한우 Leptin 유전자의 단일 염기 다형성 분석

이정민* · 송기철* · 이종영** · 김영봉*
건국대학교 동물생명공학과*, 국립보건연구원 유전체센터**

Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms of Leptin Gene in Hanwoo (Korean Cattle)

J. Min Lee*, G. C. Song*, J. Y. Lee** and Y. B. Kim*
Department of Animal Biotechnology, Konkuk University*,
National Genome Research Institute, Korea National Institute of Health**

ABSTRACT

Leptin, the product of the obese (*ob*) gene, is an adipocyte-derived hormone for the regulation of whole-body energy storage and energy usage. It has been reported that the homozygous mutations in the gene for leptin (*LEP*) induce obesity and reduce energy expenditure. In cattle, *LEP* has significant roles directly or indirectly related with phenotypes such as body weight and fat deposits, therefore SNPs of *LEP* have been considered important genetic marker to estimate carcass fat content in cattle. In this study, SNPs were screened in *LEP* (2,222 bp) between intron 1 to 3'-UTR from 24 independent Hanwoo (Korean cattle) by PCR and DNA sequencing. Total 25 SNPs were found and two nonsynonymous SNPs including T1163A (V19E) and G3256A (G132D) were newly detected only from Hanwoo. Among 20 SNPs previously reported in cattle, 16 SNPs were found in Hanwoo; however, the frequencies of some SNPs were significantly different between Hanwoo and western cattle breeds. The other 4 SNPs were not detected from Hanwoo. These Hanwoo specific SNP patterns in *LEP* will be used in development of molecular marker and application to genetic improvement of Hanwoo.
(**Key words** : Leptin, Single nucleotide polymorphisms (SNPs), Hanwoo (Korean cattle))

Ⅰ. 서 론

가축에 있어서 분자유전학적 기술의 발달은 경제 형질에 영향을 미치는 주요한 유전자에 대한 탐구를 가속화하여, 분자 육종에 의한 가축 개량이 점차 가능해 지고 있다. 한우는 다른 외국 품종과 차별적 육질 특성(근내 지방 교잡종)을 보이는 육용종으로 알려져 있다. 따라서 고급 육질을 제공하는 품종으로서의 개량 성과를 높이기 위해 분자 육종의 측면에서 육질 관련 형질에 관여하는 유전자들의 특성에 대한 분석은 매우 중요하다(임 등, 2004). 육우에서는 매우 중요한 경제 형질로서 성장률, 근내 지방, 등심 단면적 및 등 지방 두께 등을 들 수 있으며, 이러한 육질의 형질과 지방의 축적, 에너지 대사 및 체중에 있어서 중요한 역할을 하는 유전자로서 leptin 유전자가 알려져 있다. Leptin 유전자(LEP)는 비만 유전자로서 처음 생쥐에서 positional cloning법에 의해 분리되었으며, 3.2 kb cDNA로 167개의 아미노산을 암호화하고 있다 (Zhang 등, 1994). 소 (Ji 등, 1998), 인간 (Isse 등, 1995), 침팬지(GenBank PTU96450), 고릴라 (GenBank GGU72872), 돼지 (Bidwell 등, 1997; Ramsay 등, 1998), 개 (Iwase

First two authors contributed equally to this work.
Corresponding author : Young Bong Kim, Department of Animal Biotechnology, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea. Tel : +82-2-450-4208 E-mail : kimera@konkuk.ac.kr

