

---

碩士學位論文

미토콘드리아 DNA D-loop region과 MSH  
receptor 遺傳子의 PCR-RFLP를 이용한 韓牛,  
濟州在來韓牛와 타 品種과의 遺傳的 關係 分析

濟州大學校 大學院



李 晟 守

1997年 12月

미토콘드리아 DNA D-loop region과 MSH  
receptor 遺傳子의 PCR-RFLP를 이용한 韓牛,  
濟州在來韓牛와 타 品種과의 遺傳的 關係 分析

指導教授 梁 榮 勳

李 晟 守

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함

1997年 12月

 제주대학교 중앙도서관  
李晟守의 農學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_

委 員 \_\_\_\_\_

委 員 \_\_\_\_\_

濟州大學校 大學院

1997年 12月

Determination of phylogenetic relationships of  
Korean native and Cheju native cattle to other  
breeds using PCR-RFLP of mtDNA D-loop  
region and MSH Receptor Gene

Sung-Soo Lee

(Supervised by professor Young-Hoon Yang)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF  
SCIENCE

DEPARTMENT OF ANIMAL SCIENCE  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1997.

## 목 차

Summary .....	1
I. 서 론 .....	3
II. 연구사 .....	5
1. 소 미토콘드리아 DNA 연구 .....	5
2. MSH Receptor 유전자 연구 .....	8
III. 재료 및 방법 .....	10
1. 공시재료 .....	10
2. Total DNA 분리 및 정제 .....	10
3. Primer 설계 및 합성 .....	11
1) mtDNA D-loop region primer .....	11
2) MSH receptor 유전자 primer .....	12
4. PCR에 의한 D-loop region 및 MSHR 유전자의 증폭 ..	12
5. PCR 산물의 RFLP 분석 .....	13
6. 소 mtDNA RFLP를 이용한 품종간 유전적 관계 분석 ..	13
IV. 결과 및 고찰 .....	14
1. 소 D-loop region의 PCR-RFLP 및 계통유전학적 관계 분석 .....	14
1) 소 D-loop region의 PCR-RFLP 분석 .....	14
2) 품종별 D-loop region의 다형형 및 빈도 비교 .....	22
3) 소 품종간 유전관계 분석 .....	24
2. 소 MSH receptor 유전자 PCR-RFLP 분석 .....	31
V. 적 요 .....	37
VI. 참고문헌 .....	38

## SUMMARY

Two experiments were conducted to analyze molecular genetic differences between Korean native cattle and Cheju native cattle and also determine relationships to other cattle breeds using PCR-RFLP analysis of mtDNA D-loop region. Cattle breeds sampled were Korean native cattle, Cheju native black cattle, Cheju native yellow cattle, Aberdeen Angus, Charolais, Hereford and Holstein. Seventy DNA samples from 7 breeds (10 samples/breed) were examined at 29 sites restricted by 10 enzymes, of which 8 enzymes showed polymorphism when the D-loop region was digested; 8 enzymes were Msp I, Rsa I, BstX I, Hsp92 II, Mbo I, Hae III, Ava II and Hinc II, and two enzymes Hha I and BamH I, showing no polymorphism. Differences in restriction patterns were found between Cheju native black cattle and Korean native cattle. Thirteen polymorphic sites were used to construct a phylogenetic tree, where Korean native cattle was more closely clustered with Cheju native yellow cattle than the other breeds.

PCR-RFLP (Msp I or BsrF I and Aci I) analysis of MSH receptor gene was carried out to confirm the genotypes and frequency showed differences in MSH receptor genotypes among Korean native cattle, Cheju native black cattle, Cheju native yellow cattle and Holstein. A Dominant allele  $E^D$ , which is considered to be a typical allele for black coat color in some breeds, was not observed in Cheju native black cattle, showing

---

that black coat color of Cheju native black cattle is genetically different from that of other breeds, such as Holstein, Norwegian and Icelandic cattle.



## I. 서론

소는 분류학상 척추동물문(*Vertebrata*), 포유강(*Mammalia*), 우제목(*Artiodactyla*), 반추류(*Ruminantia*), 우과(*Bovinae*), 우속(*Bos*)에 속한다. 그리고 우과의 우속(*Bos*)은 축우군(*taurine group*), 반야우군(*bibovine group*), 야우군(*bison group*) 및 수우군(*bubaline group*)의 4개의 군으로 분류되며, 축우군(*taurine group*)은 다시 유럽축우(*B. taurus*)와 인도축우(*B. indicus*)로 분류된다. 한우(Korean native cattle, *Bos taurus Coreanae*)의 기원은 4천여년전에 유럽우(*Bos taurus*)와 인도견봉우(*Bos zebu*)가 교잡되어 중국 대륙, 몽고, 만주 등을 거쳐 한반도에 전래되었을 것으로 추정되고 있다(육 등, 1981; 한, 1996). 제주재래한우(Cheju native cattle)는 한반도 또는 중국 대륙으로 부터 전래되어 오랜 세월 동안 제주도의 독특한 환경에 격리 적응하여 특징있는 체형과 모색(제주재래흑우, Cheju native black cattle; 제주재래황우, Cheju native yellow cattle)을 소유한 집단으로 유지되었을 것으로 생각된다.

최근 분자생물학의 발달과 더불어 DNA 수준에서 종(species)의 진화와 계통분류학적 연구가 활발히 진행되어 왔다. 특히 미토콘드리아 DNA(mtDNA)는 핵 DNA 보다 염기치환의 진화 속도가 빠르고(Brown 등 1979; Cann 등, 1987), 핵 DNA의 멘델유전방식과는 다른 모계유전을 한다는 특성이 보고(Hutchison 등, 1974)되어 인류를 비롯한 많은 포유동물에서 종내 및 근연종 사이의 유전학적 관계를 연구하는데 매우 유용한 도구로 활용된다(Brown 등, 1980; Cann 등 1987; Ballinger 등, 1992; Torroni 등, 1994; Wills 등, 1995). 특히 소의 진화와 분류를 위해 mtDNA에 대한 연구가 많은 연구자들에 의해 수행되었지만(Watanabe 등, 1989; Amano 등,

1994; Loftus 등, 1994a; Loftus 등, 1994b), 한우의 mtDNA 다형성에 대한 연구는 한정적으로 수행되어 왔고(Chung 등, 1995; 정 등, 1996; Kikkawa 등, 1995), 특히 한우의 mtDNA 다형현상 분석을 통한 계통유전학적 연구는 Kikkawa 등(1995)의 단편적인 보고 이외에는 찾아보기 어렵다.

소의 모색은 품종의 특징을 구성하는 주요 심사대상 형질이며 개체 및 품종을 식별하는 수단으로도 이용될 수 있는 대표적인 질적 형질의 하나이다. 특히 한우의 모색은 황갈색으로 대표되지만 제주재래한우는 흑색을 비롯하여 흑갈색, 호반모 등의 모색이 나타난다. 과거 한우의 모색 분포에 관한 연구 등에서 한우 또한 황갈색 이외의 모색이 보고된 바 있다(김, 1963; 이 등, 1970; 박 등, 1971). 최근 소를 비롯한 많은 포유동물에서 모색 발현에 관여하는 MSH receptor 유전자의 역할에 대해 보고되었다(Robbins 등, 1993; Valverde 등, 1995; Klungland 등, 1995; Joerg 등, 1996; Marklund 등, 1996).

따라서 본 연구는 한우와 제주한우(흑우, 황우)의 유전적 특성을 구명하고 *Bos taurus* 품종간의 계통유전학적 유연관계를 분석하기 위하여 mtDNA D-loop region과 MSH receptor를 각각 PCR-RFLP 사용하여 수행되었다.

## II. 연구사

### 1. 소 미토콘드리아 DNA (mtDNA) 연구

소 mtDNA의 전체 염기서열이 Anderson 등(1982)에 의해 보고된 이후 많은 학자들이 소 mtDNA의 polymorphism 분석과 분자유전학적 연구에 대한 관심을 쏟기 시작하였다.

소에서의 mtDNA polymorphism에 관한 연구는 Laipis 등(1982)이 Holstein 종 모계내에서 염기서열 변이에 따른 Hae III 제한효소에 의한 다형성을 처음으로 보고하였고, 이러한 개체간 또는 집단간에 염기서열의 변이를 보이는 mtDNA의 다형성 분석은 종간 및 집단간에 유전적 구조 차이의 구명은 물론 종의 진화와 축화 과정을 밝히려는 연구로 진행되었다. Amano 등(1994)과 Tanaka 등(1995)은 mtDNA 다형성 분석을 통하여 소(cattle)와 water buffalo의 swamp type과 river type간의 유전적 관계와 유전적 구조 차이를 보고한 바 있다. 특히 두 종류의 *Bos* 종(species), 즉 *B. indicus*(humped)와 *B. taurus*(humpless)에 대한 연구가 활발히 진행되었는데 Watanabe 등(1989)은 European cattle(*B. taurus*)과 Zebu cattle(*B. indicus*) 혼혈로 여겨지는 Native Philippine cattle에 대한 mtDNA 다형성 분석에서 뚜렷한 차이를 보이는 두 개의 mtDNA type으로 나누어지고, Philippine cattle의 두 type은 European cattle과 Zebu cattle 양쪽에서 서로 유래되었을 것으로 추정된 바 있다. 그리고 Loftus 등(1994)은 European cattle(*B. taurus*), African cattle(*B. taurus*와 *B. indicus*) 및 Asian cattle(*B. indicus*)의 13 품종에 대한 mtDNA의 RFLP 분석을 통하여 이들 품종간의 유전적 관계를 연구하였는데 이들 품종들은 두 가지의

뚜렷한 lineage, 즉 African-European type과 Asian type이 나타나고, 다른 포유동물로부터 추정된 미토콘드리아 진화율(rates of mitochondrial evolution)을 적용한 결과 이 두 lineage는 575,000 ~ 1,150,000년전에 나누어진 것으로 추정하였다.

