

## 돼지 Melanocortin 4 Receptor (*MC4R*) 유전자의 육질연관성 분석

노정건<sup>1†</sup> · 김상욱<sup>1†</sup> · 최정석<sup>1</sup> · 최양일<sup>1</sup> · 김종주<sup>2</sup> · 최봉환<sup>3</sup> · 김태현<sup>3</sup> · 김관석<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>충북대학교 농업생명환경대학 축산학과, <sup>2</sup>영남대학교 생명공학부, <sup>3</sup>농촌진흥청 국립축산과학원

## Characterization and Evaluation of Melanocortin 4 Receptor (*MC4R*) Gene Effect on Pork Quality Traits in Pigs

Jung-Gun Roh<sup>1†</sup>, Sang-Wook Kim<sup>1†</sup>, Jung-Suk Choi<sup>1</sup>, Yang-Il Choi<sup>1</sup>, Jong-Joo Kim<sup>2</sup>, Bong-Hwan Choi<sup>3</sup>, Tae-Hun Kim<sup>3</sup> and Kwan-Suk Kim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>College of Agriculture, Life and Environment Sciences, Chungbuk National University, Korea

<sup>2</sup>School of Biotechnology, Yeungnam University, Gyeongsan, Korea

<sup>3</sup>Division of Animal Genomics and Bioinformatics, National Institute of Animal Science, Korea

### ABSTRACT

This study aimed to investigate the single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the porcine *MC4R* gene and validate the effect of the *MC4R* genotype for marker assisted selection (MAS). Six amplicons were produced to analyze the entire base sequences of the porcine *MC4R* gene and six SNPs were detected (c.-780C>G, c.-135C>T, c.175C>T-Leu59Leu, c.707A>G-Arg236His, c.892A>G-Asp298Asn, and c.\*430A>T). Linkage disequilibrium (LD) of the six SNPs was analyzed by performing haploid analysis. There was a perfect linkage disequilibrium in c.-780C>G, c.-135C>T, c.175C>T-Leu59Leu, c.707A>G-Arg236His, and c.\*430A>T. Only the c.892A>G (Asp298Asn) SNP showed a very low LD with an  $r^2$  value of 0.028 and the  $D'$  value of 0.348. As a result, the two SNPs—c.707A>G (Arg236His) and c.892A>G (Asp298Asn)—were selected to extract the genotype frequencies from the 5 pig breeds by using the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) genotype analysis method. The SNP frequency of c.707A>G (Arg236His) indicated the presence of the A (His) allele only in Yorkshire, while the G allele was fixed in the KNP, Landrace, Berkshire, and Duroc. Association analysis was carried out in 484 pigs with the c.707A>G (Arg236His) SNP and the meat quality traits of four different pig cross populations: a significant association was noted in crude fat, sirloin moisture, meat color, and the degree of red and yellow coloration. The frequency of the c.892A>G (Asp298Asn) SNP genotype varied among the breeds; while Duroc showed the highest frequency of the A (*Asn*) allele, KNP showed the highest frequency of the G (*Asp*) allele. Association analysis was carried out in 1126 pigs with the c.892A>G (Asp298Asn) SNP and the meat quality traits of four pig populations: a highly significant linkage was noted in the back-fat thickness ( $P<0.002$ ). It was found that the back-fat thickness was higher in individuals with the AA genotype than in those with the AG or GG genotype. Thus, in this study, we verified that the c.892A>G (Asp298Asn) SNP in the pig *MC4R* gene has a sufficient effect as a gene marker for MAS in Korean pork industry.

(Key words : *MC4R*, SNPs, Meat quality, Korean native pig, Pig population)

### 서 론

종돈 개량 및 선발에 있어서 생산성과 관계되는 형질은 복당산자수, 이유두수, 일당증체량, 사료요구율, 등지방두께, 정육율, 제형 및 내구성, 육질형질 등이 있으며, 이들 형질을 개량하여 다음 세대에 이어질 수 있도록 하는 것이 바로 종돈 개량의 가장 핵심이 되는 목표이다. 그 동안 대표적인 양돈분야 유전자표지인자들을 살펴보면 PSE 돈육을 판별하기 위한 것으로 대표적인 *RYR1*

(Ryanodine Receptor) 유전자의 Arg615Cys 단일염기변이와 모돈의 다산능력에 영향을 미치는 *ESR* (Estrogen Receptor) 유전자의 단일염기변이 등이 있다 (Fujii 등 1991; Rothschild 등, 1996). 또한 육질 관련에 있어서는 *PRKAG3* 유전자의 Ile199Val 단일염기변이와 CAST 유전자의 Arg249Lys 단일염기변이가 고기 연도와 산패도 등에 관련이 있다고 보고되었다 (Ciobanu 등 2001; Ciobanu 등 2004). *MC4R* (Melanocortin-4 receptor) 유전자는 에너지 중심 조절에 중요한 G-protein 쌍의 receptor를 중심으로

† These authors contributed equally to this work

\* Corresponding author : Kwan-Suk Kim, College of Agriculture, Life and Environment Sciences, Chungbuk National University, Tel: 043-261-2547, Fax: 043-273-2240, E-mail: kwansukkim@chungbuk.ac.kr

