      3440      *      3460      *      3480
NC_009146. : ..... : 3480
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 3480
WhitePatch : ..... : 3480
           gccccctgattgcttaagtttctaatactggtgtaaaaaggtaacctctgcagccttattg

*      3500      *      3520      *      3540
NC_009146. : ..... : 3540
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 3540
WhitePatch : ..... : 3540
           attttaagagaaataccatcggatctcatcctctgatcccaataaaaaggagaggcctttc

*      3560      *      3580      *      3600
NC_009146. : ..... : 3600
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 3600
WhitePatch : ..... : 3600
           ctagagcacagtttgagcttgggtgacctatggcccttgagagccctcacctgtctctg

*      3620      *      3640      *      3660
NC_009146. : ..... : 3660
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 3660
WhitePatch : ..... : 3660
           caagaggagcatgtccctgggacctgaggtgtcttgagggcaccagctgggatgacca

*      3680      *      3700      *      3720
NC_009146. : ..... : 3720
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 3720
WhitePatch : ..... : 3720
           gcagtggtgaggggttggtactgtgaagaggagcgtgagccagggcccgaggcgcct

```

Figure 14 (Continued)

```

*      3740      *      3760      *      3780
NC_009146. : ..... : 3780
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 3780
WhitePatch : ..... : 3780
           ccctcctggagtcaccaaaggagagcgctggtctccacctgtatttagaaaaatcagac

*      3800      *      3820      *      3840
NC_009146. : ..... : 3840
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 3840
WhitePatch : ..... : 3840
           cgttgacgttgagggggtgctggttgccttctctggactcattcccctcgatgagccag

*      3860      *      3880      *      3900
NC_009146. : ..... : 3900
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 3900
WhitePatch : ..... : 3900
           aagagagtgtccggccatctattctctctccagagactcataaatgccatttgtgctgta

*      3920      *      3940      *      3960
NC_009146. : ..... : 3960
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 3960
WhitePatch : ..... : 3960
           aattcccaatctctgctttggctttttttttttttttttttttcattttaattctcttttgc

*      3980      *      4000      *      4020
NC_009146. : ..... : 4020
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 4020
WhitePatch : ..... : 4020
           agactctgaacatatgagggaaaatcacactggaacttcaacaccacaagctacactgaa

*      4040      *      4060      *      4080
NC_009146. : ..... : 4080
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 4080
WhitePatch : ..... : 4080
           cacaacctacattagttaatagccattgatgtctttcaaagcaattggactgtacatgaa

*      4100      *      4120      *      4140
NC_009146. : ..... : 4140
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 4140
WhitePatch : ..... : 4140
           gcctgcatacgtagaccctggtcacagcattctcagagcctgacaacgtaattacagttg

*      4160      *      4180      *      4200
NC_009146. : ..... : 4200
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 4200
WhitePatch : ..... : 4200
           ttatacttggaacttatagtgaatttttaattaggcacatttttcagttttttatcaat

*      4220      *      4240      *      4260
NC_009146. : ..... : 4260
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 4260
WhitePatch : ..... : 4260
           tggcctctattaagaatgctgtctaaagtagaaattatcatctaattagcaatcagatga

```

Figure 14 (Continued)

```

*      4280      *      4300      *      4320
NC_009146. : ..... : 4320
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 4320
WhitePatch : ..... : 4320
           ctattaatgattagagatctagctctaaaactctctcttttggccttaaataccattgt

*      4340      *      4360      *      4380
NC_009146. : ..... : 4380
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 4380
WhitePatch : ..... : 4380
           attgttggtgttcgtggcgcgctctgtgggagatgcctttgccatctctcgctcactgcct

*      4400      *      4420      *      4440
NC_009146. : ..... : 4440
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 4440
WhitePatch : ..... : 4440
           acttccttaccggtggcatagctgccgtgacacagagaacacacctgtgtacacag

*      4460      *      4480      *      4500
NC_009146. : ..... : 4500
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 4500
WhitePatch : ..... : 4500
           tagcagctgtcaacagtaaccactccagatgggtgggcccagggttgcctctgctgga

*      4520      *      4540      *      4560
NC_009146. : ..... : 4560
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 4560
WhitePatch : ..... : 4560
           agtggctagcacaggctgttcctgcattaaaaggagagaaaaggaagaattcagcatctg

*      4580      *      4600      *      4620
NC_009146. : ..... : 4620
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 4620
WhitePatch : ..... : 4620
           gtaataatattttatctcatgagttggagtaatcacatgatttataaatagttcagtga

*      4640      *      4660      *      4680
NC_009146. : ..... : 4680
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 4680
WhitePatch : ..... : 4680
           agcagaggcctaagagagttgttaggcatttgtcaaataattaacttaattagttaatttaa

*      4700      *      4720      *      4740
NC_009146. : ..... : 4740
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 4740
WhitePatch : ..... : 4740
           tttaaactaaatttggtgtgtcgtgtgcctctcaaattgaaacttactgtttgatgta

*      4760      *      4780      *      4800
NC_009146. : ..... : 4800
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 4800
WhitePatch : ..... : 4800
           gtaactctaactggttttctttggtgctggaactaacctttacttcttaatctttat

```

Figure 14 (Continued)

```

*      4820      *      4840      *      4860
NC_009146. : ..... : 4860
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 4860
WhitePatch : ..... : 4860
           ttaccttttagtctttacttctaccacactctaagattgtcacaaaatattacaaaagct

*      4880      *      4900      *      4920
NC_009146. : ..... : 4920
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 4920
WhitePatch : ..... : 4920
           ttcttggtgctattgaaatctcctaaaaagaacagcttttataaaacagtagcagaaataga

*      4940      *      4960      *      4980
NC_009146. : ..... : 4980
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 4980
WhitePatch : ..... : 4980
           ttatcaaattggataaataagataggagcctattcaagacagcagtggttttgcattgtga

*      5000      *      5020      *      5040
NC_009146. : ..... : 5040
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 5040
WhitePatch : ..... : 5040
           tagcctagatgttctcacagtaaaacttttttttttaagattttattttttcttt

*      5060      *      5080      *      5100
NC_009146. : ..... : 5100
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 5100
WhitePatch : ..... : 5100
           ttctcccaaaagccccagctacatagttgtatattcttcattgtgggtccttctagttg

*      5120      *      5140      *      5160
NC_009146. : ..... : 5160
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 5160
WhitePatch : ..... : 5160
           tggcatgtgggacgctgcctcagcgtgggtctgatgagcgggtgccatgtccgcacccagga

*      5180      *      5200      *      5220
NC_009146. : ..... : 5220
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 5220
WhitePatch : ..... : 5220
           tttgaaccgacgaaactggggccgcctgcagcggagcgcggaacttaaccgctcggcc

*      5240      *      5260      *      5280
NC_009146. : ..... : 5280
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 5280
WhitePatch : ..... : 5280
           acggggccagcccctcacagtaaaacttttattgaaaattttccttcaacttgacgtgt

*      5300      *      5320      *      5340
NC_009146. : ..... : 5340
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 5340
WhitePatch : ..... : 5340
           gacgcagcatagaccttcggtacatcatttgtgagtccttaggttcattcaacaaatgaa

```

Figure 14 (Continued)

```

*      5360      *      5380      *      5400
NC_009146. : ..... : 5400
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 5400
WhitePatch : ..... : 5400
           ggtgcaaagctttgttcacagcatggcagcctctttgaacttgctctgctgttccttagc

*      5420      *      5440      *      5460
NC_009146. : ..... : 5460
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 5460
WhitePatch : ..... : 5460
           tgcattggcacacatggggttgaaagccgtttgttttctttcttaaacagtagtaaaag

*      5480      *      5500      *      5520
NC_009146. : ..... : 5520
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 5520
WhitePatch : ..... : 5520
           acagatgagttagaacagtttctggaagacaatgaaacatttaaaatgctaagatgctat

*      5540      *      5560      *      5580
NC_009146. : ..... : 5580
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 5580
WhitePatch : ..... : 5580
           acaacttaccagtggaatactagaatttttaatttaaatattgattttgctatttttatg

*      5600      *      5620
NC_009146. : ..... : 5620
GPRIN3-mRN : ----- : -
Solid      : ..... : 5620
WhitePatch : ..... : 5620
           accgcaagaaaaatgcatcgcttcagctgtcacatgttt

```

Figure 14 (Continued)

