

한우 Mitochondrial DNA D-loop 영역의 염기서열 및 유전변이

정의룡* · 김우태** · 김연수** · 이정구** · 한상기***

상지대학교 응용동물과학부*, 강원대학교 동물자원학부**, 건국대학교 축산대학***

Sequence and Genetic Variation of Mitochondrial DNA D-loop Region in Korean Cattle

E. R. Chung*, W. T. Kim**, Y. S. Kim**, J. K. Lee** and S. K. Han***

Division of Applied Animal Sciences, Sangji University*,

Division of Applied Animal Resources, Kangwon National University**,

College of Animal Husbandry, Konkuk University***

ABSTRACT

This study was performed to determine sequences of the mt DNA D-loop region, including tRNA^{pro} and tRNA^{trp} and to analysis sequence variation polymorphism in Korean cattle. The resulting sequences were compared with previously published sequences for other cattle breeds(GenBank J01394). The PCR was used to amplify an 1142bp between nucleotides 15061 and 404 within the D-loop region of mt DNA using specific primers. Korean cattle showed 24 polymorphic sites by nucleotide substitutions and insertions of single base pairs. About 50% of polymorphic sites were found in positions 16042 to 16122 with the most variable region. Among these polymorphic sites, variations at 16055, 16230 and 16260 bp were detected as new sequence variants in Korean cattle. These specific polymorphic sites have not been reported in the Japanese black cattle and European cattle. Therefore, mt DNA variants in the D-loop region may be used as genetic markers for specifying Korean cattle. The frequencies of positions 169, 16302, 16093, 16042, 16119 with a high level of sequence polymorphism were 0.81, 0.56, 0.56, 0.50 and 0.43, respectively. In comparison of genetic distances, Korean cattle showed the more closely to European cattle as *Bos taurus* than *Bos indicus* such as African and India breeds. In conclusion, these mt DNA sequence polymorphisms in the D-loop region for Korean cattle may be useful for the analysis of cytoplasmic genetic variation and associations with economic important traits and genetic analysis of maternal lineage.

(Key words : mt DNA D-loop region, Sequence variation, Korean cattle)

I. 서 론

포유동물의 mitochondria DNA(mt DNA)는 독자적인 구조와 기능을 가지고 단백질 합성계를 형성한다는 사실이 Hutchison 등(1974)에 의해 보고된 이후 그동안 많은 연구자들에 의해 mt

DNA의 다형성과 변이성에 관한 연구가 이루어져 왔다. 특히, Anderson 등(1981)이 처음으로 인간의 mt DNA 염기서열을 결정하고 구성을 분석한 결과 16,338 염기쌍으로 이루어진 폐환상 이중분자구조로 12S와 16S 두종류의 rRNA와 22개 tRNA 그리고 호흡효소에 필요한

Corresponding author : E. R. Chung, Division of Applied Animal Sciences, College of Life Science and Natural Resources, Sangji University, Wonju 220-702, Korea. E-mail : erchung@mail.sangji.ac.kr

산화효소(oxidase)로서 cytochrome b와 c 복합체 및 ATP합성효소(ATPase) 등 13개 단백질을 지정하는 유전자로 이루어져 있음을 보고한 이후 소(Anderson 등, 1982), 닭(Desjardins와 Morais, 1990) 및 먼양(Hiendleder 등, 1998) 등 여러 포유동물과 생물군에서 전체 염기서열이 보고된 바 있다. 그동안 여러 연구자들의 연구결과에 의하면 mt DNA는 염기치환율이 genomic DNA 보다 약 5~10배 빠르고(Brown 등, 1979) 상이한 DNA 분자간에 유전자 조환현상이 발생하지 않는 모성유전을 하여 그 진화과정이 단순하며(Brown, 1982) 종간 및 동종내에 염기치환에 의한 많은 돌연변이를 보유하고 있다는 사실이 인간을 비롯한 여러 포유동물에서 보고(Brown, 1980; Lansman 등, 1983)됨에 따라 품종의 기원, 진화과정, 유전적 변이성 추정, 품종간 유전적 유연관계 및 유전적 차이를 구명하는데 매우 유용한 도구로 이용되어 왔다(Amano 등, 1994; Kikkawa 등, 1995; Mannen 등, 1998). 특히, mt DNA 염기서열 가운데 tRNA^{Pro}와 tRNA^{Phe} 유전자 사이에 위치하고 있는 D-loop(displacement loop) 영역은 mt DNA의 복제 개시점으로 전체 mt DNA에 비해 10배 이상 높은 염기치환율과 고빈도의 염기서열 변이가 존재한다는 사실이 밝혀짐에 따라(Anderson 등, 1982; Lindberg 등, 1989; Ron 등, 1993), 최근에 와서는 D-loop 영역의 염기서열 차이를 분석하여 품종 또는 개체간의 염기변이 추정(Kim 등, 1999; Bowling 등, 2000) 및 진화와 계통분류(Bradley 등, 1996; Mannen 등, 1998^b) 그리고 산유량과 유조성분 등 경제형질(Ron 등, 1993; Schutz 등, 1994; Boettcher 등, 1996)과 관련된 새로운 유전정보원으로서 그 활용이 시도되고 있다. 특히, 세포질 유전효과는 재조합(recombination) 현상없이 모성유전하기 때문에 mt DNA D-loop 변이에 따라 모계를 분류하기 쉽고 핵과 세포질 효과에서 바람직한 유전적 잠재능력을 갖는 모계계통의 검색이 가능하다(Mannen 등, 1998a). 그동안 세포질 유전효과에 관한 연구결과에 의하면 젖소에서 우유와 유지방 생산변이의 2~10%가 모성영향에 의해 결정되고(Ron 등, 1993) 육우의 경우