Kikkawa 등(1995)은 한우(Korean native cattle)와 Japanese black cattle과 함께 European cattle(*B. taurus*), Zebu cattle(*B. indicus*) 및 Bali cattle(*B. javanicus*)의 mtDNA에 대한 RFLP 분석에서 각각의 세 그룹은 특정한 haplotype을 가지고 있음을 보고하였고, 공시된 세 그룹의 cytochrome b 유전자에 대한 염기서열을 비교한 결과 아시아 축우의 조상 집단은 3백만년전에 두 개의 lineage, 즉 Bali cattle(*B. javanicus*)과 European+Zebu로 나누어졌고, 그 후 European cattle과 Zebu cattle 그룹이 1백만년전 혹은 축화가 일어나기 전에 나누어졌을 것으로 보고하였다.

그리고 최근 mtDNA 염기서열에 대한 연구와 PCR 기술의 개발로 D-loop region과 cytochrome b 등 mtDNA 특정 부위의 PCR-RFLP 분석 및 염기서열에 대한 분석이 활발히 이루어지고 있는데 포유동물의 미토콘드리아 genome내 D-loop region은 tRNA<sup>pro</sup>과 tRNA<sup>phe</sup> 유전자 사이에 위치하고 있으며 소 D-loop region의 크기는 911 bp인 것으로 밝혀졌다(Anderson 등, 1981, 1982). 사람의 미토콘드리아 D-loop region의 염기 치환율은 미토콘드리아 genome의 다른 나머지 부분에서 발생하는 것 보다 빠른 것으로 보고되었으며(Aquadro & Greenberg, 1982; Cann 등, 1984), 소 D-loop region의 염기 변이는 소 전체 mtDNA에서 보고된 것 보다 10배나 높은 것으로 보고되었다(Ron 등, 1993).

Suzuki 등(1993)은 서부 아프리카 N'Dama(*Bos taurus* 품종)와 동부 아프리카 Zebu 등 5개의 집단에서 D-loop region의 PCR-RFLP 분석을 한 결과 사용된 12 종류의 제한효소 중 5개의

효소에서 다형현상이 나타났으나, 품종의 특징적인 다형현상은 관찰할 수 없었음을 보고하였다. 그리고 Loftus 등(1994)은 6종의 European(taurine) 품종, 3종의 Indian(zebu) 품종 그리고 4종의 African(3 zebu, 1 taurine) 품종들에서 D-loop region의 염기서열을 분석한 결과 공시되었던 모든 European 품종과 African 품종들은 하나의 lineage에, 그리고 Indian 품종들은 또 다른 lineage에 소속되는 매우 독특한 지리적인 두 개의 lineages로 나누어지고 있다고 보고한 바 있는데, 이것은 일반적으로 구분되고 있는 taurin-zebu의 이분법과는 일치하지 않은 결과였다. 또한 이 두 lineages는 200,000 ~ 1,000,000년전에 분리되었음을 추정하였는데 이 결과는 8,000 ~ 10,000년전의 단일 축화(single domestication)에 의해 *Bos taurus*와 *Bos indicus*가 유래되었다는 사실을 부인하는 결과로 소에 있어서 두개의 독립적인 축화(two independent domestications)의 증거로 제시된 바 있다.

한편 mtDNA의 염기 변이와 경제형질 및 질병과의 관계에 대한 연구 결과도 보고되고 있는데(Brown 등, 1989; Ron 등, 1993; Holt 등, 1990), Schutz 등(1993)은 D-loop region의 특정 염기 치환으로 인하여 우유내 유지방 함량 등에 유의적인 차이가 있음을 보고하였다.

한우에 있어서 mtDNA 다형성에 대한 연구는 Chung 등(1995)이 Holstein과 한우의 mtDNA RFLP 연구에서 3 종류의 제한효소에서 다형성을 보고하였고, 정 등(1996)이 D-loop region의 PCR-RFLP 분석에 관한 연구에서 14 종류의 제한효소 중 2 종류의 제한효소에서 다형현상이 나타났음을 보고하였다.

## 2. MSH Receptor(MSHR) 유전자 연구

포유동물의 모색은 두 가지의 색소, 즉 phaeomelanin(red/yellow) 과 eumelanin(brown/black)의 분포에 따라 결정되는데 이들의 상대적 양은 주로 2개의 좌위, 즉 Extention(E)과 Agouti(A) 좌위에 의해 주로 조절된다(Robbins 등, 1993; Jackson, 1993).

마우스에서 E 좌위는 MSHR(Melanocyte-Stimulating Hormone Receptor)를 encode하고, 마우스에서 나타나는 여러 종류의 E 좌위는 MSH receptor의 기능을 변경시키는 point mutation에 기인한다고 보고하였다(Robbins 등, 1993). 그리고 Lu 등(1994)은 A 좌위의 Agouti protein은 MSH receptor의 competitive antagonist로 MSH와 그 receptor와의 결합을 방해함으로써 모색 발현에 관여한다는 보고를 하였다. 또한 Jackson(1993, 1994)은 마우스의 흑색(black)과 황색(yellow)의 모색은 E 좌위의 MSH receptor와 A 좌위의 Agouti protein에 의해 결정된다는 분자생물학적 모델을 제시하였다.

Valverde 등(1995)은 사람의 MSH receptor 유전자 분석에서 사람의 MSH receptor는 색소 표현형의 조절에 있어서 다른 포유동물과 마찬가지로 중요한 요인일 수 있다고 하였고, 총 9개의 MSH receptor 유전자의 염기 변이와 모색 및 피부색별 빈도를 보고하였다. 또한 그는 MSHR receptor 유전자 염기 변이는 poor tanning response와도 관련된다고 보고하였다.

Jahnson 등(1994)은 말에서 MSH receptor에 대한 PCR-RFLP 분석 결과 chestnut 모색과 MSH receptor의 다형현상은 cosegregation됨을 보고하였고, Marklund 등(1996)은 말 MSH receptor의 염기서열 분석 결과 단일 missense mutation이 chestnut 모색과 관련되고 있음을 보고하였다.

소의 MSH receptor 유전자 연구에서는 흑색을 나타내는 dominant allele인 E<sup>D</sup>, 동형접합체일 때 적색을 나타내는 frameshift mutation인 e 그리고 여러 가지 모색을 나타내는 E<sup>+</sup>의 세가지 allele이 보고되었다(Klungland 등, 1995). Msp I 제한효소를 이용한 PCR-RFLP 분석 결과 홀스타인의 적색 모색은 MSH receptor 유전자에서 특정 염기의 deletion에 기인하며 흑색과 적색 모색에 대한 구별이 가능하다는 보고를 하였다(Joerg 등;1996). 한편 Werth 등(1996)은 소에서 MSH receptor 유전자에 대한 Msp I 제한효소에 의한 RFLP의 밴드 양상은 멘델 유전을 하고 있으며 이 MSH receptor 유전자는 소의 18번 염색체에 존재한다고 보고 하였다.



### III. 재료 및 방법

#### 1. 공시재료

mtDNA D-loop region 분석에 공시된 혈액 시료는 7품종 70두에서 채취되었으며 한우, Angus 및 Charolais 품종의 혈액 시료는 축산기술연구소 대관령지소와 제주도 소재 평해광업주식회사 제주목장에서 품종별 각각 10두씩 채혈되었고, Hereford 품종은 축산기술연구소 대관령지소에서, Holstein 품종은 제주도 및 육지도입축에서 각각 10두씩 채혈되었다. 그리고 제주재래한우(흑우 10, 황우 10두)의 혈액 시료는 농촌진흥청 제주농업시험장 및 제주도축산진흥원에서 보존 사육되고 있는 집단에서 채취되었다. 공시된 7품종 중 헤어포드 10두를 제외한 다른 공시 품종들의 혈액 표본들은 두 집단 이상에서 채혈되었다. 그리고 MSHR 유전자 분석을 위해서 홀스타인 10두, 한우 11두, 제주재래흑우 15두 그리고 제주재래황우 7두의 혈액 시료가 실험에 이용되었다.

