

# 한우 후보종모우 및 칩소와 흑소에서 MC1R 유전자의 유전자형 분석

진 실<sup>1</sup> · 심정미<sup>1</sup> · 서동원<sup>1</sup> · 정우영<sup>1</sup> · 류승희<sup>2</sup> · 김진호<sup>3</sup> · 이준헌<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>충남대학교 농업생명과학대학 동물자원생명과학과, <sup>2</sup>충청남도 축산기술연구소, <sup>3</sup>농협중앙회 한우개량사업소

## Analysis of MC1R genotypes in three different colored Korean cattle (Hanwoo)

Shil Jin<sup>1</sup>, Jung-Mi Shim<sup>1</sup>, Dong-Won Seo<sup>1</sup>, Woo-Young Jung<sup>1</sup>, Seung-Heui Ryo<sup>2</sup>, Jinho Kim<sup>3</sup>, Jun-Heon Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Science & Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

<sup>2</sup>Livestock Technology Research Institute, Cheongyang-gun, Chungcheongnam-do 345-811, Korea

<sup>3</sup>Livestock Improvement Main Center, National Agriculture Cooperative Federation, Seosan-si, Chungcheongnam-do 356-831, Korea

Received on 12 August 2011, revised on 22 August 2011, accepted on 19 August 2011

**Abstract :** The MC1R (Melanocortin 1 receptor) gene has been known as a causative gene of the coat colors in mammals and responsible for the E (Extension) locus which has three alleles ( $E^D$ ,  $E^+$ , e) that determines coat colors. The dominant allele  $E^D$  produces black or brown colors due to the missense mutation and the recessive e allele has frameshift mutation which shows red or yellow coat colors. Whereas the wild type  $E^+$  produces variety of colors due to the interaction with A (Agouti) locus. In this study, PCR-RFLP was performed using two restriction enzymes (*BsrF I* and *MspA1 I*) in order to obtain MC1R genotypes in Korean brindle cattle and black cattle. The results showed that all of the animals have the  $E^+$  alleles, indicating the  $E^+$  allele might related with black coat colors. Later on, the experiments expanded to the 260 Korean candidate bulls whether these animals have the same  $E^+$  allele. Among 260 samples investigated, 5% (13/260) of the animals had  $E^+e$  genotypes, indicating the  $E^+$  allele is also present in the candidate bulls in a low frequency. Even though we expected that A locus also affect the black coat color in cattle, all the black coat color animals (brindle and black) have  $E^+$  alleles in this study. Therefore, the genotyping of the MC1R gene in candidate bulls will recommended be applied for eliminating of black coat colors in Hanwoo population, if the farmers need to have the brown coat colors only.

**Key words :** Candidate bull, Coat color, Genotype, Hanwoo, MC1R

## I. 서론

포유동물에서 모색과 관련된 유전자에 대한 연구가 꾸준히 진행되고 있다. 특히 현재까지 밝혀진 소의 모색에 영향을 미치는 유전자는 TYR(albinism)(Schmutz 등, 2004), TYRP1(brown), DCT, PMEL(dilution)(Guibert 등, 2004), KIT(colour-sided)(Reinsch 등, 1999), KITLG(roan)(Charlier 등, 1999; Seitz 등, 1999) 그리고 MC1R(extension)(Klungland 등, 1995) 등이 알려져 있으며, 우리나라 소 품종의 모색구분은 주로 MC1R(melanocortin 1 receptor)

유전자의 유전자형 분석을 통해 이루어지고 있다. 포유동물에서 모색은 두 가지의 melanin 색소인 eumelanin(black 또는 brown)과 pheomelanin(red 또는 yellow)에 의하여 결정되며 주로 E(Extension) 좌위와 A(Agouti) 좌위가 관여하고 있는 것으로 알려져 있다. MC1R 유전자는 melanocyte-stimulating hormone receptor(MSHR)를 암호화하고 있는 E 좌위라고도 불리며, 세 개의 대립 유전자( $E^D$ ,  $E^+$ , e) 변이에 의해 eumelanin과 pheomelanin을 합성하며 궁극적으로 모색을 결정한다. 우성대립유전자인  $E^D$ 는 missense mutation에 기인하여 eumelanin을 합성시키고 흑색을 생산하며, 열성대립유전자 e는 frameshift mutation에 의해 pheomelanin을 합성시키므로 황색을 생산한다. 한편,

