

## 한우 Leptin 비만 유전자와 도체 및 육질 형질과의 연관성 구명

신성철 · 정화철 · 김희선 · 전상희 · 권수연 · 김보현 · 정구용 · 정의룡\*

상지대학교 동물생명자원학부

### 서 론

Leptin은 비만 유전자(obese gene)에 의해 분비되는 호르몬 단백질로서 뇌의 시상하부와 뇌하수체 전엽에 작용하여 식욕 조절, 에너지 대사 및 체성분 조절에 매우 중요한 역할을 담당한다<sup>1)</sup>. Leptin은 주로 지방 세포(adipocytes)에서 합성되며 체지방 함량과 조성을 조절하는 feedback system과 관련되어 있다<sup>3)</sup>. Leptin의 결핍은 식욕 및 체중 증가를 초래하고 저장된 지방이 많아지면 지방세포에서 합성되는 leptin의 농도가 높아지게 된다. Leptin 유전자의 돌연변이가 사람이나 동물에게서 비만을 일으키는 것으로 알려져 있지만 비만에 걸린 대부분의 사람들은 혈청 leptin의 농도가 높게 나타나고 이는 leptin 수용체가 있는 뇌가 leptin과 반응하지 않아 비만이 나타나는 것으로 이해되고 있다. 육우에서 혈청 leptin 농도는 도체의 지방 및 도체 특성과 밀접한 관련이 있다는 사실이 여러 연구자들에 의해 보고되었다<sup>2)</sup>. 최근 국내 쇠고기 시장 구조는 근내지방 등 육질 특성에 따른 도체 등급간의 가격 차이가 커지고 있는 상황에서 소의 지방축적과 체중에 관여하는 호르몬으로서 leptin은 매우 중요하다고 할 수 있다. Leptin 호르몬의 이러한 생리적 특성은 지방대사(lipid metabolism)와 관련된 가축의 주요 경제형질(체중, 성장률, 근내지방도, 등지방 등)에 관련된 후보유전자로서의 가능성을 제시하고 있다. 따라서 본 연구는 한우 leptin 비만유전자의 single nucleotide polymorphism(SNP)을 분석하고 SNP 마커와 한우의 도체 및 육질 형질과의 연관성을 구명하고자 실시하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 공시 동물과 도체 성적

본 연구 개발에 사용한 한우는 국가 능력검정사업에 등록하고 후대검정을 통하여 혈통기록과 도체성적을 보유하고 있는 제 32차(162두) 및 33차(147두) 후대 검정우 집단 총 309두를 공시축으로 선정하였다.

#### 2. Genomic DNA 추출 및 정제

각 공시축으로부터 혈액을 채취하고, Genomic DNA의 분리 및 정제는 Salting out 방법을 일부 변경하여 수행하였다.

Table 1. Primer sequence, position and PCR product size used in RFLP and SSCP analysis of the leptin gene in Korean cattle

Location <sup>a</sup>	Primer sequence (5'-3')	Nucleotide change	Restriction enzyme	Amplified region	Fragment size	Analysis method
877-1342	GATTCCGCCGCACCTCTC CCTGTGCAAGGCTGCACAGCC	A 1127 T	<i>Clal</i>	Exon2	467	RFLP
1008-1201	ATGCGCTGTGGACCCCTGTATC TGGTGTCACTCCTGGACCTTCG	C 1180 T	<i>KpnI</i>	Exon2	94	RFLP
2961-3456	CCCTCTCTCCCACTGAGCTC TAAAGGATGCCCACATAGGC	C 3100 T	.	Exon3	496	SSCP

<sup>a</sup> Location was based on the sequence of the bovine leptin gene from GenBank accession no. U50365.

### 3. Leptin 유전자의 단일 염기 다형(SNP) 검출

한우 leptin 유전자의 exon2 영역과 exon3 영역을 각각 포함하는 primer를 설계 및 합성하여 PCR로 증폭한 후, SNP 검출을 위해 ABI PRISM 3700 DNA analyzer(Applied Biosystems, Foster City CA)를 이용하여 Direct sequencing 법으로 한우 leptin 유전자의 염기 서열을 분석하였다.