발현하며, 에너지 균형 조절과 비만의 유전적 기초에 있어서 중대한 역할을 한다(Farooqi 등, 2003). 돼지 *MC4R* 유전자 내의 *Asp298Asn* 단일염기변이는 돼지의 성장과 사료효율 및 지방침착에 영향을 미치는 매우 중요한 후보유전자로 보고되었는데 *Asp298Asn* 단일염기변이의 *G (Asp)* 대립유전자를 가지고 있는 개체는 육량이 많으며 사료효율이 좋고, *A (Asn)* 대립유전자를 가지고 있는 개체는 성장률이 좋으며 등지방두께가 두꺼운 것으로 보고되었다(Kim 등, 2000ab; Houston 등, 2004; Bruun 등, 2006; Jokubka 등, 2006; Meidtner 등 2006; Van den Maagdenberg 등, 2007). 국내 종돈에서 이러한 유전자표지인자들의 효과가 검증된 보고는 매우 적는데, 새로운 표지인자나자를 탐색하는 것도 중요하지만 기존의 표지인자나자들의 정확한 검증을 통해 산업현장에 적용하는 것도 중요한 과제이다. 국내에서 이용되는 돼지 품종은 모계라인으로는 요크셔 종과 랜드레이스 종의 교잡을 이용하고 부계라인으로는 듀록품종이다. 고급육질의 돈육을 생산하기 위해 버크셔품종이나 한국재래돼지를 흑돈으로 사용한다. 한국재래돼지는 타 품종에 비해 성장률과 체구는 작지만 육질 및 풍미가 우수한 것으로 알려져 있다(Jin 등, 2006; Choi 등, 2005; Cho 등, 2007; Jin 등, 2005). 따라서 한국재래돼지의 유전적 개량을 위한 유전자 연구가 활발히 이루어지고 있다(Kim 등, 2007; Kim 등, 2009; Moon 등, 2009; Kim 등, 2010; Li 등, 2009; Li 등, 2010). 본 연구는 한국재래돼지 *MC4R* 유전자 내의 단일염기변이들을 규명하고, *MC4R* 유전자형 효과를 국내의 돼지품종 조합에서의 검증하여, 궁극적으로 *MC4R* 유전자형을 이용한 마커도움선발(MAS)에 활

용가능성을 제시하기 위하여 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시재료 및 육질분석

본 연구의 품종별 genomic DNA 시료는 한국재래돼지 16두, 요크셔 8두, 듀록 8두와 랜드레이스 8두를 국립축산과학원으로부터 제공받아 분석에 이용하였다.

또한 *MC4R* 유전자의 단일염기변이와 표현형질 간의 연관성을 분석하기 위해 이용된 공시재료는 제주재래돼지와 요크셔 품종의 양방향교배로 생산된 F2 집단 325두, 국립축산과학원에서 보유한 한국재래돼지와 랜드레이스 품종의 양방향교배로 생산된 F2 집단 253두, 남원지역 버크셔농장에서 279두와 도드람양돈조합에서 생산한 비육돈 292두를 포함하여 총 1171두의 등심조직에서 분리된 genomic DNA를 이용하였다.

도체형질은 도축 직후 온도체중을 측정하였으며, 등지방두께는 10번째와 11번째 늑골에서 측정하였다. 육질형질은 등심에서 pH, 보수력, 가열감량, 전단력 및 일반성분 분석을 실시하였다. pH는 도체 후 24시간에 측정하였으며, 육즙손실량은 등심시료를 진공포장한 뒤에 24시간 후에 손실량을 측정하였다. 가열감량은 70℃에서 40분간 처리한 후 가열 전후의 무게를 측정하였다. 전단력은 도축 24시간 후 12번 늑골부위의 등심부위를 3cm 정도 두께의 스테이크 모양으로 절단하여 70℃에서 40분간 가열하여 전단력측정기

Table 1. Phenotypic records of meat quality traits in four pig population

Meat quality traits	KNP × YS (n = 347)	KNP × LR (n = 253)	Dodram pigs (n = 292)	Berkshire (n = 279)	Total animals (n = 1171)
Carcass weight (kg)	92.59± 11.33	91.01±15.9	87.65± 5.51	84.71±5.50	89.22± 11.48
Backfat thickness (mm)	N/A	25.44± 8.13	22.94± 5.13	24.42±4.73	24.32± 6.60
Crude fat (%)	2.49± 1.49	2.09± 1.94	2.18± 0.71	2.80±1.18	2.33± 1.46
Crude ash (%)	1.06± 0.14	1.03± 0.14	1.28± 1.68	N/A	1.12± 0.97
Crude protein (%)	22.18± 1.59	22.24± 1.07	N/A	23.79±0.68	22.65± 1.38
Moisture (%)	73.96± 1.71	N/A	74.23± 1.02	75.51±0.87	74.47± 1.39
Water holding capacity (%)	58.03± 6.35	58.14± 5.18	56.74± 5.31	57.75±2.12	57.60± 5.14
24-h loin pH	5.63± 0.26	5.63± 0.22	5.55± 0.18	5.86±0.20	5.65± 0.24
Drip loss (%)	5.11± 1.81	N/A	4.98± 1.72	4.46±1.85	4.24± 2.18
Cooking loss (%)	32.26± 3.54	N/A	31.15± 2.99	27.97±3.17	30.69± 3.62
Shearforce	1732.46±434.47	N/A	1219.49±316.99	N/A	719.33±784.21
Lightness (CIE-L)	52.69± 5.50	N/A	60.48± 4.33	48.31±2.98	52.00± 7.87
Redness (CIE-a)	5.72± 2.03	7.97± 2.21	6.92± 1.83	6.21±1.09	6.79± 2.06
Yellowness (CIE-b)	7.43± 1.81	4.04± 1.71	9.63± 1.28	2.73±0.98	6.33± 3.12
Color score	3.06± 0.49	N/A	2.99± 0.43	N/A	3.02± 0.46
Marbling score	2.39± 1.01	N/A	2.57± 0.73	N/A	2.50± 0.86
Tenderness score	3.07± 0.49	N/A	2.86± 0.57	N/A	2.95± 0.65

Marbling, 1: extremely low in intramuscular fat, 5: very abundant in intramuscular fat, Meat color, 1: very pale, 5: very dark. 1: very tough, very dry, very mild. 5: very tender, very juicy, very intense. N/A: not analysis.

(Warner-Bratzler shear force meter)로 측정하였다. 육색은 도축 후 24시간에 등심부위의 절개단면을 공기 중에 30분간 노출시킨 후에 CIE (Commision International de Leclairage) 값을 사용하여 L, a, b 값을 각각 측정하였다(Oh 등, 2008).