등, 2000), 고양이(Sasaki 등, 2001)에서 leptin 유전자의 염기서열 정보가 보고되어 있다. Leptin 단백질은 혈청 내에서 순환하는 16 kDa의 단백질로서 위 근육, 태반 그리고 유방 상피세포 등에서 발현되지만, 주로 지방세포(adipocytes)에서 분비되는 호르몬으로 음식물이 흡수되는 양에 따라 증가하거나 감소한다(Ahima와 Flier, 2000). 또한 체내 에너지가 소비될 때 증가하며, 몸무게의 항상성과 에너지 균형 조절인자로써 식욕을 억제하기 위해 지방을 저장하고, 그 크기를 조절하는 중요한 역할을 하고 있다(Halass 등, 1995; Weigle 등, 1995; Hwa 등, 1997). 생체 내에서 비만의 발생과 진행을 방지하기 위해 뇌 속의 시상하부에 체중의 증가와 감소를 조절하는 중요한 역할을 담당하고 있으며, 시상하부에서 몸 안의 여러 가지 정보를 받아 신체의 지방량을 일정 수준으로 유지시키는 역할을 한다. 정상적인 생체 내 기전은 지방세포에서 정상적인 비만 단백질이 분비되고 이 단백질이 뇌의 비만 수용체와 결합, 포만중추를 자극해 식욕을 적절하게 조절한다. 반면 비만인 개체는 지방세포에 있는 비만 관련 유전자가 돌연변이를 일으켜 비만 단백질이 변형되고 또한 혈중으로 분비되지도 않아 포만중추는 아무런 자극을 받지 못해 계속 음식을 섭취하게 된다(Campfield 등, 1995, Halaas 등, 1995, Pelleymounter 등, 1995; Fruhbeck 등, 1998). 그러므로 비만 유전자의 변이는 에너지 대사의 변화, 지방대사 및 지방축적 등에 깊은 관계가 있으며, 비만 유전자 leptin의 경우 leptin의 수준에 따라 사료 섭취량이 조절되며 체지방의 축적과 지방의 에너지로서의 사용 정도가 다른 것으로 알려져 있다(Halaas 등, 1995; Ahima와 Flier, 2000; 임 등, 2004)

축산 분야에서 이러한 분자생물학적 기능을 갖는 유전자 혹은 유전적 마커 정보를 이용하여 동량의 사료 또는 사료효율이 우수한 비육우나 육질이 우수한 개체를 유전적 선발방법에 의한 개량 및 조기에 선발함으로써 개체의 부가가치를 높일 수 있고, 이는 농가의 경제적 이익을 제고할 수 있는 방법 중의 하나이다. Leptin 유전자의 하류에 위치하는 BM1500 microsatellite 마커와 지육율에 대한 상관관계를 조사한 결과 138/138 homozygous 소는 % rib fat이 평균치에 비해 약 1.5% 높게 나타난 것을 보고하고 있다(Carolyn 등, 1998).

본 연구에서는 한우 24두로부터 genomic DNA를 추출하여 leptin 유전자의 exon 및 intron 부위를 포함한 2,222 bp를 PCR법으로 증폭하였고, 이들의 염기서열을 결정하여 한우에 존재하는 단일 염기 다형성(single nulcleotide polymorphisms, SNPs)을 발굴하였다. 발굴된 단일 염기 다형성 정보를 분석하여 한우 특이적 단일 염기 다형성과 외국 소 특이적 단일 염기 다형성 정보를 분석하였으며, 한우 특이적 SNP 정보들은 금후 한우의 유전적 개량 및 수입육과의 구분 등에 중요한 정보를 제공할 것이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 공시축 및 genomic DNA 분리

본 연구에 사용한 공시축은 경기도 안성 및 충남 당진 지역에서 사육 중인 한우 비육우로서, 도체 체중 320 kg 이상에 도달한 24두로부터 도살 시 항응고제 ACD 용액이 들어있는 VACUTAINER (BD medical, U.S.A)에 전혈(5 ml)을 채취하여 −20℃의 냉동고에 보관하였다. DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN Co., USA)을 이용하여 전혈로부터 genomic DNA를 추출, 정제하였으며 요약하면 다음과 같다. Microcentrifuge tube에 전혈 200 µl를 분주 한 후, 20 µl의 protease (10 mg/ml)와 4 µl의 RNase A (100 mg/ml)를 첨가하여 55℃에서 16시간 배양하였다. Kit에 포함된 AL Buffer 200 µl를 넣고 가볍게 혼합한 후, 56℃에서 10분간 배양한 후, 99% ethanol 200 µl를 넣어 혼합 후, 이 혼합액을 2 ml collection tube 안에 있는 spin column에 옮기고 8,000 × g로 1분간 원심분리 하였다. Spin column을 새로운 tube에 옮긴 후, Kit에 포함된 AW1 Buffer 500 µl를 넣고, 8,000 × g로 1분간 원심분리 하였다. Spin column을 새로운 tube에 옮긴 후, AW2 Buffer 500 µl를 넣고 13,000 × g에서 3분간 원심분리한 후,

microcentrifuge tube에 Spin column을 옮긴 후, AE Buffer 200 µl를 넣고, 실온에서 1분간 배양하고, 이것을 다시 8,000 × g로 1분간 원심분리하였다. 추출한 genomic DNA는 전기영동을 통하여 확인하였으며, 분광기를 이용하여 분리한 DNA의 농도를 측정한 후, 이를 PCR의 주형으로 이용하였다.

