

Effects of Genetic Polymorphisms of *ADD1* Gene on Economic Traits in Hanwoo and Jeju Black Cattle-derived Commercial Populations in Jeju-do

Sang-Hyun Han¹, Hong-Shik Oh¹, Jae-Bong Lee², Eun-Sook Jwa³, Yong-Jun Kang³, Sang-Geum Kim³, Sung-Nyun Yang³, Yoo-Kyung Kim³, In-Cheol Cho³, Won-Mo Cho³, Moon-Suck Ko³ and Kwang-Soo Baek^{3*}

¹Educational Science Research Institute, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

²Korea Zoonosis Research Institute, Chonbuk National University, Iksan 570-390, Korea

³Subtropical Animal Experiment Station, National Institute of Animal Science, RDA, Jeju 690-150, Korea

Received October 20, 2014 / Revised November 18, 2014 / Accepted November 18, 2014

Genetic polymorphisms of *adipocyte determination and differentiation factor 1* (*ADD1*) gene were screened in Hanwoo and Jeju Black cattle-derived commercial (JBC-DC) populations. The *ADD1* genotypes were determined using the presence/absence of 84-bp fragment at intron 7 region. The association of *ADD1* genotypes for economic traits was examined in both populations. In the Hanwoo steers, *ADD1* *D*/*-* carcasses showed significantly thicker backfat levels than those from *WW* ($p < 0.05$). However, the thickest level of backfat appeared in *WD* heterozygotes, whereas thicker backfat did not appear in *DD* homozygotes in the JBC-DC population ($p < 0.05$), leading to the supposition that synergic effects of alleles *W* and *D* increase backfat deposition. On the other hand, there was no association between the *ADD1* genotypes and intramuscular fat deposition measured as meat quality index and marbling score. From these results, we concluded that the bovine *ADD1* affected the backfat in subcutaneous tissue, rather than intramuscular fat in muscle tissue. In addition, the *DD* animals showed higher levels of meat color than those from *W*/*-* ($p < 0.05$). Interestingly, a highly significant difference was found between the genotypes and carcass weights only in the JBC-DC population, and *D*/*-* animals were heavier by more than 38 kg than those from *WW* ($p < 0.001$). The results of this study reveal faster growth rate and differences in steer productivity according to genotypes of the *ADD1* gene. These findings demonstrate that *ADD1* genotypes may effectively function as molecular genetic markers for the improvement of Hanwoo and Jeju Black cattle-related crossbreeding systems.

Key words : *ADD1* (*adipocyte determination and differentiation factor 1*), association, economic trait, Hanwoo, Jeju Black cattle

서 론

가축에서 유전체 정보에 대한 연구는 후대의 모색과 같은 질적형질에 대한 원인 유전자의 탐색 수준을 넘어, 체중, 체장과 같은 양적형질의 유전양상을 설명하는 자료를 제공하는 수준에 이르렀다. 전 세계적으로 다양한 분야의 연구결과 중에서 유전자의 다형성과 경제형질의 상관을 분석한 결과들은 분자도움선발(marker-assisted selection)을 통한 종축의 선발과 육성단계에 적용되고 있다[8, 39].

경제형질 관련 유전자 탐색을 위해서 양적형질좌위(quantitative traits loci, QTL) 탐색법과 후보유전자접근법(candidate

gene approach) 등 크게 두 가지 실험적 접근법이 이용되고 있다[32]. 전자는 유전체 수준의 방대한 정보와 표현형의 상관관계를 참조가계(reference family)에 대한 평가를 통해 최고 연관유전자를 탐색할 수 있는 체계이다. 반면, 세대가 긴 소와 말 등의 동물이나 특정 질병의 원인 탐색 등에서는 생화학적 대사경로를 중심으로 선정한 유전자군 내지 단일 유전자 좌위의 다형성을 집단유전학(population genetics) 분석을 통해 얻은 자료를 바탕으로 다형성의 분포와 표현형의 통계적 상관관계를 분석하는 방식이므로, 완벽한 가계를 요구하지 않으며, 충분한 규모의 표본집단에 대한 분석을 통해 선정된 DNA marker의 유전적 다형성의 효과를 표본집단 내에서 평가할 수 있다[4, 31].

제주흑우는 [조선왕조실록], [탐라순력도(耽羅巡歷圖)], [탐라기년(耽羅紀年)] 등 옛 문헌에 제주지역에서 제향·진상품으로 공출되고 국가적으로 엄격히 사육·관리되었던 기록이 전해지고 있는 모색이 검은 우리나라 고유의 소 품종 중 하나이다. 2013년 천연기념물 546호로 지정되어 관리되고 있으며, 인공수정용 정액을 이용한 한우와의 교배축군(제주흑우실용화축

*Corresponding author

Tel : +82-64-754-5714, Fax : +82-64-754-5713

E-mail : bks@korea.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

군)이 생산되어 산업화에 적용되고 있다.

제주흑우의 유전적 특성에 대해서는 미토콘드리아 유전자 서열의 다형성에 근거한 계통유전학적 특성과 모색 특성과 관련된 *MC1R*, *ASIP* 유전자형의 분포[10, 22, 23], 축군의 혈통 관리를 위해 연구된 *microsatellite*, *indel marker*의 다형성과 대립인자의 분포 등이 연구되었다[11, 12]. 반면, 현재의 제주흑우가 1990년대에 시작되어 육성된 축군이며, 그동안 특성화 및 개체 증식을 위한 연구들이 집중되어[18-20, 29], 가축의 경제형질 개량을 위한 연구자료를 거의 전무한 실정이다. 현재 우리나라의 소고기 생산에 있어 가장 중요한 경제형질은 육질과 육량, 즉 등심 내 지방함량과 체중이라고 할 수 있다. 지난 수십 년 동안 가축의 성장 형질은 유전적 선택, 환경의 조절, 적정 사양관리 등을 통해 빈약한 육질을 향상시키는 방향으로 개선되었다[24, 35]. 이 중 근내지방도는 육질을 결정하는 중요한 항목들 중 하나로, 동물생산에서 가장 관심의 집중이 되었고[6, 36], 도축우의 단가에 가장 큰 영향을 미치고 있다.