mt DNA D-loop 염기변이가 도체형질에 유의적인 영향을 미친다고 보고되었다(Mannen 등, 1998^a). 그러나 소의 경우 지금까지 D-loop 영역의 다형성 및 변이성 검출은 주로 PCR을 이용한 RFLP marker가 폭넓게 이용되어 왔으나 RFLP marker는 각종 제한효소 인지부위에 따른 개체간의 변이성이 상대적으로 낮기 때문에 염기서열을 직접 분석하여 비교하는 것이 보다 상세하고 유용한 정보를 얻을 수 있다.

소의 mt DNA 염기서열 분석과 관련하여 Anderson 등(1982)이 최초로 소 mt DNA의 전체 염기서열을 규명하여 보고한 이후 Ron 등(1993)은 Holstein종의 유량에 따라 high와 low group으로 분류한 암소 모계 선발군간에 D-loop 영역의 염기서열을 비교 분석하여 산유능력에 차이를 발표하였고, Takeda 등(1997)은 mt DNA D-loop 영역내 고변이 부위를 대상으로 일본의 흑모화종과 갈모화종 및 Holstein 종에 대한 염기배열의 차이를 비교 검토하여 보고하였으며 또한, Mannen 등(1998^a, 1998^b)은 일본 흑모화우집단에서 mt DNA D-loop 염기서열 변이성 분석을 통하여 품종진화와 계통분류를 추정하였고 나아가 mt DNA 염기변이가 도체형질에 미치는 영향을 보고한 바 있다. 한편, 국내의 경우 도입우와 한우의 D-loop 영역내 RFLP 양상을 분석하기 위해 각종 제한효소 절단형에 의한 mt DNA의 다형성이 보고(정 등, 1996; 이 등, 1998)된 바 있으나 현재까지 한우 mt DNA D-loop 영역에 대한 염기서열과 그 유전변이는 밝혀져 있지 않은 실정이다. 모계 세포질 유전물질로서 mt DNA의 염기서열 분석은 동물의 품종 성립과정, 계통진화 및 품종 집단의 유전적 구조 해석에 유용한 정보를 제공해 준다(Bradley 등, 1996; Mannen 등, 1998^a, 2000).

따라서 본 연구에서는 우리나라 고유의 유전 자원인 한우를 대상으로 mt DNA의 D-loop 영역의 염기서열을 결정하고 이전에 보고된 타 품종의 염기서열과 비교 분석을 통해 한우집단의 유전적 변이성 및 구조를 파악하여 한우의 유전자원 보존 및 개량을 위한 기초자료를 얻고자 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시축

본 연구에서 이용한 공시재료는 축산기술연구소 대관령지소에서 순수혈통이 유지관리되어 온 한우 암소집단 가운데 50두를 선발하여 각 공시축으로부터 5~10ml의 혈액을 EDTA(10~20 IU/ml)가 함유된 tube에 채혈하여 사용하였다.

2. Total DNA의 분리 및 정제

공시축의 혈액으로부터 total DNA의 분리 및 정제는 Miller 등(1988)의 방법을 일부 변형하여 분리 정제하였고, 분리된 DNA는 TE buffer (10mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA)에 용해하였다. 그리고 추출된 DNA의 농도는 spectrophotometer로 260nm의 UV 흡착에 의해 측정하였다.

