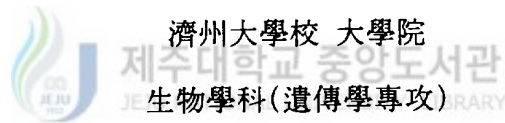


---

博士學位論文

Epsilon Globin 遺傳子 分析에 의한 奇蹄目  
몇 種間의 系統類緣關係와 濟州在來馬에서의  
Cytochrome-b 遺傳子 多形研究

Phylogenetic Relationship in Some Species of Perissodactyla by Epsilon-Globin  
Gene Analyses and Cytochrome-b Gene Polymorphism in Cheju Native Horses



金 基 玉

1996年 7月

Epsilon Globin 遺傳子 分析에 의한 奇蹄目  
몇 種間의 系統類緣關係와 濟州在來馬에서의  
Cytochrome-b 遺傳子 多형연구

Phylogenetic Relationship in some Species of Perissodactyla by Epsilon-Globin  
Gene Analyses and Cytochrome b Gene Polymorphism in Cheju Native Horses


指導教授 吳 文 儒

金 基 玉


이 論文을 理學 博士學位 論文으로 提出함

1996년 4월


金基玉의 理學 博士學位 論文을 認准함

 제주대학교 중앙도서관  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

審査委員長: 김 씨 재 

委 員: 吳 文 儒 

委 員: 김 씨 일 

委 員: 李 廷 珠 

委 員: 손 씨 응 

濟州大學校 大學院

1996년 6월

---

Phylogenetic Relationship in Some Species of Perissodactyla  
by Epsilon-Globin Gene Analyses and Cytochrome-b Gene  
Polymorphism in Cheju Native Horses

Gi-Ok Kim

(Supervised by professor Moon-You Oh)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
DOCTOR OF SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOLOGY

GRADUATE SCHOOL

CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1996. 7.

---

## Lists of Table

- Table 1. Various primers for sequencing of Perissodactyla  $\epsilon$ -globin gene.
- Table 2. The size of fragment found after digested of  $\epsilon$ -globin gene with restriction endonuclease in Perissodactyla.
- Table 3. The size of fragment found after digested of  $\epsilon$ -globin gene with restriction endonuclease in Perissodactyla.
- Table 4. Homology percentage of amino acid coded nucleotide sequence of partial  $\epsilon$ -globin gene in Perissodactyla.
- Table 5. Nucleotide composition(%) of Perissodactyla  $\epsilon$ -globin gene.
- Table 6. Alignment gap frequencies in Perissodactyla  $\epsilon$ -globin gene.
- Table 7. Pairwise composition of the  $\epsilon$ -globin gene sequence between Perissodactyla.
- Table 8. Pairwise percentage of divergences among Perissodactyla.
- Table 9. Size of intervening sequences in mammalian  $\beta$ -like globin gene.
- Table 10. Molecular size of restriction fragments of horse mtDNAs digested with 10 restriction enzymes.

---

## Lists of Figure

- Fig. 1. Current phylogeny of the 57 million years record of fossil horses.
- Fig. 2. Phylogeny of fossil and recent species of Equus.
- Fig. 3. Evolution of mammalian  $\beta$ -globin gene cluster.
- Fig. 4. Southern blot analysis of the  $\epsilon$ -globin gene of Cheju native horses.
- Fig. 5. Southern blot analysis of the  $\epsilon$ -globin gene of Cheju native horses.
- Fig. 6. Agarose gel electrophoresis pattern of amplified  $\epsilon$ -globin gene in horses.
- Fig. 7. Agarose gel electrophoresis pattern of amplified  $\epsilon$ -globin gene in horses and goat.
- Fig. 8. Agarose gel electrophoresis pattern of amplified  $\epsilon$ -globin gene in horses and goat.
- Fig. 9. Agarose gel electrophoresis pattern of amplified  $\epsilon$ -globin gene in Perissodactyla.
- Fig. 10. Agarose gel electrophoresis pattern of secondary PCR produced  $\epsilon$ -globin gene in Perissodactyla.
- Fig. 11. Agarose gel electrophoresis pattern of secondary PCR produced  $\epsilon$ -globin gene in Perissodactyla.
- Fig. 12. Restriction fragment patterns of amplified  $\epsilon$ -globin gene.
- Fig. 13. Agarose gel electrophoresis pattern of isolated plasmid DNA from recombinant.
- Fig. 14. Screening of recombinant plasmid with restriction endonuclease.
- Fig. 15. Screening of recombinant plasmid with restriction endonuclease and Southern blot.
- Fig. 16. DNA sequences of  $\epsilon$ -globin gene in *E. grevy*, *E. przewalskii*, *E. zebra* and *E. africanus*.
- Fig. 17. DNA sequences of  $\epsilon$ -globin gene in *E. caballus* and *E. simum*.

- Fig. 18. Comparison of DNA sequence of  $\epsilon$ -globin gene within Perissodactyla and between other mammalian.
- Fig. 19. Comparison of amino acid sequence of  $\epsilon$ -globin polypeptide between Perissodactyla and other mammalian.
- Fig. 20. Comparison of alignment of 5'-noncoding sequence of mammalian  $\epsilon$ -globin gene.
- Fig. 21. An alignment of the sequence surrounding the four intron/exon junction of eight mammalian globin gene.
- Fig. 22. UPGMA tree based on the Perissodactyla distance matrix.
- Fig. 23. Neighbor-Joining Tree based on the two parameter method of Kimura distance matrix.
- Fig. 24. Maximum-Parsimony Tree based on the aligned  $\epsilon$ -globin gene sequences from Perissodactyla.
- Fig. 25. UPGMA Tree based on the  $\epsilon$ -globin gene alignment of mammalian.
- Fig. 26. Neighbor-Joining tree based on the distance from mammalian. Number above nodes indicate bootstrap estimates for 100 replication analyses.
- Fig. 27. Maximum-Parsimony tree based on the total nucleotide substitution from mammalian and constructed using PAUP ver. 3.1.
- Fig. 28. Phylogenetic tree based on distance that was constructed using Plioup program of CCG.
- Fig. 29. The structure and sequences of Amino acid variability in mammalian cytochrome-b.
- Fig. 30. An agarose gel electrophoretic patterns of the Cheju native horse mtDNA with restriction enzymes.
- Fig. 31. Southern blot analysis of the mtDNA in Cheju native horse.
- Fig. 32. An agarose gel electrophoresis patterns of PCR products.

# 목 차

## Abstract

### 제 1 장 Epsilon globin 遺傳子分析에 의한 奇蹄目 몇 種間의 系統類緣關係

I 서론 .....	2
1) 奇蹄類의 進化 .....	2
2) 馬科의 進化 .....	3
3) 分子生物學的 研究 및 目的 .....	8
II 재료 및 방법 .....	15
1)  사용시약 .....	15
2)  Primer Design과  합성 .....	15
3)  혈액채취 및 Genomic DNA분리 .....	16
4)  Southern blot 분석 .....	17
4-1) Genomic DNA제한효소 처리 및 전기영동 .....	17
4-2) Digoxigenin- Labelling 방법에 의한 Probe 준비 .....	18
4-3) Hybridization 및 Immunodetection .....	18
5) PCR에 의한 Epsilon Globin 유전자 합성 .....	19
6) Epsilon Gobin 유전자 확인 .....	19
7) PCR product 추출 .....	20
8) DNA Ligation과 Transformation .....	20
9) Clone 선발과 Plasmid 분리 .....	21
10) Nucleotide Sequencing .....	22
11) Data 분석 처리 .....	24

Ⅲ 결 과 .....	25
1) Southern blot에 의한 濟州 在來馬의 $\epsilon$ -Globin 유전자 분석 .....	25
2) 奇蹄目에서의 $\epsilon$ - Globin 유전자 증폭 및 분리 .....	25
3) 奇蹄目에서의 $\epsilon$ - Globin 유전자의 PCR-RFLP .....	34
4) Cloning과 Insert DNA 확인 .....	34
5) DNA Alignment 및 $\epsilon$ -Globin 유전자 구조 .....	42
6) $\epsilon$ -Globin 유전자의 5'-Flanking Region의 비교 .....	42
7) 奇蹄類의 Polypeptide Sequence .....	42
8) 염기조성 및 Transversion과 Transition .....	60
9) Phylogenetic Tree .....	65
Ⅳ 考 察 .....	74





## 제 2 장 濟州 在來馬의 Cytochrome-b 遺傳子 多形研究

I 서론 .....	84
II 재료 및 방법 .....	88
1) Genomic DNA 준비 .....	88
2) 말의 간 (liver)에서 mtDNA 분리 .....	88
3) MtDNA 제한효소 처리 .....	89
4) Dig-labeling에 의한 mtDNA Probe 준비 .....	89
5) 전기영동 및 Southern blot 분석 .....	90
6) Hybridization과 Immunodetection .....	90
7) Cytochrome-b 유전자 합성 .....	91
8) PCR-RFLP .....	92
III 결과 .....	93
1) MtDNA 분리 .....	93
2) MtDNA-RFLP .....	93
3) Cytochrome-b 유전자 RFLP .....	93
IV 고찰 .....	99
V 참고문헌 .....	102
VI 요약문 .....	123

---

## Abstract

In the order Perissodactyla belonging to mammals, three families (Equidae, Tapiridae and Rhinocerotidae) are in existence. It is supposed that Perissodactyla emerged in the late Paleocene(60 Mya), and diverged into six families in early Eocene. But only three families exist in south American, Asia, and Africa. According to recent literature, Equus classified into seven species in four subgenus, order Perissodactyla, and widely distributed throughout Africa, Asia, and America. The Equus is an ancient to hyracontherium which is commonly encountered as fossil at early Eocene in western North America. One mammalian group with a particularly good fossil record is the genus Equus, which consists of seven existing species that have all evolved within the last five million years ago. The analysis of  $\beta$ -globin gene in primate, lagomorph, rodent, artiodactyla, and marsupial indicate that the ancestral for  $\beta$ -globin gene cluster of therian mammals(65-85 million year ago), consisted of five linked gene (5'-  $\epsilon$ - $\gamma$ - $\eta$ - $\delta$ - $\beta$ -3'). The  $\epsilon$ -globin gene in mammals is the 5'-most member of the  $\beta$ -globin gene cluster, that arose from a series of tandem duplications, the first of which occur about 200 million year ago, and led to the embryonically expressed proto- $\epsilon$  gene and the post maturely expressed proto- $\beta$  gene.

To synthesize the  $\epsilon$ -globin gene from Perissodactyla PCR was performed by using genomic DNA as template and synthesized primers. The PCR product was 1.475 Kb in length. The amplified  $\epsilon$ -globin genes were cloned by using A-T cloning method, and their nucleotides were determined by using the Sanger's method. The structure of  $\epsilon$ -globin gene amplified by PCR from Perissodactyla showed that it contained consensus CCAAT at position -85 site a Hogness-Goldberg box (ATA) at position -30 site, and mRNA ribosomal binding sequence CTTCTC at position +8 site in the 5' flanking-region. The Amino acid sequence encoded by exon 1 and 2 (105 amino acids) of  $\epsilon$ -globin gene was highly

homologous to human's (84%), goat's (89%), respectively. The insert sequence in IVS 2 of  $\epsilon$ -globin gene was not found. The  $\epsilon$ -globin gene, as is typical of other  $\beta$ -like globin genes, contains three exons and two introns. The second intron( IVS 2) of the  $\epsilon$ -globin show different length, as human and goat, is 960 bp and 1039 bp in length. This difference is entirely due to a difference in the size of insertion element.

The studies about the Perissodactyla  $\epsilon$ -globin suggest that the  $\beta$ -globin gene locus in goat and sheep have apparently evolved along a different pathway from the mammalian counterpart. Phylogenetic relationship among Perissodactyla was examined on the basis of the comparison of partial  $\epsilon$ -globin gene DNA sequence data. Those results show that Rhinocerotidae and Tapiridae is one group, and Equidae clade is a sister diverged from Rhinocerotidae. In phylogenetic relationship constructed comparing our results with globin sequences reported from other mammalian species, the Perissodactyla group is sister group of Artiodactyla(goat, pig).

Also, the genetic polymorphisms of the cytochrome b gene in mitochondrial genome were investigated in Cheju native horse population. The cytochrome-b gene was amplified (1.14 kb) by using PCR, and digested with restriction enzymes(*Msp* I, *Hae* III), which recognize four nucleotides. Two variant types were found when the cytochrome-b genes was digested with *Msp* I enzyme, which are designated, A type (900, 240 bp) and B type (760, 240 and 130bp), respectively. In this study, A and B type was detected in 21 and 4 individual horses, respectively. Therefore, we suggest that this result provides a useful genetic marker in Cheju native horse, as well as useful tool for individual identification and parentage control in horse population.

Key word:  $\epsilon$ -globin gene, Perissodactyla, base substitution, phylogenetic relationship, mammalian, sequencing, gene alignment, cytochrome-b gene, mitochondrial DNA, restriction enzyme, genetic variant, Cheju native horse.

---

제 1 장

Epsilon globin 遺傳子 分析에 의한 奇蹄目  
몇 種間의 系統類緣關係 分析

Phylogenetic Relationship in Some Species  
of Perissodactyla by  $\epsilon$ -Globin Gene Analyses



# I. 서론

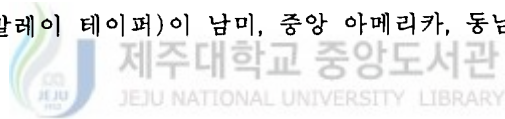
## (1) 奇蹄目(Perissodactyla)의 進化

奇蹄目は 현생 포유류 16目 가운데 하나로 그 進化 과정은 化石에 바탕을 두어 고생물학적, 생물지리학적 연구가 매우 활발하게 이루어져 왔으며, 오늘날의 생물 진화학적 연구에 이용된 바가 크다. 奇蹄目(Perissodactyla)에는 馬科(Equidae), 코뿔소과(Rhinocerotidae), 맥과(Tapiridae)가 존재하며, 이들 3과의 진화학적 연구는 치아(dental), 두개골(cranial), 후두골(postcranial), 그리고 발(hind foot and fore foot)의 化石 표본을 대상으로 이루어져 왔다(Simpson, 1951; MacFadden, 1976, 1988). 기재目を 최초로 보고한 Owen(1848)은 有蹄類(Ungulate)를 偶蹄目(Artiodactyla)과 奇蹄目(Perissodactyla)으로 분류하였다. Marsh(1884)는 奇蹄目 위에 上目(superorder)에 Mesaxonia, 그리고 奇蹄目 아래로 Hippomorpha亞目(Wood, 1937)과 Ceratomorpha亞目(Wood, 1937)으로 분류 하였다. 기재류 분화는 효신세 3기(late Paleocene)에 다른 포유류와 함께 다윈 발생적으로 분화하여 원시 유제류 동물로 적용되어 왔다. 그리고 시신세(Eocene: 54 Mya, million year ago)에는 코뿔소亞目(코뿔소과, 테이퍼과), 갈고리발亞目(Chalicotheres, Paleotheres), 馬亞目(Brontotheres, Equidae)이 있었고 6과가 광범위하게 분포하고 있었다.

기제류는 북아메리카 대륙에서 처음으로 출현하였으며 化石학상으로 보고된 자료에 의하면, *Loxolophus*(early Paleocene)는 원시 有蹄類로서 *Phenacodontid condylarths*의 원시조상으로 보고있다. *Tetraclaenodos*(middle Paleocene)는 Phenacodontid 科에 포함되며, 모든 奇蹄目的의 조상으로 알려져 있다. 이 종의 특징으로는 영성한 다리와 각 다리에 5개의 발톱(toe)을 가지고 있었다. 그리고 효신세 후기(late Paleocene)에 출현한 *Radinskya yupingae*는 아시아 대륙까지 분포하였다(Prothero and Schoch 1989). *Homagalax*(early Eocene)는 말과의 원시조상인 Hyracotherium의 sister group으로서 보여지며, 그리고 *Tapia*의 조상으로 추정되는 *Heptodon*(late early Eocene)은 two group으로 나누어져 *Helaletes*(Eocene)와

*Hyrachyus*(late Eocene)로 분화했다. *Heleletes*는 점진적으로 진화되어 오늘날의 *Tapia*와 유사한 *Prototapia*로 분화되었으며, 중신세 초기(early Miocene)에는 *Mitotapirus*로 진화 되었다. 그리고 갱신세(Pliocene)에 출현한 *Tapirus*는 현생 테이퍼과 동물과 같은 종으로 보고 있다. *Hyrachyus*는 코뿔소와 테이퍼의 조상(Rhino-Tapiroid or running Rhino.)으로 보여지는 *Hyracodontids*(hyracodon)으로부터 탄생된 종으로서 조밀한 치아(high crowned teeth)구조와 거대한 체구, 짧은 코가 특징이다. 그리고 점진세 초기(early Oligocene)에는 큰 체구와 뿔이 없는(hornless) *Caenopus*가 출현하였고, 중신세에서 점진세(Miocene-Pliocene)사이에 현생의 원시코뿔소가 출현하였다. 그리고 현생의 코뿔소는 약 4 Mya에 최초로 출현하여, 오늘날의 4屬 5種(*Diceros bicornis*:검은 코뿔소, *Ceratotherium simus*;흰 코뿔소, *Rhinoceros unicornis*:인도코뿔소, *Rhinoceros ondaicus*;자바 코뿔소, *Dicerohinus sumatransis*:수마트라 코뿔소)이 동남 아시아, 아프리카, 인도 등지에 분포한다.

Tapiridae (테이퍼과)는 살아있는 화석이라 할만큼 현생 포유류 가운데 가장 원시적인 골격 구조를 갖는다. Tapiridae는 체고가 75 - 120cm 정도, 몸무게가 225 - 300 kg정도이며, 수컷이 암컷보다 작은 것이 특징이며, 현재 1屬 4種(*Tapirus terrestris*:남아메리카 테이퍼, *Tapirus pinchaque*:산 테이퍼, *Tapirus bairdi*:베어드 코뿔소, *Tapirus indicus*:말레이 테이퍼)이 남미, 중앙 아메리카, 동남 아시아 등지에 분포 서식한다.



## (2) 馬科(Equidae)의 進化

馬의 진화에 대한 연구는 Marsh(1879, 1884, 1892)가 최초로 북아메리카에서 발견된 馬의 화석에서 비롯되었다. 말의 기원은 Eohippus(Hyracotherium)라고 보고한 후 많은 학자들에 의하여 현재의 馬까지의 진화경로를 화석학을 중심으로 연구되어 왔다(Fig. 1, 2). 시신세(Eocene)에 출현한 馬의 조상은 현재의 개(doggish)정도의 체형으로 활처럼 휘둥(arched back), 짧은 목(short neck), 짧은 주둥이(short snout), 짧은 다리(short legs), 긴 꼬리(long tail)를 가지고 있어서 현재의 말과와는 형태적으로 상당한 차이가 있었다. 머리는 작은 전두엽 (frontal lobes)이며, 치아의 구조는 포유

동물의 원시적인 구조로서 3개의 앞니 (incisors), 1개의 송곳니(canine), 4개의 소구치(distinct premolars), 3개의 저작어금니(grinding molars)가 턱의 양쪽에 배열되어 있어서 omnivorous browsers의 전형적인 치아의 구조를 가졌다(Radinsky, 1983). Hyracotherium은 기제류의 원시종 가운데 대단히 성공적으로 분화 된 종으로서 시신세 중-초기(early middle Eocene)에는 Orohippus로 진화되었다 (MacFadden, 1976, 1988a, 1985; Matthew, 1926; Marsh, 1876).

Epihippus 출현은 시신세 중기(middle Miocene)으로서, 외부 형태는 Orohippus와는 큰 차이가 없으나, 치아에서 소구치 2개가 어금니(molar)같이 매우 발달하여 초식에 적응하였다. 중신세 중기에 출현한 Duchesnehippus는 Epihippus와 같은 종으로 보는가 하면, Epihippus의 아속 또는 하나의 종으로 보고 있다. 따라서 Hyracotherium, Orohippus, Epihippus는 말과의 원시적인 구조 형태를 가지고 있는 종으로서 시신세(Eocene)에 분포하였다. 이들 종의 출현은 원시적인 초식동물에서 소형 초식동물로 분화되는 과정에 있었던 종들이다.

Mesohippus는 시신세 후기에 갑자기 출현한 종으로 소형에서 중형으로 진화된 종이다. 즉 현재의 말의 기본 형태를 가지고 출현한 종으로서 현생 馬의 원시 조상이라 볼 수 있다. 이 종의 출현은 약 40 Mya으로 추정되며, 체형은 원시적 형태에서 탈피하였을 뿐만 아니라, 앞발과 뒷발의 발가락(toe)이 모두 3개로 진화되었다. 그리고 뇌 구조 역시 현격하게 발달되어 머리의 직경이 커지고, 3개의 송곳니가 어금니처럼 저작과 분쇄에 용이하도록 발달되었다.

Miohippus는 Mesohippus보다는 약간 큰 체형과 기다란 두개골과 이마를 가졌다. 그리고 이 두 종이 약 4 Mya이상 공존했을 가능성을 제시하였으나(Prothero and Schoch, 1989) 형태학적으로는 아주 큰 차이를 보이고 있다. 즉, Miohippus는 약 36 Mya에 출현하였으며 Mesohippus보다는 체구가 발달하여, 두개골(skull)과 상악치아(upper cheek teeth)가 발달하였다. Miohippus는 24 Mya(중신세 초기)까지 출현하였으며, Anchitherium, Archeohippu, Parahippus로 분화되었다. Anchitherium은 Hypohippus와 Megahippus로 나누어져 진화되었으며, Archeohippus(pygmy horse)는 이 시기에 출현하였으나 지속적으로 분화되지는 못했다. 이들 종의 특징은 발톱 3개(three toes)로 퇴화되었으며, 송곳니의 정단부가 채식에 용이하도록 발달되었다

(MacFadden, 1976, 1984, 1985).

Parahippus(22-17 Mya)는 중신세 초기에 출현한 종으로서 체형이 발달하여 다리 길이, 몸의 크기, 머리의 크기가 전체적으로 발달한 시기로서 경주(speed)와 구보(walking)에 효율적으로 적응되었다(MacFadden, 1988b; Matthew, 1926).

Merychippus는 꼬리가 약 40 인치 정도로 길어졌으며, 뇌의 크기와 두개골이 뚜렷하게 발달되어 초기의 馬 형태를 갖추는 시기로 보는 견해가 지배적이다. 그러나 발가락은 계속 3개로 남아 있다. Merychippus로 진화되는 시기는 20 Mya 으로서 북미에서 Alaska반도를 걸쳐 Siberia로 통하는 Bering 해협을 횡단하여 아시아 대륙으로 넘어 오는 시기로서 체형도 많은 진화를 거쳐 원시적인 말 형태를 갖추었으며, 몸무게도 약 200kg정도로 중형에 가깝게 진화되었다. 그리고 전 대륙으로 이주되면서 약 19 종이 탄생하여 馬의 분포에 새로운 전기를 마련한 종으로 알려졌다(Mac Fadden and Hulbert, 1988; Bennett, 1980). 현생 馬와 같이 하나의 발가락을 가진 馬종이 출현한 것은 Merchippus 계인 Hipparion과 proto-Hipparion으로 추정되고 있다. Pliohippus는 약 15 Mya에 Merchippus에서 진화되어 3개의 발가락중 2개가 퇴화되었다. 그리고 10 Mya에 Astrohippus가 출현하였다. 이 종은 Pliohippus가 퇴화되는 시기에 출현한 것으로 보고있다. 그리고 현재의 馬로 직접 진화된 Dinohippus는 1개의 발가락을 갖고 있었으며 12 Mya에 출현하여 4 Mya까지 분포하고 있었던 종으로서 Hippidion, Onohipp, Parahiparion과 Equus로 분화되어 현생마로 진화되었다(Bennet, 1980; MacFadden, 1984)(Fig 1).

현생 馬科(Equidae)가 탄생된 시기는 4 Mya로 보이며, 당시 말의 형태는 약 130 cm의 pony size로서 곧은 척추(rigid spine), 긴 목(long neck), 긴 다리(long leg), 융합된 다리 뼈(fused leg bone), 유연성인 주둥이(flexible), 깊은 턱(deep jaw)을 가진 simple horse였다. 따라서 4 Mya에서 부터 현생馬는 진화되어 2.5 Mya (late Pliocene)에 아프리카로 유입된 말은 현재의 Zebra까지 분화되었다(Lindsay *et al.*, 1980). 다른 경로인 아시아, 중동 또는 북 아프리카에는 사막에 적응된 Onagers와 Ass가 분포하고 있으며, 아시아, 중동, 유럽에는 *E. caballus*가 남아메리카로 분산되었다(Fig. 2). 현생 馬科 (Equidae)에는 1屬 4亞屬에 8種(*E. przewalskii*:몽고 야생마, *E. caballus*:가축마, *E. africanus*: 아프리카 야생 당나귀, *E. hemionus onaga*:아시아 들당나귀, *E.*



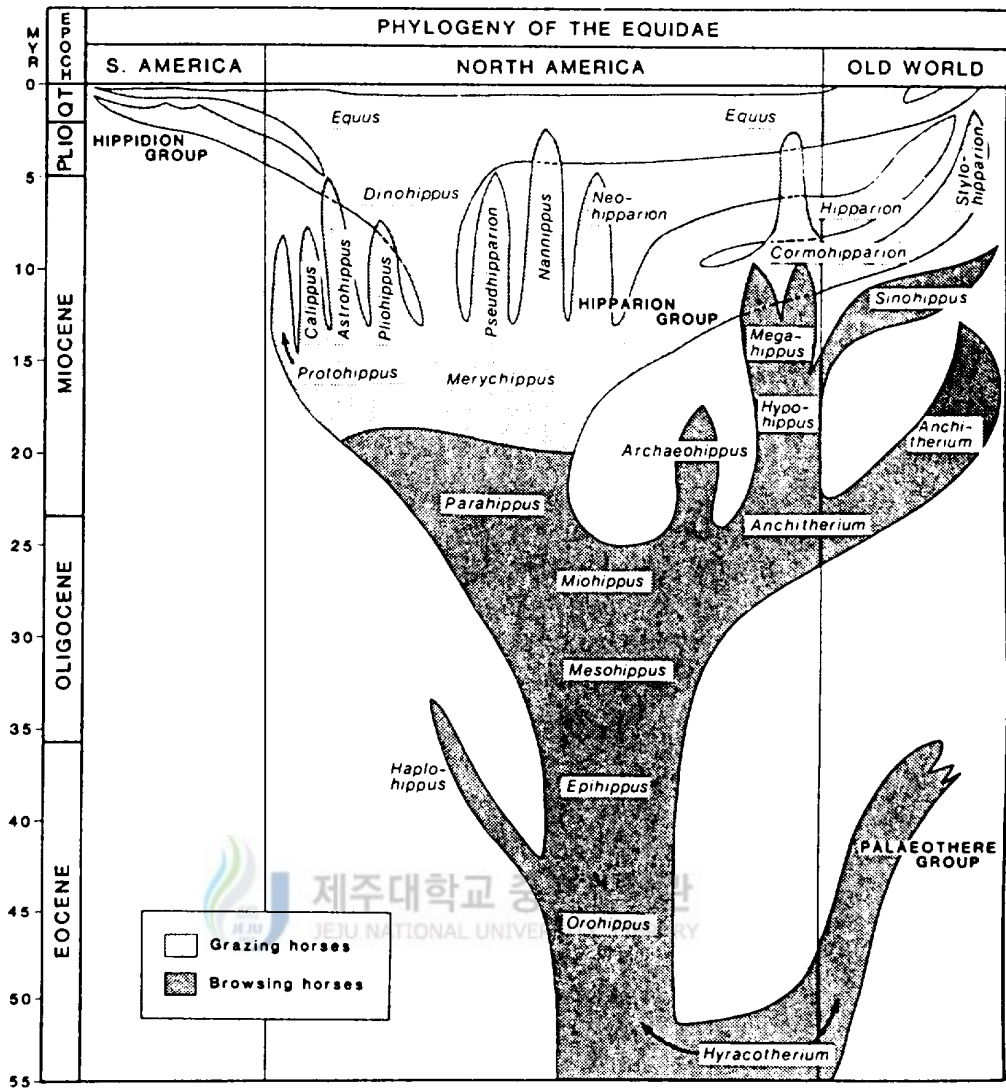


Fig. 1. Current phylogeny of the 57 million year record of fossil horses. Interrelationships of the currently recognized genera of horses. From MacFadden(1985).

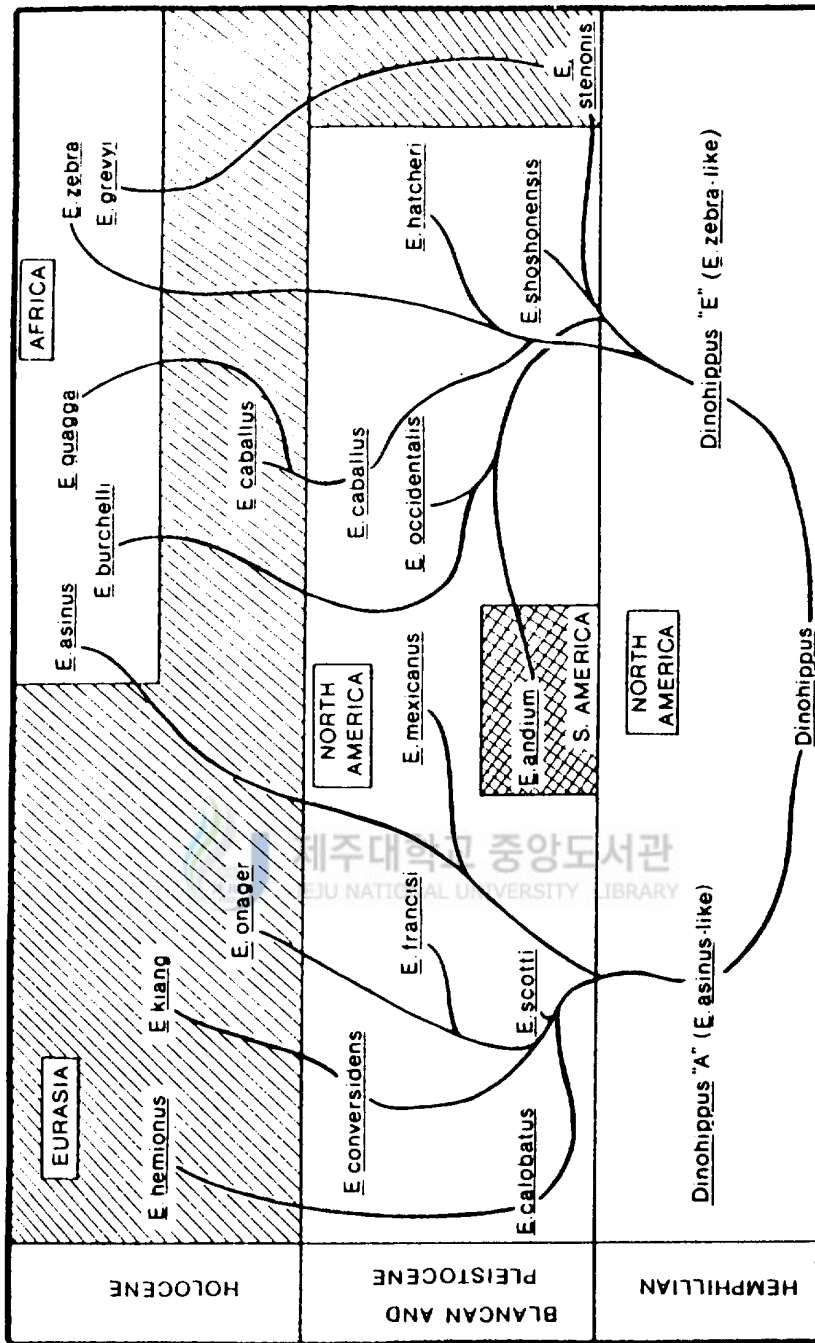


Fig. 2. Phylogeny of fossil and recent species of *Equus*. The origin of this genus from *Dinohippus*. From Bennett(1980).

*grevyi*: 그레비 얼룩말, *E. buechelli boehni*: 아프리카 얼룩말, *E. zebra hartmanae*: 산 얼룩말, 그리고 *E. quaga*이 아프리카와 아시아에 분포하고 있다.(Fig 2)

### (3) 분자 생물학적 연구

분자 생물학적 기법인 DNA RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), DNA sequencing, PCR (Polymerase Chain Reaction) 방법의 개발은 유전자의 염기서열의 분석과 염기 변화 (치환, 전이) 분석을 가능케 하였다. 이런 기법은 분자 진화학적, 유전학적 연구에 도입되어 보다 진전된 연구를 가능하게 하였다. 이러한 분자적 진화에 대한 연구는 주로 rDNA (18S - rDNA)(Lake, 1988 ; Lane *et al.*, 1985; Trociynski *et al.*, 1983), mitochondrial DNA (Attardi, 1985; Avise and Lansman, 1983; Cann *et al.*, 1983, 1987; Ferris *et al.*, 1981, 1982; Horai and Matsunaga, 1986; Horai *et al.*, 1984; Irwin *et al.*, 1991; Kikkawa *et al.*, 1995; Xu and Arnason, 1994; Ishida *et al.*, 1995; Koehler *et al.*, 1991; Excoffier and Langaney, 1989; Zhang and Ryder, 1993; Girman *et al.*, 1993; Loftus *et al.*, 1994), globin DNA ( $\alpha, \beta$ -globin genes cluster)(Akar *et al.*, 1978; Bailey *et al.*, 1991, 1992a, 1992b, ; Tagle *et al.*, 1988, 1991, 1992; Flint *et al.*, 1990; Reitman *et al.*, 1993; Fitch *et al.*, 1988, 1990, 1991; Goodman *et al.*, 1984; Shapiro *et al.*, 1983; Produfoot and Gil, 1982; Cheng *et al.*, 1988), Y-염색체의 반복배열(Casanova *et al.*, 1985; Spurdle and Jenkins, 1992), VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) (Nagamura *et al.*, 1987; Deka *et al.*, 1992)을 대상으로 이루어져 왔다.

포유동물에서의 globin gene은  $\alpha$ -globin,  $\beta$ -globin gene cluster로 구분되어 각각 다른 염색체 좌위에 위치한다. 이들 유전자는 유전적인 현상을 구명하는 모델로 잘 알려져 있다. 즉 gene duplication, conversion, divergence 같은 유전자의 유전적 변화기작을 연구하는 marker로서 널리 이용되어 왔다(Efstratiadis *et al.*, 1980; Hill *et al.*, 1984; Goodman *et al.*, 1984; Hardison, 1984; Koo *et al.*, 1989; Koop and Goodman, 1988; Shehee *et al.*, 1989; Magort *et al.*, 1989; Harris *et al.*, 1986). Globin 유전자는 식물의 뿌리 혹(root nodule)에서 산소를 운반하는 leghemoglobin(monomeric)에서

부터 무척추동물의 monomeric myoglobin, 그리고 고등척추 동물의 4량체 헤모글로빈 까지 one locus gene 또는 다연관 유전자(multiple-linkage gene)로 분포하고 있어서 생물의 진화 과정 및 유전자 분화기작을 이해하는데 놀랄만한 자료를 제공했다 (Jeffreys, 1982; Benz *et al.*, 1979). 사람에서의 globin 유전자는  $\alpha$ -globin gene family,  $\beta$ -globin gene family로 구성되어 있는데, 각각이 11번 염색체와 16번 염색체에 위치하고 있으며, 이들 유전자는 약 4.5~5억년전(450~500 Mya)에 분산된 것으로 추정되고 있다(Efstratiadis *et al.*, 1980). Globin 유전자는 복합연관 유전자(multiple linkage gene)으로서 유전자 군(gene cluster)를 이루고있으며, 이들 유전자는 발생 과정 중의 LCR(Locus Control Region), SSP(Stage Specific Protein), 그리고 SSE(Stage Specific Element)에 의한 gene switching regulation으로서 발생특이적, 조직특이적(time-, tissue-specific expression)으로 그 발현이 조절된다. 그리고  $\epsilon$ -globin gene의 5'-영역에서 5-21kb 정도에 위치하는 LCR은 globin 유전자를 발생특이적 발현을 조절하는데 관여한다(Orkin, 1990; Chada *et al.*, 1986; Choi and Engle, 1988; Karlsson and Nienhuis, 1985; Caterina *et al.*, 1991). 포유동물에서의 globin genes은 발생 특이적으로 발현이 이루어 지는데, 배발생 단계에 따라서  $\zeta\gamma$ -gene(Hb portland),  $\zeta\epsilon$ -gene(Hb grower 1),  $\alpha\epsilon$ -gene(Hb Grower 2),  $\alpha\gamma$ -gene(Hb F)순으로 유전자가 발현된 후, 출생 10 주전부터  $\alpha, \beta$ -gene이 발현되기 시작하며 출생 후에는 적혈구의 헤모글로빈을 구성하는 헤모글로빈 단백질은  $\alpha$ -globin과  $\beta$ -globin이 각각 2분자씩으로 구성된 4량체( $2\alpha 2\beta$ ) 단백질로서 기능을 수행한다(Orkin *et al.*, 1982).

Globin 유전자는 gene duplication, gene conversion, gene replacement, gene fusion 과같은 기작으로 진화되어 왔다(Fig. 3).  $\alpha$ -Globin gene family의 유전자의 구조는 5'-  $\zeta$ -  $\psi\zeta 1$ -  $\psi\alpha 2$  - $\psi\alpha 1$ - $\alpha 2$  - $\alpha 1$  - $\theta 1$  - 3'순서로서 gene cluster를 형성하고 있으며, 그 크기는 약 30 kb 정도이다. Globin 탄생은 약 5억년 전(500 Mya)으로 myoglobin gene에서 분지된 후, 다시  $\alpha, \beta$ -globin gene으로 분지되었다.  $\alpha$ -globin 유전자에서부터 3억년전(300 Mya)에  $\zeta$ -globin gene가, 2.6 억년전 (260 Mya)에  $\theta 1$ -gene가, 4,000 - 5,000만년전(40 - 50 Mya)에  $\psi\alpha 1$ -gene가 분지되어 현재의  $\alpha$ -globin 유전자 군을 형성하고 있다(Proudfoot and Gil, 1982). 사람의  $\alpha$ -globin complex 영역에는 minisatellite DNA를 구성하고 있는 HVR(hypervariable region) 영역에는 interzeta

(IZ), zeta-intron-1 ( $\zeta$ ), 그리고 3'-말단의 downstream 3'HVR core sequence (tandem repeat unit)가 특징적으로 분포되어 있다(Proudfoot and Gil 1982; Jarman *et al.*, 1986). 그리고  $\alpha$ -globin 상류부위에서 약 100 Kb에 minisatellite site로 구성된 5'-HVR이 위치하고 있다(Jarman and Higgs, 1988; Higg *et al.*, 1980). 5 억년전 (500 Mya)에 분지된  $\beta$ -globin gene은 2 억년전 (200 Mya)에 duplication기작에 의하여  $\epsilon$ -globin gene이 탄생되면서 유전자 군(gene cluster)을 형성하기 시작하여 오늘날의  $\beta$ -globin 유전자군을 이룬다. 이들 구조는 5'- $\epsilon$ -  $\gamma$ -  $\delta$ -  $\beta$ -3'순서로서 gene cluster를 형성하고 있으며, 그 크기는 약 65 Kb 정도로서  $\alpha$ -globin gene cluster에 비하여 다소 크다(Fritsch *et al.*, 1980).  $\epsilon$ -Globin gen은 200 Mya에 tandem gene duplication 기작에 의해 발생한 유전자로서 포유동물에서는 embryonic 시기에 proto- $\beta$  globin으로서  $\epsilon$ - globin gene를 발현한다. 따라서 포유동물 에서의  $\epsilon$ -globin gene은 약 100~90 Mya에 이미 다른 유전자와 linkage되어 있던 것으로 보고있다.  $\beta$ -Globin gene cluster는 사람을 비롯한 영장류에서는 5'- $\epsilon$ - $\gamma$ - $\eta$ - $\beta$ -3' form 으로 gene family를 구성하고 있으나, 우제류(Artiodactyla)인 산양의 경우는 5'- $\epsilon$ 1- $\epsilon$ 2- $\psi\beta$ 1- $\beta$ 1-3'과 같은 형태로 triplication으로 gene cluster(5'- $\epsilon$ 1- $\epsilon$ 2- $\psi\beta$ 1- $\beta$ 1- $\epsilon$ 3- $\epsilon$ 4- $\psi\beta$ 2- $\beta$ 2- $\epsilon$ 5- $\epsilon$ 6- $\psi\beta$ 3- $\beta$ 3-3')를 이루고 있다(Townes *et al.*, 1984a, 1984b). 이런  $\beta$ -globin gene을 바탕으로 한 분자진화는 유대동물의 주머니쥐(Koop and Goodman, 1988), 설치류의 마우스(Shehee *et al.*, 1989), 토끼목(lagomorph)의 토끼(Margort *et al.*, 1989), 영장류의 여우원숭이(Harris *et al.*, 1986), 안경원숭이(Koop *et al.*, 1989), 사람(Baralle *et al.*, 1980; Efstratiadis *et al.*, 1980, Antonarakis *et al.*, 1982), 우제류의 산양(Townes *et al.*, 1984), 등에서 많은 연구가 이루어 지고 있다.