Adipocyte determination and differentiation factor-1 (ADD1) 유전자는 지방전구세포(*preadipocyte*)가 지방세포로 분화되는 과정을 조절하는 핵심 유전자 중 하나로[29, 41, 45], 지방전구세포에 지방이 축적되는 과정에서 지방산의 수송과 합성에 관련된 여러 가지 유전자 발현을 조절하는 전사인자로 알려져 있다. 특히, *ADD1* 유전자는 지방세포 분화에 핵심적인 역할을 수행하는 *peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 (PPAR γ 2)*와 함께 작용하여 근육 유래의 중간엽 줄기세포(*muscle-derived mesenchymal stem cell, MDMSC*)의 분화에 관여하는 것으로 알려져 있다. *MDMSC*의 지방세포 분화는 근육 내에서 근내지방(*intramuscular fat*)의 축적을 결정하는 가장 중요한 대사경로라 할 수 있다[2, 7, 44]. 최근 중국의 소 품종들에 대한 연구보고에서 *ADD1* 유전자의 *intron 7*에서 84-bp 크기의 삽입/결실 돌연변이(*insertion/deletion mutation, indel*)를 발견하였고, Nanyang 품종의 월령별체중과 일당증체량 등의 경제형질이 유전자의 다형성과 유의적인 상관을 나타낸다고 보고하였다[16].

본 연구에서는 제주도 내에서 사육되어 도축된 한우 거세우 집단과 제주흑우와 한우의 교배축군인 제주흑우실용화축군 집단의 도체형질과 *ADD1* 유전자 다형성의 상관관계를 조사하여 향후 제주도 한우, 제주흑우 및 제주흑우 유래의 산업용 축군의 유전적 개량에 활용할 수 있는 기초자료를 마련하고자 수행하였다.

재료 및 방법

공시동물

연구에 이용된 제주흑우실용화축군(Jeju Black cattle-derived commercial population, JBC-DC)은 제주특별자치도 축산진흥원과 국립축산과학원 난지축산시험장에서 보유중인

제주흑우 종모우 유래의 동결정액을 공급받아, 인공수정을 통해 제주도 내 농가에서 한우를 종빈우하여 생산한 제주흑우와 한우의 교배 1세대를 의미한다. 생산된 송아지 중에서 유전자 검사를 통해 제주흑우 종모우가 부친으로 확인되고, 친자확인인 된 이후, 제주흑우 특이 모색유전자형을 보유한 흑모색 개체들을 연구의 대상으로 선정하였다. 유전자 친자확인 후 *MC1R* 유전자형 판독은 제주특별자치도 축산진흥원에서 수행하였으며, 비육 출하된 개체들을 재선정하는 과정에서 *MC1R* 유전자형과 친자확인을 다시 수행하였다. 연구에 이용된 한우 도축우 집단은 JBC-DC의 출하시기와 유사한 시기에 출하된, 출하월령 30개월인 개체들을 선정하였고, 또한 축산물품질평가원에서 제시한 품종판정 결과에서 한우로 인정되면서, 유전자 검사에서 *MC1R* 유전자형 *ee*인 개체들만을 선별하여 이용하였다. JBC-DC와 한우 모두 거세우만을 선정하여 유전자형 판독과 통계분석에 이용하였다.

DNA 분리

제주흑우 종모우의 DNA는 제주특별자치도 축산진흥원과 국립축산과학원 난지축산시험장에서 보유중인 *genomic DNA*를 분양받아 이용하였으며, 한우 집단은 2012년 7월부터 2014년 5월까지 제주도 내 축협도축장을 통해 도축된 도축우의 등급판정 시 절개한 근육시료를 이용하였다. JBC-DC 집단은 제주도 축산진흥원에서 유전자검사를 위해 수집된 전혈에서 분리한 *genomic DNA* 일부를 분양받아 사용하였다. 한우 도축우의 근육 조직에서 DNA 분리는 Sambrook 등[33]의 방법을 변형하여 수행하였다. 잘게 분쇄한 조직을 *nuclei lysis buffer*를 이용하여 분해하고, 추출액에 *RNase*를 처리 후 *phenol-chloroform*을 이용하여 분획하였다. DNA는 *ethanol* 침전법으로 회수하고 *TE buffer*에 용해하였다. 준비한 DNA 용액은 *NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA)*로 흡광도를 측정 후 A_{260}/A_{280} 1.8 이상인 DNA 용액들을 50 ng/ μ l로 희석하여 PCR 증폭을 위한 주형으로 이용하였다.

중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)

ADD1 유전자형 판독을 위한 PCR 증폭을 위해 Huang 등[16]에 의해 National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) database 상에 보고된 accession no. GQ202218의 서열을 대상으로 고안하였다: bADD1_84del_F1 5'-ACC GCT CTT CCA TCA ATG AC-3', bADD1_84del_R 5'-TCC CTG ACC ACC CAA CTT AG-3'. Han 등[8]의 보고에서 사용된 primer들을 제작하였다. PCR 반응은 10 \times 반응원추액, 20 mM dNTP, 각각 200 mM primer, 0.5 units *Taq* DNA polymerase (TaKaRa, Japan)와 50 ng *genomic DNA* 용액에 멸균한 탈이온수를 첨가하고, PTC-200 (MJ Research, USA)을 이용하였다. 주형인 DNA의 단일가닥

변성은 초기에 94℃에서 5분을 수행한 후, 94℃ 40초-결합온도 (ADD1, 60℃; MC1R, 68℃) 40초-72℃ 50초로 구성된 cycle을 35회 반복하였다. PCR 증폭 산물은 agarose gel 상에서 전기영동법으로 확인한 후 유전자형 분석에 이용하였다.

유전자형 결정

ADD1 유전자형의 결정은 Huang 등[16]의 방법을 변형하여 수행하였고, 증폭된 PCR 산물을 1.5% agarose gel 상에서 전개하여 281-bp (W), 197-bp (D)의 출현양상을 이용하여 WW, WD, DD를 판독하였다. MC1R 유전자형의 판독은 Han 등[10]의 방법을 따랐으며, *AluI*과 *MspI* 제한효소로 절단한 절편을 2.5% agarose gel 상에서 전개하여 E^+ , E^D , e 대립인자를 판독하였다. 제주흑우실용화축군과 한우 집단에서 ADD1 대립인자 W와 D, 유전자형 WW, WD, DD의 분포와 빈도, 유전적 다양성에 대한 평가는 CERVUS 3.0.7 program [17]을 이용하여 산출하였다.