*MC4R* 유전자 단일염기변이와의 육질관련 형질간의 연관성 분석을 수행하기 위해 이용된 집단별 표현형 자료는 Table 1에 나타내었다.

2. 돼지 *MC4R* 유전자 증폭 및 염기서열분석

*MC4R* 유전자 내의 총 단일염기변이를 확인하기 위해 Meidtner 등 (2006)이 보고한 3쌍의 프라이머와 Fan 등 (2009)이 보고한 3쌍의 프라이머, 총 6쌍의 프라이머를 이용하였다(Table 2).

유전자 내 단일염기변이를 조사하기 위하여 재래돼지품종 8두와 요크셔 품종 8두에 대하여 주형 DNA를 이용하였다. DNA 증폭을 위해 사용된 PCR 기계는 PTC-200 themocycler (MJ Research, Watertown MA, USA)이며, DNA 중합효소는 h-Taq polymerase (Solgent, Korea)를 이용하였다. PCR 반응조건은 template DNA 25 ng, primer 0.01 uM, dNTP 5 mM, 10XPCR buffer 2.5 ul, 그리고 h-Taq DNA polymerase를 0.625 units를 넣어 최종 반응액 25 ul를 이용하였다. 반응조건은 최초 95℃에서 15분간 예비가열한 후 95℃에서 20초 동안 변성시키고, 각 Primer에 대응하는 annealing 온도 (Table 1)에서 20초 그리고 72℃에서 30초 합성 (extension)시키는 총 40 사이클 반복증폭하고 72℃에서 5분 동안 마지막 합성단계 (final extension)를 수행하고 DNA 증폭을 중단하였다. 증폭한 산물들은 4 ul를 취하여 모두 2% agarose gel에서 100 mv 전압을 가해 20분간 전기영동을 통해 확인하였다.

증폭산물은 GeneClean turbo kit (MP Biomedicals, USA)를 이용하여 정제한 후 Applied Biosystems 3730 DNA sequencer (PE Applied Biosystems, USA)를 이용하여 염기서열분석을 수행하였다. 얻어진 염기서열들은 Sequencher ver 4.7 (Gene codes, version 4.7, Ann RBOR, MI)을 사용하여 재래돼지에서 나타나는 단일염기변이를 조사하였다.

3. PCR-RFLP를 이용한 유전자형 결정

*MC4R* 유전자 내의 c.707A>G (Arg236His) 단일염기변이에 대한 유전자형 분석은 Primer를 이용하여 증폭한 PCR 산물에서 A 대립유전자를 인식하는 제한효소 *MwoI*을 처리하여 결정된 유전자형을 이용하였다. 또한 c.892A>G (Asp298Asn) 단일염기변이는 증폭된 동일한 PCR 산물에서 G 대립유전자를 인식하는 제한효소 *TaqI*을 처리하여 결정된 유전자형을 이용하였다 (Table 2). c.707A>G (Arg236His)와 c.892A>G (Asp298Asn) 단일염기변이에 대한 유전자형 판정은 제한효소 2 unit를 넣어 각각의 최적반응 조건 하에서 6시간 이상 반응을 통해 절단된 단편들을 2.5% MetaPhor® agarose gel (LONZA, USA)에서 90 mV 전압으로 40분간의 전기영동을 통해 수행하였다.

4. 통계분석

(1) c.707A>G (Arg236His)와 c.892A>G (Asp298Asn) 단일염기변이의 빈도분석 및 도체형질간의 연관성 분석  
공시재료로부터 얻는 *MC4R* (c.707A>G: Arg236His와 892A>G

Table 2. PCR primers and conditions used for amplification and sequencing, and restriction enzymes used for SNP genotyping

SNP	SNP location	Accession no.	Primer sequences		Tm (°C)	Restriction enzyme	PCR-RFLP pattern (bp)
			Forward (5'→3')	Reverse (3'→5')			
c.-780C>G <sup>1</sup>	proximal promoter	107793981	GTGGGGAAAGGTCACAATGG	AGTGGCTCCTCCTCTGCTT	60		
c-135C>T <sup>1</sup>	5'UTR	107793982	TCTTCTCCCAATAGCACAGC	GGAAACGCTCACCAGCATA	60		
c.175C>T <sup>2</sup> (Leu59Leu)	EXON1	107793983	CAGGTCAGAGGGGATCTCAA	GTGCAGACTGCCAGATAACA	62		
c.707A>G <sup>2</sup> (Arg236His)	EXON1	107793984	TCGATTGCAGTGGACAGGTA	GAAATGCTGTTGTTGAAGCA	62	<i>MwoI</i>	464+199/382+199+82
c.892A>G <sup>2</sup> (Asp298Asn)	EXON1	107793985	TCGATTGCAGTGGACAGGTA	GAAATGCTGTTGTTGAAGCA	60	<i>TaqI</i>	662+1/466+199+1
c.*430A>T <sup>1</sup>	3' UTR	107793986	AATGGGGACAGAGGAGACTT	CTGCACAGGGAGAATGAGC	62		

Primers were referenced from <sup>1</sup>(Fan et al., 2009) and <sup>2</sup>(Meidtner et al., 2006).

Asp238Asn) 단일염기변이들의 유전자형을 분류하여 그 빈도를 계산하였고, 집단 간의 유전적 평형상태 (Hardy-Weinberg equilibrium;  $P$ -value>0.001)를 알아보기 위하여  $\chi^2$ -test로 유의성을 검증하였다.

경제형질 측정치에 대한 *MC4R* 707A>G (Arg236His)와 892A>G (Asp238Asn) 단일염기변이의 유전자형 효과를 추정하기 위해 SAS 9.1 Package/PC를 이용하여 일반선형모형 (GLM) 분석을 하였으며, 유전자형의 효과가 유의한 형질들에 대해 최소유의차 검정으로 평균간 차이에 대한 유의성을 조사하였다. 통계분석에 이용한 모형들은 다음과 같다.