Globin gene cluster는 정보영역과 비정보영역으로서 nonsense mutation, replacements, substitutions, codon mutation, repetitive site, pseudo-gene, LCR(Locus Control Region), Alu-family gene, gene conversion 그리고 gene linkage 같은 다양한 유전적 변이 기작과 유전자 구조는 유전자 분화 및 조절을 설명하는 model 유전자로 알려져 있다. 따라서 이런 현상은 동물의 진화적 위치, 종의 계통유연관계, 종의 분화 연구 등에 많이 이용되고 있다(Fitch *et al.*, 1988, 1990, 1991; Gieble *et al.*, 1985; Goodman *et al.*, 1984; Jeffrey, 1982; Konkel *et al.*, 1979; Koop *et al.*, 1989;

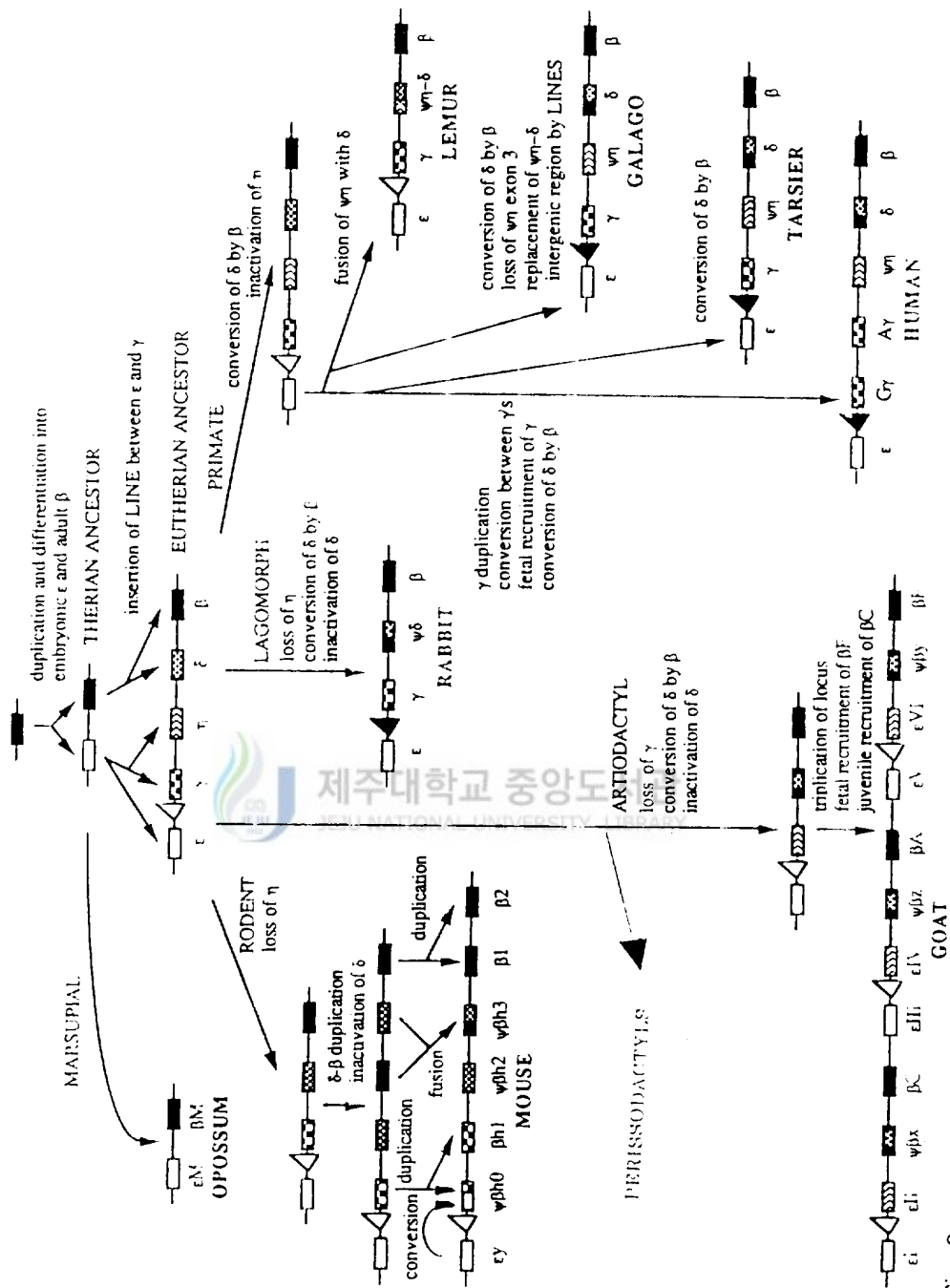


Fig. 3

Miyamoto *et al.*, 1987, 1988; Hayasaka *et al.*, 1992; Shehee *et al.*, 1989; Hill *et al.*, 1987; Tsintsof *et al.*, 1990; Wada-Kiyama and Kiyama, 1995; Tagle *et al.*, 1988, 1991; Slightom *et al.*, 1980, 1985, 1987, 1988; Robbins *et al.*, 1979; Reitmans *et al.*, 1993; Hardies *et al.*, 1984; Chang *et al.*, 1984; Hertzberg *et al.*, 1988; Trent *et al.*, 1988, 1990). 특히 영장류에서의  $\beta$ -globin 유전자 분석은 종분화 연구와 종간의 계통유연관계를 분석하는데 많이 이용된다. Bailey 등(1992)은 아프리카 침팬지(*Pan paniscus*)  $\beta$ -globin의 염기배열을 분석하여 사람과 비교한 결과 분리된 시기는 5~7 Mya이며, 긴팔원숭이(gibbon)으로 부터 분리된 시기는 17~19 Mya라 하였다. 또한 Koop 등(1986)은 오랑우탄(orangutan)의  $\epsilon$ -globin 유전자에서 Alu-repeat을 분석하여 사람, 침팬지, 오랑우탄과의 염기치환율  $1.0 \sim 1.5 \times 10^{-9}/\text{year}$  그리고 사람과 오랑우탄의 분산 시기는 약 10~15 Mya에 분리되었다고 보고한바 있다. 우제목(Artiodactyla)에 속하는 산양의 globin-gene의 구조는 5'- $\epsilon 1$ - $\epsilon 2$ - $\phi\beta A$ - $\beta$ -3'로  $\beta$ -globin cluster를 이루고 있다. 특히  $\epsilon$ -globin gene은 embryonic gene으로서 다른  $\beta$ -globin genes에 비하여 진화속도가 매우 느려서 포유동물간의 높은 상동성을 보존하고 있다.  $\epsilon 1$ 과  $\epsilon 2$ -gene은 146 개의 polypeptide로 구성되어 있으며, 3 개의 엑손(30, 74 and 42 amino acids)과 2개의 인트론으로 구성되어 있다. Goat의  $\epsilon 1$ -polypeptide를 사람의  $\epsilon$ -polypeptide와 상동성을 비교하여 보면 90% 정도, mouse embryonic  $\epsilon y 2$ ( $\epsilon$ -like gene)는 89% 정도의 높은 상동성을 보이고 있다(Shapiro *et al.*, 1983).  $\epsilon 2$ -polypeptide ( $\gamma$ -like gene)는 goat  $\epsilon 1$ 과는 78%, 사람의  $\epsilon$ -polypeptide와는 79%, 그리고 rabbit의  $\beta 3$ 와는 73%의 상동성을 보이며, 또한 사람의 fetal protein  $\gamma$ 와는 75%의 상동성을 갖는다. Goat의 non-coding region에서 nucleotide 상동성을 비교하여 보면  $\epsilon$ -globin gene IVS 1은 사람의  $\epsilon$ -globin gene IVS1과는 64%, 그리고  $\epsilon$ -globin gene IVS2 와 사람의  $\epsilon$ -globin gene IVS2의 상동성은 69%이다. 또한 coding sequence을 비교하여 보면  $\epsilon$ -globin gene 1은 사람  $\epsilon$ -globin gene과 89%, 마우스  $\epsilon \phi 2$ -globin gene과는 83%의 상동성을 가지며, 사람의 globin gene cluster에서 goat  $\epsilon 2$ -globin gene과 가장 높은 상동성을 가지는 gene은  $\gamma$ -globin gene으로서 79% 정도이다(Shapiro *et al.*, 1983).

한편, 말(Horse)의  $\alpha$ -globin gene cluster의 구성은 3'- $\zeta 2$ - $\zeta 1$ - $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\theta$ - $\phi \alpha$ -5' 으로

배열되어 있으며, 그 크기는 약 30 kb 정도이다(Bowling *et al.*, 1988; Clegg, 1987; Clegg *et al.*, 1984; Flint *et al.*, 1988, 1990). 馬科 화석학 연구에서 현재의 야생馬로 분산되는 시기는 3~5 Mya이라고 Simpson(1951)과 McFadden(1988a)이 보고하였다. 그리고 George와 Ryder(1986)가 mtDNA RFLP분석 결과 馬科의 분리는 3.7 Mya전에 분리되었으며, 염기 치환율은  $2.5 \times 10^{-8}$  bp/year 이라고 보고하였다. 그리고 Flint 등(1990)이  $\alpha$ -globin gene에서의 restriction map에 의한 연구에서 기제목의 sequence divergence 결과에서 유전자 치환율을  $2.1 \times 10^{-8}$  bp/year정도 라고 하였다. 그러나 기제목의  $\beta$ -globin 유전자에 대한 연구는 아직까지 전무한 실정이다.

기제목(Perissodactyla)에서 염색체 banding법 연구에 의하면 흰코뿔소(*C. simum*)는 40쌍의 상동염색체와 1쌍의 성염색체( $2n=82$ )를 가지고 있다(Houck *et al.*, 1994). 그리고, Ryder 등(1978)은 말과에 3屬 7種에서 염색체를 G-banding과 C-banding법으로 분석한 결과 몽고 야생마(*E. przewalskii*;  $2n=66$ ), 사육말(*E. caballus*;  $2n=64$ )(Ronne *et al.*, 1993; Maciulis *et al.*, 1984), 당나귀(*E. asinus*;  $2n=62$ ), 아시아 들당나귀(*E. hemionus onager*;  $2n=56$ ), 그레비 얼룩말(*E. grevyi*;  $2n=46$ ), 서너배얼룩말(*E. burchelli boehmi*;  $2n=44$ ), 제브라 얼룩말(*E. zebra hartmannae*;  $2n=32$ )로 보고하여 염색체 수준에서 진화를 설명 하였다. Ryder와 Chemnick(1990)은 아시아 야생당나귀인 *E. kiang holdereri*, *E. Hemionus kulan*, *E. hemionus onager*에서 염색체 수준에서의 진화와 mtDNA의 RFLP분석에 의한 분자진화를 설명하였다. 그리고 Breen 등(1994)와 Wichman 등(1991)은 13종류 microsatellite DNA를 이용하여 馬科에서의 domestic horse와 野生馬사이의 다형현상과 더불어 가축마 기원이 몽고야생마(*E. przewalskii*)일 가능성을 추정하였다. Wijers 등(1993)은 58번 염색체에 221 bp tandem repeat unit로 놓여있는 satellite DNA를 분석하여 馬의 진화수준을 설명하였다.

이렇듯 다양한 동물에서의 연구에도 불구하고 馬科를 포함한 奇蹄目(Perissodactyla)에서는  $\beta$ -globin유전자 구조에 대한 연구는 아직까지 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는  $\beta$ -globin gene cluster중에서 배발생 시기(embryonic time)에만 발현되는  $\epsilon$ -globin gene의 염기배열을 분석하여 지금까지 규명된 많은 포유동물  $\beta$ -globin gene cluster상의  $\epsilon$ -globin 유전자 구조와 상호 비교함으로써 기제목



의 계통유연관계를 구명 하고, 화석학적으로 밝혀진 많은 자료와 비교하여 진화학적 위치를 밝히고자 한다. 그리고 기제목(Perissodactyla)에서  $\epsilon$ -globin gene 분석을 통하여 奇蹄目의 진화적 위치를 추정하고, 코뿔소과(Rhinocerotidae), 테이퍼과(Tapiridae), 말과(Equidae)의 계통유연관계도 아울러 구명하고자 실시하였다.



## Ⅱ. 재료 및 방법

### (1) 사용시약

제한효소 *Ava* I, *Ava* II, *Kpn* I, *Sac* I, *Bam* HI, *Pvu* II, *Sty* I, *Xho* I, *Msp* I, *Hae* III는 NEB Inc. (Tozer Road Beverly, USA)에서 구입하였으며, PCR kit(Perkin Elemer, Foster city, USA), Taq-polymerase (ID-Lab., Canada), T-vector (Promega, Northern California, USA), RNase (Sigma, St Louis, Mo, USA), Protease K (Sigma, St Louis, Mo, USA), Ampiciline (Sigma, St Louis, Mo, USA), Dig-labelling kit (Boehinger Mannheim, Gemany), [ $\alpha$ - S]-dATP (spec. act. 3,000 Ci/mmol) (Ammesham, USA), dNTP( Perkin Elmmmer, USA), 32P-dCTP (speci. act 3,000 Ci/mmol, USA), Hyper-film (Ammersham Co, USA), Agarose (Sigma, St Louis, Mo, USA and Promega, USA), Nylon membrane(positive charge, Sigma, St Louis, Mo, and Ammershsam, USA), X-Gal (Sigma, St Louis, Mo, USA), IPTG (Sigma, St Louis, Mo, USA), Repel Silan (Phamacia,Sweden), Bind Silan (Phamacia, Sweden) 등이 본 연구에서 사용 되었다.

### (2) Primer 디자인과 합성

본 실험에 사용된 primers는 현생 포유동물 16목 가운데 馬科 또는 奇蹄目に 진화 상으로 가장 가까운 포유류인 goat의  $\epsilon$ -globin 유전자(Shanpiro *et al.*, 1983)의 염기 서열에서부터 디자인 하였다. Primers 디자인은 DNASIS Program을 이용하여 아래와 같이 총 3쌍의 primer를 디자인하여 DNA International In.(USA.)에서 합성 의뢰 하여 사용하였다.

2-1) CCAAT box에서 poly A site까지 합성에 이용된 primer

F1: Primer CCAAT box (5'-GGGACACAGCCTAACCTTGACCAA-3')

R1: Primer exon 3 (5'-AATAATCACCATCACGTTACCCAGG-3')

2-2) Exon 1 end 에서 3 exon upstream site까지 합성에 이용된 primer  
F2: Primer exon2 (5'-GGAAGAGGCTGGAGGTGAAGCCTTGGG-3')  
R2: Primer poly A site (5'-CCAAGGGGCAGAAGGAAGGCACTGG-3')

2-3) Exon 1 start code에서 exon 3 stop code까지 합성에 이용된 primer  
F3: Primer state (5'-ATGGTGCATTTTACTGCCGAG-3')  
R3: Primer stop (5'-GTGGTACTTGTGGGCACGAGC-3')

### (3) 혈액 채취 및 Genomic DNA추출

혈액은 제주도 축산진흥원에서 보호 사육하는 제주 재래마와 한국 마사희 제주도 종마장에서 사육되는 馬의 경정맥에서 50-ml 주사기를 이용하여 채취 하였다. 채취한 혈액은 항응고제로 처리된 50-ml conical tube에 넣고 얼음에 보관하여 실험실로 옮겨 total DNA를 분리하기 위한 시료로 사용되었다. 日本 對馬島 재래마의 혈액은 1994년 8월 長崎大學 공동 연구팀과 함께 對馬島를 방문하여 채취 하였다. 중국마의 DNA sample은 中國 유남성 재래마에서 분리한 genomic DNA를 中國科學院 昆明動物 研究所의 Wen Wang박사로부터 받아 사용하였다.

Total DNA를 분리하기 위해서 혈액에서 buffy coat층(혈장과 혈구 사이층)을 얻은 후 white cell lysis buffer (WCLB: 10 mM Tris, pH 7.6, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl)를 2배 가량 첨가하여 20% SDS를 최종농도 1%가 되게 첨가하여 세포를 lysis시켰다. 그리고 RNase(20 µg/ml), Protease K (100 mg/ml)를 처리하여, 65℃에서 1시간 동안 방치하였다. 이 때 2-3회 정도 뒤집어 주었다. 그리고 5 M NaCl을 시료의 1/5 vol. 정도 넣고 혼합시킨 후 증화된 phenol (pH 8.0)을 동량 첨가하여 30분 동안 혼든 후 4℃에서 4,000 ×g로 10분 동안 원심 분리하였다. 상층액을 채취하여 phenol : chloroform (1:1)을 넣고 다시 10분 동안 혼든 후, 10분동안 4,000 ×g 에서 원심분리하여 상층액을 얻었다. 그리고 phenol-chloroform으로 약 2-3회정도 extraction하였다. 상층액에 다시 chloroform : isoamyl alcohol (24:1)을 동량 넣고 혼합한 후 다시 원심 분리하였다. 그리고 최종적으로 냉장된 에탄올을 2배 첨가하여

-20℃에 1시간 이상 보관한 후 약 2,000~3,000 ×g에서 원심분리하여 DNA pellet을 얻었다. DNA 세척은 70% EtOH를 넣고 가볍게 원심분리하여 상층액을 버리고 진공 건조 또는 자연건조 시킨 후 TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)에 total DNA를 녹였다. 분리된 DNA는 0.7% agarose gel에 loading하여 확인하거나 또는 분광광도계(260/280 nm)에서 OD값을 측정하여 농도를 측정 하였다.

코뿔소과의 흰 코뿔소(*Ceratotherium simum s.*), 테이퍼과의 남아메리카 테이퍼(*Tapirus terrestris*), 그리고 馬과의 5種인 아시아 들장나귀(*Equus hemionus*), 그레비 얼룩말(*Equus Grevyi*), 산 얼룩말(*Equus zebra hartmannae*), 아프리카 야생 당나귀(*Equus africanus somalicus*), 몽고 야생마(*Equus przewaskii*)의 genomic DNA를 미국에서 공급받았다. 이들 7종은 멸종위기 동물로서 CITS 조약(Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) 으로 규제를 받고 있는 동물로써, 시료는 미국의 캘리포니아주의 San Diego에 있는 Center for Reproduction of Endangered Species의 팀장인 Oliver A. Ryder박사로 부터 제공 받았다.

#### (4) Southern blot 분석

##### 4-1) Genomic DNA의 제한효소 처리 및 전기영동

Total DNA를 절단하기 위해서 제한효소(restriction endonuclease) *Bam HI*을 10 units/ $\mu$ g으로 처리한 후, 37℃에서 밤새 반응시켜 DNA를 완전히 절단하였다. 그리고 절단된 DNA시료의 완전절단 여부는 mini-gel horizontal electrophoresis를 사용하여 확인하였다. 제한효소 처리된 DNA는 1.0% agarose gel에서 1 V/cm의 전류를 주어 16 시간 동안 실온에서 전기영동하여 분리하였다.

Southern blot는 Southern (1975)의 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 전기영동이 끝 gel을 사진촬영 후 denature sol. (0.2 M NaOH, 1.5 M NaCl)에서 20분씩 2번, 그리고 중류수로 가볍게 gel을 씻어내고, neutralization buffer (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 7.4)에서 20분 씩 2회 처리후 positively charged nylon membrane에 capillary transfer방법으로 DNA를 옮겼다. 이때 transfer buffer는 20 X SSC buffer (3 M sodium citrate, 1.5 M NaCl, pH 7.5)를 이용하여 6 ~12 시간 동안 전이시켰

다. Nylon membrane에 전이된 DNA는 UV-crosslinker (Hybaid Co. UK)를 이용하여 DNA를 고정하고, 실온에서 건조 시킨 후 hybridization을 실시하였다.

#### 4-2) Digoxigenin-labelling Method에 의한 Probe준비

사람의  $\beta$ -globin gene cluster의  $\epsilon$ -globin 유전자(1.2kb, *Eco RI-Bam HI*)를 K. Shimizu 박사(Japan)로부터 제공받아 probe로 사용하였다. Probe를 Digoxigenin-labelling하기 위하여 제조사에서 제공한 random primed 방법으로 실시하였다. 먼저 순수분리된 DNA fragment (300 ng)를 95°C에서 10분 동안 가열하여 재빨리 얼음으로 옮겨 ssDNA를 만든다. 그리고 0.035 mM dUTP (digoxigenin-11-dUTP), 0.4 mM dNTP (dCTP, dATP, dGTP, dTTP)와 Klenow enzyme (2 units) 첨가하여 총 20  $\mu$ l 반응용액을 만든 후 37 °C에서 12~24 시간동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 0.2 M EDTA용액을 첨가하여 반응을 중지 시킨 후 3 M LiCl 용액을 1/4정도 첨가하고, 냉장 에탄올을 2 vol. 첨가하여 -70 °C에서 30분 동안 방치한 후 12,000  $\times$ g에서 10분 동안 원심분리를 실시하였다. 그리고 70% EtOH을 이용하여 washing 하고, 상층액을 버린 후, 진공 건조시켰다. 건조 후 TE buffer를 30  $\mu$ l정도 첨가하여 DNA를 녹여 probe로 이용하였다.

#### 4-3) Hybridization 및 Immunodetection

Membrane (positively charge nylon membrane)을 pre-hybridization sol. (5 X SSC, 0.1% N-laurylsarcosine, 0.02 % SDS, 1 % blocking sol.)에 넣고 hybridization oven(Hybaid Co.)에 68°C에서 3시간 동안 pre-hybridization을 실시하였다. Pre-hybridization이 끝나면 준비된 probe를 100°C에서 10분동안 boiling하여 ssDNA을 만들어 hybridization용액과 섞은 후 hybridization oven에서 12시간 동안 혼성화 하였다. Membrane은 0.1% SDS가 포함된 2X SSC buffer를 이용하여 실온에서 10분씩 2회 세척한 후 0.1 X SSC buffer (0.1 % SDS)에서 10분씩 2회 세척하였다.

Immunodetection은 washing을 마친 membrane을 buffer I (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5)으로 가볍게 씻어낸 후, buffer I (1% blocking sol./ buffer I)에서 30분 동안 blocking을 실시한 후, alkaline phosphatase에 antidigoxigenin fab

fragment를 결합시킨 항체를 1/5,000로 희석하여 1시간 동안 incubation하였다. 비 결합 항체제거는 Buffer I을 이용하여 20분씩 2회정도 처리한 후, membrane를 buffer III sol. (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5)으로 가볍게 씻었다. Color detection을 위해서 buffer III sol. 10 ml에 NTP 35  $\mu$ l, X-phosphate 용액 45  $\mu$ l를 혼합한 용액에 membrane를 처리하여 암조건하에서 밤새 반응시켰다.

#### (5) PCR에 의한 $\epsilon$ -globin 유전자 증폭

PCR mixture는 약 100 ng 정도의 genomic DNA, 각각의 primer 20 pmol, dNTP (dATP, dTTP, dCTP, and dGTP) 200  $\mu$ mol, 50 mM KCl, 10mM Tris (pH 8.3), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>를 함유하여 최종 volume은 50  $\mu$ l이 되도록 하였다. 이 용액을 잘 혼합하여 동량의 mineral oil을 넣고 PCR thermocycler(Phamasia Co. Sweden)에 넣어 반응 시켰다. PCR-cycle은 먼저 pre-heat cycle은 95 $^{\circ}$ C에서 2분, 85  $^{\circ}$ C에서 2분, main cycles은 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 55 $^{\circ}$ C에서 2분, 72 $^{\circ}$ C에서 3분씩 총 30 cycles을 실시하였다. Taq-polymerase (Perkin Elemer Co.)는 pre-heat 끝나고 main-cycle로 들어가기 전에 3 units을 첨가 하였다. PCR 수행시 primer는 forward primer 3와 reverse primer 3개를 서로 조합 하면서 실시하였다. 그리고 control template DNA로 사용된 goat  $\epsilon$ -globin gene (p $\pi$ SV)은 미국 Cincinnati 대학의 Jerry. B. Lingrel 박사로부터 제공받아 사용하였다.

#### (6) $\epsilon$ -globin 유전자 확인

PCR cycle이 끝나면 mineral oil을 제거한 후 동량의 chloroform을 첨가하여 순수한 PCR product를 얻었다. 그리고 10  $\mu$ l 정도를 1.2% agarose gel에 loading 하여 전기영동을 실시 하였다. 전기영동은 Minigel kit(Mupid Co., Japan )에서 50V에서 1시간 동안 실시하였다.

전기영동이 끝나면 gel을 ethidium bromide 용액에서 30분 동안 염색하여 UV-illuminator(Phamacia Co., Sweden)에서 polaroid camera를 이용하여 촬영하였다.  $\epsilon$ -

globin 유전자는 southern blot 방법으로 확인되었다. 이 때 사용된 probe는 goat  $\epsilon$ -globin gene (p $\epsilon$ SV)을 template로 PCR을 수행하여 증폭한 후, 1.2% low melting agarose gel에서 PCR product만을 Maniatis *et al.*,(1989)의 방법에 의거 순수분리된 DNA를 사용했다.

#### (7) PCR product 추출

PCR방법(Saiki *et al.*, 1985)으로 증폭된  $\epsilon$ -globin 유전자는 Maniatis *et al.*,(1989)의 방법으로 순수분리 하였다. 먼저 PCR product는 1.2% low melting agarose 전기영동으로 분리한 후 예상되는 DNA fragment ( $\epsilon$ -globin)를 UV-lamp하에서 오려낸 후 1.5 ml microtube에 옮기고 가볍게 원심분리 하였다. 그리고 오려낸 agarose 부피의 약 4~5배 정도의 TE buffer을 첨가하여 60~75°C에서 10분 동안 방치하여 agarose을 녹이 후 실온에서 식힌 다음 포화된 phenol (pH 8.0)을 동량 넣고 DNA를 추출하였다. 그리고 4,000  $\times$ g에서 10분 동안 원심분리를 하여, 상층액을 얻은 후 phenol-chloroform (1:1)을 동량 넣고 다시 원심분리를 하였다. 마지막으로 상층액을 채취하고 chloroform : isoamylalcohol (24:1)을 동량 넣고 처리한 후 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 상층액에 0.3 M 정도의 sodium acetate (pH 5.4)와 에탄올 2배를 처리하여 -70°C에서 1시간 정도 보관 후 15,000  $\times$ g에서 원심분리하여 DNA pellet을 얻고, 70 % 에탄올로 DNA를 세척하였다. 세척된 DNA는 진공건조한 후 TE buffer를 10  $\mu$ l 첨가하여 녹인 후 agarose gel 전기영동으로 확인하였다.

#### (8) $\epsilon$ -Globin 유전자 Cloning

PCR 산물인  $\epsilon$ -globin gene를 cloning하기 위해서 T-vector (pGEM, Promega Co.)와 pCR-script SK(+) vector (Stratagene Co.)를 사용하였다. 먼저 T-vector에 ligation은 준비된 insert DNA 3  $\mu$ l(50 ng), vector 1  $\mu$ l (10 ng), 10 X reaction buffer 1 $\mu$ l, T4-ligase 1  $\mu$ l (20 Units)에 최종 Vol. 10  $\mu$ l되게한 후 15°C에서 overnight 반응시켰다. pCR-script SK(+)에 ligation은 pre-digested pCR-script SK(+) vector

1  $\mu$ l (10 ng), 10 X reaction buffer 1  $\mu$ l, rATP 0.5  $\mu$ l (0.02 mM), Srf I restriction enzyme 1  $\mu$ l (5 unit), T4-ligase 1  $\mu$ l (4 unit)을 혼합시킨 후 최종 vol. 10  $\mu$ l 되게 하여 4°C에서 밤새 반응시켰다.

형질전환에 사용된 균주로는 DH5 $\alpha$  (*supE44*  $\Delta$ *lacU169* ( $\phi$ 80*laxZ*  $\Delta$ M15) *hsdR17*, *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *reA1*), JM109 cell (*recA1* *supE44* *endA1**hsdR17* *gyrA96**relA1* *thi* $\Delta$ (*lac-proAB*), *F'*[*traD36**proAB*+ *lacI* *lacZ* $\Delta$ M15])을 사용하였으며, 형질전환은 CaCl<sub>2</sub> 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 먼저 competent cell은 본 연구실에서 stock으로 보관 중인 cell을 -70°C에서 실온으로 옮긴 후, 준비된 LB-plate 배지에 도말하여 37°C에서 12~24 시간동안 배양하여 만들어졌다. 그리고 colony 직경이 2 mm 정도된 colony를 선발하여 15 ml conical tube에 5 ml의 LB-broth배지에 균주를 접종하여 37°C에서 배양했다. 12시간 배양 후에 1ml 정도의 균주와 신선한 LB-broth배지에 접종하여 약 3시간 배양하여 0°C에 1시간 보관 한 후 2,500  $\times$ g에서 10분 원심분리하여 세포를 침전시킨 후, 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 을 처리하여 resuspension을 하였다. 그리고 다시 원심분리하여 세포를 다시 회수하여 0.1 M CaCl<sub>2</sub>를 처리하여 얼음에서 1시간 동안 보관한 후 200  $\mu$ l씩 microtube에 넣고, ligation 된 DNA 5  $\mu$ l정도를 competent cell에 넣고 혼합하여 얼음에서 1시간 동안 보관하고 난 후 42°C에서 1분 동안 heat shock을 주어 형질전환을 실시하였다. 그리고 ice에서 3분 정도 식힌 후에 SOC medium (2% bacto-trypton, 0.5% bacto-yeast extract, 0.05% NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM glucose) 800  $\mu$ l정도 넣고 37°C에서 1시간 동안 배양한다. 그리고 ampiciline이 처리된 LB-plate (50  $\mu$ g/ LB ml)에 100  $\mu$ l정도의 cell을 도말 하여 밤새 배양하여 white colony를 선발하였다. 형질전환 된 세포를 petri dish에 뿌리기 전에 LB-plate에 미리 X-Gal 20  $\mu$ l (50mg/ml), IPTG 40  $\mu$ l (0.2 M)을 처리 하였다.

#### (9) Clone 선발과 Plasmid 분리

선발한 white colony를 ampiciline (50  $\mu$ g/ml)이 들어있는 LB-broth배지에서 12시간 동안 배양한 후 mini preparation 방법으로 plasmid DNA를 분리하였다. 먼저 세



포 배양액을 1.5 ml tube에 옮긴 후 12,000 ×g에서 3분 동안 원심분리하여 침전시킨 후 배양액을 버렸다. 그리고 200 μl 정도의 남은 배양액에서 세포를 vortex를 이용하여 resuspension하였다. 그리고 TEN buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M NaOH, 0.5% SDS, 1 mM EDTA) 300 μl정도 넣고 혼합한 후에 3 M sodium acetate (pH 4.7)를 150 μl 넣고 혼합하여 12,000 ×g 에서 5분동안 원심분리하였다. 그리고 상층액을 회수한 후에 EtOH 900 μl를 넣고 -20 °C에서 1시간 동안 보관 하였다. DNA 침전은 12,000 ×g에서 10분 동안 원심분리한 후에 상층액을 버리고, 70% EtOH을 넣고 다시 원심분리하여 plasmid DNA을 washing 하였다. DNA 건조는 dry oven을 이용하여 건조 시킨 후에 RNase (50 mg/ml)가 들어있는 TE buffer를 넣고 DNA을 녹였다. Plasmid DNA 확인은 1.0% agarose gel 전기영동으로 확인하고, UV-illuminator하에서 polaroid camera로 촬영한 후에 insert DNA를 선별하였다. 그리고 restriction enzyme *Pvu* II, *Kpn* I, *Sac* I 를 처리하여 insert DNA와 plasmid vector를 구별하였다.

#### (10) Nucleotide Sequencing

염기서열 분석은 예상되는 clone들을 위 방법으로 선별하여 DNA purification Kit (Wizard mini column, Promega Co.)를 사용하여 순수분리한 후에 Sanger방법(1977)과, automatic sequencer (ABI Inc.)를 사용하여 분석하였다.

먼저 ε-globin template DNA 5 μg (recombinant plasmid DNA)를 준비한 후 증류수 9.4 μl, 1 M NaOH 4 μl, 2.5 mM EDTA 5 μl를 혼합하여 37°C에서 30분 incubation 시킨 후에 EtOH 2 Vol.과 3 M NaOAc 3 μl을 첨가하여 -70°C에서 15분 동안 보관하였다. 그리고 15,000 ×g에서 30분 동안 원심분리하여 DNA pellets을 얻은 후 진공건조시켜 template DNA를 준비하였다.

Template DNA (5 μg/7 μl)에 Rxn buffer 2 μl (50 μg/ml), primer 2.5 ng을 반응 tube에 넣고 65°C에서 2분 동안 incubation을 실시한 후 실온에서 30분동안 cooling하였다. Labeling반응은 혼합된 template-primer에 0.1 M DTT 1 μl, labeling mix sol. 2 μl, [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]dATP (6000 Ci/mmol) 0.5 μl와 sequenase 2 units를 첨가

하여 잘 혼합시킨 후 실온에서 5분 동안 반응을 실시하였다.

Termination 반응은 4개의 각 tube에 labeling 반응시킨 용액 3.5  $\mu$ l를 나누어 넣고, terminal mixing된 dNTP와 ddNTP (Tube G: 4 dNTP/ 7.5  $\mu$ M ddGTP 150  $\mu$ l; Tube C: 4 dNTP/ 7.5 ddCTP 150  $\mu$ l; Tube A: 4 dNTP/5  $\mu$ M ddATP 150  $\mu$ l; Tube T: 4 dNTA/ 5  $\mu$ M ddTTP 150  $\mu$ l)를 각 T, G, C, A tube에 넣고 37°C에서 15분동안 sequenase 반응을 실시하였다. Stop 반응은 4  $\mu$ l formamide, 0.15% xylene cyanol, 0.15% bromophenol blue, 0.37% EDTA를 첨가하였다. Sample은 95 °C에서 3분 동안 가열시켰다.

전기영동은 7% polyacrylamide—6 M urea gel을 이용하여 60 watt에서 4 시간 정도 running 하였다. 전기영동이 끝나면 10% EtOH-AcOH (1:1)에서 20분 동안 washing한 후 자연건조시킨 후에 X ray-film을 밀착시켜 -70°C에서 5일 동안 노출시켰다.

Automatic sequencing은 ready reaction DyeDeoxy terminator cycle sequencing 방법을 적용하였다. 먼저 plasmid DNA 400 ng, primer 3 pmol, terminator premix 8  $\mu$ l를 혼합하여 최종 vol. 20  $\mu$ l에 동량의 mineral oil를 넣고 PTC-150 mini-cycler에서 25 cycle를 반응하였다. Sequencing에는 총 7 종류의 primer들을 사용하여 분석하였다(Table 1).

Terminator premix 조성은 5 X TACS buffer(400 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 9.0), deoxynucleotide triphosphate mix (750  $\mu$ M dITP, 150  $\mu$ M dATP, 150  $\mu$ M dCTP, 150  $\mu$ M dTTP), G-, A-, T-, C- DyeDeoxy terminator, ampliTaq DNA polymerase (ABI, Foster City CA). Amplification반응 cycle은 pre-heat 96°C 3분, main cycle은 96°C 30 초, 50°C 15 초, 60°C 4분에서 25 cycle을 반응시킨 후, final cycle은 60°C에서 5분 동안을 반응시켰다. 잔류 nucleotide(unincorporated) 제거는 Centi-Sep spin column (Princeton separations Adelphia, NJ)을 사용하였다. Loading buffer는 6  $\mu$ l deionized formamide, 50 mM EDTA, (pH 8.0) 넣고, 90°C에서 2분동안 boiling하였다. 전기영동은 6% denaturing polyacrylamide gel을 조성한 후 Automatic Sequencer (model 373 Automated DNA sequencer, ABI Inc.)를 사용하여 30 W, 1,300 V에서 12 시간 동안 전기영동을 실시

하였다. Sequencer분석은 ABI sequencer software program (Ver. 1.21)으로 자동으로 행하여지는 것을 편집하여 완성하였다.

Table 1. Various primers for sequencing of *Perissodactyla*  $\epsilon$ -globin gene

Name of Primers	Sequence
Exon2	5'-CATGGCAAGAAGGTGCTGACC-3'
Intron2	5'-GTCTCTAACCAATGCAATAAC-3'
CCAAT box	5'-GGGACACAGCCTAACCTTGACCAA-3'
Exon3	5'-AATAATCACCATCACGTTACCCAGG-3'
Exon1	5'-ATGGTGCATTTTACTGCTGAG-3'
T7-primer	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
SP6-primer	5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3'

#### (11) Phylogenetic tree 구성 및 기타 분석

$\epsilon$ -globin base sequence를 자료로 하여 matrices을 작성하여 UPGMA (Unweighted Pair Group Method)(Sneath and Sokal, 1973)와 NJ (Neighbor-Joining)방법에 의거한 tree (Saitou and Nei, 1987; Nei, 1991; Nei and Gojobori, 1986; Nei and Li, 1979; Nei and Hughes, 1992) 작성, 그리고 pasimony tree (Ver. 3.1)(Swofford and Olsen, 1990) program을 이용하여 포유류의 유연관계를 분석하였다. 그리고 이들 Tree구성에 이용한 Program은 MEGA (Ver. 1.2)와 PAUP program를 이용하였다 (Kimura, 1980; Kurmar *et al.*, 1993). 기제류의 계통유연 관계분석은 이미 유전자 구조가 밝혀진 사람(Baralle *et al.*, 1980), 영장류(Koop *et al.*, 1986), 산양 (Shapiro, *et al.*, 1983), 토끼(Hardison, 1984), 마우스(Hill *et al.*, 1984), 돼지(Sharma *et al.*, 1995)의  $\epsilon$ -globin 유전자 염기서열과 gene alignment를 실시하므로서 수행되었다.

### Ⅲ. 결과

#### (1) Southern blot에 의한 제주마의 $\epsilon$ -globin 유전자 분석

馬의  $\epsilon$ -globin 유전자의 RFLP 분석은 p $\epsilon$ globin 유전자를 사용하여 수행하였다. probe p $\epsilon$ (human  $\epsilon$ -globin Gene, 1.1 kb)와 *Bam* HI를 이용하여 제주마의  $\epsilon$ -gobin 유전자의 RFLP를 분석한 결과 4.3 kb, 1.2 kb DNA단편이 추적 되었다(Fig. 4). 馬科의  $\epsilon$ -globin 유전자는 현재까지 보고된 포유류 중에서 goat  $\epsilon$ -globin 유전자와 진화 또는 계통유연관계가 가깝다고 보고되었다. 제주마와 유전적 상동성을 추정하기 위하여 goat  $\epsilon$ -globin 유전자 (p $\pi$ SV)를 probe로 사용하고 *Bam* HI으로 절단한 후 Southern blot을 실시하였다. 그 결과 3개의 단편(4.3, 1.2, 0.5 kb)이 추적되었다(Fig. 5).

#### (2) 기제목에서의 $\epsilon$ -globin 유전자 증폭 및 분리

기제목 3과 8種에서의  $\epsilon$ -globin 유전자 증폭을 위하여 각각 3종류의 forward primer (F1, F2, F3)와 reverse primer(R1, R2, R3)를 준비하였다. PCR 수행은 forward primer와 reverse primer를 서로 조합시켜 PCR을 수행한 결과 3 pair (F1-R1, F2-R1, F3-R1)에서 PCR 산물이 생성되었다(Fig. 6, 7, 8 and 9). 그러나 F3, R2, R3로 조합된 primer pair에서는 PCR 산물이 생성되지 않았다. 먼저 F1-R1 primer를 이용한 결과에서는 1.475 kb, 1.23 kb의 PCR 산물이 증폭되었다(Fig. 6-B). 생성된 PCR산물이 globin 유전자임을 확인하기 위하여 goat  $\epsilon$ -globin 유전자(p $\pi$ SV)를 이용하여 Southern blot를 실시한 결과 1.475 kb 만의 추적되었다.(Fig. 6-C). 그리고 primer F2-R1을 이용하여 PCR을 수행한 결과 1.31 kb와 0.9 kb 정도 크기를 가지는 PCR 산물이 생성되었으며(Fig. 7-B), Southern blot방법 으로 확인한 결과 1.33 kb에 해당하는 band만 추적 되었다(Fig. 7-C). Primer 디자인에 사용된 goat  $\epsilon$ -globin 유전자(p $\pi$ SV)를 control templete DNA로 PCR을 수행한 결과 馬의 PCR-product보다 약 200 bp 정도 큰 PCR-product가 생성되어 goat는 馬의  $\epsilon$ -globin 유전

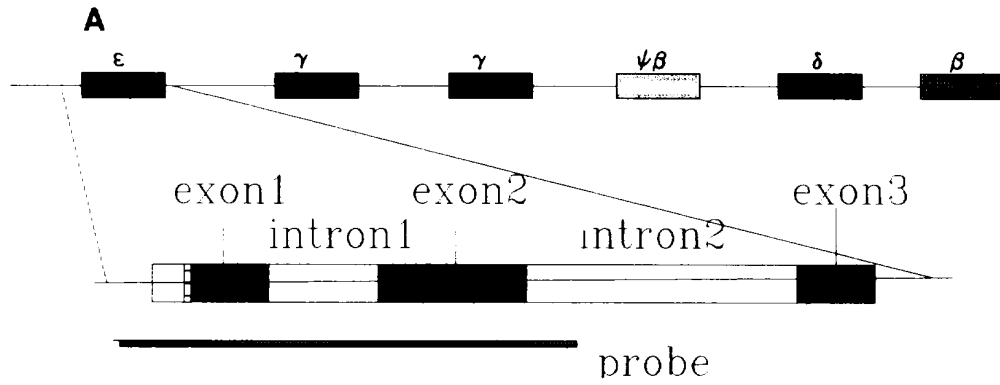


Fig. 4. A) Map of the human  $\beta$ -globin gene cluster and probe used Southern blot. B) Southern blot analysis of the  $\epsilon$ -globin gene of Cheju native horse. Total genomic DNA was digested with *Bam* HI restriction endonuclease and the digested bands were separated on 1% agaros gel. DNA fragments were detected using p $\epsilon$  (human  $\epsilon$ -globingene, 1,3 kb) as Dig-labeled probe. The sizes of lambda restriction fragment markers are shown on the right

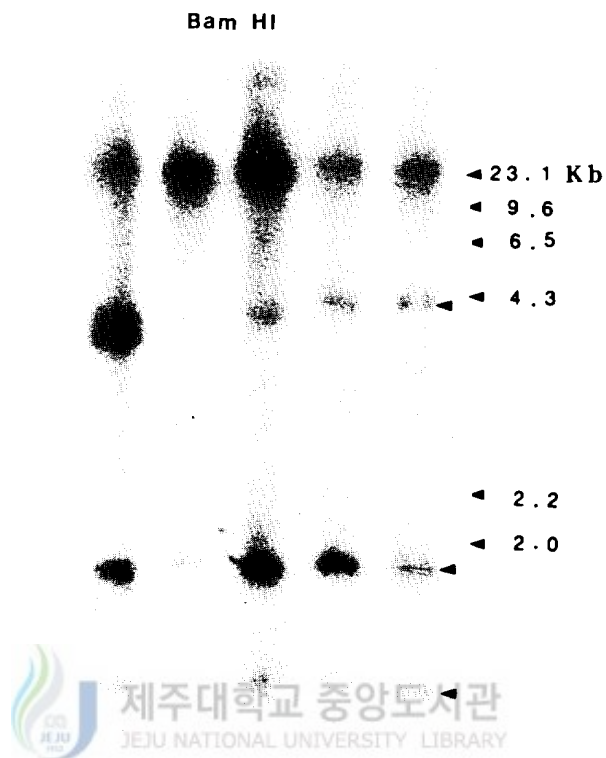


Fig. 5. Southern blot analysis of the  $\epsilon$ -globin gene of Cheju native horse. Total genomic DNA was digested with *Bam* HI restriction endonuclease and the digested bands were separated on 1% agarose gel. DNA fragments were detected using pSV (goat  $\epsilon$ -globin gene, 1.5 Kb) as  $^{32}$ [P]-dCTP-labeled probe. The sizes of lambda restriction fragment markers are shown on the right.