#### 2. Total DNA의 분리 및 정제

소의 total DNA의 분리 및 정제는 Miller 등(1988)의 방법을 다소 변형하여 수행되었다. 소의 경정맥에서 10 ml의 혈액을 채취한 후 50 ml 튜브에 넣고  $\text{NH}_4\text{Cl}$  lysis buffer (0.15 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM  $\text{KHCO}_3$ , 10 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )를 2배 첨가하여 1,500xg에서 10분 동안 원심분리 후 상층액을 제거하였고, 이 과정을 2 ~ 3회 반복하였다. 그 후 3 ml의 extraction buffer (0.4 M  $\text{NaCl}$ ; 10 mM Tris

HCl, pH 8.0; 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA)를 넣어 혼합 후 200  $\mu$ l의 10% SDS와 50  $\mu$ l의 proteinase K를 첨가하여 50°C에서 3 ~ 12시간 방치하였다. 그리고 방치기간 중에 튜브를 2 ~ 3회 정도 뒤집어 주었다. 그 후 시료에 중화된 phenol (pH 8.0)을 동량 첨가하여 30분 동안 흔든 후 4°C에서 4,000xg로 10분 동안 원심분리를 하였다. 상층액을 채취하여 phenol:chloroform (1:1)을 동량 넣고 다시 10분 동안 흔든 후, 10분 동안 4,000xg에서 원심분리를 하여 상층액을 얻었다. 그리고 phenol:chloroform으로 약 2 ~ 3회 정도 extraction 실시하였다. 상층액에 다시 chloroform:isoamyl alcohol (24:1)을 동량 넣고 혼합한 후 다시 원심분리를 하였다. 그리고 최종적으로 냉장된 에탄올을 2배 첨가하여 -70°C에 20분 이상 보관한 후 약 2,000 ~ 3,000xg에서 원심분리하여 DNA pellet을 얻었다. DNA 세척은 70% EtOH를 넣고 가볍게 원심분리하여 상층액을 버리고, 진공건조 또는 자연건조시킨 후 TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA)에 total DNA를 녹였다. 분리된 DNA는 1.0% agarose gel에 전기영동을 하여 확인하거나 또는 분광광도계 (260/280 nm)에서 OD값을 측정하여 농도를 측정하였다.

### 3. Primer 설계 및 합성

#### 1) mtDNA D-loop region Primer

소 mtDNA의 D-loop region을 증폭하기 위하여 Anderson 등 (1982)이 소에서 보고한 염기서열과 Ishida 등(1994)이 말에서 이용한 primer를 참조하여 15,677번과 410번 사이의 1,072 bp 단편을 증폭하는 primer를 합성하여 사용하였고 그 염기서열은 다음과 같다.

Forward primer : 5'-ACA CCA GTC TTG TAA ACC AG-3'

Reverse primer : 5'-TCA TCT AGG CAT TTT CAG TG-3'

## 2) MSHR 유전자 Primer

본 실험에 이용된 primer는 말에서 보고된 primer를 참조하여 제작하였고 염기서열은 다음과 같다(Kreigesmann 등, 1995).

Forward primer : 5'-CAT GTA CTG CTT CAT CTG CTG CC-3'

Reverse primer : 5'-GAG GTT GAA GTT CTT GAA GAT GCA G-3'

## 4. PCR에 의한 D-loop region 및 MSHR 유전자의 증폭

mtDNA D-loop region을 증폭하기 위하여 PCR 반응액은 약 100 ng의 template DNA, primer 각 20 pmol, dNTPs 각 50  $\mu$ M, 10X reaction buffer 그리고 2 units Taq polymerase를 혼합하여 최종 volume이 50  $\mu$ l가 되도록 하였고 이 용액을 잘 혼합하여 동량의 mineral oil을 넣고 Thermal cycler(Perkin Elmer Co.)에서 반응시켰다. PCR은 먼저 94°C에서 5분간 denaturation를 실시하고, 94°C 1분, 60°C 1분, 72°C 1.5분씩 30 cycles을 수행하였고 그 후 72°C에서 5분간 extension을 실시한 후 종료하였다.

그리고 MSHR 유전자의 증폭은 사용된 primer를 제외하고는 D-loop region의 증폭에서와 같은 반응액 조성 조건으로 증폭시켰고, 반응시간은 먼저 94°C에서 5분간 denaturation를 실시하고 94°C에서 45초, 58°C에서 45초, 72°C에서 1분씩 총 30 cycle 수행한 후, 72°C에서 5분 동안 extention을 실시한 후 반응을 중지하였다.

반응이 끝난 후 1.5% agarose gel에서 전기영동으로 PCR 산물을 확인하였다.

## 5. PCR 산물의 RFLP 분석

총 10 종류의 제한효소(Msp I, HaeIII, Mbo I, Rsa I, BstXI, Hinc II, AvaII, Hsp92II, BamHI, 및 Hha I)가 D-loop region의 RFLP 분석에 이용되었다. PCR product 2.5  $\mu$ l에 각 제한효소 5 ~ 10 units과 reaction buffer를 첨가하여 최종 vol.이 5  $\mu$ l 되도록 하여 12 ~ 24시간 37°C에서 배양하여 절단하였다.

그리고 MSHR 유전자의 RFLP 패턴의 분석은 Klungland 등 (1995)의 방법을 참조하여 실시되었다. 즉 E<sup>D</sup>와 E<sup>e</sup> allele을 구별할 수 있도록 Aci I 제한효소를 이용하였고, E와 e allele을 구별하기 위하여 Msp I 혹은 BsrR I 제한효소를 이용하였다. 제한효소에 의한 소화절단은 앞의 실험 조건에서 수행되었다.

증폭된 D-loop region과 MSHR 유전자를 제한효소로 절단한 후 얻어진 DNA 단편을 8.0% polyacrylamide gel에 전기영동을 하여 분리한 후 silver staining을 실시하여 RFLP를 분석하였다.



## 6. 소 mtDNA RFLP를 이용한 품종간 유전적 관계 분석

소 미토콘드리아 DNA 내에 D-loop region의 PCR-RFLP 분석 data를 이용하여 공시된 품종간의 유전적 관계를 GDA(Lewis and Zaykin, 1996) program과 RESTML(Felsenstein, 1996) program를 사용하여 Neiber-joining, UPGMA와 Maximum likelihood tree로 분석되었다.

## IV. 결과 및 고찰

### 1. 소 D-loop region의 PCR-RFLP 및 계통유전학적 관계 분석

#### 1) 소 D-loop region의 PCR-RFLP 분석

미토콘드리아 DNA의 D-loop region을 PCR한 결과가 Fig. 1에 제시되었다. 소 D-loop region의 PCR 산물을 10종의 제한효소로 처리한 결과 각 제한효소들의 특정한 염기 인지부위에 의해 밴드의 수와 크기가 서로 다른 특징적인 제한효소 절단 양상을 나타내었다(Fig. 2). 사용된 10개의 제한효소 중 Hha I는 restriction site를 갖지 않음을 보여 주었고 BamHI은 1개의 절단부위를 인식하여 2개의 단편 즉 525와 547 bp 밴드를 나타냈다. 이들의 결과는 Anderson 등(1982)에 의해 보고된 염기서열에서 추정된 결과와 같고, Susuki 등(1993)에 의해 분석된 Massi Zebu 10두 중 1두에서 보고된 BamHI 제한효소에 의한 D-loop region의 다형형은 본 실험에서는 나타나지 않았으며, 한우와 홀스타인종에서 BamHI 제한효소에서 단일형을 나타냈다는 정 등(1996)의 보고와 일치하였다.

공시된 70두의 소 mtDNA의 D-loop region 분석에 이용된 10종의 제한효소 중 Msp I, HaeIII, Mbo I, Rsa I, HincII, BstXI, AvaII 및 Hsp92II의 8종류 제한효소에서 다형형을 관찰할 수 있었다(Fig. 3-1 ~3). 분리된 DNA 밴드의 크기 변화와 발표된 염기서열(Anderson 등, 1982)을 참고하여 추정된 각 제한효소별 절단부위의 수, 분리된 단편의 크기 및 다형형을 요약한 결과는 Table 1과 같다. Msp I, HaeIII, Mbo I, HincII, BstXI 및 AvaII 제한효소에서는 각각 2개의 type이 출현하였다. Rsa I 처리시 4개의 type이

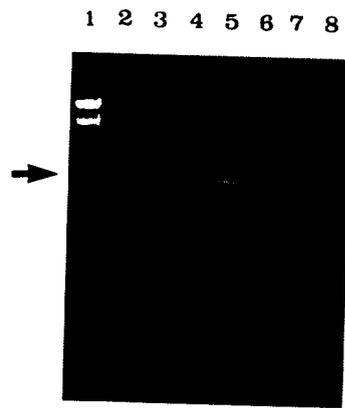


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of the PCR products of bovine D-loop region. Lanes: 1, size marker ( $\lambda$ /HindIII & EcoRI); 2, Korean native cattle; 3, Cheju native black cattle; 4, Cheju native yellow cattle; 5, Chaolais; 6, Aberdeen angus; 7, Hereford; 8, Holstein

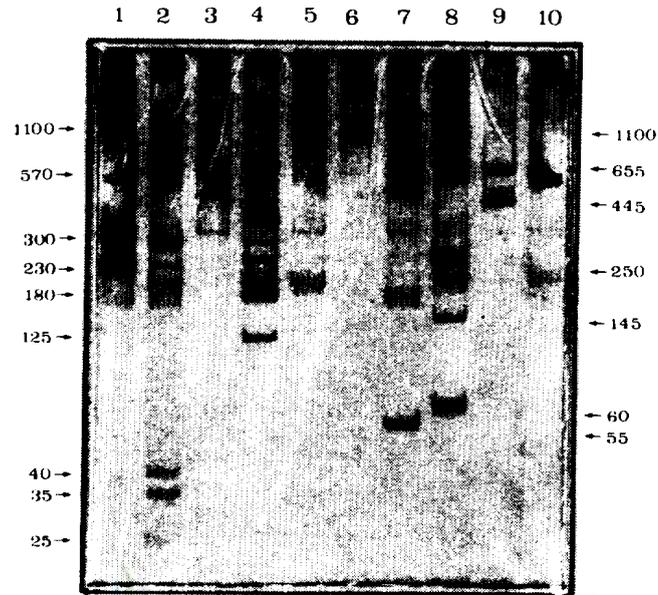


Fig. 2. Restriction cleavage patterns of bovine D-loop region of Korean native cattle digested with 10 restriction enzymes (Electrophoresis on 8% polyacrylamide gel). Lanes: 1, Msp I ; 2, Rsa I ; 3, BstX I ; 4, Hsp92II ; 5, Hha I ; 6, Hinc II ; 7, Mbo I ; 8, HaeIII ; 9, AvaII ; 10, BamH I .

