

# 긴꼬리닭의 깃털조직에 대한 차등 메틸화 영역 유전자 연구

최현지, 채한화\*, 임다정, 박원철, 박종은  
국립축산과학원 동물유전체과

## The Study of Differentially Methylated Region Gene on Feather Tissue in Long-tailed Chickens

Hyunji Choi, Han-Ha Chai\*, Dajeong Lim, Woncheoul Park, Jong-Eun Park  
Animal Genomics and Bioinformatics Division, National Institute of Animal Science

**요약** 긴꼬리닭의 품종 특이 표현형에 대한 유전자 발현의 조절인자를 구명하기 위해서, 전장 유전체에서 DNA-메틸화를 중심으로 살펴보았다. 메틸화된 CpG 부위를 포함하는 차등 메틸화 영역(DMR)은 단일 CpG 부위와 비교하여 질병 진행에 중요한 영향을 미친다. 본 연구는 긴꼬리닭 수컷의 조직샘플에서 생산한 DNA 데이터를 이용하여 메틸화 분석을 수행했다. Bowtie2를 이용하여 참조서열에 맵핑하였다. MEDIPS 패키지를 통해 전장유전체에서 DNA 메틸화 분석을 했다. 이를 통해 전체 염색체의 구역별 CpG 수를 확인했고 통계적인 유의 기준으로( $\log_{2}FC > 0$  및  $p\text{-value} < 0.01$ ) 히 대비 깃털 조직 관련 DMR 유전자를 선별하였다. DMR 유전자들은 유전자 온톨로지(GO) 분석을 통해 기능을 확인하였으며, Circos plot을 사용해 연구 결과를 시각화하였다. 결과적으로 DNA 메틸화 분석을 통해 조직별 CpG 영역을 확인하였고 가슴 깃, 꽂지깃, 꽂지 부근 깃에서 각각 48개, 6개, 472개 DMR 유전자를 확인하였다. 특히 가장 많은 수의 차등 메틸화 영역 유전자가 나온 꽂지 부근 깃 조직에서 Wnt-신호전달 경로가 활성화됐다. 긴꼬리닭 수컷의 특이적인 형질인 꽂지깃 및 환우에 대하여 후성 유전학적 측면의 해석이 가능할 것으로 보인다.

**Abstract** To identify the regulatory factors of gene expression for the breed-specific phenotype of long-tailed chicken, we focused on whole genome DNA methylation. The differentially methylated regions (DMR) containing methylated CpG sites have an important effect on disease progression compared to single CpG sites. In this study, the DNA data of the tissues of long-tailed fowls were used. These were mapped to the reference sequence of chicken using the sequence analysis software Bowtie2. The genome-wide DNA methylation profiling was carried out through the MEDIPS package. Accordingly, the CpG counts of the entire chromosome were identified and the DMR genes related to the tongue-to-feather trait ( $\log_{2}FC > 0$  and  $p\text{-value} < 0.01$ ) were selected based on statistical significance. The function of the DMR gene was identified by gene ontology and the results were visualized as a circos plot. Thus, DNA methylation was carried out to confirm the CpG region. The DMR genes of the chest feather, tail feather, and tibialis posterior feather were confirmed to be numbers 48, 6 and 472, respectively. In particular, the Wnt-signaling pathway was activated in the tissue of the tibialis posterior feather, where the highest number of genes were found in the DMR. It thus appears that the epigenetic aspect of the specific traits of long-tailed males such as tail feathers and molting can be interpreted better through genome-wide DNA methylation.

**Keywords** : Long-tailed Chicken, Epigenetics, DNA Methylation, CpG Region, Different Methylated Region

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호:PJ01334101, “긴꼬리닭 유전체 해독 및 표현형특이 유전자 분석(1주관)”)의 지원에 의해 수행되었음.

\*Corresponding Author : Han-Ha Chai(National Institute of Animal Science.)

email: hanha@korea.kr

Received May 6, 2022

Accepted June 3, 2022

Revised May 31, 2022

Published June 30, 2022

## 1. 서론

다양한 조직 및 장기의 세포는 동일한 유전자 정보를 가지고 있지만, 그 기능과 표현형에서 큰 차이가 있다. 이는 각 조직과 장기의 세포에서 특정한 유전자만이 발현되기 때문이다. 유전자 염기서열과 무관한 특정 형질이 자손에게 전달되는 것을 후생유전이라고 한다. 즉, 후생 유전학이란 DNA 염기서열의 변화 없이 일어난 유전자의 활성화 또는 기능 변화를 연구하고 히스톤 변형, 비암호화 RNA와 함께 DNA 메틸화가 주요 기전에 포함된다. DNA 메틸화는 유전자 발현억제에 관여하는 단백질을 모집하거나 전사 인자가 DNA에 결합하는 것을 억제함으로써 유전자 발현을 조절한다[1]. 각 세포 유형에서 특이적인 유전자 발현은 세포가 분화하면서 확립되는데 이것은 조직 특이적인 DNA 메틸화 작용으로 이루어진다[2]. 많은 DNA 메틸화 프로파일과 그 기능이 보고되었다[3-7].

CpG 부위(CpG island, cytosine and guanine dinucleotide)는 염색질 구조와 전사인자 결합을 조절함으로써 유전자 발현을 촉진하기 위해 진화적으로 보존된 것으로 보인다[8]. CpG 부위의 메틸화는 전사인자 결합 손상 및 억제적인 메틸 결합 단백질을 모집하고, 유전자 발현을 안정적으로 억제시킬 수 있다. 연속적으로 메틸화된 CpG 부위를 포함한 DMR(Differentially Methylated Region)은 단일 CpG 부위와 비교하여 질병 발달 및 진행에 중요한 영향을 미친다[9].

조류의 깃털은 비행 이외에도 체온유지를 위한 단열제와 같은 역할을 한다[10]. 한국 재래 닭에 속하는 긴꼬리닭은 FAO(국제연합농업식량기구)와 DAD-IS(가축 유전자원 정보시스템)에 Ginkkoridak으로 등재됐다[11,12]. 한국 긴꼬리닭은 1980년도부터 선발과 도태를 반복하여 현재 수컷의 꽁지깃이 1m에 달하는 집단을 복원 및 보존 중에 있다[13]. 현재까지 깃털의 발생 양상 및 형태적 특성[14], 개체 간 생산능력에 미치는 영향[15], 한국 재래 닭의 깃털발달 패턴과 형태에 대한 연구[16] 등과 같이 한국 재래 닭의 깃털 형질에 관하여 많은 관심과 연구가 진행되고 있다.

본 연구는 긴꼬리닭 수컷의 깃털 형질 발현에 대해 후천적인 작용을 알아보려고 긴꼬리 닭 수컷 1수의 49개 조직 중 가슴 깃, 꽁지깃, 꽁지 부근 깃 등 깃털 관련 3가지 부위의 DNA 메틸화 분석을 했다. 각 조직의 CpG 영역을 확인하였고 후성 유전학적 조절 하에 있는 깃털 형질의 DMR 영역 및 유전자와 그 기능을 탐색했다.

## 2. 실험재료 및 연구방법

### 2.1 실험재료

본 연구에서 이용된 긴꼬리닭 수컷 1수의 49개 조직(십이지장, 목, 뼈, 도관, 머느리 발톱, 가슴 깃, 소낭, 정강이 피부, 꽁지 깃, 맹장, 신장, 폐, 비장, 간, 모이주머니, 분문, 정액샘, 회장, 홍골, 췌장, 뇌척수막, 심장, 시상하부, 꽁지깃, 도관, 뇌하수체 전엽, 기관, 직장, 육수, 정액관, 배설구, 벚, 배설강, 공장, 결장, 기관지, 눈, 위 근육, 혀, 가슴, 골수, 콧볼, 근막, 피부 근육, 후경골근, 후경골피부, 다리근육, 발)시료 수집은 국립 축산과학원 동물실험위원회 운영 규정에 따라, 동물 실험 계획승인 심사를 받아 실행하였다(승인번호:2018-628). 긴꼬리닭 수컷 1수로부터 MethylMiner Methylated DNA Enrichment Kit와 TruSeq Nano DNA Kit를 사용하여 library를 구축하였다. 구축된 라이브러리는 Illumina package bcl2fastq 플랫폼을 사용하여 49개 조직 총 77.4G의 single end DNA raw data를 생성하여 메틸화 분석을 진행했다.