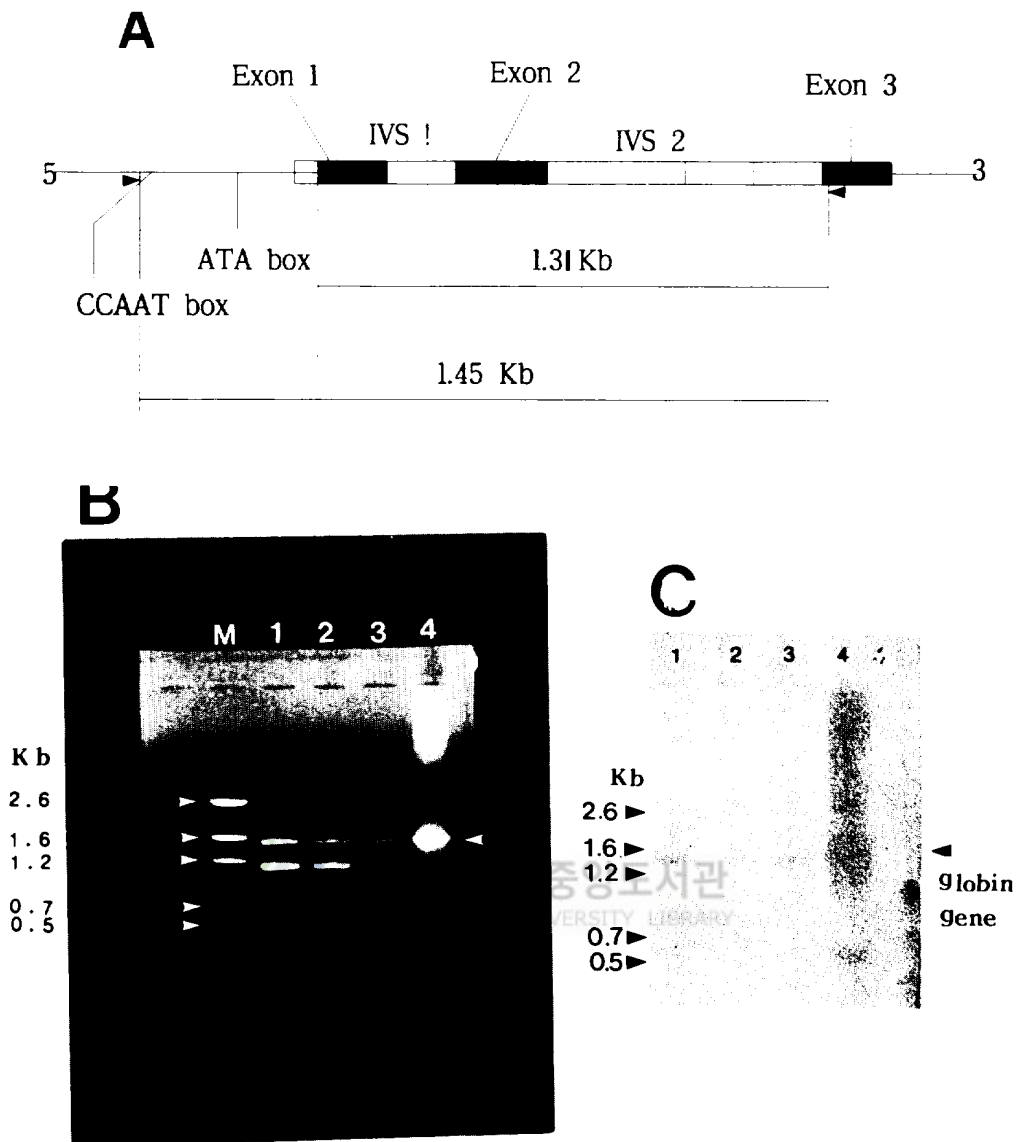


Fig. 6. A) Schematic illustration of the  $\epsilon$ -globin gene of goat. Arrows indicate positions and orientations of PCR primers presented in the method section. The arrow pointing to the right shows a forward primer, and the arrow pointing to the left a reverse primer. B) Agarose gel electrophoresis pattern of amplified  $\epsilon$ -globin gene. The  $\epsilon$ -globin gene was amplified by using PCR with primers(CCAAT box site and initiation site of exon 3). Lane 1 to 3 were *E. caballus*(Thoroughbred horse), *E. caballus*(Cheju-native horse), and *E. caballus*(Yunnan-native horse), Lane 4. Secondly PCR-product. C) Southern blot of B.

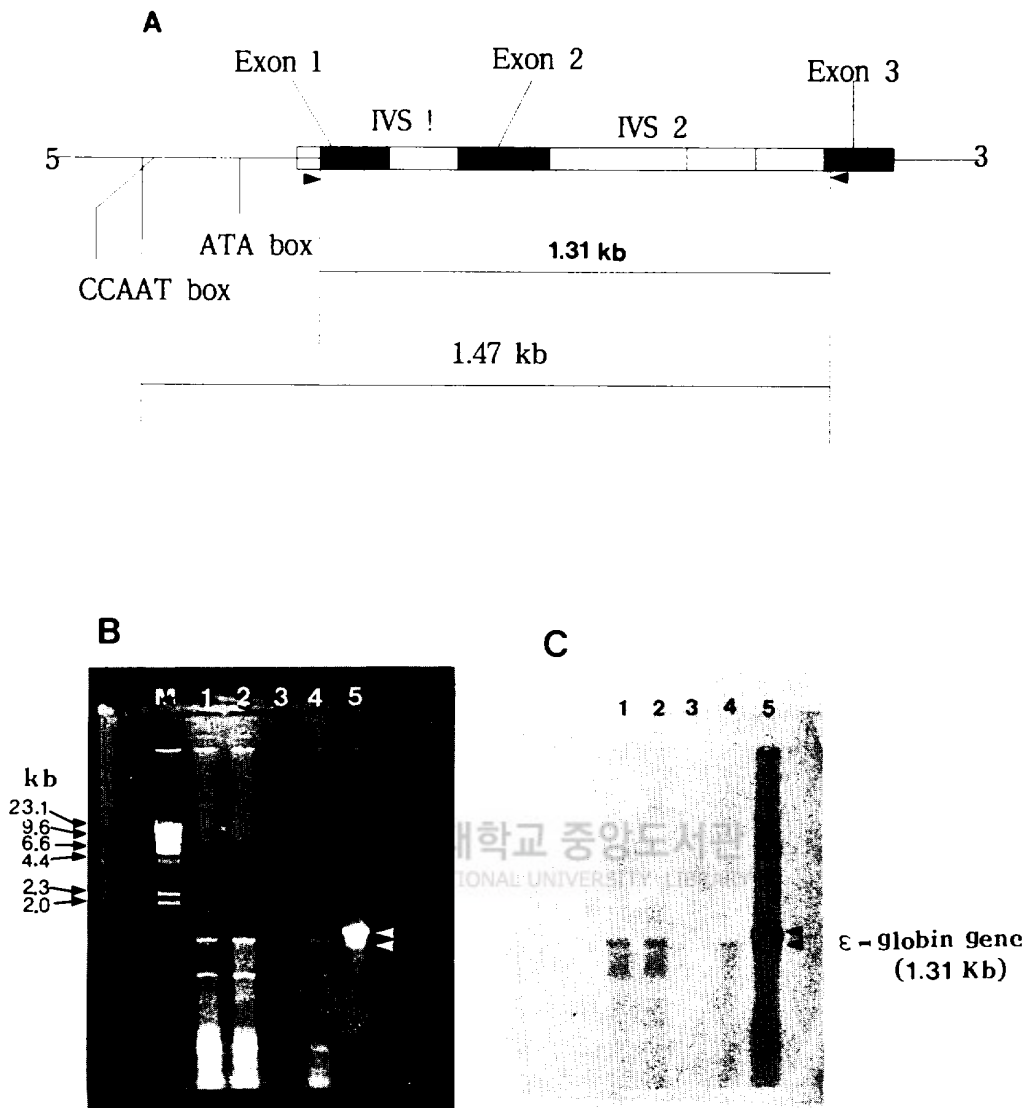


Fig. 7. A) Schematic illustration of the  $\epsilon$ -globin gene of goat. Arrows indicate positions and orientations of PCR primers presented in method. The arrow pointing to the right shows a forward primer, and the arrow pointing to the left a reverse primer. B) Agarose gel electrophoresis pattern of amplified  $\epsilon$ -globin gene. The  $\epsilon$ -globin gene was amplified by using PCR with primers (initiation site of exon 1 and initiation site of exon 3). Lane 1 to 4: *E. caballus* (Cheju-native horse), lane 5: amplified of goat  $\epsilon$ -globin gene. C) Southern blot of B.



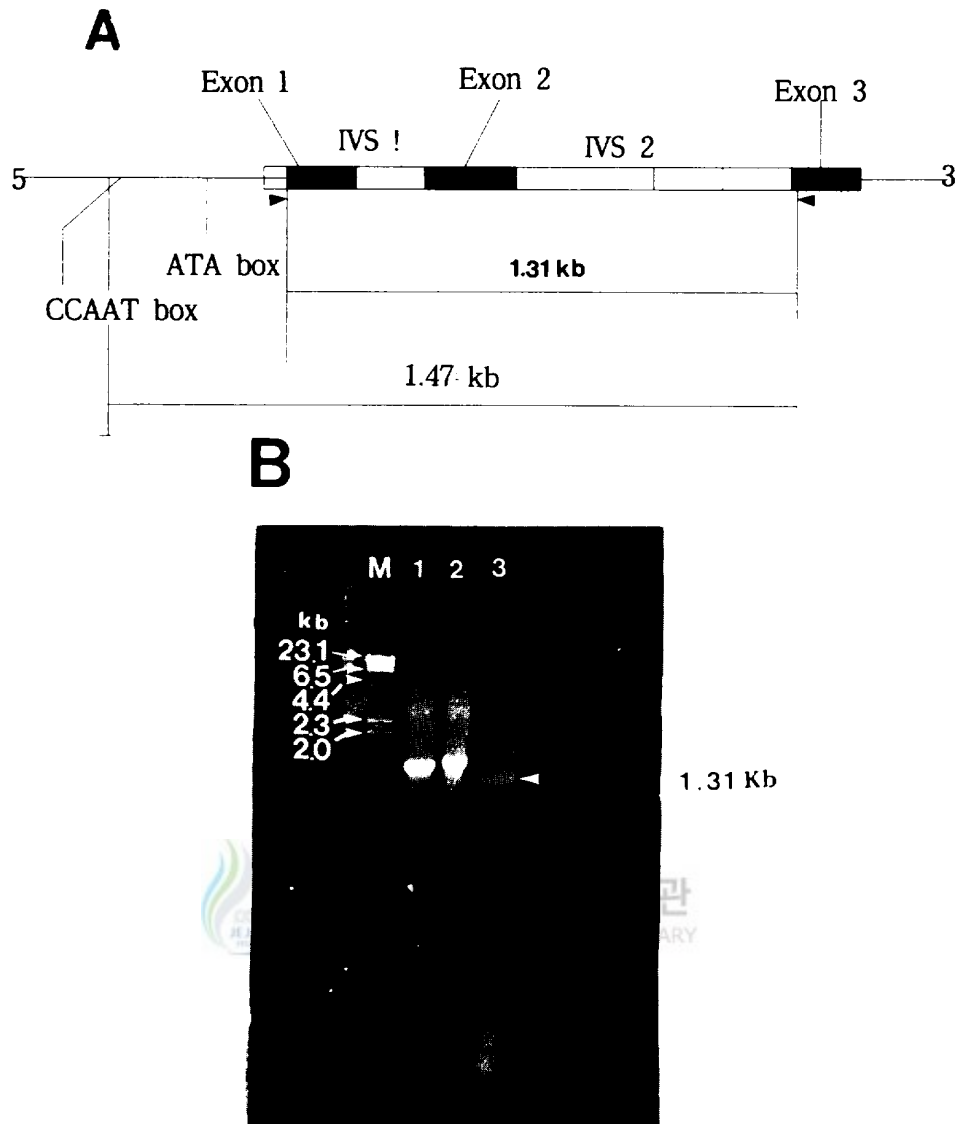


Fig. 8. A) Schematic illustration of the  $\epsilon$ -globin gene of goat. Arrows indicate positions and orientations of PCR primers presented in method. The arrow pointing to the right shows a forward primer, and the arrow pointing to the left a reverse primer. B) Agarose gel electrophoresis pattern of amplified  $\epsilon$ -globin gene. The  $\epsilon$ -globin gene was amplified by using PCR with primers (initiation site of exon 1 and initiation site of exon 3). Lane 1 and 2 were goat  $\epsilon$ -globin gene, lane 3; horse  $\epsilon$ -globin gene. M: marker DNA (digested  $\lambda$ -DNA with *Hind* III restriction enzyme).

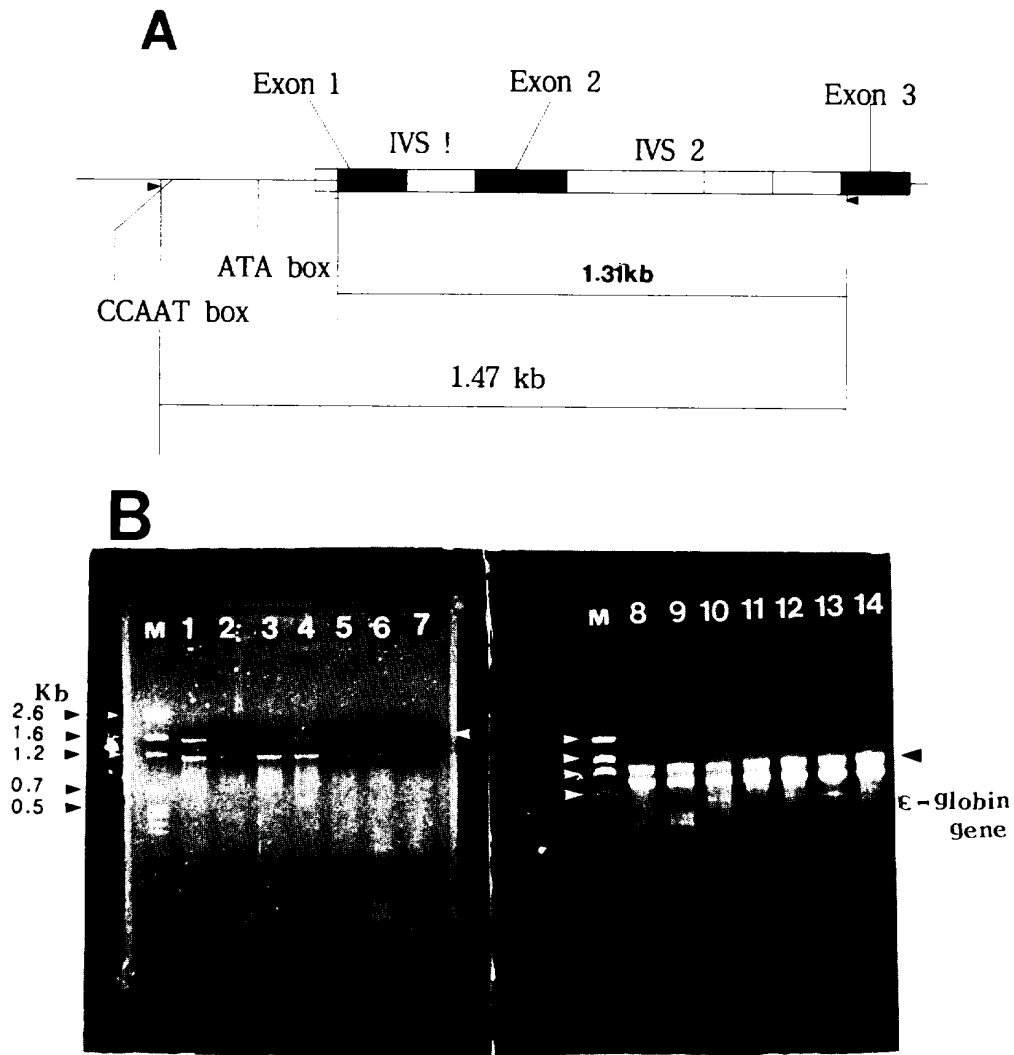


Fig. 9. A) Schematic illustration of the  $\epsilon$ -globin gene of goat. Arrows indicate positions and orientations of PCR primers presented in method. The arrow pointing to the right shows a forward primer, and the arrow pointing to the left a reverse primer. B) Agarose gel electrophoresis pattern of amplified  $\epsilon$ -globin gene. The  $\epsilon$ -globin gene was amplified by using PCR with primers(CCAAT box site and initiation site of exon 3). Lane 1 to 14 were Thoroughbred horse, Cheju native horse-1, Cheju native horse-2, Japan native horse, SH-1(Yunnan native horse), SH-2(Yunnan native horse), SH-3(Yunnan native horse), *T. terrestis*, *C. simum*, *E. hemionus* Kulan, *E. grevy's*, *E. zebra hartmannae*, *E. africanu somalicus*, and *E. przewalskii*, in order left to right. M: marker DNA( digested pGEM-3 DNA with Hinf I, Rsa I and Sin I restriction enzymes).

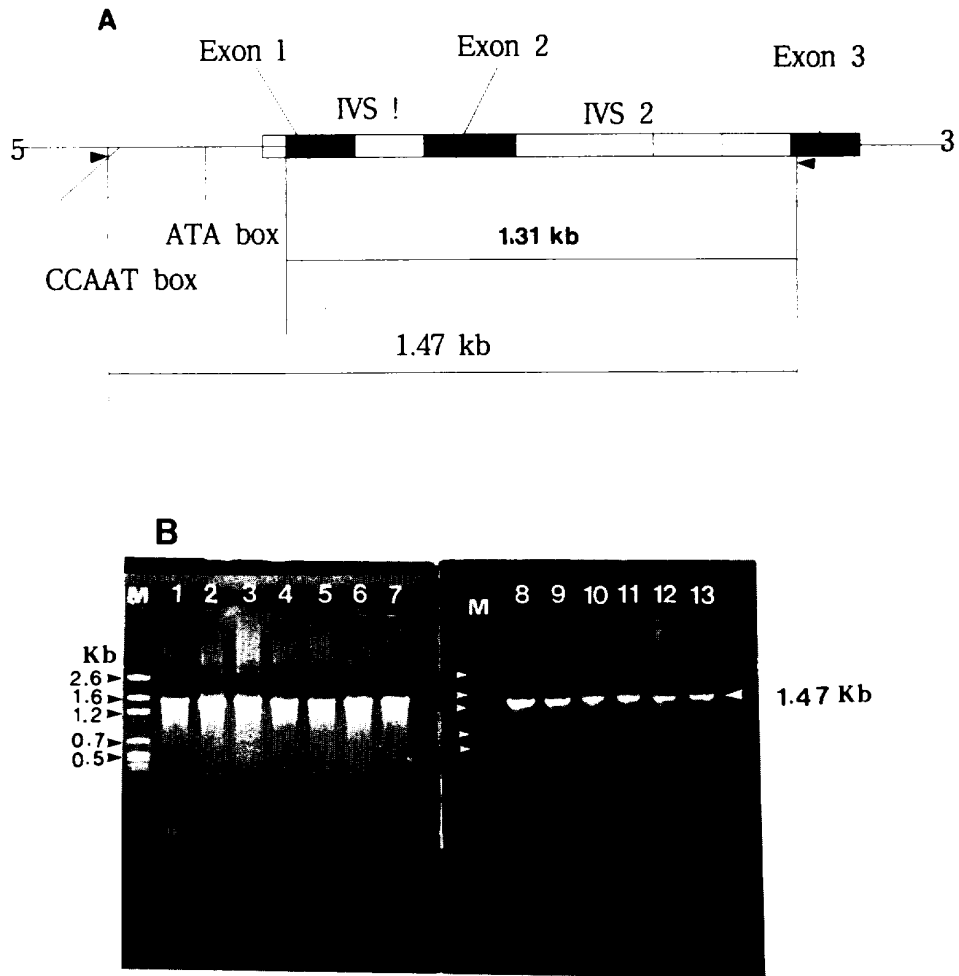


Fig. 10. A) Schematic illustration of the  $\epsilon$ -globin gene of goat. Arrows indicate positions and orientations of PCR primers presented in method. The arrow pointing to the right shows a forward primer, and the arrow pointing to the left a reverse primer. B) Agarose gel electrophoresis pattern of amplified  $\epsilon$ -globin gene. The  $\epsilon$ -globin gene was amplified by using secondary PCR with primers (initiation site of exon 1 and initiation site of exon 3). Lane 1 to 13 were *T. terrestis*, *C. simum*, *E. hemionus* Kulan, *E. grevy's*, *E. zebra hartmannae*, *E. africanu somalicus*, and *E. przewalskii*, Thoroughbred horse, Cheju native horse, Japan native horse, SH-1 (Yunnan native horse), SH-2 (Yunnan native horse), SH-3 (Yunnan native horse). M: marker DNA (digested pGEM-3 DNA with Hinf I, Rsa I and Sin I restriction enzymes).

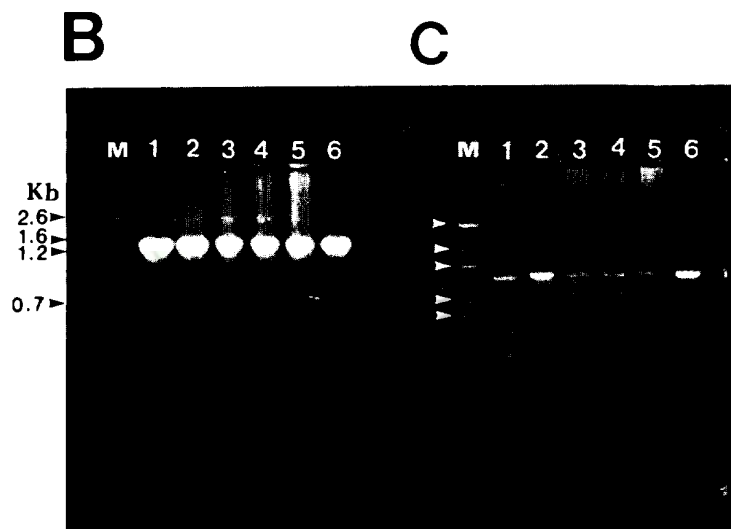
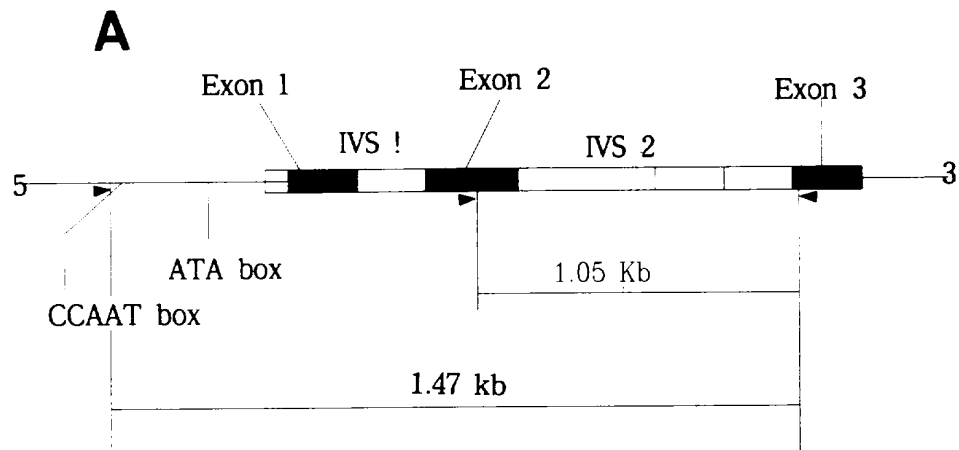


Fig. 11. A) Schematic illustration of the  $\epsilon$ -globin gene of goat. Arrows indicate positions and orientations of PCR primers presented in method. The arrow pointing to the right shows a forward primer, and the arrow pointing to the left a reverse primer. B) Agarose gel electrophoresis pattern of amplified  $\epsilon$ -globin gene. B) PCR product pattern by using secondary PCR with primers(CCAAT box site primer and initiation site of exon 3 primer). Lane 1 to 6 were *T. terrestris*, *C. simum*, *E. Hemionus Kulan*, *E. grevy's*, *E. zebra hartmannae*, and *E. africanus somalicus*. C) PCR products pattern by using secondary PCR with primers(initiation site of exon 2 primer and initiation site of exon 3 primer). Lane were same to B.

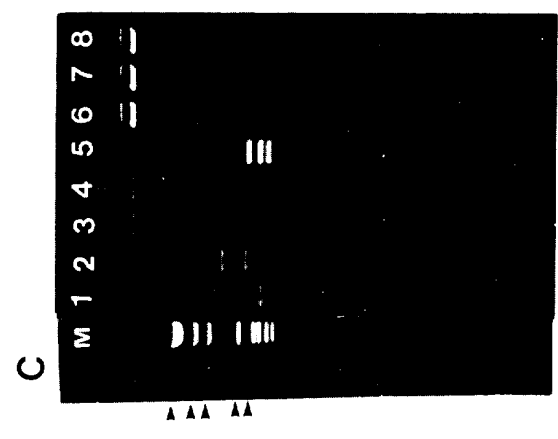
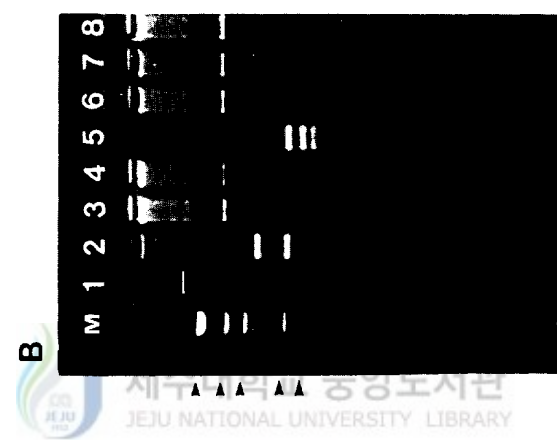
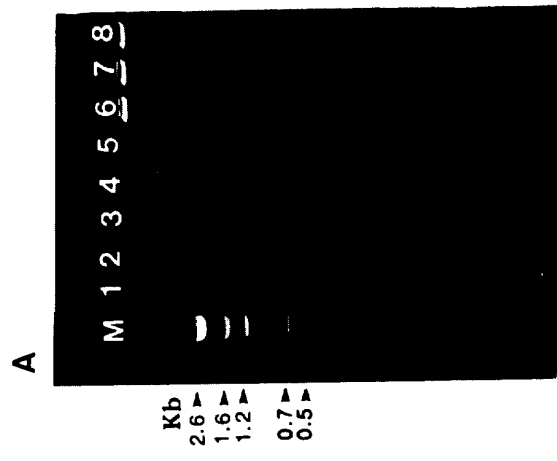
자보다 다소 큼을 알 수 있었다(Fig. 7-lane 5; Fig. 8-lane 1, 2). 기제목에서의  $\epsilon$ -globin 유전자 증폭은 PCR방법으로 수행한 후,  $\epsilon$ -globin 유전자임을 재확인 하기 위하여 2차 PCR을 수행하였다(Fig. 9, 10). 그리고 primer F1-R1과 primer F3-R1을 사용하여 PCR을 수행한 결과 1.475 kbp와 1.08 kbp가 각각 증폭되었다(Fig. 11-B, C).

### (3) 기제목의 $\epsilon$ -globin 유전자의 PCR-RFLP

기제목 3과 8종내에서  $\epsilon$ -globin 유전자의 구조적 차이를 구명하기 위하여 PCR 산물을 8종류의 제한효소로 처리하여 restriction site 차이를 보았다(Fig. 12, Table 2, 3). 그 결과 3 종류의 제한효소 *StyI* I (CCAAGG), *Bam* HI (GGATCC), *Hae* III (GGCC)로 절단했을 때 각각 3 단편(0.88, 0.5, 0.1 kb), 2 단편(0.93, 0.55 kb), 3 단편(0.78, 0.4, 0.3 kb)이 생성되었다. 그러나 *Sty* I과 *Hae* III(GGCC)처리에서 아프리카 당나귀(*E. africanus*), 그레비 얼룩마(*E. grevy*), 제부라 얼룩마(*E. zebra*)에서 1.1 0.38 Kb 단편과 0.55, 0.55, 0.37 kb 단편이 검되어 다른 종과 차이를 보였다(Fig. 12, D, E; Table 3). 그러나 제한효소 *Bgl* I (GCCNNNNNGGC), *Hae* II (PuGCGCPy), *Hinc* II (GTPyPuAC), *Msp* I (CCGG) 그리고 *Xho* I (CTCGAG)로 절단 했을 경우는 절단부위가 관찰되지 않았다.

### (4) Cloning과 Insert DNA 확인

3과 8종에서 PCR로 증폭된  $\epsilon$ -globin 유전자들을 cloning하여 plasmid DNA을 분리하고 agarose gel 전기영동으로 확인하였다(Fig. 13). 그리고 제한효소 *Pvu* II와 *Sac* I, *Kpn* I을 이용하여 insert DNA를 확인하였고 다양한 clone들을 선발하여 sequencing 한 후  $\epsilon$ -globin 유전자가 들어 있는 clone들을 선발하였다(Fig. 14 - A, B, C). 다시 전기영동상에서 동일한 band양상을 보이는 clone만을 선발하여 southern blot으로 확인한 후, 각 종에서 $\epsilon$ -globin gene이 삽입된 clone만을 선발하여 DNA sequencing에 사용하였다(Fig. 15).



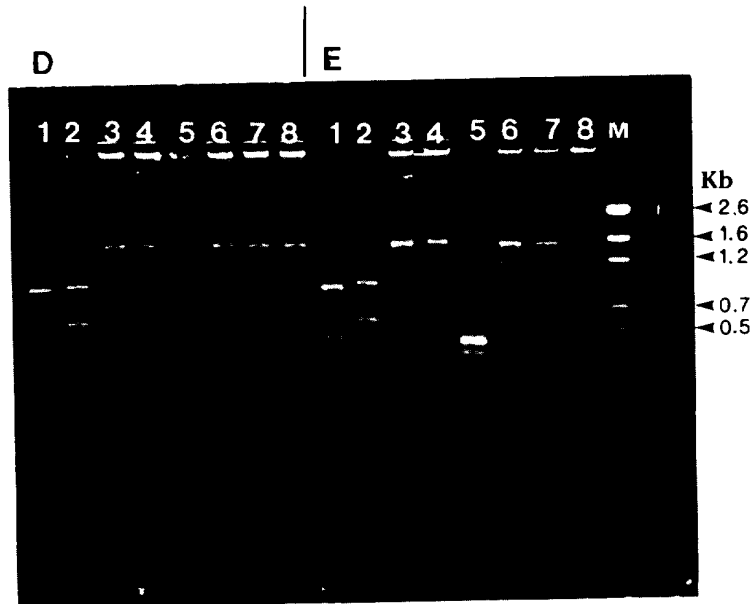


Fig. 12. Restriction fragment patterns of amplified  $\epsilon$ -globin gene of perissodactyla that was digested with 8 restriction endonuclease( *Sty* I, *Bam* HI, *Bgl* I, *Hae* II, *Hae* III, *Hinc* II, *Msp* I, and *Xho* I shown in lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8, respectively).

Pannel A: *T. terrestis*, *C. simum*

Pannel B: *E. przewaskii*, *E. hemionus Kulan*,

Pannel C: *E. caballus* (domestic horse).

Pannel D: *E. grevy's*, *E. zebra hartmannae*.

Pannel E: *E. africanus somalicus*.

Table 2. The size of fragments found after digestion of  $\epsilon$ -globin gene with various endonuclease in Perissodactyla.

Species	Restriction Endonuclease	Length of fragment (Kb)
White Rhinoceros ( <i>C. simum</i> )	<i>Sty</i> I	0.85, 0.5, 0.1
	<i>Bam</i> HI	0.9, 0.55
	<i>Bgl</i> I	no cleavage
Tapirus ( <i>T. terrestris</i> )	<i>Hae</i> II	"
	<i>Hae</i> III	0.75, 0.4, 0.3
	<i>Hinc</i> II	no cleavage
	<i>Msp</i> I	no cleavage
	<i>Xho</i> I	no cleavage
<i>E. Przewalskii</i>	<i>Sty</i> I	0.85, 0.5, 0.1
	<i>Bam</i> HI	0.9, 0.55
	<i>Bgl</i> I	no cleavage
	<i>Hae</i> II	"
	<i>Hae</i> III	0.75, 0.4, 0.3
	<i>Hinc</i> II	no cleavage
	<i>Msp</i> I	no cleavage
	<i>Xho</i> I	no cleavage



Table 3. The size of fragments found after digestion of  $\epsilon$ -globin gene with various endonuclease in Perissodactyla.

Species	Restriction Endonuclease	Length of fragment (Kb)
Ass( <i>E. africanus</i> )	<i>Sty</i> I	1.1, 0.35
Grevy's( <i>E. grevy</i> )	<i>Bam</i> HI	0.9, 0.55
zebra( <i>E. zebra</i> )	<i>Bgl</i> I	no cleavage
	<i>Hae</i> II	"
	<i>Hae</i> III	0.5, 0.5, 0.45
	<i>Hinc</i> II	no cleavage
	<i>Msp</i> I	no cleavage
	<i>Xho</i> I	no cleavage
Cheju native horse	<i>Sty</i> I	0.85, 0.5, 0.1
Japan	<i>Bam</i> HI	0.9, 0.55
Asia wild ass ( <i>E. hemionus</i> )	<i>Bgl</i> I	not cleavage
	<i>Hae</i> II	"
	<i>Hae</i> III	0.75, 0.4, 0.3
	<i>Hinc</i> II	not cleavage
	<i>Msp</i> I	not cleavage
	<i>Xho</i> I	not cleavage

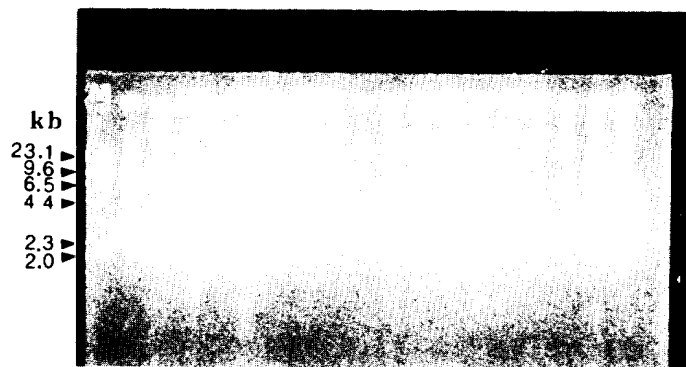


Fig. 13. Agarose gel electrophoresis pattern of isolated plasmid DNA from 18 different white colonies (recombinant plasmid). Plasmid DNA was isolated by the mini-pre method. DNA fragment obtained from PCR were inserted into T-vector(pGEM vector) at polycloning site.

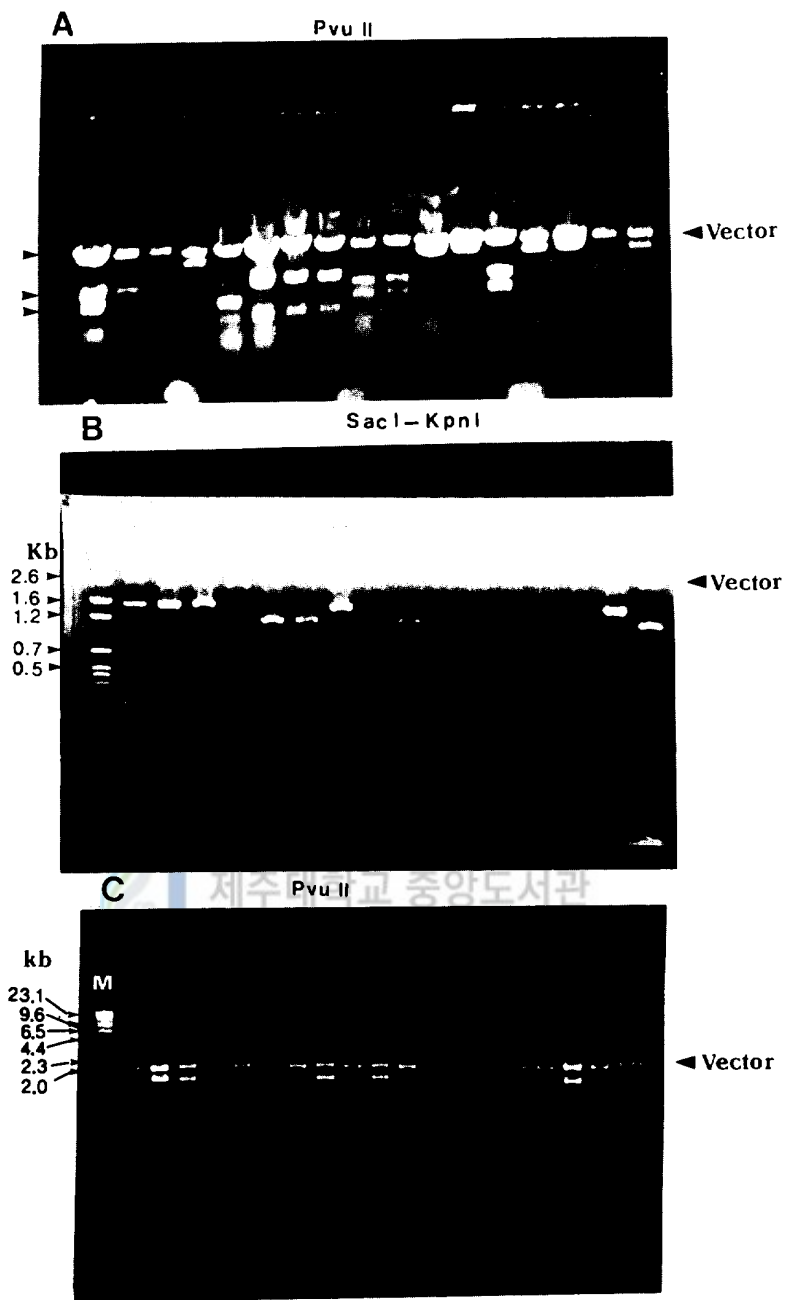


Fig. 14. Screening of recombinant plasmids digested restriction endonuclease *Pvu* II (A, C), *Sac* I and *Kpn* I(B). Digested plasmids were separated by electrophoresis on a 1.2% agarose gel.

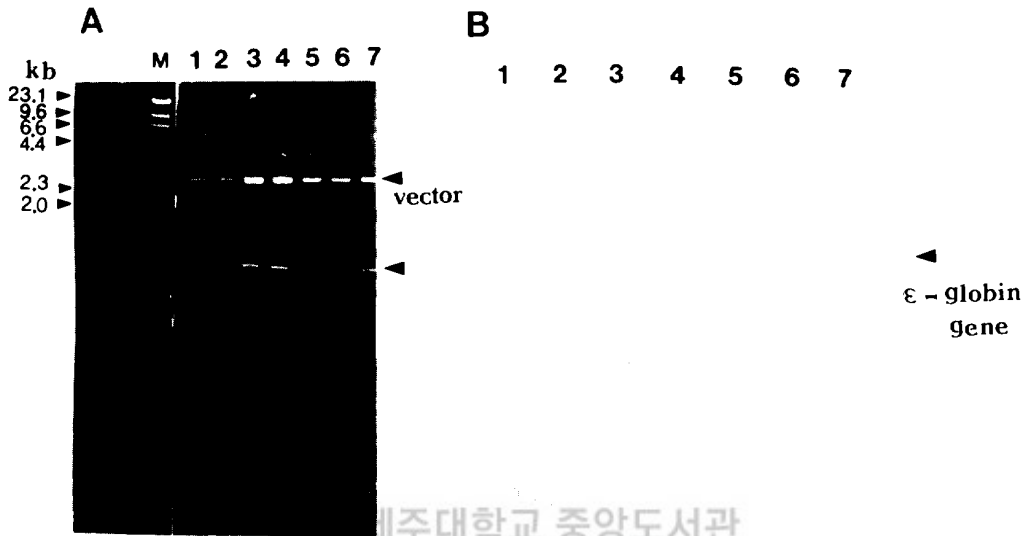


Fig. 15. A) Vector and insert DNA bands of 7 different isolated plasmids(lane 1 through 8) with an appropriate single shown in fig. 14, and each of the plasmid digested with a mixture of *Sac* I and *Kpn* I restriction endonucleases. M: digested  $\lambda$ -DNA with *Hind* III. B) Southern blot of A after bands by hybridized with probe(p $\alpha$ SV plasmid:  $\epsilon$ -globin gene).

#### (5) DNA Alignment 및 $\epsilon$ -globin 유전자 구조

기제목 3과 8종의  $\epsilon$ -globin gene의 구조 및 특징을 분석하기 위하여 Sanger 방법 (1985)인 termination stop reaction을 이용하여 DNA 염기서열을 결정하였다(Fig. 16, 17). 그 결과 기제목의  $\epsilon$ -globin 유전자 길이는 1,475 bp로 구성되어 있음을 확인하였다(Fig. 18). 유전자 구조에서 5'-flanking 영역을 보면, 먼저 cap-site(+1)를 기점으로 하여 상류부위(upstream site)에 Consensus sequence CCAAT box가 -85 site에, Hogness-Goldberg box (ATA-box)가 -30 site에 위치하고 있었다. 그리고 m-RNA와 리보솜결합 배열부위 CTTCTG(ribosomal binding sequence)가 +8 site에 위치함을 보였다. Exon과 intron 사이의 splice junction은 GT/AG 구조였고 (Fig. 21), 인트론 1 (IVS 1) 염기길이는 128 bp, 인트론 2 (2 IVS sequence) 염기길이는 845 bp 이었다. 엑손 1(exon 1)은 31개 아미노산 암호배열(amino acid coding sequence), 엑손 2 (exon 2)는 74개 아미노산 암호배열을 가짐을 알 수 있었다.

#### (6) $\epsilon$ -globin 유전자의 5'- 말단영역(Flanking region)의 비교

기제목의  $\epsilon$ -globin 유전자의 상류부위(upstream site)에 있는 -68 에서 -105 사이 염기서열을 비교분석한 결과 배발생 특이적 유전자에서 높은 상동성을 볼 수가 있다. 奇蹄目에서의 상동성은 매우 높게 보였으며, 다른 포유류와의 비교에서는 CCAAT-box, ATA-box 그리고 Cap-box를 중심으로 매우 높은 상동성을 보였다(Fig. 18, 20). 기제목의 promotor 조절부위는 다른 포유동물과 같이 매우 높은 상동성을 가지고 있었으며, 기제목의 5'-flanking영역(-105 - +45)을 산양과 사람에서 각각 상동성을 비교한 결과 93.8%와 84%로 높게 나타났다.

#### (7) 기제목 $\epsilon$ -globin polypeptide sequence 비교

기제목의  $\epsilon$ -globin 유전자의 DNA sequence을 바탕으로 아미노산 암호영역을 해석하여, 비교한 결과 산양(89%), 사람(85%), 마우스(77%)의 순으로 상동성을 보였다.

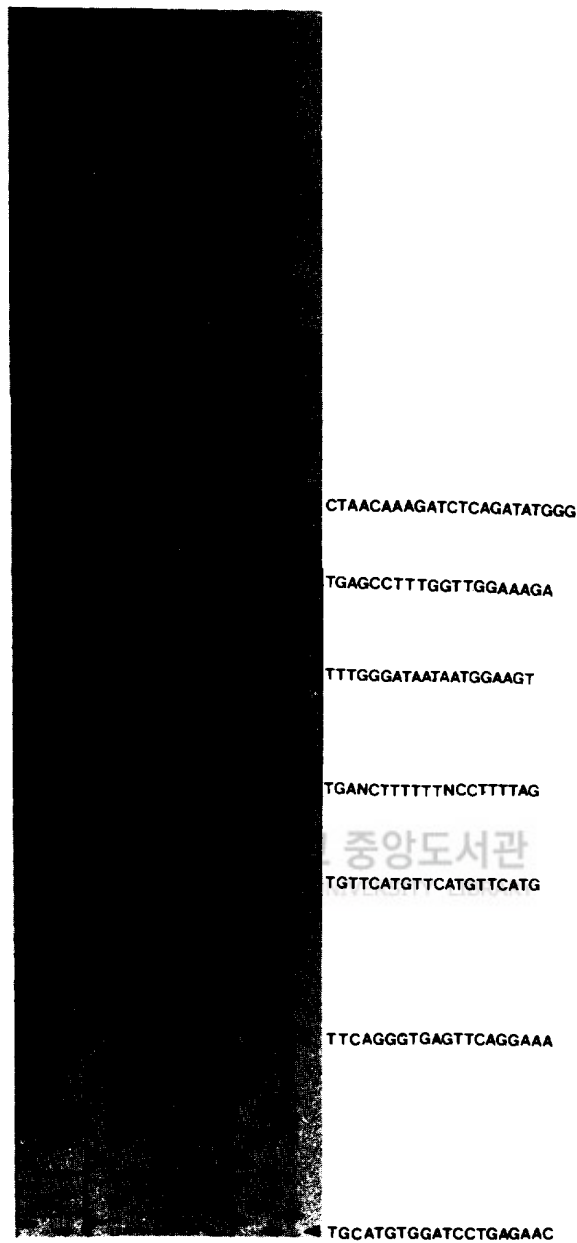


Fig. 16. An example autoradiography for DNA sequencing of various clones of  $\epsilon$ -globin gene from G14, P3, Z21 and A13. DNA sequence was determined using the dideoxynucleotide chain termination method(Sanger *et al.*, 1977). G14; *E. Grevy*, P3; *E. przewalskii*, Z21; *E. zebra*, A13; *E. Afaricanus*.