2. Primers 제작 및 염기서열 결정

한우의 genomic DNA로부터 leptin 유전자중 유전자 암호 부위에 존재하는 단일 염기 다형성(SNPs) 정보를 발굴하기 위하여, NCBI에 등록되어 있는 BTU50365의 염기서열 정보를 이용하여 인터넷 웹사이트의 Primer3 program (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)을 이용하여 leptin 유전자의 intron 1 일부, exon 2와 3 그리고 이들 두 exon 사이의 intron 2를 증폭시킬 수 있도록 primer들을 제작하였다. 사용된 primer들의 이름과 염기서열은 Table 1과 같다.

Genomic DNA 50 ng을 주형으로 한 중합효소 연쇄반응(PCR) 조건은 95℃ 5분간 처리 후, 95℃ 30초, 52℃ 1분, 72℃ 3분간의 반응을 30회 반복한 후, 72℃ 5분간의 신장 반응을 실시하였다. 염기 서열 결정 반응에 이용하는 주형 DNA의 농도는 약 300 ng의 PCR 증폭산물을 이용하였고, 반응 조건은 95℃ 5분간 처리 후, 96℃ 10초, 50℃ 5초, 60℃ 4분간의 반응을 25회 반복하였다. 반응 후 95% ethanol 25 µl, 3 M의 sodium acetate 1 µl를 혼합하여 −20℃에 30분 보관 후, 13,000 × g로 4℃에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 버리고, 다시 30 µl의 70% ethanol 넣고 13,000 × g로 4℃에서 5분간 원심분리 후, 상층을 제거하고 공기 중에서 건조시켰다. 건조 후 10 µl의 HiDi Formamide로 녹이고, 95℃ 2분간 열을 가한 후, 급냉 하였다. 이렇게 정제된 시료들을 96-well plate에 옮겨 ABI 3100 염기 서열 장치에 장착하여 염기서열을 결정하였다.

3. 단일 염기 다형성 분석

염기 서열 분석 장치에 의해 분석된 PCR 증폭산물의 chromatogram 자료를 linux 기반의 Phred / Phrap / Consed package (Ewing과 Green, 1998; Ewing 등, 1998) 프로그램을 이용하여 1차적인 염기서열정보를 분석하였고, polyphred (Nickerson 등, 1997)를 이용하여 이들 염기서열 정보에서 단일 염기 다형성 예상 부위의 정보를 분석하였다. 이 프로그램을 이용하면 염기서열 정보 중 단일 염기 다형성 예상 부위를 6가지 색으로 나타나며, 6가지 색은 1. red, 2. orange, 3. green, 4. dark blue, 5. magenta, 6. purple로 1번은 2번에 비해 10배 높은 가능성을 의미한다. 이상과 같은 프로그램을 이용하여 목적 유전자에서 나타나는 개체 간의 단일 염기 다형성을 분석하였다. 또한 기존의 연구 문헌에 존재하는 단일 염기 다형성을 조사하여 본 연구와의 유의성 및 단일 염기 다형성 간의 상관관계 등을 조사하였다.

Table 1. PCR primers for amplification of leptin gene in this study

Primers	Sequence (5' to 3')	Position in BTU50365
Leptin_Bo_F02	GACAGCAAATCTCGTTGTTATCC	966 - 988
Leptin_Bo_R02	CTGAGCTTATGGACCTCAGAAAA	1700 - 1722
Leptin_Bo_F03	CAGATACAACCCTCTGTGTTTTTG	1646 - 1669
Leptin_Bo_R03	TTTCTCTAGGAAATGCAGACACTG	2376 - 2399
Leptin_Bo_F05	GAGGAAGCACCTCTACGCTCTA	2904 - 2925
Leptin_Bo_R05	AGGAAGACTGCTGTGAAAATCC	3604 - 3625

BTU50365 : *Bos taurus* leptin (obese) gene, complete cds.