### 2.2 데이터 전처리 및 서열정렬

생산된 FASTQ 파일에 대한 염기서열(short reads)의 품질(quality) 체크는 FASTQC (version 0.11.8)를 사용했다. Trimmomatic 프로그램(version 0.39)으로 trimming 하여 낮은 품질의 reads(Q30, Zero errors and ambiguities를 갖는 정확성에 부합이 되지 않은 read)를 제거했다. 이후 조직별 Single end DNA 서열을 공개된 닭의 참조 유전체(Gallus gallus 6.0)에 Bowtie2(version 2.3.4.3)를 사용하여 정렬(alignment)하였다. 다음단계로, mapping된 긴꼬리닭 data와 닭 참조 서열의 파일구성을 일치시켰고 samtools 프로그램 (version 1.10)을 이용하여 참조 서열과 동일한 파일형태로 변환 시켰다.

### 2.3 메틸화 분석

R(version 3.6.3)패키지 MEDIPS(version 1.38.0)를 이용하여 메틸화 분석을 수행했다. 분석 순서는 다음과 같다(Fig. 1). Read의 양이 충분한지 확인하기 위해  $p$ -value 0.001, extend 300, shift 0의 파라미터 값을 설정 하에 유전체 길이를 각각 100bp, 1000,000bp 조건으로 전체 유전체 길이에서 DNA-메틸화 영역의 범위에 대한 Saturation analysis와 순차메틸화 패턴 범위

(Sequence pattern coverage)를 확인했다. 위와 같은 조건으로 정규화시켜 RPKM (Reads Per Kilobase of transcript per Million mapped reads)로 해당 구역에 맵핑된 서열을 수치화했다. 다음단계로 49개 각 조직별 메틸화 프로파일링과 두 조직을 비교하여 차등 메틸화 패턴영역(differential coverage)을 구했다. 두 조직 간의 차등 메틸화 패턴 영역에서 fold change(FC)값이 0 이상( $\log_{2}FC > 0$ ), 통계적으로 유의미한( $p$ -value < 0.010) DMR을 선별하여 전체 염색체의 구역별 CpG 수를 확인했다. 이때 각 두 조직 간의 CpG 영역에 대한 순서 무작위 유의확률( $p$ -value)에 대한 계산은 전장유전체에서 CpG 영역의 개수에 대한 분포 하에서 조직별 CpG 영역의 개수에 대해 Z-test의  $p$ -value를 계산한 값이다.

마지막으로 Ensemble BioMart를 참고하여 DMR 유전자 목록을 만들었다.

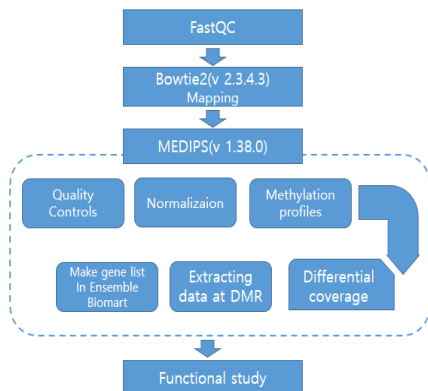


Fig. 1. Workflow of methylation analysis for differential coverage methylated region using various tissues DNA data from Ginkkoridak.

## 2.4 클러스터링 비계층적 군집분석

조직 간의 비교를 하기 위해 1000,000bp 기준 RPKM으로 hkmeans 군집분석(Hierarchical k-means clustering)을 하였다. 이는 hierarchical clustering과 k-means 계산을 결합한 하이브리드 접근 방식을 사용했다. R (version 3.6.3)의 factoextra (version 1.0.7.999) 패키지와 FactoMineR (version 2.4) 패키지를 이용하여 시각화했다.

## 2.5 메틸화 DMR 유전자 기능분석 및 시각화

차등 DNA-메틸화(DMR)된 유전자의 기능에 대한 정보를 얻기 위해 DAVID(data base for annotation

visualization and integrated discovery) 데이터베이스를 통해 생물학적 반응경로(BP), 세포구성요소(CC), 유전자 기능(MP)의 3가지 관점에서 Gene ontology 분석을 수행했다. 이외에도 차등 메틸화된 유전자들의 반응경로 KEGG pathway 분석을 했다. 유전자의 기능분석을 할 때, EASE(expression analysis systematic explorer)값이 < 0.1 유의적인 기준으로 실시했다. GO 분석 결과 시각화는 ggplot2 (version 3.3.5) 패키지와 Circos (version 0.69-9) 프로그램을 이용했다.

## 3. 실험결과 및 고찰

### 3.1 긴꼬리닭 DNA 메틸화 데이터

생산된 데이터를 Illumina package bcl2fastq를 사용해 품질을 확인하였다. HiSeq 2000 데이터의 phred score값 Q30이 80% 이상이 되어야 해당 데이터의 품질이 보장되므로(Illumina 기준), 모든 데이터의 Q30이 90% 이상임을 확인한 후, 분석을 시작하였다. 추가적으로 긴꼬리닭의 염색체 1번부터 33번까지의 상염색체와 성염색체(수컷, ZZ)를 기준하여 각 조직의 CpG수를 확인한 결과이다. 뇌하수체 전엽에서 가장 많은 CpG수(235,171,901개)가 확인되었고 맹장에서 가장 적은 CpG수(8,247,593개)를 확인 하였다(Table 1).

### 3.2 조직별 하이브리드 계층적 K-평균 군집화 확인

긴꼬리닭 49개 조직을 이용하여 K-평균 군집분석의 결과이다. 군집을 너무 많이 나눌 경우, 해석의 문제가 발생하기 때문에 WSS (within sum of square)방법을 이용하여 적당한 K개 군집 수를 결정했다. 4개 군집부터 군집 수가 늘어나더라도 군집 내 편차가 거의 줄어들지 않는 것을 확인하였다. 4개 군집의 중심으로부터 각 조직 간의 유사도를 구하고 가장 높은 값의 조직을 K에 할당한 결과(Fig. 2) 조직별 유사성을 확인할 수 있었다. 혀 조직을 기준으로 피부근육이 유사도가 가장 적었고 발이 가장 높은 유사성을 보였다. 긴꼬리닭의 깃털과 관련된 가슴 깃, 콩지깃, 콩지 부근 깃 조직과 혀 조직이 각각 다른 유사성을 가지고 있었다.

### 3.3 메틸화 분석결과

대조군의 혀 조직과 비교군의 49가지 조직을 대비하여 전체 염색체별 메틸화 분석을 수행한 결과이다. 49가

Table 1. Sanger quality check (ASCII Character Code=phred Quality Calue +33) Read Counts annotates total bases divided by the base length (101 bp; Illuminal pipeline).