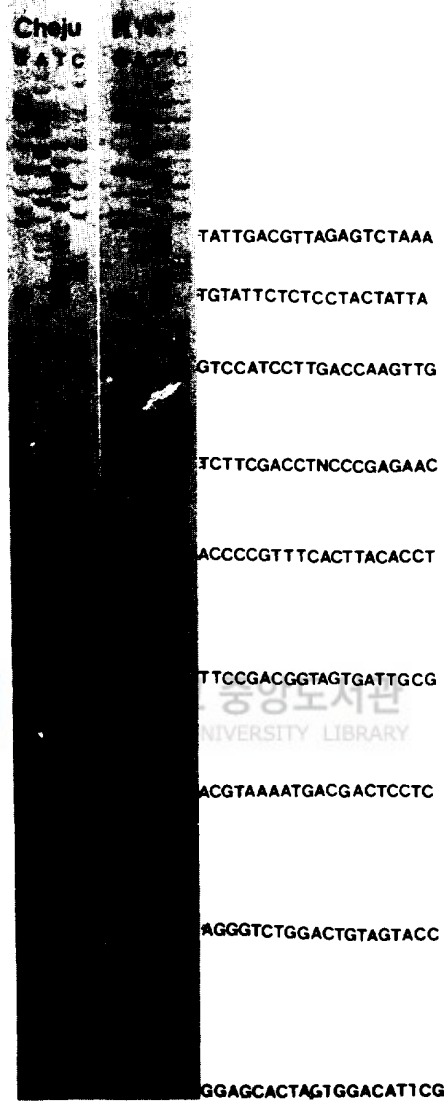


Fig. 17. An example autoradiography for DNA sequencing of various clones of  $\epsilon$ -globin gene from Cheju, R14. DNA sequence was determined using the dideoxynucleotide chain termination method(Sanger *et al.*, 1977). Cheju: Cheju native horse(*E. caballus*), R14: White Rhinoceros(*C. simum*).

ccaat box

#Cheju	GGGACACAGC	CTAACCTTGA	CCAATGACTT	CAAAGTACTA	GGGGGAACCA	50
#Ass13	GGGACACAGC	CTAACCTTGA	CCAATGACTT	CAAAGTACTA	GGGGGAACCA	
#Gre14	GGGACACAGC	CTAACCTTGA	CCAATGACTT	CAAAGTACTA	GGGGGAACCA	
#Hemi11	GGGACACAGC	CTAACCTTGA	CCAATGACTT	CAAAGTACTA	GGGGGAACCA	
#Jenpen12	GGGACACAGC	CTAACCTTGA	CCAATGACTT	CAAAGTACTA	GGGGGAACCA	
#Prew3	GGGACACAGC	CTAACCTTGA	CCAATGGATT	CAAAGTACTA	GGGGGAACCA	
#Rhino	GGGACACAGC	CTAACCTTGA	CCAATGGATT	CAAAGTACTA	GGGGGAACCA	
#Sh38	GGGACACAGC	CTAACCTTGA	CCAATGACTT	CAAAGTACTA	GGGGGAACCA	
#Tapia	GGGACACAGC	CTAACCTTGA	CCAATGGATT	CAAAGTACTA	GGGGGAACCA	
#Goat	GGGACACAGC	CTAACCTTGA	CCAATGACTT	CAAAGTACTA	GGGGGAGCAA	
#Human	AGGACACAGG	TCAGCCTTGA	CCAATGACTT	TTAAGTACCA	TGGAGAACAG	
#Mouse	AGG-----	-----CTGA	CCAATGGCTT	CAAAGAATAA	TGCAGAACAA	
#Rabbit	AGGACACA-	TTCCAGTCTTGA	CCAATGACTT	CAAAGTATGA	AAGAGAACAA	

ATA box

#Cheju	GGGGCCAGAA	GTTCCACAGT	AAAGAATAAA	AGGCCACACC	ATACAGCAGC	100
#Ass13	GGGGCCAGAA	GTTCCACAGT	AAAGAATAAA	AGGCCACACC	ATACAGCAGC	
#Gre14	GGGGCCAGAA	GTTCCACAGT	AAAGAATAAA	AGGCCACACC	ATACAGCAGC	
#Hemi11	GGGGCCAGAA	GTTCCACAGT	AAAGAATAAA	AGGCCACACC	ATACAGCAGC	
#Jenpen12	GGGGCCAGAA	GTTCCACAGT	AAAGAATAAA	AGGCCACACC	ATACAGCAGC	
#Prew3	GGGGCCAGAA	GTTCCACAGT	AAAGAATAAA	AGGCCACACC	ATACAGCAGC	
#Rhino	GGGGCCAGAA	GTTCCACAGT	AAAGAATAAA	AGGCCACACC	ATACAGCAGC	
#Sh38	GGGGCCAGAA	GTTCCACAGT	AAAGAATAAA	AGGCCACACC	ATACAGCAGC	
#Tapia	GGGGCCAGAA	GTTCCACAGT	AAAGAATAAA	AGGCCACACC	ATACAGCAGC	
#Goat	GGGGCCAGAA	GTTCCACAGT	AAAGAATAAA	AGGCCACACC	ATACAGCAGC	
#Human	GGGGCCAGAA	CTTCGGCAGT	AAAGAATAAA	AGGCCACACC	GAGAGGCAGC	
#Mouse	AGGGTCAGAA	CATTGTCTGC	GAAGAATAAA	AGGCCACACC	TTCTAGCAGC	
#Rabbit	GGGGCCAGAC	CATCAGCAGT	GGGGAATAAA	AGGCCAAGCC	TTGAAGCAGC	

Cap site(+1)

#Cheju	AGCACATACC	TGCTTCTGAC	ACCTCTG---	-TGATCACCT	GTAAGCTC--	150
#Ass13	AGCACATACC	TGCTTCTGAC	ACCTCTG---	-TGATCACCT	GTAAGCTC--	
#Gre14	AGCACATACC	TGCTTCTGAC	ACCTCTG---	-TGATCACCT	GTAAGCTC--	
#Hemi11	AGCACATACC	TGCTTCTGAC	ACCTCTG---	-TGATCACCT	GTAAGCTC--	
#Jenpen12	AGCACATACC	TGCTTCTGAC	ACCTCTG---	-TGATCACCT	GTAAGCTC--	
#Prew3	AGCACATACC	TGCTTCTGAC	ACCTCTG---	-TGATCACCT	GTAAGCTC--	
#Rhino	AGCACATACC	TGCTTCTGAC	ACCTCTG---	-TGATCACCT	GTAAGCTC--	
#Sh38	AGCACATACC	TGCTTCTGAC	ACCTCTG---	-TGATCACCT	GTAAGCTC--	
#Tapia	AGCACATACC	TGCTTCTGAC	ACCTCTG---	-TGATCACCT	GTAAGCTC--	
#Goat	AGCACAGACT	TGCTTCTGAT	GCTTCTG---	-TGATCACCT	GTAAGCTC-C	
#Human	AGCACATATC	TGCTTCCGAC	A---CAGCTG	-CAATCACTA	GCAAGCTCTC	
#Mouse	AGTACGTACT	TGCTTCTGAC	ACTCCTG---	-TGATCACCA	GCAACCTC--	
#Rabbit	AGCACAAAGC	TGCTTCTGAC	ACATTTGTGA	TCGATCACCA	GCAAGCTC--	

		M	V	H	F	T	A	E	E	K	A	A	
#Cheju	--CCAGACCT	GACATCATGG	TGCATTTTAC	TGCTGAGGAG	AAGGCTGCCA	200							
#Ass13	--CCAGACCT	GACATCATGG	TGCATTTTAC	TGCTGAGGAG	AAGGCTGCCA								
#Gre14	--CCAGACCT	GACATCATGG	TGCATTTTAC	TGCTGAGGAG	AAGGCTGCCA								
#Hemi11	--CCAGACCT	GACATCATGG	TGCATTTTAC	TGCTGAGGAG	AAGGCTGCCA								
#Jenpen12	--CCAGACCT	GACATCATGG	TGCATTTTAC	TGCTGAGGAG	AAGGCTGCCA								
#Prew3	--CCAGACCT	GACATCATGG	TGCATTTTAC	TGCTGAGGAG	AAGGCTGCCA								
#Rhino	--CCAGACCT	GACATCATGG	TGCATTTTAC	TGCTGAGGAG	AAGGCTGCCA								
#Sh38	--CCAGACCT	GACATCATGG	TGCATTTTAC	TGCTGAGGAG	AAGGCTGCCA								
#Tapia	--CCAGACCT	GACATCATGG	TGCATTTTAC	TGCTGAGGAG	AAGGCTGCCA								
#Goat	AC---GACTT	GACATCATGG	TGCATTTTAC	TGCCGAGGAG	AAGGCTGCTA								
#Human	----AGGCCT	GGCATCATGG	TGCATTTTAC	TGCTGAGGAG	AAGGCTGCCG								
#Mouse	--CCAGACTT	GCCATCATGG	TGAACCTTAC	TGCTGAGGAA	AAAACCTTCA								
#Rabbit	--CCAGACGT	GACACCATGG	TGCATTTTAC	TCCTGAGGAA	AAGTGCATTA								



	I	T	N	A	W	G	K	V	N	V	E	E	A	G	G	E	A		
#Cheju	T	C	A	C	T	A	A	C	G	C	G	T	G	G	G	G	C	A	250
#Ass13	T	C	A	C	T	A	A	C	G	C	G	T	G	G	G	G	C	A	
#Gre14	T	C	A	C	T	A	A	C	G	C	G	T	G	G	G	G	C	A	
#Hemi11	T	C	A	C	T	A	A	C	G	C	G	T	G	G	G	G	C	A	
#Jenpen12	T	C	A	C	T	A	A	C	G	C	G	T	G	G	G	G	C	A	
#Prew3	T	C	A	C	T	A	A	C	G	C	G	T	G	G	G	G	C	A	
#Rhino	T	C	A	C	T	A	A	C	G	C	G	T	G	G	G	G	C	A	
#Sh38	T	C	A	C	T	A	A	C	G	C	G	T	G	G	G	G	C	A	
#Tapia	T	C	A	C	T	A	A	C	G	C	G	T	G	G	G	G	C	A	
#Goat	T	C	A	C	T	A	A	C	G	C	G	T	G	G	G	G	C	A	
#Human	T	C	A	C	T	A	A	C	G	C	G	T	G	G	G	G	C	A	
#Mouse	T	C	A	C	T	A	A	C	G	C	G	T	G	G	G	G	C	A	
#Rabbit	T	C	A	C	T	A	A	C	G	C	G	T	G	G	G	G	C	A	

	L	G	R																
#Cheju	C	T	T	G	G	C	A	G	G	T	-	T	C	A	A	C	A	C	300
#Ass13	C	T	T	G	G	C	A	G	G	T	-	T	C	A	A	C	A	C	
#Gre14	C	T	T	G	G	C	A	G	G	T	-	T	C	A	A	C	A	C	
#Hemi11	C	T	C	G	G	C	A	G	G	T	-	T	C	A	A	C	A	C	
#Jenpen12	C	T	C	G	G	C	A	G	G	T	-	T	C	A	A	C	A	C	
#Prew3	C	T	T	G	G	C	A	G	G	T	-	T	C	A	A	C	A	C	
#Rhino	C	T	T	G	G	C	A	G	G	T	-	T	C	A	A	C	A	C	
#Sh38	C	T	T	G	G	C	A	G	G	T	-	T	C	A	A	C	A	C	
#Tapia	C	T	T	G	G	C	A	G	G	T	-	T	C	A	A	C	A	C	
#Goat	C	T	G	G	G	C	A	G	G	T	-	-	-	-	-	-	-	-	
#Human	T	T	G	G	G	C	A	G	G	T	-	G	-	-	-	-	-	-	
#Mouse	T	T	G	G	G	A	A	G	G	T	-	T	T	T	T	A	G	T	
#Rabbit	T	T	G	G	G	C	A	G	G	T	-	G	-	-	-	-	-	-	

#Cheju	T	A	A	C	C	T	G	G	C	A	A	A	T	G	A	C	T	A	A	350
#Ass13	T	A	A	C	C	T	G	G	C	A	A	A	T	G	A	C	T	A	A	
#Gre14	T	A	A	C	C	T	G	G	C	A	A	A	T	G	A	C	T	A	A	
#Hemi11	T	A	A	C	C	T	G	G	C	A	A	A	T	G	A	C	T	A	A	
#Jenpen12	T	A	A	C	C	T	G	G	C	A	A	A	T	G	A	C	T	A	A	
#Prew3	T	A	A	C	C	T	G	G	C	A	A	A	T	G	A	C	T	A	A	
#Rhino	T	A	A	C	C	T	G	G	C	A	A	A	T	G	A	C	T	A	A	
#Sh38	T	A	A	C	C	T	G	G	C	A	A	A	T	G	A	C	T	A	A	
#Tapia	T	A	A	C	C	T	G	G	C	A	A	A	T	G	A	C	T	A	A	
#Goat	T	G	A	G	C	C	T	G	G	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
#Human	T	T	A	C	C	T	A	G	C	T	A	A	G	A	A	G	-	-	-	
#Mouse	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
#Rabbit	T	G	A	C	C	T	G	G	T	A	A	C	T	G	A	C	A	A	A	

#Cheju	C	T	C	T	G	A	T	T	T	C	T	T	C	T	G	C	T	A	A	400
#Ass13	C	T	C	T	G	A	T	T	T	C	T	T	C	T	G	C	T	A	A	
#Gre14	C	T	C	T	G	A	T	T	T	C	T	T	C	T	G	C	T	A	A	
#Hemi11	C	T	C	T	G	A	T	T	T	C	T	T	C	T	G	C	T	A	A	
#Jenpen12	C	T	C	T	G	A	T	T	T	C	T	T	C	T	G	C	T	A	A	
#Prew3	C	T	C	T	G	A	T	T	T	C	T	T	C	T	G	C	T	A	A	
#Rhino	C	T	C	T	G	A	T	T	T	C	T	T	C	T	G	C	T	A	A	
#Sh38	C	T	C	T	G	A	T	T	T	C	T	T	C	T	G	C	T	A	A	
#Tapia	C	T	C	T	G	A	T	T	T	C	T	T	C	T	G	C	T	A	A	
#Goat	T	G	C	T	G	A	T	T	T	C	C	A	T	C	T	C	A	T	A	
#Human	C	T	C	T	A	A	T	T	T	G	T	A	T	C	T	G	A	T	G	
#Mouse	C	C	T	T	A	T	A	T	T	C	T	A	C	T	T	G	T	T	T	
#Rabbit	C	T	C	T	G	A	T	T	T	C	T	T	C	T	G	C	T	A	A	

	V	V	Y	P	W	T	Q	R	F	F	G	T	F	G	N	L	
#Cheju	TTGTCTATCC	CTGGAACCA	GAGGTTTTTT	GGCAACTTTG	GGAA-CCTGT	450											
#Ass13	TTGTCTATCC	CTGGAACCA	GAGGTTTTTT	GACAACTTTG	GCAA-CCTGT												
#Gre14	TTGTCTATCC	CTGGAACCA	GAGGTTTTTT	GACAACTTTG	GCAA-CCTGT												
#Hemi11	TTGTCTACCC	CTGGAACCA	GAGGTTTTTT	GACAACTTTG	GCAA-CCTGT												
#Jenpen12	TTGTCTA-CC	CTGGAACCA	GAGGTTTTTT	GACAACTTTG	GCAA-CCTGT												
#Prew3	TTGTCTATCC	CTGGAACCA	GAGGTTTTTT	GACAACTTTG	GCAA-CCTGT												
#Rhino	TTGTCTATCC	CTGGACCCA	GAGGTTTTTT	GACAACTTTG	GCAA-CCTGT												
#Sh38	TTGTCTATCC	CTGGAACCA	GAGGTTTTTT	GACAACTTTG	GCAA-CCTGT												
#Tapia	TTGTCTATCC	CTGGAACCA	GATGTTTTTT	GACAACTTTG	GCAA-CCTGT												
#Goat	TTGTCTACCC	CTGGACCCA	GAGGTTCTTT	GATAGCTTTG	GCAA-CCTGT												
#Human	TTGTTTACCC	CTGGACCCA	GAGATTTTTT	GACAGCTTTG	G-AAACCTGT												
#Mouse	TTGTGTACCC	ATGGACCCA	GAGATTCTTT	GACAGCTTTG	G-GAACTTGT												
#Rabbit	TTGTCTACCC	CTGGACCCA	AAGATTCTTT	GACAACTTTG	G-CAACTTGT												

	S	S	S	S	A	I	M	G	N	P	K	I	K	A	M	G	
#Cheju	CCTCTTCCCTC	-TGCCATAAT	GGGGAATCC	CAAAGTCAAG	GCCCCATGGC	500											
#Ass13	CCTCTTCCCTC	-TGCCATAAT	GGGGAATCC	CAAAGTCAAG	GCCCCATGGC												
#Gre14	CCTCTTCCCTC	-TGCCATAAT	GGGGATCCC	CAAAGTCAAG	GCC?TGGGA												
#Hemi11	CCTCTTCCCTC	-TGCCATAAT	GGGCATCCC	CAAATTC AAG	GCCTTGGGC												
#Jenpen12	CCTCTTCTTC	-TGCCATAAT	GGGGAATCC	CAAAGTCAAG	GCCCCATGGC												
#Prew3	CCTCTTCCCTC	-TGCCATAAT	GGGGAATCC	CAAAGTCAAG	GGCCATGGC												
#Rhino	CCTCTTCCCTC	-TGCCATAAT	GGGGAATCC	CAAAGTCAAG	GGCCATGGC												
#Sh38	CCTCTTCCCTC	-TGCCATAAT	GGGGCATCC	CAAAGTCAAG	GGCCATGGC												
#Tapia	CCTCTTCCCTC	-TGCCATAAT	GGGGAATCC	CAAAGTCAAG	GGCCATGGC												
#Goat	CCTCTGCCCTC	-TGCCATAAT	GGGAAACCC	CAAGGTCAAG	GCCCCATGGC												
#Human	CGTCTCCCTC	-TGCCATCCT	GGGCAACCC	CAAGGTCAAG	GCCCCATGGC												
#Mouse	CCTCTGCCCTC	-TGCCATAAT	GGGCAACCC	AAGGGTCAAA	GCCCCATGGC												
#Rabbit	CCTCTTCCCTC	-TGCCATCAT	GGGAAACCC	CAAGGTCAAG	GCACATGGC												

	K	K	V	L	T	S	F	G	D	A	V	K	N	M	D	N	L	
#Cheju	AAGAAGGTGC	TGACCTCTTT	TGGAGATGCT	GTTAAGAACA	TGGACAACCT	550												
#Ass13	AAAAAGGTGC	TGAACCTCTTT	TGGAGATGCT	GTTAAGAACA	TGGACAACCT													
#Gre14	AGAAAGGTGC	TGAATCCTTT	TGGAGATGCT	GTTAAGAACA	TGGACAACCT													
#Hemi11	AAAAAGGTGC	TGACCCCTTT	TGGAGATGCT	GTTAAGAACA	TGGACAACCT													
#Jenpen12	AAAAAGGTGC	TGAACCTCTTT	TGGAAATGCT	GTTAAGAACA	TGGACAACCT													
#Prew3	AAGAAGGTGC	TGACCCCTTT	TGGAGATGCT	GTTAAGAACA	TGGACAACCT													
#Rhino	AAGAAGGTGC	TGACCTCTTT	TGGAGATGCT	GTTAAGAACA	TGGACAACCT													
#Sh38	AAAAAGGTGC	GAACCTCTTT	TGGAGATGCT	GTTAAGAACA	TGGACAACCT													
#Tapia	AAGAAGGTGC	TGACCTCTTT	TGGAGATGCT	GTTAAGAACA	TGGACAACCT													
#Goat	AAGAAGGTGC	TGACCTCCTT	TGGAGAAGCT	ATTAAGAATT	TGGACAACCT													
#Human	AAGAAGGTGC	TGACTTCCTT	TGGAGATGCT	ATTAAGAACA	TGGACAACCT													
#Mouse	AAGAAGGTGC	TGACTGCTTT	TGGAGAGTCC	ATTAAGAACC	TAGACAACCT													
#Rabbit	AAGAAGGTGC	TGACCTCCTT	TGGAGATGCC	ATCAAGAACA	TGGACAACCT													

	K	A	A	F	A	K	L	S	I	L	H	C	D	K	L	H	
#Cheju	CAAGGCTGCC	TTTGCTAAGC	TGAGTGAGCT	GCACTGTGAC	AAGCTGCATG	600											
#Ass13	CAAGGCTGCC	TTTGCTAAGC	TGAGTGAGCT	GCACTGTGAC	AAGCTGCATG												
#Gre14	CGAGGCTGCC	TTTGCTAAGC	TGAGTGAGCT	GCACTGTGAC	AAGCTGCATG												
#Hemi11	CAAGGCTGCC	TTTGCTAAGC	TGAGTGAGCT	GCACTGTGAC	AAGCTGCATG												
#Jenpen12	CAAGGCTGCC	TTTGCTAAGC	TGAGTGAGCT	GCACTGTGAC	AAGCTGCATG												
#Prew3	CAAGGCTGCC	TTTGCTAAGC	TGAGTGAGCT	GCACTGTGAC	AAGCTGCATG												
#Rhino	CAAGGCTGCC	TTTGCTAAGC	TGAGTGAGCT	GCACTGTGAC	AAGCTGCATG												
#Sh38	CAAGGCTGCC	TTTGCTAAGC	TGAGTGAGCT	GCACTGTGAC	AAGCTGCATG												
#Tapia	CAAGGCTGCC	TTTGCTAAGC	TGAGTGAGCT	GCACTGTGAC	AAGCTGCATG												
#Goat	CAAAGGTGCC	TTTGCTAAGC	TGAGTGAGCT	GCACTGTGAC	AAGTTGCACG												
#Human	CAAGCCGCC	TTTGCTAAGC	TGAGTGAGCT	GCACTGTGAC	AAGCTGCATG												
#Mouse	CAAGTCTGCC	TTGGCCAAGC	TCAGTGAAC	GCACTGTGAC	AAGCTACATG												
#Rabbit	TAAGGCTGCC	TTTGCTAAGC	TGAGTGAGCT	GCACTGTGAC	AAACTGCATG												

	V	D	P	E	N	L	R	
#Cheju	TGGATCCTGA	GAAC TTCAGG	GTGAGTTCAG	GAAATGTTCA	TGTT CATGTG	650		
#Ass13	TGGATCCTGA	GAAC TTCAGG	GTGAGTTCAG	GAAATGTTCA	TGTT CATGTG			
#Gre14	TGGATCCTGA	GAAC TTCAGG	GTGAGTTCAG	GAAATGTTCA	TGTT CATGTG			
#Hemi11	TGGATCCTGA	GAAC TTCAGG	GTGAGTTCAG	GAAATGTTCA	TGTT CATGTG			
#Jenpen12	TGGATCCTGA	GAAC TTCAGG	GTGAGTTCAG	GAAATGTTCA	TGTT CATGTG			
#Prew3	TGGATCCTGA	GAAC TTCAGG	GTGAGTTCAG	GAAATGTTCA	TGTT CATGTG			
#Rhino	TGGATCCTGA	GAAC TTCAGG	GTGAGTTCAG	GAAATGTTCA	TGTT CATGTG			
#Sh38	TGGATCCTGA	GAAC TTCAGG	GTGAGTTCAG	GAAATGTTCA	TGTT CATGTG			
#Tapia	TGGATCCTGA	GAAC TTCAGG	GTGAGTTCAG	GAAATGTTCA	TGTT CATGTG			
#Goat	TGGATCCTGA	GAAC TTCAGG	GTGAGTTCAG	GAA-----G	TGTT CATGCC			
#Human	TGGATCCTGA	GAAC TTC AAG	GTGAGTTCAG	GTGCTGGTGA	TGT-----GA			
#Mouse	TGGATCCTGA	GAAC TTC AAA	GTGAGTCTAG	G-----GCAA	TGC-CACAAA			
#Rabbit	TGGATCCTGA	GAAC TTC AAA	GTGAGTTT AG	GAGATGCTCA	TG-----AG			
#Cheju	CTCTT-TTTT	GCTTTTTTAGT	TTGGGATAAT	AATGGAAGTT	GAGCCTTTGG	700		
#Ass13	CTCTT-TTTT	GCCTTTTTAGT	TTGGGATAAT	AATGGAAGTT	GAGCCTTTGG			
#Gre14	CTCTT-TTTT	GCCTTTTTAGT	TTGGGATAAT	AATGGAAGTT	GAGCCTTTGG			
#Hemi11	CTCTT-TTTT	GCTTTTTTAGT	TTGGGATAAT	AATGGAAGTT?	GAGCCTTTGG			
#Jenpen12	CTCTT-TTTT	GCTTTTTTAGT	TTGGGATAAT	AATGGAAGTT	GAGCCTTTGG			
#Prew3	CTCTT-TTTT	GCTTTTTTAGT	TTGGGATAAT	AATGGAAGTT	GAGCCTTTGG			
#Rhino	CTCTT-TTTT	GCTTTTTTAGT	TTGGGATAAT	AATGGAAGTT	GAGCCTTTGG			
#Sh38	CTCTT-TTTT	GCCTTTTTAGT	TTGGGATAAT	AATGGAAGTT	GAGCCTTTGG			
#Tapia	CTCTT-TTTT	GCCTTTTTAGT	TTGGGATAAT	AATGGAAGTT	GAGCCTTTGG			
#Goat	TTCC-ITTG	GCTTTTTACC	TTGCAATAAT	AATGGAAGTT	GAGTGTTTTA			
#Human	TT--T-TTTG	GCTTTATAT	TTGA--CATT	AATGGAAGCT	CATAATCTTA			
#Mouse	TTTAT-TTTG	GATTTGT-CT	TAGGAACAAA	ATGAGAAGCC	AAGAATATGA			
#Rabbit	CTCTT-TCTG	GTTTTATAAC	TTAGCACAAAT	AATGGGATAT	AAGACTATGA			
#Cheju	TTGAAAAGAC	TAACAAAGAT	CTCAGATATC	ATGGGTCTCA	CTTGGTGTTA	750		
#Ass13	TTGAAAAGAC	TAACAAAGAT	CTCAGATATC	ATGGGTCTCA	CTTGGTGTTA			
#Gre14	TTGAAAAGAC	TAACAAAGAT	CTCAGATATC	ATGGGTCTCA	CTTGGTGTTA			
#Hemi11	TTGAAAAGAC	TAACAAAGAT	CTCAAATATC	ATGGGTCTCA	CTTGGTGTTA			
#Jenpen12	TTGAAAAGAC	TAACAAAGAT	CTCAAATATC	ATGGGTCTCA	CTTGGTGTTA			
#Prew3	TTGAAAAGAC	TAACAAAGAT	CTTAGATATC	ATGGGTCTCA	CTTGGTGTTA			
#Rhino	TTGAAAAGAC	TAACAAAGAT	CTCAGATATC	ATGGGTCTCA	CTTGGTGTTA			
#Sh38	TTGAAAAGAC	TAACAAAGAT	CTCAGATATC	ATGGGTCTCA	CTTGGTGTTA			
#Tapia	TTGAAAAGAC	TAACAAAGAT	CTCAGATATC	ATGGGTCTCA	CTTGGTGTTA			
#Goat	TTGAAAAGAC	TAG-AAAGAC	CTCAGAAATC	ATAGATCAAA	CTAGGTGTTA			
#Human	TTGAAAAGAC	CAACAAAGAT	CTCAGAAATC	ATGGGTCTGAG	CTTGATGTTA			
#Mouse	ATG-----	---TGGGTG	CTTA-----	-----	TTAGCTGTCA			
#Rabbit	TTGGAGAGAT	CAACAAAGAT	TTCAGAAGTC	ATAGATATGT	TTTGGTGTTA			
#Cheju	TGAGGGCAGA	CCTCAAGTGG	GCATCACTGA	GAAC TCCTAG	ATTCAGGACT	800		
#Ass13	TGAGGGCAGA	CCTCAAGTGG	GCATCACTGA	GAAC TCCTAG	ATTCAGGACT			
#Gre14	TGAGGGCAGA	CCTCAAGTGG	GCATCACTGA	GAAC TCCTAG	ATTCAGGACT			
#Hemi11	TGAGGGCAGA	CCTCAAGTGG	GCATCACTAA	GAAC TCCTAG	ATTCAGGACT			
#Jenpen12	TGAGGGCAGA	CCTCAAGTGG	GCATCACTAA	GAAC TCCTAG	ATTCAGGACT			
#Prew3	TGAGGGCAGA	CCTCAAGTGG	GCATCACTGA	GAAC TCCTAG	ATTCAGGACT			
#Rhino	TGAGGGCAGA	CCTCAAGTGG	GCATCACTGA	GAAC TCCTAG	ATTCAGGACT			
#Sh38	TGAGGGCAGA	CCTCAAGTGG	GCATCACTGA	GAAC TCCTAG	ATTCAGGACT			
#Tapia	TGAGGGCAGA	CCTCAAGTGG	GCATCACTGA	GAAC TCCTAG	ATTCAGGACT			
#Goat	GGAGGACAGA	CTTCCAGTGG	GCAT-ACCGA	G-CCCACTTG	ATTCAGGACT			
#Human	GAACAGCAGA	CTTCTAGTGA	GCATAACCAA	AACTTACATG	ATTCAGAACT			
#Mouse	A-----	----AGT--	---TAATTAA	-----TTGG	TCCCAGTAAG			
#Rabbit	GA-----GA	TCTCCAATGG	TCATCAACAA	GACCAATTTA	ATTCAGAAAT			

#Cheju	AGTGATAGTA	AAGGGATA--	----CTAGCA	GCCTGAGTTT	ACTTAAAAC	850
#Ass13	AGTGATAGTA	AAGGGATA--	----CTAGCA	GCCTGAGTTT	ACTTAAAAC	
#Gre14	AGTGATAGTA	AAGGGATA--	----CTAGCA	GCCTGAGTTT	ACTTAAAAC	
#Hemi11	AGTGATAGTA	AAGGGATA--	----CTA?CA	GCCTGAGTTT	ACTTAAAAC	
#Jenpen12	AGTGATAGTA	AAGGGATA--	----CTAGCA	GCCTGAGTTT	ACTTAAAAC	
#Prew3	AGTGATAGTA	AAGGGATA--	----CTAGCA	GCCTGAGTTT	ACTTAAAAC	
#Rhino	AGTGATAGTA	AAGGGATA--	----CTAGCA	GCCTGAGTTT	ACTTAAAAC	
#Sh38	AGTGATAGTA	AAGGGATA--	----CTAGCA	GCCTGAGTTT	ACTTAAAAC	
#Tapia	AGTGATAGTA	AAGGGATA--	----CTAGCA	GCCTGAGTTT	ACTTAAAAC	
#Goat	AGTGACA-TA	AAGAGCTA--	-TGG---GCA	GCCTTACTGT	GCATGCA--T	
#Human	AGTGACAGTA	AAGGACTA--	----CTAACA	GCCTGAATTG	GCTTAA--CT	
#Mouse	GGTGACAGTG	AATGGCT--	---GTAAGAA	GCCTAAATTA	GTTTA-----	
#Rabbit	AGTAA-GGTA	AAAGGCTA--	----TTAACA	GTCT-----	-----AATT	

#Cheju	TTCCAAGAAT	TGT-TGTCAG	-AACTGGACT	?GTTTATCCT	AT?GAATATC	900
#Ass13	TTTCAAGAAT	TGT-TGTCAG	-AACTGGACT	TGTTTATCCT	ATA?AATATC	
#Gre14	TTCCA-GAAT	TGT-TGTCAG	-AACTGGACT	TGTTTATCCT	ATAGAATATC	
#Hemi11	TT-CAAGAAT	TGT-TGTCAG	-AACTGGACT	TGTTTATCCT	ACAGAATATC	
#Jenpen12	TTTCAAGAAT	TGT-TGTCAG	-AACTGGACT	TGTTTATCCT	ACAGAATATC	
#Prew3	TTTCAAGAAT	TGT-TGTCAG	-AACTGGACT	TGTTTATCCT	ATAGAATATC	
#Rhino	TTTCAAGAAT	TGT-TGTCAG	-AACTGGACT	TGTTTATCCT	ATAGAATATC	
#Sh38	TTTCAAGAAT	TGT-TGTCAG	-AACTGGACT	TGTTTATCCT	ATAGAATATC	
#Tapia	TTTCAAGAAT	TGT-TGTCAG	-AACTGGACT	TGTTTATCCT	ATAGAATATC	
#Goat	GGCTAAG---	-TCGCTTCAG	GTGTCAGAC-	TCTTTGT---	----GACCCC	
#Human	TTTCAGGAAA	TCT-TGCCAG	-AACTTGATG	TGTTTATCCC	AGAGAATTGT	
#Mouse	-CCCGA-----	-CAT-TTAG	AAA-----	-----ATTT	AGATCGTGAT	
#Rabbit	TTTCAGAAAA	T-----	-----GATG	TGTTTATCCT	G-AGAATAAT	

#Cheju	AGAGCATAGC	C-TGACTTGT	TCAAAGAAG-	AATGGAATTT	GACTTTTGT	950
#Ass13	A?AACATA?C	--TGACTTGT	TCCAA?A?G-	AATGGAATTT	GACTTTTGT	
#Gre14	AGA?CATAGC	--TGACTTGT	TCCAAGAAG-	AATGGAATTT	GACTTTTGT	
#Hemi11	AGAGAATA?C	--TGACTTGT	TCAAAGAAG-	AATGGAATTG	GACTTT?GAT	
#Jenpen12	AGCA-ATAGC	--TGACTTGT	TCAAAGAAGG	AATGGAATTT	GACTTTGGAT	
#Prew3	AGAGCATAGC	--TGACTTGT	TC?AAGAAG-	AATGGAATT-	GACTTTTGT	
#Rhino	AGA?CATAGC	--TGACTTGT	TCCAAGA?G-	AATGGAATT-	GACTTTTGT	
#Sh38	AGAGCATAGC	--TGACTTGT	TCAAAGAAG-	AATGGAATTT	GACTTTTGT	
#Tapia	AGA?CATAGC	--TGACTTGT	TCCAAGAAG-	AATGGAATTT	GACTTTTGT	
#Goat	AT-----GGC	TGTAGCC---	-----	-----ACCA	GGTCCCT---	
#Human	ATTATAGAAT	TGTAGACTTG	TGAAAGAA-G	AATGAAA--T	-----TTGGC	
#Mouse	AAAATTTA-T	CATGGATTTA	TATGGAGAGT	AAT-----	-----	
#Rabbit	GTTATTGAAT	TGTAGCTTTG	TACAAGGAAA	AATAGAATTT	GTCTGTTAGT	

#Cheju	?GAT?A?GGC	TT--CTCCAC	A--AGGAGAA	ATGCC---TT	CATTTTATGT	1,000
#Ass13	AAATGAAGGC	CT?TCTC-AA	A?AAGGA?AA	ATGCC---T?	-ATTT?ATGT	
#Gre14	AGATGAA?GG	CTATCTC-AA	A?AAGGA?AA	?TGCC---CT	-AATTTATGT	
#Hemi11	AGATGAAGGG	CTGTCTCCAA	A?AAGGA?AA	ATG?C---TT	-ATTT?TGT	
#Jenpen12	AGATGAAGG-	CTGTCTC--A	AAAAGGA-AA	ATGCC---TA	-ATTT?ATGT	
#Prew3	A?ATGAAGGG	CTATCTC-AA	AGAAGGA-AA	ATGCC---TA	-ATTT?ATGT	
#Rhino	AGATGAAGGC	CTATCTC-AA	AGAAGGA?AA	ATGCC---T?	-ATTTTATGT	
#Sh38	AGATGAAGGC	CTATCTCCAA	AGAAGGA?AA	ATGCC---TT	-ATTTTATGT	
#Tapia	AGATGAA?GG	CTATCTC-AA	AGAAGGAGAA	ATGCC---TA	---TTTATGT	
#Goat	-----	CTGT-----	-----	---CCATG---	-----	
#Human	-----	---TTTT-GG	T-AGATGAAA	GT-----	-----	
#Mouse	--ATGAAG--	-----	---AGAA	GTACCATG--	-----GC	
#Rabbit	AGATGAAGGC	CTATCTC-AA	TGAAGGAGAA	ATGCAATGCT	TACATTATAT	

#Cheju	GGGTTCCCTTA	CGAC-GAAGT	TTAAGGACAA	-----	-----TTGG	1,050
#Ass13	TGGTCCTA-T	G-ACTGAAAT	TTAGGAAAAA	-A-----	-----TTGG	
#Gre14	TGGTCCTAAT	GAAGTGAAT	TTTAGGAA?A	-A-----	---AATTTGG	
#Hemi11	TGTTCTCA-T	GAAGTGAAGT	T?AATTA?AA	-A-----	---A-T?A?	
#Jenpen12	TGGTCCTA-A	TGACTGAAGT	TTAT--TAAA	-A-----	---AATTTAG	
#Prew3	TGGTCCTA-T	GAAGTGAAT	TTAAGGAAAA	-----	---AATTTGG	
#Rhino	-GGTCCTA-T	GA-CTGAAAT	TTAAGGAAAA	-----	---?ATT?GG	
#Sh38	-GGTCCTA-A	TGACTGAAGT	TTAAGGAA?A	-A-----	---?ATTTGG	
#Tapia	TGGTCCTA-T	GA-CTGAAGT	TTA-GGAAGA	-----	---GATTTGG	
#Goat	GGATTCTC-C	AGGCTAGGAT	ACAGGTATGT	GTTGCC----	---ATTTCC-	
#Human				-----CCAT-		
#Mouse	GGGATCTA--	-----T	GCAAGAAGAA	-----ATG	GAA----TAG	
#Rabbit	TTTTCTGAT	-GAT-GAA--	CTAG-GACTT	GATT---AGG	GACGATTT--	

#Cheju	GGG-----	-----AAAAA	AAATCCTGGA	CAAG?TTATC	-----T	1,100
#Ass13	GGG-----	-----AAAA	AAATTTTG-A	CAGATATTT	-----	
#Gre14	GGG-----	-----AAAAA	AA-TTCTGGA	CAGATT?TTT	-----T	
#Hemi11	GGG-----	-----AAAGA	AAATTC?GGA	CAGATTATTT	-----	
#Jenpen12	GGG-----	-----AAAAA	AAATTC?GGA	CAGATATTT	-----	
#Prew3	GG-----	-----GAAAA	AAATTC?GGA	CAGATTATCT	-----	
#Rhino	GG-----	-----AAAAA	AAATTC?GGA	CAGATTATCT	-----	
#Sh38	GGG-----	-----AAAAA	AAATTC?GGA	CAGATTATCT	-----	
#Tapia	G-----	-----AAAAA	AAATTC?GGA	CAGATTATCT	-----	
#Goat	-----TTT	TTCCAGGG--		--GATCTACC	CA-----GCC	
#Human					-----	
#Mouse	GG-----	-----AATGGA	AAATCTT---	--AACTTTTT	-----	
#Rabbit	ATGCGAGATC	TCTTGAAAAA	AAATAC--AA	CAAATTTT--	-----CT	

#Cheju	CAGAG-----	GGGAA?GAG-	-----	?GAAA-----	-----ATTC-	1,150
#Ass13	CAGAG-----	AAA-ATAAA-	-----	AAAAA-----	-----ATT?T	
#Gre14	CAGAG-----	?GAAATCAA	-----	AAA?A-----	-----ATTT?	
#Hemi11	CAGAG-----	GAAAATACA-	-----	AAAA-----	-----TTT?	
#Jenpen12	CAGAG-----	AAAAATAAA-	-----	AAAA-----	-----TTTC	
#Prew3	CAGAG-----	AAAAATAAA-	-----	AAAA-----	-----ATTTT	
#Rhino	CAGAG-----	AAAGATAAA-	-----	AAAA-----	-----ATTTT	
#Sh38	CAGAG-----	AAAAATAAA-	-----	AAAA-----	-----ATTTT	
#Tapia	CAGAG-----	AAAAATAAA-	-----	AAAA-----	-----TTTC	
#Goat	CAAGGAT---	-----CATAT	CTGT-----AT	C-----	-----TCT	
#Human				-----T-T	CAAG-----	
#Mouse				-----GCGCGG	-----	
#Rabbit	GAAAAATATT	AAATTC---T	C--TCAGTAT	TGTGAC-CAA	ATATAAAC-T	

#Cheju	-----TC	TG-----A	A?TATGCTAA	G-----	---GTGAC---	1,200
#Ass13	T-----TT	-----A	AGTATA?TAA	A-----	---TTAC---	
#Gre14	T-----TT	TA-----A	AGTATACTAA	A-----	---?TAC---	
#Hemi11	T-----TT	TA-----A	AGTATACCAA	A-----	---TTAC---	
#Jenpen12	T-----TT	TA-----A	AGGA-ACTAA	A-----	---TTAC---	
#Prew3	T-----CT	-A-----A	AGTATACTAA	A-----	---TTAC---	
#Rhino	T-----CT	-A-----A	AGTATACTAA	A-----	---TTAC---	
#Sh38	T-----TT	TA-----A	AGTATA?TAA	A-----	---TTAC---	
#Tapia	T-----CT	-A-----A	TGTATACTAA	A-----	---TTAC---	
#Goat	TACATCTCCT	TCAATAGC-A	GGCATGTT--	-CTTT-----	---ATCACTAG	
#Human			GAAAT-----	-----	AGAA-----	
#Mouse	---TCCTATT	TA-----TTG	---ATGTTGA	A-----G	AAAAGTCTTG	
#Rabbit	TGTTCTGTC-	---TTTGGTTG	GAGACTTTAA	ACTCC-----	AAGACCCTTG	



```

#Cheju ----- CTGTCCAA T----- 1,250
#Ass13 ----- CTGT-CCA T-----
#Gre14 ----- CTGT-CGA T-----
#Hem11 ----- ?TGTTCCA T-----
#Jenpen12 ----- CTGT-CAA T-----
#Prew3 ----- CTGT-CAA T-----
#Rhino ----- CTGT-C?A T-----
#Sh38 ----- CTGT-CAA T-----
#Tapia ----- CTGT-CAA T-----
#Human ----- AT--GCCTTA T-TTTATGTG GGTCA-----TGATAATT
#Mouse CAAGACA--- ---ACCTTA TG-----GTGA-----
#Rabbit C--AACACTG GC--ATTCTA TGTTTACTGA AACTAAACAA T-TATTAAT