Table 1. The number of cleavage sites and restriction fragment patterns of the 1072bp D-loop region restricted with 10 restriction enzymes

Enzyme	Type	No. of cleavage site	Fragment size(bp)						
Ava II	A	1	626	446					
	B	0	1,072						
BamH I	A	1	525	547					
BstX I	A	1	556	516					
	B	0	1,072						
Hae III	A	4	546	249	145	63	59	10*	
	B	3	546	308	63	59	10*		
Hha I	A	0	1,072						
Hinc II	A	1	997	75					
	B	0	1,072						
Hsp92 II	A	4	388	353	189	124	18*		
	B	5	353	239	189	149	124	18*	
	C	5	388	353	132	124	57	18*	
	D	5	310	239	189	149	43*	18*	
	E	6	388	221	189	132	124	18*	
Mbo I	A	2	547	473	52				
	B	3	547	252	230	52			
Msp I	A	2	542	300	230				
	B	3	542	252	230	48			
Rsa I	A	6	654	291	40	35	26	19*	7*
	B	5	654	291	54	40	26	7*	
	C	5	654	291	40	35	33	19*	
	D	5	654	331	35	26	19*	7*	

\* This fragment was not detected on the photographs, but its presence was confirmed by comparison with other cleavage patterns for the enzyme and mtDNA sequence(Anderson et al., 1982)

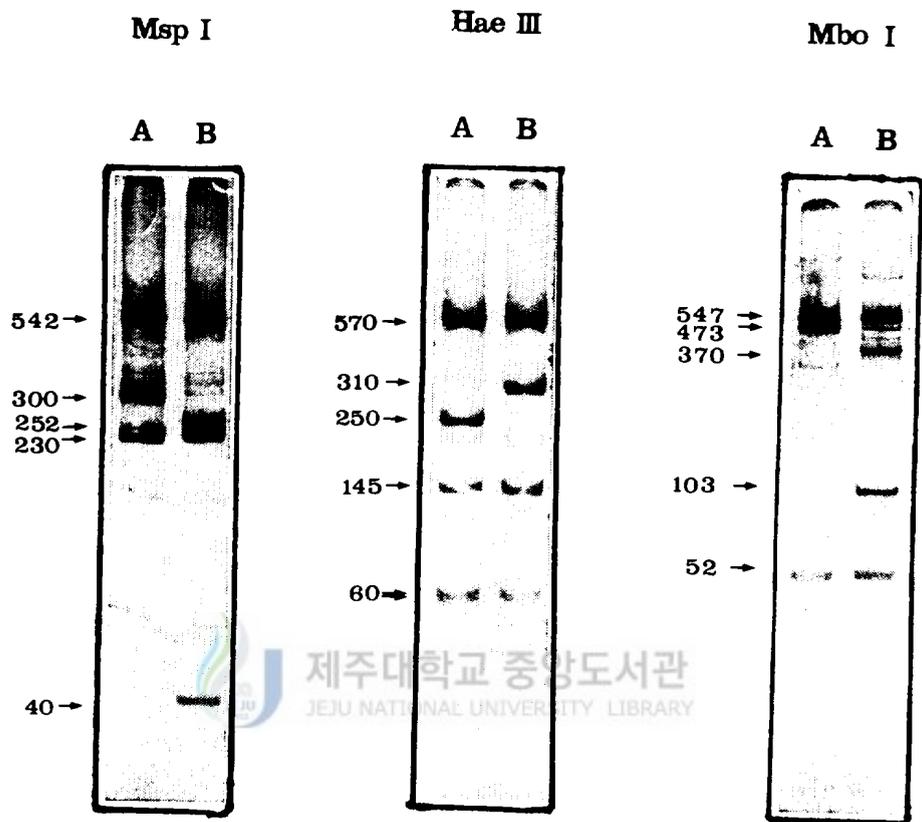


Fig. 3-1. RFLP of D-loop region restricted with Msp I, Hae III and Mbo I. Polymorphisms are denoted by the capital letters at the top of lanes and fragment sizes (bp) are shown at left

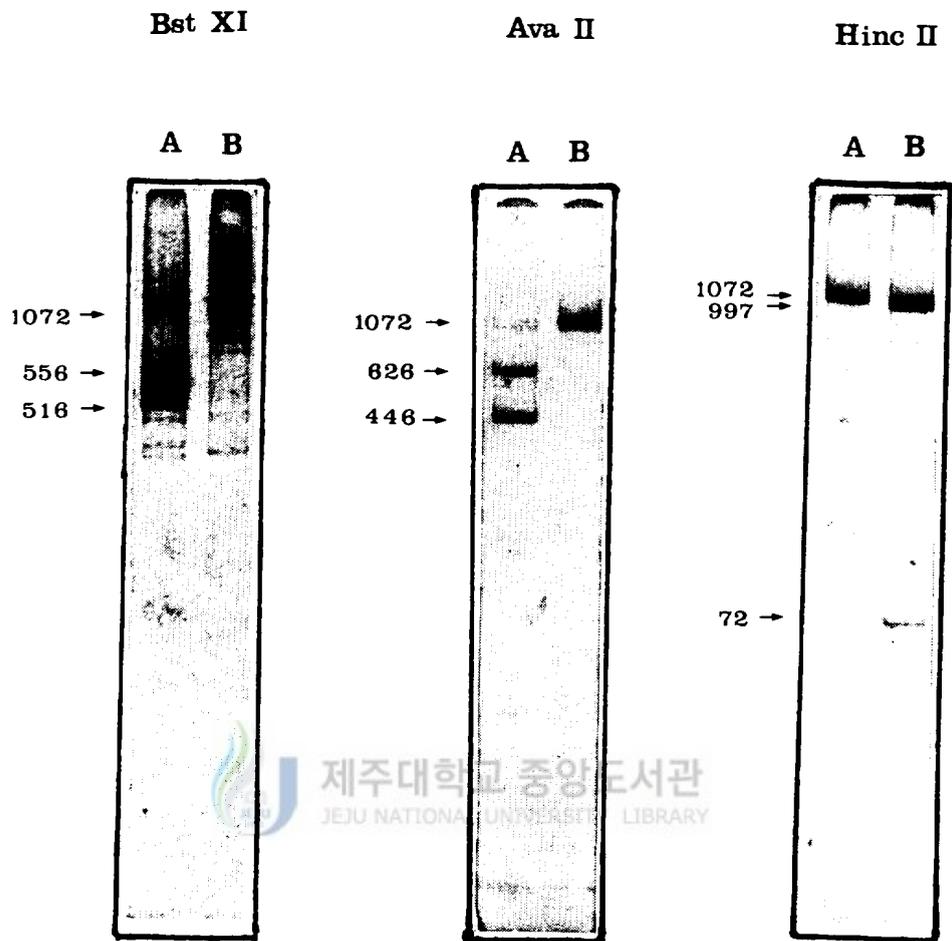


Fig. 3-2. PFLP of D-loop region restricted with BstX I, AvaII and HincII. Polymorphisms are denoted by the capital letters at the top of lanes and fragment sizes (bp) are shown at left