Ⅲ. 결과 및 고찰

Leptin 단백질은 adipocytes에서 분비되는 혈장 단백질로서 젖소의 생체중, 번식력 그리고 지방축적 등에 직접 또는 간접적인 영향을 미치고, 이러한 생체내 기능을 담당하는 유전자의 돌연변이는 에너지 섭취를 조절하지 못하여 비만을 일으키는 원인중의 하나로 알려지고 있다(Liefers 등, 2005). 본 연구는 한우 leptin 유전자의 일부분을 direct sequencing 방법으로 SNPs 분석을 실시하여, 25개의 SNPs을 발굴하였다.

1. Leptin 유전자의 분리 및 구조 분석

Leptin 유전자는 4번 염색체의 4q32의 위치에 존재하며, 3개의 exon과 2개의 intron으로 구성되어 있다. 이 leptin 유전자의 구조를 간략하게 나타내면 Fig. 1과 같다. Exon 1은 33 bp로 이루어져 있으나, 아미노산을 암호화하지 않는 비번역부위에 해당되며, exon 2로부터 약 17 kb의 거리에 위치하고 있다. 단백질을 암호화하고 있는 exon 2와 exon 3은 각각 144 bp 및 360 bp에 해당하며, 167개의 아미노산으로 구성된 단백질을 암호화하고 있다. 이중 exon 2에서 암호화하는 N-말단의 21개의 아미노산은 signal sequence로서 leptin 단백질의 분비에 관련되어 있으며, 기능적 역할을 갖는 부위는 나머지 146개의 아미노산으로 구성되어 있다(Liefers 등, 2005). 본 연구에서는 한우의 전혈로부터 평균 8 ug의 순도 높은 genomic DNA를 분리하였다. 이들 genomic DNA를 주형으로 하여 3쌍의 leptin 유전자 특이적인 primer (Table 1)들을 이용하여 PCR을 수행한 결과 총 72개의 DNA 단편들을 얻을 수 있었다. 이 영역들은 contig를 작성한 결과 2,222 bp에 상당하였으며, Konfortov 등(1999)이 보고한 22두의 축우에서 얻은 SNP 분석 영역에 해당한다(Fig. 1).

한우 24두로부터 얻어진 leptin 유전자의 염기서열은 리눅스 운영체제하에서 phred/phrap/onsed package에 의해 얻어진 분석결과에 polyphyred를 이용하여 SNP 정보를 얻었다. 프로그램에서 제공하는 SNP 정보를 육안으로 검색한 후, 최종적으로 25개의 SNPs을 발굴하였다(Fig. 1). 전체 염기서열을 아미노산으로 변환한 후 비교한 결과, 염소(*Capra hircus*)와는 98%, 돼지(*Sus scrofa*)와는 92%, 고양이(*Felis catus*)와는 90%, 개(*Canis familiaris*)와는 88%, 인간(*Homo sapiens*)과는 84%, 침팬지(*Pan troglodytes*)와는 83%의 아미노산 상동성을 나타냈다.

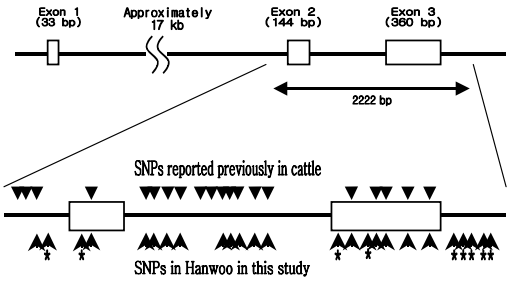

Fig. 1. Gene structure of bovine leptin gene and the polymorphisms reported previously and in this study. Exon 1 is located approximately 17 kb before exon 2 and not translated. Location numbers and gene structures refer to Genbank access number U50365. Previously reported SNPs are upper arrows, and SNPs in this study are lower arrows. The newly found SNPs in this study are in askerisk.

2. 한우 Leptin 유전자의 단일염기다형성 (SNPs) 분석

염기서열 결정 후 분석한 결과, leptin 유전자의 intron 1 일부, intron 2 및 3'-UTR에서 16개, exon 2에서 2개, exon 3에서 7개 등 총 25개의 SNPs을 발굴하였으며 이를 기존의 서양 품종에서 발견된 SNPs과 비교하여 Table 2에 나타내었으며, 아미노산의 변화를 유도하는 nonsynonymous SNPs의 경우 Table 3에 나타내었다.

