



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

博士學位論文

한우 모색 특성 및 무색소증에
대한 분자유전학적 연구

The background features a large, faint watermark of the Jeju National University logo. The logo is circular, containing a stylized flame or leaf design in blue, green, and purple. The text 'JEJU NATIONAL UNIVERSITY 1952' is written around the top half of the circle, and '제주대학교' is written around the bottom half. In the center of the logo, there is a book icon and the word 'JEJU'.

濟州大學校 大學院

動物資源科學科

李 晟 守

2010年 7月

한우 모색 특성 및 무색소증에 대한 분자유전학적 연구

指導教授 梁 榮 勳

李 晟 守

이 論文을 農學 博士學位 論文으로 提出함

2010年 7月

李晟守의 農學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____

委 員 _____

委 員 _____

委 員 _____

委 員 _____

濟州大學校 大學院

2010年 7月

Molecular Genetic Studies on Coat-color
Characteristics and Albinism in Native Korean
Cattle, Hanwoo

Sung-Soo Lee

(Supervised by professor Young-Hoon Yang)

A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirement for the degree of Doctor of
Agriculture

2010. 7.

This thesis has been examined and approved.

Department of Animal Biotechnology

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

ABSTRACT

This study was carried out to explain coat color characteristics in native Korean cattle, Hanwoo, and Jeju Black cattle (JBC). Our study also determined the genetic basis of the occurrence of albinos in Hanwoo.

Melanin contents in hairs were quantitatively assayed and compared among cattle breeds to characterize the coat color patterns in cattle. Spectrophotometric assay was used to measure total melanin levels of upper scapular hairs that were obtained from various cattle breeds. The total melanin content of JBC was significantly lower than those of Holstein and Angus ($P < 0.001$) among breeds with black coats. Total melanin content of JBC was significantly higher than that of Hanwoo, a breed with a yellowish-brown coat, and the red-coated breeds, Red Angus and Red Holstein, respectively ($P < 0.001$). In addition, among yellow/red-coated breeds, total melanin content of Hanwoo was significantly lower than that of Red Angus and Red Holstein, but higher than that of crossbred animals exhibiting a pale yellow coat produced from a cross of Hanwoo and Charolais ($P < 0.001$). The relative ratios of eumelanin to pheomelanin in black-colored Angus, JBC, Red Holstein, and Hanwoo were 0.382, 0.359, 0.112 and 0.124, respectively. These results indicated that cattle with higher total melanin and eumelanin levels developed a black coat while those with lower total melanin and eumelanin levels developed a yellow/red coat, suggesting that bovine hair and coat color patterns may be determined by their total melanin and eumelanin levels.

In order to reveal the relation of coat color pattern and gene expression, the expression levels of three genes which play a critical role in melanin synthesis in melanocytes, *Tyrosinase (TYR)*, *Tyrosinase-related protein 1*

(*TYRPI*), and *Dopachrome tautomerase* (*DCT*), were analyzed by a semi-quantitative real time reverse transcription-PCR (RT-PCR) technique. An investigation into the expression levels of these three genes was conducted based upon the genotypes of the *Melanocortin 1 receptor*(*MC1R*) gene which was preliminarily determined in the four representative coat colors - yellowish-brown from *MC1R e/e* in Hanwoo, wild type black from *E⁺/E⁺* in JBC, and dominant black and white pied regions from *E^D/E^D* in Holstein. In Holstein black skin, the expression levels of *TYR*, *TYRPI*, and *DCT* were over 4.5, 2.3, and 2.5 folds higher than those of JBC, respectively ($P < 0.001$). The expression levels of these three genes in JBC were significantly higher than those of Hanwoo ($P < 0.001$). Our results indicate that coat color phenotypes in Hanwoo, JBC and Holstein breeds are directly correlated with the *TRY*, *TYRPI*, and *DCT* in transcription levels. Moreover, these gene expression levels also coincide with the genotypic distribution of the *MC1R* gene - *e/e* in Hanwoo, *E⁺/E⁺* in JBC and *E^D/E^D* in Holstein. These results infer that the *MC1R* genotypes may determine the levels of total melanin content in the skin of Hanwoo and JBC as well as induce transcription activities of a *TYR* series and its downstream genes responsible for melanin synthesis. The entire complementary DNA (cDNA) sequences of *TYR* and *TYRPI* were determined in Hanwoo and JBC. In comparison to those previously reported in cattle breeds, no differences were found in the complete coding sequences of *TYR* cDNAs. However, a novel short transcription variant showing the deletion of several exons was detected in *TYRPI* in part of Hanwoo as well as in JBC. Based on this finding, further studies are recommended on the correlation between this transcription variant and coat color pattern in cattle.

Recently, white coat calves with white coats have been reported on Hanwoo farms in South Korea. A total of 9 white individuals were found on three Hanwoo farms in Jeollabuk-do and Chungcheongnam-do. These calves

and their yellowish-brown Hanwoo relatives were collected from each farm for pedigree analysis and genetic investigation. Based on the observation of the color of skin, hair, and eyes, the calves were identified as albinos due to oculocutaneous albinism (OCA) which differs from the Charolais-related white coat color, a specific characteristic of the Charolais breed. The calves lacked melanogenic pigments in whole pigmentary organs including eyes and skin. In addition, they displayed the autosomal recessive inheritance patterns identical to OCA in mammals. Albino hair showed the lowest level of melanin content among the cattle breeds tested including the white pied region of Holstein. The evidence for the existence of melanocytes in ear skin was provided from the results of the immunohistochemical (IHC) staining for melanocytes using melanocyte specific antigen analysis. Further results obtained from flow cytometry and immunofluorescent staining using melanocyte cell markers have given histological evidence for the existence of melanocytes in albinos. A total of 15 DNA samples of the albinos and their relatives were collected and used to screen for causative mutation for the development of albinism in *SILV* and *TYR* genes, known as critical candidate genes in mammals. DNA sequencing results showed the albino-specific mutation c.871G>A in *TYR*, but not in *SILV*. All albinos had the homozygous *TYR* c.871A/A and their dams and relatives with yellow coats had the heterozygous *TYR* c.871A/G. However, all Hanwoo individuals unrelated to the albinos had the homozygous *TYR* c.871G/G. The genotypic distribution of the mutation *TYR* c.871G>A was consistent with the bovine inheritance patterns of albinism in Hanwoo. Out of all DNA samples tested for the other population study, only one individual was heterozygous *TYR* c.871G/A. However, its breed was not identified because it was slaughtered as an unidentified crossbreed. The pedigree and genotypic analyses results for each coat color in the different cattle breeds suggested that this *TYR* c.871G>A mutation may be a diagnostic molecular marker for detection of albinos and their carriers in

Hanwoo.

In conclusion, bovine coat colors are mainly regulated by the genetic backgrounds of genotypes of the primary response gene for MSH signaling, *MC1R*, and the melanocyte intracellular melanin synthesis genes, *TYR*, *TYRP1*, and *DCT*. In addition, the Hanwoo albinos recently found in Korea were caused by a mutation of the *TYR* gene. The results of this study will provide the scientific basis of coat color genetics and a breed identification system for the Korean cattle breeds, Hanwoo and JBC. The newly established molecular methods developed in this study have also contributed to determining hair color patterns, measuring for melanin contents, detecting albinos and their carriers, and accelerating molecular breeding in the cattle industry in Korea.

Key words: cattle, coat color, melanocyte, melanin, eumelanin, pheomelanin, *MC1R*, *TYR*, *TYRP1*, *DCT*, *SILV*, albino, oculocutaneous albinism, Hanwoo, Jeju Black cattle.

목 차

ABSTRACT	i
목 차	v
LIST OF FIGURES	vii
LIST OF TABLES	ix
I. 서 론	1
II. 연구사	5
1. Melanin 색소 및 melanin 생합성 관련 유전자 연구	
2. 소 무색소증 및 관련 유전자 연구	
III. 재료 및 방법	17
1. 실험동물 및 시료	
2. Melanin 함량 측정	
3. Genomic DNA 분리와 증합효소연쇄반응	
4. Total RNA 분리와 cDNA 합성	
5. Real time RT-PCR 분석	
6. RT-PCR과 DNA sequencing	
7. 유전자형 분석	
8. 조직면역화학염색 분석	
9. 색소세포 배양 및 동정	
10. Homology model을 이용한 TYR 단백질 구조 예측 및 비교	
11. 통계분석	

IV. 결과 및 고찰	24
1. 소의 모발 melanin 색소 함량의 품종별 비교 분석	
2. 한우와 제주흑우, 홀스타인에서 <i>MC1R</i> 유전자형에 따른 melanin 생합성 유전자들의 발현 수준과 모색 출현양상의 관계	
3. 한우와 제주흑우에서 <i>TYR</i> 과 <i>TYRP1</i> 유전자 염기서열 분석	
4. 한우 알비노 원인 유전자 및 돌연변이 분석	
V. 요약	64
VI. 참고문헌	67



LIST OF FIGURES

Figure 1. The biosynthetic pathways to eumelanin and pheomelanin	7
Figure 2. Coat colors in three different Korean native cattle breeds	10
Figure 3. The structure of the <i>TYR</i> gene. A, Chromosomal structure of the human <i>TYR</i> gene	15
Figure 4. Different coat color phenotypes in Hanwoo	16
Figure 5. Total melanin levels among cattle breeds	27
Figure 6. Ratios of eumelanin/total melanin contents	28
Figure 7. Correlation of total melanin content with the ratio of eumelanin/total melanin	29
Figure 8. HPLC Chromatograms for the eumelanin	30
Figure 9. Scattergrams for the total melanin content against the parameters, L, a, and b of colorimeter in Hanwoo	31
Figure 10. Relative transcription levels of melanin synthesis genes	35
Figure 11. RT-PCR analysis of <i>TYR</i> gene	36
Figure 12. Nucleotide sequences and mutations of the complete <i>TYR</i> cDNA	37
Figure 13. RT-PCR analysis of <i>TYRP1</i> gene	41
Figure 14. Nucleotide sequences and mutations of the complete <i>TYRP1</i> cDNA	42

Figure 15. Total melanin contents for the hairs collected from yellow hairs of Hanwoo, white hairs of Holstein, and white hairs of albino Hanwoo	45
Figure 16. Immunohistochemical staining.	47
Figure 17. Melanocytes isolated from yellowish-brown Hanwoo and albino Hanwoo	48
Figure 18. Flowcytometric analysis for confirming the melanocytes	49
Figure 19. Immunofluorescent staining for melanocytes isolated from albino Hanwoo	49
Figure 20. Nucleotide substitution mutation at <i>TYR</i> c.871G>A found in albino cattle in Hanwoo	51
Figure 21. Nucleotide sequences and mutations of <i>TYR</i> cDNA from albino cattle in Hanwoo	52
Figure 22. Amino acid sequences of <i>TYR</i> in Holstein and two albinos from Braunvieh and Hanwoo	55
Figure 23. Prediction of secondary structure for TYR protein in Hanwoo (normal) and Hanwoo albino (albino)	57
Figure 24. Structural models constructed by homology modeling of the bovine TYR proteins in Holstein, Hanwoo and albino Hanwoo	58
Figure 25. Three pedigrees for albino Hanwoo families	59
Figure 26. PCR-RFLP for <i>TYR</i> c.871G>A in the Hanwoo albino family collected from the cattle farm in Sunchang, Jeollabuk-do	60

LIST OF TABLES

Table 1. Genotype distribution of <i>SILV</i> g.64A>G in cattle breeds	50
Table 2. Genotype and allele frequencies for <i>TYR</i> c.871G>A mutation in cattle	61



I. 서 론

한우(Hanwoo, Korean native cattle, *Bos taurus coreanae*)는 몇 천 년 이래로 한반도에서 운반용이나 농경용으로 사육해 오던 재래종 역우를 일컫는 말로 유럽우(*Bos taurus*)와 인도견봉우(*Bos zebu*)의 혼혈종에서 기원하여 북부 중국, 만주를 거쳐 한반도에 옮겨 온 후 다른 품종과의 특별한 교류 없이 오늘날에 이르고 있는 것으로 추정하고 있다(육 등, 1976; 한, 1996).

한우에 대한 본격적인 조사연구사업은 일제 강점기부터 시작되었으며, 농사시험장 축산부에서 전담 수행하였고, 당시 한우의 개량을 위해 체형 측정 및 종우와 비육우 품평회를 개최하기도 하였다. 또한 한우의 모색을 적갈색으로 규정할 것도 이 시점인 것으로 알려져 있다(육 등, 1976; 한, 1996). 이후 최근까지 한우 선별을 위한 척도로 이용되어온 외모심사표준은 1964년 농수산부 고시 제 865호로 처음으로 제정되었다; 고시에서는 전신이모색(전신흘합모 포함), 부분이모색(암소의 유방부위, 수소 귀끝부의 심한 백반, 그 이외의 백반과 부분 호반모 및 부분 흑갈색모, 흑만선)과 눈까풀, 눈언저리의 흑색 및 비경 흑색까지 외모심사나 등록심사에서 제외되는 실격 조건으로 다루었다(한, 1996). 그러나 최근 쇠고기 생산이력추적제의 실시에 따라 재설정된 외모심사 기준에서는 모색 실격 조건에 대한 개정 필요성으로 한우로 인증 받을 수 있는 이모색 범위는 머리카락에 있는 지름 10cm 미만의 백반과 몸체에 흰색 털이 몇 가닥씩 산재한 것, 컷속에 검은색 털이 밀집해 있거나 입 주위, 몸통 등에 있는 지름 10cm 미만의 흑반점, 비경에 검정색 반점이 있거나 비경 전체가 검정색을 띠어도 한우 인증을 허용하는 범위로 완화되는 추세이다. 또한 황갈색 바탕에 검은색 또는 흑갈색 털이 세로로 줄무늬를 띤 일명 칩소(호반우, Korean Brindle cattle, KBrC)와 몸 전체가 검은색인 제주흑우(Jeju Black cattle, JBC) 역시 한우로 인증 받을 수 있도록 그 범주가 확대되었다(한국동물자원과학회 한우연구회, 2009).

현재도 관행적으로 한우의 모색은 황갈색 혹은 적갈색으로 표현되지만, 과거의 조사연구에 따르면 적갈색, 흑갈색, 흑색, 호반모, 갈색에 흰 반점, 흑색에 흰 반

점 등 다양한 모색이 보고되고 있다(김, 1963; 이 등, 1970; 박 등, 1971; 농촌진흥청 축산연구소, 2005). 조선시대에 편찬된 우의방(신동원, 2004)의 고문헌 자료에서 이와 유사한 모색에 대한 구분이 있었고, 현재까지 남아 있는 재래 소들 역시 모색을 중심으로 황갈색의 한우, 황색바탕에 흑색 호반무늬를 나타내는 칙소, 흑갈색의 흑우 등으로 구분되고 있다.

소의 모색은 세계적으로도 품종의 특징을 구분하는 매우 중요한 형질로 간주되고 있으며, 개체 및 품종을 식별하기 위한 기준으로 이용되기도 하는 대표적인 질적형질이다. 전 세계적으로 광범위하게 분포, 사육되고 있는 다양한 소 품종들은 대부분 품종형성과정에서 고정된 특유의 모색을 지니고 있다. 그렇지만 소의 모색 분류체계를 살펴보면 흑색(black), 갈색(brown), 적색(red), 황색(yellow), 회색(grey), 암갈색(dark brown), 열성백반(recessive white spotting), 우성백반(dominant white spotting), 흑반점(black spotting), 호반(brindle), 담색화(dilution), 부분백화(fawn), 조모(roan), 하지유색(colored leg) 등 매우 복잡하다(이 등, 1998). 한우 역시 여러 가지 모색이 존재하고 있다. 그러나 황갈색이나 적갈색으로 표현되는 대표 모색뿐만 아니라 다양한 정도의 차가 있어 모색의 구분이 모호한 경우가 많다. 또한 현존하는 한우, 제주흑우의 집단에서 모색에 대한 구분도 객관적인 기준이 없이 단지 육안 관찰에 의해 황갈색과 흑색의 범주를 적용하고 있으며, 이를 명확히 제시할 수 있는 분석법은 개발되지 못하고 있다. 이에 모색의 고정과 유전적 원인 분석을 위해서는 감각적이고 주관적인 기록보다는 모색의 수치화 등 과학적이고 객관적인 자료를 기준으로 한 모색분류체계의 도입 및 정형화가 요구되고 있는 실정이다.

색(color)은 일반적으로 색상, 명도, 채도의 세 가지 지각적 속성을 갖는다. 그러나 흔히 사용되는 이 세 가지 용어와 색을 표현하는 다양한 일상적인 유사 용어를 사실상 정확히 이해하고 구분하여 사용하고 있지 않다(김과 오, 1997). 동물의 모색 또한 melanin 색소가 만들어 내는 색상, 명도, 채도의 표현이라 볼 수 있는데, 모색의 분류 체계에 복잡하고 다양한 유사어가 사용되고 있다. 또한, 우리나라와 외국의 모색 분류에 이용되는 일부의 용어도 차이가 있다.

최근 소를 비롯한 많은 포유동물에서 모색 발현에 관여하는 유전자들에 대한 연구가 진행되고 있으며 모색 유전 연구는 유전학뿐만 아니라 진화학, 발생생물

학 등의 연구 분야에서도 중요하게 다루어지고 있다. 포유동물에서는 약 100개 이상의 유전자들이 모색형성과정(pigmentation)에 관여하는 것으로 추정되며, 현재까지 염기서열과 기능이 밝혀진 것은 60 여 개 정도로 보고되고 있다(Jackson, 1994; Hoekstra, 2006). Holstein을 비롯한 다수의 소 품종들에서 모색관련 유전자의 기능과 유전자형 등에 대한 다양한 연구가 진행되고 있으나, 한우에서는 황색/적색 표현형 발현의 원인으로 추정되고 있는 핵심유전자인 *melanocortin 1 receptor(MC1R)*외에는 별 다른 성과가 없는 실정이다.