도체형질 측정과 유의성 분석

한우와 제주흑우실용화축군의 도체성적은 축산물평가원 제주지원의 전문 등급판정사에 의해 측정된 결과를 확보하여 이용하였다. 조사형질은 형질은 등을 측정하였다. 도체중(carcass weight, CW), 육질등급지수(meat quality index, MQI), 등지방두께(backfat thickness, BF), 등심단면적(eye muscle area, EMA), 근내지방도(marbling score), 육색(meat color,

MC), 지방색(fat color, FC), 조직감(texture index, TI) 등으로 구분하였다. 여기서 육질등급지수는 육질등급을 수치로 변환한 것이며(3등급, 1; 2등급, 2; 1등급, 3; 1+등급, 4; 1++등급; 5), 근내지방도는 다시 9단계(최저 1-최고 9, MARB1)와 27단계(최저 1/0는 1, 최고 9/++는 27, MARB2)로 구분하여 통계 분석에 이용하였다. 조사된 성장형질 측정치에 대한 유전자 다형성의 효과는 SAS ver 8.01 program package/PC [34]의 General linear model (GLM) procedure를 이용하여 추정하였다. 통계모델은 $Y = \mu + SNP + \epsilon$ (여기서, Y = 표현형, μ = 전체평균, SNP = SNP marker의 효과, ϵ = 임의 잔차값) 이용하였고, 거세우만을 선발하였기 때문에 성별효과는 고려하지 않았다. 평균값의 차이는 Duncan's multiple range test로 유전자형별 유의차 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

제주흑우실용화축군과 제주도 한우집단에서의 ADD1 유전자 다형성

부-모-자 친자확인과 MC1R 자료에 의해 선정된 JBC-DC와 한우 거세우 집단에서 ADD1 유전자의 intron 7의 84-bp 절편의 유무에 따라 다형성을 나타내는 대립인자 W와 D, 이에 따른 3 가지의 유전자형들(WW, WD, DD)이 두 집단에서 모두 검출되었다(Fig. 1).

Table 1은 한우와 JBC-DC 집단의 ADD1 유전자의 대립인

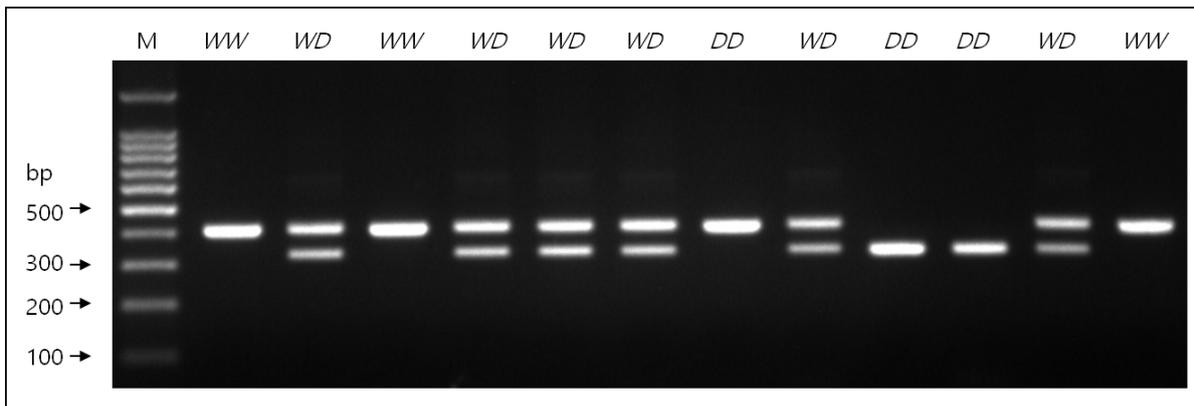


Fig. 1. PCR amplification patterns for the insertion/deletion polymorphisms of an 84-bp fragment in the intron 7 of bovine ADD1 gene. Allele W and D showed 281-bp, 197-bp bands on the agarose gel, respectively. M is 1-kb DNA ladder plus.

Table 1. Genotype frequency and genetic diversity parameters at ADD1 gene in the Hanwoo and JBC-DC populations

Population	Genotype			No. of animals	Allele		χ^2 (HWE)**	Diversity parameter***		
	WW	WD	DD		W	D		Ho	He	PIC
JBC-DC†	0.603 (114)	0.333 (63)	0.034 (6)	189	0.770	0.230	$p > 0.05$	0.333	0.355	0.292
Hanwoo	0.704 (677)	0.273 (262)	0.023 (22)	961	0.841	0.159	$p > 0.05$	0.273	0.268	0.232

자와 유전자형의 빈도를 나타낸 것이다. JBC-DC 집단에서 *ADD1* 유전자의 *W* 대립인자의 빈도는 0.770으로 한우 집단의 빈도 0.841보다 더 낮은 빈도를 나타내었다. 유전자형 중에는 *WW* 유전자형이 두 집단에서 모두 더 높은 빈도를 나타내었고, *DD* 동형접합의 빈도는 JBC-DC 집단에서는 0.034, 한우 집단에서는 0.023으로 조사되어 JBC-DC 집단에서 상대적으로 더 높은 빈도를 나타내었다. χ^2 -시험 결과에서는 한우와 JBC-DC 집단의 유전자형 분포는 모두 $p > 0.05$ 이상으로 Hardy-Weinberg 평형을 나타내었다. 또한 다형정보량을 나타내는 PIC 값이 JBC-DC에서 0.292, 한우에서 0.232로 조사되어, 분석된 두 집단에서 *ADD1* 유전자의 유전적 다양성은 높은 수준의 다양성을 나타내지는 않는 것으로 판단되었다.

제주도 한우 집단의 도체형질과 *ADD1* 유전자 다형성의 상관 분석

Table 2는 한우 도축우 집단에서 도체성적과 *ADD1* 유전자형의 상관관계를 분석한 결과이다. 조사된 모든 표현형 항목 중에서 등지방두께(BF)만이 유전자형의 효과가 유의적인 차

이를 나타내었고($p < 0.05$), 나머지 항목들(도체중, 육질등급, 근내지방도, 육색, 지방색, 조직감)에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p > 0.05$).