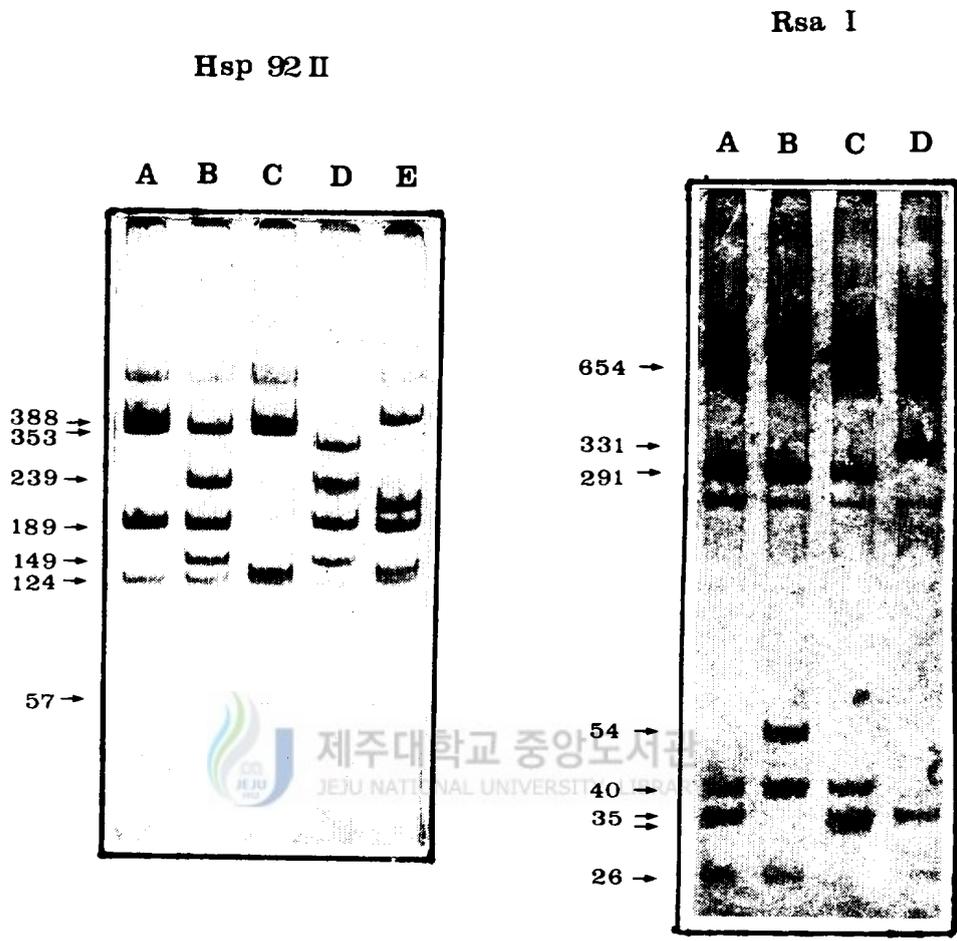


Fig. 3-3. PFLP of D-loop region restricted with Hsp92II and Rsa I. Polymorphisms are denoted by the capital letters at the top of lanes and fragment sizes (bp) are shown at left

확인되었는데 발표된 염기서열을 참고하면 Rsa I 제한효소 처리시 654, 291, 40, 35와 26bp 밴드 이외에도 사용된 primer 보다 작은 19와 7bp의 밴드가 존재하는 것으로 추정되었고, 이 밴드들은 polyacrylamide gel 전기영동 및 silver staining으로는 구별이 안 되었지만 분리된 밴드의 크기에 의해 확인되었다. 그리고 Hsp92II에서는 총 5개의 type이 출현하여 가장 많은 다형형을 보여주고 있었다.

PCR-RFLP 분석에 이용된 10개의 제한효소로 부터 총 29개 부위에서 D-loop region의 cleavage site의 존재여부가 조사되었는데, 이 29개 cleavage site 중 13개의 site가 polymorphic site로 조사되었고, 10개 polymorphic site의 위치가 확인되었다. 앞에서 언급한 Hsp92II에서 나타난 3개의 polymorphic site는 정확하게 확인할 수는 없었다. Ron 등(1993)은 홀스타인에서 D-loop region의 염기서열 분석 결과 1개의 염기 insertion과 17개의 base substitutions를 보고하였는데 그 중 2개의 polymorphic site, 즉 16,042번째와 169번째 염기의 치환 부위가 각각 Rsa I 과 Hsp92II에 의해 본 실험에서 확인되었다. 그 이외의 polymorphic site은 본 분석에 사용된 제한효소로는 확인될 수 없었다. 또한 Schutz 등(1993)이 홀스타인종에서 maternal lineage clusters 분석을 위해 이용된 D-loop region의 16개의 polymorphic site 중 169번째와 16,049번째 (Mbo I) 염기를 제외하고는 확인할 수 없었다. 본 연구에서 PCR-RFLP 분석은 D-loop region의 염기서열 분석을 통한 연구(Ron 등; 1993, Loftus 등; 1994, Bradley 등; 1996) 결과에 비해 다형형의 출현 빈도는 적었지만, 소 D-loop region의 PCR-RFLP 분석을 수행한 연구보고(Suzuki 등; 1993, 정 등; 1996; Koehler 등, 1991; Anderson 등, 1989)들에 비하면 비교적 많은 다형형을 제시하였다.

## 2) 품종별 D-loop region의 다형형 및 빈도 비교

품종별 각 제한효소에 의한 다형형과 빈도가 Table 2에 제시되었다. Msp I의 각 type은 모든 품종에서 나타났지만 품종간 출현율에는 차이가 있었으며 한우, 제주재래황우와 제주재래흑우에서 B type의 출현율은 다른 품종에 비해 비교적 높았다. 이 결과는 정 등 (1996)이 한우와 홀스타인에서 보고한 내용과 일치하였다. Rsa I 제한효소의 4개의 다형형 중에서 B type은 한우에서 3두가 출현하여 다른 품종에 비교적 높은 비율로 나타났고, 제주재래흑우와 황우 그리고 홀스타인에서 각각 1두씩 출현하였으며, C type은 한우 1두에서만 출현하였고, D type은 헤어포드에서만 1두 출현하였다. BstX I에서의 두가지 type 중 B type은 Gambia와 Kenya에서 채혈된 25두의 N'Dama 중 1두에서 출현한 것으로 보고하였다 (Susuki 등, 1993). 본 연구에 공시된 축우에서의 B type은 제주재래흑우와 헤어포드에서 3두와 1두가 각각 출현하는 것으로 나타났고 특히 제주재래흑우에서는 10두 중 3두로 Susuki 등(1993)이 보고한 N'Dama 품종에서 보다 높은 출현율을 나타내었다.

Hsp92II 제한효소의 5가지 다형형에서 A type은 모든 품종에서 출현하였으나, B type은 샤로레, 앵거스와 홀스타인에서만 비교적 높은 비율로 출현하였으며, C type은 제주재래흑우에서만 1두 출현하였고, D type은 헤어포드와 홀스타인에서 각각 3두 및 1두씩 나타났고, E type은 헤어포드에서만 1두가 출현하였다. Mbo I, HaeIII 및 HincII 제한효소에 의한 각각의 2가지 다형형 중 B type은 헤어포드와 홀스타인에서만 출현하였다. Suzuki 등(1993)은 AvaII 제한효소에 의한 B type의 다형형은 N'Dama와 Zebu cattle에서는 전혀 출현하지 않고 Holstein에서만 1두가 출현한 것으로 나타나 본 연구에 공시된 Holstein에서와 비슷한 출현율을 보였으나, 한우에서 3두, 제주재래흑우에서 1두 그리고 황우에서 1두가 각

Table 2. Polymorphic types and their frequencies in the D-loop region of 7 cattle breeds

Enzyme	Type	Korean cattle		CNBC <sup>1</sup>		CNYC <sup>2</sup>		Charolais		Angus		Hereford		Holstein		Total	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Msp I	A	5	50	6	60	5	50	8	80	7	70	9	90	8	80	48	68.6
	B	5	50	4	40	5	50	2	20	3	30	1	10	2	20	22	31.4
Rsa I	A	6	60	9	90	8	80	10	100	10	100	9	90	9	90	61	87.1
	B	3	30	1	10	1	10	-	-	-	-	-	-	1	10	6	8.6
	C	1	10	-	-	1	10	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2.9
	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	10	-	-	1	1.4
Bst XI	A	10	100	7	70	10	100	10	100	10	100	9	90	10	100	66	94.3
	B	-	-	3	30	-	-	-	-	-	-	1	10	-	-	4	5.7
Hsp 92II	A	10	100	9	90	10	100	7	70	8	80	6	60	6	60	57	81.4
	B	-	-	-	-	-	-	3	30	2	20	-	-	3	30	8	11.4
	C	-	-	1	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1.4
	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	30	1	10	4	5.7
	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	10	-	-	1	1.4
Mbo I	A	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	7	70	9	90	66	94.3
	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	30	1	10	4	5.7	
Hae III	A	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	9	90	9	90	68	97.1
	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	10	1	10	2	2.9
Ava II	A	7	70	9	90	9	90	10	100	10	100	10	100	9	90	64	91.4
	B	3	30	1	10	1	10	-	-	-	-	-	-	1	10	6	8.6
Hinc II	A	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	7	70	9	90	66	94.3
	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	30	1	10	4	5.7

\* <sup>1</sup> : Cheju native black cattle.

<sup>2</sup> : Cheju native yellow cattle.

각 출현하여 N'Dama 및 Zebu cattle과는 다른 양상을 보였다. 그리고 Masai Zebu 1두에서 출현된 BamHI 제한효소에 의한 다형형은 출현하지 않았다. 이상과 같이 본 연구에서 품종을 확실히 구별할 수 있는 다형형은 나타나지 않았지만, 일부 품종에서만 출현하는 다형형과 각 다형형에 대한 출현율에 품종간 차이가 있음을 확인할 수 있었다.

### 3) 소 품종간 유전관계 분석

제한효소별 다형형의 조합에 의하여 공시된 70두의 개체들이 총 17개의 restriction type으로 분류되었다(Table 3). 1번과 2번 type의 출현율은 각각 0.457과 0.157로서 공시된 개체의 43두가 이에 해당되었으며, 나머지 15개의 type은 1 ~ 5두의 빈도를 나타내었다.