### 4. PCR-RFLP 기법에 의한 Leptin 유전자의 SNP marker 분석

염기 서열 분석을 통해 검출된 한우 leptin 유전자의 exon2 및 3번 영역 내 총 3개의 SNP 부위를 검출하고, 검출된 이들 SNP 부위를 인지하는 제한 효소가 존재하는 exon2 영역의 2개 SNP(A1127T, C1180T)에 대한 PCR-RFLP 분석을 실시하였다. 각 SNP의 PCR-RFLP 분석을 위한 primer 설계, PCR fragment size 및 restriction enzyme은 Table 1에 제시하였다.

### 5. PCR-SSCP 기법에 의한 Leptin 유전자의 SNP marker 분석

검출된 한우 leptin 유전자의 SNP 중 제한 효소 인지 부위가 존재하지 않는 exon3 영역 내 SNP(C3100T)의 SNP genotyping은 PCR-SSCP 기법을 이용하여 SNP marker를 분석하였다 (Table 1). PCR product를 95℃에서 5분간 변성 후 7M Urea가 함유된 변성 polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동한 후 유전자형 SNP marker를 결정하였다.

### 6. 통계 처리

도체 및 육질 형질에 영향을 미치는 leptin 유전자의 SNP marker 효과를 분석하기 위해 SAS 8.1 프로그램의 일반선형모형(GLM)분석법으로 통계처리 하여 연관성을 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. Leptin 유전자의 SNP 검출

Direct sequencing을 통해 한우 leptin 유전자의 exon2 영역과 exon3 영역의 염기 서열을 분석한 결과 총 3개의 SNP를 검출하였다. Exon2 영역에서 A1127T, C1180T 등 2개의 SNP를 검출하였고, exon3 영역에서 C3100T등 1개의 SNP를 검출하였다(GenBank accession no. U50365).

## 2. PCR-RFLP 기법에 의한 SNP marker 분석

A/T 염기치환에 따른 1127번째 SNP 부위에 *Cla*I 제한 효소를 처리하여 agarose gel에 전기영동한 결과, Fig. 1에 제시된 바와 같이 A대립유전자는 1개의 제한 효소 인지 부위가 존재하여 215 및 252bp 크기를 갖는 총 2개의 band가 검출되었고, A/T 이형 접합체는 215, 252 및 469bp 크기를 갖는 총 3개의 band가 검출되었다. 또한, C/T 염기 치환에 따른 1180번째 SNP 부위에 *Kpn*2I 제한 효소를 처리하여 8% 비변성 polyacryamide gel에 전기영동한 결과, Fig. 2에 제시된 바와 같이 C 대립 유전자는 1개의 제한 효소 인지 부위가 존재하여 19 및 75bp 크기를 갖는 총 2개의 band가 검출되었고, T 대립유전자는 제한 효소 인지 부위가 존재하지 않아 94bp 크기의 단일 band가 검출되었다. C/T 이형접합체형의 경우 이들 세 종류 DNA band가 모두 검출되었다.

## 3. PCR-SSCP 기법에 의한 SNP marker 분석

검출된 exon3 영역의 3100번째 C/T 염기치환에 따른 SNP에 대해 SSCP 분석을 실시한 결과 Fig. 3에 제시한 바와 같이 C/C, C/T 및 T/T 각각의 유전자형에 따른 SNP marker를 검출하였다.

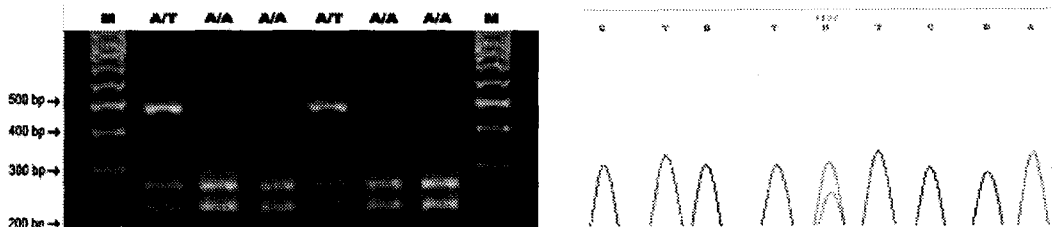


Fig. 1. PCR-RFLP and sequence chromatogram for the detection of a C/T substitution at position 1127(C1127T SNP) within exon 2 region of the Leptin gene in Korean cattle. M: molecular size marker.