총 집단을 통합한 돼지집단 1,171두

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + G_j + D_k + b_l L_l + e_{ijkl}$$

여기서  $Y_{ijkl}$ : 도체형질 관측치,  $\mu$ : 전체의 평균,  $S_i$ : 성별의 효과,  $G_j$ : 유전자형 효과,  $D_k$ : 품종,  $L_l$ : 체중에 대한 공변량,  $b_l$ : 체중에 대한 회귀계수,  $e_{ijkl}$ : 임의오차를 나타낸다.

(2) *MC4R* 유전자 내의 단일염기변이들간의 연관 불균형 분석 및 반수체형 분석

*MC4R* 총 6개의 단일염기변이 (c.-780C>G, c-135C>T, c.175C>T-Leu59Leu, c.707A>G-Arg236His, c.892A>G-Asp298Asn, c.\*430A>T) 간의 연관불균형 (Linkage disequilibrium) 정도를 추정하기 위해 HaploView software package (Barrett 등, 2005)를 이용하여 분석을 수행하였으며 Stephens 등 (2001)의 method를 적용하여 단일염기변이간의  $D'$ 과  $r^2$  값을 추정하였다.

결 과

1. 한국재래돼지 *MC4R* 유전자의 염기서열 단일염기변이들간의 연관 불균형 분석

본 연구에서는 *MC4R* 유전자 내의 총 염기서열을 재래돼지 품종과 요크셔 품종에서 탐색하였다. *MC4R* 유전자는 1번 염색체에 위치하고 염기서열 상으로 볼 때 *MC4R*은 하나의 Exon 영역으로 이루어져 있는데, 6개의 Primer 쌍을 이용하여 프로모터 영역, 5'UTR 영역, Exon 영역과 5'UTR 영역에서 염기서열 분석을 수행하였다.

총 6개의 단일염기변이 (c.-780C>G, c-135C>T, c.175C>T-Leu59Leu, c.707A>G-Arg236His, c.892A>G-Asp298Asn, c.\*430A>T)를 발굴하였다. 재래돼지의 총 6개의 단일염기변이간의 연관불균형 정도에 대하여 c.-780C>G, c-135C>T, c.175C>T-Leu59Leu, c.707A>G-Arg236His와 c.\*430A>T는 완전한 연관불균형을 이루고 있었으며, c.892A>G (Asp298Asn) 단일염기변이만  $r^2$ 는 0.028 그리고  $D'$ 값은 0.348 로 나타나 연관불균형 정도가 매우 낮았다 (Fig. 1). 따라서 c.707A>G (Arg236His)과 c.892A>G (Asp298Asn)의 두 단일염기변이를 선발하여 유전자형 분석을 실시하였다.

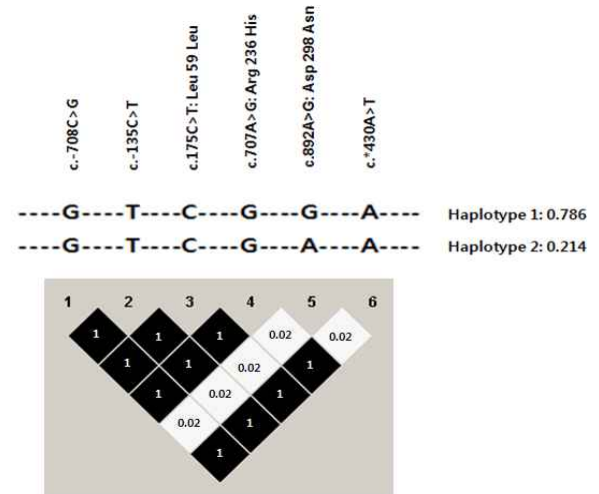


Fig. 1. Linkage disequilibrium and haplotypes frequency in the *MC4R* gene from Korean Native pig population (Linkage disequilibrium: Black boxes indicate  $r^2$  values between 0.8 and 1.0, and light boxes indicate  $r^2$  values less than 0.80).

2. *MC4R* 유전자내의 c.707A>G (Arg236His)와 c.892A>G (Asp298Asn) 두 단일염기변이의 품종별 빈도 분석

돼지 품종별 *MC4R* 유전자 내의 c.707A>G (Arg236His)과 c.892A>G (Asp298Asn) 단일염기변이의 유전자형의 빈도는 Table 3에 요약되어 있다. c.707A>G (Arg236His) 유전자형 빈도는 G 대립유전자의 빈도가 재래돼지, 랜드레이스, 버크셔 그리고 듀록 품종에서는 1로 고정되어 있었다. 요크셔 역시 그 빈도가 0.06으로 현저히 낮았다. 또한 c.892A>G (Asp298Asn) 단일염기변이의 G 대립유전자의 빈도는 재래돼지에서 0.81로 가장 높게 나타났으며, 버크셔에서도 0.71로 높게 나타났다. 하지만 랜드레이스에서는 0.32, 요크셔에서는 0.19 그리고 듀록에서는 0.12로 G 대립유전자의 빈도가 현저히 낮게 관찰되었다. 또한 유전자형이 분석된 집단 모두 하디와인버그평형 ( $P$ -value>0.05)에 만족 하는 것으로 나타났다 (Table 3).

