

## 돼지 melanocortin-4 receptor (MC4R) 유전자의 경제형질과의 연관성에 관한 연구

김관석 · 신희영 · 이종재 · 홍성광<sup>1</sup> · 최봉환<sup>2</sup> · 김태현<sup>2</sup> · 이학교<sup>3</sup> · 조병욱<sup>4\*</sup>

충북대학교 축산학과, <sup>1</sup>대한양돈협회 종돈능력검정소, <sup>2</sup>농촌진흥청 축산연구소, <sup>3</sup>한경대학교 유전정보연구소, <sup>4</sup>밀양대학교 동물자원학과

Received November 8, 2005 / Accepted December 6, 2005

**Investigation of Porcine Melanocortin-4 Receptor (MC4R) Polymorphism on Economic Traits.** Kwan-Suk Kim, Hee Young Shin, Joong-Jae Lee, Sung-Kwang Hong<sup>1</sup>, Bong-Hwan Choi<sup>2</sup>, Tae-Hun Kim<sup>2</sup>, Hak-Kyo Lee<sup>3</sup> and Byung-Wook Cho<sup>4</sup>. Department of Animal Science, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea, <sup>1</sup>Performance Testing Station, Korea Swine Association, Seoul 467-811, Korea, <sup>2</sup>Animal Genomics and Bioinformatics Division, National Livestock Research Institute, Suwon 441-706, Korea, <sup>3</sup>Genetic Information Research Center, Hankyung University, Ansung 456-749, Korea. <sup>4</sup>Department of Animal Science, Miryang National University, Miryang 627-702, Korea – The Melanocortin-4 receptor gene (MC4R) regulates the energy balance and the genetic basis of obesity. A polymorphism in the porcine melanocortin-4 receptor has previously shown to be associated with growth, fat deposition and feed intake. In this study, the polymorphism of the gene was studied in several pig breeds of Duroc, Landrace, Berkshire, and Yorkshire. The results showed that the frequencies of MC4R genotype varied among those breeds. Association analyses were also performed between the MC4R polymorphism and average daily gain, feed conversion ratio, backfat thickness and lean percentage phenotypes. The results strongly support that the MC4R polymorphism can be used DNA marker selection indicator for economically important traits for pig breeding program in Korea.

**Key words** – Economic traits, pig, PCR-RFLP, Polymorphism, MC4R

Melanocortin-4 receptor (MC4R) 유전자는 G-Protein coupled receptor의 한 종류로서 영양분섭취에 의한 에너지 유입, 신체활동, 기초대사에 의한 에너지 소비가 적절하게 균형을 이루도록 조절하는 leptin 호르몬의 반응에 부분적으로 관련이 있고 인간을 포함한 포유동물의 에너지 조절에 중요한 기능을 담당하고 있는 것으로 알려져 있다[1]. 또한 인간 MC4R 유전자에 존재하는 DNA 변이가 성인 비만에 약 4~5%정도 영향을 미치는 것으로 보고 되고 있으며, 인체비만의 유전요인 조기 진단과 치료제 개발을 위해서도 많은 연구가 진행되고 있다[2-4].

MC4R 유전자는 돼지의 성장(growth rate)과 체조성(body composition)에 영향을 미칠 수 있는 매우 중요한 후보유전자라고 간주될 수 있는데, 이 유전자에 존재하는 G/A DNA 변이(Asp298Asn)가 다양한 돼지품종에서 사료섭취, 도체지방 및 성장형질에 현저하게 영향을 미친다는 것이 이미 밝혀진 바 있다[5-7]. 하지만 Meishan 품종을 이용한 합성돈 집단과 Large White와 Wild Boar간의 교배집단에서는 MC4R 변이와 성장 및 체조성에 관한 연관성이 나타나지 않았다[5,8].