\*Corresponding author: Tel: +82-42-821-5779

E-mail address: junheon@cnu.ac.kr

wild-type인  $E^+$ 는 A 좌위와의 상호작용에 의해 다양한 모색을 생산하는 것으로 알려져 있으며, A 좌위의 Agouti protein이 eumelanin의 생산을 유도하는 MSHR의 antagonist로 작용한다는 보고가 있다(Lu 등, 1994). 따라서 우성대립유전자  $A^+$ 는 황갈색 모색생산에 관여하고 열성대립유전자  $a$ 는 흑색을 생산하는데 관여하는 것으로 알려져 있다(Hearing과 Tsukamoto, 1991; Robbins 등, 1993; Adalsteinsson 등, 1995; Klungland 등, 1995).

국내의 일반적인 한우는 ee 유전자형을 가지는 황색의 개체가 대부분을 차지하고 있으나  $E^+e$  타입의 유전자형도 가지고 있는 것으로 보고되고 있으며,  $E^+$  대립유전자의 작용으로 칩소와 같은 얼룩무늬나 검은 흑모의 출현가능성을 배제하지 못하고 있다. 최근에는 다양한 한우 유전자원 확보를 위하여 한우뿐만 아니라 멸종위기에 처한 칩소와 흑소, 제주흑우 등 우리나라 재래 소품종에 대한 유전자형 분석과 증식사업도 활발하게 추진되고 있다. 따라서 본 연구는 칩소와 흑소의 MC1R 유전자형을 확인하고 후보종모우에서  $E^+$  유전자형의 빈도를 추정함으로써 선발기준을 설정하는데 필요한 개체정보를 제공하기 위하여 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시재료

세 가지 다른 피모색을 가진 한우(칩소, 흑소, 황색한우)의 MC1R 유전자 유전자형을 분석하기 위하여 충남 축산기술연구소에서 보유하고 있는 칩소 2두와 흑소 11두의 모근에서 DNA를 채취하였으며(TOYOBO Kit, Japan), 충남대학교 동물유전학실에서 보유하고 있는 후보종모우 260두(28차 85두, 38차 86두, 39차 89두)의 샘플을 이용하였다(Fig. 1). 추출된 genomic DNA의 농도는 NanoDrop 2000C spectrophotometer(Thermo Scientific, USA)를 사용하여 측정하였다.

### 2. PCR에 의한 유전자 증폭

먼저 칩소와 흑소에서 원하는 MC1R 유전자의 일부분을 증폭하기 위하여 Klungland 등(1995)에 의해 보고된 forward primer와 Kim 등(2000)에 의해 보고된 reverse primer를 이용하였으며(Table 1), PCR반응에는 25 ng의

genomic DNA, 10 pmol의 forward primer와 reverse primer, 10X rxn PCR Reaction Buffer(GenetBio, Korea), 0.2 mM의 dNTP(GenetBio, Korea), 1 unit의 Prime Taq DNA Polymerase(GenetBio, Korea)를 증류수와 희석하여 사용하였다. PCR 반응조건으로 GeneAmp PCR System 2700(Applied Biosystems, USA)을 사용하여 최초 denaturation으로 95°C에서 5분간 반응시킨 후, 94°C에서 30초간 denaturation, 64°C에서 1분간 annealing을 35회 반복하고 72°C에서 5분간 최종 extension과정을 수행하였다. 칩소와 흑소에서 사용한 방법으로 후보종모우에서도 PCR 증폭을 수행하였으나 결과가 명확하지 않아 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 등록된 Bos taurus melanocortin 1 receptor(MC1R) mRNA(Accession number: AF445642.1) 염기서열을 기초로 Primer3 프로그램(<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>)을 사용하여 forward primer를 디자인하였고, reverse primer는 Kim 등(2000)에 의해 보고된 것을 이용하였다(Table 1). PCR 반응에는 GeneAmp PCR System 2700(Applied Biosystems, USA)을 이용하여 25 ng의 genomic DNA와 10 pmol의 HS Prime Taq 2X Premix(GenetBio, Korea)를 증류수와 혼합하여 사용하였다. PCR의 수행은 95°C에서 5분간 pre-denaturation시킨 후, 95°C에서 30초, 62°C에서 1분씩 2단계로 40 cycle을 반복하고 72°C에서 5분간 final extension 하였다. 증폭된 MC1R 유전자의 PCR product들은 1%의 agarose gel에 전기영동하여 증폭여부와 크기를 확인하였다.