```

          *           20           *           40           *
GPRIN3-mRN : MGTVPDPLRSATTSLIAASGKEEVPVAVSPPPQSALLCENTNGLSDAPAEP : 50
GPRIN3-SNP : MGTVPDPLRSATTSLIAASGKEEVPVAVSPPPQSALLCENTNGLSDAPAEP : 50
          MGTV D  RSATTS  AASGK  V AVS   SA  C NTNG SDA  A

          60           *           80           *           100
GPRIN3-mRN : DLSPRAATKALMHACEHETTQPDMSSPGIFNEVEKASPTLNSPGNTLLPG : 100
GPRIN3-SNP : DLSPRAATKALMHACEHETTQPDMSSPGIFNEVEKASPTLNSPGNTLLPG : 100
          D S RAATKA MHAC H TT  DMSS G  N V KAS T NS GNT  G

          *           120           *           140           *
GPRIN3-mRN : SSEPTAPGPHSAAGKDLINTAFIMPATQHHTHQAIPGDQPNASPSSGPEDM : 150
GPRIN3-SNP : SSEPTAPGPHSAAGKDLINTAFIMPATQHHTHQAIPGDQPNASPSSGPEDM : 150
          SS  TA G HSAAGK  NTA  M AT HTH A  GD  NAS SSG  DM

          160           *           180           *           200
GPRIN3-mRN : LVKSQGTSDGEQPEKSTCPVGGTLLSSNDQVPCDFPSQETIQGAVHTAKA : 200
GPRIN3-SNP : LVKSQGTSDGEQPEKSTCPVGGTLLSSNDQVPCDFPSQETIQGAVHTAKA : 200
          VKS  GTSDG   KSTC VGGT SSSND V CD  S  T  GAVHTAKA

          *           220           *           240           *
GPRIN3-mRN : ATKAFSHAPSPGQRQPAVCGSQARSCESPAREDGCSGKQPSATASDAQ : 250
GPRIN3-SNP : ATKAFSHAPSPGQRQPAVCGSQARSCESPAREDGCSGKQPSATASDAQ : 250
          ATKA SHA S  G R  AVCGS ARSC S AR DGCSGK  SATASDA

          260           *           280           *           300
GPRIN3-mRN : PVTSVTPPPSHLTSKGSFPADPEKVLLPAQHQASRFKEAGTMTSQGEEGE : 300
GPRIN3-SNP : PVTSVTPPPSHLTSKGSFPADPEKVLLPAQHQASRFKEAGTMTSQGEEGE : 300
          VTSVT  SH TSKGS  AD  KV  A H ASR K AGTMTS G  G

          *           320           *           340           *
GPRIN3-mRN : IREVPSRARQDAEVQAVASVESRSVSTSPSILTALLKETPAPERFEQQEQ : 350
GPRIN3-SNP : IREVPSRARQDAEVQAVASVESRSVSTSPSILTALLKETPAPERFEQQEQ : 350
          R V SRAR DA V AVASV SRSVSTS S  TA  K T A  R

          360           *           380           *           400
GPRIN3-mRN : LRVICHGRGSGSHTLELSDNTIAPPEESGQCPSMMPEVRIQAAA AVSTAFQ : 400
GPRIN3-SNP : LRVICHGRGSGSHTLELSDNTIAPPEESGQCPSMMPEVRIQAAA AVSTAFQ : 400
          RV CHGRGSGSHT  SDNT A  SG C SMM  VR  AAAAVSTA

          *           420           *           440           *
GPRIN3-mRN : GESQSVSPAEVLKTSSTLVASSKAQDTGKEDGRSAGVTPVREEPTSKQL : 450
GPRIN3-SNP : GESQSVSPLAEVLKTSSTLVASSKAQDTGKEDGRSAGVTPVREEPTSKQL : 450
          G S SVS  A V KTSST VASSKA DTGK DGRSAGVT VR  TSK

          460           *           480           *           500
GPRIN3-mRN : SGTNSSSLKASPTDQISLSGDNQAETSRGLGKPKETKSSEFAVKTTNDHKT : 500
GPRIN3-SNP : SGTNSSSLKASPTDQISLSGDNQAETSRGLGKPKETKSSEFAVKTTNDHKT : 500
          SGTNSSS KAS  D  S S GDN A TSRG GK  TKSS  AVKTTNDHKT

```

Figure 15. Amino acid sequences of the *GPRIN3*. Reference sequences was from GenBank (GPRIN3-mRN is the accession number XP\_005608638).

```

          *           520           *           540           *
GPRIN3-mRN : DPDCKFAGSCGPASKADPSGSLDPNNKGDAREKKPASPQIVKEQESSGTD : 550
GPRIN3-SNP : DPDCKFAGSCGPASKADPSGSLDPNNKGDAREKKPASPQIVKEQESSGTD : 550
          D DCK AGSCG ASKAD SGS D NNKGDAR KK AS  VK  SSGTD

          560           *           580           *           600
GPRIN3-mRN : AEGKTLNPRSQESGGTGSAASTPSPVRRNQEGAVEESRQTKTTASLS : 600
GPRIN3-SNP : AEGKTLNPRSQESGGTGSAASTPSPVRRNQEGAVEENRQTKTTASLS : 600
          A GKT  N RS  SGGTGSAA S T S VRRN GAV  SR TKTTAS S

          *           620           *           640           *
GPRIN3-mRN : LPSDSLGDSSPSSGKKTSPRSVKASPRRGSRVSEFLKEQKLNVTAAAAQV : 650
GPRIN3-SNP : LPSDSLGDSSPSSGKKTSPRSVKASPRRGSRVSEFLKEQKLNVTAAAAQV : 650
          SDS GDSS SSGKKT SRSVKAS RRGSRVS  K  K NVTAAAA V

          660           *           680           *           700
GPRIN3-mRN : GLTPGEKKKQLGADAKLQLKQSKRVRDVVWDEQGMTWEVYGASLDPESLG : 700
GPRIN3-SNP : GLTPGEKKKQLGADAKLQLKQSKRVRDVVWDEQGMTWEVYGASLDPESLG : 700
          G T G KKK  GADAK  K SKRVRDVVWD  GMTW VYGAS D  S G

          *           720           *           740           *
GPRIN3-mRN : IAIQNHLQRQIREHEKLVKAQNSQTRRSISSDASSNKKLKGRQHSVFQSM : 750
GPRIN3-SNP : IAIQNHLQRQIREHEKLVKAQNSQTRRSISSDASSNKKLKGRQHSVFQSM : 750
          A NH  R  R H K VKA NS TRRS SSDASSNKK KGR HSV  SM