돼지 MC4R 유전자 변이가 위치하는 단백질의 아미노산은 Melanocortin receptor들 사이에서 구조적으로 잘 보존된 영역에서 발견되었는데, 이렇게 보존된 아미노산 서열들이 가지고 있는 단백질의 기능에 관한 연구결과, Asp298Asn

MC4R 변이가 adenylyl cyclase의 활성화에 영향을 주어 돼지의 성장과 체조성에 차이를 나타내는 것이라고 판단되었다[9]. 하지만 MC4R 유전자가 위치하는 돼지 염색체 1번 영역에서 MC4R 유전자 양쪽 주위에 두 개의 suggestive QTL이 보고되면서, 일부 돼지 축군에서는 MC4R 변이와 표현형과의 연관성(linkage)에 차이가 나타날 수 있다고 시사하였다[8].

따라서 본 연구는 국내 돼지 품종 집단간에 MC4R 변이 유전자의 빈도 특성을 분석하고, 이를 바탕으로 양돈 산업현장에서 우수한 종돈을 선발하는데 MC4R 유전자 이용의 타당성을 조사하기 위해 돼지 품종의 경제형질인 등지방 두께, 일당중체량, 사료 요구율, 정육률과 MC4R 유전자 다형성에 대한 관계를 규명하였다.

### 재료 및 방법

#### 공시재료

본 연구는 2004년 4월부터 2005년 3월 까지 대한양돈협회 산하 검정소에 입식되어 우수한 종돈을 선발하기 위해 측정된 형질인 체중 30 kg부터 체중 90 kg에 도달할 때까지의 일당중체량, 사료요구율, 등지방두께 정육률 자료를 이용하였다(Table 1). 품종별로는 Duroc, Landrace, Berkshire, Yorkshire를 포함하고 있으며, 공시축의 혈액으로부터 genomic DNA 추출은 Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer<sup>TM</sup>)와 Toyobo MagExtractor Kit (Toyobo)를 이용하

\*Corresponding author

Tel : +82-55-350-5515, Fax : +82-55-350-5519

E-mail : bwcho@mnu.ac.kr

Table 1. Summary of overall means and standard deviations on performance traits

Breed	Daily Gain (g)	Feed Conversion (%)	Backfat (cm)	Meat Percentage (%)
Duroc (n=618)	1117.08±88.46	2.25±0.15	1.31±0.17	57.19±2.63
Landrace (n=127)	1021.17±94.67	2.33±0.14	1.42±0.23	56.53±3.31
Berkshire (n=66)	1027.45±93.42	2.32±0.13	1.26±0.16	57.38±2.21
Yorkshire (n=192)	1045.46±98.81	2.30±0.15	1.37±0.24	56.85±3.12

였다.

**PCR에 의한 DNA 증폭**

돼지 MC4R의 다형성 검정을 위한 primer는 Kim 등 [2000]이 보고한 염기서열 forward 5'-TAC CCT GAC CAT CTT GAT TG-3'와 reverse 5'-ATA GCA ACA GAT GAT CTC TTT G-3'을 이용하였다.

돼지 MC4R 유전자를 증폭하기 위한 PCR 반응은 약 20 ng의 주형 DNA, primer 각 10 pmol, dNTPs 50 µM, 10X reaction buffer 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> 및 1 unit *Taq* polymerase (Enzymomics, Korea)를 혼합하여 최종 반응액은 10 µl로 하였다. 반응조건은 PTC-100 (MJ, USA)를 사용하여, 94°C에서 2분간 denaturation한 후 94°C에서 30초(denaturation), 62°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분 20초 extension을 35cycle 수행한 후 마지막으로 72°C에서 10분간 최종 extension 과정을 수행하였다. PCR 증폭 산물은 1% TBE agarose gel을 이용하여 확인하였으며, 돼지의 MC4R 유전자 다형성분석은 제한효소 *Taq* I 을 이용하

여 65°C에서 6시간동안 처리한 후 2% agarose gel에 전기영동을 실시한 후 유전자형을 결정하였다(Fig. 1).