간혹 황색 한우간의 교배에서 Charolais 품종과 유사한 백색 송아지가 출생하는 것으로 보고되고 있으나, 이에 대한 정확한 분자유전학적 원인이 밝혀지지 않았고, 해당 소가 한우로 인증되지 않아 해당 농가에 적잖은 피해가 발생하는 사례들도 발생하고 있다. 과거 소에 대한 고문헌(신동원, 2004)에서 우리나라에 흰색의 소가 존재했음을 보여주는 근거들은 발견되지만, 이들이 현재 발견되고 있는 백색 한우와 같은 것인지는 알 수 없다. 단지 이들 백색 한우가 출생한 과정을 역추적한 결과 축주들의 주장과 인공수정 확인서에서는 한우보증종모우 인공수정용 정액을 사용한 것으로 추정되어 이에 대한 연구도 필요한 실정이다. 또한, 국내 일부 지역에 도입된 적이 있는 외국 품종 중 Charolais는 백색 한우와 비슷한 형태를 보이는 전신 백모색을 나타내어 해당 백색 한우들이 교잡우로 취급될 수 있는 가능성은 대단히 높다. 최근의 보고(Gutierrez-Gil 등, 2007)에 따르면 Charolais 품종의 백모색 발생은 mouse의 *silver-homologue (SILV)* 유전자의 돌연변이형에 의해 발생하며 유전양상에서도 중간유전(intermediate inheritance)의 양상을 나타낸다. 반면, 최근 한우 집단에서 산발적으로 발생하고 있는 백색 한우는 Charolais의 백모색의 발생과 유전양상이 달라, 그 원인 유전자 역시 상이한 것으로 추정되고 있다. 한우 집단에서 발생하고 있는 백색 소의 출현에 대한 원인유전자의 구명과 직접적인 원인이 되는 염기서열 돌연변이를 구명하는 것은 농가의 소득보존 뿐만 아니라, 한우의 모색 및 분자유전학적 특성의 재확립 등 향후 한우 산업의 안정화에 크게 기여할 수 있는 부분이다.

따라서 본 연구는 우리나라의 대표적인 재래 소인 한우와 제주흑우의 모색 특성과 유전양상, melanin 생합성에 관여하는 유전자들의 발현 양상을 분석하여, 재래 품종인 한우와 제주흑우의 분자유전학적 특성을 구명하고자 수행하였다. 또

한 한우 집단에서 출현하고 있는 무색소증의 발생 원인을 분자유전학적인 방법으로 조사하여 향후 한우 산업에 대한 모색관련 유전자의 특성에 대한 기틀을 마련하는 데 목적을 두고 있다.



II. 연구사

1. Melanin 색소 및 melanin 생합성 관련 유전자 연구

동물의 모색은 피부조직의 색소세포(melanocyte)의 분포와 색소세포에서 형성된 melanin의 함량에 따라 결정되며, 자외선(ultraviolet, UV)과 같은 DNA 손상 물질에 노출에 대한 생체방어 대사 중 하나로도 melanin 색소가 생성된다. 인간을 비롯한 대부분의 포유동물은 출생 후 그 색소세포의 수와 melanin 함량이 어느 정도 결정되며, UV 조사량, 계절 등 환경적 요인에 따라 일시적인 melanin 색소의 증감이 나타나게 된다. Melanin 색소는 아미노산인 tyrosine을 기질로 하여 만들어지며, 크게 pheomelanin과 eumelanin 두 가지로 구분된다. 알칼리에 용해되는 pheomelanin은 적색과 황색계의 색을 나타내고, eumelanin은 흑색과 갈색 두 가지 형태의 색을 나타내며 알칼리 용액에 불용성이고, 5,6-dihydroxyindole (DHI)와 5,6-dihydroxyindole-2-carboxy acid (DHICA) 단위로 구성된다(Wakamatsu와 Ito, 2002; Ito와 Wakamatsu, 2003). 포유동물의 모색은 주로 이 두 가지 색소, 즉 eumelanin과 pheomelanin의 분포에 따라 결정되어 지고, 대부분의 색소침착 조직에서 이 두 가지 색소가 혼재되어 존재한다(Jackson, 1994; Wakamatsu와 Ito, 2002).

피부색, 모색, 눈의 색깔 등의 연구에서 이 두 가지 melanin의 함량은 정량적으로 나타낼 수 있는 가장 기본적인 자료가 된다. Ito와 Jimbow(1983)은 화학적 감성(degradation)과 high-performance liquid chromatography(HPLC) 기법을 이용하여 eumelanin과 pheomelanin의 함량을 분석한 바 있는데 이 방법은 현재까지도 melanin 생합성의 관련연구에 유용하게 이용되고 있다. 그 후 mouse와 사람의 여러 조직에서 색소 함량을 정량적으로 측정할 수 있는 분석방법의 개발과 함께 연구결과들이 보고되고 있다(Borges 등, 2001; Lamoreux 등, 2001; Wakamatsu와 Ito, 2002; Ito와 Wakamatsu, 2003; Hennessy 등, 2005).

가축에서 Sponenberg 등(1988)은 말의 여러 모색에 따른 색소 함량의 차이를

보고하였고, Renieri 등(1993)은 소에서 Holstein, Limousine, Charolais, Chianina 등의 품종들에서 HPLC를 이용한 melanin 함량 분석 결과가 보고된 바 있다. 또한 최근 melanin 함량 분석에 있어 분광광도계(spectrophotometer)를 이용한 비교적 간단한 실험 기법이 개발되어, mouse, 면양, 사람의 모발과 melanin 함량의 상관관계에 대한 연구 결과들이 보고되었다(Ozeki 등, 1996; Lamoreux 등, 2001).

피부, 모발, 눈 등 색소침착 조직에서 melanin은 고도로 특화된 색소세포 내에서 생산되며, 다양한 대사 경로를 통해 여러 가지 유전자의 상호작용을 통해 조절되는 것으로 알려져 있다. 현재까지 밝혀진 바로는 마우스에서는 127 개의 모색 관련 유전 좌위에서 800 개가 넘는 표현형-연관대립인자들이 확인되었고, 이 중 59개 유전자가 클로닝되어 염기서열과 그 기능이 연구되었다(Bennett와 Lamoreux, 2003).

포유동물의 모색 발현은 발생과정 중 신경능(neural crest)에서 유래한 색소세포가 피부로 이주, melanin을 생산하고, melanosome을 형성하여 keratinocyte로 침착되는 일련의 과정을 통해 이루어진다. 이 과정에서 신경능에서의 이주는 *c-KIT oncogene (KIT)*, *c-KIT ligand (KITLG)*, *endothelin receptor type B (EDNRB)* 등의 유전자 산물들이 관여하고, 색소세포자극호르몬(melanocyte stimulating hormone, MSH)에 대한 신호수용과 세포 내로의 전달은 *melanocortin 1 receptor (MC1R)*, *agouti signaling peptide (ASIP)*에 의해 결정되며, melanin 합성 유전자의 전사는 *microphthalmia-associated transcription factor (MITF)*, *SRY-box containing gene 10 (SOX10)* 등이 관여한다. 색소세포 내에서 melanin 생합성은 *tyrosinase (TYR)*, *tyrosinase-related protein 1 (TYRP1)*, *dopachrome tautomerase (DCT)* 등 3 가지 유전자 산물에 의해 촉매된다. 합성된 melanin은 *mouse Silver homologue (SILV)*, *adaptor-related protein complex 3 (AP3)* 등의 유전자 산물에 의해 melanosome으로 축적되며, melanosome의 이동은 *myosin Va (MYO5A)*, *Ras-associated protein RAB27A (RAB27A)* 등에 의해 조절된다(Slominski 등, 2004; Sulaimon 등, 2003). Melanin 생합성에 관여하는 *TYR*, *TYRP1*, *DCT*는 색소세포 특이 효소 유전자로서 두 종류의 melanin 즉, eumelanin과 pheomelanin 모두의 합성을 담당한다.

*TYR*은 melanin 합성의 가장 핵심효소로서 tyrosine을 DOPAquinone으로 전환시키는 생합성 대사 개시단계와 DHI를 indole-5,6-quinone으로 전환하는 적어도 두 단계에 작용한다. *DCT*는 DOPAquinone을 DHICA로 전환하며, 생성물인 DHICA는 다시 *TYRP1*에 의해 eumelanin으로 전환(Figure 1)되는 것으로 알려져 있다 (del Marmol와 Beermann, 1996; Wakamatsu와 Ito, 2002; Guibert 등, 2004). 마우스를 포함한 여러 포유동물 종에서 melanin 생합성에 관여하는 이들 *TYR*, *TYRP1*, *DCT* 유전자와 그 기능에 대해 연구가 진행되었는데, 특히 소에서 Guibert 등(2004)은 이들 유전자의 cDNA 서열과 여러 품종과 모색에서 발현 수준을 측정하여 보고하였다.

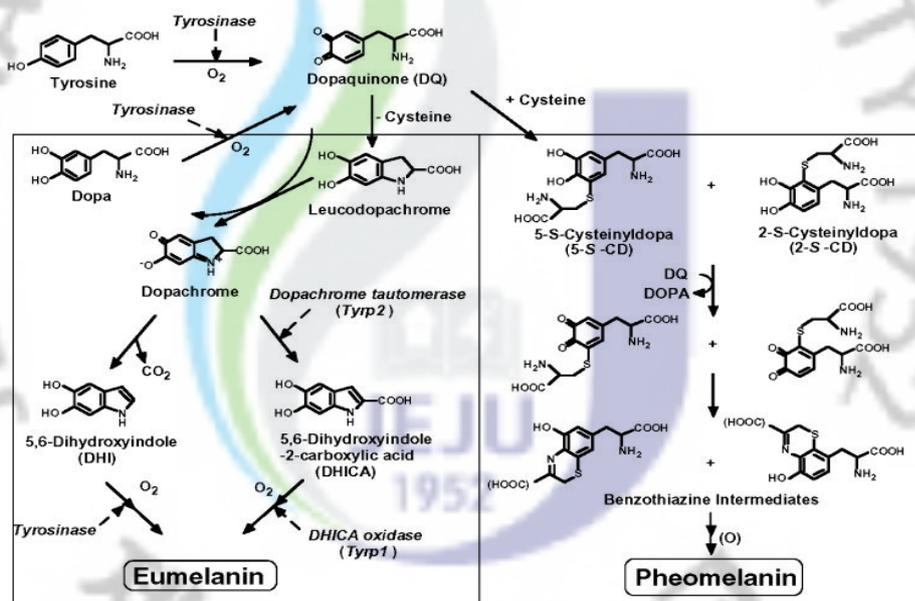


Figure 1. The biosynthetic pathways to eumelanin and pheomelanin. Note that activities of *TYR*, *TYRP1*, and *DCT* are involved in the production of eumelanin, while only tyrosinase activity (and the presence of cysteine) is necessary for the production of pheomelanin. Cited from Wakamatsu and Ito (2002).

1800년대 소의 개량과 품종 형성 시기부터 소의 모색은 많은 육종가들의 관심의 대상이었고, 품종의 동일성을 보장하는 도구로써 통일된 모색 혹은 백반의 분포 양상 등으로 품종을 육성하려는 시도가 이루어졌다. Hereford 품종은 기본 적 모색과 목과 배 등 특정 부위에 균일한 백반을 갖도록 고정된 좋은 예라 하겠다 (Olson, 1999). 소의 모색에 대한 유전학적 연구는 상당히 오랜 역사를 가지고 있는데, 1906년에 Barrington과 Pearson이 Shorthorn 품종과 그 교잡종에 대한 모색 유전양상에 대한 연구 결과를 보고한 이후, 여러 품종에서 모색 유전에 대한 체계적인 연구보고들이 있었다(Searle, 1968; Olson, 1999).

대부분의 종(species)에 있어서 모색 혹은 백반 형태에서의 변이를 효율적으로 고찰하기 위해서는 그에 상응하는 야생형(wild type)을 결정하고, 그 야생형과 비교하는 것이 효과적이다. 소의 색소침착에 대한 야생형의 선택은 다소 어려운 문제이지만, 대부분의 *Bos taurus* 품종의 야생 조상인 Aurochs(유럽원우, *Bos primigenius*)의 모색이 적절한 것으로 보고되고 있다. Aurochs는 본질적으로 적갈색(reddish brown)에서 흑갈색(brownish black)의 모색을 나타내며, 수컷이 암컷보다 더 진한 모색을 지닌다. 야생형의 동물들은 말의 유마 모색처럼 몸의 끝부분(머리, 목, 발, 후구)이 더 짙은 색을 지니는 경향이 있다(Olson, 1980; Olson, 1999). 이러한 특징은 한우에서는 보고되지 않고 있으나, 제주흑우에서도 관찰되며, 유사한 점이 많아 주목 할만 연구 대상으로 간주되고 있다. 야생형의 모색에서 가장 일반적으로 관찰되는 변이는 적색(red)과 흑색(black)이고, 그 외의 다른 모색들은 이 세 가지 기본 모색, 즉 흑색, 야생형(wild type) 그리고 적색(red)의 변형(modification)이라 할 수 있다. Limousin 품종의 밝은 적모색, 한우의 황갈색, Charolais의 희석된 색소침착 등은 좋은 예라 할 수 있다.

Olson(1999)은 소 모색에 영향을 미치는 돌연변이와 유전좌위를 체계화하였고, 야생형 모색의 변이를 기준으로 소의 모색에 관여하는 좌위를 *Extension(E)*, *Agouti(A)*, *Albino(C)*, *Charolais dilution(Dc)*, *Simmental dilution(Ds)*, *Dun(Dn)*, *Brindle(Br)*과 백반 관여 좌위로서 *Spotting(S)*, *Roan(R)*, *Belting(Bt)*, *Blaze(Bl)*, *Brocking/pigmented legs(Bc)*, *Colour-sided(Cs)* 등으로 분류하고 있다. 이 중 가장 활발히 연구가 진행된 것은 *Extension* 좌위로 소의 기본 모색을 결정하는 좌위로 *MC1R* 유전자에 암호화되어 있다. 이 좌위에서

는 대표적으로 세 가지의 대립인자(allele), 즉 우성 흑모색(dominant black)의 E^D , 야생형(wild type)의 E^+ 그리고 열성적모색(recessive red)의 e 대립인자가 알려져 있으며, 각각의 대립인자에 해당하는 염기서열의 변이들이 확인되었다 (Klungland 등, 1995; Joerg 등 1996). *Agouti* 좌위는 Girardot 등(2006)이 Normande 품종에서 *Agouti* 유전자의 5' 부위의 long interspersed nuclear element (LINE)의 삽입에 의해 모색에 영향을 미치는 새로운 A^{br} 대립인자를 확인하였다.

현재까지 우리나라 소 품종의 모색에 관한 분자유전학적 설명은 *Extension* 좌위인 aMSH의 수용체, *MC1R* 유전자의 다형성에 의해 이루어지고 있다. 한우의 대부분은 *MC1R* 유전자에서 310번째 염기서열 G가 결실된(g.310delG) 결실돌연변이(deletion mutation)에 의한 틀이동돌연변이(frameshift mutation)로 나타나는 열성동형접합자 e/e 인 상태로 황색(yellow) 또는 적색(red)을 나타낸다. 반면, 진한 흑색인 Angus, Holstein 등의 흑모색은 우성 대립인자인 E^D (*MC1R* g.296T)의 보유에 의해 결정된다. 비슷한 흑모색인 제주흑우의 경우는 E^D 가 아닌 야생형 대립인자 E^+ (*MC1R* g.296C/-, non g.310delG)에 의해 결정되는 것으로 보고되고 있다(김 등, 2000; 이 등, 2000; 정 등, 2000). 반면, *MC1R* E^+/e 인 이형접합자들은 제주흑우와 칩소 등에서 출현하고, 동시에 황색인 한우에서도 드물게 보고되고 있다(Klungland 등, 1995; 이 등 2000; 김 등, 2000; Sasazaki 등, 2005) (Figure 2). 바꾸어 말하자면 *MC1R* 유전자형만으로는 우리나라 재래 소 품종, 특히 칩소와 한우의 모색 출현 양상도 완전히 설명되지 못하는 부분이 없지 않다는 것이다. 또한 이와 같은 현상은 황색이나 갈색, 적색을 기본 모색으로 하는 다른 소 품종들, Hereford, Simmental, Swiss Brown, 갈모화우 등에서도 발견되고 있다(Klungland 등, 1995; 이 등 2000; 김 등, 2000). 따라서 이와 같은 문제를 해결하기 위해서는 *Extension* 좌위(*MC1R*) 이외에 특히 색소세포의 이주와 분화 과정, 피부조직 내 분포를 결정하는 유전자, melanin 생합성을 담당하는 효소들과 생합성 대사에 관여하는 전사인자, 이와 관련된 조절 단백질의 품종별 발현양상, 유전자 서열 내의 변이 등에 대한 심층적인 연구들이 수행되어야 할 것이다.



Figure 2. Coat colors in three different Korean native cattle breeds. A, Hanwoo; B, Jeju Black cattle; C, Korean Brindle cattle.

2. 소 무색소증 및 관련 유전자 연구

1903년 사람의 무색소증(백화증, albinism)은 멘델의 분리(mendelian segregation)의 법칙이 인간에게 최초로 적용되는 증거로 제시된 이래로 100 여년 동안 연구되어져 온 대표적인 선천적 유전질환 중 하나이다. 이러한 무색소증은 과거 단일 유전자의 돌연변이에 의해 야기되는 것으로 생각되었으나, 그 간의 연구를 통해 현재까지 무색소증과 관련된 12 가지의 다른 유전자들이 동정되었다(Oetting 등, 2003).