          760           *
GPRIN3-mRN : LQNFRRPNCCVRPAPSSVLD* : 770
GPRIN3-SNP : LQNFRRPNCCVRPAPSSVLD* : 770
          N RR NCCVR A SSV D

```

Figure 15 (Continued)

*TIGD2* 유전자는 말의 3번 염색체 48,945,077bp에서 48,948,335bp에 reverse strand 방향으로 위치하고 있다(Figure 16). *TIGD2* 유전자는 1개의 coding exon으로 구성되어 있으며 525개의 아미노산 서열을 암호화한다. 단색(solid) 모색과 토비아노(Tobiano) 모색에서 얻은 *TIGD2* 유전자의 DNA 서열을 기존에 보고된 Throughbred *TIGD2* 서열(XM\_005608623)과 비교했을 때, 총 4개의 SNP (c.483G>A, c.996A>G, c.1175G>A, c.\*152G>A)가 확인되었다(Figure 17). SNP 중 coding 영역에 있는 c.483G>A와 c.996A>G는 침묵 돌연변이로 확인됐으며, 단색 모색과 토비아노 모색 간의 염기서열 차이가 없는 것으로 확인됐다. c.1175G>A는 아미노산 서열을 p.392S>N (Ser>Asp)로 치환되는 것으로 확인되었으나, 단색 모색과 토비아노 모색 간의 염기서열 차이는 없었다.(Figure 17). c.397\_398insC의 reference amino acid 서열을 확인한 결과 아미노산 코돈이 x로 표기되어 DNA 염기서열 오류로 추정된다. *TIGD2* 유전자 3'-UTR에 위치한 c.\*152G>A SNP는 단색 모색과 토비아노 모색 간의 염기서열에 차이가 있는 것으로 확인되었다 (Figure 18).



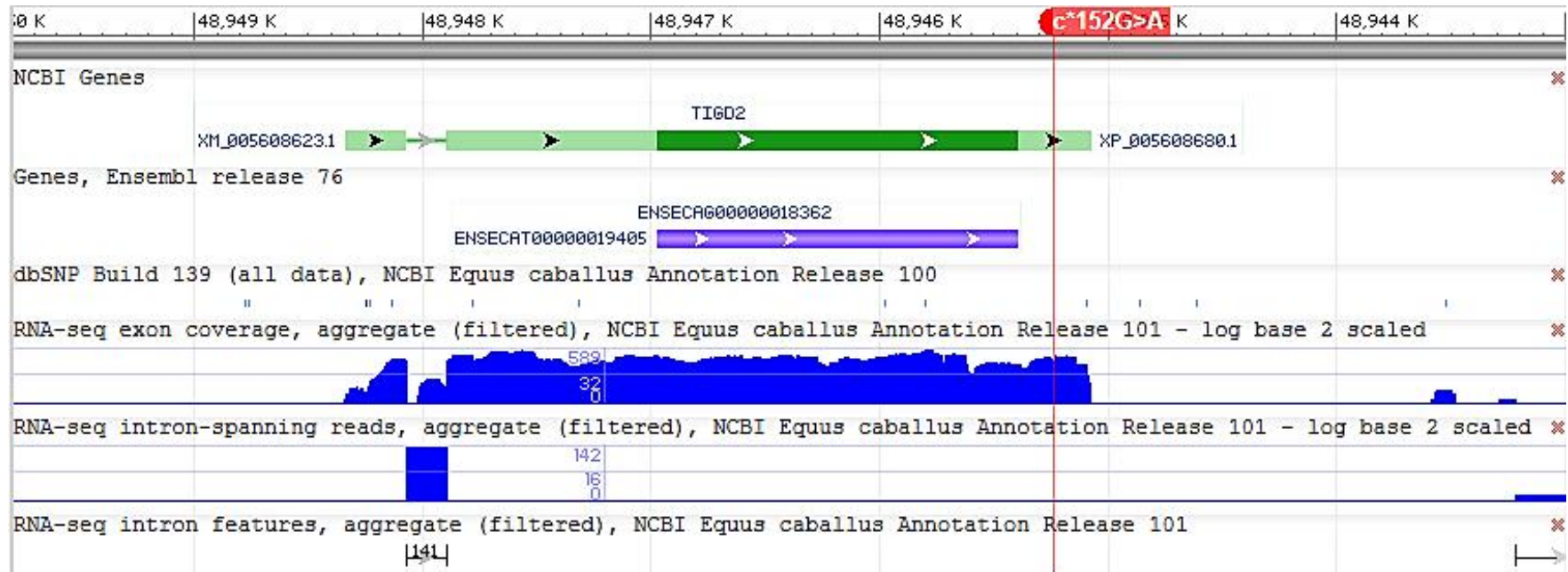


Figure 16. *TIGD2* gene structure. *TIGD2* gene has one coding exon and include the 525 amino acid sequence. Four SNPs are identified (c.483G>A, c.996A>G, c.1175G>A, c.\*152G>A).

```

*          20          *          40          *          60
TIGD2-cods : ..... : 60
Solid-1    : ..... : 60
WhitePatch : ..... : 60
ATGTTGGGGAAACGTAAGCGTGTAGTGTGGACAATTAAGGACAAGCTTGAGATTATTAAG

*          80          *          100         *          120
TIGD2-cods : ..... : 120
Solid-1    : ..... : 120
WhitePatch : ..... : 120
AAACTTGAGGAAGGCATATCTTTCAAAAACTTCTGTGGTGTATGGAATTGGGGAATCC

*          140         *          160         *          180
TIGD2-cods : ..... : 180
Solid-1    : ..... : 180
WhitePatch : ..... : 180
ACAGTTCGTGACATTAAGAAAGCAAAAGAAAGGATAATAAACTATGCAAACAGTTCAGAT

*          200         *          220         *          240
TIGD2-cods : ..... : 240
Solid-1    : ..... : 240
WhitePatch : ..... : 240
CCTACTAGTGAGGTATCCAAACGTAAATCCATGAAGTCATCGACATATGAAGAAGTGGAT

*          260         *          280         *          300
TIGD2-cods : ..... : 300
Solid-1    : ..... : 300
WhitePatch : ..... : 300
AGAGTTATGATAGAGTGGTTTAAACCAACAGAAAACAGATGGGATTCCAGTGTCTGGAACA

*          320         *          340         *          360
TIGD2-cods : ..... : 360
Solid-1    : ..... : 360
WhitePatch : ..... : 360
ATTGTGCAAAAACAAGCCAAGTTCTTTTTTGATGCATTGGGGATGGAAGGTGATTTTAAT

*          380         *          400         *          420
TIGD2-cods : ..... : 419
Solid-1    : ..... : 420
WhitePatch : ..... : 420
GCATCCTCTGGCTGGCTAACTCGATTTAAGCAGCGCcACGGTATTCCAAGGCGGCTGGT

*          440         *          460         *          480
TIGD2-cods : ..... : 479
Solid-1    : ..... : 480
WhitePatch : ..... : 480
AAAGGAACAAAATTAAGGAGATGAAACGGCTGCCAGTGAATTTTGTGGTAACTTTCAG

*          500         *          520         *          540
TIGD2-cods : ..g..... : 539
Solid-1    : ..... : 540
WhitePatch : ..... : 540
GAaTTTGTGAGAGAGAGAATCTACAACCAGAGCAAATTTATGGTGTGATCAAACCTGGA

*          560         *          580         *          600
TIGD2-cods : ..... : 599
Solid-1    : ..... : 600
WhitePatch : ..... : 600
TTGTTCTGGAATGTCTACCATCTAGGACCTTAGCCCTTGAAACTGAGCAGACTACTTCT

```

Figure 17. Nucleotide sequences and mutations of the complete *TIGD2*. Reference sequences was from GenBank (TIGD2-cods is the accession number XM\_005608623). Dotes indicate identical sequence to Thoroughbred.

```

*           620           *           640           *           660
TIGD2-cods : ..... : 659
Solid-1    : ..... : 660
WhitePatch : ..... : 660
GGTTATAGGTCAAGCAGAGAGAGAATCATTATTATGTGCTGTGCAAATGCCACAGGCTTA

*           680           *           700           *           720
TIGD2-cods : ..... : 719
Solid-1    : ..... : 720
WhitePatch : ..... : 720
CACAAACTTAATCTTTGTGTTGTGGAAAAGCAAAAAACCCCGTCATTCAAAGGAGCT

*           740           *           760           *           780
TIGD2-cods : ..... : 779
Solid-1    : ..... : 780
WhitePatch : ..... : 780
GACCTTTCAAACCTTCCTGTAACCTATTTTCAGTCAAAAAAGTGCATGGATAGAACATTCT

*           800           *           820           *           840
TIGD2-cods : ..... : 839
Solid-1    : ..... : 840
WhitePatch : ..... : 840
GTTTTTCAGACAGTGGTTTGAGAAATACTTTGTGCCACAGGTACAGAAGCATTGAAATCC

*           860           *           880           *           900
TIGD2-cods : ..... : 899
Solid-1    : ..... : 900
WhitePatch : ..... : 900
AAGGGGCTTCTAGAAAAAGCAGTGCTTCTTTTGGATTTTCCCCCAGCACATCCACATGAA

*           920           *           940           *           960
TIGD2-cods : ..... : 959
Solid-1    : ..... : 960
WhitePatch : ..... : 960
GAATTGTTGAGTTCAGATGATGGCAGAATAGTTGTGAAATACTTGCCACCAAATGTCACA

*           980           *           1000          *           1020
TIGD2-cods : ..... : 1019
Solid-1    : ..... : 1020
WhitePatch : ..... : 1020
AGTCTTATTCAACCTATGAGCCAGGGAGTTCTAGCgACAGTAAAAAGATACTACCGAGCA