Exon 2에서는 2개의 SNPs이 발굴되었는데, T1163A는 Valine이 Glutamine으로 변화하는 아미노산의 변화(V19E)를 유발하는 nonsyno-

Table 2. Comparison of sequence variations between the cattle and Hanwoo in leptin gene.

SNP number and primer for detection	Location in leptin gene (position at U50365)	Variations in Korean cattle (Hanwoo) in this study		Variations in cattle in previous reports*	
		Sequence	Frequency	Sequence	Frequency
1 Leptin_Bo_02	Intron 1 (978)	C/C	–	C/T	0.59/0.41
2 Leptin_Bo_02	Intron 1 (1001)	G/G	–	G/C	0.59/0.41
3 Leptin_Bo_02	Intron 1 (1018)	C/T	0.95/0.05	C/T	0.98/0.02
4 Leptin_Bo_02	Intron 1 (1064)	T/G	0.94/0.06	T/T	–
5 Leptin_Bo_02	Exon 2 (1163)	T/A	0.95/0.05	T/T	–
6 Leptin_Bo_02	Exon 2 (1180)	C/T	0.83/0.17	C/T	0.59/0.41
7 Leptin_Bo_02	Intron 2 (1410)	C/T	0.71/0.29	C/T	0.88/0.12
8 Leptin_Bo_02	Intron 2 (1412)	C/A	0.94/0.06	C/A	0.95/0.05
9 Leptin_Bo_02	Intron 2 (1474)	A/G	0.75/0.25	A/G	0.98/0.02
10 Leptin_Bo_02	Intron 2 (1518)	G/C	0.86/0.13	G/C	0.95/0.05
11 Leptin_Bo_02	Intron 2 (1600)	C/C	–	C/T	0.95/0.05
12 Leptin_Bo_02	Intron 2 (1619)	T/T	–	T/C	0.95/0.05
13 Leptin_Bo_03	Intron 2 (1726)	T/C	0.50/0.50	T/C	0.68/0.32
14 Leptin_Bo_03	Intron 2 (1734)	T/C	0.70/0.30	T/C	0.61/0.39
15 Leptin_Bo_03	Intron 2 (1741)	G/A	0.96/0.04	G/A	0.95/0.05
16 Leptin_Bo_03	Intron 2 (1838)	A/G	0.93/0.07	G/A	0.95/0.05
17 Leptin_Bo_03	Intron 2 (2059)	T/C	0.71/0.29	C/T	0.75/0.25
18 Leptin_Bo_05	Exon 3 (3011)	C/G	0.96/0.04	C/C	–
19 Leptin_Bo_05	Exon 3 (3100)	C/T	0.71/0.29	C/T	0.93/0.07
20 Leptin_Bo_05	Exon 3 (3256)	G/A	0.82/0.13	G/G	–
21 Leptin_Bo_05	Exon 3 (3257)	C/T	0.79/0.21	C/T	0.75/0.25
22 Leptin_Bo_05	Exon 3 (3260)	T/C	0.71/0.29	T/C	0.68/0.32
23 Leptin_Bo_05	Exon 3 (3272)	T/C	0.70/0.30	T/C	0.68/0.32
24 Leptin_Bo_05	Exon 3 (3356)	C/T	0.70/0.30	C/T	0.68/0.32
25 Leptin_Bo_05	3'-UTR (3468)	G/A	0.76/0.24	G/G	–
26 Leptin_Bo_05	3'-UTR (3496)	T/C	0.68/0.32	T/T	–
27 Leptin_Bo_05	3'-UTR (3521)	G/A	0.76/0.24	G/G	–
28 Leptin_Bo_05	3'-UTR (3541)	T/G	0.80/0.20	T/T	–
29 Leptin_Bo_05	3'-UTR (3551)	T/C	0.90/0.10	T/T	–

* Konfortov et al., 1999, Bucanan et al., 2002, Liefers et al., 2002, Liefers et al., 2005.

nymous SNP으로서, 기존의 서양 품종에서는 발견되지 않은 SNP이다. C1180T 또한 Arginine이 Cysteine으로의 아미노산 변화(R25C)가 일어나는 nonsynonymous 한 SNP으로, 기존의 서양 품종에서도 매우 높은 빈도(C/T = 0.59/0.41)로 존재하지만, 한우에서는 그 보다 낮은 빈도(C/T=0.83/0.17)로 나타났다.