3. *MC4R* 유전자내의 c.707A>G (Arg236His)와 c.892A>G (Asp298Asn) 두 단일염기변이와 육질관련 형질간의 연관성 분석

돼지 *MC4R* 유전자 내의 c.707A>G (Arg236His)와 c.892A>G (Asp298Asn) 단일염기변이 및 육질관련 형질간의 연관성 분석을 위해 제주재래돼지와 요크셔 품종의 양방향교배로 생산된 F2 집단 325두, 한국재래돼지와 랜드레이스 품종의 교배로 생산된 F2 집단 253두, 버크셔 품종집단 279두와 상업돈집단인 292두의 표현형자료를 모두 통합하여 484두 (c.707A>G-Arg236His)와 1,126두

Table 3. Genotypes and allele frequencies of c.707A>G (Arg236His) and c.892A>G (Asp298Asn) polymorphisms in the *MC4R* gene from 8 pig populations

SNP	Line	Genotype frequency			Allele frequency		HWE <i>P</i> -value
		AA	AG	GG	A Allele	G Allele	
c.707A>G (Arg236His)	KNP (n=14)	–	–	14(1.00)	0	1	1.00
	Yorkshire (n=8)	–	1(0.12)	7(0.88)	0.06	0.94	1.00
	Landrace (n=7)	–	–	7(1.00)	0	1	1.00
	Duroc (n=8)	–	–	8(1.00)	0	1	1.00
	Berkshire (n=8)	–	–	8(1.00)	0	1	1.00
	KNP × Yorkshire (n=347)	–	31(0.10)	293(0.90)	0.05	0.95	0.94
	KNP × Landrace (n=96)	–	–	96 (1.00)	0	1	1.00
	Dodram pigs (n=270)	–	9(0.03)	261(0.97)	0.02	0.98	1.00
Total animals (n=758)			37(0.07)	474(0.93)	0.11	0.89	
c.892A>G (Asp298Asn)	KNP (n=16)	0(0.00)	6(0.37)	10(0.63)	0.19	0.81	1.00
	Yorkshire (n=8)	5(0.62)	3(0.38)	0(0.00)	0.81	0.19	1.00
	Landrace (n=7)	4(0.50)	3(0.37)	1(0.13)	0.68	0.32	1.00
	Duroc (n=8)	6(0.75)	2(0.25)	0(0.00)	0.87	0.12	1.00
	Berkshire (n=279)	22(0.08)	116(0.42)	141(0.50)	0.29	0.71	0.93
	KNP × Yorkshire (n=347)	59(0.18)	178(0.55)	88(0.27)	0.45	0.55	0.22
	KNP × Landrace (n=253)	69(0.27)	122(0.48)	62(0.25)	0.51	0.49	0.27
	Dodram pigs (n=292)	82(0.28)	147(0.50)	63(0.22)	0.53	0.47	0.27
Total animals (n=1210)		238(0.21)	551(0.49)	337(0.30)	0.46	0.54	

(c.892A>G-Asp298Asn)에 대한 유전자형 효과를 분석하였다 (Table 4).

*MC4R* 유전자 내의 c.707A>G (Arg236His) 단일염기변이와 육질형질간의 연관성 분석 결과는 조지방, 등심 내의 수분, 육색, 적색도 그리고 황색도 등에서 유의적인 효과를 나타내었다 ( $P < 0.005$ ). 하지만 본 검증집단에서는 AA 유전자형의 출현이 없었으며, AG 유전자형 역시 37두 밖에 존재하지 않았다.

또한 *MC4R* 유전자 내의 c.892A>G (Asp298Asn) 단일염기변이의 연관성분석 결과는 오직 등지방두께의 형질에만 효과가 있는 것으로 나타났으며 c.892A>G (Asp298Asn) 단일염기변이가 AA 유전자형을 가지고 있는 개체는 AG와 GG 유전자형을 가진 개체보다 등지방두께가 두꺼운 것으로 관찰되었다 ( $P < 0.005$ ). 다른 육질 관련 형질에서는 유전자형 효과를 관찰할 수 없었다.

### 고찰

*MC4R* (Melanocortin-4 receptor) 유전자는 중요한 인체비만유전자중의 하나로 알려져 있으며, 돼지에서 c.892A>G (Asp298Asn) 단일염기변이의 기능성과 돼지품종간의 빈도분포는 비교유전체학의 관점에서 매우 중요한 유전자로 인식되고 있다. 돼지 *MC4R* 유전자는 돼지 염색체 1번에 존재하는데, 양쪽 주위에 두 개의

suggestive QTL이 보고되면서, 야생멧돼지와 요크셔의 실험축군과 폴란드 비육돈집단에서는 *MC4R* 단일염기변이가 지방관련 형질에 효과가 없는 것으로 보고되었다 (Park 등, 2002; Stachowiak 등, 2006). 그러나 그 외의 다른 돼지 품종에서는 *MC4R* 유전자형이 성장형질 중 일당증체량, 사료요구율, 등지방두께 등과 유의적인 연관이 있음이 보고되어 있다 (Houston 등, 2004; Jokubta 등, 2006; Meidtnr 등, 2006). 따라서 본 연구는 *MC4R* 유전자의 단일염기변이들을 규명하고, 육질형질간의 연관성을 평가하는 것을 목적으로 하였다.

Fan 등 (2009)의 보고와 동일하게 *MC4R* 유전자 내의 총 염기서열을 재래돼지에 대하여 분석을 수행하였으며, 총 6개의 단일염기변이 (c.-780C>G, c-135C>T, c.175C>T-Leu59Leu, c.707A>G-Arg236His, c.892A>G-Asp298Asn, c.\*430A>T) 가 발굴되었다 (Table 2). 재래돼지의 *MC4R* 유전자 내의 단일염기변이들을 최초로 본 연구에서 보고하였다. 발굴한 총 6개의 단일염기변이간의 연관불균형을 조사한 결과, 재래돼지에서는 c.-780C>G, c-135C>T, c.175C>T (Leu59Leu), c.707A>G (Arg236His)과 c.\*430A>T는 완벽한 연관불균형으로 되어 있음을 알 수 있었으며, c.892A>G (Asp298Asn) 단일염기변이는 나머지 총 5개의 단일염기변이와는 연관균형을 이루고 있음을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1). 위의 연관불균형분석을 바탕으로 아미노산 구조를 바꾸는

Table 4. Association of *MC4R* gene c.892A>G-Asp298Asn and c.707A>G- Arg236His polymorphisms genotypes with meat quality traits from combined pig population