품종별 restriction type 및 빈도는 Table 4에 요약되었다. 1번 type은 모든 품종에서 나타났고, 2번 type은 한우, 제주재래흑우, 제주재래황우에서 타 품종에 비해 높은 비율로 나타났다. 그리고 3, 4, 5번 및 16번 type은 제주재래흑우에서만 출현하였고, 특히 3번 type의 비율이 높았다. 한우와 제주재래황우에서는 제주재래흑우에서 나타나지 않은 6, 7번 type이 출현하였고, 17번 type은 한우에서만 나타났다. 그리고 홀스타인, 헤어포드, 샤로레와 앵거스 등에서도 품종별 특이적인 type이 나타났다. 이상과 같이 다형성 type의 분류에서 각 품종별 특이적인 type이 나타났으며, 두 품종 이상에서 출현되는 type 또한 품종별 빈도 등에서 차이가 있음을 알 수 있었다. 특히 제주재래흑우는 한우와 제주재래황우와는 다른 다형성 type을 나타내고 있다.

제한효소별 restriction type에 의한 품종간 genetic distance matrix를 GDA program를 이용하여 분석한 결과는 Table 5에 나

Table 3. Polymorphic types and their frequencies in the D-loop region restricted with 8 enzymes

Type	Enzyme								No. obs	Frequency
	Msp I	Rsa I	Bst XI	Hsp 92II	Mbo I	Hae III	Ava II	Hine II		
1	A	A	A	A	A	A	A	A	32	0.457
2	B	A	A	A	A	A	A	A	11	0.157
3	A	A	B	A	A	A	A	A	3	0.043
4	A	B	A	A	A	A	A	A	1	0.014
5	A	A	A	C	A	A	A	A	1	0.014
6	A	C	A	A	A	A	A	A	2	0.029
7	B	B	A	A	A	A	B	A	3	0.043
8	B	A	A	B	A	A	A	A	5	0.071
9	A	A	A	B	A	A	A	A	1	0.014
10	B	D	B	A	A	A	A	A	1	0.014
11	A	A	A	D	B	A	A	B	4	0.057
12	A	A	A	F	A	A	A	A	1	0.014
13	A	A	A	A	A	B	A	A	1	0.014
14	B	A	A	B	A	B	A	A	1	0.014
15	A	B	A	B	A	A	A	A	1	0.014
16	B	A	A	A	A	A	A	A	1	0.014
17	A	B	A	A	A	A	A	A	1	0.014
Total									70	1.000

Table 4. Polymorphic types and their frequencies in the D-loop region of various cattle breeds

Type	Korean cattle		CNBC <sup>1</sup>		CNYC <sup>2</sup>		Charolais		Angus		Hereford		Holstein		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1	3	30	1	10	4	40	7	70	7	70	4	40	6	60	32	45.7
2	3	30	3	30	4	40	-	-	1	10	-	-	-	-	11	15.7
3	-	-	3	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	4.3
4	-	-	1	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1.4
5	-	-	1	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1.4
6	1	10	-	-	1	10	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2.9
7	2	20	-	-	1	10	-	-	-	-	-	-	-	-	3	4.3
8	-	-	-	-	-	-	2	20	2	20	-	-	1	10	5	7.1
9	-	-	-	-	-	-	1	10	-	-	-	-	-	-	1	1.4
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	10	-	-	1	1.4
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	30	1	10	4	5.7
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	10	-	-	1	1.4
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	10	-	-	1	1.4
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	10	1	1.4
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	10	1	1.4
16	-	-	1	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1.4
17	1	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1.4

\* <sup>1</sup> : Cheju native black cattle.

\* <sup>2</sup> : Cheju native yellow cattle.

Table 5. Genetic distance matrix between breeds

Type	CNBC <sup>1</sup>	CNYC <sup>2</sup>	Korean cattle	Charolais	Angus	Hereford	Holstein
CNBC <sup>1</sup>	0.000000	0.993972	0.984181	0.982480	0.990394	0.958247	0.979062
CNYC <sup>2</sup>		0.000000	0.997420	0.980988	0.992010	0.949806	0.979133
Korean cattle			0.000000	0.967783	0.976827	0.937336	0.973048
Charolais				0.000000	1.002055	0.974621	1.002584
Angus					0.000000	0.972261	0.999123
Hereford						0.000000	0.989153
Holstein							0.000000

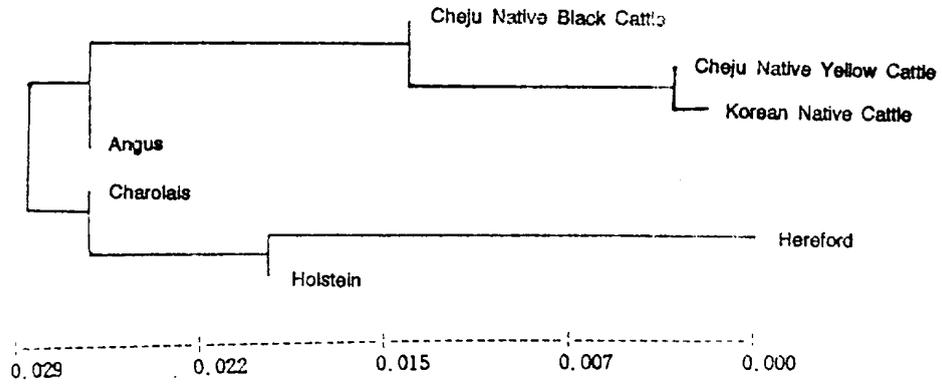
\* <sup>1</sup> : Cheju native black cattle.

<sup>2</sup> : Cheju native yellow cattle.

타나 있다.

품종별 N-J tree와 UPGMA tree 및 RESTML program의 Maximum Likelihood Methods을 이용하여 polymorphic site에 의해 작성된 품종별 phylogenetic tree는 Fig. 4-1과 Fig. 4-2에 제시되었다. 구성된 계통도에서와 같이 여러 가지 품종들 가운데 한우와 제주재래황우가 가장 가까운 유연관계를 나타냈다. Cho 등 (1994)은 PCR-RAPD 분석에서 한우와 홀스타인간 유연관계가 가까운 것으로 보고하였으나, 이 실험에서 한우는 헤어포드와 홀스타인과 가장 유연관계가 적음을 나타냈다. 그리고 제주재래흑우는 다형성 type 분류에서와 마찬가지로 한우와 제주재래황우와는 다소 차이가 나타났다. 이 결과 제주재래흑우는 한우 및 제주재래황우와는 다른 유전적 차이를 지니고 있을 가능성을 암시하였고, 南 (1968)이 고문헌 조사에 의해 제주재래흑우가 고려 충열왕때 다른 가축과 함께 몽고에 의해 유입되었을 것이라는 추정과 더불어 이에 대한 확증을 위해서는 몽고, 중국 및 일본 재래소 등 동아시아에서 사육되는 품종들을 추가 공시하여 더 자세한 연구가 필요할 것으로 사료된다. 그리고 mtDNA에 대한 PCR-RFLP는 많은 두수의 개체를 빠른 시간에 수행할 수 있어 계통유전학적 연구에 있어서 어느 정도 유용한 방법으로 사료되나 polymorphism의 탐색에는 한계가 있어 염기서열 분석 등에 의한 연구가 반드시 필요하리라 생각된다.

A



B

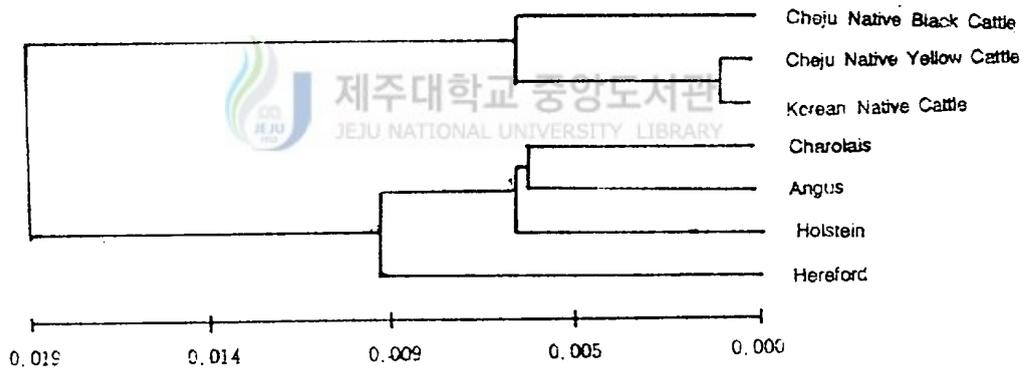


Fig. 4-1. Phylogenetic tree constructed from 17 different polymorphic types. A; N-J method, B; UPGMA method.

