

## 돼지 Melanocortin Receptor 1(MC1R) 대립유전자 3의 신규 유전변이 탐색

조인철\* · 정용환\* · 정진관\* · 성필남\* · 오운용\* · 고문석\* · 김병우\*\* · 이정규\*\* · 전진태\*\*  
농촌진흥청 제주농업시험장\*, 경상대학교 응용생명과학부\*\*

### Detection of Novel Genetic Variations of the MC1R \*3 Allele in Pig(*Sus scrofa*)

I. C. Cho\*, Y. H. Jung\*, J. K. Jung\*, P. N. Seong\*, W. Y. Oh\*, M. S. Ko\*,  
B. W. Kim\*\*, J. G. Lee\*\* and J. T. Jeon\*\*  
National Jeju Agricultural Experiment Station, R.D.A.\*  
Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University\*\*

#### ABSTRACT

This study was conducted to investigate novel genetic variations of MC1R\*3 allele. In general, white spotting or white belt on a black background in pigs is determined by the  $E^p$  allele at the MC1R/Extension locus.  $E^p$  shares a frameshift mutation with the  $E^{f2}$  allele for dominant black color. An oligonucleotide primer set was designed to amplify complete coding sequence of the porcine MC1R gene. The MC1R coding sequences obtained from five breeds those were Landrace(white), Yorkshire(white), Hampshire(belt), Berkshire(spot) and Jeju native black pigs(black), were used for this study. A multiple sequence alignment of the MC1R coding region using Clustal W was performed. The total length of the MC1R coding sequence ranged from 963 to 966 base pairs(bp) among the selected breeds. The sequence analysis of the complete coding region of MC1R was revealed that Hampshire and Jeju native black pig have 3 cytosines deletion and Berkshire has 2 cytosines deletion at codon 23(nt68) in Extension loci. Besides the finding, there were three different missense mutations and a frameshift mutation in the MC1R coding region.

(Key words : MC1R, Extension, Novel genetic variation, Frameshift mutation, Missense mutation)

#### I. 서 론

돼지 MC1R 유전자는 6번 염색체 단완(short arm-p)에 위치하고 있으며(Kijas, 1998), 다른 포유동물에서와 마찬가지로 기본적인 모색은 흑갈색(black/brown)과 적황색(red/yellow)이며, 이들 색은 eumelanin(black/brown)과 pheomelanin(red/yellow)의 상대적인 양, 정도, 분포에 의해 여러

가지 형태의 모색이 존재한다(Evert 등, 2000). 이들 두 가지 색소의 양과 분포는 Extension과 Agouti loci에 의하여 영향을 받으며 일반적으로 흑모색 발현은 MC1R 유전자가 활성화 되던지 아니면 Agouti 유전자가 불활성화 되어야 한다. 돼지 MC1R은  $\alpha$ -MSH와 결합함으로써 활성화 된다(Lockton, 1992; Varga 등, 1997) 또한 Extension과 Agouti loci는 tyrosinase 유전자에 의하여 영향을 받으며, 낮은 수준의 tyrosinase는

Corresponding author : J. T. Jeon, (Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea. Tel : 055-751-5509, E-mail : jtjeon@nongae.gsnu.ac.kr

phaeomelanin 색소를 합성하지만, 반대로 높은 수준의 tyrosinase는 eumelanin이 합성된다.

지금까지 *MC1R* 유전자에 대한 연구는 mouse (Robbins 등 1993), 소(Klungland 등 1995), 사람 (Valverde 등 1995), 말(Marklund 등 1996), 여우 (Vage 등 1997), 닭(Takeuchi 등 1997), 면양 (Vage 등 1999), 개(Newton 등 2000) 등에서 보고 되었으며, 돼지에서는 Kijas 등(1998, 2001), Giuffra 등(2000), 김 등(2001) 및 조 등(2002)이 보고하였다. Kijas 등은 돼지 *MC1R* 유전자의 대립유전자를 5가지로 분류하였으며, 대립유전자별로 살펴보면, allele\*1과 allele\*5의 유전자형은 *E* (wild type)이며, allele\*2의 유전자형은 *E<sup>DL</sup>* (dominant black)이다. allele\*3의 유전자형은 *E<sup>DS</sup>* (dominant black)이며, 마지막으로 allele\*4의 유전자형은 *e* (recessive red)이다.