무색소증은 모발, 피부, 눈의 망막세포에서 색소침착이 크게 감소하거나 전혀 안 되는 안피부무색소증(眼皮膚無色素症; oculocutaneous albinism, OCA)과 주로 눈과 관련된 눈무색소증(ocular albinism, OA)으로 나누어지는 두 가지의 형태가 있다. 인간에게서 안피부무색소증은 발생 원인에 따라 크게 4 가지(OCA1-OCA4)로 분류하고 있는데, OCA1은 melanin 생합성에 가장 핵심 유전자인 *TYR* 유전자의 돌연변이에 의해 발생한다. OCA1은 다시 2 가지 아형(subtype)으로 나누는데, *TYR* 유전자에서의 틀이동돌연변이나 염기치환에 의해 tyrosinase 활성이 완전히 결여된 형태를 OCA1A형으로 정의하며, 출생 시부터 털, 피부, 눈의 신체 모든 색소침착 부위에서 색소가 완전 결여된 형태로 관찰된다. OCA1A형과 달리 *TYR* 유전자의 변이에 의해 효소활성이 감소된 형태는 OCA1B로 구분된다. 그 외의 OCA2, OCA3과 OCA4는 OCA1 보다 완화된 증상을 나타내는데, 각각 *pink-eyed dilution (P)*, *TYRP1*과 *membrane-associated transporter protein (MATP)* 유전자의 돌연변이에 의해 나타난다(Oetting 등, 2003). 이와 같이 모든 무색소증은 17,000 명당 1 명 정도 발생률을 보이는 것으로 보고되고 있는데, 이는 약 70 명당 1 명 정도는 무색소증 원인 변이를 가지는 보인자임을 제시하고 있다(Gronskov 등, 2007). *TYR* 유전자에 의한 OCA1형은 대부분의 미국인 인구 집단에서 1:40,000의 발생률을 보이고, 아프리카계 미국인에서는 드물게 나타난다. 반대로 *P* 유전자 변이에 의한 OCA2는 아프리카계 흑인 OCA 환자 중에서 매우 일반적으로 발생하는데, 미국인 전체 발생률은 1:36,000이고 아프리카계 미국인에서는 약 1:10,000으로 추정되고 있다. *TYRP1*에 의한 OCA3는 코카시안계와 아시안계에서는 매우 드물게 나타나지만 아프리카에

서는 1:8,500의 발생률을 나타내고, *MATP* 유전자 돌연변이에 의한 OCA4는 독일 무색소증 환자의 5-8%를 차지하지만 일본 무색소증 환자의 18%는 OCA4에 의한 증상인 것으로 보고되고 있다(Gronskov 등, 2007).

포유동물에서 피부, 눈, 모발의 색소침착에 심각한 지장을 초래하는 완전한 무색소증(complete albinism)을 보이는 OCA1과 그 원인 유전자인 *TYR* 변이에 대한 많은 보고가 있었고, 마우스(Kwon 등, 1989a; Halaban 등, 2000), 쥐(Blazczyk 등 2005), 토끼(Aigner 등, 2000), 붉은털원숭이(Ding 등, 2000), 소(Schmutz 등, 2004), 고양이(Lyons 등, 2005; Schmidt-Kuntzel 등, 2005; Lyons 등, 2005), 족제비(Blazczyk 등, 2007), 멩크(Benkel 등, 2009) 등에서 완전한 무색소증 표현형과 그 유전변이들이 보고되었다. 이 무색소증의 원인 유전자인 *TYR*은 Kwon 등(1987)과 Yamamoto 등(1987)에 의해 마우스와 사람에서 처음 분리 동정되었다. *TYR* 유전자는 5개의 exon으로 구성되어 있으며, 암호화하고 있는 tyrosinase는 548개의 아미노산으로 구성되고, glycosylation site와 구리(Copper)가 결합하는 histidine-rich heme-binding site가 존재한다(Kwon 등, 1989b; Giebel 등, 1991). 사람의 경우 100여개가 넘는 무색소증 관련 *TYR* 유전자 변이가 확인되었다고 보고하고 있으며(Tomita 등, 1989; Spritz 등, 1989; Oetting 등, 2003), 이들 변이들은 두 개의 copper binding site와 exon 1과 exon 4등 기능적으로 중요한 역할을 할 것으로 추정되는 4 개의 지역에 군집되어 분포하고 있는 것으로 보고되고 있다(King 등, 1991; Tripathi 등, 1992).

소에서 무색소증은 1920년 Detlefsen이 Holstein 품종에서 보고된 이후 다수의 품종에서 보고되어왔다. Jayasekera와 Leipold(1981)가 소의 무색소증에 대한 기존의 보고를 종합한 자료에 따르면, 소에서 부분 혹은 불완전 무색소증 등 여러 가지 형태의 무색소증에 대해 많은 보고가 있었으나, 완전한 무색소증은 Leipold 등(1968)이 보고한 Guernsey 품종 1두, Greene 등(1973)이 보고한 4두의 Shorthorn, 그 외 다른 연구자들이 보고한 Brown Swiss 무색소증 송아지들과 그들 자신이 보고하는 4두의 Charolais 등에 한정하고 있다. 그렇지만 이들 개체들도 지금까지 유지되어져 오지 못하여 유전적 원인 분석은 이루어지지 않고 있는 실정이다.

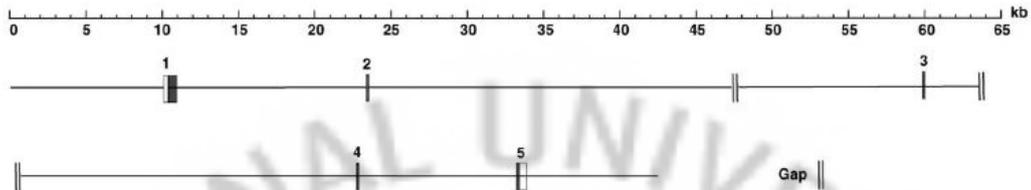
소에서의 무색소증에 대한 유전 원인이 밝혀진 경우는 Schmutz 등(2004)이

Braunvieh 품종에서의 보고가 유일하다. Braunvieh 품종은 스위스 원산의 소 품종으로 후에 Brown Swiss 품종 형성에 공헌한 것으로 알려져 있다. 품종 이름인 Braunvieh은 “brown cow”를 의미하고, 품종 이름과 같이 회갈색에서 갈색의 모색을 나타낸다. Schmutz 등(2004)은 Braunvieh 품종에서 알비노 개체 및 가계를 확인하고 유전자를 분석한 결과 *TYR* 유전자의 exon 1에서 하나의 염기서열 삽입돌연변이 발생에 의한 틀이동돌연변이가 이들 알비노 개체의 원인 유전 변이임을 보고하였다. 또한 가계 분석과 유전자 분석 결과는 상동염색체성 열성유전양식을 따르는 것으로 확인되었고, 이는 고전적이고 전형적인 OCA1 형의 무색소증임을 추정케 하였다. 그렇지만 Schmutz 등(2004)은 추가로 공시된 1두의 홀스타인 알비노 개체에서 Braunvieh 품종 알비노 개체들에서 나타나는 틀이동돌연변이는 발견하지 못하였고, 부분적인 *TYR* 유전자 분석 결과에서도 원인 변이를 찾지 못하였다고 보고하였다. 이러한 결과는 사람에서와 같이 다른 많은 *TYR* 유전자내 무색소증 관련 변이가 존재하거나, 아니면 다른 형태의 안피부무색소증(OCA2-OCA4)인 것으로 추정되고 있다. 소의 *TYR* 유전자는 29 번 염색체에 존재하고 그 단백질 산물은 530 개의 아미노산으로 구성된다(Schmidtz 등 2001; Guibert 등, 2004). Braunvieh 품종 완전 무색소증 개체는 염기 삽입에 의한 틀이동돌연변이로 조기 종결 코돈(termination codon)을 만들어 316 개의 아미노산으로 이루어진 결실 단백질을 형성하는 것으로 보고되었다(Schmutz 등, 2004).

최근 한우 집단에서 여러 보도매체를 통하여 전라북도, 충청남도의 여러 농가에서 황색 한우간의 교배를 통해 생산된 몇몇 송아지들이 완전 무색소증을 나타내어 관심의 대상이 되고 있다. 과거 한우 개량을 위하여 일부 지방, 특히 제주도와 강화도 등지에 Charolais 품종이 도입되었다. Charolais 품종은 특징적으로 전신 백모색을 나타내며, 백모색 발생의 유전양상은 상동염색체성 열성유전양상을 나타내는 OCA1 무색소증과 달리 *Charolais dilution(Dc)* 유전좌위에 의한 모색 희석(dilution)에 의한 백색 모색을 지니고, 유색 품종과의 교배에서는 유색과 백색의 중간 모색이 나타난다. 또한 이러한 Charolais 고유 모색 유전에 대한 유전 변이가 밝혀졌는데 *SILV* 유전자의 변이가 깊은 관련이 있음이 보고되고 있다(Gutierrez-Gil 등, 2007). 즉, *SILV* 유전자 돌연변이의 동형접합에서 전신 백

모색을 나타내고 흑모색이나 황색 품종과의 교배에서 생산되고 F₁에서는 중간 모색을 나타내며, F₁ 상호교배나 역교배에 의해 다시 유전자형이 분리되면 백색, 중간 형태의 모색, 흑색, 황색 등으로 분리된다. 그러나 한우에서 태어난 송아지의 경우 눈의 색소침착이 안 되는 경우가 있으며, 안색은 Charolais 품종의 정상적인 눈의 색깔과는 조금 다른 양상을 보이고 있다(Figure 4). 앞에서 살펴 본 바와 같이 무색소증의 원인에는 다양한 유전적 요인이 있다. 특히 말, 돼지 등에서는 무색소증 이외에도 *KIT* 유전자 변이의 우성유전양상을 따르는 선천성 백색증과 *EDNRB* 유전자의 돌연변이에 의한 백색치사증후군(lethal white foal syndrome), 기본 모색을 출생하여 연령의 경과에 따라 점진적으로 백화현상(progressive whitening)을 나타내는 총마 등 백모색, 혹은 백모색과 유사한 모색 유전이 보고되고 있다(Johansson-Moller 등, 1996; Santschi 등, 1998; Haase 등, 2007; Pielberg 등, 2008). 따라서 한우 백색 송아지 출생에 대한 분자생물학적 원인을 규명하기 위해서는 무색소증 관련 유전자와 *Dc* 유전좌위의 *SILV* 유전자 등 다각적인 연구가 요구된다.

A.



B.

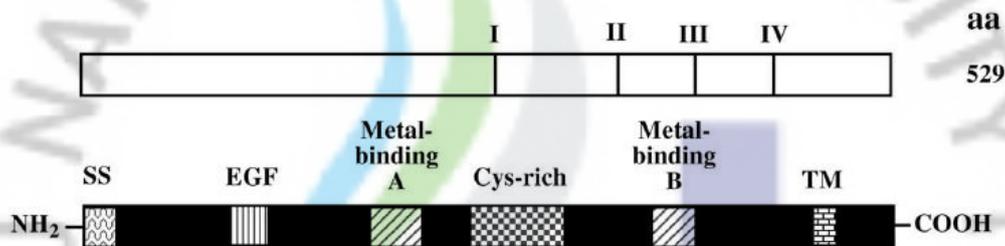


Figure 3. The structure of the *TYR* gene. A, Chromosomal structure of the human *TYR* gene. The non-coding portions of the exons are indicated by open boxes, the coding region by closed boxes. B, A schematic illustration of the generic structure of the *TYR* gene showing the position of N-terminal secretory signal peptide (SS), epidermal growth factor-like region (EGF), two metal binding domains (A and B), cysteine rich region (Cys-rich), and C-terminal membrane spanning domain (TM). Cited from Sturm et al. (2001).



Figure 4. Different coat color phenotypes in Hanwoo. On the left a female with normal pigmentation; A, on the right-hand side a female albino exhibits complete albinism. B, The appearance of the left eye of a female albino. Note pink iris and albinotic reflection in the pupil.

Ⅲ. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 시료

1) 한우, 제주흑우 및 외래 소 품종

품종별 모색 특성 및 모색관련 유전자형의 연관 분석을 위해 우리나라 재래 소 품종들과 외국에서 도입된 소 품종들, 품종간 교잡우, 최근 한우 농가에서 생산된 무색소증 한우를 이용하였다. 농촌진흥청 국립축산과학원 난지축산시험장에서 사육 중인 한우 26 두, 제주흑우 18 두, 한우×제주흑우 29 두, 제주도 소재 제동목장의 Angus 14 두, Red Angus 1 두, Charolais 3 두, 일반 농가의 Holstein 4 두, Red Holstein 2 두에서 혈액표본과 모발표본을 채취하였다. Simmental, Hereford 등은 동결 정액이나 DNA를 국립축산과학원에서 분양받아 연구에 이용하였다. 무색소증 유전자형 분석은 보증종모우 154 두를 포함하여 총 506 주의 한우 DNA, 제주흑우 55 두, 제주흑우×한우 교배축 29 두, 칩소 20 두, Charolais 15 두, Hereford 10 두, Angus 5 두, Holstein 60 두, Simmental 2 두, 제주축협 도축장에서 임의로 선정된 108 주의 DNA 시료를 확보하여 연구에 이용하였다.

2) 무색소증 한우

무색소증 한우는 전라북도 순창과 정읍, 충청남도 대전 등에서 출생한 개체들을 이용하였다. 순창 한우농가에서는 무색소증을 보이는 개체 3 두와 이들과 혈연관계가 있는 황색 한우 3 두에서 혈액이나 모근을 채취하여 DNA 분석에 이용하였다. 대전 한우농가에서 출생한 무색소증 한우 1 두와 이를 생산한 어미 소 1 주의 DNA를 국립축산과학원에서 공급받아 DNA 분석에 이용하였다. 정읍 한우농가에서는 무색소증 한우 3 두와 혈연관계가 높은 황색 한우 2 주의 혈액이나 모근을 1차로 수집하여 DNA 분석에 이용하였다. 또한 정읍 한우농가에서 무색소증 한우 3 두(♂ 1 두, ♀ 2 두)를 국립축산과학원 유전자원시험장으로 도입하여 교배를 실시하고, 여기서 생산된 무색소증 한우 2 두를 포함하여 총 5 두에서

DNA 분석을 위한 혈액, 색소함량 분석을 위한 모발, RNA 추출과 색소세포 배양을 귀(ear) 절편을 채취하여 연구에 이용하였다.

3) Melanin 함량 분석을 위한 모발 시료

Melanin 함량 분석을 위해 공시된 소 품종들을 대상으로 모발을 채취하였다. 한우와 제주흑우는 기갑과 앞다리 사이의 어깨부위에서 채취된 모발 시료를 이용하였고, Holstein에서는 흑반과 백반 부위의 모발을 각각 채취하여 분석에 이용하였다. 모색의 계절적 차이를 없애기 위하여 모발의 채취는 동일 계절에 수행하였으며, 불순물 제거를 위하여 멸균된 증류수와 에탄올로 각각 2회씩 세척한 후 50℃에서 건조하였다. 또한 알비노 한우 5두에서 채취된 모발을 상기와 같은 방법으로 준비하여 분석에 이용하였다.

4) 유전자 발현 분석 등을 위한 피부조직 시료

농촌진흥청 국립축산과학원 난지축산시험장에서 제주흑우와 한우 각각 4두, 젓소 농가에서 Holstein 4 두에서 피부조직을 기갑과 앞다리 사이의 어깨부위에서 채취하여 RNA 추출에 이용하였다. Holstein에서는 한우와 제주흑우에서 채취한 부위와 가장 유사한 위치에서 흑모색 및 백반 부위의 피부조직을 절취하여 RNA 발현 수준의 분석에 이용하였고, 동일 개체의 경정맥에서 얻은 혈액을 DNA 유전자 분석에 이용하였다. 무색소증 한우의 경우 귀 절편에서 분리한 피부조직에서 RNA를 추출하였다.

2. Melanin 함량 측정

무색소증 한우를 포함한 소 품종별, 모색별 melanin 총량과 total melanin 중 eumelanin의 비율은 분광광도법으로 조사하였다. 상대량 측정은 Wakamatsu와 Ito(2002)의 방법과 Lamoreux 등(2001)의 방법을 변형하여 수행하였다. 개체별로 수집하여 준비한 모발 1 mg을 1 ml 추출액 soluene 350:water=9:1(v/v)에 넣고 45분 동안 boiling water bath에서 가열하여 완전 용해한 후 천천히 냉각하였다. 냉각한 시료는 Cary 100 UV-Vis Spectrophotometer(Varian, USA)로 흡광도

A_{500} (total melanin)과 A_{650} (eumelanin)에서 측정하였다. 또한 분광광도법으로 얻어진 eumelanin의 상대량은 공시된 품종 중 흑모색은 Angus와 제주흑우, 적색은 Red Angus, 황색은 한우, 한우×Charolais 교잡종 그리고 백색은 Holstein 백반을 대상으로 각각 1두씩 Borges 등(2001)의 방법에 따라 high performance liquid chromatography(HPLC) System/600E(Waters, USA)로 확인하였다. 개체별로 5 mg의 모발을 water-0.5 M NaOH-3% H_2O_2 가 들어있는 추출액에 넣고, internal standard로 40 nmol phthalic acid를 첨가한 후, boiling water bath에서 20분간 가열하여 melanin을 추출한 후 냉각하였다. 추출액에 20 μ l 10% Na_2SO_3 와 250 μ l 6M HCl을 첨가하고, ethyl acetate로 두 번 추출하였고 45°C 풍건 하에서 건조한 후 1 ml의 이동상 용액으로 녹였다. 이동상으로는 0.01 M potassium phosphate 완충액 (pH 2.1)과 methanol을 사용하였고, 유속 0.8 ml/min으로 상기 연구 보고의 이동상 비율(용매강도) 변화에 따라 설정하였고, 주입량 100 μ l 및 UV 검출기(280 nm)를 이용하여 분석을 실시하였다. 그리고 소에서 여러 가지 모색을 나타내는 품종별로 얻어진 모발은 일정한 투명 유리판으로 밀착 후 Colorimeter(Model CR-301, Minolta, Japan)를 이용하여 국제조명위원회 (Commission International de l'Eclairage; CIE)의 L^* (lightness)과 a^* (red-green), b^* (yellow-blue) 값을 측정하였다.