등지방두께의 경우 *ADD1* 유전자형 *DD*인 동형접합 개체들에서 *WW* 동형접합 개체들의 등지방두께보다 평균 1.3 mm 더 두꺼운 것으로 조사되었다. 평균의 유의적인 차이는 나타내지 않았으나, *WW*인 개체들의 도체중(407.25±1.494 kg)은 *DD*인 개체들의 도체중(413.50±8.289 kg)에 비해 적었으나, *WW*의 등심단면적(84.049±0.334 cm²)이 *DD*인 개체의 등심단면적(82.955±1.852 cm²)에 비해 많은 것으로 미루어 보아, *ADD1* *DD* 유전자형을 나타내는 개체들에서의 도체중의 증가는 등심 등 근육부위의 근육량 증가에 의한 도체중의 증가가 아니라, 등지방이 *WW*인 개체들 보다 더 많이 축적되어 도체중의 증가를 야기하는 것으로 추정된다.

제주흑우실용화축군의 도체형질과 *ADD1* 유전자 다형성의 상관 분석

Table 3은 JBC-DC의 도체형질과 *ADD1* 유전자 다형성의

Table 2. Association between different genotypes of *ADD1* gene and carcass traits in Hanwoo population

Trait	Overall mean	<i>ADD1</i> genotype			P-value	Significance ¹
		<i>WW</i> (n=667)	<i>WD</i> (n=262)	<i>DD</i> (n=22)		
CW (kg)	407.408	404.25±1.494	411.29±2.402	413.50±8.289	0.7585	n.s.
MQI	3.665	3.698±0.038	3.595±0.061	3.454±0.211	0.2152	n.s.
BF (mm)	13.210	13.03±0.166 ^b	13.59±0.267 ^{ab}	14.32±0.921 ^a	0.0381	*
EMA (cm ²)	84.142	84.049±0.334	84.481±0.537	82.955±1.852	0.6416	n.s.
MARB1	5.822	5.888±0.077	5.698±0.124	5.273±0.4278	0.1863	n.s.
MARB2	16.393	16.589±0.232	16.027±0.372	14.727±1.285	0.1865	n.s.
MC	4.854	4.855±0.015	4.844±0.024	4.955±0.084	0.4457	n.s.
FC	2.983	2.984±0.006	2.981±0.010	3.000±0.035	0.8655	n.s.
TI	1.165	1.158±0.014	1.179±0.023	1.227±0.079	0.5371	n.s.

LS Mean ± SE values in the same row with different letters are significantly different at 5% (*) significance thresholds. n.s. indicates not significant.

Table 3. Association between different genotypes of *ADD1* gene and carcass traits in JBC-DC population

Trait	Overall mean	<i>ADD1</i> genotype			P-value	Significance ¹
		<i>WW</i> (n=114)	<i>WD</i> (n=63)	<i>DD</i> (n=6)		
CW (kg)	389.21	373.47±4.551 ^A	413.29±6.123 ^B	412.33±14.029 ^B	2.861×10 ⁻⁷	**
MQI	3.293	3.368±0.087	3.270±0.117	3.750±0.269	0.261	n.s.
BF (mm)	15.101	14.123±0.515 ^a	17.079±0.693 ^b	14.000±1.589 ^a	0.003	*
EMA (cm ²)	80.360	79.193±0.786	82.000±1.058	82.833±2.424	0.062	n.s.
MARB1	5.222	5.272±0.169	5.000±0.228	5.917±0.522	0.248	n.s.
MARB2	14.593	14.693±0.511	14.016±0.688	16.667±1.575	0.292	n.s.
MC	4.899	4.877±0.037 ^a	4.873±0.050 ^a	5.250±0.115 ^b	0.008	*
FC	3.032	3.035±0.017	3.032±0.022	3.000±0.051	0.807	n.s.
TI	1.129	1.272±0.041	1.238±0.055	1.083±0.125	0.350	n.s.

LS Mean ± SE values in the same row with different letters are significantly different at 5% (*) and 0.1% (**) significance thresholds, respectively. n.s. indicates not significant.

상관관계를 분석한 것이다. 도체성적이 조사된 항목 중에서도 체중에서는 고도의 유의적 차이를 나타내었고($p < 0.001$), 등지방두께와 육색에서도 유의적인 차이를 나타내었다($p < 0.05$). 반면, 육질등급지수, 등심단면적, 근내지방도지수, 지방색, 조직감의 성적은 *ADD1* 유전자형과의 유의적인 상관을 나타내지 않았다($p > 0.05$). *ADD1* 유전자형이 유의적인 상관을 나타낸 형질 중에서도 도체중의 경우 *ADD1* 대립인자 *D*를 보유한 개체들(*WD*, *DD*)의 평균은 413.29 ± 6.123 kg과 412.33 ± 14.029 kg으로 *WW* 유전자형을 보유한 개체군의 평균 373.47 ± 4.551 kg에 비해 38 kg 정도 더 무거운 것으로 나타나($p < 0.001$), 유전자형에 따른 표현형의 차이가 대단히 큰 효과를 나타낼 수 있을 것으로 추정되었다. 등지방두께의 경우는 이형접합인 *WD* 유전자형을 보유한 개체들의 성적인 17.079 ± 0.693 mm로 다른 두 가지 동형접합에서 출현한 성적보다 대략 3 mm 정도 더 두꺼운 것으로 조사되었다($p < 0.05$). 이외에도 육색의 성적에서도 유전자형에 따른 유의적인 차이를 나타내었는데, *DD* 유전자형을 갖는 개체들의 육색이 상대적으로 더 진한 붉은색 계열을 나타내는 것으로 확인되었다($p < 0.05$).

유전자 마커로써 *ADD1* 다형성

ADD1 유전자는 콜레스테롤, 지방산, 중성지방의 합성과 지방산의 수송 등에 관여하는 유전자 발현의 조절을 담당하는 핵심적인 전사인자 중 하나로 작용하며, 지방세포의 분화에 결정적인 역할을 수행한다[13, 15]. 특히 근육 유래의 중간엽 줄기세포가 지방전구세포를 거쳐 지방세포로 분화되는 과정을 조절하는 *ADD1*의 역할은 근육 내 근내지방의 축적에 중요한 역할을 수행한다고 할 수 있다[2, 7, 42, 44]. DNA microarray 분석에서도 지방세포 분화과정에서 *ADD1*의 전사체들이 *PPAR γ 2*, *C/EBP α* 등과 함께 특이적으로 많은 양의 발현을 보이는 유전자군으로 동정되었다[14, 24, 45].