Exon 3에는 총 7개 SNPs이 발견되었다. C3100T는 Alanine이 Valine으로(A80V), G3256A는 Glycine이 Aspartic acid로(G132D) 각각 아미

Table 3. Nonsynonymous SNPs and their frequencies found in Hanwoo in this study

SNP position	Nucleotide change	Amino acid change	Frequency in Korean cattle (Hanwoo)	Frequency in cattle*
T1163A	GTG to GAG	Val19Glu	0.95/0.05	–
C1180T	CGC to TGC	Arg25Cys	0.83/0.17	0.59/0.41
C3100T	GCG to GTG	Ala80Val	0.71/0.29	0.93/0.07
G3256A	GGC to GAC	Gly132Asp	0.82/0.13	–

* Konfortov et al., 1999, Bucanan et al., 2002.

노산 변화를 유도하는 nonsynonymous SNPs이였으며, 이 중 G3256A는 기존의 서양 품종에서는 발견되지 않은 SNP이며, C3100T의 경우 기존의 서양 품종(C/T = 0.93/0.07)에서 보다 높은 변이(C/T = 0.71/0.29)를 나타내었다. C3011G, C3257T, T3260C, T3272C, C3356T는 모두 아미노산을 암호화하는 코돈의 세 번째에 위치하여 동일한 아미노산을 유도하는 synonymous SNP이었으며, 이 중 C3011G는 서양 품종에서 보고되지 않은 SNP이며, 다른 변이들의 빈도는 한우에서도 서양 품종의 경우와 유사하게 나타났다.

한우 leptin 유전자의 intron 1에서는 C1018T과 T1064G의 2개의 SNPs이 발견되었는데 T1064G는 서양 품종에서는 보고되지 않은 SNP이며, C1018T의 경우 서양 품종에서와 유전자 빈도에서 큰 차이가 없었다. 그러나 기존에 보고된 C978T와 G1001C는 서양 품종에서는 보고되었지만, 본 연구의 한우에서는 발견되지 않았다. Intron 2에서 발견된 9개의 SNPs은 모두 서양 품종에서도 보고된 것과 같았다. 그러나, 기존에 보고된 C1600T와 T1619C는 본 연구의 한우에서는 발견되지 않았으며 서양 품종에 특이적인 SNPs로 사료되었다(Table 2). 3'-UTR에서 발견된 G3468A, T3496C, G3521A, T3541G, T3551C는 서양 품종에서 SNPs에 대한 보고가 없기 때문에 한우에서만 발견된 SNPs로 사료된다.

서양 품종에서 보고된 leptin 유전자의 SNPs는 20여 개로, Buchanan 등(2002)은 Angus, Hereford, Charolais, 그리고 Simmental 154두에서 genomic DNA를 분리하여 SNPs을 조사한 결과, exon 2에서 C1180T (R25C) 1개, exon 3에서 C3100T (A80V), C3257T, T3260C, T3272C, C3356T 등 5개의 SNPs가 존재하고 있음을 보고하고 있으며, lean 형과 fat 형의 3마리 소에서 leptin 유전자의 염기서열을 결정하여 비교한 결과 exon 2의 C1180T (A80V)에서 C allele은 lean형에서, T allele는 fat 형에서 나타났다고 보고하고 있다(Konfortov 등, 1999; Buchanan 등, 2002). 또한 PCR-RFLP를 실시하여, Chi-square 분석을 통한 종 간 빈도를 조사한 결과 C1180T (A80V)의 T allele는 Angus와 Hereford에서 Charolais (P = 0.01)나 Simmental (P = 0.04)에서 보다 높게 나타났다. 본 연구에서 나타난 C1180T는 C/T allele의 빈도가 0.83/0.17로 C allele이 보다 높게 나타났다. 이와 같은 결과로부터 한우는 Angus나 Hereford 보다는 Charolais나 Simmental에 가까운 유전정보를 갖고 있을 것으로 사료된다. 또한 젖소의 경우, leptin 유전자에서 RFLP1으로 알려져 있는 intron 2에 위치하는 C2059T가 산유량과 연관이 있는 것으로 알려져 있다 (Liefers 등, 2002; Liefers 등, 2005).