C

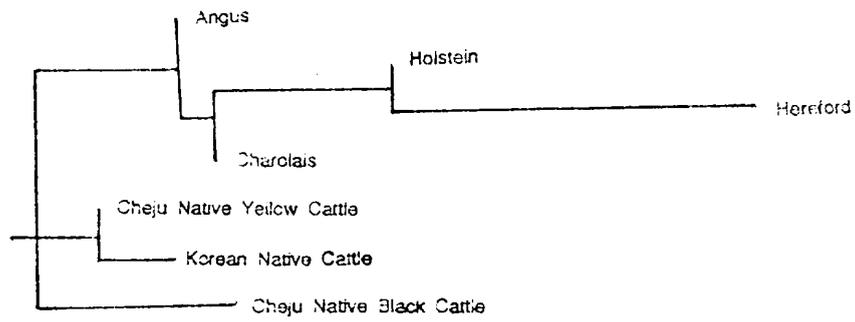


Fig. 4-2. The phylogenetic tree constructed from polymorphic types(Maximum Likelihood Method)

## 2. 소 MSH receptor 유전자 PCR-RFLP 분석

Fig. 5는 primer에 의해 MSHR 유전자를 PCR 증폭한 결과를 보여준다. Klungland 등(1995)이 보고한 세가지의 allele를 판별하기 위하여 Msp I (혹은 BsrF I)과 Aci I 제한효소를 처리하였는데, Msp I 제한효소 처리시 밴드 패턴은 Fig. 6과 같으며 이 제한효소에 의해  $e/e$ ,  $E^+/e$  그리고  $E^+/E^+$  유전자형이 판별될 수 있었다. Klungland 등(1995)과 Joerg 등(1996)은 MSH receptor 유전자의 frameshift을 야기시키는 단일 염기 deletion에 의해 Extension (E) locus에  $e$  allele이 나타남을 보고하였다. Fig. 7은 Aci I 처리시  $E^+/E^+$ ,  $E^D/E^+$  그리고  $E^D/E^D$  유전자형이 있음을 보여주는데, Klungland 등(1995)은 MSH receptor 유전자의 99번째 아미노산의 서열을 바꾸는 missense mutation에 의한 E locus에서의  $E^D$  allele를 보고하였다. 공시된 모든 개체들은 이 두가지 제한효소가 처리되어 분석되었고,  $E^D/E^D$ ,  $E^D/E^+$ ,  $E^D/e$ ,  $E^+/E^+$ ,  $E^+/e$  및  $e/e$ 의 총 6가지의 가능한 유전자 조합으로 분류되었다. 품종별 MSH receptor 유전자형 및 빈도가 Table 6에 제시되었는데 한우와 제주재래황우에서는  $E^+/e$  및  $e/e$  유전자형만이 나타났고, 제주재래흑우에서는  $E^+/E^+$  및  $E^+/e$  유전자형이 각각 9두와 6두씩 출현하였으며, 홀스타인에서는 모든 개체에서  $E^D$  allele를 가지고 있는 것으로 나타났다.

공시된 품종간의 모색별 유전자형 빈도는 상당한 차이를 나타내고 있어 이 MSH receptor 유전자에서의 mutation은 서로 다른 모색 발현과 밀접한 관계에 있을 수 있음을 제시한다. 또한 이 모색 유전자에 의한 품종 구별 가능성도 시사해 준다. 그러나 한우, 제주재래황우 그리고 홀스타인에서 모두  $E^+$  allele를 지니고 있어 실험에서 출현되지 않는  $E^+/E^+$  유전자형이 공시측 확대시 이들

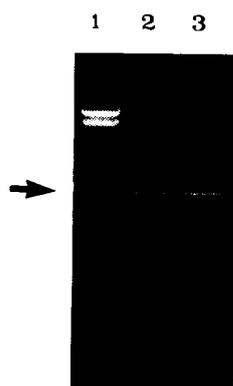


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of the PCR products of the bovine MSH receptor gene. Lanes: 1, size marker; 2, 3, PCR products.

e/e E<sup>-</sup>/e E<sup>+</sup>/E<sup>-</sup>



Fig. 6. RFLP of the bovine extension locus alleles E<sup>-</sup> and e.  
PCR-amplified DNA digested with Msp I (or BsrF I).

$E^+/E^+$   $E^D/E^D$   $E^D/E^+$

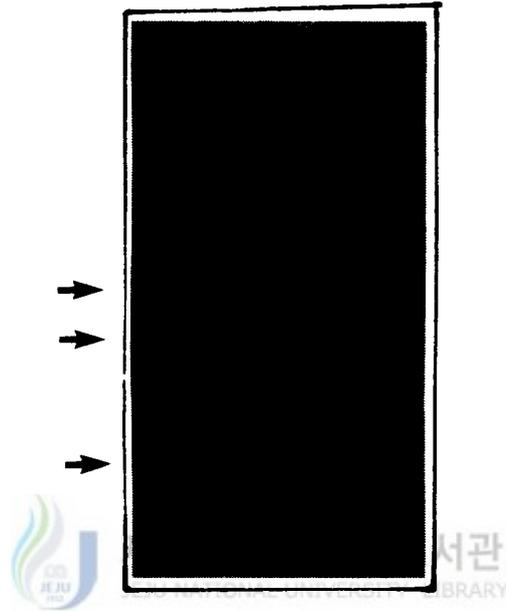


Fig. 7. RFLP of the bovine extension locus alleles  $E^D$  and  $E^+$ .  
PCR-amplified DNA digested with Aci I (CCGG)

Table 6. Genotypes frequencies of MSH receptor gene in Korean native cattle, Cheju native cattle and Holstein

Breed	color	$E^u/E^u$	$E^u/E'$	$E^u/e$	$E'/E'$	$E'/e$	$e/e$	$\Sigma$
Korean native cattle	yellow	-	-	-	-	2	9	11
Cheju native cattle	black	-	-	-	9	6	-	15
	yellow	-	-	-	-	2	5	7
Holstein	black	1	8	1	-	-	-	10



품종에서도 출현될 가능성도 배제할 수 없다. 따라서  $E^{-/-}$ 인 개체에서 모색을 결정하는 후보 유전자들에 대한 자세한 연구가 필요하며, 또한 이 MSH receptor 유전자에서의 또 다른 mutation이 존재하는지에 대한 연구가 필요할 것으로 판단된다. 그리고 소에 있어서 흑색을 나타내는  $E^D$  allele이 제주재래흑우에서 전혀 나타나지 않아 제주재래흑우의 흑모색은 홀스타인이나 Klunland 등(1995)에 의해 보고된 Nowegian cattle과 Icelandic cattle의 흑색 계통과는 다른 allele 혹은 다른 모색 관련 유전자와의 상호작용에 의해 지배되는 것으로 추정된다. 현재 본 연구의 후속으로 MSH receptor가 유전적 표지인자로서 집단유전학, 품종 구별 및 모색에 있어서 여러 가지 변이를 밝힐 수 있는지에 대한 연구가 진행 중에 있다.



## V. 적 요

한우와 제주재래한우의 유전적 특성을 분석하고 타품종과의 관계를 연구하기 위하여 두가지 실험을 실시하였다. 한우, 제주재래흑우, 제주재래황우, 앵거스, 샤로레, 헤어포드 및 홀스타인을 공시하여 이들 품종간의 모계 계통유전학적 관계를 분석하기 위하여 7품종 70두의 혈액으로 부터 얻은 mtDNA의 D-loop region을 PCR 증폭하였고, 10개의 제한효소를 가지고 총 29 restriction site에서 절단 여부가 조사되었다. 이용된 10개의 제한효소 중 8개의 제한효소(Msp I, Rsa I, BstX I, Hsp92II, Mbo I, HaeIII, AvaII와 Hinc II)에서 다형형을 나타냈고, 2개의 제한효소(Hha I 과 BamHI)에서는 다형형이 관찰되지 않았다. D-loop region에서 13개의 polymorphic site가 확인되었고 관찰된 이들 restriction type 및 polymorphic site에 의해 공시 품종간 계통유전학적 계통도를 구성한 결과 한우와 제주재래황우간의 유전적 관계가 가장 가까운 것으로 나타났으며, 제주재래흑우는 한우와는 다소 차이가 있었다.

한우, 제주재래흑우 및 제주재래황우에서 소 모색 결정에 대한 MSH receptor 유전자형과 출현 빈도를 조사하기 위하여 이 유전자에 대한 PCR-RFLP 분석을 실시하였다. Msp I (혹은 BsrF I)과 Aci I 제한효소를 처리하여 얻은 결과 공시 품종간의 MSH receptor 유전자형( $E^D/E^D$ ,  $E^D/E^+$ ,  $E^D/e$ ,  $E^+/E^+$ ,  $E^+/e$ ,  $e/e$ )의 빈도에 상당한 차이가 있었다. 또한 제주재래흑우에서 dominant allele인  $E^D$ 는 관찰되지 않았다. 이 결과 제주재래흑우의 흑모색은 홀스타인 등 타 품종에서 보고된 흑모색과는 유전적으로 다른 형태를 보이고 있음이 확인되었다.