```

```

#Cheju ----- 1,300
#Ass13 -----
#Gre14 -----
#Hem11 -----
#Jenpen12 -----
#Prew3 -----
#Rhino -----
#Sh38 -----
#Tapia -----
#Goat -----TTCTGG -----AAC TTCTGTCAGA -----
#Human GAGGTT-TAG AA-GAG-----AT TTTTGCAAAA ---AAAATAAA
#Mouse -----
#Rabbit GAGAA---AG AAAAAAAGAA AGAAGATAAA TATGGTGAAA TGTGGAAGGA

```

```

#Cheju ----- 1,350
#Ass13 -----
#Gre14 -----
#Hem11 -----
#Jenpen12 -----
#Prew3 -----
#Rhino -----
#Sh38 -----
#Tapia -----
#Goat -ACTGGATGT ATTTACCCCA G-AGAATATC AAAG-----AA
#Human A-----G ATTTGCTCAA AGAAAA-AT- -AAGACACAT TTTCTAA-AA
#Mouse ----- ATTTTCTCAA -----T AAACATAA-----AA
#Rabbit GGATA---AG ATATAGGTAG TCAGAAATGTT GAACGGAAGT CTCATAAAAA

```

```

#Cheju ----- -AAA?TACCT 1,400
#Ass13 ----- -AAATTACCT
#Gre14 ----- -AAATTACCT
#Hem11 ----- -AAATTACCT
#Jenpen12 ----- -AAATTACCT
#Prew3 ----- -AAATTACCT
#Rhino ----- -AAATTACCT
#Sh38 ----- -AAATTACCT
#Tapia ----- -AAATTACCT
#Goat TAGCAT---A TTTGT-----TCTG----- --GGAGAAAT GAAA---TCT
#Human T-ATGTTAAA TTT---CCCA TC--AGTATT GTGACCAAGT GAAGGCTT--
#Mouse TTGTATTTAA TT---CCTA GGTGAATATC TTGA-CAAAT GGAGGCTT--
#Rabbit TGAAATTGAA TCCAT-----

```

#Cheju	TGTCA-----	-----AG	TAGGAGGGAG	CTTGTTATTG	C-ATTGGTTA	1,450
#Ass13	?T-CA-----	-----AG	TAGGAGGA-G	CTTGTTATTG	C-ATTGGTTA	
#Gre14	GTTCT-----	-----AG	TAGGAGGA-G	CTGGTTATTG	CCATT??TTA	
#Hemi11	GT-CA-----	-----AG	TAAGAGGAAG	CTTGTTAT?G	C-ATTGGTTA	
#Jenpen12	-T-CA-----	-----AG	TAGGAGGAAG	CTTGTTATTG	C-ATTGATTA	
#Prew3	GT-CA-----	-----AG	TAGGAGGAAG	CTTGTTATTG	C-ATTGGTTA	
#Rhino	GT-CA-----	-----AG	TAGGAGGAAG	CTTGTTATTG	C-ATTGGTTA	
#Sh38	GT-CA-----	-----AG	TAGGAGGAAG	CTTGTTATTG	C-ATTGGTTA	
#Tapia	GT-CA-----	-----AG	TAGGAGGAAG	CTTGTTATTG	C-ATTGGTTA	
#Goat	GGCT--TTTG	A-----	-----AAGAA-	-----TAAGT	CCAGTCTCTA	
#Human	-----GTTT-	---CCGAATT	IGTTGGGGA-	-----	-----TTTT-	
#Mouse	-----GTTC-	---TTACA--	--TTGGGGA-	-----	-----TA	
#Rabbit	-----	-----	-----	-----	-----	

#Cheju	GAGA----AC	---GGTAAAC	TCACTCTGAG	AACCC-ATGC	AGCCCTGAAA	1,500
#Ass13	GAGA----C	---GTTAAAC	TCACTCTGAG	AACCC-ATGC	AGCCCTGAAA	
#Gre14	GAGA----C	---GT?AA-C	TCA?TCTGAG	AACCCCATGC	AGCCCTG?A-	
#Hemi11	GAGA----C	---ATTA AAC	TCACTCTGAG	AACCC-ATGC	AGCCCTGAAA	
#Jenpen12	GAGA----C	---GTTAAAC	TCACTCTGAG	AACCC-ATGC	AGCCCTGAAA	
#Prew3	GAGA----C	---GTTAA-C	TCACTCTGAG	AACCC-ATGC	AGCCCTGAAA	
#Rhino	GAGA----C	---GTTAAAC	TCACTCTGAG	AACCC-ATGC	AGCCCTGAAA	
#Sh38	GAGA----C	---GTTAAAC	TCACTCTGAG	AACCC-ATGC	AGCCCTGAAA	
#Tapia	GAGA----C	---GTTAAAC	TCACTCTGAG	AACCC-ATGC	AGCCCTGAAA	
#Goat	GGAG-----	---GGAGAAT	T-----	-ATCCT----	--ATGTGA?T	
#Human	-----	---AAAC	TCCCCTGAG	AACTCTTGC-	-AGCA-----	
#Mouse	G---TTTTA-	-----AAAC	TC-CACCAAT	AGCAGTAGGA	AAACA-GAAA	
#Rabbit	-----	-----	-----	---TCTTG--	-----	

#Cheju	TCCTATGATT	ACAGG-AATT	AGATAATTGG	TAAATGAGCA	AGGAAGGGAG	1,550
#Ass13	TCCTATGATT	ACAGG-AATT	AGATAATTGG	TAAATGAGAA	AGAAAGGGAG	
#Gre14	TC?TAT?A?T	ACAGG-AATT	AGATA?CTGG	TATATGAGAA	A?G?AGGGAG	
#Hemi11	TCCTATGATT	ACAGG-AATT	AGATAATTGG	TAAATGAGAA	AGGAAGGGAG	
#Jenpen12	TCCTATGATT	ACAGG-AATT	AGATAATTGG	TAAATGAGAA	AGGAAGGGAG	
#Prew3	TCCTATGATT	ACAGG-AATT	AGATAATTGG	TAAATGAGAA	AGGAAGGGAG	
#Rhino	TCCTATGATT	ACAGG-AATT	AGATAATTGG	TAAATGAGAA	AGGAAGGGAG	
#Sh38	TCCTATGATT	ACAGG-AATT	AGATAATTGG	TAAATGAGAA	AGGAAGGGAG	
#Tapia	TCCTATGATT	ACAGG-AATT	AGATAATTGG	TAAATGAGAA	AGGAAGGGAG	
#Goat	CCCGATGACT	GAAGTTTA--	-----GG	AAGATATTTG	GGAG---AAT	
#Human	-----CTC	ACATTCTACA	TTT-----A	CAA-----	-AAATTAGAC	
#Mouse	TTCTG-----	-----	---AATTTA	CAGAT-----	---ACTAGAC	
#Rabbit	-----	-----	-----	-----	-----	

#Cheju	AGAGGCAAGT	CACCATGATG	AAATGAGA--	----GGGAG-	-----	1,600
#Ass13	AGAGGCAAGT	CAAAATGATG	AAATGAGA--	----GGGAG-	-----	
#Gre14	AGCGGCAAGT	CAATATGA?G	?AATGAGA--	----GGGAG-	-----	
#Hemi11	AGAGGCAAGT	CAAAATGATG	AAATGAGA--	----GGTCG-	-----	
#Jenpen12	AGAGGCAAGT	CAAAATGATG	AAATGAGA--	----GGGAG-	-----	
#Prew3	AGAGGCAAGT	CAAAATGATG	AAATGAGA--	----GGGAG-	-----	
#Rhino	AGAGGCAAGT	CAAAATGATG	AAATGAGA--	----GGGAG-	-----	
#Sh38	AGAGGCAAGT	CAAAATGATG	AAATGAGA--	----GGGAG-	-----	
#Tapia	AGAGGCAAGT	CAAAATGATG	AAATGAGA--	----GGGAG-	-----	
#Goat	AATTATTAGC	CAG----ATC	ATCTCAAAGA	AAAA-----	-TTGAT---C	
#Human	AA-----	TTGCTTA---	-----AA	GAAAA-----	-----AC	
#Mouse	AA-----	----CTATA	GAATGAGAAA	AACAAG-----	-----AC	
#Rabbit	-----	-----	-----	-----	-----	

```

Cheju ----- GGT ----- GGAGCCAT 1,650
#Ass13 ----- GGT ----- GGAGCCAT
#Gre14 ----- GGT ----- GGAGCCAT
#Hemi11 ----- GGT ----- GGAGCTAT
#Jenpen12 ----- GGT ----- GGAGCCAT
#Prew3 ----- GGT ----- GGAGCCAT
#Rhino ----- GGT ----- GGAGCCAT
#Sh38 ----- GGT ----- GGAGCCAT
#Tapia ----- GGT ----- GGAGCCAT
#Goat AA--TATCTC A-AGGAATTA --CCCA-- --TCAGAACTGT
#Human AGG-----G AGAGAGG-- GAACCCAATA ATCCTGGTA-----
#Mouse AGG----- --CAA-- -----AT
#Rabbit -----

```

```

#Cheju AAG----- TAG----- 1,700
#Ass13 AAG----- TAG-----
#Gre14 AAG----- TAG-----
#Hemi11 AAG----- CAG-----
#Jenpen12 AAG----- TAG-----
#Prew3 AAG----- TAG-----
#Rhino AAG----- TAG-----
#Sh38 AAG----- TAG-----
#Tapia AAG----- TAG-----
#Goat GA-----CTA GGTGGAGGCT TATTGTTGC--ATTGAATTG AGGGTTTAC--
#Human AAA--TG-- --GGG-- --AA-- --GG-- --GG--GTG
#Mouse AAA----- --TATG
#Rabbit -----

```

```

#Cheju ----- CCAG A----- 1,750
#Ass13 ----- GCAG A-----
#Gre14 ----- GCAG ?-----
#Hemi11 ----- GCAG A-----
#Jenpen12 ----- GCAG A-----
#Prew3 ----- GCAG A-----
#Rhino ----- GCAG A-----
#Sh38 ----- GCAG A-----
#Tapia ----- GCAG A-----
#Goat ----- TAAGC----- --TC--AT
#Human AG--GGT GT----- --AGGTAGGTA GAATG----- --TTGAAT
#Mouse A--TG-- --A----- --GAATAG----- --AAAG
#Rabbit ----- --TCTTG-----

```

```

#Cheju ----- 1,800
#Ass13 -----
#Gre14 -----
#Hemi11 -----
#Jenpen12 -----
#Prew3 -----
#Rhino -----
#Sh38 -----
#Tapia -----
#goat TCTAA----- --CAACC CA-----TGC AGCCC-----T GAAT--CCTA--
#Human --GTAGGGCTC -----A-- TAGA----- --A-TA--AA
#Mouse TATGAGACTC C----- --CTGT --GCTC--ATC AGAGAT--A
#Rabbit ----- --GTTTAA-----

```



```

#Cheju      -----ATGTT G-----1,850
#Ass13     -----ATGTT G-----
#Gre14     -----ATGTT G-----
#Hemi11    -----ATGTT G-----
#Jenpen12  -----ATGTT G-----
#Prew3     -----ATGTT G-----
#Rhino     -----ATGTT G-----
#Sh38      -----ATGTT G-----
#Tapia     -----ATGTT G-----
#Goat      --TGAA---T ATAAAATTA-- --GAAGGA--- ---GGGAAA AGGCCAA--CT
#Human     ATTGA--ACC -TAAGCTCAT CTGA--ATT TTTTGGGTGG GCACAAACCT
#Mouse     GCTGAGGAC- -----ACT T-----GTGC-----
#Rabbit    -----GGGTAG GCACAATCCT

```

```

#Cheju      -----AATGGATAGG T-----1,900
#Ass13     -----AATGGAAAAGG T-----
#Gre14     -----AATGGAAAAGG T-----
#Hemi11    -----AATGGAAAAGG T-----
#Jenpen12  -----AATGGGAAGG T-----
#Prew3     -----AATGGAAAAGG T-----
#Rhino     -----AATGGAAAAGG T-----
#Sh38      -----AATGGAAAAGG T-----
#Tapia     -----AATGGAAAAGG T-----
#Goat      AAAAATAGTG AAATAGGAGA GAGG----CA AGGGAT-ATA GGCAGACAAA
#Human     TGGAACAGTT T--GAGGTCA -GGGTGTCT AGGAATG-TA GGTATAAAGC
#Mouse     TGAA----- -TGTTT AAAGACTATG GGT-CAAA--
#Rabbit    TGGAGTAATT T--GAGGTCA -GAGTTTCA GGGAAATG-TA GGTACATAGT

```

```

#Cheju      CATAGTAAAT G--GAACTGA ---GGG-AC- TAGAGTATG- -TGAGT-T--1,950
#Ass13     CATATTTAAAT G--GAATTGA ---GGG-AC- TAGAGTATG- -TGAGT-T--
#Gre14     CATATTTAAAT G--GAATTGA ---GGG-AC- TAGAGTATG- -TGAGT-T--
#Hemi11    AATATTTAAAT G--GAATTGA ---GGG-AC- TAGAGCATG- -TGAGT-T--
#Jenpen12  CATATTTAAAT G--GAATTGA ---GGG-AC- TAGAGTATG- -TGAGT-T--
#Prew3     CATATTTAAAT G--GAATTGA ---GGG-AC- TAGAGTATG- -TGAGT-T--
#Rhino     CATATTTAAAT G--GAATTGA ---GGG-AC- TAGAGTATG- -TGAGT-T--
#Sh38      CATATTTAAAT G--GAATTGA ---GGG-AC- TAGAGTATG- -TGAGT-T--
#Tapia     CATATTTAAAT G--GAATTGA ---GGG-AC- TAGAGTATG- -TGAGT-T--
#Goat      -ATATTGTAT GGAGGGCTCA TA-GGATTTA ---AATTTAA TTGAA-----
#Human     CGTTTTTTGTT TGTTTTGTTT TTT----TT- TC--ATCAAG TTG----TTT
#Mouse     -ATATTTCTT -----TGTTT
#Rabbit    CATTTCTTTC T-----TTG T-----AAA TT-----CTT

```

```

#Cheju      -----ATT TGG----- -AT-----AG CCATAACCCT TGGAGCAGGT 2,000
#Ass13     -----ATT TGG----- -AT-----AG GCATAACCCT TGGAGCAGGT
#Gre14     -----ATT TGG----- -AT-----AG ?CATAACCCT TGGAGCA??T
#Hemi11    -----ATT TGG----- -AT-----AG GCATAACCCT TGGAGCAGGT
#Jenpen12  -----ATT TGG----- -AT-----AG GCATAACCCT TGGAGCAGGT
#Prew3     -----ATT TGG----- -AT-----AG GCATAACCCT TGGAGCAGGT
#Rhino     -----ATT TGG----- -AT-----AG GCATAACCCT TGGAGCAGGT
#Sh38      -----ATT TGG----- -AT-----AG GCATAACCCT TGGAGCAGGT
#Tapia     -----ATT TGG----- -AT-----AG GCATAACCCT TGGAGCAGGT
#Goat      -GGACAAGCT CATCTGAGTT TATTGTATAG GTACAACCCA TGGAGAAGTT
#Human     TCGGAAACTT CTAC----TC AAC-----AT GCCTGTGTGT TA-----TT
#Mouse     TTA-----ATGCATAT-----
#Rabbit    TTGGGAACAC CTAC----TC AAT-----AT GCCTATGTAT CA-----TT

```

#Cheju	TAAGGTGCAG	AGATGGCAGG	GAGAGGAGGT	-CTTAGCCAT	T-TTTCCTGC	2,050
#Ass13	TAAGGTGCAG	AGTTGGCAGG	GAGTGGAGGT	-CTTAGCCAT	T-TTTCCTGC	
#Gre14	TAAGGTGCAG	AGTTGGCAGG	GAGT?GAG?T	-?TTAGCCAT	T-TTTCCTGC	
#Hemi11	TAAGGTGCAG	AGTTGGCAGG	GAGTGGAGGC	-CTTAGCCAT	T-TTTCCTGC	
#Jenpen12	TAAGGTGCAG	AGTTGGCAGG	GAGTGGAGGT	-CTTAGCCAT	T-TTTCCTGC	
#Prew3	TAAGGTGCAG	AGTTGGCAGG	GAGTGGAGGT	-CTTAGCCAT	T-TTTCCTGC	
#Rhino	TAAGGTGCAG	AGTTGGCAGG	GAGTGGAGGT	-CTTAGCCAT	T-TTTCCTGC	
#Sh38	TAAGGTGCAG	AGTTGGCAGG	GAGTGGAGGT	-CTTAGCCAT	T-TTTCCTGC	
#Tapia	TAAGGTGCAG	AGTTGGCAGG	GAGTGGAGGT	-CTTAGCCAT	T-TTTCCTGC	
#Goat	TAAGATGTGG	ACTTGGGAGT	G-GTTTAGGT	ACTAAGCCAT	---TTTCTGT	
#Human	T----TGTC-	--TT-----	-----TT	GCCTAA----	-----CAG-	
#Mouse				-----T	CGTTTC-----	
#Rabbit	T----TGTC-	--TT-----	-----TT	ACCTAA----	-----CAG-	

#Cheju	AATTTCTGGG	GGAAATTTCT	ACTCAACACA	CCTATCTGTC	A-TCTTGCT	2,100
#Ass13	AATTTCTGGG	GGAAATTTCT	ACTCAACACA	CCTATTTGTC	A-TTTTGCT	
#Gre14	AATTTCTG?G	GGAAATTTCT	ACTCAACACA	CCTATTTGTC	A-TTT-TCT	
#Hemi11	AATTTCTGGG	GGAAATTT?T	ACTCAACACA	C?TATTTGTC	A-TTTTGCT	
#Jenpen12	AATTTCTGGG	GGAAATTTAT	ACTCAACACA	CCTATTTGTC	A-TTT-TCT	
#Prew3	AATTTCTGGG	GGAAATTTCT	ACTAAACACA	CCTATTTGTC	A-TTTTGCT	
#Rhino	AATTTCTGGG	GGAAATTT?T	ACTCAACACA	CCTATTTGTC	A-TTTTGCT	
#Sh38	AATTTCTGGG	GGAAATTTCT	ACTCAACACA	CCTATTTGTC	A-TTTTGCT	
#Tapia	AATTTCTGGG	GGAAATTT?T	ACTCAACACA	CCTATTTGTC	A-TTT-TCT	
#Goat	AACTCTTTTA	GCAAACCTCA	ACTTGGCCTA	CCTAATTCTT	A-TTCTGCT	
#Human	--CTCCTGGG	TAA-----CGT	GAT-----			
#Mouse	-----	--AAATCTTC	ATTTAACACA	CCGATTTGTT	TCTTTTGCT	
#Rabbit	--CTCCTGGG	AAA-----CGT	G-----	-----CTG-C	-----	

#Cheju	ATCACCTAAC	AGCTCCTGGG	CAATGTGATT	GTGATTATT	2, 140
#Ass13	TTCACCTAAC	AGCTCCTGGG	CAATGTGATT	GTGATTATT	
#Gre14	TTCACCTAAC	AGCTCCTGGG	CAATGTGATT	GTGATTATT	
#Hemi11	TTCACCTAAC	AGCTCCTGGG	CAATGTGATT	GTGATTATT	
#Jenpen12	TTCACCTAAC	AGCTCCTGGG	CAATGTGATT	GTGATTATT	
#Prew3	TTCACCTAAC	AGCTCCTGGG	CAATGTGATT	GTGATTATT	
#Rhino	TTCACCTAAC	AGCTCCTGGG	CAATGTGATT	GTGATTATT	
#Sh38	TTCACCTAAC	AGCTCCTGGG	CAATGTGATT	GTGATTATT	
#Tapia	TTCACCTAAC	AGCTCCTGGG	CAATGTGATT	GTGATTATT	
#Goat	CTCACCCAAC	AGCTCCTGGG	CAATGTGATT	GTGATTATT	
#Human	TTGCCTAAC	AGCTCCTGGG	TAACTGTATG	GTGATTATT	
#Mouse	TTCCATCAAC	AGCTCCTGGG	TAAATGTGCT	GGTGATTGT	
#Rabbit	TTTACCTAAC	AGCTCCTGGG	AAACGTGCTG	CTGATCGTT	

Fig. 18. Comparison of DNA sequence of  $\epsilon$ -globin gene within Perissodactyla and other mammals. Tapia: *T. terrestris*, Rhino: *C. simum*, Hemi: *E. hemionus* Kulan, Gre14: *E. grevy's*, Ass13: *E. africanu somalicus*, Prw3: *E. przewalskii*, Cheju: Cheju native horse, Japan12: Japan native horse, SH38: Yunnan native horse.

Amino acid alignment

						50
Sh 31	MVHFTAEEKA	AITNANGKVN	VEEAGGEALG	RLLVVYPWTQ	RFFGTFGNLS	
Cheju2	-----	-----	-----	-----	-----	
Japen12	-----	-----	-----	-----	-----	
Prew.3	-----	-----	-----	-----	-----	
Tapir16	-----	-----	-----	-----	-----	
Rhino 3	-----	-----	-----	-----	-----	
Ass13	-----	-----	-----	-----	-----	
Hemi.11	-----	-----	-----	-----	-----	
Grevy14	-----	-----	-----	-----	-----	
Pig	-----S	V--GL-----	---T--Q-V-	-----	---DS---M-	
Goat	-----	---GL-----	-----	-----	---DS---	
Human	-----	-V-SL-S-M-	-----	-----T-	---DS---	
Lemur	-----S	T--LSL-----	-----	-----	---DN---	
Mouse	--N-----T	L--NGL-S---	---V-----	-----	---DS---	
Rabbit	----P---C	I--SKQ--Q--	ID-T-----	-----	---DN---	

						105
Sh 31	SSSAIMGHPK	VKGHGKVKLT	SFGDAVKNMD	NLKAFAKLS	ILHCDKLHVD	PENLR
Cheju2	-----N--	--A-----	-----	-----	-----	-----
Japen12	-----	--A-----N	-----	-----	-----	-----
Prew.3	-----N--	--G-----	-----	-----	-----	-----
Tapial6	-----N--	--G-----	-----	-----	-----	-----
Rhinoc3	-----N--	--G-----	-----	-----	-----	-----
Ass 13	-----N--	--A-----N	-----	-----	-----	-----
Hemi.11	-----N--	F-A-----	-----	-----	-----	-----
Grevy14	-----I--	--A--R--N	-----	-----	-----	-----
Pig	-P-----N--	V-AH-----	A-----	---GT-----	E-----	---F-
Goat	-A-----	V-A-----	---E-I--L-	---G-----	E-----	---F-
Human	-P---L-N--	V-A-----	---I-----	---P-----	E-----	---F-
Lemur	-A---L----	V-AH-----	---E-----	---G-----	E-----	---FK
Mouse	-A-----R	V--H-----	A--ESI--L-	---S-L----	E-----	---FK
Rebbit	-----	V--H-----	---I-----	---G-----	E-----	---FK

Fig. 19. Comparison of amino acid sequence of  $\epsilon$ -globin gene polypeptide between perissodactyla and other mammarians. tapial6: *T. terrestris*, rhino3: *C. simum*, hemi11: *E. hemionus* Kulan, gre14: *E. grevy's*, Ass13: *E. africanu somalicus*, prew3: *E. przewalskii*, cheju2: Cheju native horse, papen12: Japan native horse, Sh31: Yunnan native horse.

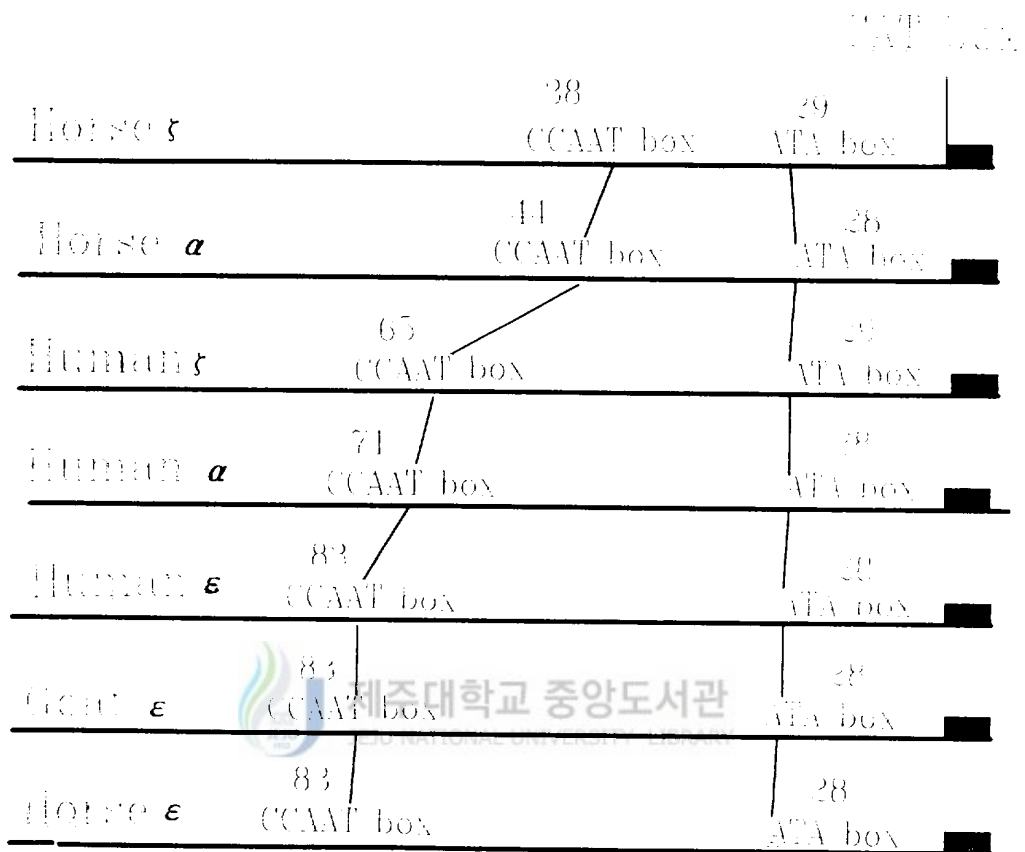


Fig. 20. Comparison of location 5'-noncoding sequence of mammalian  $\epsilon$ -globin gene. An alignment of sequence between the CCAAT box and CAT box of several different mammals globin genes.

Table 4. Homology percentage(%) of amino acid coding nucleotide sequence of partial  $\epsilon$ -globin gene in Perissodactyla and Mammal  $\epsilon$ -globin proteins.

Animal	Perissodactyla amino acids	References
Goat	89 %	Shapiro <i>et al.</i> ,(1983)
Pig	83 %	Sharma <i>et al.</i> ,(1995)
Human	85 %	Baralle <i>et al.</i> ,(1980)
Lemur	85 %	Slighton <i>et al.</i> ,(1987)
Mouse	77 %	Hansen <i>et al.</i> ,(1982)
Rabbit	82 %	Hardison (1983)



Genes	Exon 1 3-end	Intron 1	Exon 2 5'-end---Exon 3'-end	Intron 2	Exon 3 5'-end
Horse $\zeta$	GAG	GTGAGT-----GCCCCGAG	GC-----AAG	GTG-----CAG	CTT
Horse $\alpha$	GAG	GTGAGG-----CTCCCTGCAG	GA-----AAG	GTG-----CAG	CTT
Human $\zeta$	GAG	GTGAGT-----CCCCTCCCAG	GC-----AAG	GTG-----CAG	CTC
Human $\alpha$	GAG	GTGAGG-----CTCCCGCAG	GA-----AAG	GTG-----CAG	CTC
Human $\beta$	CAG	GTTGGT-----CCACCCTTAG	GC-----AGG	GTG-----CAG	CTT
Human $\epsilon$	CAG	GTAAGC-----CATTCATAG	AC-----AAG	GTG-----CAG	CTT
Goat $\epsilon$	CAG	GTAGAA-----CATTCATAG	GC-----AGG	GTG-----CAG	CTC
Horse $\epsilon$	CAG	GTAGGAA-----CGTTCATAG	GC-----AGG	GTG-----CAG	CTC

Fig. 21. An alignment of the sequences surrounding the four intron/exon junction(GT/AG) of eight mammalian globin genes.

기제류는 우제류인 산양과 가장 높은 상동성을 보이는 한편, 설치류인 마우스에서 가장 낮은 상동성을 보였다(Fig. 19, Table 4). 기제류의  $\epsilon$ -globin 유전자의 암호배열 영역에서 아미노산 배열을 분석한 결과 105 개 아미노산 암호 배열을 가지고 있었다. 그리고 기제목내 아미노산 치환은 58번째 아미노산 Asn→His (AAT-CAT), 61번째 아미노산 Val→Phe (GTC-TTC), 63번째 아미노산 Ala→Gly (GCC-GGC), 66 번째 아미노산 Lys→Ars (AAG-AGA), 67번째 아미노산 Thr→Asn (ACC-AAC)로 변화 하였으며, 총 5개의 아미노산이 치환되었다 (Fig. 19). 그 결과 기제목에서의 아미노산 상동성은 최하 96.2 %로서 매우 높은 상동성을 보이고 있다.

#### (8) 염기조성 및 염기치환(Transversion and Transition)

기제류의  $\epsilon$ -globin gene 염기조성은 A(30 ± 1%), T(27 ± 1%), C(17.5 ± 0.5%), G(24 ± 0.5%)로 구성되어 있음을 보여 주었다 (Table 5). 기제류 8종에서의 gap length는 제주마에서 9로 가장 적은 길이를 보인 반면, 몽고야생마(*E. przewalskii*)에서 28로 가장 높았다(Table 6). 염기치환에서는 기제목에서의 Transition(ns)/Transversion(nv)값은 최고 2.5 (Tapirus/*E. Przewalkii*), 최하 0.7(*E. Africanus*/ *E. Grevy*)로 나타났다(Table 6). Transition(ns)+Tranversion(nv)값은 최고 127(*E. przewalskii*/Cheju horse), 최하 9 (Tapia/Rhinoceros)로 염기치환을 보이고 있었다(Table 7). 기제목 8종에서 비교한 transition(ns)/transversion(nv) 비(rate)는 아프리카 당나귀 (*E.africanus*)와 그레비 얼룩말(*E. grevy*)에서 0.727로 가장 낮은 비를 보이는 반면, 테이퍼와 몽고야생마 (Tapirus/*E. przewalskii*)에서 2.50으로 가장 높았다.

Pairwise divergence percentage를 Miyamoto *et al.*,(1987) 공식에 의거하여 분석하였다. 그 결과 최저 2.44% (Rhinoceros/Tapirus)에서 최고 10.49% (Cheju native horse/*E. africanus*)로서 코뿔소(Rhinoceros)와 테이퍼(Tapirus)는 매우 가까운 유연 관계를 가지고 있으나, 馬科에서의 염기치환율은 코뿔소와 테이퍼보다 비교적 높게 일어나고 있음을 알 수 있었다(Table 8).

----- Nucleotide Composition -----

All values in per cent (%) except Totals

	A	T	C	G	Total
tapia16	30.2	27.6	17.7	24.5	1432
rhino3	30.3	27.6	17.8	24.3	1435
ASS13	30.6	27.6	17.6	24.2	1435
cheju26	29.7	26.8	17.9	25.7	1439
gre14	29.7	28.1	17.9	24.2	1433
hem11	30.4	27.3	18.1	24.2	1439
prewa3	30.3	27.2	18.0	24.5	1432
sh38	30.8	27.3	17.5	24.5	1430
	30.3	27.4	17.8	24.5	11476

Table 5. Nucleotide composition(%) of in Perissodactyla  $\epsilon$ -globin gene.  
 tapia16: *T. terrestris*, Rhino3: *C. simum*, Hem11: *E. hemionus Kulan*, Gre14: *E. grevy's*, Ass13: *E. africanu somalicus*, Prewa3: *E. przewalskii*, Cheju26: Cheju native horse, and sh38: Yunnan native horse.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	≥10	Total
tapial6	23	0	0	0	0	0	0	0	1	2	26
rhino3	20	0	1	0	0	0	0	0	1	2	24
ASS13	24	3	0	0	0	0	0	0	1	2	30
cheju26	6	2	0	0	0	0	0	0	0	1	9
gre14	13	2	0	0	0	0	0	0	0	1	16
hem11	16	1	0	0	0	0	0	0	1	2	20
prewa3	27	0	0	0	0	0	1	0	0	0	28
sh38	16	2	4	0	0	0	0	0	1	2	25
	145	10	5	0	0	0	1	0	5	12	178

Table 6. Alignment gap frequencies in Perissodactyla  $\epsilon$ -globin gene. Gap refer to both insertion and deletion events. tapial6; *T. terrestris*, rhino3; *C. simum*, hem11; *E. hemionus* Kulan, gre14; *E. grevy's*, Ass13; *E. africanu somalicus*, Prewa3; *E. przewalskii*, Cheju; Cheju native horse, sh38;Yunnan native horse.

	ns/nv	Transitions						Transversions				Identical pairs				ns+nv	Total
		AG	TC	AT	AC	TG	CG	AA	TT	CC	GG						
tapia16 & rhino3	1.250	4	1	1	1	0	2	422	388	249	340	9	1408				
tapia16 & ASS13	1.333	11	5	2	6	2	2	414	382	240	327	28	1391				
tapia16 & cheju26	1.018	35	23	15	11	17	14	388	355	223	317	115	1398				
tapia16 & gre14	1.143	9	7	7	5	2	0	390	373	232	321	30	1346				
tapia16 & hem11	1.208	13	16	5	9	8	2	410	369	235	325	53	1392				
tapia16 & prewa3	2.500	5	5	1	3	0	0	423	385	244	340	14	1406				
tapia16 & sh38	0.909	4	6	4	1	5	1	424	380	241	334	21	1400				
rhino3 & ASS13	1.600	10	6	2	4	2	2	416	379	241	331	26	1393				
rhino3 & cheju26	1.019	33	22	14	12	15	13	387	355	223	320	109	1394				
rhino3 & gre14	0.929	6	7	5	5	2	2	393	371	231	322	27	1344				
rhino3 & hem11	1.474	13	15	2	8	6	3	412	370	234	327	47	1390				
rhino3 & prewa3	1.111	5	5	1	5	1	2	425	388	245	342	19	1419				
rhino3 & sh38	2.250	11	7	2	1	4	1	426	380	241	338	26	1411				
ASS13 & cheju26	1.109	38	23	12	14	17	12	384	353	219	311	116	1383				
ASS13 & gre14	0.727	10	6	6	8	4	4	387	366	227	312	38	1330				
ASS13 & hem11	1.138	19	14	6	12	7	4	402	365	228	320	62	1377				
ASS13 & prewa3	1.500	11	10	2	8	2	2	414	378	235	331	35	1393				
ASS13 & sh38	0.941	10	6	4	6	5	2	416	375	237	330	33	1391				
cheju26 & gre14	0.901	35	29	22	19	18	12	371	344	216	304	135	1370				
cheju26 & hem11	1.097	37	31	15	14	20	13	382	343	216	311	130	1382				
cheju26 & prewa3	1.016	36	28	15	18	16	14	392	352	220	322	127	1413				
cheju26 & sh38	1.077	34	22	18	7	16	11	389	352	222	320	108	1391				
gre14 & hem11	1.034	14	16	7	12	8	2	383	358	223	308	59	1331				
gre14 & prewa3	0.938	5	10	6	8	2	0	404	376	235	330	31	1376				
gre14 & sh38	0.900	7	11	7	6	6	1	395	366	228	318	38	1345				
hem11 & prewa3	1.476	15	16	4	10	5	2	414	368	232	328	52	1394				
hem11 & sh38	1.381	15	14	3	8	8	2	415	368	232	327	50	1392				
prewa3 & sh38	1.538	8	12	4	3	4	2	426	376	237	341	33	1413				

Table 7. Pairwise Comparison of the 1.475 Kb  $\epsilon$ -globin gene sequences for Perissodactyla. The following abbreviations regard base substitutions are used: Bp, base positions under composition; ns: transitions, nv: transversions, and ns/nv: ratio of transition and transversion, tapia16: *T. terrestis*, rhino3: *C. simum*, hem11: *E. hemionus* Kulan, gre14: *E. grevy's*, Ass13: *E. africanu somalicus*, Prewa3: *E. przewalskii*, Cheju26: Cheju native horse, and Sh38: Yunnan native horse.

	Tap	Rhin.	Ass	Cheju	Grab	Hemi	Pre
Tap							
Rhin	2.44						
Ass	3.80	3.51					
Cheju	10.02	9.50	10.49				
Gravy	4.11	3.75	5.05	10.38			
Hemi	5.59	5.04	6.78	9.91	5.55		
Prewa	2.79	2.97	4.57	9.58	3.35	5.06	
Sh	3.30	3.48	4.66	8.26	3.94	4.94	4.24

Table 8. Pairwise percentages of divergences are calculated by the equation:  $[(ns+nv+gaps)/(pb+gap)] \times 100\%$  (Miyamoto et al., 1987). The following abbreviations regarding base substitution are used: PB: base positions under comparison, ns: transition, and nv: transversion. Gaps refer to both insertion and deletion events.

### (9) 계통수 분석에 의한 계통유연관계

기제목  $\epsilon$ -globin gene 염기서열을 결정 한 후 Cluster V program을 이용하여 Multiple sequence alignment를 실시한 후에 NJ-tree, UPGMA, PAUP pasimony tree method(Ver.3.1)를 사용하여 계통수를 작성하였다. Computer packages MEGA (Kumar et al. 1993)와 PAUP program (Swofford, 1993)를 이용하여 실시하였다. 그리고 GGC(genetic computer group) package program에 있는 PILEUP program을 사용하여 tree를 구성 하였다.

UPGMA tree 결과, 테이퍼(*T. terrestris*)와 흰 코뿔소(*C. simum*)가 거리지수 0.003에서 분지되어 가장 가까운 유연관계를 보이며, 馬科는 이로부터 sister group으로 나누어져 점차적으로 분지되는 경향을 보였다. 그리고 제주 재래마는 아시아 들당나귀(*E. hemionus*)와 거리지수 0.009으로 분지되었다(Fig. 22).

N-J tree (Neighbor-Joining)에서는 역시 흰코뿔소(*C. simum*)와 테이퍼(*T. terrestris*)가 가장 가까운 유연관계를 보이며, 그리고 馬의 조상으로 보이는 몽고 야생마(*E. przewalskii*)는 이들과 가까운 sister group를 형성하고 있었다. 그리고 100 bootstrap에서 63 %이상의 높은 majority rule consensus tree를 보이고 있다(Fig. 23).

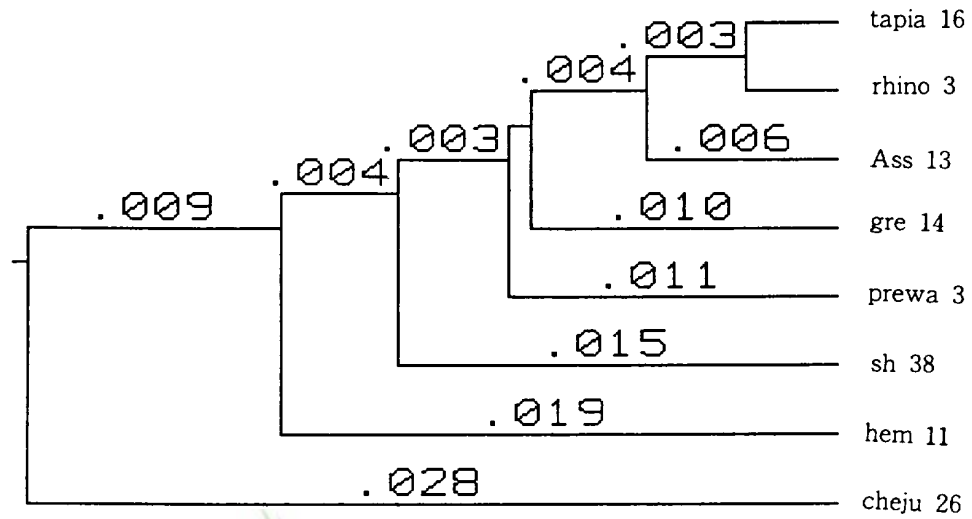
PAUP(ver 3.1)에 의한 parsimony tree구성에서의 계통유연관계는 제주 재래마와 아시아 들당나귀(*E. hemionus*), 아프리카 당나귀(*E. africanus*)와 그레비 얼룩말 (*E. grevy*), 흰코뿔소(*C. simum*)와 아메리카 테이퍼(*T. terrestris*)로서 총 3 group으로 분지되는 양상을 보였다 (Fig. 24). 그리고 아시아 들당나귀(*E. hemionus*)는 제주마 sister group으로 보이며, 몽고 야생마(*E. przewalskii*)는 테이퍼 sister group으로 나누어짐을 볼 수 있다(Fig. 24).

UPGMA에 의한 포유동물에서 기제목의 유연관계 분석에서는 奇蹄目は 偶蹄目の sister group으로 나누어지고 있었다(Fig. 25). Kimura-two parameter 방법(Kimura, 1980)의거한 N-J tree구성 결과는 아프리카 당나귀(*E. africanus*)와 그레비 얼룩말 (*E. grevy*) group, 중국 유남성 재래마(*E. caballus*)와 아메리카 테이퍼(*T. terrestris*) group, 그리고 제주 재래마 (*E. caballus*), 몽고야생마(*E. przewalskii*), 흰코뿔소(*C.*

*simum*) group으로 분지되었다. 그리고 아시아 들당나귀(*E. hemionus*)와 일본 재래마(*E. caballus*)는 또다른 group을 형성하고 있었다.

기제류는 우제류와 sister group을 형성한 결과를 보이고 있다(Fig. 26). 그리고 100 bootstrap에서 62 %이상의 높은 majority rule consensus tree를 보이고 있다.

Maximum parsimony tree에서는 총 4종류의 tree가 분석되었으며, 기제목(perissodactyla)은 우제목(Artiodactyla)과 sister group을 형성하고 있다. 기제목에서는 흰코뿔소(*C. simum*)와 아메리카 테이퍼(*T. terrestris*)가 가장 가까운 유연관계를 보이고 있다. 그리고 그레비 얼룩말(*E. grevy*)과 아프리카 들당나귀(*E. africanus*), 일본재래마(*E. caballus*)와 아시아 들당나귀 (*E. hemionus*)가 각각의 하나의 branch을 형성하고 있었다. 그리고 몽고야생마(*E. przewalskii*)는 코뿔소(Rhinoceros) group으로부터 분지 되었다(Fig. 27). Pileup tree 구성에서는 흰코뿔소(*C. simum*)와 몽고야생마(*E. przewalskii*) group, 아메리카테이퍼(*T. terrestris*)와 아프리카 당나귀(*E. africanus*) group으로 나누어 지고 있으며, 제주 재래마 (*E. caballus*)는 馬科에서도 제일 분화된 group으로 나누어지고 있다(Fig. 28). 이상의 결과, 기제목에서의 유연관계는 흰코뿔소(*C. simum*)와 아메리카 테이퍼(*T. terrestris*) 가장 가까운 group를 형성하는 결과를 보이고 있다. 그러나 아시아 들당나귀(*E. hemionus*)는 아프리카 당나귀(*E. africanus*)보다 가축마(*E. caballus*)인 일본재래마, 유남성 재래마, 제주재래마와 가까운 유연관계를 보이고 있다. 그리고 가축마(*E. caballus*)의 조상이라고 보고 되어있는 몽고 야생마(*E. przewalskii*)는 馬科(Equidae)보다는 코뿔소科(Rhinocerotidae)와 가까운 유연관계를 보이고 있다.