ADD1 유전자형이 한우와 JBC-DC 집단의 도체형질과의 상관성을 분석한 결과에서, 한우 집단에서는 등지방두께에서만 유의적인 상관관계가 확인되었으나($p < 0.05$), JBC-DC 집단에서는 등지방두께뿐만 아니라 도체중과는 고도의 유의적 상관이 검출되었고($p < 0.001$), 육색과도 유의적인 상관이 있음을 나타내었다($p < 0.05$). 반면, 근내지방도와 관련된 근내지방도지수, 육질등급지수의 경우 한우, JBC-DC 집단 모두에서 유의적인 상관이 발견되지 않았고($p > 0.05$), 등지방두께와는 유의적인 상관을 나타내었다($p < 0.05$). 이러한 결과들은 한우와 JBC-DC 집단에서 도체형질과 유의적인 상관을 나타내는 *ADD1* 유전자형의 효과는 지금까지 보고된 지방세포의 분화를 조절한다는 면에서, 중간엽 줄기세포의 분화를 통한 근육 내 지방세포 분화에 의한 근내지방 축적을 제한한 기존의 연구보고들[24, 27, 42, 45]과는 어느 정도 불일치되는 결과를 나타내지만, 등지방의 축적과는 밀접한 상관이 있는 것으로 보인다. 또한 본 연구에서 이용한 *ADD1* 유전자의 다형성이 일차적인 단백

질 서열과는 상관없는 intron 7에서 84-bp indel 다형성이라는 점에서 향후 *ADD1* 유전자 전체서열에서 아미노산의 변이나 틀변경돌연변이(frame-shift mutation)와 같은 단백질 암호화 영역에서의 구조적인 분석뿐만 아니라 intron 다형성 자체의 발현조절과 같은 기능적 분석 등 추가적인 연구가 수행될 필요가 있는 것으로 판단된다. 단지 본 연구의 결과만을 놓고 볼 때 *ADD1* 유전자의 intron 7에서 84-bp indel 다형성은 적어도 한우와 제주흑우 유래의 소 집단에서는 근육 내 지방세포의 분화를 통한 근내지방도의 축적보다는 등지방의 축적을 통한 등지방두께의 변화에 더 많이 기여하고 있다는 가설을 제기할 수 있겠다.

연구결과에서 특이한 점은 JBC-DC 집단에서 *ADD1* 유전자형은 도체중에서 고도의 유의적 상관(P value = 2.861×10^{-7} , $p < 0.001$)을 나타내었다. 이에 대한 해석으로 *ADD1* *WD* 유전자형의 개체들은 등지방두께의 증가가 도체중의 증가에 어느 정도 기여한 데서 유래된 것으로 판단할 수도 있으나, *ADD1* *DD* 유전자형을 보유한 개체들의 등지방두께는 *WW* 동형에 비해서 더 얇다는 점은 대립인자 *D*가 많을수록 등지방두께가 더 두꺼워지는 가산적 효과가 아니라, 이형접합자 상태에서가 최고의 효과를 나타내는 일종의 이형접합에 의한 상호보완 효과인 것으로 추정된다. 통계적 유의성은 없으나($p > 0.05$), 한우 집단에서도 도체중은 *WD* 유전자형을 나타내는 개체군이 *WW*보다 무거운 평균값을 나타내었다. Huang 등[16]은 중국의 재래 소 품종 하나인 Nanyang 품종에서 *ADD1* intron 7의 84-bp indel 다형성이 6개월령, 18개월, 24개월령 체중과 일당 증체량의 성장형질 측정치와 유의적인 상관을 보고하였다. Nanyang 집단의 24개월령 체중이 *ADD1* *WD* 개체는 평균 407.000 ± 10.920 kg, *WW*에서 363.229 ± 4.506 kg 으로 약 30 kg 이상의 차이를 보였고, 일당증체량은 초기부터 18개월까지의 일당증체가 *WW*보다 *WD*에서 훨씬 좋은 성적으로 나타내고 있으나, 후기인 24개월에는 유의적인 차이가 없다고 보고하였다. Nanyang 품종에서는 *DD* 동형접합인 개체가 보고되지 않았다. 이상의 결과들을 종합해 보면, *ADD1* 유전자의 다형성이 초기 및 중기의 성장과 관련이 있으며, 적어도 초-중기의 등지방 축적이나 발육 향상에 따라 도체중의 차이를 나타낼 수 있는 것으로 추정된다. 특히, 근내지방의 축적이 왕성하게 진행되는 비육후기에서 큰 기여를 하지 않는다는 점에서 유전자형 차이가 근내지방의 축적과는 무관하다는 연구결과가 설명될 수 있을 것으로 판단된다. 기존의 연구보고들에서 intron의 다형성은 인간의 암, 고혈압 등 많은 유전질환과 연관되어 있음으로 보고하였다[5]. 유전자 내에서 intron이 단지 splicing에 의해 제거되는 것이 아니라, intron 서열의 변이나 삽입/결실 돌연변이나 다형성은 종종 splicing 오류에 의해 비정상 전사체나 alternative splice variant의 출현 등의 원인이 되기도 하며[21, 28], intron 서열 상에서 전사인자나 전사후 가공과정에 관여하는 단백질복합체에 대한 결합능력의 획득/상실

등을 나타내기도 한다[25, 28, 37]. 예를 들어, 돼지 *SPP1* intron 1의 g.3836A>G 중에서 G 대립인자는 C/EBP enhancer와의 결합을 방해하여 비정상적인 splicing 과정을 유발하고, 결과적으로 정상적인 mRNA 양을 감소시켰다[28]. 또한 인간 *GHI* intron 4의 +1169A 대립인자는 3'-UTR의 다형성과 cis-acting 조절을 통해 순환성 GH와 IGF1의 수준을 감소시켜 대장암의 발생의 위험을 감소시키는 것으로 알려졌다[26]. Intron 내에서 microsatellite DNA의 반복 수는 *HSD11B2*, *GRK5* 유전자 발현에 영향을 주는 것으로 보고되었다[1, 43]. 이 외에도 *tumor necrosis factor receptor*, *lipoprotein* 유전자의 intron 영역들이 지방세포의 대사와 연관이 있는 것으로 알려져 있고[3, 30], *PPAR γ 2*, *C/EBP α* , *ADD1* 유전자들의 intron 서열들이 microRNA에 의한 조절작용 참여가 제기되었다[9, 38, 40]. 하지만 *ADD1* 유전자의 정확한 기능을 이해하기 위해서는 intron 7에서 84-bp 절편의 삽입/결실이 *ADD1* 유전자 자체의 전사와 번역과정과 지방대사 조절에서 어떤 기능을 수행하는지에 대한 연구가 뒷받침되어야 할 것이다.