3. mt DNA D-loop 영역의 primer 합성 및 PCR 증폭

축우 mt DNA의 D-loop 영역 가운데 15601번과 404번 사이를 지정하는 염기서열 부위의 1142bp 단편을 증폭하기 위한 primer로서 forward primer는 5'-TAGTGCTAATACCAACG-GCC-3' 그리고 reverse primer는 5'-AGGCA-TTTTCAGTGCCTTGC-3'의 염기배열을 설계하여 합성하였으며, PCR 증폭은 GeneAmp PCR System 9600(Perkin-Elmer Cetus, USA)을 이용하여 다음과 같은 조건하에서 실시하였다. 즉, 반응액은 0.5ml tube에 template DNA 약 200ng, primer 각 0.5 μ M, dNTP 각 200 μ M, 10 \times PCR buffer 그리고 Taq DNA polymerase 2.5unit를 첨가하여 PCR 반응액을 총 20 μ l로 조정하였다. PCR cycle은 최초 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 예비가열 후 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 58 $^{\circ}$ C에서 1분 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 1분간의 cycle을 총 30회 반복한 후 최종적으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열한 후 종료했다.

4. mt DNA D-loop 영역의 염기서열 분석

PCR 증폭산물을 agarose gel로 전기영동하여 증폭산물을 확인한 후 DNA가 함유된 gel slice를 purification kit로 추출한 다음 dye가 첨가된 ABI Prism™ Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin-Elmer Cetus, USA)를 사용하여 제작회사의 protocol에 따라 각 염기에 형광물질을 부착하기 위해 PCR로 재증폭 과정을 수행하였다. PCR 증폭 DNA의 염기서열 결정은 DNA sequencer(ABI 370)를 이용하여 Capillary 방식으로 분석하였다.

5. 유전 분석

한우 mt DNA내 D-loop 영역의 염기서열 변이를 이용한 품종간의 유전적 거리를 추정하기 위하여 D-loop 영역내에 존재하는 염기서열 변이의 수와 polymorphic site 당 동일한 염기치환을 값을 기초로 한 Nei 등(1983)의 공식을 적용하여 계산하였고 UPGMA program을 이용하여 품종간 근연관계를 나타내는 dendrogram을 작성하였다.

III. 결과 및 고찰

한우 mt DNA D-loop 영역의 염기서열 분석은 GenBank(J01394)에 등록된 bovine mt DNA (Anderson 등, 1982) 염기서열 가운데 tRNA^{Pro}와 tRNA^{Phe} 유전자 사이에 위치하고 있는 D-loop 영역의 15601번과 404번 사이를 지정하는 1142bp를 특정 염기서열을 갖는 primer를 이용하여 증폭한 후 PCR 증폭산물을 2% agarose gel 전기영동법으로 검출한 결과는 Fig. 1에 나타낸 바와 같다. PCR 증폭산물을 전기영동한 결과 예상하였던 1142bp 크기의 단일 band만이 검출되고 그 밖의 다른 non-specific band는 출현되지 않아 목적으로 하는 영역의 PCR 증폭이 성공적으로 수행되었음을 시사해 주었다.

한우 mt DNA내 D-loop 영역의 염기서열 분석결과는 Table 1과 2에 나타낸 바와 같으며

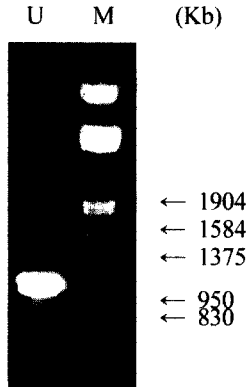


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of mt DNA D-loop region amplified by PCR. U : PCR product of the mt DNA D-loop region. M : molecular marker(λ DNA/EcoR I + Hind III).

본 연구의 이같은 결과를 Mannen 등(1998)이 보고한 일본화우, Bradley 등(1996)이 보고한 유럽축우 4품종(Angus, Charolais, Hereford 및 Simmental)과 Africa 4품종(Butana, Fulani, Kenana 및 N'Dama) 및 India 3품종(Hariana, Sahiwal 및 Tharparkar)의 D-loop 염기서열 변이와 비교 분석하였다. 먼저, 한우에서 결정된 D-loop 영역의 염기서열을 Anderson 등(1982)이 보고한 소 mt DNA D-loop 영역과 비교했을 때 단일염기의 치환(substitution) 및 삽입(insertions)에 의한 결과로 16019에서 221 번째 염기서열 가운데 총 24개 염기에서 다형성이 확인되었다. 즉, 본 연구에서 분석한 한우집단의 일부개체의 D-loop 염기서열에서 16019, 16042, 16055, 16085, 16109, 16119, 16122, 16255 및 106번의 T 염기가 C로 치환되었고 16093, 16185, 16200, 16302 및 8번의 염기는 G → A로 그리고 16050, 16052, 16104, 16209 및 16260번 염기는 C → T로 염기치환이 인정되었다. 또한, 16057, 16088, 16230과 169번의 G, G, C 및 A 염기들은 C, C, G 및 G로 각각 치환되어 있었다. 한편, 축우 D-loop 염기서열에서 116번부터 221번까지 C 단일염기가 반복배열로 구성되어 있으나 품종 또는 개체에 따라 염기의 삽입 및 결실로 인하여 개체차이를