3. Genomic DNA 분리와 종합효소연쇄반응

피부조직 채취 전 채집한 혈액에서 DNA 분리는 Miller 등(1988)의 방법을 변형하여 수행하였다. 경정맥에서 채취한 전혈을 red cell lysis solution(10 mM Tris-HCl (pH 7.4)/10 mM NaCl/1.5 mM $MgCl_2$)을 이용하여 적혈구를 용해한 후, 회수한 백혈구에 proteinase K를 첨가하고 55°C에서 overnight 진탕하였다. 동결정액에서 DNA 추출을 위해 1 mM EDTA/0.9% NaCl 용액으로 희석한 후 원심분리하여 동결보존액을 제거하였다. 침강된 정자세포를 phosphate-buffered saline에 재현탁하고 0.5% SDS/proteinase K (10 mg/ml) 용액을 첨가하여 55°C 진탕항온수조에서 overnight 반응하여 단백질을 분해시켰다. 각각의 추출액에 RNase를 처리하고 phenol-chloroform을 이용하여 단백질을 분획하여 제거한

후, ethanol 침전법으로 DNA를 회수하여 TE buffer에 용해하였다. 준비한 DNA 용액은 NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer(NanoDrop Technologies, USA)로 흡광도를 측정 한 후 A_{260}/A_{280} 1.8 이상인 DNA 용액들을 50-60 ng/ μ l로 희석하여 PCR 증폭을 위한 주형으로 이용하였다. 모색관련 유전자의 서열 결정과 각각의 유전자에 대한 돌연변이 탐색, 유전자형의 결정을 위해 분리한 DNA를 주형으로 증합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 통해 해당 유전자 절편을 증폭하였다. 유전자형 결정을 위한 PCR 반응은 10 \times 반응완충액, 20 mM dNTP, 각각 200 mM primer, 1.5 units *i-Taq* DNA polymerase (Intron Biotechnology, Korea)와 50-60 ng genomic DNA 용액에 멸균한 탈이온수를 첨가하고, PTC-200 (MJ Research, USA)을 이용하여 95 $^{\circ}$ C 3 분 초기변성 후, 94 $^{\circ}$ C-30 초, primer 별 적정 결합온도에서 1 분, 72 $^{\circ}$ C-1 분 또는 2 분으로 구성된 연쇄반응을 35 회 반복한 후 72 $^{\circ}$ C에서 10 분간 최종 신장하였다.

4. Total RNA 분리와 cDNA 합성

채취된 피부조직에서 지방조직과 모발을 제거하였으며, 액체질소를 이용하여 마쇄한 후 100 mg을 취하여 TRIzol (Invitrogen, USA)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 생김한 피부조직을 액체질소에 넣어 실험실로 운반한 후 -80 $^{\circ}$ C deep-freezer에 보관하거나 곧바로 RNA 추출에 이용하였으며, RNA 추출은 공급자의 manual을 따랐으며, 분리한 RNA시료는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 포함한 증류수에 녹여 NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer(NanoDrop Technologies, USA)로 흡광도를 이용하여 농도와 순도를 측정하였다. 준비된 total RNA 1 μ g을 주형으로 ImPromII Reverse Transcription System(Promega, USA)으로 cDNA를 합성하여 real-time RT-PCR의 주형으로 사용하였다.

5. Real time RT-PCR 분석

한우, 제주흑우, 젃소의 흑백반 피부조직에서 *TYR*, *TYRP1* 및 *DCT* 유전자의 상대적 발현량 분석은 SYBR Green qRT-PCR Master Mix(Stratagene, USA)를

이용하여 반응액을 제조하였고, MX3005P Real-Time PCR system(Stratagene, USA)을 이용하여 유전자별 독립적으로 개체별 2 회 반복 분석하였다. 분석에 이용된 각각의 유전자별 primer와 내부보정용 house keeping 유전자인 *GAPDH* primer, 그리고 PCR 조건 등은 Guibert 등(2004)의 실험방법을 이용하였다.

6. RT-PCR과 DNA sequencing

한우와 제주흑우의 모색 차이 및 한우에서 무색소증 발생의 원인 유전자를 구명하기 위한 *TYR*, *TYRP1* 유전자의 RT-PCR은 Guibert 등(2004)의 실험방법 및 primer를 이용하였다. RT-PCR 산물은 TOPO TA Cloning Kit(Invitrogen, USA)을 이용하여 염기서열 분석에 이용하거나, Agarose Gel DNA Extraction Kit(Roche, Germany)로 정제하여 Direct sequencing에 이용하였다. 염기서열 분석은 ET dye-termination sequencing kit(Amersham Pharmacia, USA) 반응 후 MegaBase1000(Amersham Pharmacia, USA)을 이용하여 확인하였다. 연구 수행과정에서 결정된 DNA 또는 cDNA 서열들은 GenBank Database 상에서 BLAST-N, BLAST-X 등으로 검색하여 기존에 보고된 서열들과의 유사도 및 염기변이 여부, 단백질 서열의 변화 등을 조사하였다.

7. 유전자형 분석

소에서 알려진 *MC1R* g.296C>T, g.311delG와 *SILV* exon 1의 g.64A>G 등에 대한 분석은 기존에 보고된 유전자형 결정 방법 및 primer(Gutierrez-Gil 등, 2007; 한 등, 2008)를 이용하여 수행하였다. 반면 연구수행과정에서 얻어진 새로운 염기치환 돌연변이인 한우 알비노 유전자형 분석은 fragment length polymorphism, RFLP) 방식을 적용하기 위하여 변이 염기의 인근 서열을 변형한 primer(TYRemF : 5'-CAA CAG TCG CCA GGC TTT ATG CAC C-3', TYRe2R : 5'-GAA CCT GAT TCA TAC TGG GTC AAA-3')를 제작 이용하였다. PCR 증폭산물은 *Msp*I 제한효소를 이용한 RFLP 분석을 실시하여 유전자형을 결정하였다.

8. 조직면역화학염색 분석

황색 한우와 무색소증 한우의 피부조직에서 색소세포의 분포와 melanin 생합성관련 유전자 산물들의 발현 여부를 조사하기 위해 김 등(2004)의 방법을 참조하여 조직면역화학염색을 통한 분석을 수행하였다. 각각의 개체에서 채취한 피부나 귀 절편을 10% formalin 용액으로 고정하고 paraffin block을 제작하였다. 제작한 조직은 8 μm 두께로 미세절편하고, slide glass 상에 부착하여 Hematoxylin-Eosin 염색과 LSAB2 System-HRP(DakoCytomation, Denmark)을 이용한 면역화학염색을 수행하였다. 피부조직에서 MC1R과 TYR 단백질의 발현 여부는 goat polyclonal antibody(Ab)를 Santa-Cruz(USA)사에서 구입하여 1차 항체로 이용하였다. 단백질 발현 확인을 위한 음성대조구로는 bovine serum albumin(BSA)만을 처리한 시료로 하였고, Hematoxylin으로 counterstaining하여 광학현미경으로 관찰하였다.

9. 색소세포 배양 및 동정

황색 한우와 무색소증 한우에서 색소세포의 확인을 위해 귀에서 분리한 피부 절편을 이용하여 세포 배양을 수행하였다. 생검한 시료를 10 \times Antibiotic/antimycotics가 함유된 PBS로 세척하고 100-90-70% ethanol로 소독한 후 0.25% dispase를 첨가하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 overnight 반응하였다. 연골 부위를 제거한 시료를 blade로 잘게 자른 후 0.5% trypsin-EDTA를 가하여 15분간 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 반응하였다. 세포 현탁액을 회수하여 mesh로 거르거나 직접 배양액(10% fetal bovine serum, FBS/DMEM/anti-biotic-antimycotics)에 human melanocyte growth supplement(HMGS) (Gibco, USA)를 첨가하여 배양하였다. 배양세포 중에 색소세포가 존재하는지를 확인하기 위해 flowcytometry를 이용하여 분석하였다. 색소세포 특이 항원으로 알려진 S-100과 melanoma marker에 대한 mouse polyclonal IgG를 1차 항체로 하는 FITC-conjugated anti-mouse IgG Ab로 표지하여 색소세포를 확인하였다. 또한 trypsin 처리한 세포들을 상기한 두 종류의 1

차 Ab로 반응시킨 후 FITC-conjugated anti-mouse IgG Ab로 항원-항체 반응을 수행하여 형광현미경으로 관찰하였다.

10. Homology model을 이용한 TYR 단백질 구조 예측 및 비교

TYR 유전자의 돌연변이가 단백질 구조에 미치는 영향을 알아보기 위하여 SWISS-MODEL workspace(Peitsch 등, 1995; Arnold 등, 2006; Kiefer 등, 2009)의 Domain annotation 도구 중에서 PsiPred(Jones, 1999)을 이용하여 돌연변이를 갖는 각각의 *TYR* 단백질 아미노산 서열로부터 예측된 이차구조를 비교하였고, 비교 모델링 방법(homology modeling method)의 automated mode에서 각각의 *TYR* 서열로부터 예측된 3차 구조를 비교 분석하였다.

11. 통계분석

Melanin 색소의 품종 간 비교분석은 총 melanin 량과 eumelanin/total melanin의 비율 값으로 하여 통계적 유의성 검정을 수행하였고, 또한 한우, 제주흑우, Holstein 3 품종에서 발견되는 4 가지 모색(황색, 흑색, 진흑색, 백색)을 나타내는 피부조직에서 발현되는 *TYR*, *TYRP1* 및 *DCT* 유전자의 상대적 발현량으로 하여 SAS프로그램(SAS, 1988)의 분산분석법과 Duncan 다중검정방법으로 유의성을 진단하였다.

IV. 결과 및 고찰

1. 소의 모발 melanin 색소 함량의 품종별 비교 분석

소의 다양한 모색을 나타내는 품종들에서 수집한 모발을 대상으로 전체 melanin 양과 흑색을 나타내는 eumelanin의 상대량을 분광광도법으로 분석하였다. Figure 5는 소의 여러 품종에서 전체 melanin의 양을 측정된 것이다. 흑모색을 지닌 Holstein과 Angus가 적색모 또는 다른 모색의 품종에 비해 상대적으로 높은 전체 melanin 수준을 나타내었고, 제주흑우는 황색, 적색 품종들 보다는 높았으나, 같은 흑색 품종인 Holstein이나 Angus 보다 낮았다($P < 0.001$). 제주흑우가 동일 흑모색인 Holstein과 Angus 보다 낮은 총 melanin 함량을 나타내는 것은 제주흑우가 완전한 흑모색 계통이 아닐 가능성을 시사하고 있다. 흑모색 발현에 중요한 *MC1R* 유전자에 대한 품종별 유전자형 연구 보고(이 등, 2000)에서 제주흑우는 Holstein과 Angus가 지니고 있는 구조적으로 기능이 강화된 우성 대립자인 E^D 가 아니라 야생형인 E^+ 대립인자를 소유한 것으로 보고된 바 있다. 제주흑우의 전체 melanin 수준이 Angus나 Holstein 흑반보다 낮게 나타나는 것이 *MC1R* 유전자의 대립인자형과 연관된 것으로 추정되나, e/e 유전자형인 한우의 전체 멜라닌 함량이 같은 e/e 유전자형인 Red Holstein이나 Red Angus보다 유의적으로 낮은 수준을 보이고 있어, 제주흑우와 한우에서는 *MC1R* 유전자 외에 다른 요인도 melanin 함량에 영향을 미치는 것으로 추정된다. 특히 *MC1R* 유전자형이 동일한 한우와 적색 품종들(Red Angus, Red Holstein)과의 전체 melanin 수준의 차이는 melanin 침착에 *MC1R* 이외의 요인이 작용하고 있음을 보여주는 결과라 생각된다. 최근의 Guibert 등(2004)의 보고에 따르면 Charolais 품종 피부에서 색소세포 내 melanin 합성에 직접적으로 관여하는 *TYR*, *TRP-1*, *DCT* 유전자의 발현 정도는 상당히 높은 것으로 나타났다. 그럼에도 모발에서 Charolais는 Holstein 백반 부위의 모발에서와 비슷한 수준의 총 melanin 함량을 보였고, C×K 교잡종은 한우와 Charolais의 중간 수준의 melanin 함량을 나타내

고 있었다.

Wakamatsu와 Ito(2002)는 eumelanin과 pheomelanin은 650-500 nm의 흡광도에 서 유의적으로 차이가 있고, 그 흡광도의 비율은 pheomelanin과 eumelanin의 상대적 수준 측정에 이용될 수 있음을 보고하였다. 또한 Ozeki 등(1996)도 A_{650}/A_{500} 비율이 전체 melanin 중 eumelanin의 상대적인 비율과 상당히 깊은 관련이 있음을 보고한 바 있다. Figure 6은 소의 모색과 품종에 따른 전체 melanin 중 eumelanin, pheomelanin의 상대적 수준(A_{650}/A_{500})을 분석한 결과이다. 흑모색 품종인 Hostein의 흑반, Angus, 제주흑우의 전체 melanin 중 eumelanin의 비율은 적모색, 황모색 품종들에 비해 유의적으로 높은 경향을 나타내고 있었다 ($P<0.001$). 제주흑우의 경우 총 melanin 수준은 Holstein과 Angus보다 낮은 수준을 나타내었으나, 전체 melanin 중 eumelanin의 상대적인 수준에서는 유의적인 차이를 나타내지 않아, 제주흑우는 Holstein, Angus에 비해 eumelanin의 수준뿐만 아니라 pheomelanin의 수준 역시 이들 품종들에 비해 상대적으로 낮은 수준인 것으로 추정된다. 이 같은 양상은 한우와 적색품종들 간 비교에서도 전체 melanin 중 eumelanin의 상대적인 비율에서 유의적인 차이가 관찰되지 않아, 비슷한 양상을 보였다.

이와는 달리 전체 melanin 수준과 전체 melanin 중 eumelanin의 상대적인 비율간의 상관관계 분석에서, 흑모색인 제주흑우는 정의 상관율, 황갈색인 한우에서는 부의 상관율을 나타내고 있어, 한우에서의 eumelanin 생합성 수준이 제주흑우에 비해 제한되어 있는 것으로 사료된다(Figure 7).

HPLC를 이용하여 eumelanin의 양을 측정된 결과는 Figure 8과 같다. 분석 결과 Black Angus가 eumelanin 수준이 가장 높았으며 제주흑우, Red Angus, 한우, Charolais×한우 그리고 백모 순으로 나타나 분광광도법적 분석에 의한 측정치와 동일한 경향을 보였다. 이는 상당히 복잡한 전처리 과정과 고가의 장비를 구비하여야 분석 가능한 HPLC 분석에 비해 분광광도법 분석은 모발 내 melanin 수준을 파악하기 데 보다 편리하게 사용될 수 있는 방법임을 시사하는 결과라 하겠다.

이상의 연구결과는 소의 품종별 모색에 대한 특성을 melanin 색소의 수준 분석을 통해 어느 정도 수치화된 계량적 정보를 제공할 수 있음을 보여주고 있으

며, 한우와 제주한우에서 모색발현에서는 *MC1R* 이외의 유전적인 요인이 관여하고 있음을 보여주고 있었다. 우리나라에서 사육되고 있는 한우와 제주흑우가 황갈색, 흑색을 기본으로 한 계통임을 의심할 여지없는 사실이나, 색상의 범위와 농도 및 채도에 대한 기준은 모호한 실정이다. 따라서 본 연구에서 제시하고 있는 색소에 대한 정보는 향후, 한우 및 제주흑우, 칠포 등 재래소의 계통 특성화 뿐만 아니라, 소에서 모색 표현의 강약을 조절하는 유전적인 요인 등을 분석하는데 있어 중요한 기초 자료가 될 것으로 사료된다.

색차계를 이용하여 소 품종별 모색 측정치와 한우의 total melanin과 색차계 수치를 비교한 결과는 Figure 9와 같다. 색차계에서 측정되는 L(명도), a(적록도) 그리고 b(황록도) 값은 total melanin과 특징적인 관계를 보여주고 있어, 모색 측정에 일부만 이용 가능할 것으로 보인다. 한우의 L평균은 46.95 ± 3.91 , a은 8.49 ± 0.75 , b은 13.95 ± 2.23 이었다. 분석된 자료를 토대로 평균 개체를 선정하여 한국표준색표집(공업진흥청/한국방송공사, 1991)에서 가장 근접한 색을 비교 분석한 결과, 한우의 모색은 5YR 0241 색체와 가장 가까운 것으로 나타났다. 그렇지만 한우는 다양한 모색을 지니고 있고 또한 많은 모색 관련 유전자들의 결과로 한 개체의 모색이 발현됨으로 정확한 한우 모색의 표준색을 결정하기 위해서는 eumelanin과 pheomelanin의 정확한 정량 분석이 수행되어야 할 것으로 사료된다.