결론적으로 *ADD1* 유전자 다형성과 도체형질의 상관을 살펴본 연구들을 통해 적어도 두 가지 가설을 제기할 수 있는 자료라 할 것이다. 첫째는 JBC-DC가 한우와 제주흑우 간 교배 축군이지만, 종모우에 대한 마커도움선발(marker assisted selection, MAS)을 통해 전체 JBC-DC 집단의 능력 향상이 가능할 수 있음을 보여주는 결과라 할 수 있다. 예를 들어 종모우의 선정과정에서 *ADD1* 유전자의 *WD*나 *DD* 유전자형을 보유한 개체의 선발과 인공수정용 정액의 보급을 통한 JBC-DC 생산은 *WW* 유전자형을 보유한 종모우의 정액을 물려받은 개체군보다 등지방두께는 더 두껍지만, 도체중이 더 무거운 소들을 생산할 수 있을 것으로 기대된다. 이는 현재 JBC-DC 집단의 산업화에서 가장 큰 문제는 흑우 고유형질인 흑모색의 유지와 한우에 비해 성장이 늦다는 점이다. 이는 한우의 개량이 60년의 역사를 통해 지속적으로 선발된 집단이라는 점을 고려할 때, 1990년대 초 멸종위기 상태인 제주흑우를 복원하고 현재의 규모로 증식하는 데 거의 모든 역량을 쏟았다는 점에서 충분히 이해할 수 있는 부분이다. 보존과 증식, 혈통관리를 위한 연구와 노력 이후 집단의 안정적 생산단계에 접어든 최근 들어 개량과 산업화의 필요성이 제기되고 있고, 그 과정에서 생산성의 문제가 가장 큰 걸림돌이 되고 있다. 이러한 결지에서 본 연구의 결과는 MAS를 통한 종모우의 선발이 전체 산업화축군의 생산성을 향상시킬 수 있는 전략이 될 수도 있을 것으로 추정된다.

또 다른 하나는 제주도 내에서 사육되고 있는 제주흑우도 넓게는 우리나라 고유 소 품종 중 대표인 한우의 한 지류라고 할 수 있으나, 오랜 기간 동안의 지리적 분리와 기후조건과 초지방목 등 생육환경의 차이에 의한 영향이 유전적 배경의 차이와 함께 복합적으로 소의 성장에 영향을 주기 때문에, 한우의 연구를 통해 얻어진 성과들을 제주흑우나 JBC-DC와 같

은 제주흑우 유래 축군의 개량에 여과없이 접목하는 것은 재고의 필요가 있다는 것으로 판단된다. 또한 현재까지 보존과 증식에 국한되어 있던 우리나라 고유의 재래가축 자원인 제주흑우의 활용에 있어, 철저한 혈통관리와 보존뿐만 아니라, 충분한 표현형 자료의 수집과 유전체수준의 연관분석(genome-wide association study, GWAS) 등을 통해 선별하고 평가된 SNP marker들을 이용한다면, 분자육종체계를 접목한 개량과 육성을 통한 산업화가 가능할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제명: 제주흑우 유전자 분석 및 특이형질 발굴을 통한 산업화 적용, 세부과제번호: PJ906979032014)의 지원에 의해 이루어진 것이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

References

1. Agarwal, A. K., Giacchetti, G., Lavery, G., Nikkila, H., Palermo, M., Ricketts, M., McTernan, C., Bianchi, G., Manunta, P., Strazzullo, P., Mantero, F., White, P. C. and Stewart, P. M. 2000. CA-Repeat polymorphism in intron 1 of *HSD11B2*: effects on gene expression and salt sensitivity. *Hypertension* **36**, 187-194.
2. Asakura, A., Komaki, M. and Rudnicki, M. 2001. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation* **68**, 245-253.
3. Benjafeld, A. V., Wang, X. L. and Morris, B. J. 2001. Tumor necrosis factor receptor 2 gene (*TNFRSF1B*) in genetic basis of coronary artery disease. *J. Mol. Med.* **79**, 109-115.
4. Collins, F. S., Guyer, M. S. and Charkravarti, A. 1997. Variations on a theme: Cataloging human DNA sequence variation. *Science* **278**, 1580-1581.
5. Cooper, D. N. 2010. Functional intronic polymorphisms: Buried treasure awaiting discovery within our genes. *Hum. Genomics* **4**, 284-288.
6. Cordero, G., Isabel, B., Menoyo, D., Daza, A., Morales, J., Piñeiro, C. and López-Bote, C. J. 2010. Dietary CLA alters intramuscular fat and fatty acid composition of pig skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue. *Meat Sci.* **85**, 235-239.
7. De Coppi, P., Milan, G., Scarda, A., Boldrin, L., Centobene, C., Piccoli, M., Pozzobon, M., Pilon, C., Pagano, C., Gamba, P. and Vettor, R. 2006. Rosiglitazone modifies the adipogenic potential of human muscle satellite cells. *Diabetologia* **49**, 1962-1973.
8. Dekkers, J. C. and Hospital, F. 2002. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 22-32.
9. Gerin, I., Bommer, G. T., McCoin, C. S., Sousa, K. M., Krishnan, V. and MacDougald, O. A. 2010. Roles for miRNA-