나타낸다(Anderson 등, 1982). 한우의 경우도 221번째 염기에서 개체에 따라 C 염기 하나가 추가로 삽입되어 있음을 확인할 수 있었다. 한우의 D-loop 영역에서 확인된 총 24개 염기변이 가운데 16042~16122번째 부위의 염기치환율이 다른 염기서열 영역에 비하여 약 50% 이상을 점유하고 있는 것으로 나타났으며 본 연구의 이같은 결과는 D-loop의 염기서열에서 염기변이(sequence variation)가 가장 높은 영역은 16042~16122번 염기서열 영역이라고 보고한 Mannen 등(1998)의 결과와 일치하였다. 특히, 한우 D-loop 영역의 염기서열 변이를 다른 축우품종에서 보고한 염기변이와 비교했을 때 16055, 16230 및 16260 번의 염기치환은 타 품종에서 보고된 바 없어 한우에서 검출된 새로운 염기변이로 확인되었다. 이처럼 한우에 특이적인 염기치환의 존재는 mt DNA의 D-loop 영역내의 염기치환을 모계 및 세포질 DNA marker로서 한우품종을 특정하는데 활용할 수 있는 가능성을 시사해 주고 있다. 또한, 16119, 16122, 16302, 169 및 221번 5개의 염기를 제외한 나머지 16개 염기서열 부위는 한우와 일본화우 품종에서만 변이성이 존재하는 것으로 확인되었고 이들 두 품종간에는 약 83%의 상동성을 갖는 것으로 나타났다. 각 품종별 mt DNA내 D-loop 영역의 polymorphic site 빈도를 이용하여 염기변이성 값을 추정할 결과 한우가 0.23으로 일본흑모화우 0.20과 비슷한 수준을 나타냈으나 유럽종의 0.08~0.15 보다 상대적으로 높은 수준을 나타내어 우리나라 한우는 상당히 풍부한 mt DNA 염기변이를 보유하고 있는 품종집단으로 해석된다. 이와같이 한우가 타 품종에 비하여 mt DNA내 D-loop 영역의 염기변이성이 높게 나타난 것은 품종성립 및 개량역사가 짧은 한우의 경우 품종집단내 다양한 유전변이가 존재하고 또한 과거 한우는 개량증식과정에서 도입축우품종과의 교잡개량 사업을 추진한 바 있어 아직도 한우집단내에 일부 외래품종의 유전물질이 남아 있을 가능성이 높고 이것이 한우집단내 유전자 빈도에 어느정도 영향을 주었을 것으로 추측된다. Mannen 등(2000)도 일본화우가 유럽종에 비해 염기변

Table 1. Polymorphic sites of variants detected in the D-loop region of Hanwoo

Breeds	Polymorphic sites(bp)											
	16019	16042	16050	16052	16055	16057	16085	16088	16093	16104	16109	16119
HL	T	T	C	C	T	G	T	C	G	C	T	T
KC1	-	C	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-
KC2	-	C	-	-	-	-	-	-	A	-	-	C
KC3	C	C	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-
KC4	-	C	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-
KC5	-	C	-	-	-	C	-	-	A	-	-	-
KC6	-	C	-	-	-	-	-	G	A	-	-	-
KC7	-	C	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-
KC8	C	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-
KC9	-	-	-	-	-	-	C	-	A	-	C	-
KC10	-	-	T	-	-	C	-	-	-	-	-	C
KC11	-	-	-	-	C	-	-	-	-	T	-	C
KC12	-	C	-	-	-	-	-	G	-	T	-	C
KC13	-	-	-	T	-	C	-	-	-	-	-	C
KC14	-	-	T	-	C	-	-	-	-	-	-	C
KC15	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	C	-
KC16	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	C
JB*	C	C	T	T	-	C	-	G	A	T	C	C
AN**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C
HF**	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-
CH**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SM**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AF1**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AF2**	-	-	T	-	-	-	C	-	-	-	-	C
AF3**	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AF4**	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AF5**	-	-	T	-	-	A	-	-	-	-	-	-
IN1**	-	-	-	-	-	A	C	-	-	-	C	C
IN2**	-	-	-	-	-	A	C	-	-	-	C	C
IN3**	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	C	C

HL : Holstein. sequence published by Anderson et al.(1982). KC1~KC16 : Hanwoo. JB : Japanese black cattle. AN : Angus. HF : Hereford. CH : Charolais. SM : Simmental. AF1 : Butana. AF2 : Fulani. AF3 : Kenana. AF4 : N'Dama. IN1 : Hariana. IN2 : Sahiwal. IN3 : Tharparkar. * and ** : Sequence published by Mannen et al.(1998) and Bradley et al.(1996). respectively. Polymorphic sites of nucleotide are listed according to the numbering of Anderson et al.(1982).