Gene	Phenotypic trait	Least square means (SE)			P-value
		AA (n=0)	AG (n=37)	GG (n=447)	
c.707A>G (Arg236His)	Backfat thickness (mm)	–	25.26 (1.80)	22.95 (0.35)	>0.21
	<b>Crude fat (%)</b>	–	<b>3.00 (0.15)<sup>a</sup></b>	<b>2.21 (0.04)<sup>b</sup></b>	<b>&lt;0.0001</b>
	<b>Moisture (%)</b>	–	<b>73.23 (0.25)<sup>a</sup></b>	<b>74.29 (0.07)<sup>b</sup></b>	<b>&lt;0.0001</b>
	Water holding capacity (%)	–	57.29 (0.91)	57.44 (0.24)	>0.87
	24-h loin pH	–	5.59 (0.03)	5.60 (0.01)	>0.85
	Driploss (%)	–	5.54 (0.28)	5.15 (0.08)	>0.19
	Cooking loss (%)	–	32.23 (0.52)	32.02 (0.14)	>0.69
	Shearforce	–	1384.96 (59.44)	1452.19 (16.55)	>0.27
	<b>Lightness (CIE-L)</b>	–	<b>55.99 (0.83)<sup>a</sup></b>	<b>56.48 (0.23)<sup>b</sup></b>	<b>&lt;0.003</b>
	<b>Redness (CIE-a)</b>	–	<b>7.63 (0.34)<sup>a</sup></b>	<b>6.23 (0.09)<sup>b</sup></b>	<b>&lt;0.0001</b>
<b>Yellowness (CIE-b)</b>	–	<b>9.56 (0.26)<sup>a</sup></b>	<b>8.33 (0.07)<sup>b</sup></b>	<b>&lt;0.001</b>	
c.892A>G (Asp298Asn)		AA (n=283)	AG (n=551)	GG (n=337)	
	<b>Backfat thickness (mm)</b>	<b>24.61 (0.38)<sup>a</sup></b>	<b>23.67 (0.26)<sup>a, b</sup></b>	<b>22.84 (0.32)<sup>b</sup></b>	<b>&lt;0.002</b>
	Crude fat (%)	2.14 (0.07)	1.97 (0.05)	2.01 (0.06)	>0.14
	Moisture (%)	74.47 (0.09)	74.49 (0.06)	74.46 (0.08)	>0.94
	Water holding capacity (%)	57.33 (0.33)	57.84 (0.21)	57.74 (0.27)	>0.41
	24-h loin pH	5.69 (0.01)	5.67 (0.01)	5.66 (0.01)	>0.26
	Driploss (%)	4.12 (0.13)	4.34 (0.08)	4.16 (0.11)	>0.19
	Cooking loss (%)	31.88 (0.21)	31.28 (0.13)	31.38 (0.17)	>0.05
	Shearforce	743.62 (15.88)	729.89 (10.28)	728.51 (13.43)	>0.72
	Lightness (CIE-L)	51.18 (0.29)	51.41 (0.19)	51.52 (0.25)	>0.67
Redness (CIE-a)	6.77 (0.12)	6.62 (0.08)	6.73 (0.10)	>0.54	
Yellowness (CIE-b)	5.87 (0.11)	5.87 (0.6)	5.96 (0.08)	>0.68	

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

c.707A>G (Arg236His)와 c.892A>G (Asp298Asn) 두 개의 단일염기변이를 선발하여 유전자형을 분석하였는데 흥미로운 것은 c.707A>G (Arg236His)의 다형성의 G 대립유전자의 빈도는 재래 돼지를 비롯한 랜드레이스, 머크셔, 듀록 품종에서도 모두 고정이었으나, 요크셔집단만이 작지만 유일하게 A 대립유전자의 빈도가 관찰되었다 (Table 3). 선행연구 결과에 의하면 요크셔집단과 타 돼지집단과의 교배방법을 이용한 실험축군들에서 c.707A>G (Arg236His) 단일염기변이가 등지방두께 및 성장률에 영향을 준다고 보고되었으며, c.707A>G (Arg236His)와 c.892A>G (Asp298Asn) 두 개의 단일염기변이들의 상호작용에 의해서 성장률에 고도의 유의적인 효과가 나타났다는 새로운 사실이 최근 보고되었다 (Meidtner 등, 2006; Fan 등, 2009). 하지만 본 연구에서는 c.707A>G (Arg236His) 단일염기변이의 A 대립유전자의 빈도는 매우 적게 관찰되었으며, AA 유전자형을 가진 개체는 단 1두도 발견할 수 없었다 (Table 3). 품종별 c.707A>G (Arg236His) 단일염기변이의 유전자형 빈도의 양상으로 추론해보면, *MC4R* 유전자 내의 c.707A

>G (Arg236His) 단일염기변이의 A 대립유전자는 요크셔 품종에서 기인한 것으로 사료된다.

*MC4R* 유전자 내의 c.707A>G (Arg236His)와 c.892A>G (Asp298Asn) 단일염기변이들과 표현형을 가지고 있는 돼지집단에서 연관성 분석을 실시하였을 때, c.707A>G (Arg236His) 단일염기변이 효과는 조지방, 등심내의 수분, 육색, 적색도 그리고 황색도 등에서 유의적인 연관성이 관찰되었다. A 대립유전자가 있을 때 근내지방도와 육색이 우수한 것으로 나타났으며, G 대립유전자는 상대적으로 근내지방도가 낮은 것으로 나타났다.