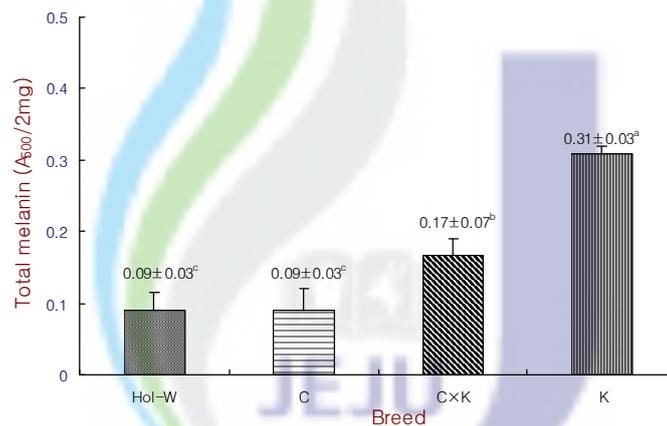
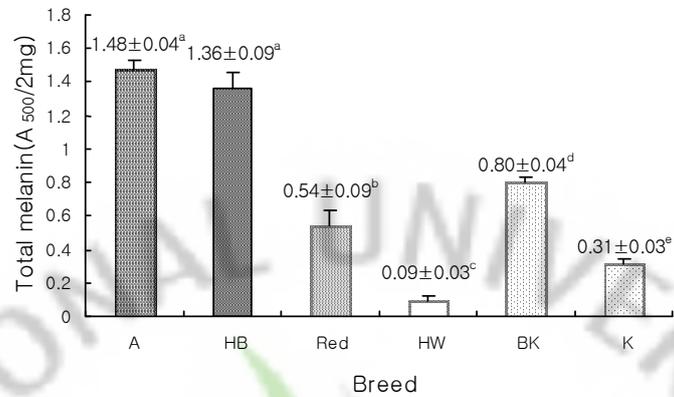


Figure 5. Total melanin levels among cattle breeds. A, Angus; HB, Holstein-black hair; Red, Red Holstein or Red Angus; HW, Holstein-white hair; BK, Jeju Black Cattle; K, Hanwoo; C, Charolais; C×K; Charloais×Hanwoo. Means marked by different superscripts on the bars within the graph are significantly different ($P < 0.001$).

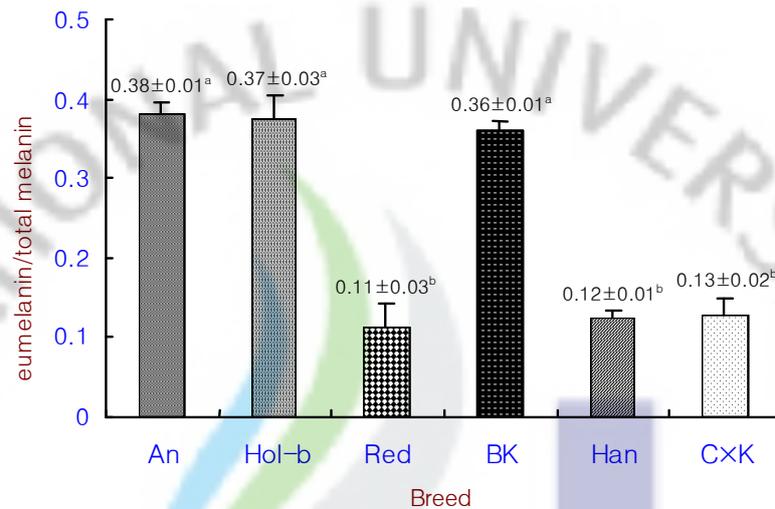
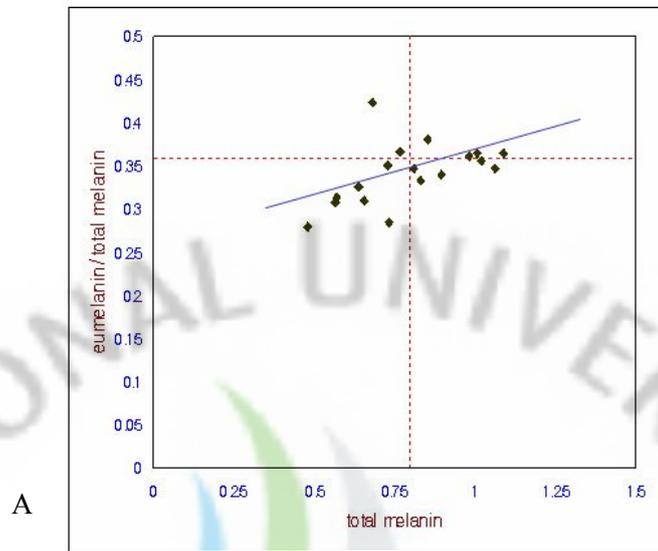
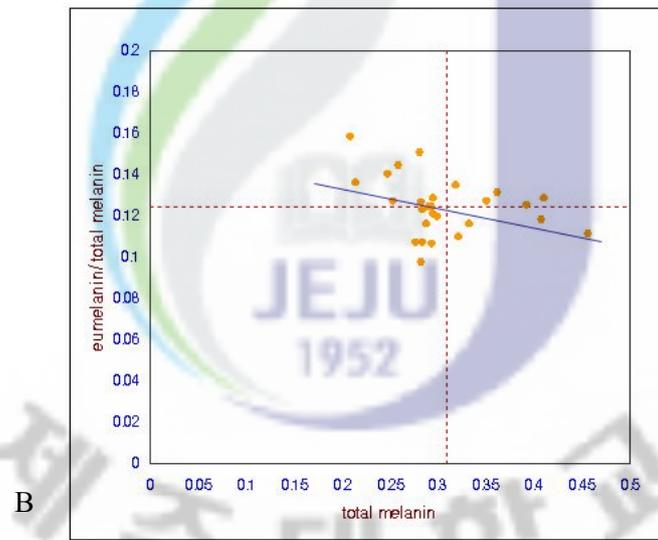


Figure 6. Ratios of eumelanin/total melanin contents. A, Angus; HB, Holstein-black hair; Red, Red Holstein or Red Angus; BK, Jeju Black Cattle; K, Hanwoo; C×K, Charloais×Hanwoo crossbred. Means marked by different superscripts on the bars within the graph are significantly different ($P < 0.001$).



$$\text{Eumelanin/total melanin} = 0.264 + 0.098 \text{ total melanin} \quad (R^2 = 0.11)$$

(0.0001) (0.09)



$$\text{Eumelanin/total melanin} = 0.15 - 0.08 \text{ total melanin} \quad (R^2 = 0.11)$$

(0.0001) (0.09)

Figure 7. Correlation of total melanin content with the ratio of eumelanin/total melanin. A, Jeju Black Cattle; B, Hanwoo.

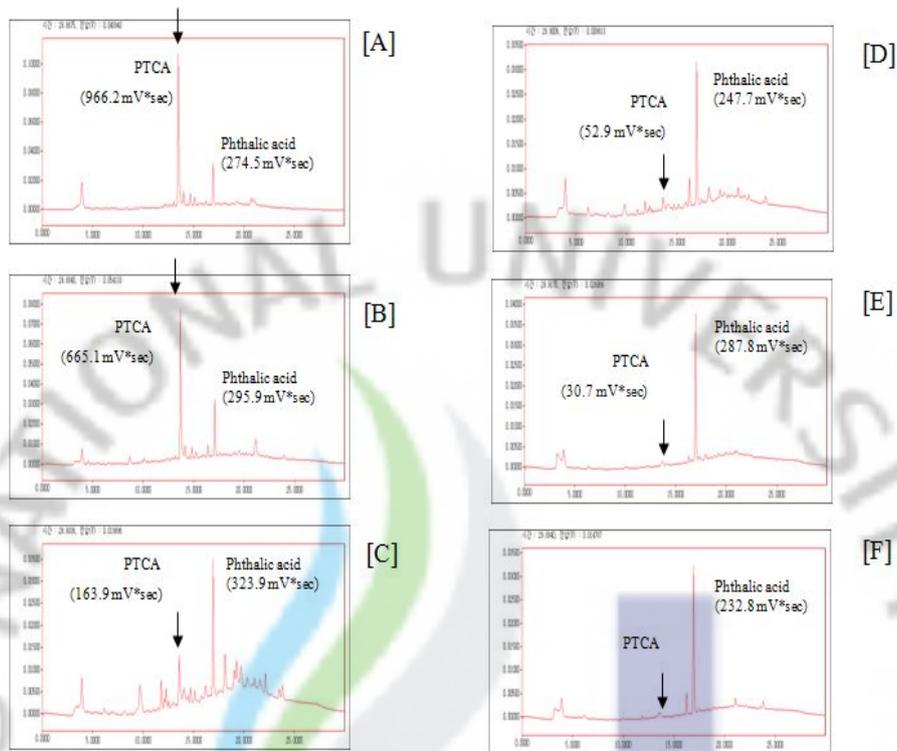


Figure 8. HPLC Chromatograms for the eumelanin. Hair samples were oxidized with permanganate to give PTCA and 40 nm phthalic acid as an internal standard. A, Angus; B, Jeju Black Cattle; C, Red Angus; D, Hanwoo; E, Charolais×Hanwoo crossbred; F, Holstein-white hair.

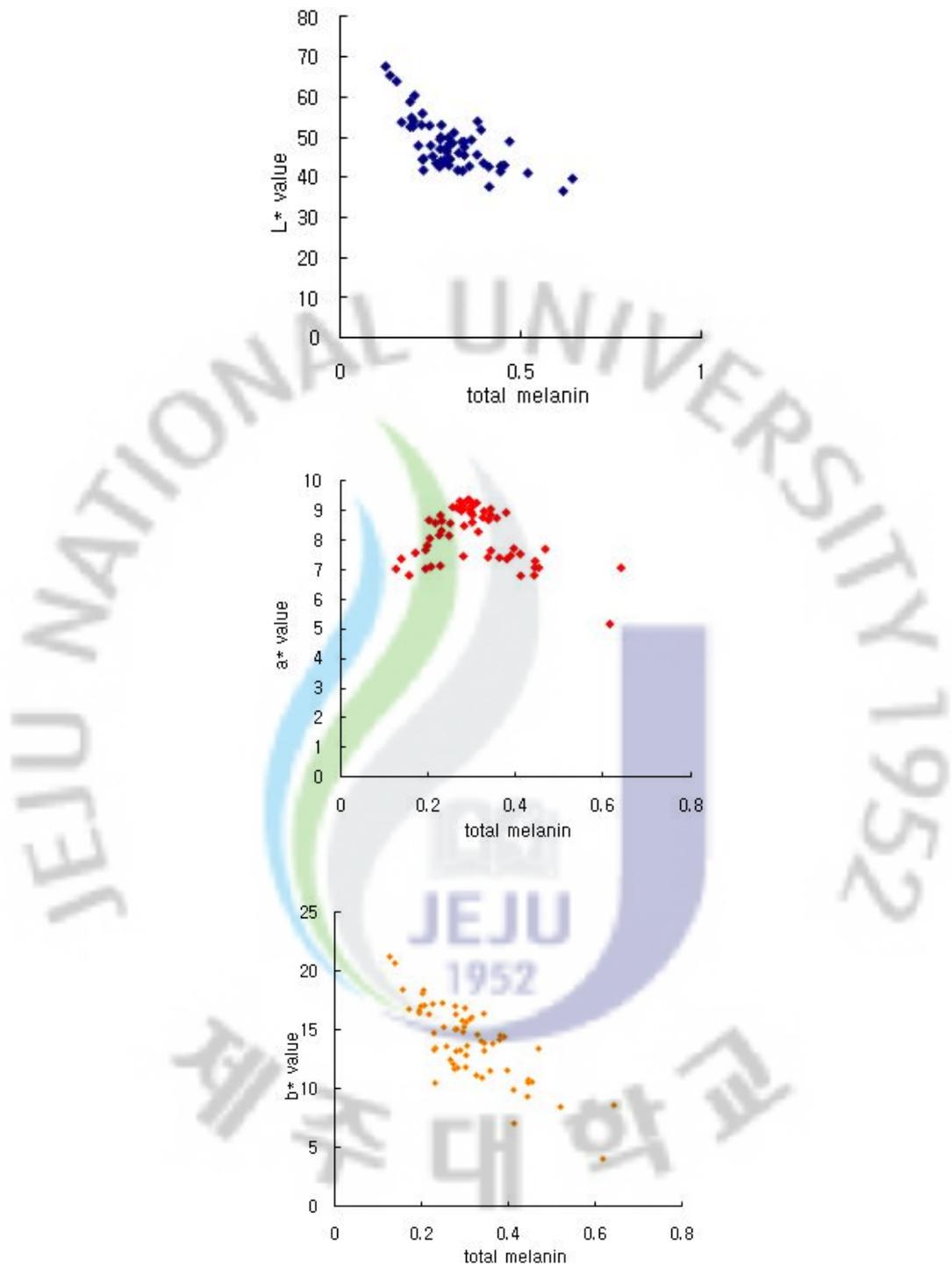


Figure 9. Scattergrams for the total melanin content against the parameters, L*, a*, and b* of colorimeter in Hanwoo.

2. 한우와 제주흑우, 홀스타인에서 *MC1R* 유전자형에 따른 melanin 생합성 유전자들의 발현 수준과 모색 출현양상의 관계

Melanin 합성 개시인자 중 하나인 α MSH의 신호전달을 매개하는 *MC1R*의 유전자형이 완전히 구분되는 3 품종, 한우(e/e), 제주흑우(E^+/E^+), Holstein (E^D/E^D)에서 melanin 생합성에 관여하는 *TYR*, *TYRP1*, *DCT* 유전자의 발현 양상을 조사하여 이를 3 품종의 모색 양상과 비교하였다. Real-time RT-PCR에서 조사된 유전자의 발현 수준은 3 종류의 유전자 모두 Holstein 흑반>제주흑우>한우>Holstein 백반의 순으로 강하게 발현되는 양상을 보이고 있었다. 황갈색으로 대표되는 한우와 흑갈색 혹은 흑색의 모색을 나타내는 제주흑우, 그리고 흑백반의 Holstein의 흑색과 백색의 피부 조직에서 *TYR*, *TYRP1* 및 *DCT* 유전자의 상대적 발현은 Holstein 흑모 부위의 피부 조직에서 유의적으로 가장 높은 발현 수준을 보였다($P<0.001$). 흑백 Holstein의 흑반에서의 유전자 발현 수준은 흑모색 계통인 제주흑우 보다 *TYR* 유전자 발현은 4.5 배, *TYRP1* 유전자는 2.3 배, 그리고 *DCT* 유전자는 2.5 배로 유의적($P<0.001$)으로 높게 나타났다(Figure 10). 한우와 Holstein 백반 사이의 유전자 발현 수준은 통계적 유의차는 없었으나 ($P>0.05$), 한우에서 *TYR*, *DCT* 유전자 발현 수준이 다소 높은 경향을 나타내고 있었으며, *TYRP1* 유전자 발현 수준은 흑백 Holstein의 백반조직에서 높은 경향을 보이고 있었다. 이에 대한 확실한 진단을 위해서는 더 많은 개체의 공시가 필요하고, real-time PCR 이외에 조직면역화학염색 등 여러 분야의 분석 기법을 적용하여 분석이 필요하다고 사료된다.

Holstein의 흑색 모발은 제주흑우의 모발보다 통상적으로 짙고 균일한 흑색을 나타내고, Holstein의 모발 내 총 melanin 함량도 제주흑우 보다 높은 것으로 나타났다(Figure 5). 피부 채취 시 체모에 대한 육안 관찰에서도 Holstein 흑반부는 제주흑우의 흑모색에 비해 모발의 흑색 정도가 더 진하고 기저부에서 말단까지 균일하였다. Melanin 생합성에 중요한 이들 세 종류 유전자의 상대적 발현량 분석에서도 유사한 양상을 보였다. Klungland 등(1995)은 소 *MC1R* 유전자의 E^D , E^+ 및 e 의 대립인자가 소의 흑모색 및 적모색 발현과 관련되어 있음을 보고한 바 있다. 본 연구에 이용된 Holstein의 *MC1R* 유전자형은 E^D/E^D , 제주흑우는

E^+/E^+ 유전자형인 개체들로 $MC1R$ 유전자형과 그에 따른 신호 전달 과정에서의 기능적 차이는 이들 melanin 생합성 유전자의 발현과도 관련이 있을 것으로 생각된다. 특히 E^D 대립인자의 경우 E^+ 대립인자 보다 색소세포 내 melanin 생합성 관련 유전자 발현을 증가시키는 것으로 보인다. 이러한 연구 결과는 마우스의 다양한 $MC1R$ 대립인자 중 특정 대립인자가 기능이 보다 강화된 작용에 의해 마우스의 흑모색 등이 발현된다는 결과(Jackson, 1993; Robbins 등, 1993)와 유사한 것으로 사료된다.

제주흑우의 TYR , $TYRP1$ 와 DCT 유전자의 상대적 발현양은 Holstein에 비해 떨어지지만, 한우에 비해 세 가지 유전자 모두에서 유의적으로 높은 것으로 나타났다($p < 0.001$). 적색 Holstein이나 한우의 적색 또는 황갈색은 $MC1R$ 유전자의 염기결실에 의한 frame shift mutation이 원인으로 그 대립인자 e 가 열성동형접합에서 출현되며, 야생형인 E^+ 는 다양한 모색발현과 관련된 것으로 보고된 바 있다(Klungland 등, 1995; 정 등, 2000; 이 등, 2000; 김 등, 2000). Melanin 합성에 관여하는 TYR , $TYRP1$ 와 DCT 유전자의 발현 수준이 전체적으로 제주흑우에 비해 한우가 낮은 것 또한 이 $MC1R$ 유전자형의 차이에 기인한 것으로 사료되고 있으며, 이러한 결과는 모발 내 melanin 함량 분석 결과와도 일치하고 있다. 하지만 E^+/e 유전자형인 황갈색의 한우가 적은 빈도지만 10% 이내에서 보고되고 있으며, 제주흑우에서는 30-40% 정도로 보고되고 있다(김 등, 2000; 이 등, 2000; 정 등, 2000; Sasazaki 등, 2005; 한 등, 2008). 본 연구에서는 이들 개체에 대한 분석은 수행되지 않았지만 한우와 제주흑우에서 나타나는 E^+/e 유전자형 개체에 대한 추가 비교 분석이 이루어진다면 재래가축의 모색에 대한 유전양식의 구명뿐만 아니라 모색 발현에 대한 생물학적 측면에서도 중요한 자료를 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

이상의 연구결과는 melanin 생합성에 중요한 역할을 수행하는 TYR , $TYRP1$ 과 DCT 유전자의 발현은 동일계통의 모색일지라도 품종에 따라 또는 모색의 발현 부위에 따라 다르다는 것을 보여주고 있으며, 여기에는 $MC1R$ 유전자형도 모색 표현형에 관여되고 있음을 보여주고 있다. 즉, α MSH와의 결합에 의해 모색발생의 신호가 색소세포 내부로 전달되는 데 있어 p.99Leu인 E^D , p.99Val E^+ , g.310delG에 의한 조기종결과 이로 인해 아미노말단이 결손된 e 대립인자형의

MC1R 단백질들이 α MSH의 신호를 세포내로 전달하는 과정에서 신호증폭에서 상대적인 차이를 나타낸다는 것이다(Klungland 등, 1995). 또한 그 결과로 melanin 생합성 유전자들의 전사활성을 결정하는 핵 내 전사인자인 *MITF*, *SOX10* 등의 발현수준의 차이가 발생하여 최종적으로 *TYR* 유전자의 전사 수준이 결정되는 것으로 보인다.