기존의 알려진 SNPs과 비교하면, 서양 품종과 한우에서 공통으로 나타난 SNPs의 경우, 유사한 대립유전자 빈도를 나타내는 경우도 있으나, 유의할만한 차이를 나타내는 SNPs도 또한 존재하였다. 특히 아미노산의 변화가 일어나는 중요한 SNP인 exon 2의 C1180T (R25C)의 경우, Schenkel 등(2005)은 또 다른 SNP와 연계하여 지방 및 살코기 양과 연관이 있음을 보고하기도 하였는데, 한우와는 다른 대립유전자 빈도를 보여서, 종 간의 특성에 의해 대립유전자의

빈도에 차이가 나타나는 것으로 사료된다(Li 등, 2006).

본 연구에서는 한우 24두로부터 leptin 유전자를 분석하여 25개 SNPs 정보를 얻을 수 있었다. 한우에 대한 보다 정확한 유전자형에 대한 정보를 얻기 위해서는 유전자 분석 개체 수의 증가가 필요하리라 사료된다. 또한 이러한 SNPs 정보로부터 얻어진 haplotype에 대한 대립유전자 빈도를 결정하여 유전자형 정보와 표현형간의 연관관계를 분석함으로써, 형질을 대표하는 단일 SNP 혹은 haplotype형을 개발하는 것이 가능하리라 사료되며, 이를 통하여 한우의 유전적 개량에 중요한 유전체 정보를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

Ⅳ. 요 약

본 연구는 한우 24두의 혈액으로부터 genomic DNA를 추출하여 leptin 유전자의 intron 1부터 3'-UTR 부분까지의 염기 서열을 결정하여 총 25개의 SNPs을 발굴하였다. 발굴된 SNPs 중 16개는 기존의 서양 품종에서도 발견되는 것으로 그 빈도는 대부분의 경우 유사하였으나, 서로 유의성이 있도록 상이한 경우도 있었다. Intron 1의 T1064G, exon 2에서 발견된 nonsynonymous SNP (T1163A, Val to Glu)과 exon 3의 C3011G 및 G3256A (Gly to Asp) SNPs은 기존에 보고되지 않은 한우에서 새롭게 발견된 것으로 종 간의 차이를 나타내는 것으로 사료된다. 이러한 한우의 SNPs 정보는 한우의 유전형을 결정하고, 도체 및 육질 형질 등 중요 경제 형질과의 연관 분석을 통하여 중요한 유전자 표지 확보 및 한우 판별 등의 응용에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

Ⅴ. 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 20070501034009)의 지원에 의해 이루어진 것임.

Ⅵ. 인 용 문 헌

1. Ahima, R. S. and Flier, J. S. 2000. Leptin. Ann. Review Physiol. 62:413-437.
2. Bidwell, C. A., Ji, S., Frank, G. R., Cornelius, S. G., Willis, G. M. and Spurlock, M. E. 1997. Cloning and expression of the porcine obese gene. Anim. Biotechnol. 8(2):191-206.
3. Buchanan, F. C., Fitzsimmons, C. J., Van Kessel, A. G., Thue, T. D., Winkelman-Sim, D. C. and Schmutz, S. M. 2002. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. Gen. Sel. Evo. 34:105-116.
4. Campfield, L. A., Smith, F. J., Guisez, Y., Devos, R. and Burn, P. 1995. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. Science 269:546-569.
5. Carolyn, J. F., Sheila, M. S., Reynold, D. B. and John, J. M. 1998. A potential association between the BM 1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle. Mamm. Genome 9:432-434.
6. Ewing, B. and Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. Genome Res. 8:186-194.
7. Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C. and Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment, Genome Res. 8:175-185.
8. Fruhbeck, G., Jebb, S. A. and Prentice, A. M. 1998. Leptin: physiology and pathophysiology. Clin. Physiol. 18:399-419.
9. Halaas, J. L., Gajiwala, K. S., Maffei, M., Cohen, S. L., Chait, B. T., Rbinowitz, D., Lallone, R. L., Burley, S. K. and Friedman, J. M. 1995. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. Science 269, 543-546.
10. Hwa, J. J., Fawzi, A. B., Graziano, M. P. Ghibaudi, L., Williams, P., Van, H. M., Davis, H., Rudinski, M., Sybertz, E. and Strader, C. D. 1997. Leptin increases energy expenditure and

selectively promotes fat metabolism in ob/ob mice. Am. J. Physiol. 272:R1204-R1209.