**통계적 분석**

조사된 경제형질 측정치에 대한 MC4R 유전자형의 효과를 추정하기 위해 SAS 8.1 Package/PC[10]를 이용하여 다음과 같은 일반선형모형(GLM) 분석을 하였으며, 통계모델은 품종, 성별, MC4R 유전자형을 포함하였다. MC4R 유전자형의 각 형질별 효과를 알아보기 위해 최소제곱 평균치(least square mean)간의 유의성 검정을 실시하였다. Duroc 품종내 MC4R 유전자형의 효과를 추정하는 통계모델에서는 품종효과를 제외하고 SAS GLM 분석을 수행하였다.

**결과 및 고찰**

**MC4R 유전자형 빈도의 품종별 분석**

검정소에 입식된 주요 상업종돈별 MC4R 유전자형빈도는 Table 2에 요약되었다. Duroc DD형 빈도는 0.05, DN형 빈도 0.46, NN형 빈도 0.49, Landrace DD형 빈도는 0.46, DN형 빈도 0.44, NN형 빈도 0.10, Berkshire DD형 빈도 0.56, DN형 빈도 0.39, NN형 빈도 0.05, Yorkshire DD형 빈도는 0.04, DN형 빈도 0.42, NN형 빈도 0.54로 분석되었다. 이러한 돼지 품종별 MC4R 유전자형의 분포결과는 이전의 보고와 현저한 차이를 나타내지 않았다[5]. 하지만 성장률이 상대적으로 높은 Duroc과 Yorkshire 품종에서 NN 유전자형의 빈도가 높은 경향을 나타내고 있어, NN 유전자형이 높은 성장률에 연관성이 있을 수 있다는 결과를 확인하였다.

**MC4R 유전자형의 형질 연관성 분석**

Table 3은 MC4R 유전자형이 형질에 미치는 효과를 나타

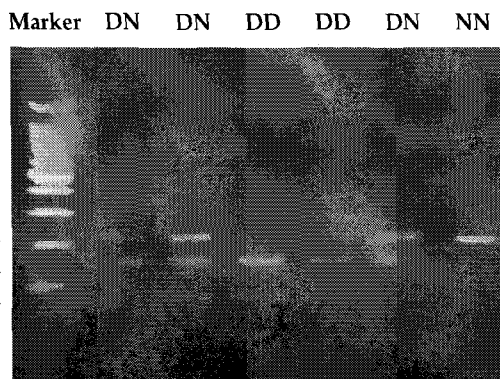


Fig. 1. PCR-RFLP patterns of porcine MC4R gene digested with *Taq* I restriction enzyme.

Table 2. MC4R genotypic and allelic frequencies in four commercial pig breeds

Breed	Number of pigs	Genotypic Frequency			Allelic Frequency	
		DD	DN	NN	D	N
Duroc	618	0.05	0.46	0.49	0.28	0.72
Berkshire	66	0.56	0.39	0.05	0.76	0.24
Landrace	127	0.46	0.44	0.1	0.68	0.32
Yorkshire	192	0.04	0.42	0.54	0.25	0.75

Table 3. Least squares means and standard errors for the performance traits by MC4R genotypes in four breeds combined data (n=1003)

MC4R genotype	Daily Gain (g)	Feed Conversion (%)	Backfat (cm)	Meat Percentage (%)
DD	<sup>a</sup> 1024.71±7.29	<sup>a</sup> 2.3215±0.0127	<sup>a</sup> 1.32±0.02	<sup>a</sup> 57.53±0.25
DN	1035.08±4.81	<sup>a</sup> 2.3237±0.0084	<sup>b</sup> 1.35±0.01	<sup>b,a</sup> 56.84±0.16
NN	<sup>b</sup> 1043.98±5.54	<sup>b</sup> 2.2901±0.0097	<sup>b</sup> 1.40±0.01	<sup>b,b</sup> 56.23±0.19

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts within column are significantly different, P<0.05.