소에서 3 가지 대표적인 모색을 나타내는 황갈색 한우, 흑색 제주흑우, 흑백반 Holstein에서 *MC1R* 유전자형에 따라 melanin 합성에 직접 관여하는 3 가지 효소 *TYR*, *TYRP1*, *DCT* 유전자의 상대적인 발현 수준을 조사하여, 모색 양상과 이들 유전자들의 발현 정도의 상관을 살펴보았다. 하지만, melanin 생합성 대사 유전자의 전사활성을 조절하는 유전자들과 melanin 합성 이후 melanosome의 형성과 이주를 담당하는 유전자들에 대한 연구가 추가된다면, *MC1R* E^+/e 황갈색 한우와 칙소, 백반, 흑반, 이모색 벨트 등 현재까지 밝혀지지 않은 분자유전학적 원인 구명을 위한 자료들이 마련될 것으로 사료된다.

우리나라에서 사육되고 있는 한우와 제주흑우가 각각 황갈색과 흑색으로 대표되지만, 모색의 범위와 농도 및 채도 측면에서는 다양하게 세분해 볼 수 있다. 때문에 본 연구에서 제시하고 있는 유전자 발현에 대한 정보는 한우 및 제주흑우, 칙소 등 재래소의 계통의 특성화 연구뿐만 아니라, 소에서 모색 표현의 강약을 조절하는 유전적인 요인을 분석하는 데 있어 중요한 기초 자료가 될 것으로 사료된다.

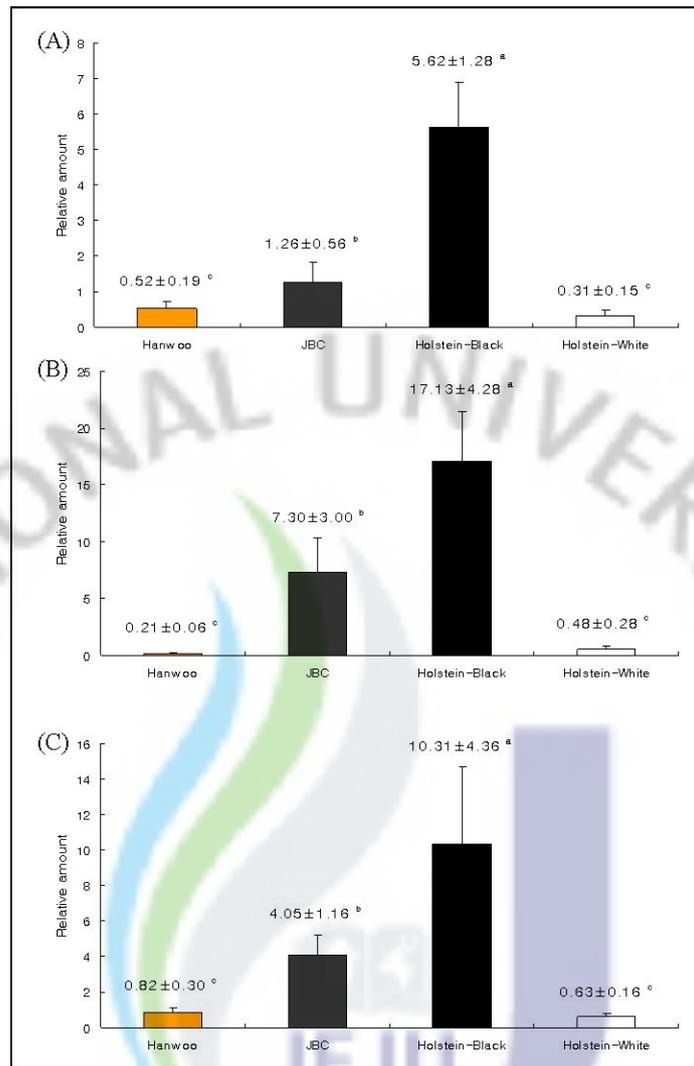


Figure 10. Relative transcription levels of melanin synthesis genes. (A), *TYR*; (B), *TYRP1*; (C), *DCT*. The relative transcription level was determined comparing to those of *GAPDH* by relative semi-quantitative real-time RT-PCR in skins from Hanwoo, Jeju black cattle (JBC), Holstein black coat-color area (Holstein-black) and Holstein white coat-color area (Holstein-white). The bovine *GAPDH* housekeeping gene was used to normalize the samples. LSmeans±SD marked by different superscripts on the bars within each graph are significantly different ($P < 0.001$).

3. 한우와 제주흑우에서 *TYR*과 *TYRP1* 유전자 염기서열 분석

멜라닌 생합성에 관여하는 *TYR*과 *TYRP1* 유전자의 full-length cDNA 염기서열을 분석하여 한우와 제주흑우의 모색에 어떠한 영향을 미치는 지를 조사하였다. 우선 *TYR* 유전자의 cDNA 서열 분석 결과, Guibert 등(2004)이 소에서 보고한 530개의 아미노산으로 구성되는 것과 같은 크기의 PCR 산물과 염기서열을 확인하였고, 앞의 발현량 분석에서와 같이 제주흑우에서 한우 보다 더 많은 PCR 산물이 나타났다(Figure 11). 염기서열 분석 결과 이 증폭산물은 소의 *TYR* 유전자임을 확인하였고, 한우와 제주흑우 몇몇 개체에서 SNP들이 탐색되었다. 그렇지만 한우 혹은 제주흑우 모색 특이 SNP, 즉 한 품종에서는 나타나고 다른 품종에서는 나타나지 않는 SNP은 확인할 수 없었다(Figure 12).

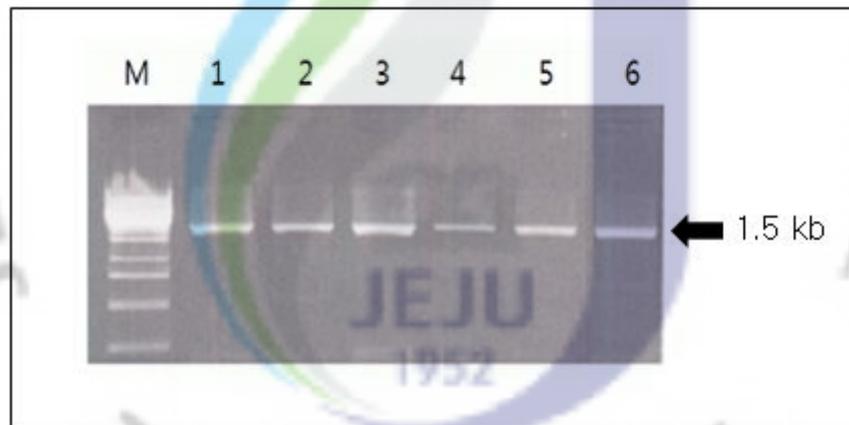


Figure 11. RT-PCR analysis of *TYR* gene. Lanes 1-3, JBC; 4-5, Hanwoo. The amplified full-length cDNA fragments were separated on the 1.2% agarose gel with 1kb DNA ladder (M) as a DNA size marker.

```

*           20           *           40           *           60           *           80
AF445639 : ATGCTCCTGGCTGCCCTGTACTGCCTACTGTGGAGTTTCGGAACCTCCGCTGGCCACTTCCCTCGAGCCTGTGCCTCCTC
AY162287 : .....
JBC1: .....
JBC2: .....
Hanwool: .....
Hanwoo2: .....

*           100          *           120          *           140          *           160
AF445639 : CAAGAGCCTGACGGAGAAGGAGTGTGCCCGCCCTGGGCGGGCGATGGGAGCCCTGTGGCCGGCTCTCAGGCAGGGGCT
AY162287 : .....
JBC1: .....
JBC2: .....
Hanwool: .....
Hanwoo2: .....

*           180          *           200          *           220          *           240
AF445639 : CCTGCCAGGACGTCACTCTGTCCACGGCACCCTCGGACCTCAGTTCGCCCTTACGGGGGTGGACGACCGGAGTCTTGG
AY162287 : .....
JBC1: .....
JBC2: .....
Hanwool: .....
Hanwoo2: .....

*           260          *           280          *           300          *           320
AF445639 : CCCTCCATCTTTTATAACAGAACTGCCAGTGTCTTAGCAACTTCATGGGATTCAATTGCGGAAGTTGTAAGTTTGGATT
AY162287 : .....
JBC1: .....
JBC2: .....G..
Hanwool: .....
Hanwoo2: .....G..

*           340          *           360          *           380          *           400
AF445639 : TAGGGGACCCCGCTGCACAGAAAGGCGACTTTTGGTGAGAAGAAACATCTTTGATTTGAGTGTCCCAGAGAAGAACAAT
AY162287 : .....
JBC1: .....
JBC2: .....
Hanwool: .....
Hanwoo2: .....

*           420          *           440          *           460          *           480
AF445639 : TTCTTGCTATCTCACTTTGGCAAACATACCACCGCCGACTACGTCACTCCACGGGCACCTATGGCCAAATGAAT
AY162287 : .....
JBC1: .....
JBC2: .....
Hanwool: .....
Hanwoo2: .....

*           500          *           520          *           540          *           560
AF445639 : CATGGAACAACCCCTGTTTAAATGACGTGAGTGTACGACCTCTTGTCTGGATGCATTATTATGTGTCAAGGGACAC
AY162287 : .....
JBC1: .....
JBC2: .....T..
Hanwool: .....
Hanwoo2: .....T..

```

Figure 12. Nucleotide sequences and mutations of the complete *TYR* cDNA. GenBank accessions AF445639 and AY162287 are previously reported in Holstein (Guibert et al., 2004) and Braunvieh (Schmutz et al., 2004), respectively. Dots indicate identical sequence to AF445639.

```

*           580           *           600           *           620           *           640
AF445639 : GCTGCTGGGGACTCTGAAGTCTGGAGAGACATTGATTTTGCTCATGAAGCCCCAGGTTTCCTGCCTTGGCATAGACTCT
AY162287 : .....
JBC1: : .....
JBC2: : .....
Hanwool1: : .....
Hanwool2: : .....

*           660           *           680           *           700           *           720
AF445639 : TCCTGCTGCTGTGGGAACAGGAAATCCAGAAGCTGACCGGGGATGAGAACTTCACGATTCCATACTGGGACTGGAGAGAT
AY162287 : .....
JBC1: : .....
JBC2: : .....
Hanwool1: : .....
Hanwool2: : .....

*           740           *           760           *           780           *           800
AF445639 : GCAGAAAACGTGTGACGTTTGACACAGATGAGTACATGGGAGGGCGCAACCCTGCAAACCTAATCTACTCAGCCCAGCATC
AY162287 : .....
JBC1: : .....
JBC2: : .....
Hanwool1: : .....
Hanwool2: : .....

*           820           *           840           *           860           *           880
AF445639 : CTTCTTCTCCTCTTGGCAGATCGTCTGCAGCAGACTGGAGGAGTACAACAGTCGCCAGGCTTTATGCAACGGGACGCTCTG
AY162287 : .....
JBC1: : .....
JBC2: : .....
Hanwool1: : .....
Hanwool2: : .....

*           900           *           920           *           940           *           960
AF445639 : AGGGACCATTACTGCGCAATCCTGGAAACCACGACAAAGCCAGGACCCC-GAGGCTCCCCTCCTCGGCTGATGTGGAGTT
AY162287 : .....C.....
JBC1: : .....
JBC2: : .....
Hanwool1: : .....
Hanwool2: : .....

*           980           *           1000          *           1020          *           1040
AF445639 : TTGCCTGAGTTTGACCCAGTATGAATCAGGTTCCATGGATAAAGCTGCCAATTCAGCTTTAGAAATACCCITGGAAGGAT
AY162287 : .....
JBC1: : .....
JBC2: : .....
Hanwool1: : .....
Hanwool2: : .....

*           1060          *           1080          *           1100          *           1120
AF445639 : TTGCTGATCCAGTTACTGGGATAGCAGATGCCTCTCAAAGCAGTATGCACAATGCCTTGACACATCTACATGAACGGAACG
AY162287 : .....
JBC1: : .....
JBC2: : .....
Hanwool1: : .....
Hanwool2: : .....

*           1140          *           1160          *           1180          *           1200
AF445639 : ATGTCCCAGGTACCAGGATCTGCCAATGATCCCATCTTCCTTCTTCATCACGCGTTTGTGACAGTATTTTTGAACAGTG
AY162287 : .....
JBC1: : .....
JBC2: : .....T.....
Hanwool1: : .....T.....
Hanwool2: : .....T.....

```

Figure 12 (Continued)

```

*      1220      *      1240      *      1260      *      1280
AF445639 : GCTTCGAAAGTATCATCCTCTTCAAGATGTTTATCCAGAAGCTAATGCACCCATTGGGCACAACCGGGAATCCTACATGG
AY162287 : .....
JBC1: : .....
JBC2: : .....
Hanwool1: : .....
Hanwool2: : .....

*      1300      *      1320      *      1340      *      1360
AF445639 : TTCTTTTCATCCCTCTCTACAGAAACGGTGACTTCTTTATTTTCATCCAAAGATCTAGGCTACGACTATAGCTACCTACAA
AY162287 : .....N.....
JBC1: : .....
JBC2: : .....
Hanwool1: : .....
Hanwool2: : .....

*      1380      *      1400      *      1420      *      1440
AF445639 : GATTCAGAACCGGACATTTTTCAAGATTACATTAAGCCCTACTTAGAACAAGCGCAACGAATCTGGCCGTGGCTCATTGG
AY162287 : .....
JBC1: : .....
JBC2: : .....
Hanwool1: : .....
Hanwool2: : .....

*      1460      *      1480      *      1500      *      1520
AF445639 : GGCAGCTGTGGTTGGGTCGGTCCCTTACTGCTGTGCTGGGAGGACTTACTAGCCTGTTATGTCGTCGAAAGAGAAACCAGC
AY162287 : .....
JBC1: : .....
JBC2: : .....
Hanwool1: : .....
Hanwool2: : .....

*      1540      *      1560      *      1580      *
AF445639 : TTCCAGAAGAAAAGCAGCCCTGCTCATGGAAAAAGAGGATTACCACAATTTGATGTATCAGAGCCATTTATGA
AY162287 : .....
JBC1: : .....
JBC2: : .....
Hanwool1: : .....
Hanwool2: : .....

```

Figure 12 (Continued)

한편, *TYRP1* 유전자의 cDNA를 이용한 RT-PCR에서는 기존의 보고(Guibert 등, 2004)와 비슷한 크기의 증폭산물이 확인되었고, 그 외에도 일부 한우와 제주 흑우에서 길이가 다른 증폭 산물을 확인하였다. 특히 한우의 경우 *TYRP1* 유전자 RT-PCR에서 500-bp의 비정상적인 증폭 산물만이 나타나기도 하였다(Figure 13). Figure 13에서 나타났던 500-bp 정도 길이의 밴드 절편에 대한 염기서열 분석 결과 exon 3-6번의 염기서열 뿐만 아니라 exon2와 마지막 exon 8번의 일부 분까지도 결여된 형태임을 확인하였다. 또한 앞에서 제시한 real-time RT-PCR 분석결과에서 *TYRP1*의 상대적 발현량 분석에 이용된 primer의 결합부위가 짧은 *TYRP1* 전사체에서는 포함되지 않았다. *TYRP1* 발현량의 분석에서 한우는 품종뿐만 아니라 홀스타인 백반에서 발현되는 것 보다 더 적은 것으로 나타났는데, 이는 아마도 이와 같은 PCR 증폭 산물도 그 원인일 것으로 추정된다.

TYRP1 유전자의 두 가지 증폭산물에 대한 염기서열 분석 결과는 Figure 14와 같다. 기존 보고에서와 같이 추정된 크기로 증폭된 절편의 염기서열 분석에서 한우와 제주흑우의 염기서열간의 차이는 없었다. Guibert 등(2004)이 Genbank에 등록된 홀스타인의 염기서열과 비교 시, 3 개의 염기치환을 확인되었으나, 본 연구에 공시된 Holstein에서는 한우나 제주흑우와 같은 염기서열을 나타내었고, 품종 특이 SNP는 확인할 수 없었다. 공시된 제주흑우, 한우 그리고 홀스타인의 *TYR* 및 *TRP-1* 유전자의 염기서열 분석 결과 품종 특이적인 변이는 없었지만, *TRP-1* 유전자에서 일부 한우와 제주흑우에서 기존에 보고가 되지 않은 일부 exon이 결실되는 mutation이 탐색되었다. *TYRP1* 유전자는 사람과 마우스, 고양이 등에서 이미 모색 발현과 깊은 관련이 있음이 보고되고 있다. 특히 마우스에서는 이 유전자가 *brown (B)* 좌위이고, 고양이에서는 이 *TYRP1* 유전자의 돌연변이가 chocolate 모색과 cinnamon 모색과 깊은 관련이 있음을 보고하고 있다 (Schmidt-Kuntzel 등, 2005). 한우와 제주흑우에서 나타나는 이 유전자의 mutation이 어느 정도 melanin의 생합성 및 모색 발현에 관여하는지는 아직 정확히 판단할 수 없으나, genomic DNA 상에서 추가 분석이 가능되고 보다 많은 소 품종 및 개체에서 더 많은 연구가 진행된다면 이 변이에 대한 평가가 이루어질 것으로 판단된다. Strum 등(1995)의 보고에 따르면 사람의 *TYRP1* 유전자는 8개의 exon으로 구성되고 약 24-kb genomic DNA 상에서 퍼져 있는 것으로 보

고하고 있다. 한우와 제주흑우 일부 개체에서 나타나는 이러한 비정상적인 RT-PCR 결과에 대한 원인을 찾기 위한 유전체 연구와 모색과의 관계 구명이 필요하다고 사료된다.