*           1040          *           1060          *           1080
TIGD2-cods : ..... : 1079
Solid-1    : ..... : 1080
WhitePatch : ..... : 1080
GGACTTCTCCAGAAATACATGGATGAAGGAATTGACCCAAAAATGTTTTGGAAGAACTTA

*           1100          *           1120          *           1140
TIGD2-cods : ..... : 1139
Solid-1    : ..... : 1140
WhitePatch : ..... : 1140
ACAGTGTGGATGCCATTTATGAAGTATCAAGAGCTTGGAACATGGTAAAATCAAGTACT

*           1160          *           1180          *           1200
TIGD2-cods : ..... : 1199
Solid-1    : ..... : 1200
WhitePatch : ..... : 1200
ATAACAAAAGCATGGAGAAAACCTTTCCCTGGCAaTGAAGAGAATTCAGGCATGAACATT

*           1220          *           1240          *           1260
TIGD2-cods : ..... : 1259
Solid-1    : ..... : 1260
WhitePatch : ..... : 1260
GATGAAGGAGCCATTTTAGCAGCTAACTTAGCAACGGTTTTGCAGAATACAGAAGACTGT

```

Figure 17 (Continued)

```

*      1280      *      1300      *      1320
TIGD2-cods : ..... : 1319
Solid-1    : ..... : 1320
WhitePatch : ..... : 1320
GAACACGCTGACATTGAGAATATTGATCAGTGGTTTGAATCTCCGAGTAATGACTCAAGC

*      1340      *      1360      *      1380
TIGD2-cods : ..... : 1379
Solid-1    : ..... : 1380
WhitePatch : ..... : 1380
TGTCAGGTGCTGACTGACAGTGAAGGTGCAGAGGACCAGGCCAAGCCTGCTGAACAAAA

*      1400      *      1420      *      1440
TIGD2-cods : ..... : 1439
Solid-1    : ..... : 1440
WhitePatch : ..... : 1440
CTTCCACTAAGACCAGAAAAACAGAAGTGAATCCAGAGAAGCATATTAGCCATAAAGTT

*      1460      *      1480      *      1500
TIGD2-cods : ..... : 1499
Solid-1    : ..... : 1500
WhitePatch : ..... : 1500
GCACTTGAATGGACTGAAAATTTGCTGGATTATCTAGAACAACAAGATGACATGCTTCTG

*      1520      *      1540      *      1560
TIGD2-cods : ..... : 1559
Solid-1    : ..... : 1560
WhitePatch : ..... : 1560
TCTGATAAACTGGTATTGCGGAGGCTTAGAACGATAATAAGAAGAAAAACAGAAGATCCAG

*      1580      *      1600      *      1620
TIGD2-cods : ..... : 1577
Solid-1    : ..... : 1620
WhitePatch : ..... : 1620
AATAACAAAAGTCATTAAtgctcctaagggctcagtgatattgcatctttatgacttta

*      1640      *      1660      *      1680
TIGD2-cods : ----- : -
Solid-1    : ..... : 1680
WhitePatch : ..... : 1680
tctgcagtggaacttaattatggtatttgaagtgctgtggatttcaacgccaatacatt

*      1700      *      1720      *      1740
TIGD2-cods : ----- : -
Solid-1    : .....G..... : 1740
WhitePatch : ..... : 1740
ttataaatgattttaggattagatgccattttggattactggaattact ctctttaatg

*      1760      *      1780      *      1800
TIGD2-cods : ----- : -
Solid-1    : ..... : 1800
WhitePatch : ..... : 1800
tcaactctagtaaatgagcattgacataataacttgctgtctactgtttgtactctgtat

TIGD2-cods : ----- : -
Solid-1    : ..... : 1809
WhitePatch : ..... : 1809
tataactact

```

Figure 17 (Continued)

```

          *          20          *          40          *
TIGD2-cods : ..... : 50
Solid-1    : ..... : 50
WhitePatch : ..... : 50
          MLGKRKRVLTIKDKLEIIKKLEEGISFKKLSVVYIGIGESTVRDIKKNKE

          60          *          80          *          100
TIGD2-cods : ..... : 100
Solid-1    : ..... : 100
WhitePatch : ..... : 100
          RIINYANSSDPTSEVSKRKSMSSTYEELDRVMIEWFNQQKTDGIPVSGT

          *          120          *          140          *
TIGD2-cods : ..... : 149
Solid-1    : ..... : 150
WhitePatch : ..... : 150
          ICAKQAKFFFDALGMEGDFNASSGWLTRFKQRhGIPKAAGKGTKLKGDET

          160          *          180          *          200
TIGD2-cods : ..... : 199
Solid-1    : ..... : 200
WhitePatch : ..... : 200
          AASEFCGNFQEFVERENLQPEQIYGADQTGLFWKCLPSRTLALETEQTTS

          *          220          *          240          *
TIGD2-cods : ..... : 249
Solid-1    : ..... : 250
WhitePatch : ..... : 250
          GYRSSRERIIIMCCANATGLHKLNLVCVVGKAKKPRAFKGADLSNLPVITYF

          260          *          280          *          300
TIGD2-cods : ..... : 299
Solid-1    : ..... : 300
WhitePatch : ..... : 300
          SQKSAWIEHSVFRQWFKEYFVPQVQKHLKSKGLLEKAVLLLDFFPAHPHE

          *          320          *          340          *
TIGD2-cods : ..... : 349
Solid-1    : ..... : 350
WhitePatch : ..... : 350
          ELLSSDDGRIVVKYLPPNVTSLIQPMSQGVLATVKRYRAGLLQKYMDEG

          360          *          380          *          400
TIGD2-cods : ..... : 399
Solid-1    : ..... : 400
WhitePatch : ..... : 400
          IDPKMFWKNLTVLDAIYEVSRAWNMVKSSTITKAWRKLFPGnEENS GMNI

```

Figure 18. Amino acid sequences of the *TIGD2*. Reference sequences was from GenBank (TIGD2-cods is the accession number XP\_005608680).

```

          *           420           *           440           *
TIGD2-cods : ..... : 449
Solid-1    : ..... : 450
WhitePatch : ..... : 450
          DEGAILAANLATVLRQNTEDCEHADIENIDQWFESPSNDSSCQVLRDSEGA

          460           *           480           *           500
TIGD2-cods : ..... : 499
Solid-1    : ..... : 500
WhitePatch : ..... : 500
          EDQAKPAEQKLSKTRKTELNPEKHISHKVALEWTENLLDYLEQQDDMLL