Table 4. Least squares means and standard errors for the performance traits by MC4R genotypes in the Duroc breed data (n=618)

MC4R genotype	Daily Gain (g)	Feed Conversion (%)	Backfat (cm)	Meat Percentage (%)
DD	<sup>a</sup> 1014.86±18.74	<sup>a</sup> 2.3638±0.0320	<sup>a</sup> 1.31±0.04	<sup>a</sup> 57.32±0.57
DN	1064.20±11.03	<sup>b,a</sup> 2.3054±0.0188	<sup>b</sup> 1.36±0.02	<sup>b,a</sup> 56.64±0.33
NN	<sup>b</sup> 1067.46±11.32	<sup>b,b</sup> 2.2786±0.0193	<sup>b</sup> 1.41±0.02	<sup>b,b</sup> 55.99±0.34

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts within column are significantly different, P<0.05.

낸 것으로서, MC4R NN유전자형을 가진 개체들과 DD 유전자형을 가진 개체들의 일당증체량은 일단 유의적으로 차이가 있는 것으로 나타났다(1043.98 g/day vs. 1024.71 g/day). 또한 MC4R DD유전자형을 가진 개체들의 사료요구율이 MC4R DN이나 NN 유전자형을 가진 개체보다 유의적으로 높은 것으로 나타났다(P<0.05). 하지만 이 결과는 MC4R DD 유전자형의 개체들이 DN이나 NN 유전자형을 가진 개체들보다 유의적으로 낮은 등지방두께와 높은 정육율을 나타냄에 따라, MC4R NN유전자형의 높은 일당증체량은 결국 돼지의 체지방의 증가에 관련이 있을 것으로 사료된다. 또한 현재 검정소에서 실시되고 있는 사료요구율의 계산은 검정돈 2두의 체중이 180 kg에 도달할 때까지 섭취한 사료총량으로 산출하게 되어 있어, 개체별로 MC4R 유전자형에 따른 사료요구량의 차이를 정확히 반영하고 있지 못하다. 따라서 본 실험의 결과에서 나타난 것은 MC4R DD 유전자형을 가진 개체들은 일당증체량은 낮지만, 등지방 두께가 얇고 도체율이 우수하다는 것과, MC4R NN 유전자형을 가진 개체들의 높은 일당증체량은 체지방 축적의 증가와 관련이 있다는 것이다.

품종별로 샘플수의 차이로 인해 품종별 MC4R 유전자형에 따른 형질별 연관성분석은 샘플수가 가장 큰 Duroc 품종 집단에서만 조사하였는데, Duroc 품종에 대한 MC4R 변이의 형질 영향은 연구된바 없어 이번 연구를 통해 최초로 보고되는 것이다. Duroc 집단내에서도 MC4R NN유전자형을 가진 개체들이 DN이나 NN 유전자형을 가진 개체들보다 일당증체량이 높고, 사료요구율이 우수한 것으로 나타났다(Table 4). 하지만 MC4R DD 유전자형을 가진 개체들이 DN이나 NN유전자형을 가진 개체들보다 등지방층이 얇고, 도체율이 높게 나타났다(Table 4). 따라서 본 실험에서 얻어진 결과는 검정소에서 검정되고 있는 일당증체량, 등지방층, 사료요

구율에 MC4R 유전자형이 유의적인 영향을 미치는 것으로 확인된 것으로, 앞으로 MC4R 유전자의 유전자형을 검정돈의 능력을 평가하는 선발지수식에 적용한다면, 우수한 개체를 정확히 식별하는데 유용할 것으로 사료된다. 또한 돼지품종별로 MC4R의 유전자형 빈도 차이가 크게 나타나는데, 품종별로 MC4R 유전자형을 이용하여 우수한 개체를 조기 선발하는데 도움이 될 것으로 사료된다.

