

근육 및 지방세포 분화 관련 유전자의 DNA Marker가 한우의 도체특성 및 육질에 미치는 영향

정구용*, 김우태¹ · 신성철¹ · 정의룡¹

상지대학교 생명자원과학대학 동물자원학과

¹상지대학교 생명자원과학대학 생명공학과

서 론

국내 쇠고기 소비량 증가와 함께 국민 식생활 수준의 변화로 최근에는 육류 소비 경향이 양에서 질로 전환되어 소비자가 우수한 육질의 고급육을 선호하는 추세에 있다. 따라서, 소비자의 기호와 입맛을 충족시킬 수 있고 쇠고기 수입자유화에 대응하는 고품질 쇠고기 생산 기술 개발이 절실히 요구되고 있다. 한우 고급육이란 근육내에 백색 지방이 골고루 침착되어 지방 교잡(marbling)이 잘 되어 있고 도체등급 판정결과 1등급을 받은 쇠고기를 말한다. 도체의 품질이나 육질은 사육기간과 급여하는 사료의 종류 등 사양관리에 따라서 크게 좌우되지만 육질에 대한 유전력이 30~50%로 매우 높아 유전적 요인에 의한 영향으로 품종 및 개체 간에 커다란 차이를 보인다. 따라서, 한우의 육질개선 및 고급육 생산을 위해 근내 지방도, 등심 단면적, 근내 지방산 조성, 등지방 두께 및 연도 등에 관여하는 기능성 유전자들을 탐색 발굴하고 이들 후보유전자의 DNA 변이를 육질형질과 관련성을 분석하여 DNA marker로 이용하는 기술은 매우 중요하다. Leptin은 소의 체지방 축적과 지방대사에 관여하는 호르몬으로 잘 알려져 있고⁽⁶⁾, H-FABP(heart fatty acid-binding proteins)은 세포막을 통한 세포내의 지방산 이용 장소로 지방산 수송에 관련되어 있으며 triacylglycerol 및 phospholipid 합성에도 관여한다⁽²⁾. 또한 MYF5(myogenic factor 5)는 근육세포 분화 및 발달에 중요한 역할을 담당하는 것으로 밝혀져 있다⁽⁴⁾. 본 연구는 생화학적 및 생물학적 기능으로 육우의 도체특성 및 육질에 관여하는 것으로 알려져 있는 이들 기능성 후보유전자들의 DNA 다형을 분석하고 한우 도체형질 및 육질관련 DNA 표지인자를 개발하고자 수행하였다.

재료 및 방법

본 연구에서 사용한 공시재료는 능력검정 프로그램에 등록되어 있고 도체성적을 보유한 한우 총 215두를 대상으로 혈액을 채취하여 genomic DNA는 Miller 등(1998)⁽⁵⁾의 방법으로

분리하였고 TE buffer(10mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA)에 용해하여 template DNA 시료로 이용하였다. Leptin, MYF5 및 H-FABP 3개 후보유전자들의 DNA 다형성은 PCR-RFLP 기법을 이용하여 분석하였고 RFLP marker 분석을 위한 제한효소 및 primer의 염기서열은 Table 1과

Table 1. Primer sequences and enzymes of candidate genes for PCR-RFLP analysis

Candidate gene	Primer sequence (5 to 3)	Enzyme	Fragment size (bp)
Leptin	GTCACCAGGATCAATGACAT	<i>Bgl</i> II	1,820
	AGCCCAAGTGAAGTCCAA		
MYF5	ACAGCGTCTACTGTCTGATG	<i>Taq</i> I	890
	CGTGGCATATACTAAGGACAC		
H-FABP	TACCTGGAAGTTAGTGGACAGC	<i>Msp</i> I	612
	CTTGGCTCTGCTTTATTGACCT		

같다. 즉, 각 후보유전자의 PCR 증폭을 위하여 반응액은 template DNA 50-80ng, primer 각 0.5 μ M, dNTP 각 200 μ M, 10 X PCR buffer 5 μ l 그리고 Taq DNA polymerase unit를 첨가하여 PCR 반응액을 총 20 μ l로 조정하였다. PCR cycle은 최초 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 예비가열한 후 94 $^{\circ}$ C에서 1분, annealing온도는 58 $^{\circ}$ C(leptin과 MYF5 유전자) 또는 55 $^{\circ}$ C(H-FABP 유전자)에서 1분 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 1분간의 cycle을 총 35회 반복한 다음 마지막으로 72 $^{\circ}$ C 5분간 가열하고 DNA 증폭과정을 완료하였다. PCR 종료 후 각 후보유전자들의 RFLP marker 분석을 위해 각각에 해당하는 제한효소로 절단하고 12-13% polyacrylamide gel을 이용한 전기영동으로 분리한 다음 ethidium bromide 또는 silver 염색법으로 DNA band를 검출하고 각 검정 개체별 RFLP marker 유전자형을 판정하였다. 육질 판정 등급에 따라 고급육과 저급육으로 구분하여 선발한 두 그룹 간에 각 후보유전자의 대립유전자 빈도의 차이는 chi-square 검정법으로 분석하였다. 그리고 도체특성 및 육질에 대한 RFLP marker의 영향을 추정하기 위하여 SAS[®] 8.1 Package/PC(SAS, 1990)를 이용하여 일반 선형모형(GLM)으로 통계 분석하였다.