          *           520
TIGD2-cods : ..... : 524
Solid-1    : ..... : 525
WhitePatch : ..... : 525
          SDKLVLRRRLRTIIRRKQKIQNNKSH

```

Figure 18 (Continued)

## 7. 토비아노(Tobiano) 모색과 *GPRIN3* 및 *TIGD2* 유전자의 연관관계 분석

*GPRIN3* 유전자내 6개의 SNP, *TIGD2* c.\*152G>A와 GWAS 분석 결과 유의성이 가장 높은 SNP 1개에 대해 pyrosequencing 방법으로 유전자형을 결정하여 연관관계를 분석하였다. *GPRIN3* SNPs, *TIGD2* SNP 및 BIEC2-819509 SNP의 유전자형 빈도, H-W  $p$  value, LOD score는 Table 9에 나타내었다. *GPRIN3* c.1114G>A, c.1388C>T, c.\*331A>G 및 BIEC2-819509 SNP에서는 각각 G/G, C/C, A/A, A/A 유전자형이 단색(solid) 모색에서는 0.655~0.873으로 빈도가 높은 것으로 확인되었으나 토비아노(Tobiano) 모색에서는 나타나지 않았다. 반면에 c.1114G>A는 A/A, c.1226C>T는 C/T, T/T, c.1388C>T는 T/T, c.1476G>A에서는 A/A 유전자형이 토비아노에서만 나타났으며 빈도가 0.034~0.190으로 확인되었다. c.1226C>T는 Hardy-Weinberg 평형상태를 이루지 못하는 것으로 확인되었으며 ( $p < 0.001$ ) 다른 SNP에서는 평형상태를 이루는 것으로 확인되었다. 각 SNP 별 Single marker regression model을 이용하여 LOD 값을 산출한 결과 60.9~121.2로 나타나 각 SNP는 토비아노 형질에 대해 높은 연관관계가 있는 것을 확인할 수 있었다. *GPRIN3* c.1114G>A에서는 LOD 값이 121.2로 나타나 GWAS 분석 결과 유의성이 높은 BIEC2-819509 SNP 보다 연관관계가 높았다. *TIGD2* c.\*152G>A SNP는 G/G 유전자형 빈도가 단색에서 0.979로 높게 나타났으나 토비아노에서는 출현하지 않았다. LOD 값은 206.6으로 나타나 *GPRIN3* SNPs 및 BIEC2-819509 SNP보다도 높게 나타나 *TIGD2* c.\*152G>A SNP는 토비아노 형질에 대해 매우 높은 연관관계가 있는 것을 확인할 수 있었다.

토비아노 형질에 대한 haplotype 연관관계 분석을 위해 7개의 SNP를 분석하였으며 *GPRIN3* c.1388C>T SNP는 *GPRIN3* c.1114G>A SNP와 동일한 결과를 보여 Haplotype 구성에 배제하였다. Haplotype 구성은 EM-algorithm을 이용하였고 *GPRIN3* c.1114G>A, c.1226C>T, c.1476G>A, c.1790G>A, c.\*331A>G, BIEC2-819509 SNP 및 *TIGD2* c.\*152G>A SNPs를 이용하여 추정하였다. Haplotype의 토비아노와 단색 모색에 대한 빈도, Odd ratio 및 연관관계 분석 결과는 Table 10에 나타내었다. 토비아노에서는  $h_1$ 과  $h_2$ 가 각각 0.327과 0.396으로

빈도가 높았으며, 단색에서는 h1의 빈도가 0.676으로 높게 나타났고 h2 빈도는 0.007로 낮게 나타났다. Haplotype 별 Odd ratio를 분석한 결과 h2 haplotype에서 Odd ratio가 268.3으로 높게 나타났으며 토비아노 연관관계 유의성은( $1.19 \times 10^{-31}$ ) 높은 것으로 확인되었다.

본 연구결과 *TIGD2* c.\*152G>A, *GPRIN3* c.1114G>A, *GPRIN3* c.\*331A>G 및 BIEC-819509는 토비아노와 단색 모색 간 구분을 위한 보조 marker로 이용 가능할 것으로 사료된다.



Table 9. Distribution of allele and genotype frequencies and association analysis of *GPRIN3* SNPs, BIEC2-819509 SNP and *TIGD2* SNP

SNP ID	Genotype & allele	white patch (n=58)		solid (n=142)		H-W $p$ value	LOD Score
		N	freq.	N	freq.		
<i>GPRIN3</i> c.1114G>A	G/G	0	-	124	0.873	0.751	121.2
	G/A	48	0.828	18	0.127		
	A/A	10	0.172	0	-		
	G	48	0.414	266	0.937		
	A	68	0.586	18	0.063		
<i>GPRIN3</i> c.1226C>T	C/C	46	0.793	142	1	0.001	65.4
	C/T	2	0.034	0	-		
	T/T	8	0.138	0	-		
	C	98	0.839	284	1		
	T	18	0.161	0	-		
<i>GPRIN3</i> c.1388C>T <sup>†</sup>	C/C	0	-	124	0.873	0.751	121.2
	C/T	48	0.828	18	0.127		
	T/T	10	0.172	0	-		
	C	48	0.414	266	0.937		
	T	68	0.586	18	0.063		
<i>GPRIN3</i> c.1476G>A	G/G	1	0.017	124	0.873	0.462	116.9
	G/A	46	0.793	18	0.127		
	A/A	11	0.190	0	-		
	G	48	0.414	266	0.937		
	A	68	0.586	18	0.063		
<i>GPRIN3</i> c.1790G>A	G/G	1	0.017	114	0.803	0.079	66.1
	G/A	48	0.828	19	0.134		
	A/A	9	0.155	9	0.063		
	G	50	0.431	248	0.870		
	A	66	0.569	36	0.130		
<i>GPRIN3</i> c.*331A>G	A/A	0	-	93	0.655	0.781	60.9
	A/G	44	0.759	44	0.310		
	G/G	14	0.241	5	0.035		
	A	44	0.379	230	0.810		
	G	72	0.621	54	0.190		
BIEC2-819509	A/A	0	-	119	0.838	0.269	109.5
	A/C	52	0.897	22	0.155		
	C/C	6	0.103	1	0.007		
	A	52	0.448	260	0.915		
	C	64	0.552	24	0.085		
<i>TIGD2</i> c.*152G>A	G/G	0	-	139	0.979	0.264	206.6
	G/A	55	0.948	3	0.021		
	A/A	3	0.051	0	-		
	G	54	0.474	280	0.989		
	A	62	0.526	4	0.011		

<sup>†</sup> Shown the same result as *GPRIN3* c.1114G>A.

Table 10. Haplotype frequencies and association of analysed SNPs

Haplotype (sequence)	white patch (n=58) freq.	solid (n=142) freq.	total	Odds ratio (0.95CI)	$\chi^2$	$p$ value
h1(GGCGAAG)	0.327	0.676	0.583	0.27 (0.13-0.57)	12.7	$3.6 \times 10^{-4}$
h2(AGTAGCA)	0.396	0.007	0.119	268.3 (57.9-1,343.6)	137.0	$1.19 \times 10^{-31}$
h3(GGCGGAG)	0.025	0.126	0.098	0.16 (0.04-0.54)	10.6	0.001
h4(GGCGACG)	0.025	0.066	0.055	-	-	0.155
h5(AGTAGAG)	-	0.056	0.041	-	-	0.515
h6(GGCAAAG)	-	0.049	0.035	-	-	0.642
h7(AATAGCA)	0.086	-	0.026	-	16.9	$3.8 \times 10^{-5}$
h8(AATAGAG)	0.060	-	0.016	-	14.3	$1.5 \times 10^{-4}$
h9(GGCAACG)	-	0.010	0.007	-	-	-
h10(GGCAAAN)	-	0.007	0.005	-	-	-
h11(GGCGGAA)	0.008	-	0.002	-	-	-
h12(AGCAGCA)	0.008	-	0.002	-	-	-
h13(GGTGAAG)	0.008	-	0.002	-	-	-
h14(AGTGGAG)	0.008	-	0.001	-	-	-
h15(AATGGCA)	0.008	-	0.001	-	-	-
h16(ANCAACA)	0.008	-	0.0002	-	-	-
h17(GNTGGCG)	0.017	-	0.0002	-	-	-
h18(ANCAAAA)	0.008	-	0.0000	-	-	-

## V. 요약

본 연구는 국내 유일의 재래마인 제주마의 모색 특성과 백반(얼루기) 모색의 분자 유전학적 특성 구명으로 제주마의 모색에 대한 유전학적 정립과 모색의 다양성 확보를 위한 기초자료를 확보하기 위해 수행되었다. 모색 특성은 등록제주마 1,465두, 더러브렛 119두, 교잡마(제주마×더러브렛) 228두에서 기본 모색인 가라(흑색, Black), 유마(적갈색, Bay) 그리고 적다(적색, Chestnut)와 관련 있는 *MC1R*과 *ASIP* 유전자 분석과 총마(회색, Gray)와 월라(얼루기, 백반, white patch) 모색과 관련된 것으로 알려진 *STX17*과 *ECA3-inversion*의 유전자형에 대한 분석 및 백반 관련 GWAS 분석을 수행하였다.

분석결과 제주마 집단에서는 *MC1R* 유전자의  $E^+/E^+$ ,  $E^+/E^c$  및  $E^c/E^c$  유전자형 빈도는 각각 0.122, 0.447 및 0.429로 조사되었다. 더러브렛과 교잡마에서도 제주마와 유사한 빈도를 보여주고 있으나 더러브렛에서  $E^c/E^c$  유전자형이 다소 낮게 나타났다.

*ASIP* 유전자의  $A^A/A^A$ ,  $A^A/A^a$  및  $A^a/A^a$  유전자형 빈도는 제주마에서 각각 0.46, 0.448 및 0.091로 조사되었다. *MC1R* 유전자의  $E^+/-$  유전자형과 함께 *ASIP* 유전자의  $A^a/A^a$  유전자형의 조합에 의해 흑모색이 발현되는데 제주마에서  $A^a/A^a$  유전자형이 0.091로 나타나 흑모색 발현은 5.1% 이하로 추정된다. 흑모색을 나타내는  $E^+-A^aA^a$  haplotype 빈도는 제주마, 교잡마, 더러브렛에서 각각 0.042, 0.079, 0.025로 나타나 교잡마에서 빈도가 높았으며, 적갈색 모색은 더러브렛 집단에서 빈도가 높았고 제주마와 교잡마 집단에서는 유사한 빈도를 나타냈다.

제주마에서 월라 표현형으로 발현되는  $To/To$ 와  $To/+$  유전자형이 각각 0.1%와 11.9%로 나타나 제주마의 월라 모색은 12%로 나타났다. 교잡마에서  $To/To$  유전자형은 확인되지 않았으며,  $To/+$  유전자형은 3.9%로 나타나 제주마에 비해 월라 모색 빈도가 낮게 나타났다. 반면에 더러브렛에서는  $To$  유전인자는 검출되지 않았다.

더러브렛과 교잡마에서 총마 모색을 나타내는  $G/g$  유전자형이 각각 6.7%와

5.2%로 나타나 두 집단에서는 총마의 빈도는 낮게 나타났다. 반면 제주마에서는 *G* 유전인자의 homozygote 빈도와 heterozygote 빈도가 각각 0.2%와 68%로 나타나 제주마 모색의 큰 비율을 차지하고 있는 것으로 확인되었다.