따라서 본 실험은 국내에서 사육되고 있는 돼지 *MC1R*\*3 allele에 속하는 4품종과 같은 allele의 제주 재래흑돈을 공시하여 유전적 변이를 관찰하여 모색발현 기작을 연구하는데 기초 자료를 제시하고자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시동물 및 혈액채취

실험에 공시된 돼지는 제주농업시험장에서 사육하고 있는 Landrace, Yorkshire 각 20두와 제주도 소재 B 종돈장 등에서 사육하고 있는 Hampshire, Berkshire 각 3두 및 재래돼지 20두 등 5품종을 비보정법으로 18G gauge needle이 부착된 주사기로 경정맥으로부터 혈액을 채혈하였으며, DNA 추출 전까지 4℃ 냉장고에서 보관하였다.

### 2. DNA 추출 및 정제

혈액으로부터 genomic DNA의 추출은 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA)를 이용, 전기영동에 의하여 DNA 농도를 정량한 후 4℃ 냉장고에 보관하였다.

### 3. 돼지 *MC1R*의 전체 번역지역 증폭

돼지 *MC1R* 번역지역 전체의 염기서열 분석을 위하여 기존에 보고된 돼지 *MC1R* 전체 염기서열(Genbank accession number : AF326520)을 가지고 번역부위만 PCR증폭을 하기 위하여 primer를 제작하였으며, primer sequence는 아래와 같다.

*MC1R* F : 5'-ATG CCC GTG CTT GGC CCG GAG-3'

*MC1R* R : 5'-TCA CCA GGA GCA CTG CAG CAC-3'

PCR 반응은 10 × buffer 2.5 μl, dNTP 2 μl, 10 pmol primer 각 1.5 μl, *Taq* 0.3 μl, DW 15.2 μl, genomic DNA 2 μl를 첨가하여 최종 25 μl를 반응하였으며, PCR 반응조건은 94℃에서 10분간 pre-denaturation을 실시하고 94℃에서 1분, 68℃에서 1분, 72℃에서 1분 총 40 cycle을 수행한 후 72℃에서 10분간 extension을 실시 후 4℃에서 종료하였다.

### 4. 유전자 cloning 및 Sequencing

PCR product는 TOPO TA cloning kit (Invitrogen, USA)를 이용하여 ligation을 실시하였다. cloning된 DNA fragment는 Cy5-labeled된 vector inner primer인 M13-40 primer(5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3')와 M13-reverse primer(5'-TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC-3')를 이용하였으며, 각 시료는 Cy5™ AutoCycle™ Sequencing Kit를 이용하여 Plasmid DNA와 반응시켜 Sequencing 반응을 수행하였다. 그 후 gel buffer로서 0.6% TBE buffer를 이용하였고, ALFexpress DNA sequencer(Pharmacia Biotech, USA)를 1500 V에서 700 분간 6% acrylamide-7M urea gel에서 전기영동 하였다. Sequence data는 Clustal W(Thompson 등, 1994)를 이용하여 염기서열의 정렬을 수행하였다.

III. 결과 및 고찰

본 실험에 공시한 돼지 품종은 Kijas 등(1998, 2001) 및 Giuffra 등(2000)이 분류한 돼지 *MC1R*\*3 allele에 포함되어 있는 4품종과 조 등(2002)에 의하여 보고된 같은 allele의 제주 재래흑돈을 공시하였다. 돼지 *MC1R* 유전자의 allele\*3에는 2개의 유전자형 즉,  $E^{D3}$ (dominant

black)와  $E^p$ (white or white with black spots)는 제한효소 인지부위가 없기 때문에 RFLP 방법으로 식별이 불가능하다. 따라서 이들의 염기서열 분석을 위하여 기존에 보고된 GenBank (accession number : AF326520) database를 이용하여 exon 전체를 PCR 증폭 후 cloning과 Sequencing을 수행하였다. 그 결과 돼지 *MC1R* 유전자의 exon은 963에서 966 base pairs였다.