### 3. PCR-RFLP에 의한 유전자형 분석

전기영동으로 확인된 PCR product들의 유전자형을 결정하기 위하여 제한효소 *Bsr*I(BioLabs, England) 과 *Msp*A1 I(BioLabs, England)을 이용하여 PCR-RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)를 실시하였다. 제한효소 처리 반응액은 10 unit의 *Bsr*I 과 *Msp*A1 I, 각 제한효소에 맞는 1X buffer, MC1R PCR product 10  $\mu$ l를 첨가하여 37°C incubator에서 overnight 처리한 후, 2.5%의 agarose gel에 전기영동하여 절단된 단편을 확인하고 유전자형을 결정하였다.



(A) Korean brindle cattle /  $E^+E^+$  genotype



(B) Korean brindle cattle /  $E^+e$  genotype



(C) Korean black cattle /  $E^+e$  genotype

**Fig. 1.** Pictures of Korean brindle cattle and black cattle. Note that Korean brindle cattle have either  $E^+E^+$  (A) or  $E^+e$  (B) genotypes, while Korean black cattle have  $E^+e$  genotypes (C).

**Table 1.** Information for amplifying partial fragment of MC1R gene in Korean cattle.

Coat color	Primer sequence (5'→ 3')	PCR product size (bp)
Korean brindle cattle, Korean black cattle	F - CAAGAACC GCAACCTGCACT R - TGATGAAGAGCAGGCTGGTG	350
Candidate bulls	F - AGGCGGACTGAGAACAGAAG R - TGATGAAGAGCAGGCTGGTG	720

**Table 2.** Restriction enzyme information for discrimination of MC1R alleles.

MC1R allele	Recognition sequence	
	Amino acid no. 99	Amino acid no. 104
E <sup>D</sup>	C C G (Pro)	G▼G T (Gly)
E <sup>+</sup>	C▼T G (Leu)	G▼G T (Gly)
e	C▼T G (Leu)	_ T G (Val)
Restriction enzyme	<i>Msp</i> A1 I 5'-CMG▼CKG-3'	<i>Bsr</i> F I 5'-R▼CCGGY-3'

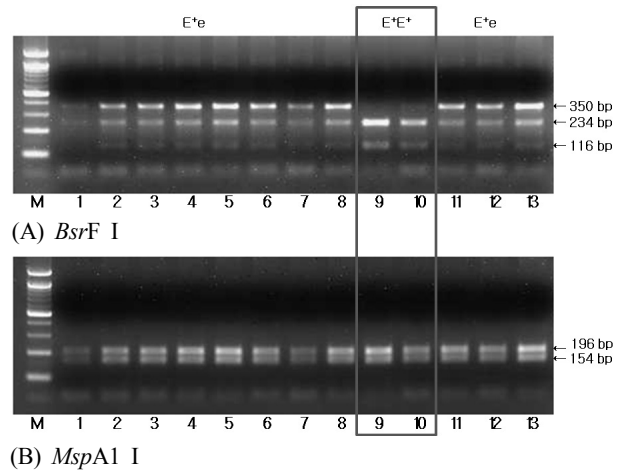
**4. 후보종모우와 헤어포드의 염기서열 분석**

증폭된 후보종모우의 PCR product들은 PCR Purification Kit(Cosmogenetech, Korea)을 이용하여 정제한 후 (주) 코스모진텍(Korea)에 의뢰하여 sequencing을 실시하였다. 확인된 염기서열은 GenBank에 등록된 Hereford(Accession number: NC\_007316.4)의 염기서열과 함께 ClustalW2 프로그램(<http://www.ebi.ac.uk>)을 이용하여 alignment한 후 각각의 제한효소로 절단되는 부위 및 SNP를 확인하였다.