Sample ID	Tissue	Total Bases(bp)	Total reads	Q30(%)	A total of CpG counts
3-duodenum-M	duodenum	2,398,118,952	23,743,752	91.93	12,826,283
3-throat-M	throat	2,182,589,800	21,609,800	91.96	12,635,540
3-marrow-M	marrow	2,369,583,624	23,461,224	91.87	15,061,200
3-billiducts-M	billiducts	2,369,583,624	23,461,224	91.87	13,806,581
3-cockspur-M	cockspur	2,197,997,552	21,762,352	92.15	17,249,061
3-C_feather-M	chest feather	2,182,589,800	21,609,800	91.96	18,669,593
3-G_stomach-M	proventriculus	2,082,387,296	20,617,696	92.07	15,536,307
3-shinskin-M	shin skin	2,341,986,081	23,187,981	91.7	13,930,083
3-tailfeather-M	tail feather	2,153,977,914	21,326,514	92.25	9,751,378
3-appendix-M	appendix	2,079,487,687	20,588,987	92.44	8,247,593
3-kidney-M	kidney	2,240,810,341	22,186,241	92.55	8,691,623
3-lung-M	lung	2,287,676,260	22,650,260	91.97	8,709,484
3-spleen-M	spleen	2,182,277,811	21,606,711	90.99	8,989,098
3-liver-M	liver	234,113,273	23,179,532	91.98	10,483,590
3-craw-M	craw	2,219,031,812	21,970,612	92.53	9,799,889
3-cardia-M	cardia	2,131,537,431	21,104,331	91.35	10,246,759
3-Se_glands-M	Seminiferous glands	2,196,606,580	21,748,580	93.32	9,751,303
3-ileum-M	ileum	2,153,977,914	21,326,514	92.25	10,971,570
3-sternum-M	sternum	2,191,081,779	21,693,879	91.43	10,633,078
3-pancreas-M	pancreas	2,325,382,287	23,023,587	92.45	10,839,668
3-meninges-M	meninges	22,47,126,275	22,248,775	91.95	11,161,855
3-heart-M	heart	2,341,132,732	23179532	91.98	10,795,416
3-hypothala-M	hypothala	2,033,283,116	20,131,516	94.55	11,693,658
3-cerebellum-M	cerebellum	2,743,512,591	27,163,491	94.62	11,833,227
3-TP_feather-M	tibialis posterior feather	2,432,718,219	24,086,319	90.88	11,641,017
3-cerebrum-M	cerebrum	2,192,822,514	21,711,114	91.49	11,218,392
3-AP-M	anterior pituitary	2,255,457,058	22,331,258	91.65	235,171,901
3-trachea-M	trachea	2,287,676,260	22,650,260	91.97	11,755,477
3-rectum-M	rectum	2,162,178,508	21407708	91.5	12,202,530
3-meatbroth-M	meatbroth	2,199,896,049	21781149	92.62	11,908,667
3-Se_duct-M	Seminiferous duct	2,228,969,101	22,069,001	90.94	11,694,982
3-cytopygium-M	cytopygium	2,109,703,554	20,888,154	90.74	12,185,510
3-cockscomb-M	cockscomb	2,209,038,670	21,871,670	92.14	11,519,826
3-cloaca-M	cloaca	2,160,897,020	21395020	92.09	11,996,139
3-jejunum-M	jejunum	2,341,986,081	23187981	91.7	11,691,642
3-colon-M	colon	2,398,118,952	2,3743,752	91.93	11,740,398
3-bronchus-M	bronchus	2,340,447,447	23,172,747	92.04	15,205,346
3-eye-M	eye	2,037,212,622	20,170,422	92.38	13,889,956
3-M_stomach-M	muscle stomach	2,162,178,508	21,407,708	91.5	13,470,642
3-tongue-M	tongue	2,340,447,447	23,172,747	92.04	12,060,913
3-breast-M	breast	2,240,810,341	22,186,241	92.55	13,283,284
3-Bonemarrow-M	bonemarrow	2,199,896,049	21,781,149	92.62	14,066,076
3-earlobe-M	earlobe	2,228,969,101	2,2069,001	90.94	14,283,525
3-fascia-M	fascia	2,196,606,580	21,7485,80	93.32	14,292,828
3-M_skin-M	muscle skin	2,325,382,287	2,3023,587	92.45	13,948,546
3-TP_muscle-M	tibialis posterior muscle	2,191,081,779	21,693,879	91.43	13,273,987
3-TP_skin-M	tibialis posterior skin	2,214,509,941	21,925,841	93.26	14,285,626
3-legmuscle-M	leg muscle	2,354,197,486	23,308,886	91.17	13,533,488
3-foot-M	foot	2,033,612,780	20,134,780	93.1	13,477,391

GC stands for the percentage of of guanine and cytosine bases on a total reads. Q30 each means phred score equivalent to the probability of an incorrect base call 1 in 1000 times. A total of 49 tissue specific DNA data. A total of CpG counts is in genome-wide about each tissue. There are no DMR in 10 out of 49 organizations. From the duodenum to the muscle stomach, it shows sequential similarities based on the tongue.

지 조직 중 10개 조직(혀, 가슴, 골수, 콧물, 근막, 피부 근육, 후경골근, 후경골피부, 다리근육, 발)을 제외(혀를 기준으로 차등메틸화 영역이 없는)한 39개 조직에서 전체 염색체 별 100bp 범위를 영역으로 보았을 때 DMR을 확인할 수 있었다. Circos plot을 통해 조직을 나열한 순서는 바깥 테두리에서부터 Table 1의 순서를 기준하여 시각화하였다(Fig. 3). Fig. 3에서 검은 색 영역은 각 염색체와 조직별에서 DNA-메틸화된 CpG 영역의 위치를 나타낸다.

기준조직인 혀와 세 가지 비교조직의 깃털 관련 조직을 대비하여 전체 염색체별 메틸화 분석한 결과이다(Fig. 4). 혀 조직의 전체적인 CpG 영역의 경향을 Circos plot을 통해 시각화시켰다. 염색체별 1,000,000bp 범위를 영역으로 보았을 때 혀, 가슴 깃, 꽂지깃, 꽂지 부근 깃 조직 등 4 종류의 조직 모두 27번 염색체, 14번 염색체, Z염색체에서 많은 양의 CpG 수를 확인할 수 있었다. 긴꼬리닭 수컷은 암컷과 달리 긴 꼬리를 가지고 있기 때문에 Z염색체에서 CpG 수가 훨씬 많이 나온 것으로 보인다. 긴꼬리닭 수컷에서 혀 대비 3쌍의 깃털 비교조직 간의 differential coverage에서 fold change(FC) 값이 0이상(logFC > 0), 통계적으로 유의미한(p-value < 0.010) differentially methylated region(DMR) 유

전자를 선별하였다[17]. 염색체 별 100bp 영역 기준 대조군 혀 대비 비교군 가슴 깃의 메틸화 분석 결과 총 48개 DMR 유전자가 나왔다(Fig. 4). 기준조직인 혀 대비 비교조직인 꽂지깃의 메틸화 분석 결과 총 6개의 DMR 유전자가 나왔다(Fig. 5). 기준조직인 혀 대비 비교군 꽂지 부근 깃의 메틸화 분석 결과, 총 472개 DMR 유전자가 나왔다(Fig. 6).