Landrace	ATGCCCTGCTGGCCCGGAGAGGCTGCTGGCTTCCTCAGCTCCGGCCCCCAGCCGCC	CCCCCCCCCTGGGGTGGCCGCCAAC	90
Yorkshire	.....	.....G..	
Berkshire	.....	.....	
Hampshire	.....	.....	
Jeju Native	.....	.....	
Landrace	CAGACCAACCAGACGGGCCCCCACTGCTGGAGGTGCCATTCCCGACGGGCTCTTCCTCAGC	CTGGGGCTGGTGAAGCTCGTGGAGAAC	180
Yorkshire	.....	.....	
Berkshire	.....	.....	
Hampshire	.....	.....	
Jeju Native	.....	.....	
Landrace	GTGCTGGTGGTGGCCGCCATGCCAAGAACCACCTGCACCTGCCCATGTACTACTTCTGTC	TGCTGGCTGGCCGTGTGGACCTGCTG	270
Yorkshire	.....	.....	
Berkshire	.....	.....	
Hampshire	.....	.....	
Jeju Native	.....	.....	
Landrace	GTGAGCGTGAGCAACGTCTGGAGACGGCCGTGCTGCTGCTGGAGGGGGGGCCCTGGCC	GCCACAGCCCGCTGGTGCAGCAGCTG	360
Yorkshire	.....	.....	
Berkshire	.....	.....	
Hampshire	.....	.....	
Jeju Native	.....	.....	
Landrace	GACAATGTCATGAACGTGCTCATCTCCGGCTCCATGGTGTCCAGCCTCTGCTTCTGGCCGCC	ATCGCCGTGGACCGCTACGTGTCTATC	450
Yorkshire	.....	.....	
Berkshire	.....	.....	
Hampshire	.....	.....	
Jeju Native	.....G.....	.....	
Landrace	TTCTACGGCTGCGCTACCACAGCATCGTGACGCTGCCCCGGGGGGGGCCATGGGGCC	ATCTGGGGGGCAGCGTGTCTCCAGC	540
Yorkshire	.....	.....	
Berkshire	.....	.....	
Hampshire	.....	.....	
Jeju Native	.....	.....	
Landrace	ACCCTTTCATGGCTACTACCACACACGGCCGTCTGCTGGCCCTGTCAGTCTTCTGCTG	GCCATGCTGGCGCTATGGCGGTACTG	630
Yorkshire	.....	.....	
Berkshire	.....	.....	
Hampshire	.....	.....	
Jeju Native	.....	.....	
Landrace	TACGTCCACATGCTGGCCGGGGCTGCCAGCAGGCCGGCAGATCGCCGGCTCCACAAGACG	CAGCACCCACCCGGCCAGGGCTCCGGC	720
Yorkshire	.....	.....	
Berkshire	.....	.....	
Hampshire	.....	.....	
Jeju Native	.....	.....	
Landrace	CTCAAGGGCCGGCCACCCTCACCATCCTGCTGGCCGTCTTCTCTCTGCTGGCACCCCTTC	TTCTGACCTCTCCCTGCTGCTCTC	810
Yorkshire	.....	.....	
Berkshire	.....	.....	
Hampshire	.....	.....	
Jeju Native	.....	.....	
Landrace	TGCCCCAGCACCCACCTGCGCTGCTTTCAAGAAGTCAACTCTTTCGGCCCTCTGTC	ATCTGCAACTGCATGCTGGACCCCTC	900
Yorkshire	.....	.....	
Berkshire	.....	.....	
Hampshire	.....	.....	
Jeju Native	.....	.....	
Landrace	ATCTACGGCTTCGACGCCAGGAGCTCCGCAAGACCTCCAGGAGGTGCTGCAGTGTCTCTGG	TGA 966	
Yorkshire	.....	.....	
Berkshire	.....	.....	
Hampshire	.....	.....	
Jeju Native	.....	.....	