**III. 결과 및 고찰**

Klungland 등(1995)은 소의 MC1R 유전자에서 99번째와 104번째 아미노산을 결정하는 코돈의 변이는 소의 모색 결정과 관련되어 있다고 보고하였다. 본 연구에 사용한 제한효소 *Bsr*F I은 104번째 아미노산을 결정하는 코돈의 뉴클레오티드 G가 deletion되어 frame shift 돌연변이를 인식하고, *Msp*A1 I은 99번째 아미노산을 결정하는 코돈인 CTG(Leu)가 CCG(Pro)로 치환된 것을 인식하여 대립유전자 E<sup>D</sup>, E<sup>+</sup> 그리고 e 타입을 구분한다(Table 2). 따라서 99번째와 104번째 아미노산을 결정하는 코돈을 포함하는 MC1R 유전자의 증폭을 위해 앞서 제작한 primer들을 이용하여 PCR을 수행한 결과, 칩소와 흑소에서 350 bp, 후보종모우에서 720 bp의 PCR product를 얻었고, PCR-RFLP 방법으로 얻어진 PCR product에 각각 제한효소 *Bsr*F I과 *Msp*A1 I을 처리하여 유전자형을 분석하였다.

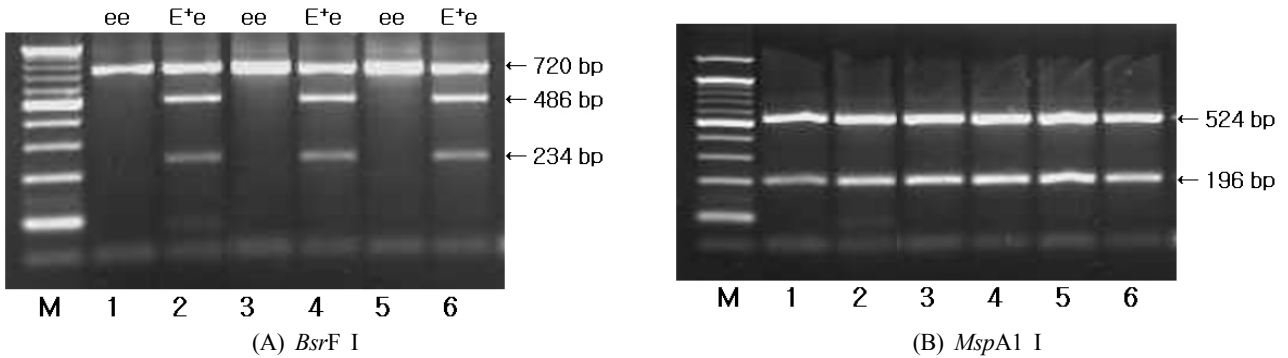
그 결과 칩소와 흑소 모두에서 대립유전자 E<sup>D</sup> 타입은 전혀 나타나지 않았고, 제한효소 *Bsr*F I에 의하여 대립유전자 E<sup>+</sup> 타입은 각각 234 bp, 116 bp 두 개의 단편으로 절단되었고 e는 절단되지 않았다. 또한 제한효소 *Msp*A1 I에 의하여 대립유전자 E<sup>+</sup>와 e 타입은 모두 196 bp, 154 bp 두 개의



**Fig. 2.** MC1R genotype results for the Korean brindle and black cattle. Note that animals in lane 9 and 10 are E<sup>+</sup>E<sup>+</sup> genotypes and others have E<sup>+</sup>e genotypes. The animals in lane 3 and 4 are Korean black cattle and others are Korean brindle cattle.