### 3.4 DMR 유전자 기능 분석

3가지 깃털 관련 조직(가슴깃, 꽂지깃, 꽂지 부근 깃)의 526개 차등 DNA-메틸화된 유전자들이 관여하는 생물학적 반응경로(BP)에 대한 온톨로지(Gene ontology) 분석(EASE < 0.1)[18]을 하였다. 온톨로지 분석결과에서 통계적으로 유의적인 것은 다중검정비교로 생길 수 있는 1종 오류(false positive)를 FDR (False Discovery rate, 'False positive/Total positives'의 비율)로 보정하여 1종 오류를 회피하여 나온 p-value를 의미한다. RNA 중합효소 II 프로모터의 전사 조절(regulation of transcription from RNA polymerase II promoter) 기능이 11.9%로 가장 높은 비율을 차지했다(p-value 6.74E-06). 이외에도 RNA 중합효소 II 프로모터로부터 전사를 증가하는 방향으로 조절(positive regulation of

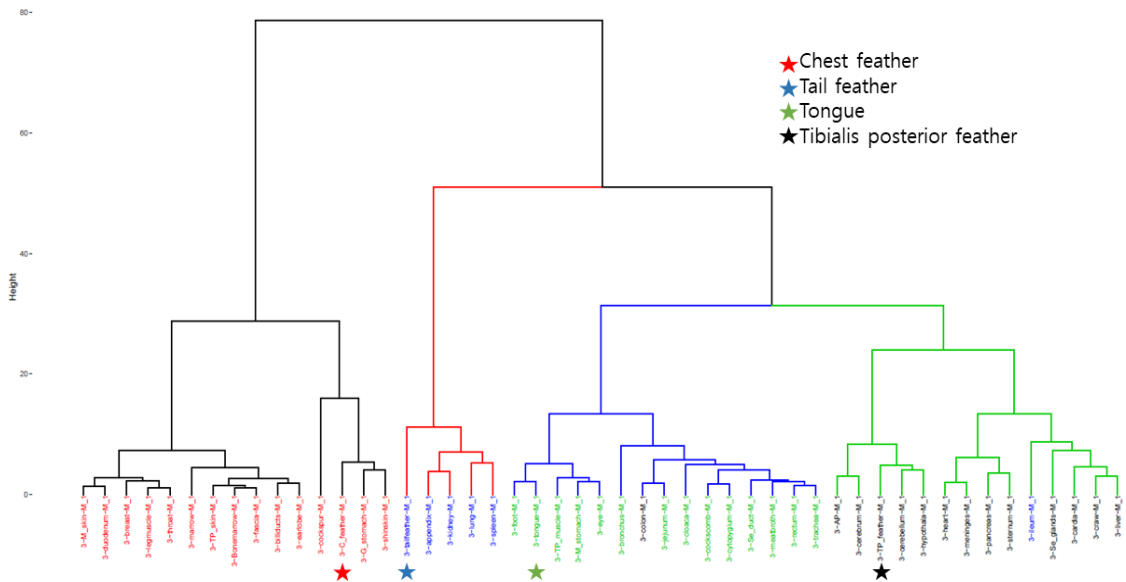


Fig. 2. A plot with 49 observations in two-dimensional space. It show the results of applying hk-means clustering with K=4, the number of cluster. The color of each observation indicates the cluster to which it was assigned using the hK-means clustering algorithm. Note that there is no ordering of the clusters, so the cluster coloring is arbitrary.

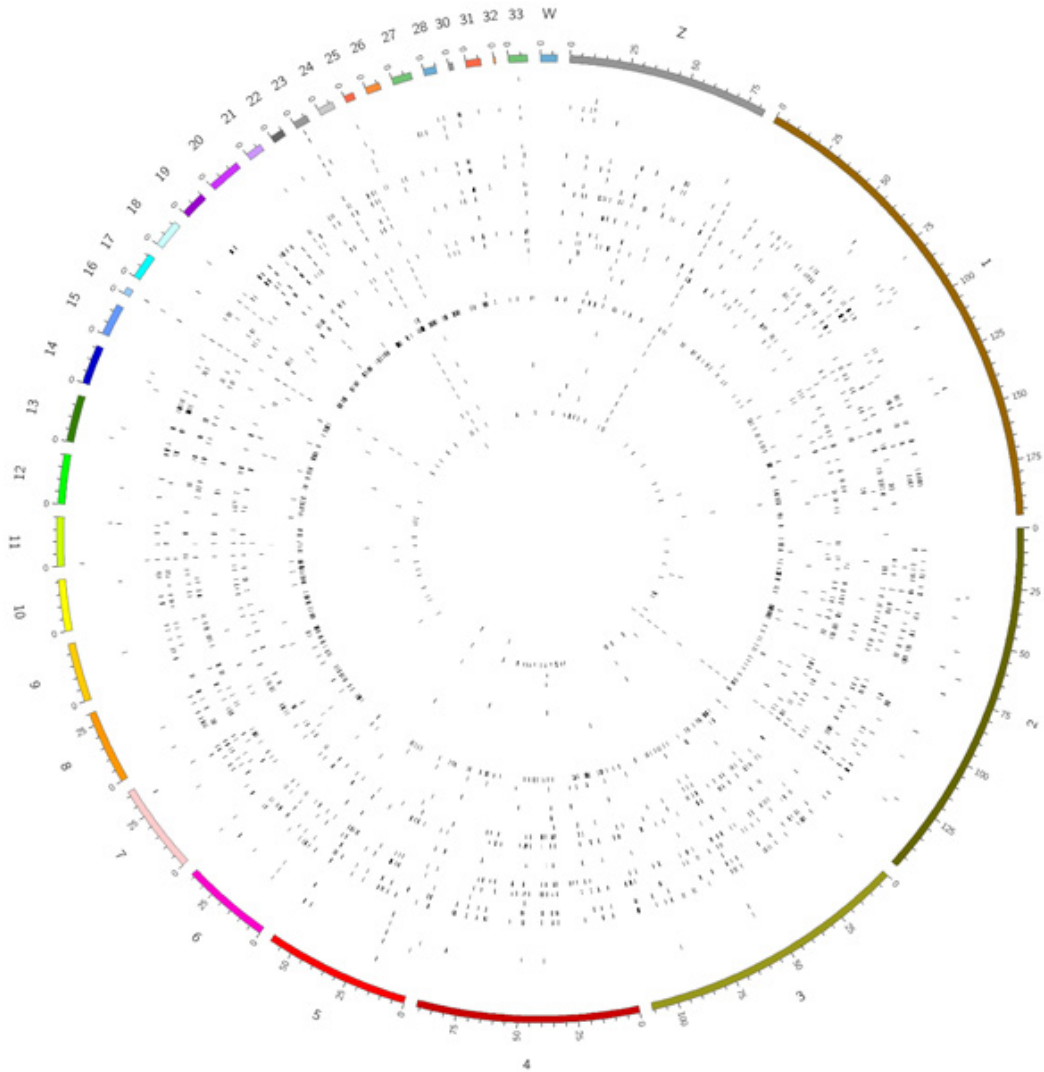


Fig. 3. The black blocks on the circle represent the DMR regions from tissue of 39 tissues in chromosome regions, respectively. From the duodenum to the muscle stomach (Table 1), it shows sequential similarities based on the tongue from the top in circo plot.

transcription from RNA polymerase II promoter) 기능과 RNA 중합효소 II 프로모터로부터 전사를 감소하는 방향으로 조절(negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter)이 각각 7.2%, 6.0%의 비율( $p$ -value 1.26E-04, 8.33E-05)을 차지했다(Table 2). RNA 중합효소 II에 의한 전사조절의 핵심 프로모터는 유전자의 전사 활성을 제어하는 데 표적부위이다[19].

혀와 가슴 깃, 혀와 품지깃, 혀와 품지 부근 깃 각각

3쌍의 조직에서 선별한 DMR 유전자를 이용하여 생물학적 반응경로(BP), 세포구성요소(CC), 유전자 기능(MP) 온톨로지 분석의 결과이다. 혀 대비 가슴 깃의 48개 DMR 유전자를 이용하여 생물학적 반응경로(BP) 분석 결과, 4가지 유전자 USP7, HOXA3, HOXA6, RREB1는 다세포 생물발달(multicellular organism development) 관련이 있었다. 그리고 BCL11A, CTBP1, GATA2, RREB1 유전자는 RNA 중합효소 II 프로모터로부터 전사를 감소하는 방향으로 조절(negative regulation of