 제주대학교 중앙도서관  
 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 22. UPGMA tree based on the Perissodactyla distance matrices tapia16: *T. terrestis*, rhino3: *C. simum*, hem11: *E. hemionus* Kulan, gre14: *E. grevy's*, Ass13: *E. africanu somalicus*, prewa3: *E. przewalskii*, cheju26: Cheju native horse, sh38: Yunnan native horse.

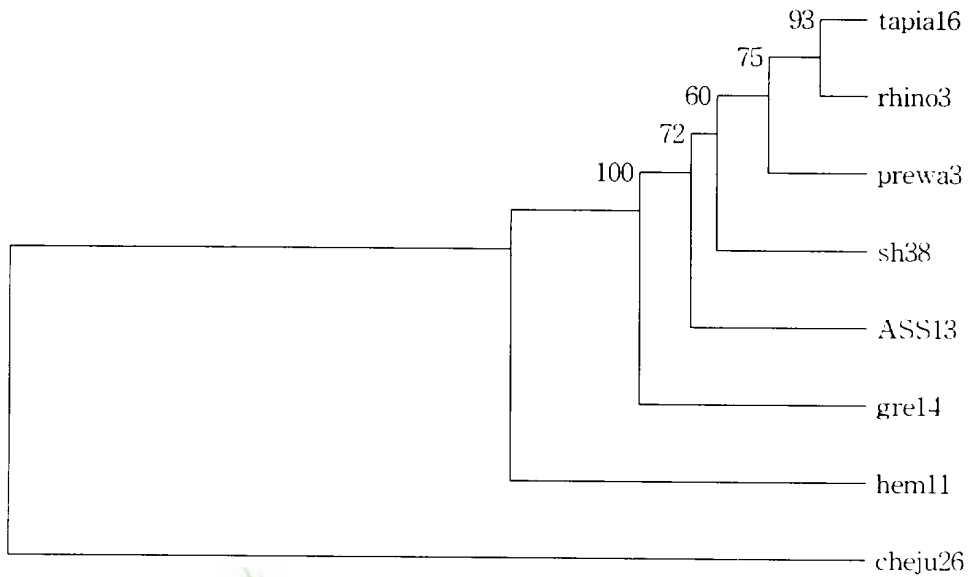


Fig. 23. Neighbor-joining tree based on the two parameter method of Kimura(1980) distance matrix. The numbers were percentages of 100 bootstrap replicates in which group occurred. tapia16; *T. terrestis*, rhino3; *C. simum*, hem11; *E. hemionus* Kulan, gre14; *E. grevy's*, Ass13; *E. africanu somalicus*, prewa3; *E. przewalskii*, Cheju26; Cheju native horse, sh38;Yunnan native horse.



Fig. 24. Maximum-parsimony tree based on the aligned  $\epsilon$ -globin gene sequences from Perissodactyla. Parsimony tree corrected using PAUP version 3.1. Cheju26: Cheju native horse, sh38: Yunnan native horse, Hem11: *E. hemionus* Kulan, Ass13: *E. africanus somalicus*, Prewa3: *E. przewalskii*, Gre14: *E. grevy's*, tapia16: *T. terrestis*, Rhino3: *C. simum*.



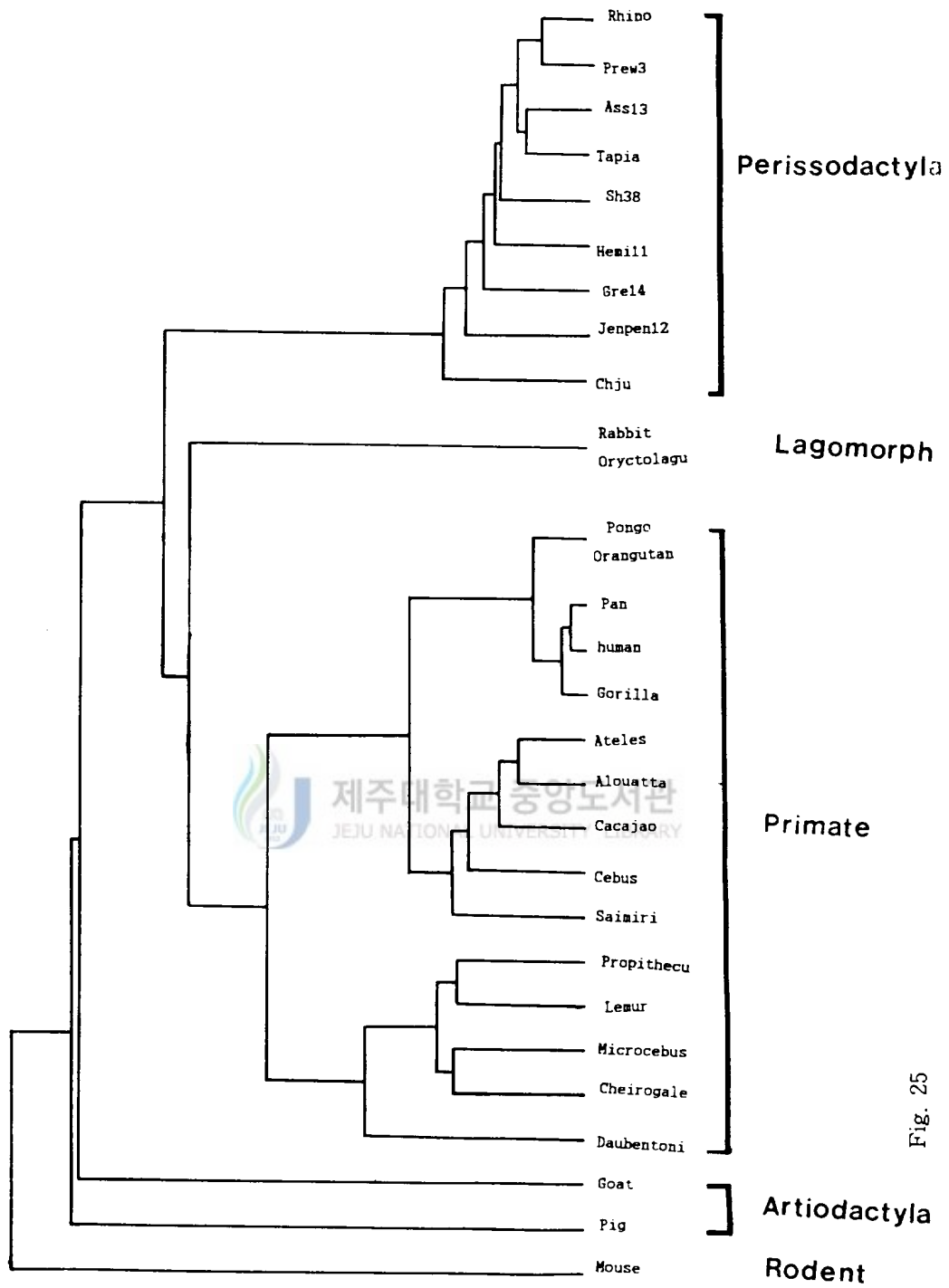


Fig. 25

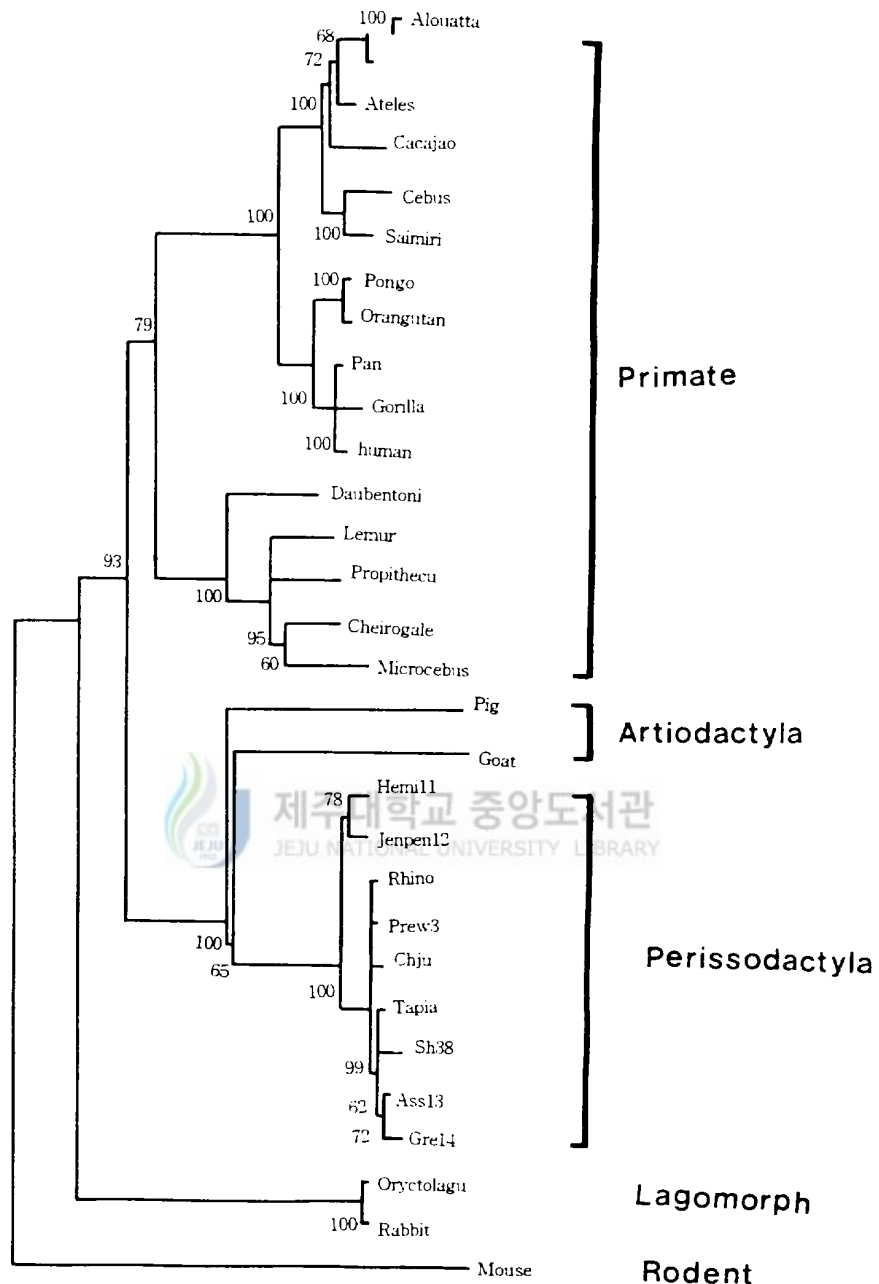
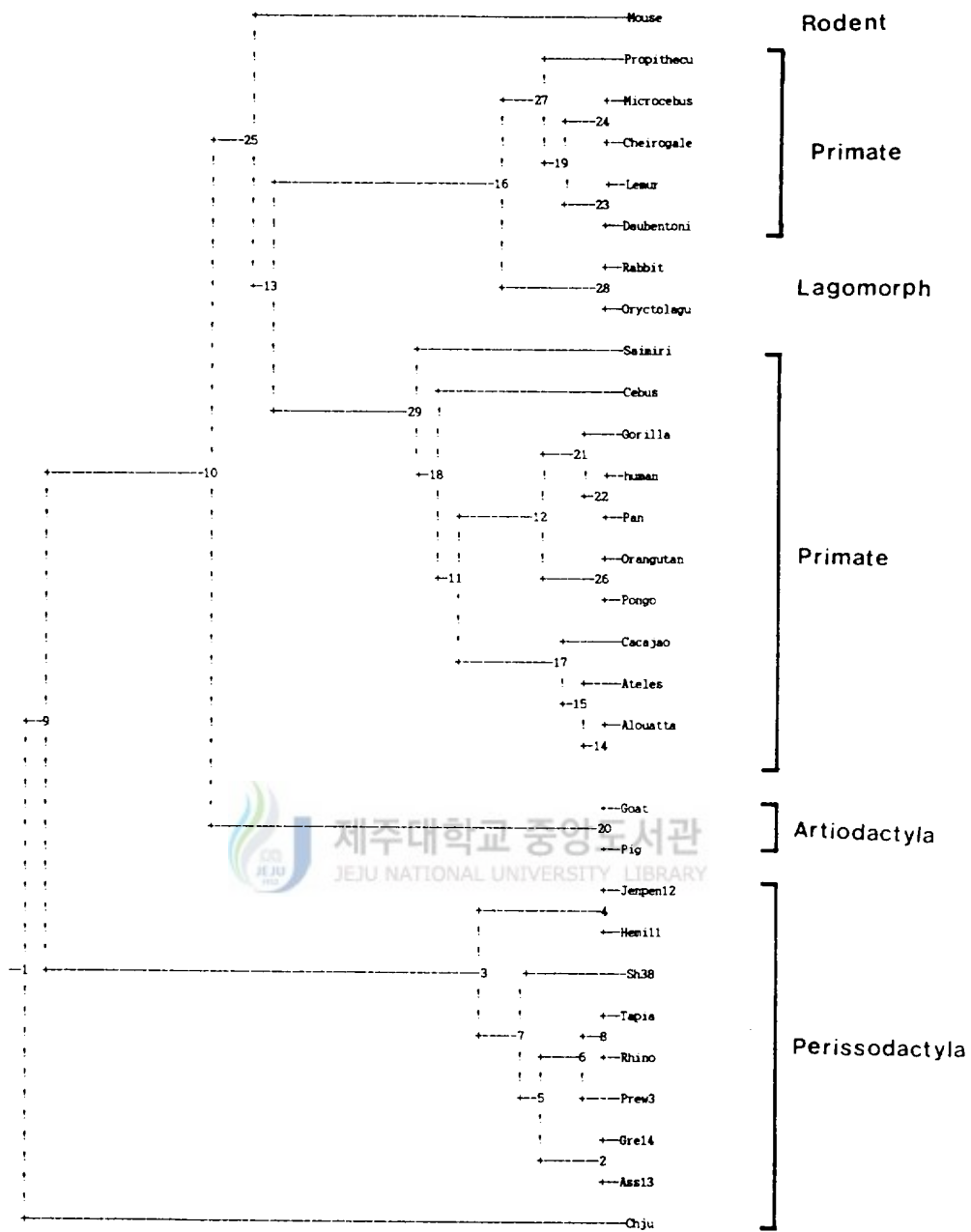


Fig. 26.



remember: this is an unrooted tree!

requires a total of 5917 000

Fig. 27.

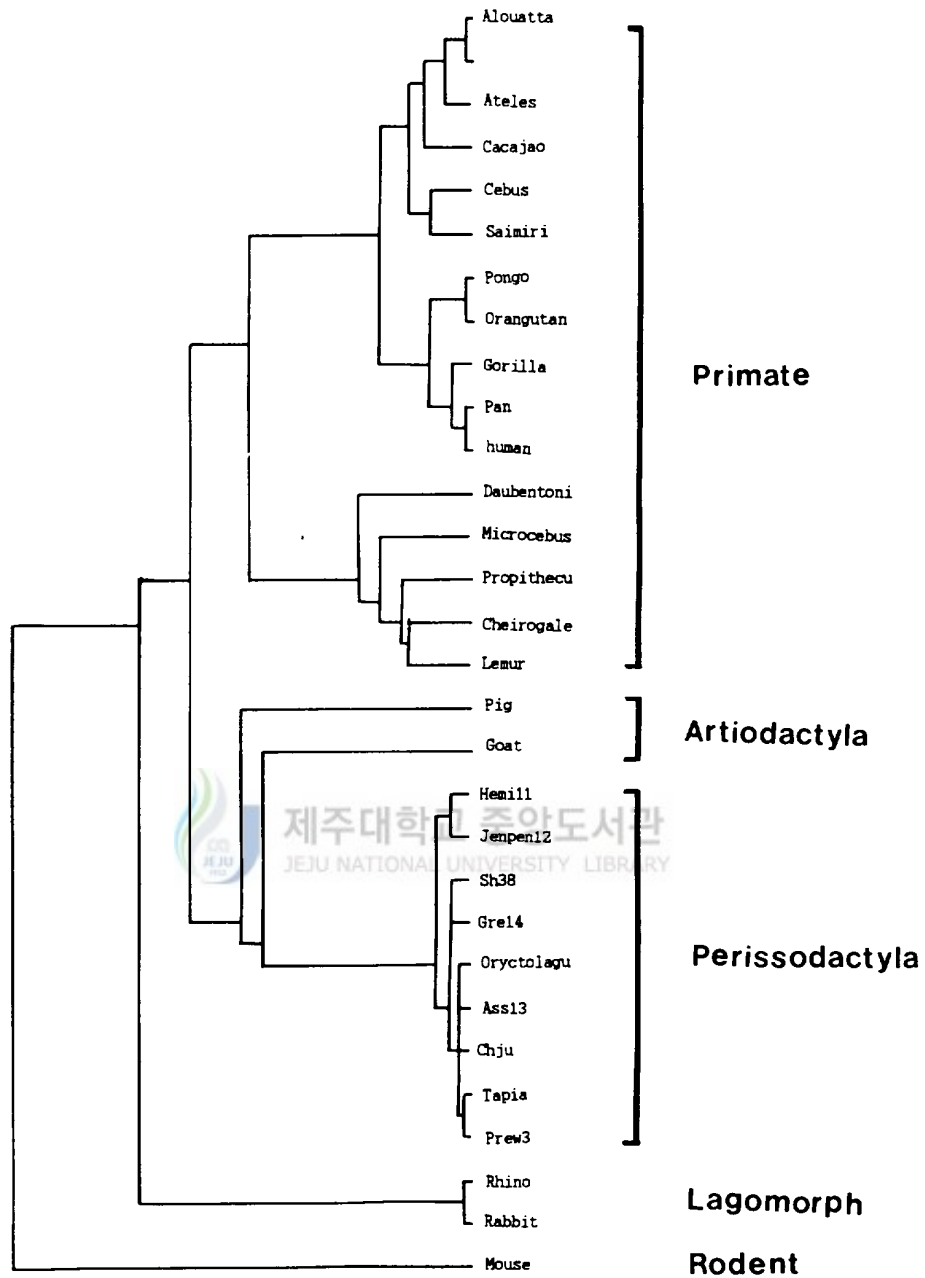


Fig. 28.

#### IV. 고찰

포유류에서의 globin 유전자는 mtDNA genome과 더불어 인류의 분자진화 및 동물의 계통유연관계 분석, 종의 분화 연구 등에 이용되어 왔다(Avise *et al.*, 1987; Beneditis *et al.*, 1987; Brown, 1983; Denaro *et al.*, 1981; Higuchi *et al.*, 1984; Johnson *et al.*, 1983; Moritz *et al.*, 1987; Duorin, 1980). Globin gene의 출현은 포유동물의 출현 훨씬 이전인 약 10억년 전(1,000 Mya)으로 보고 있으며,  $\alpha$ ,  $\beta$ -globin gene 출현은 5억년 전(500 Mya)이며, 그리고  $\epsilon$ -globin gene 탄생은 약 2억년전(200 Mya)으로 보고 있다(Efstratiadis *et al.*, 1980). 현재까지 연구된 사람(Baralle *et al.*, 1980; Fritsch *et al.*, 1980; Pascale *et al.*, 1992), 토끼(Lacey *et al.*, 1979; Hardson, 1984), 마우스(Edgeel *et al.*, 1983; Hill *et al.*, 1984; Hardison *et al.*, 1984), 산양(Shapiro *et al.*, 1983; Townes *et al.*, 1984), 영장류(Barrie *et al.*, 1981; Jeffrey *et al.*, 1982; Harris *et al.*, 1984; Bailey *et al.*, 1992; Slightom *et al.*, 1988; Tagle *et al.*, 1988; Miyamoto *et al.*, 1987; Koop *et al.*, 1986; Koop *et al.*, 1989; Koop *et al.*, 1985; Fitch *et al.*, 1988; Goodman *et al.*, 1984; Hayasaka *et al.*, 1992; Porter *et al.*, 1995), 박쥐류(Bailey *et al.*, 1992)에서 유전자 염기배열 분석은 현생 포유류의 계통 진화학적 연구에 이용되어 왔다.

포유동물이 분산되기 시작한 시기는 약 2억년에서 8천만년전 사이(200~80 Mya)로 추정하고 있다. 따라서 이 시기에는 포유류가 동시 다발적으로 종이 분화한 것으로 추정되나 많은 종들이 사라진 것으로 보고 있다(Owen, 1948; Savage and Russell, 1993). 이와 같이  $\epsilon$ -globin 유전자의 분지되는 시기와 포유동물이 왕성하게 분지되는 시기는 여러 면에서 서로 일치하는 부분이 많다. 따라서 tandem duplication에 의해 생성된  $\epsilon$ -globin 유전자는 동일한 시기에 출현한 포유동물에서의 계통유연관계 및 진화학적 연구에 매우 유용하다고 할 수 있다.

Globin gene구조의 전형적인 특징은 조절부위의 CCAAT box, ATA box 그리고 유전자 암호부위인 엑손 1, 2, 3과 비정보 영역인 인트론 1, 2가 있으며 최종적으로 3'-end에 poly-A signal site가 있다(Myers *et al.*, 1986; Lawn *et al.*, 1980).  $\epsilon$ -globin 유전자는  $\beta$ -globin gene cluster중에서 타 유전자에 비하여 유전자 변화의 속도(염기

치환, 전환, 부가, 삭제)가 매우 낮다고 알려져 있다(Shapiro *et al.*, 1983; Bailey *et al.*, 1992). 즉  $\beta$ -globin cluster에서  $\epsilon$ -globin gene의 noncoding영역 sequence divergence를 비교하여 보면, 32.8%(사람/갈라고원숭이), 53.7%(사람/토끼), 55.1%(갈라고원숭이/토끼)로서,  $\beta$ -globin gene sequence divergencer값에서 보이는 48.8%(사람/갈라고원숭이), 61.6%(사람/토끼), 68.4%(갈라고원숭이/토끼)보다는 약간 낮은 값을 보인다. Shapiro *et al.*, (1983)은 우제목의 한 종인 산양(goat)과 기타 포유류에서  $\epsilon$ -globin 유전자 coding region의 상동성을 비교 분석하여 최고 90%~85%의 매우 높았다고 보고 하였다. 따라서 non-coding영역은 coding sequence보다는 상대적으로 높은 염기 치환률을 보이고 있어 계통진화 연구에 용이하게 이용되어 왔다(Bailey *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1992).

분자생물학적 접근에 의한 연구와 화석학적, 고고학적연구를 접목시키려는 시도들이 최근에 영장류에서 진행되고 있다(Tagle *et al.*, 1992). 기제목에 대한 생물학적 연구는 馬科를 중심으로 한 형태학적(Bennet, 1980; Eisenmanm, 1980; Harris and Perter, 1980; Simpson, 1951; MacFaden and Hulbert, 1988). 고고학적 연구들이 주로 진행되었다. 이러한 연구를 통해 馬의 진화 경로와 이동경로를 분석하므로써 포유동물의 진화과정을 연구하는 모델로 사용로 이용되었다(MacFadden and Hulbert, 1988; Lindsay *et al.*, 1980) (Fig. 1, 2). 현재 馬科에는 1屬에 7종의 야생마가 존재하며, 대부분 중앙아시아와 아프리카에 분포한다. 그리고 가축화된 1종 (*E. caballus*)은 전 세계에 분포하며 운송과 애완, 그리고 경마에 이용된다. 대형초식 동물에 속하는 테이퍼과와 코뿔소과는 현생 포유동물 가운데 매우 원시적인 형태를 보유하고 있는 동물로 알려져 있을 뿐만 아니라, 매우 희귀한 동물로 오늘날에는 인위적 간섭과 수요로 種數(species number)가 급감하여 멸종 위기에 놓여 있다. 따라서 이런 유전자의 보호 및 육성을 위해서는 기초적인 연구는 물론 유전자 분석이 병행되는 연구가 절실히 요구된다. 본 연구에서는 제주도 재래마를 중심으로 馬科, 코뿔소과, 테이퍼과에서 PCR 기법을 이용하여  $\epsilon$ -globin 유전자 분리하여 염기서열을 분석하였다. 비록, 완전한  $\epsilon$ -globin 유전자 sequence 분석에는 실패했지만, CCAAT-box에서 3 엑손(exon)의 상류부위(upstream site)까지 1.475 kb에 해당하는 유전자를 분석하여 기제목의 계통 및 말과에서의 계통유연관계를 분석 하였다.

기제류의  $\epsilon$ -globin 유전자의 구조는 Cap(+1)를 기점으로하여 CCAAT box가 -83 site, ATA-box가 -28 site에 위치하고 있었다. 본 결과는 산양(goat)과 사람(human)의  $\epsilon$ -globin gene 구조와 동일한 구조를 가지고 있음을 보여 주었다. 엑손 1(exon 1)은 31개 아미노산을 coding 할 수 있는 92 nucleotide로 구성되어 있다. 말의 엑손1의 염기서열 상동성을 비교해 보면 산양과는 92%, 사람과는 86% 이다. 아미노산 상동성은 산양과는 96%, 사람과는 84%로서 산양과 더 높은 유연관계가 있음을 알 수 있다. 奇蹄目 3科내에서  $\epsilon$ -globin 유전자의 5-flanking region과 엑손 1 상동성은 매우 잘 보존되어 있어서 염기의 차이는 전혀 발견되지 않았다. 인트론 1(intron 1)은 128 bp 염기로 구성되어 있으며, 이는 산양의 122 bp보다 약 6 bp가 부가된 것이었다. 인트론 2는 845 bp로 구성되어 있었으며, 산양에서 처럼 insert element는 발견되지 않았다. 포유류  $\beta$ -globin 유전자군을 형성하는 유전자에서의 인트론 1과 2의 구조 및 길이는 다소 차이를 가지고 있다(Table 9). 특히 인트론 2의 염기 길이는 종에 따라 현격한 차이를 보이고 있는데, 산양의  $\epsilon$ -globin 유전자인 경우 1038 bp, 돼지는 1445 bp로서 현재까지 보고된 다른 동물종 유전자에 비해서 크다(Table 9). 그러나 마우스  $\gamma 2$ -globin gene(embryonic gene)의 인트론 2 염기 길이는 699 bp로서 현재까지 보고된 他種에 비하여 매우 짧은 염기구조를 보이고 있다. 이런 염기길이의 차이는 유전자 분화과정에서 전이인자(transposable element)의 삽입에 기인된 것으로 보고 있다. 즉 산양  $\epsilon$ -globin의 인트론 2에 있는 insert element의 염기길이는 226 bp로서, 그 구조의 특징은 direct repeat sequence와 inverted repeat가 각각 5'-flanking region과 insert element말단에 놓여있다. 그리고 출발개시부에 TG염기와 종결부위에 CA염기 구조는 진핵생물의 transposable elements 같은 구조를 하고 있다(Shapiro *et al.*, 1983). 그러나 馬蹄目的 근연目인 奇蹄目에서는 insert element가 발견되지 않았다.

한편, 기제류의  $\epsilon$ -globin 유전자 염기치환을 보면, 먼저 transition/transversion (ns/nv)값은 최저 0.72에서 최고 2.5 사이에 분포하고 있었다(Table 7). 그러나 이들 평균값은  $1.2 \pm 0.01$  로서 transition이 약간 높게 일어나고 있음을 볼 수 있다. 기제류 염기결정을 기초로하여 Miyamoto *et al.*,(1987)의 공식에 의거하여 산출된 pairwise divergence percentage 값도 2.4%(Rhinoceros/Tapia)에서 최고 10.49%(Cheju native

Table 9. Size of intervening sequence(IVS) in Mammalian  $\beta$ -like globin gene.

Gene		size(bp)	
		IVS 1	IVS2
Human	$\beta$	130	850
	$\delta$	128	889
	$\gamma^A$	122	876
	$\gamma^G$	122	906
	$\epsilon$	122	850
Rabbit	$\beta$	126	573
	$\epsilon$	120	801
Mouse	$\beta$	116	653
	$\gamma_2$	89	699
Lumur	$\epsilon$	121	840
Goat	$\epsilon$	122	1038
Pig	$\epsilon$	122	1445
Horse	$\epsilon$	128	845



horse/*E. africanus*)로서 Tagle 등(1988)이 영장류, 산양, 토끼의 non-coding region에서 보고한 최저 3.8%(사람/오랑우탄)에서 최고 50.0 %(토끼/산양), 그리고 coding region에서 보고한 최저 0.6%(사람/오랑우탄)에서 최고 8.9 %(토끼/산양)에 비교하면 비교적 낮은 값이다. 따라서 이 결과는 인트론과 엑손으로 분할하여 환산된 pairwise divergence percentage(%)로서 synonymous와 nonsynonymous 염기치환에 근거한 각각의 유전자 사이에는 현격한 차이를 보였다(Nei and Gojobori, 1986). Miyamoto 등 (1987)은 영장류에 속하는 아프리카 유인원(African apes)의  $\beta$ -globin 유전자에서 보고한 1.6% (사람/침팬치)에서 3.8% (침팬치/오랑우탄)에 비교하면 매우 높은 값을 보이고 있다.

Wu와 Li(1985)는 사람과 설치류에서 유전자 염기치환율(base substitution rate) 비교하여, 사람은 설치류보다 약 2배 이상 낮은 유전자 치환율을 보인다고 보고 하였다. 영장류에 속하는 사람/침팬치의 치환율  $1.3 \times 10^{-9}$  bp substitution/year, 사람/old world monkey 치환율은  $2.2 \times 10^{-9}$  bp substitution/year, 그리고 쥐/마우스 유전자 치환율은  $7.9 \times 10^{-9}$  bp substitution/year 정도 라고 보고하였다. Li와 Tanimura (1987)의 보고에 의하면 설치류는 영장류의 4~10배, 우제류의 2~4배 정도 높은 유전자 치환율(synonymous nucleotide substitution rate, silent code)를 나타내었다(Nei and Gojobori, 1986). 따라서 종(species)의 1세대번식(one generation time) 기간이 짧을수록 유전자 염기치환율은 높음을 단적으로 보여주는 결과라 사료된다. 이 결과는 Flint 등(1990)이 기체목의  $\alpha$ -globin gene RFLP 분석에 의해 얻은 염기 치환율  $2.1 \times 10^{-9}$  bp substitution/year와 비교하여 보면, 기체목의 유전자 치환율은 사람과 설치류의 중간정도임을 보여준다. 기체목의 세대번식은 포유류 중에서 비교적으로 긴 편에 속한다. 馬科의 번식에서 임신 기간은 약 11개월, 그리고 코뿔소의 임신 기간은 약 16개월이며, 그리고 약 5세가 되어야 번식능력을 갖게되며 7-8세가 되어야 초산(初産)을 하게 된다. 따라서 이런 세대번식 기간(generation time)은 DNA의 염기치환 속도와 상당히 밀접한 관계를 가지는 것으로 볼 수 있다. 한편, George와 Ryder (1986)는 핵DNA의 정보영역(nuclear protein-coding gene)에서의 염기치환율에 비하여 10배정도 높은 기체목의 馬科 mitochondrial genome의 RFLP비교 분석에서  $0.9 \sim 1.8 \times 10^{-8}$  substitution site/year의 염기치환율이 발생된다고 보고하였다. 그리고 馬科

의 D-loop sequence 분석에서  $2\sim 4 \times 10^{-8}$  substitution site/year 정도의 유전자 치환율이 발생한다고 보고되었다(Ishida et al., 1995). 이런 결과는 포유류 mtDNA의 평균 염기치환율  $5.7 \times 10^{-8}$  bp/year에 비하면 약 2 배정도 낮은 염기치환율이다. 따라서 기체류는 핵 유전자(nucleous gene)와 핵외유전양식(mitochondrial DNA)을 가지는 염기치환율은 현재까지 보고된 포유류 가운데 비교적 염기치환 속도가 낮은 수준으로 일어나고 있음을 알 수 있다. 위 결과는 Kohne (1970)의 유전자 치환은 generation-time effect로 설명하는 가설과 일치하는 것으로 사료된다. 그리고 본 연구결과 코뿔소와 테이퍼의 상동성 및 유연관계가 매우 높은 관계를 보이는 결과와 馬科의 염기치환은 이를 반영하는 것으로 사료된다. 따라서 보다 다양한 genome수준에서의 연구가 수반되어야만 증명이 될 것으로 사료되며, 현재 연구가 수행되지 않은 인도 코뿔소(*Rhinoceros unicornis*), 수마트라 코뿔소(*Dicerorhinus sumatrensis*), 검은 코뿔소(*Diceros bicornis*) 그리고 테이퍼과의 말레이 테이퍼(*Tapirus indicus*), 베어드 테이퍼(*Tapirus bairdi*), 산테이퍼(*Tapirus pinchaque*) 등에서의 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다. 그리고 기체류의 이웃 종인 원시 유제류에 속하는 長鼻目的 코끼리과(Elephantidae)에서의 연구는 위 가설을 증명할 수 있는 자료를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

계통유연관계 연구는 형태학적 연구와 더불어 생화학적 방법이 도입되면서부터 분산시기(divergence times), 진화율(evolution rate)을 구명하는 새로운 접근 방식이 사람과 대형 유인원(great ape)(Miyamoto et al., 1987), 우제목(Kraus and Miyamoto, 1991)의 mtDNA sequence 분석에서 시도되었다. 그리고  $\beta$ -globin 유전자 분석을 이용한 계통유연관계는 영장류에 속하는 아프리카 Hominoid科에서 molecular clock을 계산한 결과, 아프리카 유인원(Hominoid科)의 긴팔원숭이(gibbon)와는 약 17~19 Mya에 분리되었으며, 다른 Hominoid인 사람과 침팬치와는 5~7 Mya에 분리된 것으로 추정하였다(Bailey et al., 1992).

馬科에서의 계통유연관계는 형태학적 연구(Bennett, 1980; Eisenmann, 1980; Harris and Porter, 1980; MacFadden and Hulbert, 1988), 염색체와 단백질 연구(Ryder et al., 1978, 1979; Kaminski, 1979)를 기초로 분석하여 왔으나 학자 및 연구 방법에 따라 다소 차이가 있었다. George와 Ryder (1986)는 馬科의 mtDNA 분석을

통한 계통유연관계 보고에서 Zebra group, Ass group 그리고 가축마와 몽고 야생마 (*E. przewaskii*)를 하나의 group으로 나누어진다고 하였다. 그리고 평균 유전자 치환율은 2% / Mya 정도라고 보고 하였으며, 현대 Equus의 조상은 3.9 Mya에 분산되었다고 추정 하였다. 이 결과는 본 연구에서 얻은 maximum parsimony tree 결과와 유사함으로서 가축마(*E. caballus*)인 제주 재래마와 中國 幼南省 재래마 group, 아프리카 당나귀(*E. africanus*)와 Greby 얼룩마(*E. grevy*) group, 남아메리카 테이퍼(*T. terrestris*)와 흰코뿔소(*C. simum*) group으로 나누어지는 유연관계를 보이고 있다 (Fig. 24). 그러나 본 연구에서 아시아 들당나귀가 가축마의 sister group으로 나누어지는 결과는 George and Ryder(1986)가 mtDNA 분석에서 아프리카 당나귀(*E. africanus*)와 아시아 들당나귀(*E. hemionus*)가 한 group으로 분지된 결과와는 다소 차이가 있다. 이와는 달리 UPGMA tree구성에서는 馬科의 유연관계는 아프리카 당나귀(*E. Africanus*), Greby 얼룩말(*E. Greby*), 몽고야생마(*E. przewalskii*), 中國 幼南省 재래마(*E. caballus*: 소형마), 아시아 들당나귀(*E. hemionus*), 그리고 제주 재래마 (*E. caballus*: 소형마)로 분지되는 양상을 보였다(Fig. 24).

中國 西南部에 분포하는 幼南省 재래마(*E. caballus*)는 몽고야생마(*E. przewalskii*)와 매우 밀접한 유연관계를 보이는 한편, 제주 재래마(*E. caballs*)는 몽고 야생마(*E. przewalskii*)와 현격한 차이가 있음을 UPGMA tree와 N-J tree에서 볼 수 있었다 (Fig 22, 23). 이와는 달리 제주 재래마와 중국유남성 재래마가 하나의 group으로 형성된 결과는 제주 재래마가 남방계통의 소형마(southern-west pony) 전파설과 일치하는 결과이다(Fig. 24). 그리고 馬科의 치아, 두 개골의 형태학적 특징 및 염색체 다형현상을 기초로 한 계통유연관계 분석은 mtDNA RFLP분석에 의한 계통유연관계 분석과는 다소 차이가 있었다고 보고하였다(George and Ryder, 1986; Paabos et al., 1989).

아시아에는 다양한 재래마(*E. caballus*)와 몽고야생마(*E. przewaskii*), 그리고 들당나귀(wild ass)가 분포하고 있다. 특히, 아시아 당나귀(Asia wild ass)는 Persian wild Ass(*E. hemionus onager*), Transcapien wild Ass (*E. hemionus kulan*), Indian wild Ass (*E. hemionus Khur*), Mogolian dziggetia (*E. hemionus hemionus* and *E. hemionus luteus*), Tibetang Kiang (*E. King*)으로서 형성하고 있으며, *E. hemionus*

*onager*에는 두 아종(*E. h. onager* 2n=56와 *E.h. kulan*, 2n=54)으로 구분하고 있다. 이들 두 아종의 분지된 시기는 약 500,000년전으로 추정하고 있다. Ryder와 Chemnick (1990)는 이들 두 종에서의 mtDNA RFLP연구와 염색체 다형에서 0.1% nucleotide sequence divergence와 Robertsonian rearrangement을 보고하였다. Robertsonian rearrangement현상은 가축화된 말(*E. caballus*, 2n=64)의 조상으로 추측되는 몽고야생마(*E. przewaskii*, 2n=62), 그리고 Grant zebra (2n=44)와 *E. africanus somaliensis* (2n=46)에서도 동일한 현상이 일어나고 있음을 보고하였다. 中國 幼南省 재래마종은 동아시아 집단 형성에 영향을 미친 馬種으로서 그 특징은 체고가 비교적 작은 소형마 그룹에 분류되고 있다. 그리고 기원은 갱신세 (10,00~100,000년)전에 출현한 것으로 보고있으며, 그 유전적 배경은 잘 알려지지 않았다(Wang et al., 1994). 따라서 이들 종간의 유연관계를 보면 아시아 들당나귀(*E. hemionus*)와 몽고야생마(*E. przewaskii*)가 아시아 재래마 집단에 유전적 영향이 미친 것으로 보이고 있다. 본 연구결과에서 위 사실을 뒷받침하는 것은 UPGMA tree에서 아시아 들당나귀(*E. hemionus*)는 中國 幼南省 재래마(*E. caballus*)와 제주 재래마 (*E. caballus*) 사이 root를 구성하는 한편, N-J tree구성에서는 中國 幼南省 재래마 (*E. caballus*)와 몽고야생마(*E. przewaskii*)가 sister group을 형성하고 있음은 이를 간접적으로 증명하고 있다 (Fig. 22, 23). 또한 restriction site비교(Fig. 21, Table 2)에서도 아시아 당나귀(*E. hemionus*)는 가축마(*E. caballus*)의 cleavage site와 동일한 양상은 위 사실을 지지하는 결과라고 본다. 그리고 일본의 쓰시마 재래마(*E. caballus*)와 아시아 들당나귀(*E. hemionus*)가 maximum parsimony tree 구성에서 하나의 group을 형성하고 있다 (Fig. 27). 따라서 동 아시아의 재래마는 유전적으로 아시아 들당나귀(*E. hemionus*)와 몽고 야생마(*E. przewaskii*)의 중간위치에 속하는 馬계통이라 사료되며, 또한 아시아 들당나귀 (*E. hemionus*)는 아시아 재래마와 분화된 시기가 타종에 비하여 가까운 것으로 사료된다. 이런 복잡한 馬科의 분화경로를 다른시각으로 본다면, 馬科의 분화과정에서 아시아 계통과 아프리카 계통으로 나누어져 현생의 馬科를 형성하는 결과라고 추정하여본다. 그러나 이를 증명하기 위해서는 *E. caballus*의 품종 또는 inbreed사이의 유전학적 연구가 선행되어야 할 것으로 사료된다.

포유류의 phylogenetic tree구성에서 기제목(Perissodactyla)과 우제류(Artiorityla)는 가까운 유연관계를 보였다. 이는 형태학적으로 우제류가 기제목과 우제목으로 나누어

지는 결과와 일치 한다하겠다. 기제목과 우제목이 분지된 시기는 신생대 3기인 효신세 후기(70 Mya)로 추측하고 있다. 그리고 Irwin 등(1991)은 포유류의 cytochrome-b 유전자 분석에서 형태학적, 화석학적 연구에 의한 포유동물의 분화시기가 다소 차이가 있음을 보고하였다. 즉 화석기록에 의한 연대추정에서는 포유류 출현은 약 100 Mya, 우제류(Artiodactyls), 기제류(Perissodactyls), 고래류(Cetacean)의 분산시기는 80 Mya, 그리고 반추동물과 돼지류는 35~60 Mya에 분산되었다고 추정하고 있는 반면, 분자생물학적 연구결과에 따른 추정에 의하면 포유류 출현은 80 Mya, 기제류 우제류, 고래류(Cetacean)는 45~60 Mya, 그리고 Pecora는 20~25 Mya에 분화되었다고 한다. 따라서 분자생물학적 추정은 화석학적 연대추정보다 종의 분지된 연대가 다소 짧아지는 결과를 보이고 있다. Higuchi 등(1984)은 馬亞屬의 하나인 *Equus quagga*와 Mountain zebra의 mtDNA 연구결과 *E. quagga*와 Zebra는 5% 정도의 유전자 차이를 보이고 있다고 하였으며, 분산 시기는 약 3~4 Mya으로 추정 하였다. 그리고 Artiodactyla와는 약 55 Mya에 분산된 것으로 추정 하였다. 그리고 영장류(Primate)와 유제류(Ungulate)가 분지된 시기는 약 80 Mya으로 추정하였다(Savage and Russell, 1983). 이 결과는 역시 화석학적연구 결과에의한 연대추정과 분자생물학적 연구에 의한 연대추정과는 다소 차이가 있음을 보여준다고 할 수 있다.

우제류에서 진화 및 계통유연관계 연구는 영장류와 더불어 활발히 진행되어 왔다. Koop 등(1989)은 영장류, 토끼류, 기제목 사이의 계통유연관계를  $\beta$ -like globin gene 분석으로 설명한 결과, 영장류의 inner sister group으로 토끼(rabbit), 그리고 outer sister group으로 우제류인 산양(goat) branch tree를 구성됨을 보고하였다. 이 결과는 본 연구에서 얻은 maximum parsimony(PAUP)에 근거한 tree구성과 같은 결과를 보였다(Fig. 27). 그러나 UPGMA, N-J tree method에 의하여 계통유연관계를 구성한 결과와는 다른 관계를 보이고 있다. 즉 토끼류를 중심으로 각각 영장류 group과 유제류 group으로 구성하고 있었으며, 설치류는 outgroup으로 분지되는 양상을 보였다(Fig. 26, 27). 따라서 본 연구결과 기제류는 우제류와 가까운 유연관계를 가지고 있음을 알 수 있으며, 이는 이미 형태학적 연구결과에서 기제목과 우제목이 유제綱을 형성하는 결과와 일치하였다. 앞으로 기제류의  $\beta$ -globin gene cluster에 대한 진전된 연구가 진행된다면 현생 포유류의 진화 및 계통연구에 기초 자료를 제공 할 수 있을 것으로 사료된다.