결과 및 고찰

Leptin, MYF5 및 H-FABP 3개 기능성 후보유전자의 PCR-RFLP 분석을 위해 관련 유전자의 영역에 특정 염기서열을 포함하는 primer를 이용하여 증폭한 후 PCR 증폭산물을 *Bgl* II, *Taq* I 및 *Msp* I 제한효소로 각각 절단하고 polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 후 제한효소 인지부위의 존재 여부에 따라 검출된 RFLP 전기영동상은 Fig. 1, 2 및 3에 각각 제시한 바와 같다. Leptin 유전자는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 AA homo형은 900 bp와 280 bp 크기의 2개 band, BB homo형은 620bp와 280bp의 2개 band 그리고 AB hetero형은 900, 620 및 280 bp의 3개 band가 모두 발현된 양상을 나타냈다. MYF5 유전자(Fig. 2)는 AA homo형은 445bp와 96bp, BB homo형은 352bp와 96bp 그리고 AB hetero형은 445, 352 및 96bp 3개 band로 분리되었으나 96bp 크기의 작은 단편은 가시적으로 확인되지 않았다. 한편, H-FABP 유전

자(Fig. 3)는 AA homo형의 경우 298bp와 251bp, BB homo형은 361bp와 251bp 그리고 AB hetero형은 이들 3개의 단편을 모두 공유하는 band 양상을 보였다. 따라서 한우에서 이들 후보유전자들은 모두 A와 B 두개의 대립유전자에 의해 지배되는 AA, AB 및 BB 3종류의 RFLP marker 유전자형이 확인되었다. 검정 집단내 각 후보유전자들에 대한 대립유전자 빈도를 추정한 결과 leptin 유전자는 A와 B 대립유전자 빈도가 각각 0.57과 0.43이었고 MYF5 유전자는 각각 0.61과 0.39 그리고 H-FABP 유전자는 각각 0.90과 0.10으로 분석되었다. 한편, 육질 등급에 따라 고급육과 저급육으로 분리 선발한 두 그룹간의 대립유전자 출현빈도를 통계 분석한 결과 leptin과 MYF5 유전자에서 각각 유의차($P < .05$)가 인정되었다.

3개 후보유전자의 유전자형이 도체중(CW), 도체율(DP), 등지방 두께(BFT), 배장근 단면적(EMA) 및 근내 지방도(MS)에 영향을 미치는 효과를 규명하기 위하여 이들 후보유전자의 RFLP marker 유전자형과 각 도체형질과의 관련성을 통계 분석하였다(Table 2). Leptin 유전자는 등지방 두께에 유의적인 영향($P < .05$)을 미치는 것으로 나타났다. 즉, BB 형이 1.43cm으로 AA형의 0.66cm에 비해 등지방 두께가 약 0.77cm 정도 더 높게 추정되었다. MYF5 유전자는 배장근 단면적에 유의적인 영향($P < .05$)을 나타내 AA 형이 98.82 cm²로 BB 형의 81.94 cm² 보다 배장근 단면적이 약 16.88 cm² 더 넓은 것으로 분석되었다. 그러나, 이들 유전자는 근내지방도에 유의적인 영향을 미치지 않았으며 H-FABP 유전자는 어느 도체형질들과도 통계적 유의성이 인정되지 않았다. leptin 호르몬은 체지방 축적과 지방 대사에 관여하며 MYF5는 골격근의 분화 및 발달에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 근육 및 지방세포 분화에 관련된 이들 두 유전자의 PCR-RFLP 유전자형은 한우의 등지방 두께와 배장근 단면적이 높은 개체 선발을 위한 DNA marker로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

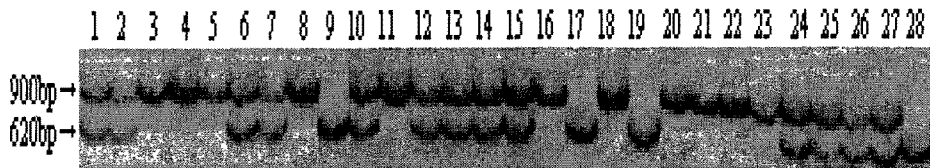


Fig. 1. RFLP markers of leptin gene in 12% polyacrylamide gel following digestion with *Bgl II* enzyme. Lanes 3-5, 8, 11, 16, 18, 20-22 and 23, AA type; lanes 1, 2, 6, 7, 10, 12-15, 24-26 and 27, AB type; lanes 9, 17, 19 and 28, BB type.