- 378/378* in adipocyte gene expression and lipogenesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **299**, E198-206.
10. Han, S. H., Kim, Y. H., Cho, I. C., Jang, B. G., Ko, M. S., Jung, H. Y. and Lee, S. S. 2008. Analysis of the genotype distribution in cattle breeds using a double mismatched primer set that discriminates the *MC1R* dominant black allele. *Kor. J. Anim. Sci. Technol.* **50**, 633-640.
 11. Han, S. H., Cho, S. R., Cho, I. C., Cho, W. M., Kim, S. G., Yang, S. N., Kang, Y. J., Park, Y. S., Kim, Y. H., Park, S. P., Kim, E. Y., Lee, S. S. and Ko, M. S. 2013. A parentage test using indel, microsatellite markers and genotypes of *MC1R* in the Jeju Black cattle population. *J. Embryo Transf.* **28**, 207-213.
 12. Han, S. H., Ko, J. C., Kim, Y. H., Kim, N. Y., Kim, J. H., Ko, M. S., Jeong, H. Y., Cho, I. C., Yang, Y. H. and Lee, S. S. 2010. Verification of ET and AI derived offspring using on the genetic polymorphisms of microsatellite and coat color genes in Jeju Black cattle. *J. Life Sci.* **20**, 381-387.
 13. Horton, J. D. 2002. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 1091-1095.
 14. Hou, Y., Xue, P., Bai, Y., Liu, D., Woods, C. G., Yarborough, K., Fu, J., Zhang, Q., Sun, G., Collins, S., Chan, J. Y., Yamamoto, M., Andersen, M. E. and Pi, J. 2012. Nuclear factor erythroid-derived factor 2-related factor 2 regulates transcription of CCAAT/enhancer-binding protein β during adipogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* **52**, 462-472.
 15. Hua, X., Wu, J., Goldstein, J. L., Brown, M. S. and Hobbs, H. H. 1995. Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13. *Genomics* **25**, 667-673.
 16. Huang, Y. Z., Zhang, E. P., Wang, J., Huai, Y. T., Ma, L., Chen, F. Y., Lan, X. Y., Lei, C. Z., Fang, X. T., Wang, J. Q. and Chen, H. 2011. A large indel mutation of the bovine *ADD1/SREBP1c* gene and its effects on growth traits in some native cattle breeds from China. *Mol. Biol. Rep.* **38**, 2037-2042.
 17. Kalinowski, S. T., Taper, M. L. and Marshall, T. C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* **16**, 1099-1106.
 18. Kim, D. H., Yang, B. C., Im, G. S., Yoo, J. G., No, J. G., Park, J. J., Lee, S. S., Ko, M. S. and Park, J. K. 2012. *In vitro* production of Jeju Black cattle cloned embryos by somatic cell nuclear transfer (SCNT). *J. Emb. Trans.* **27**, 140-154.
 19. Kim, E. Y., Kim, Y. O., Kim, J. Y., Park, M. J., Park, H. Y., Han, Y. J., Mun, S. H., Oh, C. E., Kim, Y. H., Lee, S. S., Ko, M. S. and Park, S. P. 2010. *In vitro* development of somatic cell nuclear transfer embryo treated with flavonoid and production of cloned Jeju Black cattle. *Reprod. Dev. Biol.* **34**, 127-134.
 20. Kim, Y. H., Koo, J. C., Oh, C. W., Kang, S. Y., Yang, B. S., Oh, S. J., Kim, C. N., Song, J. Y. and Kim, I. H. 2006. *In vivo* embryo production and embryo transfer in Hanwoo and Jeju Black cattle using CIDR. *J. Embryo Transf.* **21**, 191-198.
 21. Kozyrev, S. V., Abelson, A. K., Wojcik, J., Zaghlool, A., Linga Reddy, M. V., Sanchez, E., Gunnarsson, I., Svenungsson, E., Sturfelt, G., Jönsen, A., Truedsson, L., Pons-Estel, B. A., Witte, T., D'Alfonso, S., Barizzone, N., Danieli, M. G., Gutierrez, C., Suarez, A., Junker, P., Lastrup, H., González-Escribano, M. F., Martin, J., Abderrahim, H. and Alarcón-Riquelme, M. E. 2008. Functional variants in the B-cell gene *BANK1* are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* **40**, 211-216.
 22. Lee, S. S., Yang, B. S., Yang, Y. H., Kang, S. Y., Ko, S. B., Jung, J. K., Oh, W. Y., Oh, S. J. and Kim, K. I. 2002. Analysis of *melanocortin receptor 1 (MC1R)* genotype in Korean brindle cattle and Korean cattle with dark muzzle. *Kor. J. Anim. Sci. Technol.* **44**, 23-30.
 23. Lee, S. S., Yang, Y. H., Kang, S. Y., Oh, W. Y., Yang, B. S., Ko, S. B., Oh, S. J. and Kim, K. I. 2000. Comparison of the genotypes and frequencies of *MSH receptor (MC1R)* gene in Korean cattle, Cheju native black cattle, Japanese black and Japanese brown cattle. *Kor. J. Anim. Sci. Technol.* **42**, 253-260.
 24. Lei, H., Yu, B., Yang, X., Liu, Z., Huang, Z., Mao, X., Tian, G., He, J., Han, G., Chen, H., Mao, Q. and Chen, D. 2011. Inhibition of adipogenic differentiation by myostatin is alleviated by arginine supplementation in porcine-muscle-derived mesenchymal stem cells. *Sci. China Life Sci.* **54**, 908-916.
 25. Mann, V., Hobson, E. E., Li, B., Stewart, T. L., Grant, S. F., Robins, S. P., Aspden, R. M. and Ralston, S. H. 2001. A *COL1A1* Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality. *J. Clin. Invest.* **107**, 899-907.
 26. Millar, D. S., Horan, M., Chuzhanova, N. A. and Cooper, D. N. 2010. Millar Characterisation of a functional intronic polymorphism in the human growth hormone (*GHI*) gene. *Hum Genomics* **4**, 289-301.
 27. Morrison, A. C., Bray, M. S., Folsom, A. R. and Boerwinkle, E. 2002. *ADD1* 460W allele associated with cardiovascular disease in hypertensive individuals. *Hypertension* **39**, 1053-1057.
 28. Muráni, E., Ponsuksili, S., Seyfert, H. M., Shi, X. and Wimmers, K. 2009. Dual effect of a single nucleotide polymorphism in the first intron of the porcine *secreted phosphoprotein 1* gene: allele-specific binding of C/EBP beta and activation of aberrant splicing. *BMC Mol. Biol.* **10**, 96.
 29. Oh, S. A., Choi, S. H., Ko, M. H., Kang, T. Y., Oh, Y., Chung, Y. H. and Cho, W. M. 2012. Effect of low density lipoprotein (LDL) on motility, viability, membrane integrity and acrosome integrity of frozen-thawed sperm in Korean Jeju Black bull. *J. Embryo Transf.* **27**, 155-162.
 30. Pasalić, D., Sertić, J., Kunović, B., Milicević, Z., Pasić, A., Zrinski-Topić, R., Ferencak, G. and Stavljenić-Rukavina, A. 2001. Lipoprotein lipase gene polymorphism and lipid profile in patients with hypertriglyceridemia. *Croat. Med. J.* **42**, 517-522.
 31. Risch, N. and Merikangas, K. 1996. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* **273**, 1516-1517.
 32. Rothschild, M. F. and Soller, M. 1997. Candidate gene analy-

sis to detect genes controlling traits economic importance in domestic livestock. *Probe* **8**, 13-20.

33. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory.

34. SAS. 1999. SAS/STAT software for PC. Release 8.01. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

35. Schwab, C. R., Baas, T. J., Stalder, K. J. and Mabrym, J. W. 2007. Deposition rates and accretion patterns of intramuscular fat, loin muscle area, and backfat of Duroc pigs sired by boars from two time periods. *J. Anim. Sci.* **85**, 1540-1546.

36. Schwab, C. R., Mote, B. E., Du, Z. Q., Amoako, R., Baas, T. J. and Rothschild, M. F. 2009. An evaluation of four candidate genes for use in selection programmes aimed at increased intramuscular fat in Duroc swine. *J. Anim. Breed. Genet.* **126**, 228-236.

37. Shen, Z., Chen, L., Hao, F., Wang, G. and Liu, Y. 2010. Intron-1 rs3761548 is related to the defective transcription of *Foxp3* in psoriasis through abrogating E47/c-Myb binding. *J. Cell Mol. Med.* **14**, 226-241.

38. Song, G., Xu, G., Ji, C., Shi, C., Shen, Y., Chen, L., Zhu, L., Yang, L., Zhao, Y. and Guo, X. 2014. The role of microRNA-26b in human adipocyte differentiation and proliferation. *Gene* **533**, 481-487.

39. Spangler, M. L., Bertrand, J. K. and Rekaya, R. 2007. Combining genetic test information and correlated phenotypic records for breeding value estimation. *J. Anim. Sci.* **85**, 641-649.

40. Taniguchi, M., Nakajima, I., Chikuni, K., Kojima, M., Awata, T. and Mikawa, S. 2014. MicroRNA-33b downregulates the differentiation and development of porcine preadipocytes. *Mol. Biol. Rep.* **41**, 1081-1090.

41. Taxvig, C., Dreisig, K., Boberg, J., Nellemann, C., Schelde, A. B., Pedersen, D., Boergesen, M., Mandrup, S. and Vinggaard, A. M. 2012. Differential effects of environmental chemicals and food contaminants on adipogenesis, biomarker release and PPAR γ activation. *Mol. Cell Endocrinol.* **361**, 106-115.

42. Vettor, R., Milan, G., Franzin, C., Sanna, M., De Coppi, P., Rizzuto, R. and Federspil, G. 2009. The origin of intermuscular adipose tissue and its pathophysiological implications. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **297**, E987-998.

43. Xia, Z., Yang, T., Wang, Z., Dong, J. and Liang, C. 2014. GRK5 intronic (CA) n polymorphisms associated with type 2 diabetes in Chinese Hainan Island. *PLoS One* **9**, e90597.

44. Yada, E., Yamanouchi, K. and Nishihara, M. 2006. Adipogenic potential of satellite cells from distinct skeletal muscle origins in the rat. *J. Vet. Med. Sci.* **68**, 479-486.

45. Yin, C., Xiao, Y., Zhang, W., Xu, E., Liu, W., Yi, X. and Chang, M. 2014. DNA microarray analysis of genes differentially expressed in adipocyte differentiation. *J. Biosci.* **39**, 415-423.

초록 : 제주도 한우와 제주흑우실용화축군 집단에서 ADD1 유전자의 다형성이 경제형질에 미치는 영향

한상현¹ · 오홍식¹ · 이재봉² · 좌은숙³ · 강용준³ · 김삼금³ · 양성년³ · 김유경³ · 조인철³ · 조원모³ · 고문석³ · 백광수^{3*}

(¹제주대학교 교육과학연구소, ²전북대학교 인수공통전염병연구소, ³농촌진흥청 국립축산과학원 난지축산시험장)

한우와 제주흑우실용화축군(JBC-DC) 집단에서 ADD1 유전자의 유전적 다형성을 조사하였다. ADD1 유전자형은 intron 7 영역에서 84-bp 절편의 유무에 따라 결정하고, 두 집단에서 ADD1 유전자형과 경제형질의 상관관계를 시험하였다. 한우 거세우집단에서는 ADD1 D/- 도체들이 WW 개체들보다 유의적으로 더 두꺼운 등지방두께를 보여주었다($p < 0.05$). 하지만, JBC-DC 집단에서는 이형접합인 WD에서 가장 두꺼운 등지방두께를 나타냄을 볼 수 있었고($p < 0.05$), 이는 W와 D 대립인자의 상승효과에 의해 등지방 축적이 증가하는 것으로 추정된다. 반면 육질등급지수나 근내지방도로 측정된 근육조직에서 근내지방의 축적과 ADD1 유전자형과는 상관없는 것으로 조사되었다. 이상의 결과들로부터, ADD1 유전자는 근육조직의 근내지방보다는 피하조직에서 등지방에 영향을 주는 것으로 보인다. 또한 DD 유전자형에서 W/-인 동물들에 비해 더 높은 수준의 육색을 나타내었다($p < 0.05$). 흥미로운 것은 JBC-DC 집단에서만 도체중과 유전자형 사이에 고도의 유의적인 차이를 나타내었는데, D/-인 동물들이 WW인 동물들에 비해 38 kg 이상 더 무거웠다($p < 0.001$). 연구결과는 ADD1 유전자형에 따라 빠른 성장률과 거세우의 생산성에 차이를 나타내는 것을 보여주고 있다. 이러한 발견들은 ADD1 유전자형이 유전적 분자 마커로써 한우와 제주흑우-유래 축군의 개량을 위한 교배육종에서 효과적인 역할을 수행할 수 있음을 보여주는 결과이다.