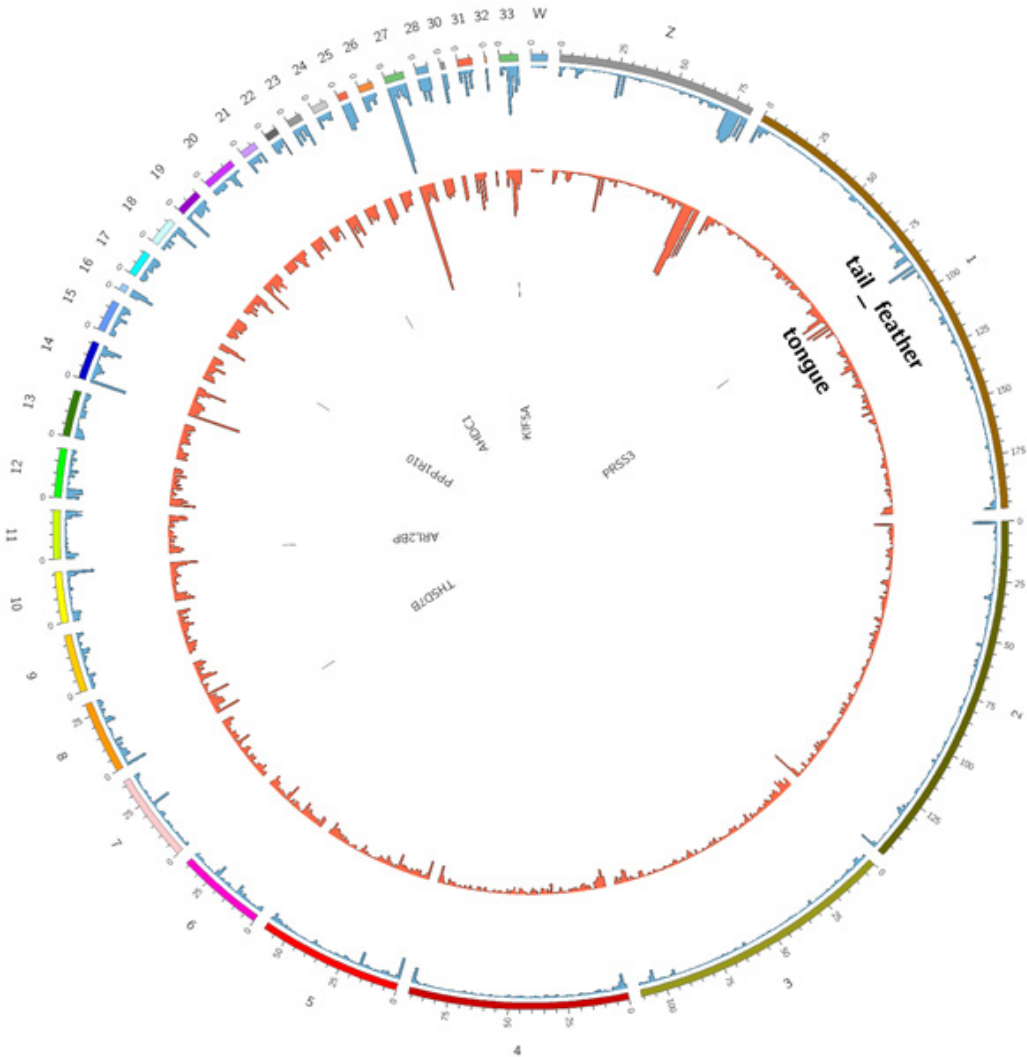


Fig. 5. The red blocks and blue blocks on the circle represent the CpG counts from tissue of tail feather and tongue in chromosome regions, respectively. The center represent the 6 DMR genes between tail feather and tongue in chromosome regions.

regulation of tyrosine phosphorylation of Stat3 protein)하는 기능 관련 ARL2BP 유전자가 33.33% 가장 높은 비율을 차지했다( $p$ -value 0.002, 0.003). ARL2BP 유전자는 미토콘드리아 내막(mitochondrial intermembrane space)을 구성하는 세포구성요소로서, 전자 속도를 증가시키기 위해 활성화제에 결합하는 전사 코어 조절제(transcription coactivator activity)로 작용한다(Fig. 8).

혀 대비 꼬지 부근 깃에서 나온 472개 DMR 유전자를 이용한 Gene Ontology 분석 결과이다. 생물학적,

세포구성요소, 유전자 기능을 포함하여 유전자 비율(% 기준 상위 10개를 확인했다(Table 2). 세포구성요소(CC) 결과, 핵(nucleus)기능 관련 BTRC, GPC4, PRKCB 외 총 77개 유전자가 17.61% 가장 높은 비율을 차지했다( $p$ -value 0.019). 생물학적 반응경로(BP) 결과, RNA 중합효소 II 프로모터로부터 전사의 양성 조절(positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter)기능 관련 TBL1XR1 외 27개 유전자가 6.09% 가장 높은 비율을 차지했다( $p$ -value 8.33E-05). 유전자 기능(MP) 결과, 금속 이온 결합



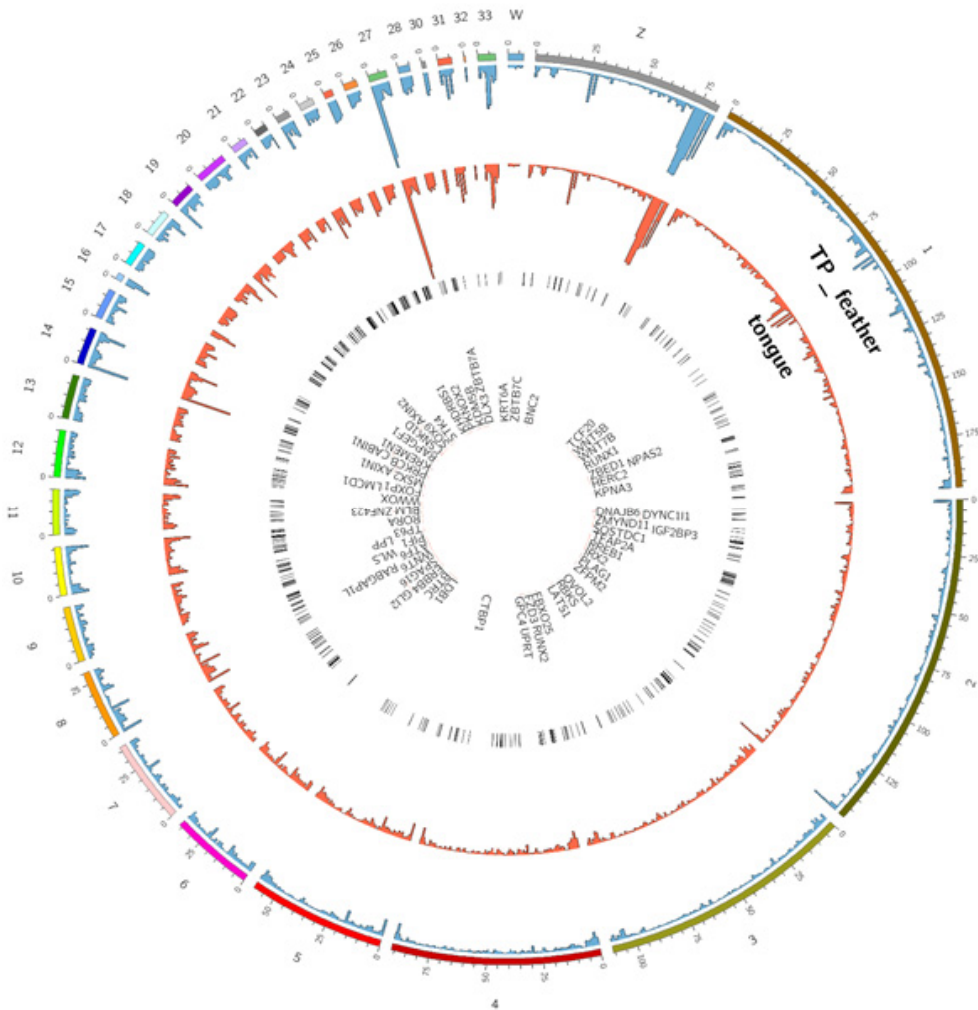


Fig. 6. The red blocks and blue blocks on the circle represent the CpG counts from tissue of tibialis posterior feather and tongue in chromosome regions, respectively. The center represent the 63 of 472 DMR genes between tibialis posterior feather and tongue in chromosome regions.