이성이 높은 이유로서 화우의 선조는 약 2천년 전 한반도를 경유하여 일본에 전래되었고 명치 시대에는 외래품종이 도입되어 화우의 품종개량에 이용함으로써 당시 교배된 외래품종이 현재 화우품종의 mt DNA 빈도에 영향을 준 것으로 보고하였다. 이처럼 한우 mt DNA의 염기 변이 다양성을 과거 한우의 품종 성립과정이나

외래종을 도입하여 한우 품종개량에 이용하였던 유전적 영향에서 그 원인을 찾을 수 있으나 향후 추가적인 한우의 D-loop 영역의 염기서열 분석을 통하여 보다 상세한 한우집단의 유전적 변이성과 한우의 품종성립 과정 및 그 기원을 구명할 필요가 있을 것으로 사료된다. 한편, Bradley 등(1996)이 아프리카와 유럽 축우 13개

Table 2. Polymorphic sites of variants detected in the D-loop region of Hanwoo

Breeds	Polymorphic sites(bp)											
	16122	16185	16200	16209	16230	16255	16260	16302	8	106	169	221*
HL	T	G	G	C	A	T	C	G	G	T	A	*
KC1	-	-	-	-	C	-	-	A	-	-	G	*
KC2	-	-	-	-	-	-	-	A	-	C	G	*
KC3	-	A	A	-	-	-	-	A	-	-	G	*
KC4	-	-	-	-	-	-	-	A	A	-	-	*
KC5	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	G	*
KC6	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	G	*
KC7	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	G	*
KC8	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	G	C
KC9	-	A	-	-	C	-	-	-	-	C	G	*
KC10	-	-	-	T	-	C	-	-	-	-	-	*
KC11	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	G	*
KC12	-	-	A	-	-	-	T	-	-	-	G	*
KC13	C	-	-	-	C	-	-	-	-	C	G	*
KC14	C	-	-	-	-	-	-	-	-	C	G	*
KC15	C	-	-	T	-	-	-	-	-	-	G	*
KC16	-	-	-	-	-	C	-	A	-	-	-	C
JB*	C	A	A	T	-	C	-	A	A	C	G	C
AN**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C
HF**	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	C
CH**	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	G	*
SM**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	C
AF1**	-	-	-	-	-	C	-	-	-	C	G	C
AF2**	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	G	-
AF3**	-	-	-	-	-	C	-	-	-	C	G	C
AF4**	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	G	-
AF5**	C	-	-	-	-	C	-	-	-	-	G	-
IN1**	C	-	-	-	-	-	-	-	A	C	-	C
IN2**	C	-	-	-	-	-	-	-	A	C	-	C
IN3**	C	-	-	-	-	-	-	-	A	C	-	C

HL : Holstein, sequence published by Anderson et al.(1982), KC1~KC16 : Hanwoo, JB : Japanese black cattle, AN : Angus, HF : Hereford, CH : Charolais, SM : Simmental, AF1 : Butana, AF2 : Fulani, AF3 : Kenana, AF4 : N'Dama, IN1 : Hariana, IN2 : Sahiwal, IN3 : Tharparkar. * and ** : Sequence published by Mannen et al.(1998) and Bradley et al.(1996), respectively. Position 221* indicates nucleotide insertions. Polymorphic sites of nucleotide are listed according to the numbering of Anderson et al.(1982).

품종의 기원 및 유전적 다양성을 구명하기 위하여 mt DNA내 D-loop 영역의 염기변이를 분석한 결과 단일염기의 치환 및 삽입에 따라 총 55개의 염기변이를 검출하여 보고하였고, Mannen 등(1998)은 총 32두의 일본화우에서 D-loop 염기서열을 비교한 결과 총 18개의 특

이적인 haplotype을 확인하여 보고하였다. 또한, Ron 등(1993)도 Holstein 종 D-loop 영역의 염기서열을 분석한 결과에서 17개의 염기치환 부위를 확인하여 보고한 바 있다.

한편, 한우에서 단일염기의 치환 및 삽입에 의해 확인된 24개의 염기변이 부위의 출현빈도

를 분석한 결과는 Table 3에 제시한 바와 같다. 즉, 24개의 polymorphic site 가운데 169번째 염기가 81.3%로 가장 출현율이 높았고 다음으로 16302번과 16093번째는 56.3% 그리고 16042번과 16119번째 염기가 각각 50.0%와 43.8%의 치환율을 보였으며 나머지 14개 염기는 6.3%에서 25.0% 수준으로 나타났다. 최근에 Mannen 등(1998*)이 일본화우의 D-loop 염기변이와 출현빈도를 분석한 결과 총 23개 염기부위에서 169번째 염기가 약 94%로 가장 높았고 다음으로 16302번, 16093번 및 16042번째 염기가 각각 66.4%, 65.5% 및 62.9%의 출현율을 갖는다고 보고한 결과와 비교해 볼 때 한우에서 확인된 D-loop 영역의 단일 염기치환 부위의 출현율 순위는 이들의 연구결과와 일치하였으나 출현빈도는 두 품종간에 차이가 인정되었다.