*MC1R*, *ASIP*, ECA3-inversion 인자들은 Hardy-Weinberg 평형상태를 유지하고 있었으나 제주마의 *STX17*에서 Hardy-Weinberg 평형상태를 이루지 않는 것으로 나타났다( $p < 0.001$ ). 이는 제주마 집단 유지를 위해 총마 선정시 총마모색의 총마를 선정하여 교배한 결과 총마 유전인자의 증가에 의한 것으로 사료되었다.

세대 경과에 따른 제주마 *MC1R*과 *ASIP* 유전인자 및 유전자형의 빈도는 큰 변화가 없었다. 월라 유전인자인 *To*는 0세대 0.126에서 점진적으로 감소하여 2.5세대 0.034로 나타나 제주마 월라 모색은 세대가 경과 됨에 따라 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ ). 총마를 발현하는 *STX17* 유전자의 *G* 유전인자 빈도 변화는 0세대 0.192에서 2.5세대 0.386으로 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ ). 또한 *STX17* 유전자형 빈도에서도 총마 발현 유전자형인 *G/g*의 빈도는 0세대 0.384에서 2.5세대 0.764로 2배가 증가하여 세대 경과에 따라 총마 발현 유전자와 유전자형 빈도가 급격히 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

제주마 월라 모색의 유전학적 특성 구명을 위해 Tobiano, Overo, Sabino와 관련된 인자 분석을 수행한 결과 월라 모색은 Tobiano와 관련된 ECA3-inversion에서는 모두 *To* 유전인자를 갖고 있는 것이 확인되었으며, Overo와 관련된 *EDNRB* 그리고 Sabino와 관련된 *KIT* intron 16 SNP에서는 모두 wild type으로 확인되었다. 따라서 제주마의 월라 모색은 Tobiano 형태에 속하는 것으로 사료되었다.

얼루기 모색(백반)과 염색체상 염기서열의 연관성 탐구를 위해 GWAS 분석 결과 주로 3번 염색체에서 강한 연관성을 보여주고 있었으며, 그중 유의수준  $p < 0.001$ 을 만족하는 SNP는 equine genome 내에 72개로 조사되었다. 유의성이 있는 SNP들은 3번 염색체 21Mbp부터 85.1Mbp까지 넓게 분포하였다. 가장 유의성이 높은 SNP는 48853535bp(BIEC2-819509)에 위치하였으며  $p$  value는  $1.01 \times 10^{-22}$ 으로 나타났다. 유의성이 가장 높은 SNP 좌위 인접한 지역에 *GPRIN3* 유전자와 *TIGD2* 유전자를 확인할 수 있었으며, 또한 *MC1R*과 *KIT* 유전자도 유의성 있는 지역에 존재하는 것으로 확인되었다.

*GPRIN3* 유전자의 DNA 서열을 분석한 결과 총 6개의 SNP를 확인하였고 삽입/결실 돌연변이는 발견되지 않았다. 확인된 SNP 중 c.1114G>A와 c.1476G>A는 Synonymous로 확인됐으며, c.1226C>T, c.1388C>T와 c.1790G>A는 amino acid 서열을 각각 p.372V>I (Val>Ile), p.409S>L (Ser>Leu), p.463T>M (Thr>Met)로 치환하는 것으로 확인되었다. *GPRIN3* 유전자 내 SNP와 얼루기 (Tobiano)간 연관관계를 분석한 결과 LOD 값이 60.9~121.2로 높게 나타났다. *TIGD2* 유전자에서는 4개의 SNP들을 확인하였으며, c.\*152G>A는 단색 모색과 얼루기(Tobiano) 염기서열 간 차이를 확인할 수 있었다. *TIGD2* c.\*152G>A SNP와 얼루기(Tobiano) 간 연관관계를 분석한 결과 LOD 값이 206.6으로 매우 높게 나타났다.

종합적으로 제주마의 모색 다양성은 감소하고 있는 것으로 확인되었고 특히 종마 모색 인자의 빈도가 세대의 경과에 따라 유의적으로 증가하고 있음을 확인하였다. 따라서 제주마 집단의 모색 다양성을 유지하기 위해서는 종마 선정 단계에 모색 인자의 검토가 필요한 것으로 사료되었다. 또한 제주마에서 나타나는 얼루기 모색(윌라)은 유전학적으로 토비아노(Tobiano)에 속하는 것으로 확인되었다. 얼루기(Tobiano) 관련 염기서열은 말의 3번 염색체에서 연관관계가 높은 것으로 나타났으며, *TIGD2* c.\*152G>A, *GPRIN3* c.1114G>A, *GPRIN3* c.\*331A>G 및 BIEC-819509 SNP를 확인하였고 이들 SNP들은 토비아노(Tobiano) 모색 확인을 위한 보조 마커로 이용 가능할 것으로 사료된다.

## VI. 참고문헌

- Abasht, B., Lamont, S. 2007. Genome wide association analysis reveals cryptic alleles as an important factor in heterosis for fatness in chicken F2 population. *Animal Genetics* 38(5):491-498.
- Anderson, D. J. 2000. Genes, lineages and the neural crest: a speculative review. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 355:953-964.
- Bennett, D. C., Lamoreux, M. L. 2003. The Color Loci of Mice - A Genetic Century. *Pigment Cell Research* 16:333-334.
- Bolormaa, S., Pryce, J., Hayes, B., Goddard, M. 2010. Multivariate analysis of a genome-wide association study in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 93(8):3818-3833.
- Bowling, A. T. 1987. Equine linkage group II : phase conservation of *To* with *AIB* and *GcS*. *Journal of Heredity* 78(4):248-250.
- Bowling, A. T. 2000. Genetics of colour variation. In: Bowling, A. T., Ruvinsky, A. (Eds.), *CABI Publishing, Wallingford, U.K.* page 53-56.
- Brooks, S. A., Lear, T. L., Adelson, D. L., Bailey, E. 2007. A chromosome inversion near the *KIT* gene and the Tobiano spotting pattern in horses. *Cytogenetic and Genome Research* 119:225-230.

- Brooks, S. A., Terry, R., Bailey, E. 2002. A PCR RFLP for *KIT* associated with tobiano spotting pattern in horses. *Animal Genetics* 33(4):301-303.
- Brooks, S. A., Bailey, E. 2005. Exon skipping in the *KIT* gene causes a Sabino spotting pattern in horses. *Mammalian Genome* 16(11):893-902.
- Brooks, S. A., Gabreski, N., Miller, D., Brisbin, A., Brown, H. E., Streeter, C., Mezey, J., Cook, D., Antczak, D. F. 2010. Whole-genome SNP association in the horse: identification of a deletion in myosin Va responsible for Lavender Foal Syndrome. *PLoS Genetics* 6(4):e1000909.
- Duijvesteijn, N., Knol, E. F., Merks, J. W., Crooijmans, R. P., Groenen, M. A., Bovenhuis, H., Harlizius, B. 2010. A genome-wide association study on androstenone levels in pigs reveals a cluster of candidate genes on chromosome 6. *BMC Genetics* 11(1):42.
- Dupuis, M. C., Zhang, Z., Druet, T., Denoix, J. M., Charlier, C., Lekeux, P., Georges, M. 2011. Results of a haplotype-based GWAS for recurrent laryngeal neuropathy in the horse. *Mammalian Genome* 22(9-10):613-620.
- Fan, B., Onteru, S. K., Du, Z. Q., Garrick, D. J., Stalder, K. J., Rothschild, M. F. 2011. Genome-wide association study identifies loci for body composition and structural soundness traits in pigs. *PLoS One* 6(2):e14726.
- Grindflek, E., Aasmundstad, T., Hamland, H., Hansen, M., Nome, T., Kent, M., Torjesen, P., Lien, S. 2011a. Revealing genetic relationships between compounds affecting boar taint and reproduction in pigs. *Journal of Animal Science* 89(3):680-692.

- Grindflek, E., Lien, S., Hamland, H., Hansen, M. H., Kent, M., van Son M., Meuwissen, T. H. 2011b. Large scale genome-wide association and LDLA mapping study identifies QTLs for boar taint and related sex steroids. *BMC Genomics* 12(1):362.
- Gu, X., Feng, C., Ma, L., Song, C., Wang, Y., Da, Y., Li, H., Chen, K., Ye, S., Ge, C. 2011. Genome-wide association study of body weight in chicken F2 resource population. *PLoS One* 6(7):e21872.
- Haase, B., Brooks, S. A., Schlumbaum, A., Azor, P. J., Bailey, E., Alaeddine, F., Mevissen, M., Burger, D., Poncet, P. A., Rieder, S. 2007. Allelic heterogeneity at the equine *KIT* locus in dominant white (*W*) horses. *PLoS Genetics* 3(11):e195.