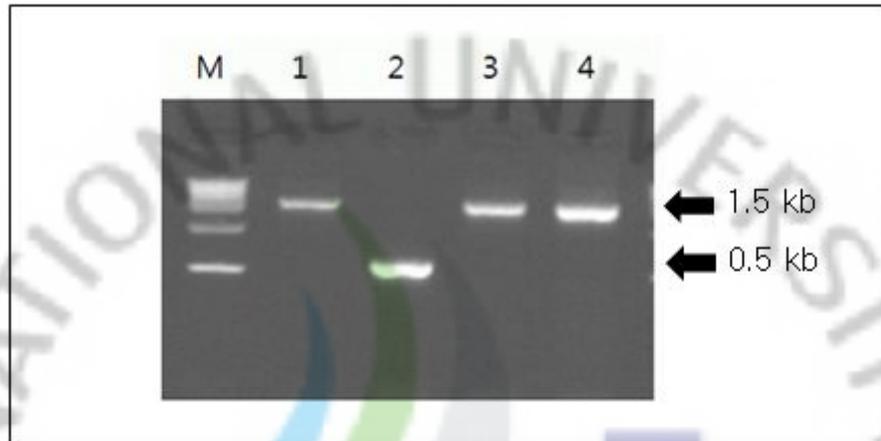


Figure 13. RT-PCR analysis of *TYRP1* gene. Lane 1-2, Hanwoo; 3, JBC; 4, Holstein black skin. Arrows indicate the 1.6-kb and 500-bp sized amplified fragments. The amplified full-length cDNA fragments were separated on the 1.2% agarose gel with 1kb DNA ladder (M) as a DNA size marker.

```

*           20           *           40           *           60           *           80
AF445639 : ATGAAATCTCCTACACTCCCTCTCTCTGGGTTACATGTTCCTAGTCCTGCTTTTTTTTCAGCAGGCCTGGGCTCAGTTC
Holstein : .....
JBC       : .....
Hanwoo    : .....
Abnormal  : .....

*           100          *           120          *           140          *           160
AF445639 : AAGAGAGTGTGCTACCATTGAGGCTTTGAGGAATGGCGTGTGTTGCCAGACCTGTCCCACTGTCTGGGCTGGGCTCTG
Holstein : .....
JBC       : .....
Hanwoo    : .....
Abnormal  : .....

*           180          *           200          *           220          *           240
AF445639 : ACCGCTGCGGTCCTCATCAGGGAGGGGAGGATGTGAGGTGGTGATAGCCGACTCCCGGGCCCCACAGCCACCCTACCCG
Holstein : .....
JBC       : .....
Hanwoo    : .....
Abnormal  : .....

*           260          *           280          *           300          *           320
AF445639 : CACGATGGCAGAGATGACCGAGAGGGCTGGCCACACGCTCCTTCAACAGGACATGCCACTGCAATGGCAATTTCTCAGG
Holstein : .....T.....
JBC       : .....T.....
Hanwoo    : .....T.....
Abnormal  : .....T.....

*           340          *           360          *           380          *           400
AF445639 : ACACAACGTGGAACTGCGCCCTGGCTGGGGAGGGGCTGCCGTGACCAGAGGGTTCACAGTCAGGAGAAACCTTC
Holstein : .....
JBC       : .....
Hanwoo    : .....
Abnormal  : .....

*           420          *           440          *           460          *           480
AF445639 : TGGACTTAAGCACAGAAAGAAAAGAACCGCTTTGTCCGGGGCCCTGGATATGGCAAAGCGCACCACTCACCCTCAGTTGTC
Holstein : .....
JBC       : .....
Hanwoo    : .....
Abnormal  : .....

*           500          *           520          *           540          *           560
AF445639 : ATTGCCACAAGGAGGTCAGAAGAAATACTGGGGCCAGATGGCAACACACCGCAGTTTGAGAACAATTTCCATTTATAACTA
Holstein : .....
JBC       : .....
Hanwoo    : .....
Abnormal  : .....

*           580          *           600          *           620          *           640
AF445639 : CTTGCTTTGGACACACTACTACTCAGTCAAAAAGACTTTC TTGGGAGCAGGACAGGAAAGCTTTGGGTGAGGTGGATTTCT
Holstein : .....
JBC       : .....
Hanwoo    : .....
Abnormal  : .....

```

Figure 14. Nucleotide sequences and mutations of the complete *TYRPI* cDNA. Abnormal indicates the about 500-bp *TYRPI* cDNA sequences newly found in Hanwoo and JBC. GenBank accessions AF445638 is previously reported in Holstein (Guibert et al., 2004). Dashes and dots indicate deletion and identical sequence to Holstein, respectively.

```

*           660           *           680           *           700           *           720
AF445639 : CTCACGAGGGACCAGCATTTCACCTGGCACAGGTACCACTGCTGCAGCTGGAGAGAGACATGCAGGAAATGTTGCAG
Holstein : .....
JBC      : .....
Hanwoo   : .....
Abnormal : .....

*           740           *           760           *           780           *           800
AF445639 : GATCCTTCTTTCTCCCTCCCTTACTGGAATTTTGCCACTGGGAAGAACACCTGCGACATTTGCACCGATGACTTGATGGG
Holstein : .....
JBC      : .....
Hanwoo   : .....
Abnormal : .....

*           820           *           840           *           860           *           880
AF445639 : ATCAAGAAGCAACTTTGATTCCACTTTATAAGCCCGAACTCTGTCTTTTCTCAATGGCGAGTGGTCTGCGAAATCCCTTGG
Holstein : .....
JBC      : .....
Hanwoo   : .....
Abnormal : .....

*           900           *           920           *           940           *           960
AF445639 : AAGATTATGATACCCTGGGAACCCTTTGCAACAGCACTGAGGGTGGGCCAATTAAGAGAAACCCAGCTGGAAATGTGGCC
Holstein : .....
JBC      : .....
Hanwoo   : .....
Abnormal : .....

*           980           *           1000          *           1020          *           1040
AF445639 : AGGCCAATGGTGCAACGTC'TPCCTAAACCACAGGATGTCGCGCAGTGCTTGGAAAGTTGGTTCATATGACACACCTCCTTT
Holstein : .....T.....
JBC      : .....T.....
Hanwoo   : .....T.....
Abnormal : .....

*           1060          *           1080          *           1100          *           1120
AF445639 : TTATTCTAATTCACAAACAGCTTCCGAAACACAGTGGAAAGGTTACAGTCATCCACAGGAAGGTATGACCCCTGCTGTGC
Holstein : .....
JBC      : .....
Hanwoo   : .....
Abnormal : .....

*           1140          *           1160          *           1180          *           1200
AF445639 : GAAGCCTTCACAATTTGGCTCATCTATTCCCTGAATGGAACAGGGGGACAAACTCATTATATCCTCCCAATGATCCTATTTT
Holstein : .....
JBC      : .....
Hanwoo   : .....
Abnormal : .....

*           1220          *           1240          *           1260          *           1280
AF445639 : GTCCTCCFACATACATTCACCTGATGCAGTATTTGATGAATGGCTGAGGCGATACAATGCTGATATATCCACATATCCACT
Holstein : .....C.....
JBC      : .....C.....
Hanwoo   : .....C.....
Abnormal : .....

```

Figure 14 (Continued)

```

*      1300      *      1320      *      1340      *      1360
AF445639 : GGAAAAATGCCCCCTATTGGACATAACAGACAATAACAATATGGTACCATTTTGGCCGCCAGTTACCAACATAGAAATGTTTG
Holstein : .....
JBC      : .....
Hanwoo   : .....
Abnormal : .....

*      1380      *      1400      *      1420      *      1440
AF445639 : TTACTGCTCCAGACAACCTGGGGTATACTTACGAAGTTCAATGGCCAAGTCGGAGTTTTAGCATTTCTGAGATTGTCACC
Holstein : .....
JBC      : .....
Hanwoo   : .....
Abnormal : .....

*      1460      *      1480      *      1500      *      1520
AF445639 : ATAGCAGTAGTGGCTGCATTATCACTGGTTGCGGTCATTTTGGGGGCGCTTCTTGTCTGATTTCGTGCCAGAAGCAACAT
Holstein : .....
JBC      : .....
Hanwoo   : .....
Abnormal : .....

*      1540      *      1560      *      1580      *      1600
AF445639 : GGATGAAGCAAATCAGCCTCTCCTTACTGATCAGTATCAACACTACATTGAAGAATATGAAAAAATCCATAATCCTAACC
Holstein : .....
JBC      : .....
Hanwoo   : .....
Abnormal : .....

*      1620      *      1640      *
AF445639 : AGTCTGTGGTCTAGTGACAAGTGTAATTCTCATATGCATTGAATCATAAA
Holstein : .....
JBC      : .....
Hanwoo   : .....
Abnormal : .....

```

Figure 14 (Continued)

4. 한우 알비노 원인 유전자 및 돌연변이 분석

무색소증 한우에서 채취한 모발에 대한 melanin 함량 분석 결과, total melanin의 함량에서 한우의 황색 모발과 Holstein 백반-무색소증 한우의 모발 그룹으로 크게 구분되며 유의적인 차이($P < 0.05$)를 나타내었다(Figure 15). 특히 측정치의 평균에서 A500에서 한우 황색 모발은 0.172 ± 0.014^a 로 가장 높고, Holstein 백색 모발(0.062 ± 0.019^b), 무색소증 한우 모발(0.050 ± 0.015^b) 순으로 확인되었다. Holstein 백색 모발과 무색소증 한우 모발 모두 한우의 황색 모발에 비해 유의적으로 낮은 수준의 melanin 함량을 나타내었다. 특이할만한 점은 Holstein의 백색 모발에 비해 무색소증 한우 모발의 melanin 함량이 더 낮은 수준을 보인다는 점이다.

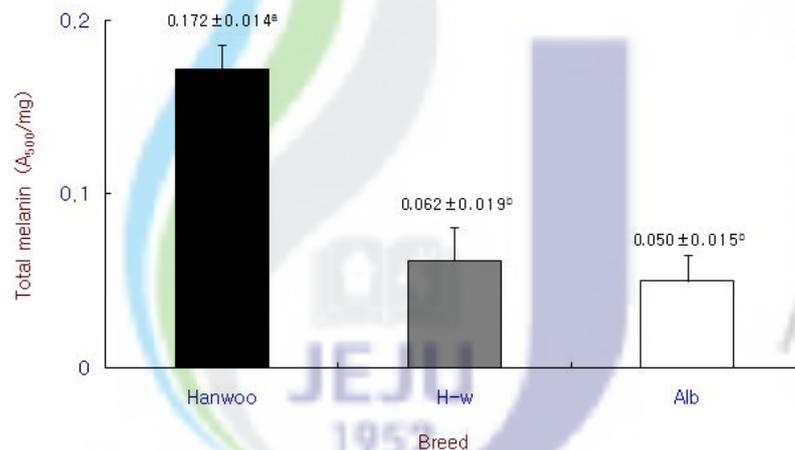


Figure 15. Total melanin contents for the hairs collected from yellow hairs of Hanwoo, white hairs of Holstein(H-w), and white hairs of albino Hanwoo(Alb). Means marked by different superscripts on the bars within the graph are significantly different ($P < 0.05$).

이러한 결과는 둘 다 백색 모발을 나타내기는 하지만 Holstein의 경우 전신이 백모색이 아니라 흑모색을 기본 모색으로 하고 부분적으로 백반이 출현한다는 점에서 피부와 눈, 모발 등에서의 melanin 침착과정이나 색소세포에서의 유전자

발현 양상이 무색소증과는 다른 대사과정을 통해 형성되었을 가능성을 추정할 수 있다.

무색소증 한우의 모발에는 melanin이 없을 것이라는 예상과 유사하게 total melanin 함량 분석에서 무색소증 한우의 모발에서의 측정치가 가장 낮은 수준을 나타내었다. 비록 측정치가 blank로 설정한 Soluene-350(A500=0.000으로 설정)과 수준보다는 다소 높은 수준을 나타내었으나, 황색이나 흑색 모발에서의 수준과 비교했을 때는 거의 없는 수준이라고 할 수 있다. 단지 실험과정에서 blank인 용매는 순수한 Soluene-350과 증류수를 9:1로 혼합한 상태이나, 무색소증 한우 시료의 경우 세척과정을 거쳤다고는 하더라도 melanin과 유사한 화학구조물이 생체 내외부에서 유입되었을 가능성이 없지 않고, melanin이 아닌 유사 유기화합물이 모발 내에 존재했을 가능성 역시 다분하기 때문에 A500의 흡광도가 완전히 0.000이 되지 않은 것은 당연한 결과로 사료된다. 이런 점들을 감안하더라도 전신에 백색 모발만을 나타낸 백색 한우는 total melanin 함량이 가장 낮은 수준이라는 점에서는 무색소증(albinism)에 의해 형성된 표현형 발현이라고 사료되었다.

백색 한우의 피부과 모발형성 부위에서 색소세포의 존재와 melanin 생합성 대사 단백질 중 핵심인 *TYR* 유전자의 발현 여부를 확인하기 위해 조직면역화학 염색 분석을 수행하였다. Figure 16은 황색 한우 어깨부위 피부조직과 무색소증 한우 귀의 피부조직에서 MC1R과 *TYR* 단백질 항체를 이용한 조직면역화학 염색의 결과를 나타낸 것이다. 1차 항체를 처리하지 않은 음성대조구에 비해 MC1R 항체 처리구에서 항원의 존재를 나타내는 발색이 황색 한우와 무색소증 한우에서 공히 관찰되었다. 이는 황색 한우뿐만 아니라 무색소증 한우에도 색소세포가 존재하고, 색소세포 내에서 *TYR* 단백질이 정상적으로 발현되고 있음을 나타내는 결과라 하겠다.

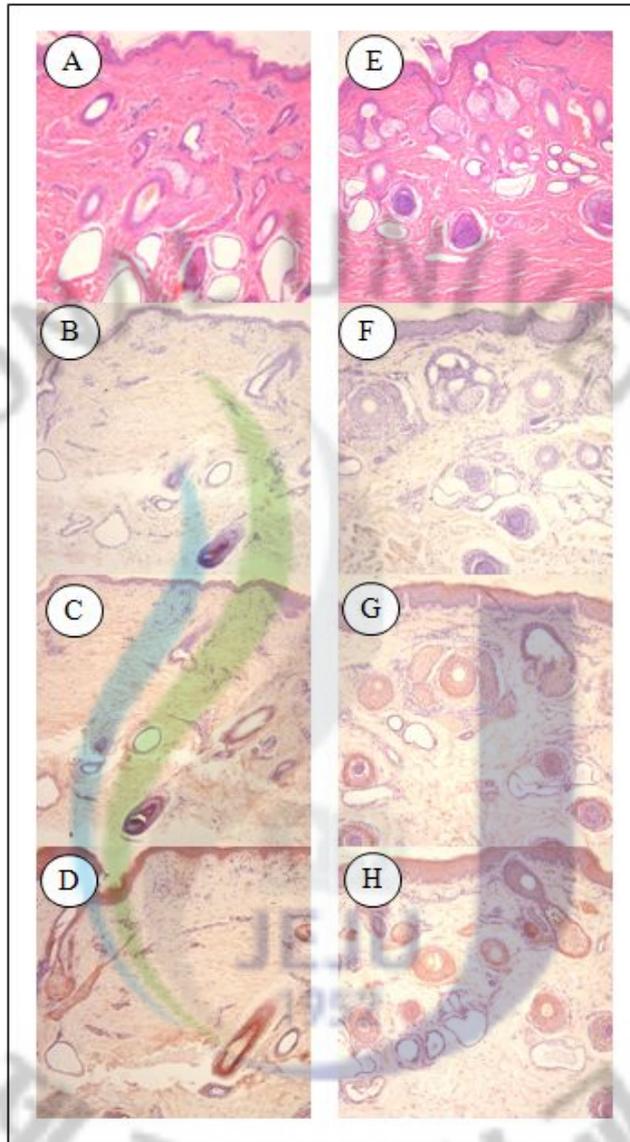


Figure 16. Immunohistochemical staining. A-D are the skins isolated from normal yellowish brown Hanwoo. E-H are ear skin from albino Hanwoo. A and E, eosin-hematoxylin staining; B and E, negative control (BSA); C and F, stained using polyclonal anti MC1R; D and H, stained using polyclonal anti TYR.