한우 mt DNA내 D-loop 영역의 염기서열 변이를 이용한 타 품종들과의 유전적 근연관계를 추정하기 위하여 D-loop 영역내에 존재하는 염기서열 변이의 수와 polymorphic site 당 동일한 염기치환율 값을 기초로 한 Nei(1993)의 공식을 이용하여 계산한 유전적 거리는 Fig. 2에 제시한 바와 같다. 한우와 타 품종간의 유전적 근연관계를 추정한 결과 일본화우와 유전거리가 0.13으로 유전적 유사성이 가장 가까운 것으로 나타났으며, 전체적으로 *Bos taurus* 계통의 유럽종과 유전적 유사도가 높은 것으로 추정되었고 *Bos indicus* 즉, Zebu 계통의 품종과는 상대적으로 근연관계가 먼 것으로 나타났으나 Africa 품종보다는 India 품종과 더 가까운 관계를 시사하였다.

지금까지 한우의 기원에 관해서는 여러 가설이 있으나 유럽원우(*Bos primigenius*)와 인도원우(*Bos indicus*)의 교잡에 의해 중국대륙, 몽고 및 만주 등을 거쳐 한반도에 정착한 가설이 가장 유력하며(Phillips, 1961) 이후 다시 일본으로 전해진 것으로 추측하고 있다(Mannen 등, 1998*). 즉, 한우는 *Bos taurus*의 이동경로를 따라 동북아시아로부터 유래된 이후 품종형성과정에서 Zebu계의 영향을 일부 받은 것으로 보고되었고(Abe 등, 1968) 동북아시아(몽고, 중국 북방, 한국 및 일본) 지역의 품종은 거의 모두

Table 3. Frequencies of polymorphic sites detected in the D-loop region of Hanwoo

Polymorphic site(bp)	Mutation	Frequency
16019	T → C	0.125
16042	T → C	0.500
16050	C → T	0.125
16052	C → T	0.063
16055	T → C	0.125
16057	G → C	0.188
16085	T → C	0.188
16088	C → G	0.125
16093	G → A	0.563
16104	C → T	0.125
16109	T → C	0.125
16119	T → C	0.438
16122	T → C	0.188
16185	G → A	0.125
16200	G → A	0.125
16209	C → T	0.125
16230	A → C	0.188
16255	T → C	0.188
16260	C → T	0.063
16302	G → A	0.563
8	G → A	0.063
106	T → C	0.250
169	A → G	0.813
221*	C	0.063

Bos taurus 계통으로 분류되고 있다(Phillips, 1961).

본 연구에서 검출한 한우 mt DNA내 D-loop 영역의 염기서열 변이는 한우 품종집단의 유전적 변이성과 한우의 기원 및 품종형성과 계통진화과정을 보다 더 정확히 밝히고 이해하는데 유용한 정보를 제공해 주고 타 품종과의 계통분류적 상호관계 분석은 물론 나아가 모계유전 분석을 통한 경제적으로 중요한 양적형질 또는 경제형질과의 연관성 분석에 기초자료를 제공해 줄 수 있을 것으로 사료된다.