- Haase, B., Jude, R., Brooks, S., Leeb, T. 2008. An equine chromosome 3 inversion is associated with the tobiano spotting pattern in German horse breeds. *Animal Genetics* 39(3):306-309.
- Han, S. H., Lee, C. E., Kim, N. Y., Ko, M. S., Jeong, H. Y., Lee, S. S. 2009. Genetic Polymorphisms of Candidate Loci and Inheritance Patterns of Gray Coat Color in Jeju Horses. *Journal of Life Science* 19:793-798.
- Hayes, B. J., Bowman, P. J., Chamberlain, A. J., Savin, K., Van Tassell C. P., Sonstegard, T. S., Goddard, M. E. 2009. A validated genome wide association study to breed cattle adapted to an environment altered by climate change. *PLoS One* 4(8):e6676.
- Hemesath, T. J., Price, E. R., Takemoto, C., Badalian, T., Fisher, D. E. 1998. MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to *c-Kit* signalling in melanocytes. *Nature* 391(6664):298-301.



- Hill, E. W., Gu, J., Eivers, S. S., Fonseca, R. G., McGivney, B. A., Govindarajan, P., Orr, N., Katz, L. M., MacHugh, D. 2010a. A sequence polymorphism in *MSTN* predicts sprinting ability and racing stamina in Thoroughbred horses. *PLoS One* 5(1):e8645.
- Hill, E. W., McGivney, B. A., Gu, J., Whiston, R., MacHugh, D. E. 2010b. A genome-wide SNP-association study confirms a sequence variant (g. 66493737C>T) in the equine myostatin (*MSTN*) gene as the most powerful predictor of optimum racing distance for Thoroughbred racehorses. *BMC Genomics* 11(1):552.
- Hirschhorn, J. N., Daly, M. J. 2005. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nature Reviews Genetics* 6(2):95-108.
- Hwangpo, T. A., Jordan, J. D., Premsrirut, P. K., Jayamaran, G., Licht, J. D., Iyengar, R., Neves, S. R. 2012. G Protein-regulated inducer of neurite outgrowth (*GRIN*) modulates sprouty protein repression of mitogen-activated protein kinase (*MAPK*) activation by growth factor stimulation. *Journal of Biological Chemistry* 287(17):13674-13685.
- Jackson, I. J. 1994. Molecular and development genetics of mouse coat colour. *Annual Reviews of Genetics* 28:189-217.
- Jennifer, Y. L., David, E. F. 2007. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 445:843-850.
- Jiang, L., Liu, J., Sun, D., Ma, P., Ding, X., Yu, Y., Zhang, Q. 2010. Genome wide association studies for milk production traits in Chinese Holstein population. *Annual Reviews of Genetics* 5(10):e13661.

- Johnston, S. E., Mcewan, J. C., Pickering, N. K., Kijas, J. W., Beraldi, D., Pikington, J. G., Pemberton, J. M., Slate, J. 2011. Genome-wide association mapping identifies the genetic basis of discrete and quantitative variation in sexual weaponry in a wild sheep population. *Molecular Ecology* 20(12):2555-2566.
- Jung, Y. H., Han, S. H., Shin, T., Oh, M. Y. 2002. Genetic characterization of horse bone excavated from the Kwakji archaeological site, Jeju, Korea. *Molecules and Cells* 14(2):224-230.
- Kijas, J., Wales, R., Tornsten, A., Chardon, P., Moller, M., Andersson, L. 1998. *Melanocortin receptor 1 (MC1R)* mutations and coat color in pigs. *Genetics* 150:1177-1185.
- Kim, K. I., Yang, Y. H., Lee, S. S., Park, C., Ma, R., Bouzat, J. L., Lewin, H. A. 1999. Phylogenetic relationships of Cheju horses to other horse breeds as determined by mtDNA D-loop sequence polymorphism. *Animal Genetics* 30(2):102-108.
- Klungland, H., Vage, D. I., Gomez-Raya, L., Adalsteinsson, S., Lien, S. 1995. The role of melanocyte-stimulating hormone (*MSH*) receptor in bovine coat color determination. *Mammalian Genome* 6:636-639.
- Lee, K. M. 1971. Studies on the old name and distribution of coat color in the Cheju Horse. *Konkuk University* 12:893-909.
- Liu, W., Li, D., Liu, J., Chen, S., Qu, L., Zheng, J., Xu, G., Yang, N. 2011. A genome-wide SNP scan reveals novel loci for egg production and quality traits in white leghorn and brown-egg dwarf layers. *PLoS One* 6(12):e28600.

- Mackenzie, M. A., Jordan, S. A., Budd, P. S., Jackson, I. J. 1997. Activation of the receptor tyrosine kinase Kit is required for the proliferation of melanoblasts in the mouse embryo. *Developmental Biology* 192:99–107.
- Mai, M., Sahana, G., Christiansen, F., Guldbrandtsen, B. 2010. A genome-wide association study for milk production traits in Danish Jersey cattle using a 50K single nucleotide polymorphism chip. *Journal of animal science* 88(11):3522–3528.
- Marklund, L., Moller, M. J., Sandberg, K., Andersson, L. 1996. A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (*MC1R*) is associated with the chestnut coat color in horses. *Mammalian Genome* 7(12):895–899.
- Meira, C. T., Farah, M. M., Fortes, M. R. S., Moore, S. S., Pereira, G. L., Silva, J. A., da Mota, M. D. S., Curi, R. A. 2014. A Genome-wide association study for morphometric traits in Quarter Horse. *Journal of Equine Veterinary Science* 34(8):1028–1031.
- Metallinos, D. L., Bowling, A. T., Rine, J. 1998. A missense mutation in the *endothelin-B* receptor gene is associated with Lethal White Foal Syndrome: an equine version of Hirschsprung disease. *Mammalian Genome* 9(6):426–431.
- Nam, D. Y. 1969. Horse production in Cheju during Lee dynasty. In: *Studies on Korean History*. Korea History Research Society, College of Letters and Sciences, Seoul National University, Seoul, South Korea 4:77–131.

- Orr, N., Back, W., Gu, J., Leegwater, P., Govindarajan, P., Conroy, J., Ducro, B., Van Arendonk, J., MacHugh, D., Ennis, S. 2010. Genome wide SNP association - based localization of a dwarfism gene in Friesian dwarf horses. *Animal Genetics* 41(s2):2-7.
- Pielberg, G., Mikko, S., Sandberg, K., Andersson, L. 2005. Comparative linkage mapping of the grey coat colour gene in horses. *Animal Genetics* 36(5):390-395.