Fig. 1. A multiple nucleotide comparison of the *MC1R* coding sequences from five breeds. Nucleotide sequences were displayed from 5' to 3'. A dot indicates that the base is identical to that of Landrace.

이는 Kijas(1998) 등이 돼지 *MC1R* 유전자의 전체 변역지역을 948 bp로 추정된 초기의 보고와 비교하였을 경우 15~18 base가 더 길게 추정된 결과이나 그 후(Kijas, 2001)에 보고한 결과와는 거의 유사한 길이를 나타낸다. 이들 염기서열은 GenBank에 등록을 하였으며, 이들의 염기 및 아미노산 서열 자료는 Clustal W 프로그램을 이용하여 염기서열 정렬을 한 결과 Fig. 1과 같다.

Point mutation 부위는 7번, 30번, 125번 codon에서 염기치환(substitution)이 일어났다. 먼저 7번 codon에서 Landrace, Yorkshire, Berkshire 및 제주 재래흑돈의 염기서열은 GAG이나 Hampshire 품종은 GGG로서 아미노산 조성이 glutamic acid(Glu)에서 glycine(Gly)으로 치환(substitution)되었다. 그러나 Kijas 등(2001)은 Hampshire 품종의 7번 codon은 GAG로 보고한 것과는 염기서열 차이가 있었다. 또한 30번과 125번 codon에서 Yorkshire 품종과 제주 재래흑돈의 point mutation이 발견되어 기 보고와는 차이가 있었다. 125번 codon은 Enzyme *Bsp*H I (TCATGIA)인

지부위로서 본 자료에서는 명시하지는 않았지만 RFLP(restriction fragment length polymorphism)를 수행하여 sequence를 확인 하였다. 김 등(2001)은 재래돼지의 *MC1R* 유전자를 분석한 결과 allele\*1과 allele\*2로 보고하였으나, 조 등(2002)은 제주 재래돼지를 분석한 결과 allele\*1은 없었고 오히려 allele\*2와 allele\*3을 보고하였다. Fig. 1과 Fig. 2의 자료에서 제주 재래흑돈의 염기서열을 분석한 결과도 allele\*3으로 나타났다.

*MC1R*\*3 allele의 5품종을 분석한 결과 가장 큰 특징은 23번 codon과 24번 codon사이 즉 68번 염기서열에서 Landrace, Yorkshire 품종의 sequence는 CCC였으나, Berkshire 품종은 시토신(cytosine) 2개가 결실(deletion) 되었으며, Hampshire 및 제주 재래흑돈은 시토신(cytosine) 3개가 결실(deletion) 되는 특징이 있었다. 이 결과는 Kijas 등(2001)이 Pietrain 품종이 *MC1R*\*1~*MC1R*\*4 allele과의 비교하였을 때 67번 염기에서 시토신(cytosine) 2개가 삽입(insert) 되어 전체적인 아미노산 조성 변화에 의하여 모색에서