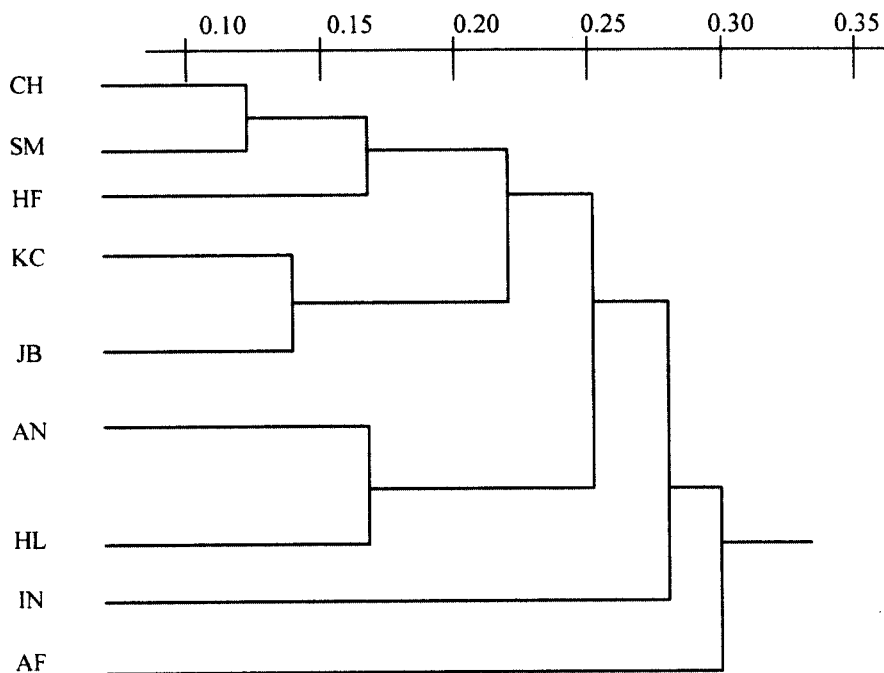


Fig. 2. Phylogenetic relationships among six cattle breeds based on genetic distance data. KC, JB, HF, CH, AN, HL, IN and AF represent Korean cattle, Japanese black cattle, Hereford, Charolais, Angus, Holstein, India and Africa breeds, respectively.

IV. 요약

본 연구는 한우 mt DNA 염기서열 가운데 tRNA^{Pro}와 tRNA^{Phe} 유전자 사이에 위치하고 있는 D-loop 영역의 염기서열을 결정하고 한우의 염기변이 다형성을 분석하기 위하여 mt DNA의 D-loop 영역내 404번부터 15061까지 1142bp 크기의 염기서열 부위를 특이적인 primer를 이용하여 PCR로 증폭하였다. 한우의 mt DNA내 D-loop 영역에서 단일염기의 치환 및 삽입에 의해 총 24개의 polymorphic site가 확인되었다. 한우 mt DNA D-loop 영역 가운데 16042~16122번째에 위치하고 있는 영역의 염기치환율이 다른 염기서열 영역에 비하여 약 50%를 점유하고 있었으며 이들 polymorphic site에서 16055, 16230 및 16260 번의 염기치환은 한우에서만 검출된 새로운 염기변이로 확인되었다. 따라서, 한우 D-loop 영역내 특이적인 염기변

이는 모계 및 세포질 DNA marker로서 한우품종을 특정하는데 활용할 수 있는 가능성을 시사하였다. Polymorphic site의 출현빈도는 169번째 염기가 81.3%로 가장 출현율이 높았고 다음으로 16302번째와 16093번째는 56.3% 그리고 16042번째와 16119번째 염기가 각각 50.0%와 43.8%의 치환율을 보였으며 나머지 14개 염기는 6.3%에서 25.0% 수준의 출현율을 나타냈다. 한우와 타 품종간의 유전적 근연관계를 추정한 결과 *Bos taurus* 계통의 유럽종과 유전적 유사도가 높은 것으로 추정되었고, Africa와 India의 *Bos indicus* 계통의 품종과는 상대적으로 근연관계가 먼 것으로 나타났다. 본 연구에서 검출한 mt DNA내 D-loop 영역의 염기서열 다형성은 한우집단의 유전적 변이성 추정과 모계유전 분석 및 나아가 경제적으로 중요한 형질들과의 연관성 분석에 유용하게 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