---

## 제 2 장

濟州 在來馬 集團에서의 Cytochrome-b 遺傳子의 多形研究  
Cytochrome-b Gene Polymorphism in Cheju Native Horses



## I. 서론

동아시아에 분포하는 재래마들은 일찌기 운송 수단이나 농경생활의 방편으로 사육되어 왔다. 이러한 재래마집단 형성은 일찌기 중국을 중심으로하여 일본, 제주도, 필리핀, 인도네시아, 한반도 등으로 분산 분포되었을 것으로 추정된다. 동아시아의 재래마는 체고가 110~120 cm인 소형마(small-sized horse)와 130~140 cm인 중형마(medium-sized horse)로 구분되었다(Mori, 1929; Hayashida, 1958). 동아시아 재래마는 농, 축산업 및 운송 수단 외에 군사적 목적 등 다양한 용도에 이용되면서 사람의 영향을 가장 많이 받은 가축종의 하나이다. 즉 타가축에 비하여 보다 인위적 간섭을 많이 받았기 때문에 유전적 형성이 더 복잡하다고 볼 수 있다.

특히 제주 재래마는 제주도의 지정학적 위치로 보아 인류집단 형성과 더불어 매우 특색있는 마집단 형성으로 모피색깔의 다양성, 면역학적 특징 등에서 다양성을 나타낸다고 보고되었다(Nozawa et al., 1976, 1992; Nozawa and Kondo, 1970; Lee, 1961; Kang, 1965, 1966).

동아시아에 분포하는 재래마 집단의 전파경로는 두 가지설로 나눈다. 하나는 몽고 지방에서 도입된 Mongolian horse 계통과 중국 남서지방으로부터 도입된 중국 남산지마 계통(south-western pony)이다(Mori, 1929; Nozawa, 1992). 중국 남산지마 전파경로는 향馬라 하여 중국의 남서지방에서부터 동남아인 인도네시아, 오키나와, 대마도, 일본대륙, 한반도에 이르기 까지 분포되었다. 따라서 일본의 南西에 있는 모든 재래마馬 등은 모두 같은 외부형태를 가지고 있으며, 체고 역시 115 cm로 같은 마종으로 분포하고 있어 이를 뒷받침하고 있다. 그러나 제주 재래마의 또 다른 전파경로는 한반도로부터 유입된 Mogilian type 전파경로설과 island type(south-western pony type) 유입설이 설득력있게 받아들여지고 있다(Mori, 1929; Hayashida, 1958). 재래마들에 관한 유전학적 연구는 지난 20년 동안 면역학적, 혈청학적 그리고 생화학적 방법과 같은 여러 연구 방법들을 이용한 단백질 수준에서의 다형 연구로 집단들 간의 계통유전학적 관계를 추정하였다(Shotake, 1967; Nozawa et al., 1965; 1975; 1976; Oh et al., 1992). 그러나, 재래마들의 진화과정을 추정하기 위한 계통유전학적 관계와 divergence time의 산출은 이러한 단백질 수준의 연구로는 여러가지 면에서

한계가 뒤따랐으며, 또한 형태적 특성과의 비교 역시 명쾌한 답을 주지 못하는 실정으로 논쟁만이 계속되어 왔다.

최근의 분자생물학적 기술의 발달은 種內 및 種間의 DNA 염기배열, 다형현상들에 대한 연구를 가능케 함으로서 단백질 수준에서의 한계를 극복할 수 있게 하였다. 특히, 母系的으로 유전되는 mitochondrial DNA (mtDNA)에 대한 염기치환의 진화 속도는 核 DNA 보다 5~10배 정도 빠르고 種들내에 염기배열의 變異가 있기 때문에 mtDNA의 다형현상은 種內 및 近緣種 사이의 유전학적 관계 및 진화를 연구하는 데 매우 유용한 도구로 활용된다(Brown, 1980; 1983; Brown *et al.*, 1979; 1982; Cann and Wilson, 1983; Ferris *et al.*, 1982; George, 1982; Horai *et al.*, 1984; Giles *et al.*, 1980; Anderson *et al.*, 1982; Wilson *et al.*, 1985).

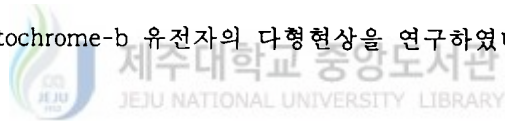
인류 및 자연집단내 혹은 집단간에서 mtDNA에 대한 제한효소의 변이분석이 최근에 많은 집단유전학자와 진화학자들 간에 깊은 관심의 대상이 되고 있다(Avise and Lansman, 1983; Avise *et al.*, 1987; Moritz *et al.*, 1987; Blance *et al.*, 1983; Can *et al.*, 1987; Denaro *et al.*, 1981). 동물의 mtDNA는 環狀 二重螺旋 分子로서 그 크기가 약 14~19 kb로서, 이는 D-loop에 의한 크기의 변화가 있어 종마다 약간의 차이를 보이고 있으며, 22개의 tRNA, 2개의 rRNA, 13개의 단백질 유전자를 갖고 있다(Attardi, 1985). Potter등 (1975)이 제한효소를 이용하여 포유동물의 mtDNA의 변이성에 대하여 처음으로 보고한 후, 면양과 산양(Upholt and Dawid, 1977), 쥐, 조류 그리고 초파리(Shah and Langley, 1979) 등의 다양한 종에서 mtDNA의 유전적 변이가 보고되었다. 이러한 개체간에 많은 염기배열의 변이를 보이는 mtDNA의 제한효소 분석이 집단 유전학에 도입되면서 종의 진화 및 유전적 연구에 매우 중요한 재료로서 활용되고 있다(Denaro *et al.*, 1981; Blanc *et al.*, 1983; Johnson *et al.*, 1983; Cann and Wilson, 1983; Horai *et al.*, 1984; Kocher *et al.*, 1989; Wallace *et al.*, 1985; Horai and Matsunaga, 1986; Finnerty and Block, 1995; Gonzalez-Villasenor and Power, 1990; Loftus *et al.*, 1994).

특히, 인류 집단에서는 mtDNA의 다형현상에 대해 여러 인종과 이들 인종내의 많은 집단을 대상으로 연구들이 다양하게 시도되어 인종간, 집단간의 유전적 구조차이의 구명은 물론 인류의 기원을 밝히려는 연구로 확대되고 있다(Anderson *et al.*,



1991; Benedictis *et al.*, 1989; Blanc *et al.*, 1983; Cann *et al.*, 1987; Excoffier and Langaney, 1989; Hertzberg *et al.*, 1989; Stoneking *et al.*, 1992). 최근에 George 와 Ryder (1986)는 현존하는 7 종의 야생마와 가축마 5 inbred의 mtDNA에 대한 연구에서 16개의 제한효소를 이용한 제한지도 작성을 통해 이들간의 계통유전학적 관계를 처음으로 보고하였다.

Cytochrome b 유전자는 미토콘드리아 genome DNA 영역에서 D-loop 영역과 인접하여 있는 유전자로서 어류 및 고등 포유류 까지 광범위하게 연구되어 종간, 종내에서의 gene diversity를 이용하여 이들의 유연관계 및 진화를 설명하는 좋은 자료로 이용되고 있다(Irwin *et al.*, 1991; Finnerty and Block, 1995). 또한 이 유전자는 매우 잘 보존된(conserved) polypeptide로서 380개의 아미노산으로 구성된 단백질이다. 그 기능은 mitochondrial membrane에서 전자를 전달하는 시스템에서 중요한 일을 수행하는 단백질로서 다른 유전자에 비하여 비교적 잘 알려져 있다(Hatefi, 1985; Howell and Gilbert, 1988)(Fig. 29). Kikkawa 등(1995)은 동남아 재래소(cattle)와 개량소와의 관계를 cytochrome b 유전자 분석을 이용하여 gene diversity를 설립함과 동시에 아시아 재래소의 조상 추정, 각 종간의 계통유연관계를 분석하였다. 본 연구는 제주 재래마의 기원 및 유전적 marker를 설립하고자 mtDNA 분리 및 RFLP 그리고 PCR 기법을 이용하여 cytochrome-b 유전자의 다형현상을 연구하였다.



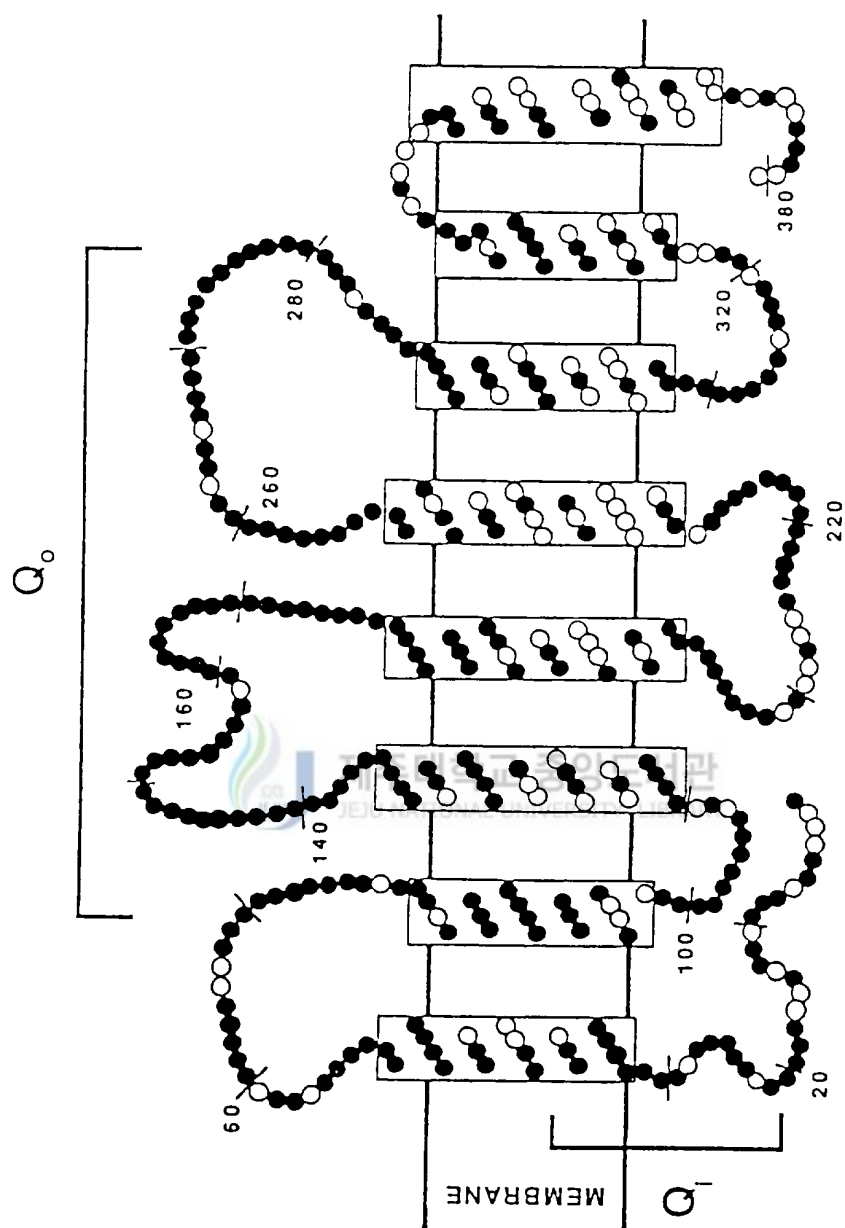


Fig. 29. Amino acid variability and structural model of cytochrome b in mammal mitochondrial membrane. An conservative and hypervariable residues are solid and empty circles.  $Q_i$ (inner surfaces) and  $Q_o$  (outer surfaces) are the redox centers.

## II. 재료 및 방법

### (1) Genomic DNA준비

제주도 축산 진흥원으로부터 혈액을 공급받아 total DNA를 분리하였다. 혈액에서 buffy coat층을 얻은 후 WCLB buffer(10 mM Tris, pH 7.5, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl)를 2배 첨가하여 20% SDS를 최종농도 1%되게 첨가하여 세포를 lysis시켰다. 5 M NaCl를 시료의 1/5 vol정도 넣고 혼합시킨 후 중화된 phenol (pH 8.0)을 동량 첨가하여 30분 동안 shaking한 후 5,000 ×g, 4℃에서 15분 동안 원심분리 하였다. 상층액을 채취하여 chloroform : isoamyl alcohol(24:1)을 동량 넣은 후 30분 동안 mixing하고 다시 5,000 ×g, 4℃에서 15분 동안 원심분리 하였다. Phenol-chloroform extraction을 2회 실시한 후 최종적으로 냉장 에탄올을 2배 첨가하여 -70℃에서 DNA를 침전 시켰다. DNA 세척은 70% EtOH로 실시하여 건조 시킨 후 TE buffer (10mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA pH 8.0)에 녹였다. 분리된 DNA는 0.7% agarose gel에 loading하여 확인하거나 또는 분광광도계(260/280 nm)에서 OD값을 측정하여 농도를 측정 하였다.

### (2) 말 간(liver)으로부터 mtDNA분리

제주 재래마에서 mtDNA 분리는 도축장으로부터 간을 공급받아 Zimmerman 등 (1988)의 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 간(liver) 조직 10 g을 가위로 조각을 낸 후 SE-I (240 mM sucrose, 1 mM EDTA, pH 7.4) 15ml 넣고 teplon homogenizer로 마쇄, SE-II(340 mM sucrose, 1 mM EDTA, pH 7.4) 20 ml 첨가시켜 700 ×g에서 15분간 원심분리한 후 세포성 찌꺼기를 제거하였다. 그리고 1,200 ×g와 1,500 ×g에서 각각 15분씩 원심분리하여 미토콘드리아를 제외한 세포물질을 제거 시켰다. 이 때 상층액을 가지고 15,000 ×g에서 20분간 원심분리한 후 미토콘드리아 침전물을 얻어, 용액 SE-I 2 ml을 첨가하여 현탁화한 후 SE-I용액 15 ml을 넣고 같은 방법으로 원심분리하였다.

핵 DNA를 제거하기 위해 2 ml의 SMT용액 (300 mM sucrose, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5), 10 μl DNase I (1mg/ml), 150 mM NaCl, 10 μl RNase A (10mg/ml)을 첨가하여 37°C에서 30분간 incubation시켰다. 여기에 4 ml의 SMT용액을 넣어 혼합시킨 후 5000 ×g에서 15분간 세번 반복하여 원심분리하여 nuclear DNA 제거 및 미토콘드리아를 washing하여 lysis를 준비하였다.

미토콘드리아 침전물에 2 ml의 TSE용액 (100 mM Tris, 200 mM NaCl, 100 mM EDTA, pH 8.0), 60 μl의 protease K (20 mg/ml)을 넣고 상온에서 5분간 incubation 시키고, 50 μl의 10% SDS를 첨가하여 20분간 37°C에서 incubation시켜 미토콘드리아 막을 파괴하였다. 이것을 8,000 ×g에서 15분간 원심분리하여 막을 제거, 상등액을 가지고 phenol/chloroform extraction을 하여 단백질을 완전히 제거하였다.

MtDNA는 7.5 M ammonium acetate 1/2 vol.과 EtOH 3 vol.을 첨가하여 -20°C에서 overnight 방치한 후 10,000 ×g에서 15분간 원심분리하여 침전 시켰다. 침전된 DNA는 70% EtOH로 세척하여 건조시킨 후 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, pH 8.0)에 녹여 사용하였다. 분리된 DNA는 0.8% agarose gel에 loading하여 확인하거나 또는 분광광도계(260/280 nm)에서 OD값을 측정하여 농도를 측정하였다.

### (3) MtDNA의 제한효소 처리

10개의 제한효소(*Eco* RI, *Hind* III, *Bgl* II, *Bam* HI, *Pst* I, *Pvu* II, *Xho* I, *Ava* I, *BstE* II, *Not* I, *Ava* II, *Msp* I)를 NEB Co.로 부터 구입하여 제조사의 권장방법에 따라 mtDNA를 처리하였다.

### (4) Digoxigenin-labelling 방법에 의한 mtDNA probe 준비

Dig-labelled kit는 BM Co.로부터 구입하여 digoxigenin-labeled된 deoxyuridine-triphosphate(dUTP)를 사용하여 random-primed 방법으로 DNA를 표지하였다.

먼저 random-primed labeling 전에 mtDNA를 *Bam* HI, *Eco* RI, *Hind* III로 절단시켜 선형가닥(ds DNA)으로 만든 후에, 100°C에서 10분간 끓인 후 ice에서 급속히 냉

각시켜 mtDNA를 단일 선형가닥(ss DNA)으로 만들었다. MtDNA probe 제조는 hexanucleotide mixture와 3 $\mu$ l dNTP (dCTP, dGTP, dATP, dTTP: 0.1 mM, digoxigenin dUTP: 0.035 mM), Klenow enzyme (2 units)를 섞어서 37 °C에서 20시간 동안 incubation하였다. 0.2M EDTA (pH 8.0)를 첨가하여 반응을 중지시키고, 4 M LiCl 2.5  $\mu$ l, EtOH 100  $\mu$ l 를 넣고 1시간 동안 -20°C에 방치, 원심분리하여 침전물을 건조시킨 후 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 녹여 probe로 사용하였다.

#### (5) 전기영동 및 Southern blot

MtDNA의 전기영동은 1% agarose gel에서 TBE buffer (9 mM Tris-borate, 2 mM EDTA, pH 8.0)를 사용하여 분리하였다. Southern blot는 Southern (1985)의 방법을 약간 변형 실시하였다. 사진촬영 후 gel을 denature sol. (0.2 M NaOH, 1.5 M NaCl)에서 20 분씩 2번, 그리고 증류수로 가볍게 gel을 씻어내고, Neutralization buffer (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 7.4)에서 20분 씩 2회 처리후 positively charged nylon membrane으로 capillary transfer방법을 사용해서 DNA를 옮겼다. 이때 transfer buffer는 20 X SSC buffer (3 M Sodium citrate, 1.5 M NaCl, pH 7.5)를 이용하여 6~12시간 동안 전이시켰다. DNA crosslinking은 UV-crosslinker (Hybaid Co. UK)를 이용하여 수행되었으며 실온에서 건조 시킨 후 hybridization을 실시하였다.

#### (6) Hybridization 과 immunodetection

Membrane을 pre-hybridization sol. (5 X SSC, 0.1% N-laurylsarcosine, 0.02% SDS, 1% blocking sol.)과 함께 hybridization oven (hybaid Co.)에 넣어 68°C에서 3시간 정도 pre-hybridization을 실시하였다. Pre-hybridization이 끝나면 준비된 probe를 100°C에서 10분 동안 boiling하여 ssDNA을 만들어 hybridization용액과 섞은 후 hybridization oven에서 12시간 가량 혼성화를 실시하였다. Membrane 세척은 0.1%

SDS가 포함된 2X SSC buffer를 이용하여 실온에서 10분씩 2회를 실시하였으며 그리고 0.1 X SSC buffer (0.1 % SDS)에서 10분씩 2회 실시하였다.

Immunodetection은 세척을 마친 membrane을 buffer I (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5)으로 가볍게 씻어낸 후, buffer II (1% blocking sol./ buffer I)에서 30분 동안 blocking을 실시한 후, alkaline phosphatase에 antidigoxigenin Fab fragment를 결합시킨 항체를 1/5,000로 희석하여 1시간 동안 incubation을 하였다. 비 결합 항체제거는 buffer I을 이용하여 20분씩 2회 정도 처리한 후, membrane을 buffer III sol. (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5)으로 가볍게 씻어 수행하였다. Color detection은 buffer III sol. 10 ml에 NTP (BM Co.) 45 ul, X-phosphate sol. (BM Co.)을 45 µl를 혼합하여 membrane에 처리하여 암조건하에서 overnight 반응 시켰다.

#### (7) Cytochrome-b gene RFLP

PCR실험을 수행하기 위해서 Irwin 등 (1991)과 Kocher 등 (1989)의 개발한 primer를 합성하여 사용하였다. 먼저 cytochrome b 유전자의 상류부위인 t-RNA의 말단부위쪽에 L-primer(L-14724 5'-CGAAGCTTGATATGAAAACCATCGTTG-3')와 H-primer(H-15915: 5'-AACTGCAGTCATCTCCGGTTTACAAGAC-3')를 만들었다. Irwin et al.(1991)의 방법에 따라서 최종 50 µl에 PCR buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8.3, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.02% gelatin, 0.025% NP-40, 0.02% Tween-20), 400 µM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), primer 20 mol, template DNA 200 g, Taq-polymerase (ID-Lab, Canada) 3 units를 혼합하여 PCR 증폭을 수행하였다. 그리고 pre-denaturation (95°C-1 min), denaturation (94°C-1 min), annealing (55°C-2 min), elongation (72°C-3 min)에서 30 Cycle를 수행한 후 1.2% agarose gel에서 PCR-products를 확인하였다.

(8) PCR-RFLP

제한효소 *Msp* I, *Hae* III를 이용하여 PCR-product 10  $\mu$ l 각각 10 units 정도의 제한효소를 처리하여 37°C에서 6 시간 처리 후 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 RFLP 양상을 분석하였다.

### Ⅲ. 결과

#### (1) MtDNA 분리

제주 재래마 mtDNA 분리는 Zimmerman 등(1988)의 방법으로 분리하여 전기영동한 결과 핵 DNA(nuclear DNA)가 전혀 오염되지 않은 순수한 mtDNA가 3가지 form인 nick circular form, linear form 그리고 super-coil form으로 분리되었다 (Fig. 30, 31).

#### (2) MtDNA-RFLP

분리된 mtDNA를 제한효소 11여 종류로 처리 후 1% agarose gel 전기영동을 실시하였고, Southern blot방법에 의거하여 제주마의 mtDNA genome의 restriction fragment의 양상을 관찰하였다. 그 결과 5 bp를 인지하는 제한효소 *Ava* II (GGA/TCC)처리시에는 3 fragments, 6 bp를 인지하는 제한효소 *Bam* HI (GGATCC)처리시에는 4 fragments, *Bgl* II(AGATCT)처리시에는 3 fragments, *Eco* RI (GAATTC)에는 6 fragments, *Hind* III (AAGCTT)처리시에는 5 fragments, *Pvu* II (CAGCTG)처리시에는 3 fragments가 나타났다. 7 bp를 인지하는 *Bst* E II (GGTNACC)처리시는 단일 fragment만 나타났다. 그리고 4 bp를 인지하는 *Msp* I (CCGG) 처리시는 12개의 fragments가 나타났다. 그러나 제한효소 *Ava* I(CPyCGPuG), *Pst* I(CTGCAG), 그리고 *Not* I(GCGGCCGC)는 절단부위를 갖지 않았다 (Fig. 31, Table. 10).

#### (3) Cytochrome-b gene RFLP

PCR 수행 후 제한효소 *Msp* I(CCGG)과 *Hae* III(GGCC)을 처리하여 전기영동한 결과 *Msp* I는 3 fragment band (760, 240 and 130 bp)가 관찰되었으며 (Fig. 32-2), *Hae* III에서는 4 fragment (570, 200, 180 and 130 bp)가 관찰되었다 (Fig. 33-3). 그



결과 *Msp* I 처리에서 two type으로 다형현상을 나타냈으며, A type (900, 240 bp), B type (760, 240 and 130 bp)으로 명명하였다(Fig. 32-2). 제주 재래마 집단 25 두에서 cytochrome-b 유전자 변이를 조사한 결과 A type의 21두, B type의 4 두로 관찰되었다.

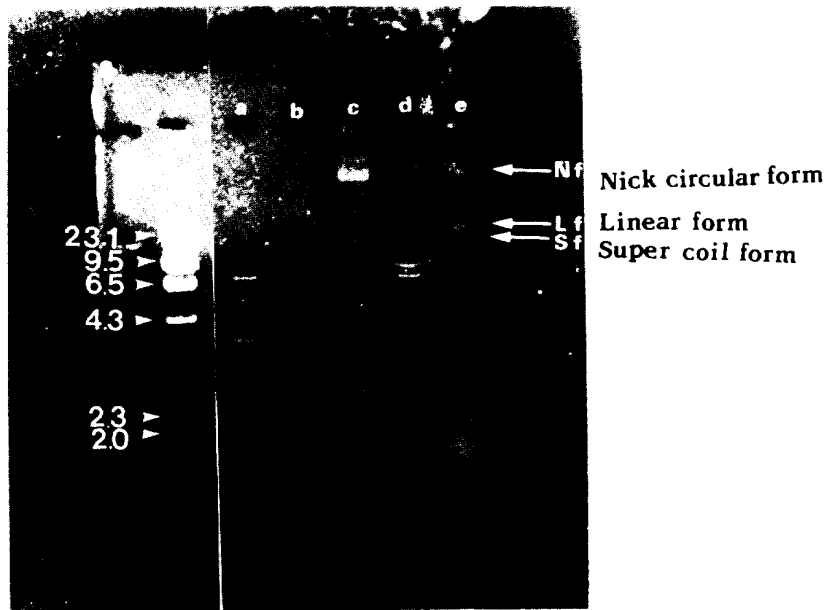


Fig. 30. A agarose gel electrophoretic patterns of the Cheju native horse mtDNA digested with various restriction enzymes: lane a to e : *Eco* RI, *Hind* III, *Pst* I, *Pvu* II, and purified mtDNA.

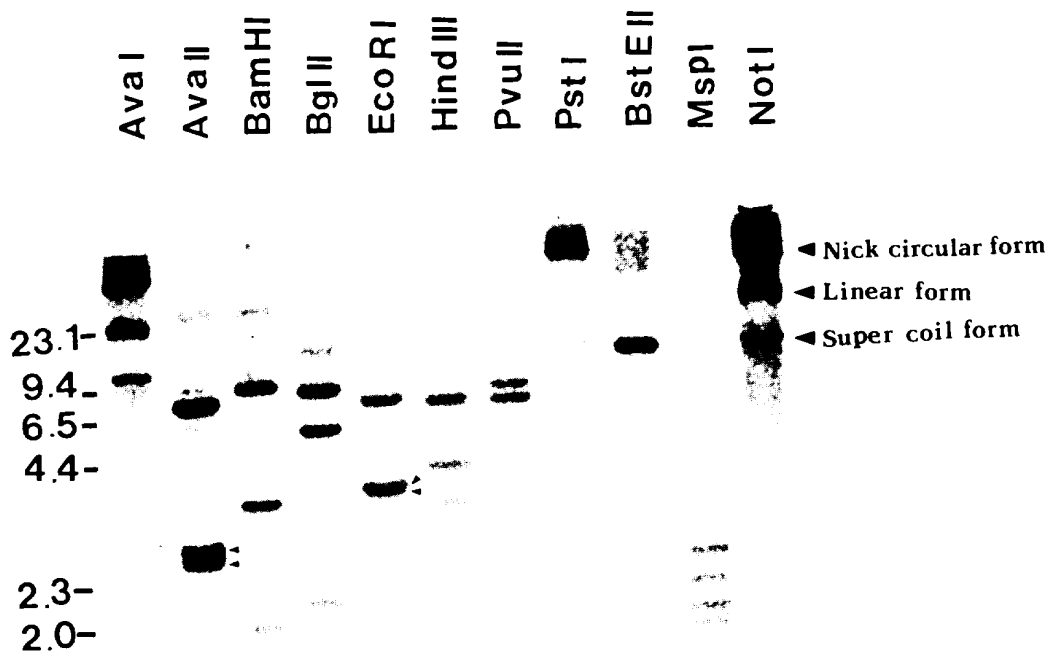


Fig. 31. Southern blot analysis of the mtDNA in Cheju native horse. Purified mtDNA was digested with various restriction enzymes and the digested bands were separated on 1% agarose gel.

Table 10. Molecular sizes of restriction fragments of horse mtDNAs digested with 10 restriction endonuclease.

Enzymes & Restriction endonuclease	Fragment sizes(K bp)
<i>Ava</i> I	no cut
<i>Ava</i> II	6.5, 3.5, 3.3, 3.3
<i>Bam</i> HI	9.4, 3.7, 1.9, 1.5
<i>Bgl</i> I	9.0, 4.6, 2.2
<i>Eco</i> RI	6.5, 3.5, 3.5, 1.3, 0.9, 0.8
<i>Hind</i> III	5.8, 3.9, 3.1, 2.0, 1.7
<i>Pvu</i> II	8.5, 6.3, 1.9
<i>Pst</i> I	no cut
<i>Bst</i> EI	no cut
<i>Msp</i> I	3.2, 3.0, 2.8, 2.6, 1.5, 1.0, 0.9, 0.6, 0.5, 0.2, 0.1

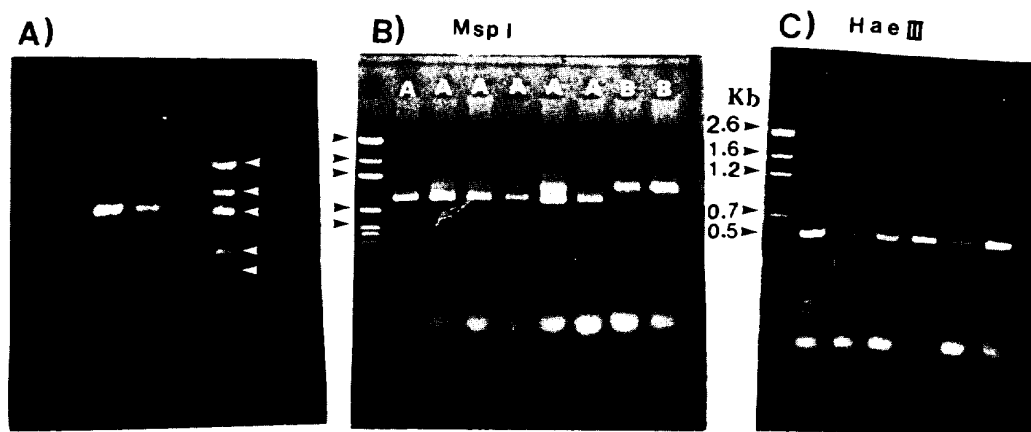


Fig. 32. A agarose gel electrophoresis of PCR products.  
 A) Cytochrome b gene by amplified with primers. The amplified DNA was digested with *Msp* I (B) and *Hae* III (C) restriction enzymes. B) The polymorphism of cytochrome b gene was showed as genotype A, B.

#### IV. 고찰

포유류에서의 mtDNA는 사람을 중심으로 개체, 집단, 종의 유전적 변이 및 분화 연구에 매우 활발하게 이용되어 왔다. 사람에서는 ethnic group 분화연구에서 인류의 기원과 분화에 대하여 다양한 경로를 주장하고 있다(Monnat and Reay, 1986; Scozzari *et al.*, 1988; Horai *et al.*, 1984; Horai and Matsunaga, 1986; Johnson *et al.*, 1983; Excoffier and Langaney, 1989; Wallace *et al.*, 1985).

동물에서의 mtDNA polymorphism 연구는 종의 기원과 종의 분화에 매우 중요한 자료를 제공함은 물론, 경제형질 구명에도 매우 유용한 자료를 제공하였다. 이런 동물의 mtDNA는 염기치환이 핵 유전자의 유전자에 비해 약 10 배정도 높으며, 연구하기가 핵 DNA에 비하여 비교적 쉽다(Brown, 1983). 현재까지 포유류의 mtDNA genome의 완전한 sequence는 사람(Anderson *et al.*, 1981), 마우스(Bibb *et al.*, 1981), 소(Anderson *et al.*, 1982) 등에서 이루어 졌다. 동 아시아의 가축에 대한 연구는 재래소(native cattle), 재래 돼지(native pig)에서 연구되어 왔으나 재래馬에 대한 연구는 비교적 미진한 실정이다(Watanabe *et al.*, 1985, 1986). 그리고 최근에 馬(*E. caballus*)에서의 mtDNA 염기서열이 완전히 분석(Xu and Arnason, 1994)됨으로서 馬에서의 연구는 PCR 기법을 적용하여 빠르게 진행되고 있다.

제주 재래馬에 대한 연구는 동물자원학적 중요성을 인식하면서부터 형태학적, 모색과 혈청학적 그리고 유전학적으로 진행되어 왔다. 그리고 제주도는 동아시아의 중앙에 위치하고 있어 어떤 타 재래마 집단보다도 모색과 혈청학적으로 아주 다양한 특징을 가진다고 보고되었다(Nozawa and Kondo, 1970).

동남아시아의 재래마는 Mongolian type과 south-western pony type (중국 남서부 type)으로 구분하고 있다. 따라서 이 두 type의 분산경로 및 분포지역에 의거하여 island type과 continental type으로 구분하였다. 그 구분의 기준을 주로 체형을 중심으로 나누고 있다(Shotake, 1967; Takamine, 1948; Mimura, 1953; Hayashida and Yamauchi, 1955; Nozawa, 1965). 제주 재래마는 지정학적 위치로 보아 Mongolian type과 중국 남서부 type이 만나는 분기점에 있어 제주 재래마의 기원 구명은 많은 문제점을 제시하고 있다. 제주 재래마의 전파경로는 제주인류집단 구성과도 매우 밀

접한 관계를 가지고 있다. 말(*E. caballus*)의 이주 경로는 자연적인 이주보다는 인위적 간섭에 의해 형성이 되었다는 경향이 지배적이다. 그리고 동아시아에 분포하는 island type pony(소형마)는 절대적으로 인위적인 간섭에 의해 형성된 馬 집단이라고 볼 수 있다. 그리고 island type의 분포지는 제주도를 중심으로 오키나와, 대마도, 인도네시아, 필리핀, 중국 남부지방이다. 인류학적 공통점은 남방문화가 분포하고 있다는 사실이다. 제주도의 남방문화의 영향을 들하르방, 고인돌(남방형: 원탁형 고인돌)에서 대표적으로 엿볼 수 있다(김, 1988). 따라서 제주도의 남방문화 형성과 馬 유입 설은 다소 무리는 있지만 설득력은 있다고 본다. 그러나 제주도의 馬 출현은 선삼국시대(약 2,000 년전)에 이미 존재하고 있음을 화석에서 증명한다(Shin et al., 1990).

제주 재래마의 mtDNA를 분리하여 RFLP를 중국의 유남성 재래마(Wang et al., 1994)의 집단과 비교한 결과 *Bam* HI (9.4, 3.7, 1.9, 1.3 kb), *Eco* RI (6.5, 3.5, 3.5, 0.9, 0.8 kb), *Hind* III (5.8, 3.9, 3.1, 2.0, 1.7 kb)에서는 같은 결과를 보였으나, *Bgl* II에서는 제주재래마(9.0, 4.6, 2.2 kb)와 유남성 재래마 (9.8 6.7 kb)에서 다른 결과를 보였다. 그리고 Oh 등(1994)의 제주 재래마 집단에서의 연구결과에서는 *Eco* RI, *Bam* HI, *Hind* III, *Ava* II에서 polymorphism을 보고한 결과에 비하여 유남성 재래마는 *Bam* HI에서만의 유전적 변이가 출현되는 양상은 중국 유남성 재래마 집단에 비하여 비교적 높은 유전적 변이가 있음을 암시하는 것으로 사료된다. 그러나 실험 집단의 크기, 즉 제주마 집단 52 두, 중국유남성 재래마 집단 6 두 차이에 기인된 결과라 볼 수도 있다.

Cytochrome-b 유전자는 mitochondrial genome에 13개의 polypeptide coding 영역 가운데 하나이며, 그 크기는 1.14 kb로서 완전한 coding 영역이다. Cytochrome-b는 잘 보존된 영역으로서 유전자 치환의 D-loop, ribosomal DNA 영역의 치환율에 비해 매우 낮다. 그러나 이런 cytochrome-b 유전자의 장점을 이용하여 최근 가축에서는 inbreed 동정, 종간의 분화, 계통유연관계분석에 유용한 도구로 사용되고 있다(Kikkawa et al, 1995; Zang and Ryder, 1993; Girman et al., 1993). 본 연구에서는 PCR 기법을 이용하여 제주 재래마의 cytochrome-b gene를 합성한 후 제한효소 4 base를 인지하는 *Msp* I, *Hae* III을 처리하여 제주 재래마에서의 유전적 변이를 관찰한 결과, 제한효소 *Msp* I 처리구에서 A type(900, 240 bp)과 B type(760, 240, and 130 bp)으로

관찰되었다. 제주재래마집단 25 두에서 A type은 21 두로서 대부분을 차지했다. 이 결과는 아직까지 연구된 집단이 없어 비교는 못했지만 제주마 집단 및 기원연구에 기초 자료가 될 수 있을 것이다.

제주 재래마의 기원 중 Nozawa (1992)의 동남아 재래마의 기원설이 옳다면, 제주 재래마는 두가지 馬계열(Mongolian type, South-western pony type)로 구성되었을 것으로 보며, 이는 앞으로 연구가 더욱 필요할 것으로 사료된다. 그리고 동남아에 분포하는 재래馬의 연구도 병행하여야 할 것으로 사료된다. 그리고 또다른 측면으로서, 현재 제주 재래마집단 형성과정에서 근세기동안에 영향을 미친 것으로 보는, 동남아 계열이 아닌 Thoroughbred horse계열이 미약하게 또는 아주 강력하게 존재할 가능성도 고려해야 할 문제라 사료된다.





## V 참고문헌

- Akar, N., A. O. Cavar, E. Dessi, A. Loi, M. Pirastu, and A. Cao, 1987.  $\beta$ -thalasemia mutation in Melanesians. *Science* 169:194-196.
- Anderson, S., A. T Bankier, B. G. Barrell, M. H. L. De Bruijn, A. R. Droyin, I. C. Eperon, D. P. Nierlich, B. A. Roe, F. Sanger, P. H. Schreier, A. J. H. Smith, R. Staden, and I. G. Young, 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457-465.
- Anderson, S., M. H. L. De Bruijn, A. R. Coulson, I. C. Eperon, F. Sanger, and I. G. Young, 1982. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved feature of the mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Bio.* 156:683-717.
- Antonarakis, S. E., C. D. Boehm, P. J. V. Giardina, and H. H. Kazazian, 1982. Nonrandom association of polymorphism restriction site in the  $\beta$ -globin cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:137-141.
- Attardi, G., 1985. Animal mitochondria DNA: A extreme example of genetic economy. *Int. Rev. Cytol.* 93:93-145.
- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb, and N. C. Saunders, 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondria bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.
- Avise, J. C. and R. A. Lansman, 1983. Polymorphism of mitochondrial DNA in populations of higher animal. In *Evolution of Genes and Proteins*(M. Nei and R. K. Koehn, eds), Sinauer, Auerland, MA, pp. 165-190.
- Bailey, J. W., D. H. A. Fitch, D. A. Tagle, J. Czelusniak, J. L. Slightom, and M. Goodman, 1991. Molecular evolution of the  $\psi\eta$ -globin gene locus: Gibbon phylogeny and the hominoid slowdown. *Mol. Biol. Evol.* 8:155-184.
- Bailey, W. J., K. Hayasaka, C. G. Skinner, S. Kehoe, L. C. Sieu, J. L. Slightom,

- and M. Goodman, 1992a. Reexamination of the african hominoid trichotomy with additional sequences from the primate  $\beta$ -globin gene cluster. *Mol. Phyl. and Evo.*:97-135.
- Bailey, W. J., J. L. Slightom, and M. Goodman, 1992b. Rejection of the flying primate hypothesis by phylogenetic evidence from the epsilon gene. *Science* 256:86-89.
- Baralle, F. E., C. C. Shoulders, and J. J. Proudfoot, 1980. The primary structure of the human  $\epsilon$ -globin gene. *Cell* 21:621-626
- Benedictis, G. D., G. Rose, G. Passarino, and C. Qnagliarello, 1989. Restriction fragment length polymorphism of human mitochondrial DNA in a sample population from Apulia(Southern Italy). *Ann. Hum. Genet.* 53:31-318.
- Benz, E. J., P. J. Kretschmer, C., E. Geist, J. A. Kantor, P. H. Turner, and A. W. Nienhuis, 1979. Hemoglobin switching in sheep. *J. Bio. Chem.* 254: 6880-6888.
- Bennett, D. K., 1980. Stripes do not a zebra make. Part I: A cladistic analysis of *Equus*. *Syst. Zool.* 29:272-288.
- Bibb, M. J., R. A. Van Etten, C. T. Wright, M. W. Walberg, and D. A. Clayton, 1981. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell* 26:167-180.
- Blanc, H., K. H. Chen, M. A. D. Amore, and D. C. Wallace, 1983. Amino acid change associated with the major polymorphic Hinc II site of Oriental and Caucasian mitochondrial DNA. *Am. J. Hum. Genet.* 35: 167-176.
- Bowling, A. T., A. M. Scott, J. Flint, and J. B. Clegg, 1988. Novel alpha hemoglobin haplotype in horse. *Animal Genetics* 19:87-101.
- Breen, M., P. Downs, Z. Iwvin, and K. Bell, 1994. Intrageneric amplification of horse microsatellite markers with emphasis on the Przewalskii's horse (*E. Przewalskii*). *Animal Genetics* 25:401-405
- Brown, W. M., 1983. Evolution of animal mitochondrial DNA. In *Evolution of*

- Genes and Proteins(M. Nei and R. K. Koehn, eds), Sinauer, Auderland, MA, pp. 62-88.
- Brown, W. M., E. M. Prager, A. Wang, and A. C. Willson, 1982. Mitochondrial DNA sequence of primate: tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.* 18:225-239.
- Brown, W. M., J. R. George, and A. C. Wilson, 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:1967-1971.
- Brown, W. M., 1980. Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:3605-3609.
- Cann, R. L., M. Stoneking, and A. C. Willson, 1987. Mitochondria DNA and Human evolution. *Nature* 325:31-36.
- Cann, R. L., and A. C. Wilson, 1983. Length mutations in human mitochondrial DNA. *Genetics* 104:699-711.
- Casanova, M. L., C. Boucekkine, J. Weissbach, C. Bishop, M. Fellous, M. Purrello, G. Fiori, and M. Siniscalco, 1985. A Y-linked DNA polymorphism and its potential for estimating genetic and evolutionary distance. *Science* 230:1403-1406.
- Case, J. T., and D. C. Wallace, 1981. Maternal inheritance of mitochondrial DNA polymorphisms in cultured human fibroblast. *Somat. Cell Genet.* 7:103-108.
- Caterina, J. J., T. M. Ryan, K. M. Pawlik, R. D. Palmiter, R. L. Brinster, R. R. Behringer, and T. M. Townes, 1991. Human  $\beta$ -globin gene locus control region: analysis of the 5'-DNaseI hypersensitive site HS2 in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:1626-1630.
- Chada, K., J. Magram, and F. Costantini, 1986. An embryonic pattern of expression of a human fetal globin gene in transgenic mice. *Nature* 319:685-689.
- Chang, L.-Y. E., and J. L. Slightom, 1984. Isolation and Nucleotide sequence analysis of the  $\beta$ -type globin pseudogene from human, gorilla and

- chimpanzee. *J. Mol. Biol.* 180:767-784.
- Cheng, J. F., D. E. Krane, and R. C. Hardison, 1988. Nucleotide sequence and expression of Rabbit globin gene  $\zeta 1$ ,  $\zeta 2$  and  $\zeta 3$ . *J. Bio. Chem.* 263: 9981-9993.
- Choi, O. B., and J. D. Engel, 1988. Developmental regulation of  $\beta$ -globin gene switching. *Cell* 55: 17-26.
- Clegg, J. B., M Goodbourn., and M. Braend, 1984. Genetic organization of the polymorphic equine  $\alpha$ -globin locus and sequence of the BII  $\alpha 1$  gene. *Nuclei Acids Res.* 12:7847-7858.
- Clegg, J. B., 1987. Gene conversions in the horse  $\alpha$ -globin gene complex. *Mol. Biol. Evol.* 4: 492-503.
- Deka, R., S. DeCruo, M. M. Yu, and R. E. Ferrell, 1992. Variable number of tandem repeat(VNTR) polymorphism at locus D17S5(YNZ22) in four ethnically defined human populations. *Hum. Genet.* 90:86-90.
- Denaro, M., H. Blanc, M. J. Johnson, K. H. Chen, E. Wilmsen, L. L. Cavalli-Sforza, and D. C. Wallace, 1981. Ethnic variation in Hpa I endonuclease cleavage patterns of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:5768-5772.
- Duorin, J., 1980. Cloning of human mitochondrial DNA in Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* 140:15-34.
- Efstratiadis, A., J. W. Poskony, T. Maniatis, R. M. Lawn, C. O'Connell, R. A. Spritz, J. K. Deriel, B. G. Forget, S. M Weissman, J. L. Slighton, A. E. Bleclji, O. Smithies, F. E. Baralle, C. C. Shoulders, and N. J. Proudfoot, 1980. The structure and evolution of the human  $\beta$ -globin gene family. *Cell* 21: 653- 668.
- Eisenmann, V., 1980. Les chevaux( Equus sensu lato) fossiles et actuels, cranes et, dents jugales superieures, cen tre natioal de la Recherche Scientifique. Paris.