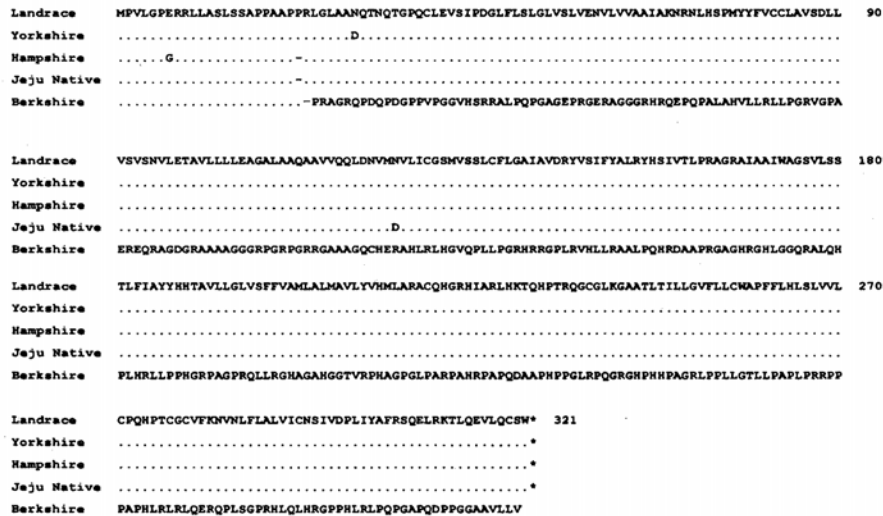


Fig. 2. An amino acid sequence alignment of porcine *MC1R* gene. Dots indicate the same amino acid as in Landrace. Dashes indicate gaps. Berkshire has different amino acid sequences from the condon 23(nt68) due to the frameshift mutation.

Table 1. Characteristics of the porcine *MC1R*\*3 allele

Taxa	Coat color phenotype	Extension genotype*	<i>MC1R</i>	
			Length(bp)	Accession number
Landrace	White	$E^P/E^P$	966	AY365253
Yorkshire	White	$E^P/E^P$	966	AY365255
Berkshire	Black with white spots	$E^{D2}/E^{D2}$	964	AY365249
Hampshire	Black with white belt	$E^{D2}/E^{D2}$	963	AY365251
Native(Jeju)	uniform black	$E^{D2}/E^{D2}$	963	AY365252

\*  $E^{D2}$  : uniform black(Jeju native black pig), black with white belt or black with white spots.  
 $E^P$  : White or white spots with on the red / black background.

차이가 난다는 보고와 거의 일치하나 1 base pair 차이가 나타났다. 그럼에도 불구하고 표현형적으로 전혀 다른 백색계통 품종과 흑모색계통 품종은 4개 부위에서의 변이 외에 전체 sequence는 일치하였다.

따라서 68번 염기서열에서 시토신(cytosine) 2개 또는 3개가 결실(deletion) 됨에 따라 전체적인 아미노산 조성이 변화하여 모색발현에 영향을 주는 것으로 사료된다.

Table 1은 coat color phenotype와 유전자형을 나타낸 것으로서 일반적으로 전신백색의 Yorkshire 품종은 *MC1R*\*3 allele이며 유전자형은  $E^P$ 다, 그리고 전신 흑모색의 Meishan이나 Large Black 품종은 *MC1R*\*2 allele이며, 유전자형은  $E^{D1}$ 다. 그러나 Hampshire와 Berkshire 품종은 모색특징은 흑모색 바탕에 백색 띠나 백색 반점이 있는 것으로 *MC1R*\*3 allele이며 유전자형은  $E^{D2}$ 다. 그러나 제주 재래흑돈은 표현형적으로는 전신 흑모색이나 조 등(2002)의 기 보고에 의하면 *MC1R*\*2 allele의  $E^{D1}$  유전자형과 *MC1R*\*3 allele의  $E^{D2}$  유전자형이 동시에 존재하는 특징이 있으며, 또한 이들의 이형 접합체(heterozygote)도 상당수 존재하는 것으로 알려져 있다.

결론적으로 *MC1R*\*3 allele의 돼지에 대하여 sequencing 자료를 분석한 결과 뚜렷한 변이가 관찰되었다. 이러한 연구결과와 더불어 더 많은 품종을 확보하여 실험을 실시한다면 모색유전에 대한 *MC1R* 유전자의 유전 양상을 구명하는데 중요한 기초 자료를 제시할 것으로 사료된다.

#### IV. 요약

본 연구는 *MC1R*\*3 allele의 돼지에 있어서 유전적 변이를 관찰하기 위하여 수행하였다. 일반적으로 흑모색 바탕에 백색반점이나 백색 띠를 갖고 있는 돼지의 *MC1R* 유전자의 유전자형은  $E^{D2}$ 로 나타낸다. 우성 백색계통의  $E^P$  유전자형은 우성 흑모색 계통의  $E^{D2}$  유전자와 frameshift mutation 관계가 있다. 돼지 *MC1R* 전체 번역지역을 증폭하기 위하여 oligonucleotide primer를 제작하여 PCR을 수행 하였다. 그 결과 길이가 963~966 base pairs인 돼지 *MC1R* 유전자의 전체번역지역을 포함하는 산물을 얻었다. 이들 번역부위의 염기서열 결정하고 이들을 Clustal W 프로그램을 이용하여 정렬한 결과 23번 코돈(nt68)에서 Hampshire와 제주 재래흑돈은 염기 시토신(cytosine)이 3개 그리고 Berkshire의 경우 염기 시토신(cytosine)이 2개 결실되어 있었다. 그 외에 3개의 missense mutations과 하나의 frameshift mutation이 발견되었다.