V. 인 용 문 헌

1. Abe, T., Oishi, T., Suzuki, S., Amano, T., Kondo, K., Nozawa, K., Namikawa, T., Kumazaki, K., Koga, O., Hayashida, S. and Otsuka, J. 1968. Studies on the native farm animals in Asia. I. On blood groups and serum protein polymorphism of East Asian cattle. *Jap. J. Zootech. Sci.* 39:517.
2. Anderson, S., De Drujijn, M. H. L., Coulson, A. R., Eperon, V. C., Sanger, F. and Young, I. G. 1982. The complete sequence of the bovine mitochondrial DNA : conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* 156:683.
3. Anderson S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J., Staden, R. and Young, I. G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457.
4. Amano, T., Miyakoshi, Y., Tokada, T., Kikkawa, T. and Suzuki, M. 1994. Genetic variats of ribosomal DNA and mitochondrial DNA between swamp and river buffaloes. *Anim. Genet.* 25:29.
5. Bowling, A. T., Del Valle, A. and Bowling, M. 2000. A pedigree-based study of mitochondrial D-loop DNA sequence variation among Arabian horses. *Anim Genet.* 31:1.
6. Boettcher, P. J., Freeman, A. E., Johnston, S. D., Smith, R. K., Beitz, D. C. and McDaniel, B. T. 1996. Relationships between polymorphism for mitochondrial deoxyribonucleic acid and yield traits of Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 79:647.
7. Brown, W. M. 1980. Polymorphism in mitochondrial DNA of human as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3605.
8. Brown, W. M., Prager, E. M., Wang, A. and Wilson, A. C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *J. Mol. Biol.* 18:225.
9. Bradley, D. G., MacHugh, D. E., Cunningham, P. and Loftus, R. T. 1996. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:5131.
10. Desjardins, P. and Morais, R. 1990. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates. *J Mol Biol.* 212:599.
11. Hiendleder, S., Lewalski, H., Wassmuth, R. and Janke, A. 1998. The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. *J Mol Evol.* 47:441.
12. Huchison III, C. A., Newblod, J. E., Potter, S. S. and Edgell, H. M. 1974. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature* 251:536.
13. Kim, K. I., Yang, Y. H., Lee, S. S., Park, C., Ma, R., Bouzat, J. L. and Lewin, H. A. 1999. Phylogenetic relationships of Cheju horses to other horse breeds as determined by mtDNA D-loop sequence polymorphism. *Anim Genet.* 30: 102.
14. Kikkawa, Y., Amano, T. and Suzuki, H. 1995. Analysis of genetic diversity of domestic cattle in East and Southeast Asia in terms of variations in restriction sites and sequences of mitochondrial DNA. *Biochem. Genet.* 33:51.
15. Lansman, R. A., Avise, J. C., Aquadro, C. F., Shapira, J. F. and Daniel, S. W. 1983. Extensive genetic variation in mitochondria DNA among geographic population of the deer mouse, *peromyscus maniculatus*. *Evolution.* 37:1.
16. Lindberg, G. L. 1989. Sequence heterogeneity of bovine mitochondrial DNA. Ph. D. Diss. Iowa state Univ. Ames.
17. Loftus, R. T., Machugh, D. E., Ngere, L. O., Balain, D. S., Badi, A. M., Bradly, D. G. and Cunningham, E. P. 1994. Mitochondrial genetic variation in European, African and Indian cattle populations. *Anim. Genet.* 25:265.
18. Mannen, H., Kojima, T., Oyama, K., Mukai, F., Ishida, T. and Tsuji, S. 1998^a. Effect of mitochondrial DNA variation on carcass traits of Japanese black cattle. *J Anim Sci.*76:36.
19. Mannen, H., Tsuji, S., Loftus, R. T. and Bradley, D. G. 1998^b. Mitochondrial DNA variation and evolution of Japanese black cattle(*Bos taurus*). *Genetics.* 150:1169.
20. Mannen, H., Kawasaki, J., Ishida, T., Mukai, F. and Tsuji, S. 2000. Mitochondrial DNA Diversity of Japanese Black Cattle. *Anim. Sci. J.* 71:1470.

21. Miller, S. A., Dykes, D. D. and Polesky, H. F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acids Res.* 16:1215.
22. Nei, M., Tajima, F. and Tatenno, Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *J. Mol. Evol.* 19:153.
23. Phillips, W. 1961. World distribution of the major types of cattle. *J. Hered.* 52:207.
24. Ron, M., Yoffe, O. and Weller, J. I. 1993. Sequence variation in D-loop DNA of cow lineages selected for high and low maternal effects on milk production. *Anim. Genet.* 24:186.
25. Schutz, M. M., Freeman, A. E., Lindberg, G. L. and Beitz, D. C. 1994. The effects of mitochondrial DNA on milk production and health of dairy cattle. *Livest. Prod. Sci.* 37:283.
26. Suzuki, R., Kemp, S. J. and Teale, A. J. 1993. Polymerase chain reaction analysis of mitochondrial DNA polymorphism in N'Dama and Zebu cattle. *Animal Genetics.* 214:339.
27. Takeda, K., Onishi, A. and Takahashi, S. 1997. Genetic variants of bovine mitochondrial DNA D-loop region in Japanese black, Japanese brown and Holstein breeds. *Anim. Sci. Technol(Jpn).* 68:1161.
28. Tamura, K. and Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in human and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10:512.
29. Watanabe, T., Masangkay, T. S., Wakana, S., Saitou, N. and Tomita, T. 1989. Mitochondrial DNA polymorphism in native Philippine cattle based on restriction endonuclease cleavage patterns. *Biochem. Genet.* 27:431.
30. 이성수, 고서봉, 오운용, 양영훈, 김규일, 조병욱. 1998. 미토콘드리아 DNA D-loop region의 PCR-RFLP를 이용한 한우, 제주 재래한우와 타 품종과의 유전적 관계 분석. *한축지.* 40:335.
31. 정의룡, 박정준, 한상기. 1996. PCR 기법을 이용한 소 mt DNA의 RFLP 분석에 관한 연구. *한축지.* 38:307.

(접수일자 : 2002. 1. 4 / 채택일자 : 2002. 3. 8)