### 요 약

본 연구는 Duroc, Landrace, Berkshire, Yorkshire를 기초축으로 이용한 1003두에 대해 MC4R 유전자의 PCR-RFLP를 이용하여 그 다형성을 조사하고 돼지의 일당증체량, 등지방 두께, 사료 요구율, 정육율과 그 유전자형 간의 연관성을 규명하고자 실시하였다. MC4R 유전자에 대해 PCR-RFLP를 이용하여 226 bp 산물을 증폭한후 *Tag I* 제한효소로 사용하였다. 얻어진 MC4R gene의 유전자 빈도는 품종별로 다르게 나타났다. 통계적 분석을 통하여 각 유전자형에 대한 경제형질과 관련성을 분석한 결과 일당 증체량과 사료요구량은 NN 유전자형을 가진 개체들이 DN이나 DD유전자형을 가진 개체들에 비해 유의적으로 우수한 능력을 보였다(P<0.05). 하지만 D 대립유전자는 높은 정육율과 낮은 등지방두께에 연관성이 있음을 관찰하였다. 따라서 돼지의 성장과 정육율과 관련된 선발력을 높이기 위해서 MC4R 유전자의 다형성분석에서 검증된 PCR marker를 우량돼지육종 계획에 있어 분자생물학적 선발 marker로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 축산연구소 경상 연구비와 바이오그린 21 사업

인 돼지 유전체 정보를 활용한 육질관련 DNA chip 및 산업화 시스템 개발(20050401-034-804-130-00-00) 연구과제 및 경기도청 고품질친환경농축산물생산기술연구센터(GRRC) 과제 “돼지 경제형질에 대한 유전체 탐색 및 육종 응용 기술 개발” 연구비 지원에 의해 수행된 연구이며 관계자들에게 깊은 감사를 드리는 바입니다.

### 참 고 문 헌

1. Farooqi, I. S., J. M. Keogh, G. S. Yeo, E. J. Lank, T. Cheetham and S. O'Rahilly. 2003. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin-4 receptor gene. *N. Engl. J. Me.* **348**, 1085-1089.
2. Hernandez-Sanchez, J., P. Visscher, G. S. Plastow and C. Haley. 2003. Candidate gene analysis for quantitative traits using the transmission disequilibrium test: the example of the melanocortin-4 receptor in pigs. *Genetics.* **164**, 637-644.
3. Hinney, A. S. Hohmann, F. Geller, C. Vogel, C. Hess, AK. Wermter, B. Brokamp, H. Goldschmidt, W. Siegfried, H. Remschmidt, H. Schafer, T. Gudermann, and J. Hebebrand. 2003. Melanocortin-4 receptor gene: case-control study and transmission disequilibrium test confirm that functionally relevant mutations are compatible with a major gene effect for extreme obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 4258-4267.
4. Houston, R. D., N. D. Cameron and K. A. Rance. 2004. A melanocortin-4 receptor (MC4R) polymorphism is associated with performance traits in divergently selected Large White pig populations. *Anim. Genet.* **35**, 386-390.
5. Kim, K. S., J. M. Reecy, W. H. Hsu, L. L. Anderson and M. F. Rothschild. 2004. Functional and phylogenetic analyses of a melanocortin-4 receptor mutation in domestic pig. *Domestic Anim Endocrinol.* **26**, 75-86.
6. Kim, K. S., N. Larsen, T. Short, G. S. Plastow and M. F. Rothschild. 2000. A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits. *Mamm. Genome.* **11**, 131-135.
7. Park, H. B., O. Carlborg, S. Marklund and L. Andersson. 2002. Melanocortin-4 receptor (MC4R) genotypes have no major effect on fatness in a Large White x Wild Boar intercross. *Anim Genet.* **33**, 155-157.
8. SAS. 2000. SAS/STAT User's guide. SAS institute Inc., Cary, NC., USA.
9. Seeley, R. J., D. L. Drazen and D. J. Clegg 1997. The critical role of the melanocortin system in the control of energy balance. *Annu. Rev. Nutr.* **24**, 133-149.
10. Tao, Y. X. 2005. Molecular mechanisms of the neural melanocortin receptor dysfunction in severe early onset obesity. *Mol. Cell Endocrinol.* **239**, 1-14.