(metal ion binding)기능 관련 HDAC4, NRP2 외 34개 유전자가 8.04% 가장 높은 비율을 차지했다( $p$ -value 0.0003).

상위 10개 비율에 포함되지 않았으나, Wnt 신호 경로(Wnt signaling pathway) 기능 관련 WNT6, FZD3, WNT5B, WNT7B 외 6개 유전자가 2.17% 비율을 차지했다( $p$ -value 3.14E-04). 게다가, 혀 대비 쪼지 부근 것의 472개 DMR 유전자를 통해 KEGG pathway 분석결과, Wnt-신호전달 경로를 확인할 수 있었다(Fig. 9). 이 Wnt-신호전달 경로에는 CTBP1, VANGL2, AXIN1, AXIN2, BTRC, FZD3, GPC4, PRICKLE2, PRKCB, TBL1XR1, WNT6, WNT5B, WNT7B 유전자들이 관여

한다(Table 3). Wnts는 세포로부터 분비되는 cysteine이 많은 당 단백질로, 주변세포의 receptor에 결합하여 활성화된다. 이를 통해 많은 유전자의 발현을 조절함으로써, 다양한 생명 현상을 조절한다고 보고된다[20]. 특히 세포가 특정 fate로 분화하는 과정에서 Wnt-신호전달이 증가하거나 감소하면서 조절 작용을 한다[21]. 또한, 이러한 경로는 닭의 성체 내 상피세포의 재생과 유전자 발현에도 연관되어 있고 후성 유전학적인 측면의 발현 조절을 내포하고 있다[22,23]. Wnt-신호전달 경로는 손실된 피부 및 피부 부속기의 재생에 필요한 줄기 세포 유지에도 중요한 작용을 하고 있다. 실제 Wnt6의 이소성 발현은 깃털 내부의 형질도입 부위에서 확장된 증식 영역

Table 2. The 526 DMR genes between tongue and chest feater (48), tail feather (6) and tibialis posterior feather (472) were methylated. Functional groups are derived from the gene ontology (GO) biological processes, molecular function and cellular component clusters (BP). Only representative functional groups with EASE < 0.1 are reported and top 10 in terms of gene ratio(%).

GO ID	Cluster	Description	Count	Percentage	P-Value	Genes
GO:0006357	BP	Regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	59	11.9	6.74E-06	RORA, TCF20, GLI2, and 50 more
GO:0045944	BP	Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	36	7.2	1.26E-04	HDAC4, LDB1, PLAG1, RORA and 26 more
GO:0000122	BP	Negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	30	6.0	8.33E-05	KHDRBS1, LDB1, CTBP1, WWC2 and 20 more
GO:0016477	BP	Cell migration	17	3.4	2.00E-04	DOCK5, LAMA5, ITGB5 and 8 more
GO:0045892	BP	Negative regulation of transcription, DNA-templated	17	3.4	1.05E-03	TFAP2A, HDAC4, KHDRBS1, TSHZ3 and 7 more
GO:0007275	BP	Multicellular organism development	17	3.4	7.21E-03	EPHA4, USP7, WNT5B, AXIN1 and 7 more
GO:0035556	BP	Intracellular signal transduction	17	3.4	4.14E-02	WSB2, PRKCB, TUFT1, NOD1 and 7 more
GO:0008285	BP	Negative regulation of cell proliferation	16	3.2	1.71E-03	HDAC4, PTPRU, BCL11B, AXIN2, SMAD6 and 5 more
GO:0045893	BP	Positive regulation of transcription, DNA-templated	16	3.2	8.55E-03	BLM, ZBTB32, AXIN1, ARID1B and 6 more
GO:0043547	BP	Positive regulation of GTPase activity	15	3.02	6.42E-03	RAP1GAP2, DOCK5, RABGAP1L, DENND1A and 5 more

Gene Ontology of Methylation DMR

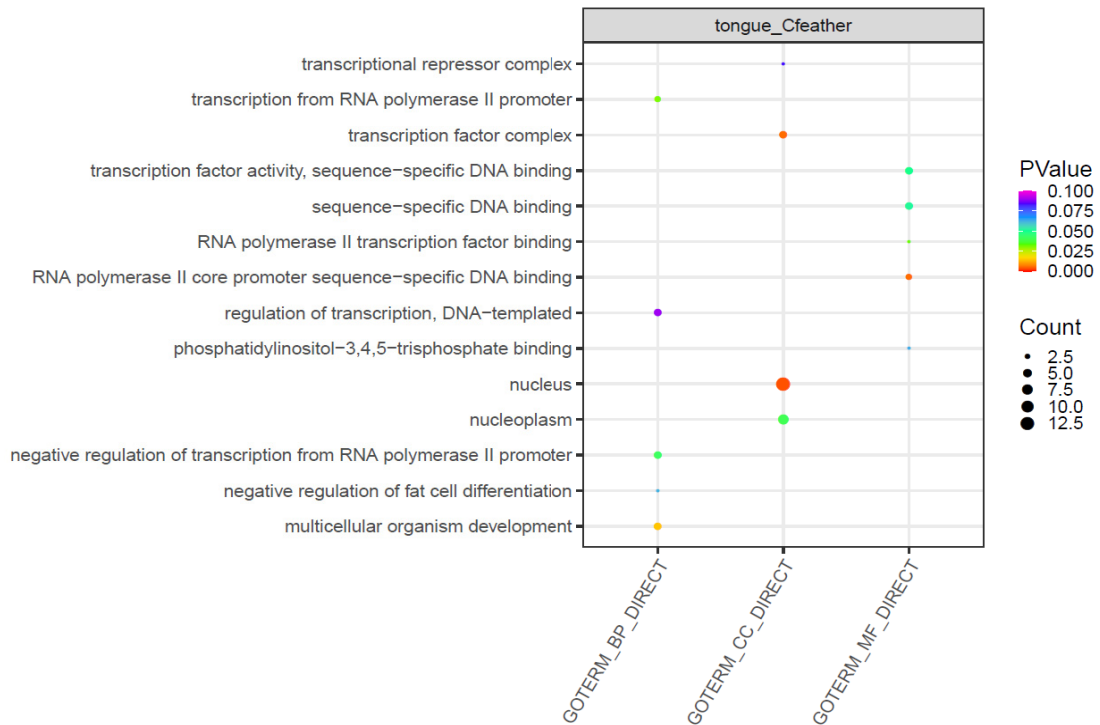


Fig. 7. The DMR genes between tongue and chest feather were methylated. Functional groups are derived from the gene ontology (GO) biological processes, molecular function and cellular component clusters (BP, MF and CC, respectively). Only representative functional groups with EASE < 0.1 are reported.