또한 *MC4R* 유전자 내의 c.892A>G (Asp298Asn) 단일염기변이의 분석결과는 등지방두께에서 유의적인 효과를 나타내었는데, AA 유전자형을 가진 개체들이 AG, GG 유전자형을 가진 개체들보다 월등히 등지방두께가 두꺼운 것을 확인할 수 있었다. 국내 선행연구에서는 *MC4R* 유전자 내의 c.892A>G (Asp298Asn) 단일염기변이의 A 대립유전자를 가지고 있는 개체는 G 대립유전자를 가지고 있는 개체보다 근내지방도가 유의적으로 높으며, 도체중이 무겁다

고 보고하였고, 또한 육질을 향상시킬 수 있음이 보고되었다(Han 등, 2007). 또한 *MC4R* 유전자 내의 c.892A>G (Asp298Asn) 단일염기변이는 국내 듀록 집단에서 모두 성장형질과 유의한 연관성이 있음을 시사하였으며, A 대립유전자는 성장률이 빠르고 등지방 두께가 두꺼운 것으로 보고되었다(Kim 등, 2005; Kim 등, 2006). 이상의 결과와 본 연구의 결과에 따르면 *MC4R* 유전자변이는 육질등급에 영향을 주는 유전자마커로 활용할 수 있으며, *MC4R* 유전자형에 따른 종돈의 선발과 이용에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 요 약

본 연구는 한국재래돼지의 *MC4R* 유전자 내의 단일염기변이들을 규명하고 그 유전자형 효과가 유전자표지인자를 이용한 선발(Marker assisted selection, MAS)에 활용 가능한지를 검증하기 위해서 수행되었다. 한국재래돼지의 *MC4R* 유전자 총 염기서열을 분석하기 위해 6개의 Primer들을 이용하여 증폭산물을 생성하였으며, 염기서열분석을 통해 총 6개(c.-780C>G, c.-135C>T, c.175C>T-Leu59Leu, c.707A>G-Arg236His, c.892A>G-Asp298Asn, c.\*430A>T)의 단일염기변이를 발견하였다. 한국재래돼지 *MC4R* 유전자 내의 총 6개의 단일염기변이들간의 연관불균형과 반수체 분석을 통해 단일염기변이들간의 연관성을 분석하였으며, c.-780C >G, c.-135C>T, c.175C>T-Leu59Leu, c.707A>G-Arg236His와 c.\*430A>T는 완전한 연관불균형을 이루고 있었고, c.892A>G (Asp298Asn) 단일염기변이만  $r^2$ -value가 0.028,  $D'$ -value가 0.348로 연관불균형 정도가 매우 낮았다. c.707A>G (Arg236His)와 c.892A>G (Asp298Asn) 단일염기변이들을 선발하여 PCR-RFLP 유전자형 분석방법을 이용해 돼지 5품종간의 유전자형 빈도를 추정한 결과, c.707A>G (Arg236His) 단일염기변이는 요크셔 품종 집단에서 오직 A (His) 대립유전자를 관찰할 수 있었으며, 나머지 한국재래돼지, 랜드레이스, 버크셔와 듀록 품종에서는 G 대립유전자의 고정으로 나타났다. c.707A>G 단일염기변이와 육질형질을 484두에서 연관성 분석을 실시한 결과, 조지방, 등심 내의 수분, 육색, 적색도 그리고 황색도 등에서 유의적인 연관성을 관찰할 수 있었다. c.892A>G (Asp298Asn) 단일염기변이의 유전자형 빈도는 품종별로 차이가 낮으며, A (Asn) 대립유전자의 빈도가 가장 높은 품종은 듀록으로 나타났고, G (Asp) 대립유전자의 빈도가 가장 높은 품종은 한국재래돼지로 조사되었다. c.892A>G (Asp 298Asn) 단일염기변이와 돼지 4 집단의 육질형질을 1,126두에서 분석한 결과, 등지방두께에 고도의 유의적인 효과를 관찰할 수 있었다 ( $P<0.002$ ). AA 유전자형을 가진 개체가 AG나 GG 유전자형을 가진 개체보다 등지방두께가 두꺼운 것을 확인할 수 있었다. 본 연구의 결과를 통해 *MC4R* 유전자 내의 c.892A>G (Asp298Asn) 단일염기변이는 돼지의 선발개량에 유전자표지인자로서 충분한 효과가 있음을 검증하였다.

(주제어: *MC4R*, DNA 마커, 육질, 재래돼지, 돼지 품종)

## 사 사

본 연구는 2011년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었습니다. 본 논문의 질적 수준 향상을 위해 수고해주신 익명의 심사위원들에게 감사의 말씀을 드립니다.

## 인 용 문 헌

- Barrett, J. E., Fry, B., Maller, J. and Daly, M. J. 2005. HAPLOVIEW: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 21:263-265.
- Bruun, C. S., Jørgensen, C. B., Nielsen, V. H., Andersson, L. and Fredholm, M. 2006. Evaluation of the porcine melanocortin 4 receptor (*MC4R*) gene as a positional candidate for a fatness QTL in a cross between Landrace and Hampshire. *Anim. Genet*. 37:359-362.
- Ciobanu, D., Bastiaansen, J., Malek, M., Helm, J., Woollard, J., Plastow, G. and Rothschild, M. F. 2001. Evidence for new alleles in the protein kinase adenosine monophosphate-activated gamma  $\gamma$ 3-subunit gene associated with low glycogen content in pig skeletal muscle and improved meat quality. *Genetics*. 159:1151-1162.
- Ciobanu, D., Bastiaansen, J., Lonergan, S. M., Thomsen, H., Plastow, G. and Rothschild, M. F. 2004. New alleles in calpastatin gene are associated with meat quality traits in pigs. *J. Anim. Sci*. 82:2829-2839.
- Choi, Y. S., Park, B. Y., Lee, J. M. and Lee, S. K. 2005. Comparison of carcass and meat quality characteristics between Korean native black pigs and commercial crossbreed pigs. *Korean J. Food Sci*. 25:322-327.
- Cho, S. H., Park, B. Y., Kim, J. H., Kim, M. J., Seong, P. N., Kim, Y. J., Kim, D. H. and Ahn, C. N. 2007. Carcass yields and meat quality by live weight of Korean native black pigs. *Korea. J. Anim. Sci. Tech*. 49:523-530.
- Fujii, J. K., Otsu, F., Zorzato, S., de Leon, V. K., Khanna, J. E., Weiler, P. J., O'Brien, D. H. and MacLennan, D. H. 1991. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*. 253:448-451.
- Farooqi, I. S., Keogh, J. M., Yeo, G. S., Lank, E. J., Cheetham, T. and O'Rahilly, S. 2003. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin-4 receptor gene. *N. Engl. J. Me*. 348:1085-1089.
- Fan, B., Onteru, S. K., Plastow, G. S. and Rothschild, M. F. 2009. Detailed characterization of the porcine *MC4R* gene in relation to fatness and growth. *Anim. Genet*. 40:401-409.
- Han, S. H., Lee, S. S., Ko, M. S., Seong, P. N., Park, B. Y. and