## VI. 참고문헌

- Amano, T., Miyakoshi, Y., Takada, T. & Suzuki, H., 1994. Genetic variants of ribosomal DNA and mitochondrial DNA between swamp and river buffaloes. *Animal Genetics* 25:29-36
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R. & Young, I.G., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457-465
- Anderson, S., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Eperon, I.C., Sanger, F. & Young, I.G., 1982. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* 156:683-717
- Aquadro, C.F., & Greenberg, B.D., 1982. Human mitochondrial DNA variation and evolution: Analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics* 103:287-312
- Ballinger, S.W., Schurr, T.G., Torroni, A., Gan, Y.Y., Hodge, J.A., Hassan, K., Chen, K.H. & Wallace, D.C., 1992. Southeast Asian Mitochondrial DNA analysis reveals genetic continuity of ancient Mongoloid migrations. *Genetics* 130:139-152

---

Bradley, D.G., MacHugh, D.E., Cunningham, P. & Loftus, R.T., 1996. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5131-5135

Brown, W.M., George, M. Jr. & Willson, A.C., 1979. Rapid evolution of mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. USA* 76:1967-1971

Brown, W.M., 1980. Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proc. Natl. Acad. USA* 77:3605-3609

Brown, D.R., Koehler, C.M., Lindberg, G.I., Freeman, A.E., Mayfield, J.E., Myers, A.M., Cshutz, M.M. & Beitz, D.C., 1989. Molecular analysis of cytoplasmic genetic variation in Holstein cows. *J. Anim. Sci* 67:1926-1932

Budd, P.S. & Jackson, I.J., 1995. Structure of the mouse tyrosinase-related protein-2/Dopachrome tautomerase(Tyrp2/Dct) gene and sequence of two novel slaty alleles. *Genetics* 29:35-43

Cann, R.L., Brown, W.M. & Wilson, A.C., 1984. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA. *Genetics* 106:479-499

Cann, R.L., Stoneking, M. & Wilson, A.C., 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325:31-36

---

Cho, B.W. & Han, J.Y., 1994. Development of RAPD marker specific for Korean cattle (Hanwoo). Korean J. Anim. Sci. 36:263-270

Chung, H.Y. & Chung, E.R., 1995. Polymorphism of mitochondrial DNA based on restriction endonuclease cleavage patterns in Holstein and Korean native cattle. Korean J. Dairy Sci. 17:102-112

Felsenstein, J., 1996. RESTML:Restriction site maximum likelihood method. ver. 3.572c

Holt, I.J., Harding, A.E., Retty, R.K.H. & Morgan-Hughes, J.A., 1990. A New mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. Am. J. Hum. Genet. 46:428-433

Hutchison III, C.A., Newbold, J.E., Potter, S.S. & Edgell, M.H., 1974. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. Nature 251:536-538

Isida, N., Hasegawa, T., Takeda, K., Sakagami, M, Onishi, A., Inumaru, S., Komatsu, M. & Mukoyama, H., 1994. Polymorphic sequence in the D-loop region of equine mitochondrial DNA. Animal Genetics 25:215-221

Jackson, I.J., 1993. Colour-coded switches. Nature 362:587-589

Jackson, I.J., 1994. Molecular and developmental genetics of mouse coat color. *Annu. Rev. Genet.* 28:189-217

Jahnsson, M., Marklund, L., Sandberg, K. & Andersson, L., 1994. Cosegregation between the chestnut coat colour in horses and polymorphisms at the melanocyte stimulating hormone (MSH) receptor locus. *Animal Genetics* 25(suppl.):35

Joerg, H., Fries, H.R., Meijerink, E. & Stranzinger, G.F., 1996. Red coat color in Holstein cattle is associated with a deletion in the MSHR gene. *Mammalian Genome* 7:317-318

Kikkawa, Y., Amano, T. & 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. Genetics* 33:51-60

Klungland, H., Vage, D.I., Gomez-Raya, L., Adalsteinsson, S. & Lien, S., 1995. The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mammalian Genome* 6:636-639

Kriegesmann, B., Jansen, S., Bishop, M. & Brenig, B., 1995. The equine MSH-R Taq I RFLP is not informative for hair colour in Arabian horses. *Animal Genetics* 27:64

---

Laipis, P.J., Wilcox, C.J. & Hauswirth, W.W., 1982. Nucleotide sequence variation in mitochondrial deoxyribonucleic acid from bovine liver. *J. Dairy Sci.* 65:1655-1662

Lewis, P.O. & Zaykin, D., 1996. GDA:Genetic Data Analysis. ver 1.0

Loftus, R.T., MacHugh, D.E., Ngere, L.O., Balain, D.S., Badi, A.M., Bradley, D.G. & Cunningham, E.P., 1994a. Mitochondrial genetic variation in European, African and Indian cattle populations. *Animal Genetics* 25:265-271

Loftus, R.T., MacHugh, D.E., Bradley, D.G., Sharp, P.M. & Cunningham, P. 1994b. Evidence for two independent domestications of cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2757-2761

Lu, D., Willard, D., Patel, I.R., Kadwell, S., Overton, L, Kost, T., Luther, M., Chen, W., Woychik, R.P., Wilkison, W.O. & Cone, R.D., 1994. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating hormone receptor. *Nature* 371:799-802

Marklund, L., Moller, M.J., Sandberg, K. & Andersson, L., 1996. A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1R) is associated with the chestnut coat color in horses. *Mammalian Genome* 7:895-899

Miller S.A., Dykes D.D. & Polesky H.F., 1988. Simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16:1215

Robbins, L.S., Nadeau, J.H., Johnson, K.R., Kelly, M.A., Roselli-Rehfuss, L., Baack, E., Mountjoy, K.G. & Cone, R.D., 1993. Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 72:827-834

Ron, M., Yoffe, O. & Weller, J.I., 1993. Sequence variation in D-loop mtDNA of cow lineages selected for high and low maternal effects on milk production. *Animal Genetics* 24:183-186

Schutz, M.M., Freeman, A.E., Lindberg, G.L. & Beitz, D.C., 1993. Effects of maternal lineages grouped by mitochondrial genotypes on milk yield and composition. *J. Dairy Sci.* 76:621-629

Suzuki, R., Kemp, S.J. & Teale, A.J., 1993. Polymerase chain reaction analysis of mitochondrial DNA polymorphism in N'Dama and Zebu cattle. *Animal Genetics*. 24:339-343

Tanaka, K., Yamagata, T., Masangkay, J.S., Faruque, M.O., Vu-Binh, D., Salundik, Mansjoer, S.S., Kawamoto, Y. & Namikawa, T., 1995. Nucleotide diversity of mitochondrial DNAs between the swamp and the river types of domestic water buffaloes, *Bubalus bubalis*, Based on restriction endonuclease

cleavage patterns. *Biochem. Genetics* 33:137-148

Torrioni, A., Lott, M.T., Cabell, M.F., Chen, Y., Lavergne, L. & Wallace, D.C., 1994. mtDNA and the origin of Caucasians: Identification of ancient Caucasian-specific haplogroups, one of which is prone to a recurrent somatic duplication in the D-loop region. *Am. J. Hum. Genet.* 55:760-776

Valverde, P., Healy, E., Jackson, I., Rees, J.L. & Thody, A.J., 1995. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nature Genetics* 11:328-330

Werth, L.A., Hawkins, G.A., Eggen, A., Petit, E., Elduque, C., Kreigesmann, B. & Bishop, M.D., 1996. Rapid Communication: Melanocyte stimulating hormone receptor (MC1R) maps to bovine chromosome 18. *J. Anim. Sci.* 74:262

Watanabe, T., Masangkay, J.S., Wakana, S., Saitou, N. & Tomita, T., 1989. Mitochondrial DNA polymorphism in native Philippine cattle based on restriction endonuclease cleavage patterns. *Biochem. Genetics* 27:431-438

Wills, C., 1995. When did Eve live? An evolution detective story. *Evolution* 49:593-607

김환경. 1963. 제주지방우의 모색분포에 관한 연구. *동아논총* 제 1

집 pp. 33-45

남도영. 1969. 조선시대 제주도 목장-한국목축업 연구의 일단-. 한국사연구 4:77-131

박영일, 한성욱. 1971. 제주한우의 모색빈도에 관한 연구. 한축지, 13:352-355

陸鍾隆, 金煥卿, 朴恒均, 尹熙攝, 설동섭, 정창국. 1976. 한우. 향문사. pp. 11

이기만. 1970. 한우의 형질과 그 상관에 관한 연구. 한축지 12:141-142

정의룡, 박정준, 한상기. 1996. PCR 기법을 이용한 소 mt DNA의 RFLP 분석에 관한 연구. 한축지, 38:307-320

韓成郁. 1996. 원색 가축의 품종. 선진문화사. pp. 53-55

## 감사의 글

학문의 길로 이끌어 주시고 이 논문이 완성되기까지 격려와 사랑으로 지도해주신 양영훈 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

본 논문을 다듬어 주시고 많은 가르침을 주신 김규일 교수님, 이현종 교수님과 축산학과 모든 교수님들께도 진심으로 고마움을 표합니다. 또한 본 연구가 잘 마무리될 수 있도록 많은 격려를 해주신 송창훈 장장님, 고서봉 과장님을 비롯한 제주농업시험장 모든 분들과 축산기술연구소 정선부 소장님께 고마운 마음을 전합니다.

어려울 때마다 용기를 잃지 않도록 사랑으로 감싸준 부모님, 장인, 장모님께 깊은 감사를 드리며, 여러 사랑하는 친구들에게 그동안 우정에 소홀했던 미안함과 아쉬움을 이 논문으로 대신하고자 합니다.



사랑하는 아내와 민환에게 이 모든 결실을 드립니다.