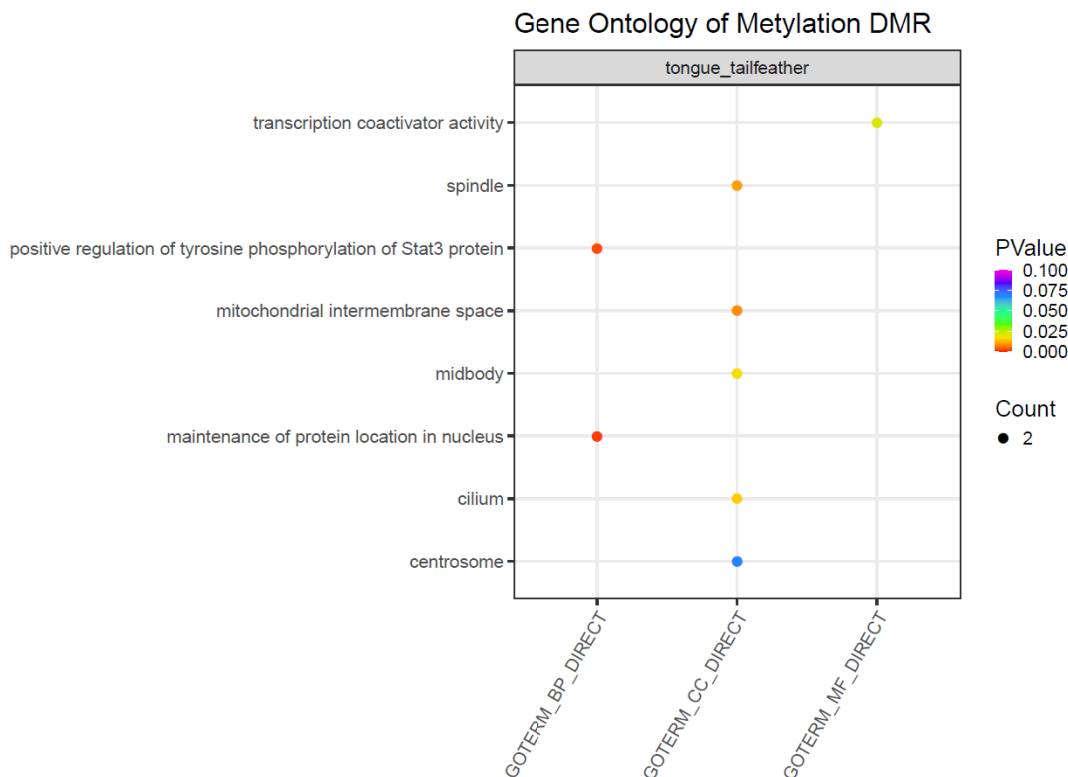


Fig. 8. The DMR genes between tongue and tail feather were methylated. Functional groups are derived from the gene ontology (GO) biological processes, molecular function and cellular component clusters (BP, MF and CC, respectively). Only representative functional groups with EASE < 0.1 are reported.

Table 3. The genes that function as a Wnt signaling pathway in the KEGG pathway map used DMR genes between tongue and tibialis posterior feather.

Gene symbol	Gene full name	Chr	Start	End
CTBP1	C-terminal binding protein 1	4	84,541,204	84,762,592
VANGL2	VANGL planar cell polarity protein 2	25	2,442,218	2,446,961
AXIN1	Axin 1	14	12,551,591	12,627,669
AXIN2	Axin 2	18	7,613,207	7,634,458
BTRC	Beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase	6	23,793,963	23,908,311
FZD3	Frizzled class receptor 3	3	105,834,156	105,886,228
GPC4	Glypican 4	4	3,771,853	3,833,252
PRICKLE2	Prickle homolog 2 (Drosophila)	12	14,033,841	14,122,269
PRKCB	Protein kinase C, beta	14	7,057,348	7,132,158
TBL1XR1	Transducin (beta)-like 1 X-linked receptor 1	9	18,059,871	18,184,272
WNT6	Wingless-type MMTV integration site family member 6	7	22,402,840	22,410,862
WNT5B	Wingless-type MMTV integration site family, member 5B	1	60,852,680	60,917,603
WNT7B	Wingless-type MMTV integration site family, member 7B	1	70,750,805	70,843,717

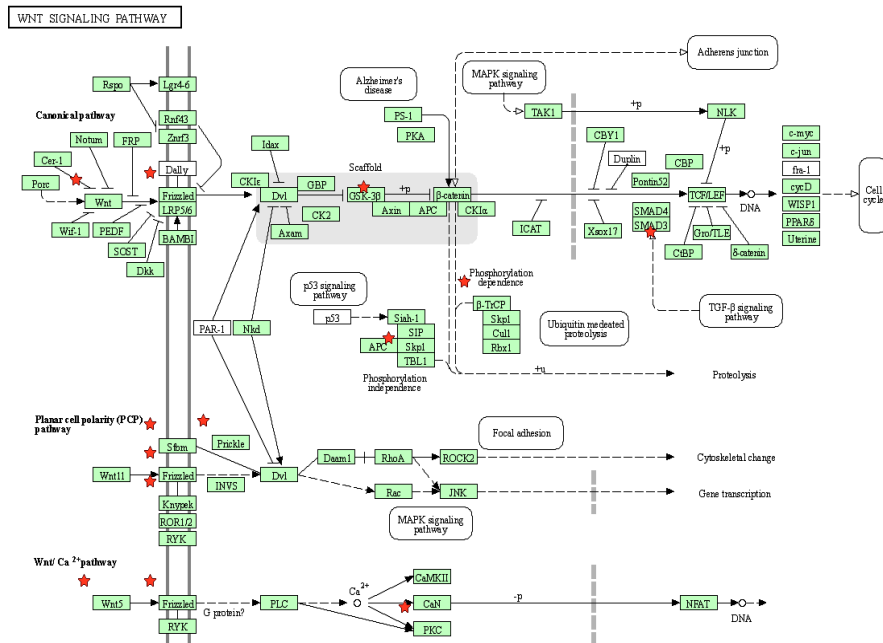


Fig. 9. KEGG Pathway navigation of DMR genes between tongue and tibialis posterior feather. The Wnt signaling pathway in the KEGG pathway map.

을 생성한다고 보고된다[24](Table 3). 본 연구에서 긴꼬리닭의 전장유전체 영역에서 DNA-메틸화는 긴꼬리닭 조직의 환우 관련 차등발현 하는 유전자[25]와 메틸화 영역의 위치를 비교해서 표현형과 연관된 유전자의 차등발현과 메틸화 차이가 결합된 Wnt-신호전달 경로에 관련된 13개 유전자 세트를 구명하였다(Table 3, Fig. 9).

하고 닭의 성체 내 상피세포의 재생과 유전자 발현, 후성유전학적인 측면의 발현 조절에도 작용이 될 것으로 추측된다. 다음 연구에서는 후성유전학적 측면인 메틸화 분석과 긴꼬리닭 수컷의 특이적인 형질인 콩지깃 및 환우 관련 전사체 분석의 비교 및 해석을 확대하고자 한다.

#### 4. 결론

본 연구는 긴꼬리닭 수컷 한 마리의 49가지의 조직으로부터 DNA 메틸화 프로파일링을 전체 상염색체 및 성염색체 내에서 실시하였고 가슴 깃, 콩지깃, 콩지 부근 깃 등 총 3가지 깃털 관련 조직의 차등 메틸화된 구역에서 각 48개, 6개, 472개 유전자를 탐색했다. CpG 부위의 DNA 메틸화가 유전자 발현을 어느 정도 관련이 있는지 추가 연구가 필요하다. 탐색된 차등 메틸화 구역 유전자의 기능을 분석한 결과, 생물학적 반응경로, 세포구성요소, 유전자 기능에 따른 기능을 유익적으로 확인할 수 있었다. 특히 차등 메틸화 구역에서 가장 많은 수의 DMR 유전자가 나온 콩지 부근 깃털 조직에서 Wnt-신호전달 경로가 활성화됐다. 이 경로는 세포가 특정 fate로 분화하는 과정에서 positive 또는 negative하게 작용

#### References

- [1] L. D. Moore, T. Le, G. Fan, "DNA Methylation and Its Basic Function", *Neuropsychopharmacology* Vol.38, No.1, pp.23-38, July 2012. DOI: <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>
- [2] J. H. Oh, Y. D. Kwon, B. W. Yoon, "Understanding of epigenetics and DNA methylation", *Maxillofacial Plastic Reconstructive Surgery* Vol.30, No.3, pp.302-309, May 2008.
- [3] D. Zilberman, M. Gehring, R. K. Tran, T. Ballinger, S. Henikoff, "Genome-wide analysis of Arabidopsis thaliana DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription", *Nature Genetics* Vol.39, No.1, pp.61-69, November 2007. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng1929>
- [4] M. Gehring, K. L. Bubb, S. Henikoff, "Extensive demethylation of repetitive elements during seed development underlies gene imprinting", *Science* Vol.324, No.5933, pp.1447-1451, June 2009.

- DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1171609>
- [5] T. F. Hsieh, C. A. Ibarra, P. Silva, A. Zemach, L. E. Williams, "Genome-wide demethylation of Arabidopsis endosperm", *Science* Vol.324, No.5933, pp.1451-1454, June 2009.  
DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1172417>
- [6] F. Eckhardt, J. Lewin, R. Cortese, V. K. Rakan, J. Attwood, "DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22", *Nature Genetics* Vol.38, No.12, pp.1378-1385, October 2006.  
DOI: <https://doi.org/10.1038/ng1909>
- [7] R. Lister, R. C. O. Malley, J. T. Filippini, B. D. Gregory, C. C. Berry, "Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in Arabidopsis", *Cell* Vol.133, No.3, pp.523-536, May 2008.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.029>
- [8] J. Tazi, A. Bird, "Alternative chromatin structure at CpG islands", *Cell* Vol.60, No.6, pp.909-920, March 1990.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90339-G](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90339-G)
- [9] K. Hotta, T. Kitamoto, A. Kitamoto, Y. Ogawa, Y. Honda, T. Kessoku, M. Yoneda, K. Imajo, W. Tomeno, S. Saito, A. Nakajima, "Identification of the genomic region under epigenetic regulation during non-alcoholic fatty liver disease progression", *Hepatology Research* Vol.48, No.3, pp.E320-E334, February 2018.  
DOI: <https://doi.org/10.1111/hepr.12992>
- [10] A. H. Brush, "Evolving a Protofeather and Feather Diversity", *American Zoologist* Vol.40, No.4, pp.631-639, August 2000.  
DOI: <https://doi.org/10.1093/icb/40.4.631>
- [11] S. Jin, D. D. Jayasena, C. Jo, J. H. Lee, "The breeding history and commercial development of the Korean native chicken", *World's Poultry Science Journal* Vol.73, No.1, pp.163-174, March 2017.  
DOI: <https://doi.org/10.1017/S004393391600088X>
- [12] Y. M. Jee, "A study on the history of Bong-Whang and Ginkkoridak(a long-tailed cock)", *Asia-Pacific Journal of Multimedia Services Convergent with Art, Humanities, and Sociology* Vol.6, No.3, pp.393-401, March 2016.  
DOI: <https://dx.doi.org/10.14257/AJMAHS.2016.03.26>
- [13] P. Y. Lee, S. H. Yen, J. H. Kim, Y. G. Ko, J. K. Son, H. H. Lee, C. Y. Cho, "Genetic composition of Korean native chicken populations - national scale molecular genetic evaluation based on microsatellite makers", *Korean Journal of Poultry Science* Vol.38, No.2, pp.81-87, June 2011.  
DOI: <https://doi.org/10.5536/KJPS.2011.38.2.081>
- [14] S. H. Sohn, D. B. Park, H. R. Song, E. J. Cho, B. S. Kang, "Genotype frequencies of the sex-linked feathering and their phenotypes in domestic chicken breeds for the establishment of auto-sexing strains", *Journal of Animal Science and Technology* Vol.54, No.4, pp.267-274, August 2012.  
DOI: <https://doi.org/10.5187/JAST.2012.54.4.267>
- [15] Sohn SH, Kim NY, Park DB, Song HR, Cho EJ, Choi SB, Heo KN, Choi HC 2013 "Influence of early- and late-feathering phenotype on productive performance in the feather-sexing strains of Korean native chicken", *Korean Journal of Poultry Science* Vol.40, No.3, pp.263-270, September 2013.  
DOI: <https://doi.org/10.5536/KJPS.2013.40.3.263>
- [16] M. H. Bang, E. J. Cho, C. Y. Cho, S. H. Sohn, "Study on the characteristics of feather developing pattern and morphology in early- and late-feathering Korean native chickens", *Korean Journal of Poultry Science* Vol.45, No.3, pp.155-165 August 2018.  
DOI: <https://doi.org/10.5536/KJPS.2018.45.3.155>
- [17] Matthias Lienhard, Christina Grimm, Markus Morkel, Ralf Herwig, Lukas Chavez, "MEDIPS: genome-wide differential coverage analysis of sequencing data derived from DNA enrichment experiments", *Bioinformatics* Vol.30, No.2, pp.284-286, November 2013.  
DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt650>
- [18] Cristobal Fresno, Elmer A. Fernandez, "RDAVIDWebService: a versatile R interface to DAVID", *Bioinformatics* Vol.29, No.21, pp.2810-2811, August 2013.  
DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt487>
- [19] J. T. Kadonaga, "The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II", *Experimental & Molecular Medicine* Vol.34, No.4, pp.259-264, September 2002.  
DOI: <https://doi.org/10.1038/emm.2002.36>
- [20] R. T. Moon, A. D. Kohn, G. V. D. Ferrari, A. Kaykas, "WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies", *Nature Reviews Genetics* Vol.5, No.9, pp.691-701, September 2004.  
DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg1427>
- [21] F. J. T. Staal, H. C. Clevers, "WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation", *Nature Reviews Immunology* Vol.5, No.1, pp.21-30, January 2005.  
DOI: <https://doi.org/10.1038/nri1529>
- [22] Helen J. McBride, Bastian Fatke, Scott E. Frasier, "Wnt signaling components in the chicken intestinal tract", *Developmental Biology* Vol.256, No.1, pp. 18-33, April 2003.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(02\)00118-5](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(02)00118-5)
- [23] C. Charton, D. J. Youm, B. J. Ko, D. H. Seol, B. S. Kim, "The transcriptomic blueprint of molt in rooster using various tissues from Ginkkoridak (Korean long-tailed chicken)", *BioMed Central Genomics* Vol.22, No.1, pp.594, August 2021.  
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07903-9>
- [24] Randall B. Widelitz, "Wnt signaling in skin organogenesis", *Organogenesis* Vol.4, No.2, pp.123-133, Jun 2008.  
DOI: <https://doi.org/10.4161/org.4.2.5859>
- [25] C. Han-Ha, N. Yunjeong, C. Hyunji, L. Dajeong, "A study on the expression of molting genes in female long-tailed chickens", *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society* Vol.23, No.1, pp. 227-235, January 2022.  
DOI: <https://doi.org/10.5762/KAIS.2022.23.1.227>

최 현 지(Hyunji Choi)

[정회원]



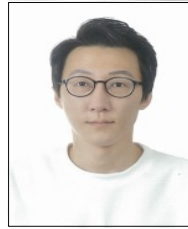
• 2021년 5월 ~ 현재 : 농촌진흥청  
국립축산과학원 연구원

<관심분야>

생물정보, 가축 집단 유전체

박 원 철(Woncheoul Park)

[정회원]



• 2019년 2월 ~ 현재 : 농촌진흥청  
국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>

전사체, 유전체

채 한 화(Han-Ha Chai)

[정회원]



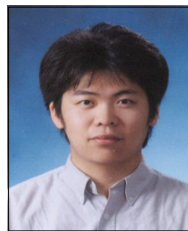
• 2010년 11월 ~ 현재 : 농촌진흥청  
국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>

동물 기능유전체, 화학·생명정보 응용연구(분자모델링)

박 종 은(Jong-Eun Park)

[정회원]



• 2015년 7월 ~ 현재 : 농촌진흥청  
국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>

통계유전, 생물통계

임 다 정(Dajeong Lim)

[정회원]



• 2007년 11월 ~ 현재 : 농촌진흥청  
국립축산과학원 농업연구관

<관심분야>

가축 집단 유전체, 생명정보 적용 유전자 선발