#### V. 인용 문헌

1. Evert, R. E., Rothuizen, J. and van Oost, B. A. 2000. Identification of a premature stop codon in the melanocyte-stimulating hormone receptor gene (*MC1R*) in labrador and golden retrievers with yellow coat color. *Animal Genetics* 31:194-199.
2. Giuffra, E., Kijas, J. M. H., Amarger, V., Carlborg, O., J.-T. Jeon. and Andersson, L. 2000. The origin of the domestic pig: Independent domestication and subsequent introgression. *Genetics* 154:1785-1791.

3. Jackson, I. J. 1993. Color-coded switches. *Nature* 362:587-588.
4. Kijas, J. M. H., Wales, R., Tornten, A., Chardon, P., Moller M. and Andersson, L. 1998. Melanocortin receptor 1(*MC1R*) mutation and coat color in pigs. *Genetics* 150:1177-1185.
5. Kijas, J. M. H., Moller, M., Plastow, G. and Andersson, L. 2001. A frameshift mutation in *MC1R* and a high frequency of somatic reversions cause black spotting in pigs. *Genetics* 158:779-785.
6. Klungland, H., Vage, D. I., Gomez, R. L., Adalsteinsson, S. and Lien, S. 1995. The role of melanocyte-stimulating hormone(MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mamm. Genome* 6:636-639.
7. Marklund, L., Johansson, M., Sandberg, K. and Andersson, L. 1996. A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (*MC1R*) is associated with the chestnut coat color in horses. *Mamm. Genome* 7:895-899.
8. Newton, J. M., Wilkie, A. L., He, L., Jordan, S. A. and Metallinos, D. L. 2000. Melanocortin 1 receptor variation in the domestic dog. *Mamm. Genome* 11:24-30.
9. Robbins, L. S., Nadeau, J. H., Johnson, K. R., Kelly, M. A. and Roselli Rehfuss, L. 1993. Pigmentation phenotypes of variant *Extension* locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 72:827-834.
10. Takeuchi, S. H., Suzuki, H., Yabuuchi, M. and Takahashi, S. 1996. A possible involvement of melanocortin 1-receptor in regulating feather color pigmentation in the chicken. *Biochim. Biophys. Acta.* 1308:164-168.
11. Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22: 4673-4680.
12. Vage, D. I., Lu, D., Klungland, H., Lien, S. and Adalsteinsson, S. 1997. A non-epistatic interaction of *Agouti* and *Extension* in the fox, *Vulpes vulpes*. *Nat. Genet.* 15:311-315.
13. Vage, D. I., Klungland, H. and Lu, D. 1999. Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. *Mamm. Genome* 10:39-43.
14. Valverde, P., Healy, E., Jackson, I., Rees, J. L. and Thody, A. J. 1995. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat. Genet.* 11:328-330.
15. 김태현, 윤두학, 노환국, 최봉환, 연성흠, 김남순, 이화진, 정일정, 한재용. 2001. 재래돼지 Melanocortin Receptor 1(*MC1R*)의 변이에 관한 연구. *한국동물자원과학회지* 43(3):293-302.
16. 조인철, 이정규, 정진관, 양보석, 강승률, 김병우. 2002. 랜드레이스, 대요크셔, 듀록 및 제주 흑돈의 Melanocortin 1 Receptor(*MC1R*) 유전자의 유전자형 분석. *한국동물자원과학회지* 44(2):207-212. (접수일자 : 2003. 9. 8. / 채택일자 : 2004. 1. 29.)