- Excoffier, L., and A. Langaney, 1989. Origin and differentiation of human mitochondrial DNA. *Am. J. Hum. Genet.* 44:73-85.
- Farris, J. S., 1972. Estimating phylogenetic trees from distance matrices. *Am. Natur.* 106:645-668.
- Felsenstein, J. S., 1986. Distance methods: A reply to Farris. *Cladistics.* 2:130-143.
- Ferris, S. D., R. D. Sage, and A. C. Wilson, 1982. Evidence from mtDNA sequences that common laboratory strains of inbred mice are descended from a single female. *Nature* 295:163-165
- Ferris, S. D., W. M. Brown, W. S. Davidson, and A. C. Wilson, 1981. Extensive polymorphism in the mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78:6319-6323.
- Finnerty, J. R., and B. A. Block, 1995. Evolution of cytochrome b in the Scombroidei(Teleostei): molecular insights into billfish(Isiophoridae and Xiphiidae) relationship. *Fichery Bullet* 93:78-96
- Fitch, D. H., C. Mainone, J. L. Slightom, and M. Goodman, 1988. The spider monkey  $\psi\eta$ -globin gene and surrounding sequences: recent or ancient insertions of LINE and SINEs. *Genomics* 3: 237-255.
- Fitch, D. H., C. Mainones, M. Goodman, and J. L. Slightom, 1990. Molecular history of gene conversion in the primate fetal globin genes. *J. Bio. Chem.* 265:781-793.
- Fitch, D. H., W. J. Bailey, D. A. Tagle, M. Goodman, L. Sieu, and J. L. Slightom, 1991. Duplication of the  $\gamma$ -globin gene mediated by L1 long interspersed repetitive elements in an early ancestor of simian primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:7396-7400
- Flint, J., A. M. Taylor, and J. B. Clegg, 1988, Structure and Evolution of the horse zeta globin locus. *J. Mol. Biol.* 199:427-437
- Flint, J., O. A. Ryder, and J. B. Clegg, 1990. Comparison of the  $\alpha$ -globin gene cluster structure in perissodactyla. *J. Mol. Evol.* 30: 36-42.

- Fritsch, E. F., R. M. Lawn, and T. Maniatis, 1980. Molecular cloning and characterization of the human  $\beta$ -like globin gene cluster. *Cell* 19:959-972.
- Garner, K. J., and O. A. Ryder, 1992. Some applications of PCR to studies in wildlife genetics. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 64:167-181.
- George, M., 1982. Mitochondrial DNA evolution in old World monkeys. Ph. D. thesis. University of California, Berkely.
- George, M., and O. A. Ryder, 1986. Mitochondrial DNA evolution in the Genus *Equus*. *Mol. Biol. Evol.* 3(6):535-546.
- Girman, D. J., P. W. Kat, M. G. L. Mills, J. R. Ginsberg, M. Borner, V. Wilson, J. H. Fanshawe, C. Fitzgibbon, L. M. Lau, and R. K. Wayne, 1993. Molecular Genetic and Morphological analyses of the africa wild dog (*Lycaon pictus*). *J. Heredity* 84:450-459.
- Giebel, L. B., V. L. Santen, J. L. Slightom, and R. A. Spritz, 1985. Nucleotide sequence, evolution, and expression of the fetal globin gene of the spider monkey *Ateles geoffroyi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 6985-6989.
- Giles, R. E., H. Blanc, H. M. Cann, and D. C. Wallace, 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:6715-6719.
- Gonzalez-Villasenor, L. I., and D. A. Powers, 1990. Mitochondrial DNA restriction site polymorphisms in the telost *Fundulus heteroclitus* support secondary intergradation. *Evolution* 44:854-863.
- Goodman, M., B. F. Koop, J. Cielusniak, M. L. Weiss, and J. L. Slighton, 1984. The  $\eta$ -globin gene: Its long evolutionary history in the  $\beta$ -globin gene family of mammals, *J. Mol. Biol.* 180:803-823.
- Hadison, R., 1981. The Nucleotide sequence of rabbit embryonic globin gene  $\beta 3$ . *J. Bio. Chem.* 256:11780-11786.
- Hardies, S. C., M. H. Edgell, and C. A. Hutchison ■, 1984. Evolution of the mammalian  $\beta$ -globin gene cluster. *J. Biol. Chem.* 259: 3748-3756.

- Hardison, R. C., 1984. Comparison of the  $\beta$ -like globin gene families of rabbits and humans indicates that the gene cluster 5'- $\epsilon$ - $\gamma$ - $\delta$ - $\beta$ -3' predates the mammalian radiation. *Mol. Biol. Evol.* 1:390-410.
- Hardison, R., 1983. The nucleotide sequence of the rabbit embryonic globin gene  $\beta$  4. *J. Bio. Chem.* 258: 8739-8744.
- Harris, S., P. A. Barrie, M. L. Weiss, and A. J. Jeffrey, 1984. The primate  $\psi\beta$ -globin gene: Ancient  $\beta$ -globin pseudogene. *J. Mol. Biol.* 180:785-801.
- Harris, S., J. R. Thackerary, A. J. Jeffrey, and M. L. Weiss, 1986. Nucleotide sequence analysis of the lemur  $\beta$ -globin gene family: Evidence for major rate fluctuation in globin polypeptide evolution. *Mol. Biol. Evol.* 3:465-484.
- Harris, A. H., and L. S. W. Porter, 1980. Late Pleistocene horses of dry cave, Eddy County New Mexico. *J. Mammals* 61:46-65.
- Hatefi Y, 1985. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu. Rev. Biochem.* 54:1015-1069
- Hayasaka, K., C. G. Skinner, M. Goodman, and J. L. Slightom, 1993. The  $\gamma$ -globin genes and their flanking sequences in primates: finding with nucleotide sequences of Capuchin monkey and tarsier. *Genomics* 18: 20-18.
- Hayashida, S., 1958. Systematic studies on the Japanese native horse. *Jan. Zootch. Sci.* 36:233-242.
- Hayashida, H., and C. Yamauchi, 1955. Studied on the kyushu native horses of Japan. I. On the Tokara, Pony, Japan. *J. Zoolch. Sci.* 26:231-236.
- Hayashida, S., 1968. Origin and phylogeny of livestock in Japan. *Japanese people and Southern Culture.* pp. 385-402.
- Hayasaka, D., H. A. Fitch, J. L. Slightom, and M. Goodman, 1992. Finding from phylogenetic analyses involving the 5'-flanking sequence of the  $\psi\gamma$  globin gene of spider monkey *Ateles geoffroyi*. *J. Mol. Bio.* 221:875-881.
- Haynes, J. R., P. Rosteck, E. A. Schon, P. M. Gallagher, D. J. Burks, K. Smith, and J. B. Lingrel, 1980. The isolation of the  $\beta$  -  $\beta$  - and  $\gamma$ -globin gene and

- presumptive embryonic globin gene from a goat DNA recombinant library. *J. Biol. Chem.* 255: 6355-6367.
- Hertzberg, M., K. N. Mikleson, S. W. Serjeantson, F. Prior, and R. J. Trent, 1989. An Asian-specific 9-base deletion of mitochondrial DNA of frequently found in Polynesian. *Am. J. Hum. Genet.* 44:504-510.
- Hertzberg, M. S., K. N. P. Mickleson, and R. J. Trent, 1988.  $\alpha$ -globin gene haplotypes in polynesians: Their relationship to population groups and Gene rearrangements. *Am. J. Hum. Genet.* 43:971-977.
- Higgs, D. R., J. M. Old, L. Pressiey, J. B. Clegg, and D. J. Weatherall, 1980. A novel  $\alpha$ -globin gene reangement in man. *Nature* 284: 632-635.
- Higuchi, R., B. Bowman, M. Freiberger, O. A. Ryder, and A. Wilson, 1984. DNA sequences from the quqggq an extinct member of the horse family. *Science* 312:282-284.
- Hill, A. V. S., B. Gentile, J. M. Bonnardot, J. Roux, D. J. Weatherall, and J. B. Clegg, 1987. Polynesian origins and affinities: globin gene variations in eastern polynesia. *Am. J. Hum. Genet.* 40:453-463.
- Hill, A., S. C. Hardies, S. J. Phillips, M. G. Davis, C. A. Hutchinson III, and M. H. Edgell, 1984. Two mouseearly embryonic  $\beta$ -globin gene sequences. *J. Biol. Chem.* 269:3739-3747.
- Horai, S., T. Gojobori, and E. Matsunaga, 1984. Mitochondrial DNA polymorphism in Japanese. I. Analysis with restriction enzymes of six base recognition. *Hum. Genet.* 68:324-332.
- Horai, S., and E. Matsunaga, 1986. Mitochondrial DNA polymorphism in Japanese. II. Analysis with restriction enzymes of four or five base pair recognition. *Hum. Genet.* 72:105-117.
- Houck, M. L., O. A. Ryder, J. Vahala, R. A. Kock, and J. E. Oosterrhuis, 1994. Diploid chromosome number and chromosome variation in the white rhinoceros(*Ceratotherium simum*). *J. Heredity* 85:30-34.



- Howell, N., and K. Gilbert, 1988. Mutational analysis of the mouse mitochondrial cytochrome b gene. *J. Mol. Biol.* 203:907-618.
- Irwin, D. M., T. D. Kocher, and A. C. Wilson, 1991. Evolution the cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol.* 32: 128-144.
- Ishida, N., T. Hasegawa, K. Takeda, M. Sakagami, A. Onishi, S. Inumaru, M. Komatsu, and H. Mukoyama, 1994. Polymorphism sequence in D-loop region of equine mitochondrial DNA. *Animal Genetics* 25:215-221.
- Ishida, N., T. Oyunsuren, S. Mashima, H. Mukoyama, and N. Saitou, 1995. Mitochondrial DNA sequences of various species of the Genus *Equus* with special reference to the phylogenetic relationship between Przewalski's wild horse and domestic horse. *J. Mol. Evol.* 41: 180-188.
- Jaman, A. P., R. D. Nicholls, D. J. Weatherall, J. B. Clegg, and D. R. Higg, 1986. Molecular characterization of a hypervariable region downstream of the human  $\alpha$ -globin cluster. *J. EMBO.* 5:1857-1863.
- Jarman, A. P., and D. R. Higgs, 1988. A new hypervariable marker for the human  $\alpha$ -globin gene cluster. *Am. J. Hum. Genet.* 43: 249-256.
- Jeffreys, A. J., and R. A. Flavell, 1977. A Physical map of the DNA regions flanking the rabbit  $\beta$ -Globin gene. *Cell* 12: 429-439.
- Jeffreys, A. J., 1982. Evolution of globin genes. *Genomic Evolution*. Academic Press. 157-176.
- Johnson, M. J., D. C. Wallace, S. D. Ferris, M. C. Rattazi, and L. L. Cavalli-Sforza, 1983. Radiation of human mitochondrial DNA types analysed by restriction endonuclease cleavage patterns. *J. Mol. Evol.* 19:255-271.
- Kang, M. H., 1965. Systematic studies on the Korean native horse. *Res. Bull. Korean Soc. Anim. Sci.* 7:92-97.
- Kang, M. H., 1966. Studies on the native horse in Korea island. Theses collection college of Agric. Korean Univ.
- Kaminski, M., 1979. The biochemical evolution of the horse. *Comp. Biochem.*

- Physiol. 63(B):175-178.
- Karlsson, S., and A., W. Nienhuis, 1985. Developmental regulation of human globin genes. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 1071-1108.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Biol.* 63:111-120.
- Kikkawa, Y., T. Amano, and H. Suzuki, 1995. Analysis of genetic diversity of domestic cattle in east and southeast Asia in terms of variation in restriction sites and sequence in mitochondrial DNA. *Biochemica Genetics* 33:51-61.
- Kocher, T. D., W. K. Thomas, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Paabo, F. X. Villablanca, and A. C. Wilson, 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animal amplification and sequencing with conserved-primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:6196-6200.
- Koehler, C. M., G. L. Lindberg, D. R. Brown, D. C. Beitz, A. Eugene Freeman, J. E. Mayfield, and A. M. Myers, 1991. Replacement of bovine mitochondrial DNA by a sequence variant within one generation. *Genetics* 129:247-255.
- Kohne, D. E., 1970. Evolution of high-organism DNA. *Quart. Rev. Biophys.* 33:237-375.
- Konkel, D. A., J. V. Maizel, and Leder, 1979. The evolution and sequence comparison of two recently diverged mouse chromosomal  $\beta$ -globin genes *Cell* 18:865-873.
- Koop, B. F., and M. Goodman, 1988. Evolutionary and developmental aspects of two  $\beta$ -hemoglobin genes ( $\epsilon$  and  $\beta$ ) of opossum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:3893-3897.
- Koop, B. F., M. M. Miyamoto, J. E. Embury, M. Goodman, J. Czelusniak, and J. Slightom, 1986. Nucleotide sequence and evolution of the orangutan  $\epsilon$ -globin gene region and surrounding Alu-repeats. *J. Mol. Evol.* 24:94-102.
- Koop, B. F., D. Siemieniak, J. L. Slightom, M. Goodman, J. Dunbar, P. C. Wright,

- and E. L. Simons, 1989. Tarsius  $\delta$ - and  $\beta$ -globin genes: conversions, evolutions and systematic implication. *J. Bio. Chem.* 264: 68-79.
- Koop, B. F., M. Goodman, P. Xu, K. Chan, and J. L. Slightom, 1986. Primate  $\gamma$ -globin DNA sequences and man's place among the graeat apes. *Nature* 319:234-238.
- Koop, B. N., D. A. Tagle, M. Goodman, and J. L. Slighton, 1989. A molecular view of primate phylogeny an d important systematic and evolutionary questions. *Mol. Biol. Evol.* 6(6): 580-612.
- Kraus, F., and M. Miyamoto, 1991. Rapid cldogenesis among the pecoran ruminants: evidence from mitochondrial DNA sequence. *Syst. Zool.* 40:117-130.
- Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei, 1993. MEGA: molecular evolutionary genetic analysis ver. 1.0. The Peninsylvania state university Park. P.K.
- Lake, J. A., 1988. Origin of the eukaryotic nucleotide determined by rate-invariant analysis of rRNA sequence. *Nature* 331:184-186.
- Lane, D. J., B. Pace, G. J. Olsen, O. A. Stahl, M. L. Sogin, and N. R. Pace, 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA gene sequences for phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:6955-6959.
- Lawn, R. M., A. Efstratiadis, C. O. Connell, and T. Maniatis, 1980. The nucleotide sequence of the human  $\beta$ -globin gene. *Cell* 21:647-651.
- Lee, K. M., 1961. Biostatistic studies on the body type of the Cheju horse in Quelpart college of Agric. Choongnam Univ.
- Li, W. H., and M. Tanimura, 1987. The molecular clock runs more slowly in man than in apes and monkeys. *Nature* 326:93-96.
- Lindsay, E. H., N. D. Opdyke, and N. M. Johnson, 1980. Pliocene dispersal of the horse equus and late cenozoic mammarian dispersal event. *Nature* 287:135-139.
- Loftus, R. T., D E MacHugh, L. O. Ngere, D. S. Balain, A. M. Badi, D. G. Bradley, and E. P. Cunningham, 1994. Mitochontrial genetic variation in

- European Africa and Indian cattle populations. *Animal Genetics* 25:265-271.
- MacFadden, B. J., 1976. Cladistic analysis of primitive equuids with notes on other perissodactyls. *Syst. Zool.* 25:1-14.
- MacFadden, B. J., 1984. *Astrohippus* and *Dinohippus* from the Yepomera local fauna (hemphillian, Mexico) and implications for the phylogeny of one-toed horses. *J. Vert. Palen.* 4(21):273-283.
- MacFadden, B. J., 1988a. Horse, the Fossil Record, and Evolution. A current perspective. *Evol. Biol.* 22: 131-158.
- MacFadden, B. J., 1988b. Fossil horse *Eohippus* (*Hyracotherium*) to *Equus*.: rate of dental evolution revisited *Biological Journal the Linnean Society* 35:37-48.
- MacFadden, B. J., and R. C. Hulbert, 1988. Explosive speciation at the base of the adaptive radiation of Miocene grazing horse. *Nature* 336:466-468.
- MacFadden, B. J., 1985. Pattern of phylogeny and rates of evolution in fossil horses: hipparions from the Miocene and Pliocene of North America. *Paleobiology* 11:245-257.
- Maciulis, A., T. D. Bunch, J. L. Shupe, and N. C. Leone, 1984. Detailed description and nomenclature of resolution G-banded horse chromosome. *J. Heredity* 75:256-268.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook, 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Margot, J. B., G. William Demers, and R. C. Hardison, 1989. Complete nucleotide sequence of the rabbit  $\beta$ -like globin gene cluster. *J. Mol. Biol.* 205: 15-40.
- Marsh, O. C., 1976. Notice of new Tertiary mammals. *Am. J. Sci.* 12:401-404.
- Marsh, O. C., 1884. *Dinocerata: a morphograph of an extinct order of gigantic mammals.* U.S. Geol. Surv. Monogr.10: 1-237
- Marsh, O. C., 1979. Polydactyle horses, recent and extinct. *Am. J. Sci.* 17:499-505.
- Marsh, O. C., 1892. Recent Polydactyle Horse. *Am. J. Sci.* 43:339-55.
- Matthew, W. D., 1926. *The evolution of the horse: a record and its interpretation.*

- Quart. Rev. Biol. 1:139-185.
- Mimura, H., 1953. On the Hokkaido native horse. Studies on the Japan native horse(T. Okabe, ed.) pp 163-209.
- Miyamoto, M., and M. Goodman, 1986. Biomolecular systematics of eutherian mammals: phylogenetic patterns and classification. Syat. Zool. 35:230-240.
- Miyamoto, M., J. L. Slightom, and M. Goodman, 1987. Phylogenetic relations of human and africa apes from DNA sequences in the  $\phi\eta$ -globin gene region. Science 238: 369-373
- Miyamoto, M., B. F. Koop, J. L. Slightom, and M. Goodman, 1988. Molecular systematics of higher primates: genealogical relations and classification. Proc. natl. Acade. Sci. USA. 85: 7627-7631.
- Monnat, R. J., and D. T. Reay, 1986. Nucleotide sequence identity of mitochondrial DNA from different human tissue. Gene 43:205-211.
- Mori, T., and T. Hosoda, 1970. Studies on serum protein types in horse. Jap. J. Zotech. Sci. 41:400-406.
- Mori, T., 1929. Ancestry of Korea native horses(a preliminary report). Japan. J. Zootch. Sci. 4:90-112.
- Moritz, C., T. E. Dowling, and W. M. Brown, 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relavance for population biology and systematics. Ann. Rev. Ecol.Syst. 18:269-292.
- Myers, R. M., K. Tilly, and T. Maniatis, 1986. Fine structure genetic analysis of a  $\beta$ -globin promoter. Science 232: 613-618.
- Nakamura, Y., M. Leppert, P. O'connell, R. Wolff, T. Holm, M. Culver, C. Martin, E. Fujimoto, M. Hoff, E. Kumlin, and R. White, 1987. Variable number of tendem repeat( VNTR) Markers for human gene mapping. Science 235: 1616-1622.
- Nei, M., 1991. Relative efficiencies of different tree making method for molecular date. Phylogenetic Analysis of DNA sequences. Oxford Univ. NY pp.90-128.

- Nei, M., and T. Gojobori, 1986. Simple method for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Bio. Evol.* 3:418-426.
- Nei, M., and W. L. Li, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:5269-5273.
- Nei, M., and A. L. Hughes, 1992. Balanced polymorphism and evolution by the birth and death process in the MHC loci. *Proceedings of the 11th Histocompatibility workshop and conference*, 2: 27-38.
- Nozawa, K., and K. Kondo, 1970. Gene constitution of Cheju native horse and its phylogenetic relationships with Japanese native horses, *Sabrao Newkletter.* 2:7-18.
- Nozawa, K., T. Shotake, and Y. Ohkura, 1975. Blood protein polymorphisms and population structure of the Japanese macaque (*Macaca fuscata*) Isozymes IV. *Genetics and Evolution.*
- Nozawa, K., K. Esaki, N. Wakasugi, and S. Hayashida, 1965. Genetical studies on the native farm animals in Japan and her adjacent localities. 1. Gene constitution of the island type native horses. *Japan. J. Zootch. Sci.* 36:233-242.
- Nozawa, K., T. Shotake, and Y. Ohkura, 1976. Blood proteins variations within and between the east Asian and European horse populations. *Sonderdruck aus Zeitschrift fur Tierzuchtung und Zuchtungsbiologie* 93: 60-74.
- Nozawa, K., 1992. Origin and ancestry of native horses in eastern Asia and Japan. *J. Equine. Sci.* 2(1):1-18.
- Oh, M. Y., M. H. Ko, G. O. Kim, S. J. Kim, C. C. Chung, and K. I. Kim, 1992. Genetic variations of the blood proteins in Cheju native horse. *Kor. J. Genetics* 14:39-50.
- Oh, M. Y., M. H. Ko, G. O. Kim, Y. S. Oh, S. J. Kim, and S. S. Hong, 1994. Phylogenetic relationship of Cheju native horse by Mitochondrial DNA

- analysis. *Mol. and Cells* 4:13-20.
- Owen, R., 1848. Description of teeth and portion of jaws of two extinct anthracotheroid quadrupeds (*Hyopotamus vectianus* and *H. bovinus*) discovered by the Marchioness of Hastings in the Eocene deposits on the N.W. coast of the Isle of Wight, with an attempt to develop Cuvier's idea of the classification of pachyderms by the number of their toes. *Quart. J. Geol. Soc. Landon* 4:104-141.
- Ooyen, A. V., J. V. D. Berg, N. Mantel, and C. Welssmann, 1979. Comparison of total sequence of a cloned rabbit  $\beta$ -globin gene and its flanking region with a homologous Mouse sequence. *Science* 206: 337-344.
- Orkin, S. H., 1990. Globin gene regulation and switching. *Cell* 63:665-672.
- Orkin, S. H., H. H. Kazazian Jr, S. E. Antonarakis, S. C. Goff, C. D. Boehm, J. P. Sexton, P. G. Waber, and P. J. Giardina, 1982. Linkage of  $\beta$ -thalassemia mutation and  $\beta$ -globin gene polymorphisms with DNA polymorphism human  $\beta$ -globin gene Cluster. *Nature* 296:627-631.
- Paabos, R., G. Higuchi, and A. C. Wilson, 1989. Ancient DNA the polymerase chain reaction. *J. Biol. Chem.* 264:9709-9712
- Pascale, P-P., M. Gouy, V. M. Nigon, and G. Trabuchet, 1992. Evolution of the Primate  $\beta$ -Globin Gene Intergenic Region of Gorilla and Phylogenetic Relationships between African Apes and Man *J. Mol. Evol.* 34:17-30.
- Porter, C. A., I. Sampaio, H. Schneider, M. P. Schneider, J. Czelusniak, and M. Goodman, 1995. Evidence on primate phyloeny from epsilon-globin gene sequence and flanking region. *J. Mol. Evol.* 40:30-55.
- Potter, S., S. J. E. Newbold III, C. A. Hutchison, and M. H. Edgell, 1975. Specific cleavage analysis of mammalian mitochondria DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72:4496-4500.
- Produfoot, N. J., and A. Gil, 1982. The structure of the human zeta-globin gene and a closely linked, nearly identical pseudogene. *Cell* 31: 553-563.

- Prothero, D. R., and R. M. Schoch, 1989. The evolution of perissodactyls clarendon Press, New York.
- Radinsky, K., 1983. Allometry and reorganization in horse skull proportions. Science 221:1189-1191.
- Reitman, M., J. A. Grasso, R. Blumenthal, and P. Lewit, 1993. Primary sequence, evolution and repetitive elements of the Gallus gallus(Chicken)  $\beta$ -globin cluster. Genomics 18: 616-626.
- Robbins, J., P. Rosteck, J. R. Haynes, G. Freyer, M. L. Cleary, H. D. Kalter, K. Smith, and J. B. Lingrel, 1979. The isolation and partial characterization of recombinant DNA containing genomic globin sequences from the goat. J. Biol. Chem. 254:6187-6195.
- Ronne, M., A. O. Gyldenholm, and C. O. Storm, 1993. The RBG-banded karyotype of equus caballus at the 525-band stage. Hereditas 118:195-199.
- Ryder, O. A., N. C. Epel., and K. Benirschke, 1978. Chromosome banding studies of the equidae. Cytogenet. Cell Cenet. 20:325-350.
- Ryder, O. A., and L. G. Chemnick, 1990. Chromosomal and molecular evolution in Asiatic wild ass. Genetica 83:67-72.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim, 1985. Enzymatic Amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354.
- Saitou, N., and M. Nei, 1987. The neighbor-joining method: Anew method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4:406-425.
- Sanger, F., S. Nicklen, and R. A. Coulson, 1977. DNA sequencing with DNA chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74:5463-5467.
- Savage, D. E., and D. E. Russell, 1983. Mammarian palcofaunas of the world. Addison-Wesely, Reading MA.
- Schimenti, J., and C. H. Duncan, 1984. Ruminant globin gene structure suggest an



- evolutionary role for Alu -type repeats. *Nucleic Acids Research* 12: 1641-1655.
- Shah, D. M., and C. H. Langley, 1979. Inter- and intraspecific variation in restriction maps of *Drosophila* DNAs. *Nature* 281:686-699.
- Sharma, A., C. T. Parson, S. Midha, J. Okabe., P. Pinton, J. Logan, and L. R. Kunar, 1995. *Sus Crafa*(domastic pig) epsilon globin gene. Unpublished(AC, X86792).
- Shapiro, S. G., E. A. Sehon, T. M. Townes, and J. B. Lingrel, 1983. Sequence and linkage of the goat  $\epsilon 1$  and  $\epsilon 2$   $\beta$ -globin genes. *J. Mol. Biol.* 169:31-52.
- Shehee, R. W., D. D. Loeb, N. B. Adey, F. H. Burton, N. C. Casavant, P. Cole, C. J. Davies, R. A. McGraw, S. A. Schichman, D. M. Severynse, C. F. Voliva, F. W. Weyter, G. B. Wisely, M. H. Edgell, and C. A. Hutchison III, 1989. Nucleotide sequence of the BALB/c Mouse  $\beta$ -globin complex. *J. Mol. Biol.* 205: 41-62.
- Shimiza, K. and O. Takenaka, 1991. DNA polymorphism in the  $\psi\beta$ - and  $\beta$ -globin gene region in Asian Macaques. *Biochem. Genet.* 298:177-187.
- Shotake, T., 1967. A study of Hokkaido native horses. *Rep. Res. Group Native Farm Anim.* 2:79-83.
- Simpson, G. G., 1951. *Horses*. New York, Oxford Univ. Press, pp. 1-245.
- Shin, T., S. Lee, S. Kim, K. Yang, J. Ko, B. Lee, S. Ahn, S. Jin, and E. Ko, 1992. An anatomic study od animal bones excavated from Kwakji archaeological site in Cheju island. *Korean University Museum Society.* pp32-42
- Slightom, J. L., A. E. Blechl, and O. Smithies, 1980. Human fetal  $\gamma g$ -and  $\gamma a$ -globin genes: complete nucleotide sequence suggest that DNA can be exchanged between these duplication genes. *Cell* 21:627-638.
- Slightom, J. L., L. Y. Edward Chang, B. F. Koop, and M. Goodman, 1985. Chimpanzee fetal  $\gamma g$  and  $\gamma a$  globin gene nucleotide sequence provide further

- evidence of gene conversion in hominine evolution. *Mol. Biol. Evol.* 2:370-389.
- Slightom, J. L., B. F. Koop, P. Xu, and M. Goodman, 1988. Rhesus fetal globin genes. *J. Bio. Chem.* 263: 12427-12438.
- Sneath, D. L., and N. E. Sokal, 1973. "Numerical Taxonomy: The principles and practice of numerical classification" Freeman Sanfrancisco.
- Tallings, R. L., A. F. Ford, D. Nelson, D. C. Torney, C. E. Hildebrand, and R. K. Moyzis, 1990. Evolution and Distribution of (GT)<sub>n</sub> Repetitive sequences in Mammalian genomes. *Genomics* 10: 807-815.
- Southern, E. M., 1975. Detection of specific sequence among DNA fragment separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
- Spurdle, A. B., and T. Jenkins, 1992. The Y-chromosome as a tool for study human evolution. *Curr. Opin. Gen.* 2:487-491.
- Stoneking, M., S. T. Sherry, A. J. Reed, and L. Vigilant, 1992. New approaches to dating suggest a recent age for the human mtDNA ancestor. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 337:167-175.
- Swofford, D. L., and G. J. Olsen, 1990. Phylogeny reconstruction. in "Molecular Systematics" pp.411-515
- Tagle, D. A., M. J. Stanhope, D. R. Siemiemiak, P. Benson, M. Goodman, and T. L. Slightom, 1992. The  $\beta$ -globin gene cluster fo the prosimian primate Galago Crassicaudatus: Nucleotide sequence determinant of the 41Kb cluster comparative sequence analyses. *Genomics* 13:741-760.
- Tagle, D. A., B. F. Koop, M. Goodman, J. Slightom, D. L. Hess, and R. T. Jones, 1988. Embryonic  $\epsilon$  and  $\gamma$  Globin of a prosimian primate (Galago crassicaudatus). *J. Mol. Biol.* 203:439-455.
- Tagle, D. A., J. L. Slightom, R. T. Jones, and M. Goodman, 1991. Concerted evolution led to high expression of a prosimian primate  $\delta$  globin gene locus. *J. Bio. Chem.* 266: 7469-7480.

- Takamine, H., 1948. A study on the body type of native horses. Bull. Tokyo Collage. Agric. Forestry No.3.
- Townes, T. M., S. G. Shapiro, S. M. Wernke, and J. B. Lingerl, 1984. Duplication a four gene during the evolution of the goat  $\beta$ -globin locus produced genes now expressed differentially in develoment Biol. Chem. 259:1896-1900..
- Townes, T. M., M. C. Fitzgerald, and J. B. Linger, 1984. Triplication of a four gene set during evolution of the goat  $\beta$ -globin locus produced three genes now expressed differentially during development. Proc. Natl. Sci. USA. 81:6589-6593.
- Trent, R. J., J. G. Buchanan, A. Webb, R. P. S. Groundar, L. M. Seruvatu, and K. N. P. Mickleson, 1988. Globin genes are useful markers to identify genetic similarities between fijians and pacific islanders from polynesia and Melanesia. Am. J. Hum. Genet. 42: 601-607.
- Trent, R. J., V. Ferguson, M. S. Hertzberg, J. Rutherford, and K. N. P. Mickleson, 1990.  $\beta$ -Globin gene haplotypes in polynesians are predominantly southern chinese in type. Hum. Hered. 40: 285-289.
- Troczynski, R. M., A. P. Bollon, and M. Fuke, 1983. The complete nucleotide sequence of the rat 18 S ribosomal RNA gene and comparison with the respective yeast and frog genes. Nucleic Acids Res. 11: 4879-4890.
- Tsintsof, A. S., M. S. Hertzberg, J. F. Prior, K. N. P. Mickleson, and Trent, 1990.  $\alpha$ -globin gene marker identify genetic differences between Australian Aborigines and Melannnesians. Am. J. Hum. Genet. 46: 138-143.
- Upholt, W. B., and I. B. Dawid, 1977. Mapping of mitochondrial DNA of individual sheep and goats: Rapid evolution in the D-loop. Cell 11:571-583.
- Wang, W., A. H. Liu, S. Y. Lin, H. Lan, B. Su, D. W. Xie, and L. M. Shi, 1994. Multiple genotypes of mitochondrial DNA within a horse population from a small region in Yunnan province of China. Biochem. Genetic 32:371-379.
- Watanabe, T., J. S. Masangkay, S. Wakana, N. Saitou, T. Tomita, 1989.

- Mitochondrial DNA polymorphism in native philippine cattle based on restriction endonuclease cleavage patterns. *Biochemical Genetics* 27:431-438.
- Watanabe, T., Y. Hayashi, N. Ogasawara, T. Tomoita, 1985. Polymorphism of mitochondrial DNA in pig based on restriction endonuclease cleavage patterns. *Biochemical Genetics*. 23: 105-113.
- Wada-kiyama, Y., and R. Kiyama, 1995. Conservation and periodicity of DNA band in the human  $\beta$ -globin gene locus. *J. Bio. Chem.* 270: 12439-12445.
- Wallace, D. C., K. Garrison, and W. C. Kniwer, 1985. Dramatic founder effects in Amerindian mitochondrial DNA. *Am. J. Phys. Anthropol.* 68:149-155.
- Wijers, E. R., C. Zijlstra, and J. A. Lenstra, 1993. Rapid Evolution of horse satellite DNA. *Genomic* 18:113-117.
- Wichman, H. A., C. T. Payne, O. A. Ryder, M. J. Hamitom, M. Maltbie, and R. J. Baker, 1991. Genomic distribution of heterochromatic sequence in Equids: implication to rapid chromosome evolution. *J. Heredity* 82:369-377.
- Wilson, A. C., R. L. Cann, S. M. Carr, M. George, G. B. Gyllensten, K. M. Helm-Bychowski, R. G. Higuchi, S. Palumbi, E. M. Prager, and M. Stoneking, 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.* 26:375-400.
- Wood, H. E. II., 1937. Perissodactyl suborders. *J. Mammal.* 18:106.
- Wu, C. I., and W. L. Li, 1985. Evidence for higher rates of nucleotide substitution in rodents than in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:1741-1745.
- Xhang, Y. P., and O. A. Ryder, 1993. Mitochondrial DNA sequence evolution in the Arctoidea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:9557-9561.
- Ximmerman, E. G., D. R. Akins, J. V. Planz, and M. J. Schurr, 1988. A Rapid procedure for isolating mitochondrial DNA. *Gene Anal. Techn.* 5:102-104.
- Xu, X., and U. Arnason, 1994. The complete mitochondrial DNA sequence of the

horse, *Equus caballus*: extensive heteroplasmy of the control region. *Gene*.  
148:357-362.

김 병 모, 1988. 제주문화의 고고학적 성격 고찰. 제주도 연구 제4차 전국학술대회집.  
pp55-61.



## 요약문

奇蹄目(Perissodactyla)은 현생 포유류 16목 가운데 하나의 목으로서 그 진화과정은 화석을 중심으로 매우 활발하게 연구되어왔다. 기제목에는 코뿔소과(Rhinocerotidae), 테이퍼과(Tapiridae) 말과(Equidae)가 현존하고 있다. 기제목은 효신세 후기에 북아메리카에서 출현하여 시신세 초기에 6科로 분화되었으나, 오늘날에는 아시아, 남아메리카, 아프리카에 3科만이 존재한다.

특히 馬科는 약 2.5 Mya에 분화되어 현재 1屬(Equus genus)에 4亞屬(Equus, Asinus, Dolichohippus, quagga)에 7種(*E. caballus*, *E. przewaskii*, *E. asinus*, *E. hemionus*, *E. kiang*, *E. greby*, *E. zebra*, *E. burchelli*, *E. quagga*)이 있으며, *E. caballus*만 제외하고 모두 야생종이다. 가축화된 *E. caballus*는 사람에 의한 영향을 가장 많이 받은 가축의 하나로서 유전적 구성은 매우 다양한 것으로 알려지고 있다.

포유동물의  $\beta$ -globin gene cluster 분석은 영장류, 우제목, 토끼목, 설치목, 그리고 유대동물에서 활발히 진행되어 포유동물의 진화과정을 이해하는 모델로 이용되어왔다.  $\epsilon$ -globin 유전자는  $\beta$ -globin gene cluster(5'- $\epsilon$ - $\gamma$ - $\eta$ - $\delta$ - $\beta$ -3')를 구성하는 유전자로서, 배발생시기에 발현되어  $\alpha$ -like globin 유전자의  $\zeta$ -globin과 함께 4량체 헤모글로빈(2 $\zeta$ 2 $\epsilon$ )을 형성한다. 본 연구는  $\epsilon$ -globin 유전자를 분석하여 기제목의 계통유연관계를 분석하였다. 기제목(Perissodactyla) 3科에는 馬科에 6종 (*E. caballus*, *E. przewaskii*, *E. asinus*, *E. hemionus*, *E. grevy*, *E. zebra*), 테이퍼과에 1종(*T. terrestris*), 코뿔소과에 1종(*C. simum*), 그리고 inbreed horse에서 PCR 기법을 이용하여  $\epsilon$ -globin 유전자를 분리하여 확인한 결과 1.475 kb 길이를 가지고 있었다. 각 種에서 PCR 방법으로 증폭된  $\epsilon$ -globin 유전자들은 A-T cloning과 sequencing분석을 실시하여 기제목의 계통유연관계 분석에 이용하였다. 또한 PCR-RFLP분석에서 제한효소 Hae III 처리결과는 제부라 얼룩마(*E. zebura*), 그레비 얼룩마(*E. grevy*), 아프리카 당나귀(*E. africanus*)는 가축마, 아시아 들당나귀(*E. asinus*), 몽고야생마(*E. przewaskii*)와는 다른 양상을 보였다.

기제목의  $\epsilon$ -globin 유전자의 구조적 특징을 보면, 먼저 5'-Flanking 영역의

CCAAT-box가 상류부위의 -85 지점, ATA-box는 -30 지점, 그리고 mRNA 와 리보솜이 결합하는 CTTCTC 분위는 +8 지점에 위치하고 있었다. 그리고 유전자 암호 영역인 엑손 1과 2를 분석한 결과 105개의 아미노산 coding으로 구성되어 있었으며, 아미노산 수준에서의 상동성을 사람과 산양에서 비교한 결과 각각 85%, 89%의 높은 상동성을 보였다.  $\epsilon$ -globin 유전자 비정보영역인 인트론 1(IVS1)과 2 (IVS 2)를 분석한 결과, 그 길이는 128 bp와 845 bp로 구성되어 있었다. 그러나 산양에서 처럼 insert element는 발견되지 않았다.

기제목의 계통수구성은  $\epsilon$ -globin 유전자분석을 기초로하여 UPGMA, NJ, PAUP program을 사용하여 계통유연관계를 분석하였다. 그 결과 코뿔소와 테이퍼가 가장 가까운 유연관계를 보였다. 말과에서의 계통유연관계는 아시아 들장나귀가 inbred horse 와 가깝게 나타났다. 흰코뿔소(*C. simum*)와 테이퍼(*T. terrestis*)가 하나의 group으로서 가장 가까운 유연관계를 보이고 있었으며, 馬科는 여기에서 sister group으로 나누어지고 있었다.

본 연구와 현재까지 보고된 영장목, 설치목, 우제목, 토끼목의  $\epsilon$ -globin gene를 gene alignment하여 포유류의 계통유연관계를 분석하였다. 그 결과 기제목과 우제목은 sister group을 형성하고 있다. 이 결과는 앞으로 기제류의 계통진화학적 연구와 포유동물의 globin gene 분석에 기초자료로 사용될 수 있다. 그리고 앞으로 연구는 genomic library를 만들어 현재까지 연구가 전무한  $\beta$ -globin gene cluster를 분석하는 연구가 요청된다.

한편, 제주 재래마의 유전적인 특징을 규명하고자 제주마 재래마에서 mitochondrial DNA을 분리한 후 Southern blot과 PCR 기법을 이용하여 제주마 mtDNA의 RFLP 특징과 cytochrome-b 유전자의 유전적 변이를 규명 하였다. 그 결과 제주마는 중국마와 일부 제한효소(*Eco* RI, *Hind* III, *Bam* HI)에서의 양상과 같은 결과를 보이고 있었다. 그리고 PCR 기법을 이용하여 제주마 집단에서의 cytochrome-b 유전자를 합성한 후 4 bp를 인지하는 제한효소 *Msp* I, *Hae* III를 처리한 결과 *Msp* I에서 유전적 변이가 발견 되었다.

본 연구에서 발견된 type을 A Type(900 , 240 bp)과 B type(760, 240, 130 bp)로 명명하였다. 제주마 집단에서 유전적 변이를 분석한 결과 A type이 21 두, B type이

4 두로서 A type이 높게 나타나는 결과를 보였다. 따라서 본 연구는 제주마를 중심으로 타 집단과의 비교연구가 요구되며, 특히 동아시아 재래마와의 비교연구가 요구된다.

Key word: 기제목,  $\epsilon$ -globin 유전자, southern blot, PCR, 계통유연관계, RFLP, 유전자 변이, cytochrome-b, mitochondrial DNA, 제한효소, 상동성.





## 감사의 글

본 논문을 마치기까지 오랜기간 동안 아낌없는 사랑과 충고로 이끌어주신 오문유 교수님께 먼저 감사를 드립니다. 그리고 부족한 저를 이끌어 주신 김세제 교수님과 김규일 교수님께 또한 감사드립니다. 본 논문의 마무리에 조언을 하여주신 서울대학교 생물학과 이정주 교수님, 강릉대학교 생물학과 남궁용 교수님께 진심으로 감사드립니다.

학문의 길로 인도하여 주신 생물학과 허인옥 교수님, 이용필 교수님, 오덕철 교수님, 김원택 교수님, 김문홍 교수님, 이화자 교수님, 고석찬 교수님께 감사 드립니다.

아울러 오랜기간 동안 실험실 생활을 같이 하면서 도움을 주신 여러 선배님과 동료, 그리고 후배들에게도 다시한번 감사를 전합니다.

지금까지 염려와 사랑으로 돌봐주신 어머니, 형님, 그리고 항상 곁에서 볼봐 주시는 장인, 장모님께도 이 자리를 빌어 감사드립니다. 사랑하는 아내와 딸 성현이 에게도 고마움을 전합니다.

1996년 여름

김 기 옥 拜