- Pielberg, G. R., Golovko, A., Sundström, E., Curik, I., Lennartsson, J., Seltenhammer, M. H., Druml, T., Binns, M., Fitzsimmons, C., Lindgren, G. 2008. A cis-acting regulatory mutation causes premature hair graying and susceptibility to melanoma in the horse. *Nature Genetics* 40(8):1004-1009.
- Ponsuksili, S., Murani, E., Brand, B., Schwerin, M., Wimmers, K. 2011. Integrating expression profiling and whole-genome association for dissection of fat traits in a porcine model. *Journal of Lipid Research* 52(4):668-678.
- Pulos, W., Hutt, F. 1969. Lethal dominant white in horses. *Journal of Heredity* 60(2):59-63.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., Bender, D. M. J., Sklar, P., de Bakker, P. I. W., Daly, M. J., Sham, P. C. 2007. PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *American Journal of Human Genetics* 81(3):559-575.

- Ramos, A. M., Duijvesteijn, N., Knol, E. F., Merks, J. W., Bovenhuis, H., Crooijmans, R. P., Groenen, M. A., Harlizius, B. 2011. The distal end of porcine chromosome 6p is involved in the regulation of skatole levels in boars. *BMC Genetics* 12(1):35.
- R Core Team. 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Ren, J., Mao, H., Zhang, Z., Xiao, S., Ding, N., Huang, L. 2010. A 6-bp deletion in the *TYRP1* gene causes the brown colouration phenotype in Chinese indigenous pigs. *Heredity* 106(5):862–868.
- Rieder, S., Taourit, S., Mariat, D., Langlois, B., Guérin, G. 2001. Mutations in the *agouti* (*ASIP*), the *extension* (*MC1R*), and the *brown* (*TYRP1*) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*). *Mammalian Genome* 12(6):450–455.
- Schmutz, S. M., Berryere, T. G. 2007. Genes affecting coat colour and pattern in domestic dogs: a review. *Animal Genetics* 38:539–549.
- Signer-Hasler, H., Flury, C., Haase, B., Burger, D., Simianer, H., Leeb, T., Rieder, S. 2012. A genome-wide association study reveals loci influencing height and other conformation traits in horses. *PLoS One* 7(5):e37282.
- Sironen, A., Uimari, P., Nagy, S., Paku, S., Andersson, M., Vilkki, J. 2010. Knobbed acrosome defect is associated with a region containing the genes *STK17b* and *HECW2* on porcine chromosome 15. *BMC Genomics* 11(1):699.

- Smit, A., Riggs, A. D. 1996. Tiggers and DNA transposon fossils in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(4):1443-1448.
- Steel, K. P., Davidson, D. R., Jackson, I. J. 1992. TRP-2/DT, a new early melanoblast marker, shows that steel growth factor (*c-kit* ligand) is a survival factor. *Development* 115:1111-1119.
- Sulaimon, S. S., Kitchell, B. E. 2003. The biology of melanocytes. *Veterinary Dermatology* 14:57-65.
- Tetens, J., Widmann, P., Kühn, C., Thaller, G. 2013. A genome wide association study indicates *LCORL/NCAPG* as a candidate locus for withers height in German Warmblood horses. *Animal Genetics* 44(4):467-471.
- Thiruvankadan, A. K., Kandasamy, N., Panneerselvam, S. 2008. Coat colour inheritance in horses. *Livestock Science* 117(2-3):109-129.
- Thomas, A. J., Erickson, C. A. 2008. The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest. *Pigment Cell & Melanoma Research* 21:598-610.
- Valverde, P., Healy, E., Jackson, I., Rees, J. L., Thody, A. J. 1995. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nature Genetics* 11:328-330.

- Wilkie, A. L., Jordan, S. A., Jackson, I. J. 2002. Neural crest progenitors of the melanocyte lineage: coat colour patterns revisited. *Development* 129:3349-3357.
- Xie, L., Luo, C., Zhang, C., Zhang, R., Tang, J., Nie, Q., Ma, L., Hu, X., Li, N., Da, Y. 2012. Genome-wide association study identified a narrow chromosome 1 region associated with chicken growth traits. *PLoS One* 7(2):e30910.
- Yoo, J. h., Lee, Y. B., Kim, Y. J., Rha, S. Y., Kim, Y. S. 2008. SNPAnalyzer 2.0: A web-based integrated workbench for linkage disequilibrium analysis and association analysis. *BMC Bioinformatics* 9:290.
- Zhao, X., Dittmer, K. E., Blair, H. T., Thompson, K. G., Rothschild, M. F., Garrick, D. J. 2011. A novel nonsense mutation in the *DMP1* gene identified by a genome-wide association study is responsible for inherited rickets in Corriedale sheep. *PLoS One* 6(7):e21739.
- 국립축산과학원. 2012. 말 모색 유전 특성 구명(PJ906975). 축산시험연구보고서. page 14.
- 김남영, 한상현, 이성수, 이종언, 박남건, 고문석, 양영훈. 2011. 제주마의 기본모색과 *MC1R*과 *ASIP* 유전자형 조합의 상관관계. *한국동물자원과학회지* 53(2):107-111.
- 남도영. 2003. 제주도 목장사, 마문화연구총서 V. 한국마사회 마사박물관:91-108.
- 신태균. 2001. 제주 종달리패총 유적에서 출토된 동물 유물의 해부학적 연구. *대한수의학회지* 41(3):275-279.

신태균, 김승호. 1993. 제주 광지유적에서 출토된 말 뼈의 골학적 관찰. Cheju University Journal 37:85-90.

장덕지. 2007. 제주마이야기. page 13-17.



## 감사의 글

본 논문이 완성될 수 있도록 오랜 기간을 시종 지도와 격려를 아끼지 않으셨고 연구자로서의 마음가짐을 가르쳐 주신 양영훈 지도교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 부족한 논문이지만 선뜻 심사위원장을 맡아주시고 부족한 내용을 다듬어 주시느라 수고를 아끼지 않으신 정동기 교수님과 논문의 상세한 내용까지 검토 해주시고 지도해주신 오성종 교수님, 이왕식 교수님, 류연철 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 멀리서 본 논문이 완성되기까지 많은 격려와 검토를 해주신 이성수 연구관님께도 감사의 마음을 전하고 싶습니다. 새로운 연구분야와 분석 기법을 지도해주시고 많은 조언을 해주신 충남대학교 이승환 교수님께 마음속 깊이 감사함을 표현하고 싶습니다.

본 연구가 잘 마무리될 수 있도록 많은 격려와 도움을 주신 홍성구 원장님을 비롯하여 국립축산과학원 모든 분들에게 깊은 감사를 드립니다. 항상 많은 관심과 애정을 보내주시고 물심양면으로 도움을 주신 박남건 소장님께 깊은 감사의 마음을 전합니다. 한라산 관음사 기슭에서 동고동락하고 있는 고문석 장장님, 채현석 연구관님, 백광수 연구관님과 난지축산연구소 직원 여러분들께 감사를 드립니다.

제주마 연구에 대해 많은 관심과 격려를 해주신 장덕지 교수님께 감사를 표하고 싶습니다. 부족한 후배에게 많은 애정을 보내주신 이종언 박사님, 김영훈 과장님, 김대철 선배님께 감사드리며, 제주대학교 유전육종실 후배 진철, 경민, 충남, 성미, 미경에게도 감사의 마음을 전합니다. 논문을 준비한다는 이유로 소홀했던 친구들에게 미안한 마음을 이 논문으로 대신하고자 합니다.

지금의 제가 성장하여 오는 동안 언제나 힘이 되어주시고 사랑으로 감싸주신 부모님, 형님 가족과 누님 가족에게 진심 어린 감사의 마음과 사랑한다는 말을 전하고 싶습니다. 무뚝뚝한 사위에게 항상 사랑으로 대해주시는 장인, 장모님과 친동생처럼, 친형처럼 대해주신 처형 가족과 처남 가족에게도 진심으로 감사를 드립니다.

마지막으로 옆에서 사랑과 믿음으로 행복한 가정을 유지할 수 있게 해준 사랑하는 아내 고경희와 건강하게 잘 자라주고 있는 지현이, 서현이, 현우에게 마지막 결실인 이 논문을 바치고 싶습니다.