- Cho, I. C. 2007. Effects of a porcine *MC4R* polymorphism (892G>A) on carcass traits in commercial pigs. *Korea. J. Anim. Sci. Tech.* 49:569-576.
- Houston, R. D., Cameron, N. D. and Rance, K. A. 2004. A melanocortin-4 receptor (*MC4R*) polymorphism is associated with performance traits in divergently selected Large White pig populations. *Anim. Genet.* 35:386-390.
- Jin, S. K., Kim, I. S., Hur, S. J., Hah, K. H. and Kim, B. W. 2005. Physico-chemical characteristics with market weight in Korean native and landrace crossbred pigs. *Korean J. Intl. Agri.* 17: 182-187.
- Jin, S. K., Kim, I. S., Hur, S. J., Kim, S. J. and Jeong, K. J. 2006. The influence of pig breeds on qualities of loin. *Korea. J. Anim. Sci. Tech.* 48:747-758.
- Jokubka, R., Maak, S., Kerziene, S. and Swalve, H. H. 2006. Association of a melanocortin 4 receptor (*MC4R*) polymorphism with performance traits in Lithuanian White pigs. *J. Anim. Breed. Genet.* 123:17-22.
- Kim, E. H., Choi, B. H., Kim, K. S., Lee, C. K., Cho, B. W., Kim, T. H. and Kim, J. J. 2007. Detection of Mendelian and parent-of-origin quantitative trait loci in a cross between Korean native pig and Landrace I. growth and body composition traits. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 19:1702-1705.
- Kim, K. S., Larsen, N. J., Short, T., Plastow, G. and Rothschild, M. F. 2000a. A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (*MC4R*) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits. *Mamm. Genome.* 11:1311-135.
- Kim, K. S., Larsen, N. J. and Rothschild, M. F. 2000b. Linkage and physical mapping of the porcine melanocortin-4 receptor (*MC4R*) gene. *J. Anim. Sci.* 78:791-792.
- Kim, K. S., Shin, H. Y., Lee, J. J., Hong, S. K., Choi, B. W., Kim, T. H., Lee, H. K. and Cho, B. W. 2005. Investigation of Porcine Melanocortin-4 Receptor (*MC4R*) Polymorphism on Economic Traits. *Korea. J. Life. Sci.* 15:968-971.
- Kim, M. J., Oh, J. D., Cho, G. H., Lee, J. H., Lee, S. S., Hong, Y. S., Jeon, J. K., Jeon, G. J. and Lee, H. K. 2006. Association between economic traits and candidate gene polymorphism in Korean native pig and Duroc. *Korean. J. Emd. Trans.* 21:73-280.
- Kim, S. S., Kim, J. R., Moon, J. K., Choi, B. H., Kim, T. H., Kim, K. S., Kim, J. J. and Lee, C. K. 2009. Transcriptional alteration of p53 related processes as a key factor for skeletal muscle characteristics in *Sus scrofa*. *Mol. Cells.* 28:565-573.
- Kim, S. W., Roh, J. G., Cho, Y. I., Choi, B. H., Kim, T. H., Kim, J. J. and Kim, K. S. 2010. Development of Optimal Breeding Pigs Using DNA Marker Information. *Genomics Inform.* 8:81-85.
- Li, S., Li, X., Choi, B. W., Lee, C. K., Cho, B. W., Kim, J. J. and Kim, K. S. 2009. Linkage disequilibrium and gene expression analyses of IGF2 gene in Korean native pigs. *Korea. J. Anim. Sci. Tech.* 51:15-24.
- Li, X., Lee, C. K., Choi, B. W., Kim, T. H., Kim, J. J. and Kim, K. S. 2010. Quantitative gene expression analysis on chromosome 6 between Korean native pigs and Yorkshire breeds for fat deposition. *Genes Genom.* 32:385-393.
- Meidtner, K., Wermter, A. K., Hinney, A., Remschmidt, H., Hebebrand, J. and Fries, R. 2006. Association of the melanocortin 4 receptor with feed intake and daily gain in F2 Mangalitsa x Pietrain pigs. *Anim. Genet.* 37:245-247.
- Moon, J. K., Kim, K. S., Kim, J. J., Choi, B. H., Cho, B. W., Kim, T. H. and Lee, C. K. 2009. Differentially expressed transcripts in adipose tissue between Korean native pig and Yorkshire breeds. *Anim. Genet.* 40:115-118.
- Oh, H., Kim, H., Yang, H., Lee, J., Joo, Y. and Kim, C. 2008. Comparison of meat quality characteristics between crossbreeds. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 28:171-180.
- Park, H. B., Carlborg, O., Marklund, S. and Andersson, L. 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.
- Rothschild, M. F., Jacobson, C. and Vaske, D. A. 1996. The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:2012-205.
- Stephens, M., Smith, N. and Donnelly, P. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am. J. Hum. Genet.* 69:978-989.
- Stachowiak, M., Szydlowski, M., Obarzanek-Fojt, M. and Switonski, M. 2006. An effect of a missense mutation in the porcine melanocortin-4 receptor (*MC4R*) gene on production traits in Polish pig breeds is doubtful. *Anim. Genet.* 37:55-57.
- Van den Maagdenberg, K., Stinckens, A., Claeys, E., Seynaeve, M., Clinquart, A., Georges, M., Buys, N. and De, Smet. S. 2007. The p.Asp298Asn missense mutation in the porcine melanocortin-4 receptor (*MC4R*) gene can be used to affect growth and carcass traits without an effect on meat quality. *Animal.* 1:1089-1098.

(Received Feb. 9, 2011; Revised Nov. 23, 2011; Accepted Jan. 31, 2012)