단편으로 절단되었다. 따라서 칩소와 흑소 총 13두의 개체 중 E<sup>+</sup>E<sup>+</sup> 타입의 유전자형을 가진 칩소 개체는 2두, 나머지 칩소 9두와 흑소 2두의 개체는 모두 E<sup>+</sup>e 타입의 유전자형을 가진 것으로 확인되었다(Fig. 2). 후보종모우의 경우 제한효소 *Bsr*F I에 의해 대립유전자 E<sup>+</sup>는 486 bp, 234 bp 두 개의 단편으로 절단되었고 대립유전자 e는 절단되지 않았으며, 제한효소 *Msp*A1 I에 의해 대립유전자 E<sup>+</sup>와 e 모두 524 bp, 196 bp 두 개의 단편으로 절단되었다(Fig. 3). 이를 바탕으로 28차, 38차 및 39차 한우 후보종모우 260두를 대상으로 PCR-RFLP 방법을 통해 유전자형 빈도를 분석한 결과, 247두는 유전자형 ee 타입(유전자형 빈도: 0.95)을 가지고 있는 것으로 확인되었고, 나머지 13두는 E<sup>+</sup>e 타입의 유전자형(유전자형 빈도: 0.05)을 가지고 있는 것으로 분석되었다(Table 3).

본 연구에서는 한국의 재래소품종인 칩소, 흑소 및 후보종모우의 모색관련 MC1R 유전자의 유전자형을 분석하였다. 그 결과 칩소와 흑소에서 E<sup>+</sup>e 타입의 유전자형이 나타



**Fig. 3.** Example of MC1R genotypes using two restriction enzymes (*BsrF*I and *MspA*1) in candidate bulls. Note that lane 2,4,6 have E<sup>+</sup>e genotypes and others have ee genotypes.

**Table 3.** Gene and genotype frequencies for candidate bulls in Korean cattle (Hanwoo).

Candidate bulls	Gene frequency		Genotype frequency	
	E <sup>+</sup>	e	E <sup>+</sup> e	ee
28th (n=85)	0.035	0.965	0.070	0.930
38th (n=86)	0.017	0.983	0.034	0.966
39th (n=89)	0.022	0.978	0.045	0.955
Average	0.025	0.975	0.050	0.950

나는 것을 확인하였으며, 칠포에서는 E<sup>+</sup>E<sup>+</sup>와 E<sup>+</sup>e 타입의 유전자형이 모두 존재하는 것을 확인하였다. 이는 MC1R 유전자의 유전자형 분석을 통하여 칠포와 흑소의 표현형은 구분할 수는 없으나 E<sup>+</sup> 유전자가 흑모의 발현에 영향을 미치고 있음을 나타낸다. 또한 한우 404두를 대상으로 한 Kim 등(2000)의 보고에서 ee 타입의 유전자형이 0.90, E<sup>+</sup>e 타입의 유전자형이 0.10의 빈도로 나타난 것과 같이 본 연구의 후보종모우에서도 낮은 수준이지만 E<sup>+</sup>e 타입의 유전자형이 존재하고 있음을 확인하였고, 본 연구를 통해 분석된 28차, 38차 그리고 39차 후보종모우의 E<sup>+</sup>e 타입의 유전자형 빈도를 비교하였을 때 그 비율이 점차 감소하는 것으로 보아 그동안의 후보종모우 선발에서 E<sup>+</sup> 대립유전자를 가지지 않은 개체를 계속적으로 선발해왔음을 알 수 있다. 그러나 E<sup>+</sup> 대립유전자를 보유하면서 황색의 표현형을 나타내는 E<sup>+</sup>e 타입의 개체로 인하여 후대에 흑색의 개체가 생산될 가능성을 배제하지 못하고 있다. 따라서 후보종모우의 선발에 있어서 MC1R 유전자의 유전자형 분석을 통한 E<sup>+</sup>e 타입의 유전자형을 가진 개체의 선별이 계속적으로 이루어져야 할 것으로 생각되며 흑모 발현에 영향을 미치는 MC1R 이외의 유전자에 대한 연구도 필요할 것으로 생각된다. 기존의 연구에서 소의 흑모 발현에 A 좌위에 존재하는 ASIP(Agouti signaling protein) 유전자도 영향을 미칠 것

으로 판단되었으나 Han 등(2011)의 연구에서 한우, 제주흑우 그리고 이들의 교배후손의 모색 변이에 ASIP 유전자가 관여하지 않는 것으로 보고되었다. 따라서 정확한 원인 규명을 위하여 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각되며 이러한 자료는 앞으로 한우의 후보종모우 개체 선발뿐만 아니라 칠포 및 흑소와 같은 우리나라 재래소품종의 보존과 개량, 한우 브랜드화에 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