Fig. 2. PCR-RFLP and sequence chromatogram for the detection of a C/T substitution at position 1180(C1180T SNP) within exon 2 region of the leptin gene in Korean cattle. M: molecular size marker.



Fig. 3. PCR-SSCP and sequence chromatogram for the detection of a C/T substitution at position 3100(C3100T SNP) within exon 3 region of the leptin gene in Korean cattle.

Table 2. Least squares means and standard errors for carcass traits and meat quality of different C1180T SNP genotypes in Korean cattle(n=309)

Traits	SNP genotype			P-value	Additive effect	Dominance effect
	CC	CT	TT			
LW/kg	549.987±7.832	543.116±5.082	530.000±36.173	0.7013	20.930±37.115	4.167±38.480
CW/kg	313.255±5.028	311.511±3.263	294.500±23.225	0.7245	19.360±23.830	13.933±24.707
DP/%	56.916±0.236	57.303±0.153	55.550±1.090	0.1322	1.380±1.113	2.109±1.154
BF/cm	<b>0.722±0.040<sup>a</sup></b>	<b>0.617±0.026<sup>ab</sup></b>	<b>0.500±0.187<sup>b</sup></b>	<b>0.0472<sup>*</sup></b>	<b>0.230±0.194</b>	<b>-0.004±0.202</b>
LDA/cm <sup>2</sup>	73.555±1.256	75.847±0.815	73.000±5.801	0.2945	0.627±5.922	4.979±6.140
MS/1~7	<b>2.880±0.119<sup>a</sup></b>	<b>1.850±0.183<sup>b</sup></b>	<b>1.600±0.847<sup>b</sup></b>	<b>0.0388<sup>*</sup></b>	<b>0.406±0.900</b>	<b>0.887±0.933</b>

LW, live weight; CW, carcass weight; DP, dressing percentage; BF, backfat thickness; LDA, *M. Longissimus dori* area; MS, marbling score

\* Effect was significant at  $P < 0.05$ .

<sup>a,b</sup> Least square means within a row without a common superscript letter differ ( $P < 0.05$ ).

#### 4. Leptin 유전자의 SNP marker와 한우 도체 및 육질 관련 형질과의 연관성 분석

Leptin 유전자의 SNP marker와 한우 도체 및 육질관련 형질과의 연관성을 통계 분석한 결과, exon 2 영역 내 C1180T SNP가 한우 근내 지방도 및 등지방 두께와 유의적인 연관성을 가지고 있는 것으로 나타났다( $P < 0.05$ ). 즉, C/C유전자형을 가진 개체들이 C/T 및 T/T 유전자형을 가진 개체들에 비해 근내 지방도와 등지방 두께에서 높은 값을 나타냈다(Table 2).

### 요 약

본 연구는 인간과 동물의 식욕조절, 에너지 대사, 체지방 축적 및 지방 대사에 핵심적인 역할을 담당하는 비만 유전자 leptin의 SNP를 검색하고, 이들 SNP 마커와 한우의 도체 및 육질형질들과의 연관성을 구명하여 고급육 생산 한우 조기 선발 및 육질 진단을 위한 분자 표지 마커로 활용하기 위하여 수행하였다. 한우 leptin 유전자의 exon 2 및 3번 영역을 포함한 염기서열 분석결과 총 3개의 SNP를 검출하였고, PCR-RFLP 및 SSCP 기법을 이용하여 SNP유전자형을 분

석한 결과 exon 2 영역 내 C1180T SNP 부위가 한우의 근내 지방도 및 등지방 두께와 유의적인 연관성( $P < 0.05$ )이 있는 것으로 나타났다.

따라서, 본 연구를 통해 개발된 한우 leptin 유전자의 특정한 SNP marker는 근내 지방도가 우수한 고급육을 생산하는 한우의 조기식별 및 마블링 등 육질진단에 매우 유용한 DNA 표지인자로 활용할 수 있을 기대된다.

### 참고문헌

1. Baile, C. A., *et al.* (2000) *Annu. Rev. Nutr.* 20, 105-127.
2. Geary, T. W., *et al.* (2003) *J. Anim. Sci.* 81, 1-8.
3. Hossner, K. L. (1998) *J. Anim. Sci.* 78, 463-472.
4. Oka, A., (1998) *Meat Sci.* 48, 159-167.