11. Isse, N., Ogawa, Y., Tamura, N., Masuzaki, H, Mori, K., Okazaki, T., Satoh, N., Shigemoto, M., Yoshimasa, Y., Nishi, S., Hosoda, K., Inazawa, J. and Nakao, K. 1995. Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene. J. Biol. Chem. 270:27728-27733.
12. Iwase, M., Kimura, K., Sasaki, N., Komagome, R., Ishioka, K., Morimatsu, M., Murakami, T. and Saito, M. 2000. Canine leptin: cDNA cloning, expression and activity of recombinant protein. Res. Vet. Sci. 68(2):109-114.
13. Ji, S., Willis, G. M., Scott, R. R. and Spurlock, M. E. 1998. Partial cloning and expression of the bovine leptin gene. Anim. Biotechnol. 9:11-14.
14. Konfortov, B. A., Licence, V. E. and Ross Miller, J. 1999. Re-sequencing of DNA from a diverse panel of cattle reveals a high level of polymorphism in both intron and exon. Mamm. Genome 10:1142-1145.
15. Li, M. H., Adamowicz, T., Switonski, M., Ammosov, I., Ivanova, Z., Kiselyova, T., Popov, R. and Kantanen, J. 2006. Analysis of population differentiation in North Eurasian cattle (*Bos taurus*) using single nucleotide polymorphisms in three genes associated with production traits. Animal Genetics 37:390-392.
16. Liefers, S. C., Te Pas, M. F. W., Veerkamp, R. F. and Van der Lende, T. 2002. Associations between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in Holstein heifers. J. Dairy Sci. 85:1633-1638.
17. Liefers, S. C., Veerkamp, R. F., Te Pas, M. F. W., Chilliard, Y. and Van der Lende, T. 2005 Genetics and physiology of leptin in periparturient dairy cows. Domestic Animal Endocrinol. 29:227-238.
18. Nickerson, D. A., Tobe, V. O. and Taylor, S. L. 1997. PolyPhred: automating the detection and genotyping of single nucleotide substitutions using uorescence-based resequencing. Nucleic Acids Res. 25:2745-2751.
19. Pelleymounter, M. A., Cullen, M. J., Baker, M. B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T. and Collins, F. 1995. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. Science 269:540-543.
20. Ramsay, T. G., Yan, X. and Morrison, C. 1998. The obesity gene in swine: sequence and expression of procine leptin. J. Anim. Sci. 76: 484-490.
21. Sasaki, N., Shibata, H., Honjoh, T., Kimura, K., Saito, M. and Ohishi, Iwao. 2001. cDNA Cloning of feline leptin and its mRNA expression in adipose tissue. J. Vet. Med. Sci. 63(10):1115-1120.
22. Schenkel, F. S., Miller, S. P., Ye, X., Moore, S. S., Nkrumah, J. D., Li, C., Yu, J., Mandell, I. B., Wilton, J. W. and Williams, J. L. 2005. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. J. Anim. Sci. 83:2009-2020.
23. Weigle, D. S., Bukowski, T. R., Foster, D. C., Holerman, S., Kramer, J. M., Lasser, G., Lofton, D. C., Prunkard, D. E., Raymond, C. and Kuijiper, J. L. 1995. Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse. J. Clin. Invest. 96:2065-2070.
24. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. and Friedman, J. M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 372(6505):425-432.
25. 임현진, 오재돈, 공홍식, 전광주, 이학교, 이승수, 윤두학, 김종대, 조병욱. 2004. PCR RFLP를 이용한 한우 Leptin gene의 유전자형 변이와 경제형질과의 관련성 분석. 한국동물자원과학회지 46(3):295-300.

(접수일자 : 2007. 1. 17. / 채택일자 : 2007. 6. 14.)