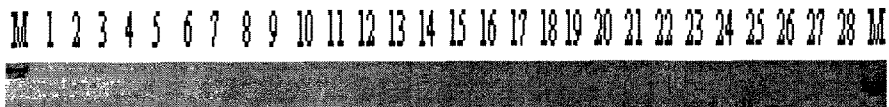


Fig. 2. RFLP markers of MYF5 in 13% polyacrylamide gel following digestion with *Taq I* enzyme. Lanes 12, 13, 23 and 25, AA type; lanes 1-3, 9, 15, 18, 19, 21 and 24, AB type; lanes 4-8, 10, 11, 14, 16, 17, 20, 22, 26, 27 and 28, BB type. M: molecular size marker(100bp DNA ladder).



Fig. 3. RFLP markers of H-FABP in 12% polyacrylamide gel following digestion with *Rsa* I enzyme. Lanes 1, 5-12, 14, 15, 18-24 and 25, AA type; lanes 2, 3, 4, 13, 16 and 17, AB type. M : molecular size marker(100bp DNA ladder).

Table 2. Least square means and standard errors of carcass composition for leptin, MYF5 and H-FABP genotypes in Korean cattle

Candidate gene	Genotype	Carcass traits				
		CW(kg)	DP(%)	BFT(cm)	EMA(cm ²)	MS(point)
		LSM±SE	LSM±SE	LSM±SE	LSM±SE	LSM±SE
Leptin	AA	481.43±78.47	60.80±2.35	0.66±0.52 ^b	91.63±7.92	3.92±1.01
	AB	479.43±78.02	60.54±1.56	0.94±0.38 ^{ab}	89.23±8.53	3.83±0.94
	BB	486.82±77.25	60.51±2.84	1.43±0.64 ^a	88.26±8.23	3.82±0.48
MYF5	AA	482.35±81.71	61.29±2.13	0.94±0.38	98.82±7.92 ^a	3.94±0.98
	AB	487.58±94.47	60.27±2.22	1.04±0.45	86.52±8.22 ^{ab}	3.77±0.96
	BB	479.75±90.46	61.26±2.52	1.03±0.54	81.94±8.37 ^b	3.59±0.72
H-FABP	AA	485.39±94.25	59.27±2.46	0.98±0.42	93.00±7.60	3.71±0.83
	AB	488.76±98.94	61.66±2.04	1.09±0.53	96.13±7.60	3.64±0.88

Superscripts with different letters in the same column significantly differ ($P < .05$). CW=Carcass weight; DP=Dressing percentage; BFT=Backfat thickness; EMA=Eye muscle area; MS=Marbling score (ranges 1-5).

요 약

본 연구는 근육 및 지방세포 분화에 관여하는 leptin, MYF5 및 H-FABP의 3개 기능성 후보 유전자가 한우의 도체특성 및 육질에 미치는 영향을 분석하기 위하여 이들 유전자의 PCR-RFLP marker와 도체형질과의 관련성을 분석하였다. Leptin, MYF5 및 H-FABP 유전자에서 AA, AB 및 BB 3종류의 RFLP 유전자형이 각각 검출되었고 A와 B 대립유전자 빈도는 각각 0.57과 0.43, 0.61과 0.39 그리고 0.90과 0.10으로 추정되었다. 육질 등급에 따라 고급육과 저급육으로 분리 선발한 두 그룹간의 대립유전자 출현빈도를 비교한 결과 leptin과 MYF5 유전자에서 각각 통계적 유의차($P < .05$)가 인정되었다. 또한 각 후보유전자의 RFLP marker 유전자형이 도체형질에 미치는 효과를 분석한 결과 leptin 유전자는 등지방 두께 그리고 MYF5

유전자는 배장근 단면적에 각각 유의적인 영향($P < .05$)을 미치는 것으로 분석되었다. 그러나 H-FABP 유전자는 도체형질들과 유의성이 인정되지 않았다. 따라서, leptin과 MYF5 유전자는 한우의 도체특성 및 육질 개선을 위한 DNA marker로 이용 가능할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Beever, J. E. et al. (1990) *J. Anim. Sci.*, **68**, 337-344.
2. Gerbens, F. et al.(1999) *J. Anim. Sci.*, **77**, 846-852.
3. LI, C. et al.(2004) *J. Anim Sci.*, **82**, 1-7.
4. Miller, S. A. et al.(1988) *Nucleic Acids Res.* **16**, 1215.
5. Sellier, P. (1994) *Meat Sci.*, **39**, 29-44.
6. Willis, J. S. et al. (1998) *Anim. Biotechnol.*, **9**, 1-14.