#### IV. 결론

소의 모색을 구분함에 있어서 E 좌위의 세 가지 대립유전자의 변이를 이용한 MC1R 유전자형 분석이 주로 이용되고 있다. 본 연구에서는 칠포와 흑소, 그리고 한우 후보종모우를 공시재료로 이용하여 MC1R 유전자의 유전자형 분석을 실시하였다. MC1R PCR-RFLP에는 두 가지 제한효소 *BsrF* I과 *MspA*1 I를 이용하였다. 각 공시재료에 대한 유전자형 분석 결과, 칠포와 흑소 모두 E<sup>+</sup> 대립유전자를 가지고 있어 대립유전자 E<sup>+</sup>가 흑모의 발현과 밀접한 연관이 있음을 나타낸다. 후보종모우에서 MC1R 유전자형을 분석한 결과 5%의 후보종모우(13/260)가 E<sup>+</sup>e 타입으로 밝혀져 흑색의 모색을 나타내지 않지만 E<sup>+</sup> 대립유전자를 가지고 있음

을 확인할 수 있었다. 본 연구를 통하여 MC1R 유전자 이외에 다른 유전자가 소의 모색에 관여할 것으로 추정되며 모색을 기초로 한 개체의 선발에 MC1R 유전자형의 분석이 매우 필요할 것으로 사료된다.

## 참고 문헌

- Adalsteinsson S, Bjarnadottir S, Vage DI, Jonmundsson JV. 1995. Brown coat color in Icelandic cattle produced by the loci Extension and Agouti. *J. Hered.* 86(5): 395-398.
- Charlier C, Denys B, Belanche JI, Coppieters W, Grobet L, Mni M, Womack J, Hanset R, Georges M. 1996. Microsatellite mapping of the bovine roan locus - a major determinant of white heifer disease. *Mamm. Genome* 7: 138-142.
- Guibert S, Girardot M, Leveziel H, Julien R, Oulmouden A. 2004. Pheomelanin coat colour dilution in French cattle breeds is not correlated with the TYR, TYRP1 and DCT transcription levels. *Pigment Cell Res.* 17: 337-345.
- Han SH, Cho IC, Kim JH, Ko MS, Kim YH, Kim EY, Park SP, Lee SS. 2011. Coat color patterns and genotypes of Extension and Agouti in Hanwoo and Jeju Black Cattle. *J. Life Sci.* 21(4): 494-501.
- Hearing VJ, Tsukamoto K. 1991. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* 5(14): 2902-2909.
- Kim TH, Yoon DH, Park EW, Lee HY, Oh SJ, Cheong IC, Thak TY, Kim KN, Han JY. 2000. A study on genotype frequencies of the bovine melanocortin receptor 1 (MC1R) in cattle breeds. *J. Anim. Sci. & Technol.* 42(6): 735 - 744. [in Korean]
- Klungland H, Vage DI, Gomez-Raya L, Adalsteinsson S, Lien S. 1995. The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mamm. Genome* 6: 636-639.
- Lu D, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, Luther M, Chen W, Woychik RP, Wilkison WO, Cone RD. 1994. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* 371: 799-802.
- Reinsch N, Thomsen H, Xu N, Brink M, Looft C, Kalm E, Brockmann GA, Grupe S, Kühn C, Schwerin M, Leyhe B, Hiendleder S, Erhardt G, Medjuqorac I, Russ I, Förster M, Reents R, Averdunk G. 1999. A QTL for the degree of spotting in cattle shows synteny with the KIT locus on chromosome 6. *J. Hered.* 90: 629-634.
- Robbins LS, Nadeau JH, Johnson KR, Kelly MA, Roselli-Rehlfuss L, Baack E, Mountjoy KG, Cone RD. 1993. Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 72(6): 827-834.
- Schmutz SM, Berryere TG, Ciobanu DC, Mileham AJ, Schmitz BH, Fredholm M. 2004. A form of albinism in cattle is caused by a tyrosinase frameshift mutation. *Mamm. Genome* 15: 62-67.
- Seitz JJ, Schmutz SM, Thue TD, Buchanan FC. 1999. A missense mutation in the bovine MGF gene is associated with the roan phenotype in Belgian blue and Shorthorn cattle. *Mamm. Genome* 10(7): 710-712.