Figure 17은 황색 한우와 무색소증 한우의 귀 절편에서 색소세포를 직접 배양한 것이다. Figure 18은 분리 배양한 황색 한우와 무색소증 한우의 배양세포에서 색소세포의 존재를 flowcytometry를 이용하여 분석한 결과이다. 분리된 배양세포 중 색소세포의 동정은 색소세포 특이 항원인 S-100과 melanoma marker 단백질에 대한 1차 항체를 반응시켰고, FITC가 부착된 2차 항체를 반응시킨 후 flowcytometry를 이용하여 분석하였다. 한우와 무색소증 한우 모두에서 색소세포 특이 항체에 결합하는 색소세포의 존재를 확인할 수 있었다. 또한 flowcytometry 분석에서 항원-항체 반응을 수행한 시료를 형광현미경으로 관찰한 결과는 Figure 19과 같다. A에서 관찰되는 되는 세포들 중 화살표로 가리키는 세포만이 S100 항원에 대한 항체가 결합하였음을 B에서 확인할 수 있다. C는 A와 B의 상을 합쳐한 것이다. 즉, FITC(초록색)-conjugated 2차 Ab가 결합한 세포만이 색소세포이며 결합하지 않은 세포들은 색소세포가 아닌 다른 종류의 세포들에서 유래한 것으로 추정되었다.

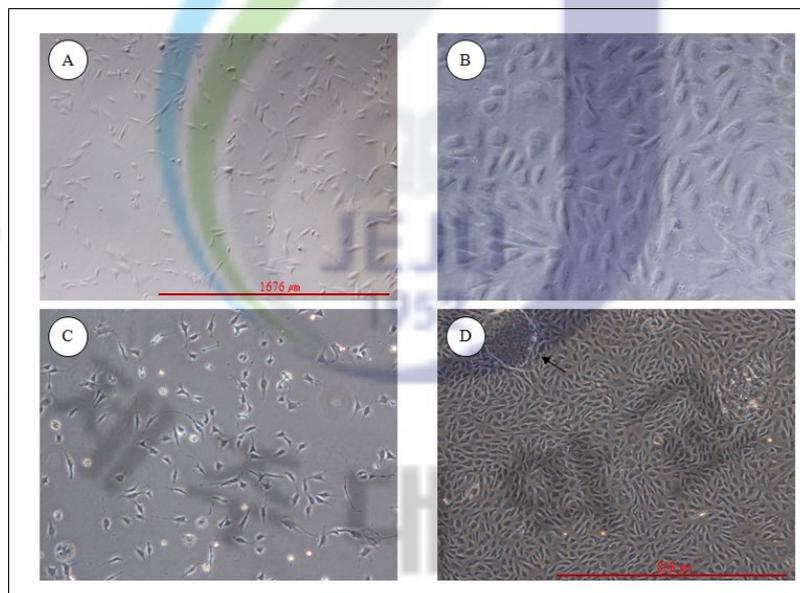


Figure 17. Melanocytes isolated from yellowish-brown Hanwoo (A and B) and albino Hanwoo (C and D). An arrow indicates the keratinocyte population co-isolated from albino Hanwoo. A, C, and D are 50× magnification but B is 100× magnification.

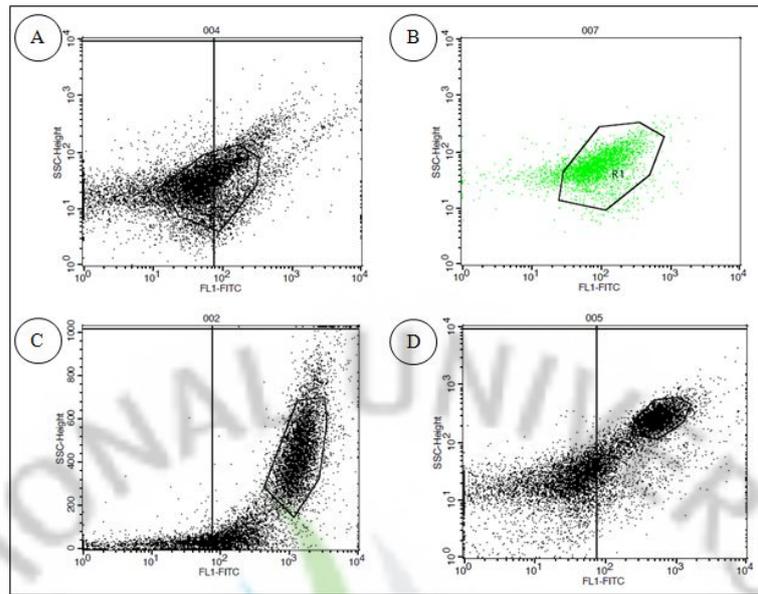


Figure 18. Flowcytometric analysis for confirming the melanocytes. A and B were cultured cells isolated from the ear section of yellowish-brown Hanwoo, and C and D did from albino Hanwoo, respectively. The melanocyte specific antigens, melanoma marker(A and C) and S-100(B and D) were used for detection of melanocytes.

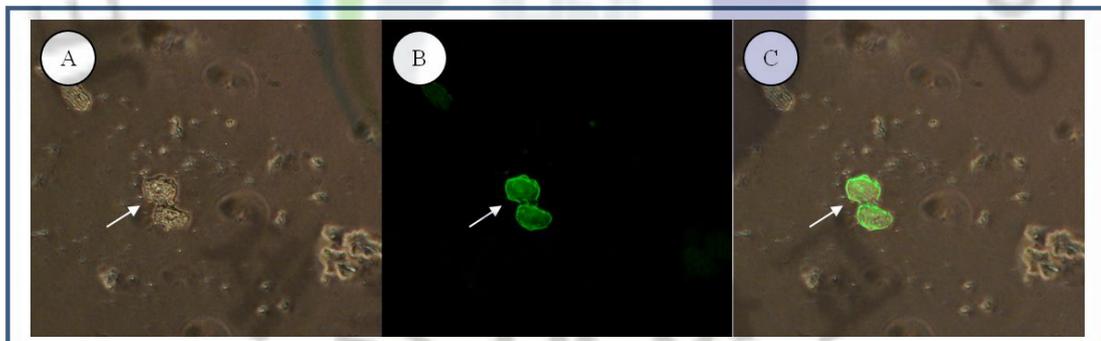


Figure 19. Immunofluorescent staining for melanocytes isolated from albino Hanwoo. Cells were stained with FITC-conjugated anti-mouse IgG for the 1st Ab, mouse melanoma marker antigen, after trypsin-EDTA treatment. Arrows indicate the identical melanocytes reacted with FITC-conjugated Ab. C is merged image.

소에서 알려진 또 다른 백색증은 Charolais 품종에서 나타나는 전신 백색증 (*Dc*)으로 *SILV* 유전자 내 exon1 g.64A>G 돌연변이와 깊은 관련이 있다 (Gutierrez-Gil 등, 2007). Charolais 백색증과 무색소증 한우의 비교를 위해 Charolais와 한우×Charolais의 F₁으로 추정되는 미황색 교잡우와 기타 품종들에 대한 유전자형을 분석하였다. Table 1은 *SILV* 유전자 g.64A>G 변이에 대한 품종과 모색별 분석결과를 나타낸 것이다. Charolais 품종에서는 전체 중 1 개체만 g.64A/G 이형접합이고 이 개체의 모색은 미황색으로 확인되었고, 나머지는 모두 g.64A/A(*Dc/Dc*)이며 모색은 모두 흰색을 나타내었다. 이 같은 양상은 Charolais와 한우의 교잡 F₁, 누진교잡 등에서 g.64A>G의 유전자형에 따라 모색이 황색(*dc+/dc+*), 미황색(*Dc/dc+*), 백색(*Dc/Dc*)으로 구분되었다. 반면 무색소증 한우에서는 모든 개체에서 *SILV* g.64G/G로 *dc+/dc+*로 확인되어 한우에서 발견되고 있는 백모색 한우들은 Charolais의 *SILV* 유전자 변이 형성된 것이 아니라 판단되었다.

Table 1. Genotype distribution of *SILV* g.64A>G in cattle breeds

Breed	genotype			allele frequency	
	<i>dc+/dc+</i>	<i>Dc/dc+</i>	<i>Dc/Dc</i>	<i>dc+</i>	<i>Dc</i>
Charolais (17)	0	1	16	0.029	0.971
C×K F ₁ (4)	0	4	0	0.500	0.500
C×K crossbred (24)	0	22	2	0.458	0.542
(C×K)×K (1)	1	0	0	1.000	0.000
Angus (9)	9	0	0	1.000	0.000
A×Hf (5)	5	0	0	1.000	0.000
Hereford (10)	10	0	0	1.000	0.000
Holstein (22)	22	0	0	1.000	0.000
Hanwoo ¹ (202)	202	0	0	1.000	0.000
JBC (31)	31	0	0	1.000	0.000
Hanwoo albino (7)	7	0	0	1.000	0.000

Number of animals for each breed were described in the parentheses.

¹ Normal yellowish-brown colored Hanwoo population.

C, Charolais; A, Angus; Hf, Hereford; K, Hanwoo

이상의 결과들에서 무색소증 한우는 피부에 정상적으로 색소세포가 존재하고 melanin 생합성 관련 유전자들도 정상적으로 발현하고 있는 것이 확인되었으며, Charolais 연관 *SILV* 유전자의 돌연변이와는 다르다는 것을 알 수 있었다. 황색 한우와 무색소증 한우에서 얻은 *TYR* 유전자에 대한 full length cDNA와 DNA 서열을 분석한 결과, 무색소증 한우의 *TYR* 유전자 full length cDNA에 대한 염기서열을 기준에 보고된 Holstein *TYR* 서열(AF445639)과 비교했을 때, 총 4 개의 SNP들(c.318A>G, c.515C>T, c.871G>A, c.1125C>T)이 확인되었고, 삽입/결실돌연변이는 발견되지 않았다(Figure 20, 21). 확인된 SNP들 중 두 개(c.318A>G와 c.1125C>T)는 amino acid의 서열에 영향을 미치지 않는 침묵돌연변이로 확인되었고, 나머지 두 개(c.515C>T, c.871G>A)는 amino acid 서열을 각각 p.172A>V(Ala>Val), p.291G>R(Gln>Arg)로 치환하는 것으로 확인되었다(Figure 22).

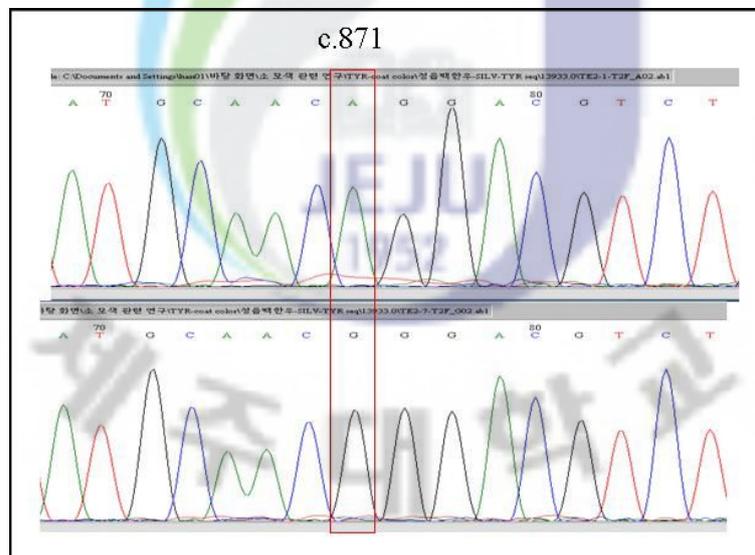


Figure 20. Nucleotide substitution mutation at *TYR* c.871G>A found in albino cattle in Hanwoo.

```

*      20      *      40      *      60      *      80
AF445639 : ATGCTCCTGGCTGCCCTGTACTGCCTACTGTGGAGTTTCCGAACCTCCGCTGGCCACTTCCCTCGAGCCTGTGCCTCCTC
AY162287 : .....
Albino1  : .....
Albino2  : .....
Albino3  : .....

*      100     *      120     *      140     *      160
AF445639 : CAAGAGCCTGACGGAGAAGGAGTGTGCCCGCCCTGGCGGGCGATGGGAGCCCTGTGGCCGGCTCTCAGGCAGGGGCT
AY162287 : .....
Albino1  : .....
Albino2  : .....
Albino3  : .....

*      180     *      200     *      220     *      240
AF445639 : CCTGCCAGGACGTCACTCTGTCCACGGCACCACTCGGACCTCAGTCCCCTTACGGGGTGGACGACCGCGAGTCTTGG
AY162287 : .....
Albino1  : .....
Albino2  : .....
Albino3  : .....

*      260     *      280     *      300     *      320
AF445639 : CCCTCCATCTTTTATAACAGAACCTGCCAGTGTCTTAGCAACTTCATGGGATTCATTGCGGAAGTTGTAAGTTTGGATT
AY162287 : .....
Albino1  : .....G..
Albino2  : .....G..
Albino3  : .....G..

*      340     *      360     *      380     *      400
AF445639 : TAGGGGACCCCGCTGCACAGAAAGGCGACTTTTGGTGAGAAGAAACATCTTTGATTGAGTGTCCCAGAGAAGAACAAGT
AY162287 : .....
Albino1  : .....
Albino2  : .....
Albino3  : .....

*      420     *      440     *      460     *      480
AF445639 : TTCTTGCTATCTCACTTTGGCAAACATACCACCAGCCAGACTACGTCACTCCACGGGCACCTATGGCCAAATGAAT
AY162287 : .....
Albino1  : .....
Albino2  : .....
Albino3  : .....

*      500     *      520     *      540     *      560
AF445639 : CATGGAACAACACCCCTGTTAATGACGTCACTGCTTACGACCTCTTTGTCTGGATGCATTATTATGTGTCAAGGGACAC
AY162287 : .....T..
Albino1  : .....T..
Albino2  : .....T..
Albino3  : .....T..

*      580     *      600     *      620     *      640
AF445639 : GCTGCTTGGGGACTCTGAAGTCTGGAGAGACATTGATTTTGGCTCATGAAGCCCCAGGTTTCTGCCTTGGCATAGACTCT
AY162287 : .....
Albino1  : .....
Albino2  : .....
Albino3  : .....

```

Figure 21. Nucleotide sequences of *TYR* cDNA from albino cattle in Hanwoo (Albino1, Albino2, Albino3). GenBank accessions AF445639 and AY162287 are previously reported in Holstein (Guibert et al., 2004) and Braunvieh (Schmutz et al., 2004), respectively. Dots indicate identical sequence to AF445639.

```

*           660           *           680           *           700           *           720
AF445639 : TCCTGCTGCTGTGGGAACAGGAAATCCAGAAGCTGACCGGGGATGAGAACTTCACGATTCCATACTGGGACTGGAGAGAT
AY162287 : .....
Albino1  : .....
Albino2  : .....
Albino3  : .....

*           740           *           760           *           780           *           800
AF445639 : GCAGAAAAGTGTGACGTTTGCACAGATGAGTACATGGGAGGGCGCAACCCTGCAAACCCTAATCTACTCAGCCCAGCATC
AY162287 : .....
Albino1  : .....
Albino2  : .....
Albino3  : .....

*           820           *           840           *           860           *           880
AF445639 : CTTCTTCTCCTCTTGGCAGATCGTCTGCAGCAGACTGGAGGAGTACAACAGTCGCCAGGCTTTATGCAACGGGACGTCTG
AY162287 : .....
Albino1  : .....
Albino2  : .....
Albino3  : .....

*           900           *           920           *           940           *           960
AF445639 : AGGGACCATTACTGCGCAATCCTGGAAACCACGACAAAGCCAGGACCCC.GAGGCTCCCTCCCTCGGCTGATGTGGAGTT
AY162287 : .....
Albino1  : .....
Albino2  : .....
Albino3  : .....

*           980           *           1000          *           1020          *           1040
AF445639 : TTGCCTGAGTTTGACCCAGTATGAATCAGGTTCCATGGATAAAGCTGCCAATTTTCAGCTTTAGAAATACCCCTGGAAGGAT
AY162287 : .....
Albino1  : .....
Albino2  : .....
Albino3  : .....

*           1060          *           1080          *           1100          *           1120
AF445639 : TTGCTGATCCAGTTACTGGGATAGCAGATGCCTCTCAAAGCAGTATGCACAATGCCTTGACATCTACATGAACGGAACG
AY162287 : .....
Albino1  : .....
Albino2  : .....
Albino3  : .....

*           1140          *           1160          *           1180          *           1200
AF445639 : ATGTCCCAGGTACCAGGATCTGCCAATGATCCCATCTTCCTTCTTCATCACGCGTTTGTGACAGTATTTTTGAACAGTG
AY162287 : .....
Albino1  : .....
Albino2  : .....
Albino3  : .....

*           1220          *           1240          *           1260          *           1280
AF445639 : GCTTCGAAAGTATCATCCTCTTCAAGATGTTTATCCAGAAGCTAATGCACCCATTGGGCACAACCGGGAATCCTACATGG
AY162287 : .....
Albino1  : .....
Albino2  : .....
Albino3  : .....

*           1300          *           1320          *           1340          *           1360
AF445639 : TTCCTTTCATCCCTCTCTACAGAAACGGTGACTTCTTTATTTTCATCCAAAGATCTAGGCTACGACTATAGCTACCTACAA
AY162287 : .....
Albino1  : .....
Albino2  : .....
Albino3  : .....

```

Figure 21 (Continued)

```

*      1380      *      1400      *      1420      *      1440
AF445639 : GATTCAGAACCGGACATTTTCAAGATTACATTAAGCCCTACTTAGAACCAAGCGCAACGAATCTGGCCGTGGCTCATTGG
AY162287 : .....
Albino1  : .....
Albino2  : .....
Albino3  : .....

*      1460      *      1480      *      1500      *      1520
AF445639 : GGCAGCTGTGGTTGGGTCCGTCCTTACTGCTGTGCTGGGAGGACTTACTAGCCTGTTATGTCGTCGAAAGAGAAACCAGC
AY162287 : .....
Albino1  : .....
Albino2  : .....
Albino3  : .....

*      1540      *      1560      *      1580      *
AF445639 : TTCCAGAAGAAAAGCAGCCCTGCTCATGGAAAAAGAGGATTACCACAATTTGATGTATCAGAGCCATTTATGA
AY162287 : .....
Albino1  : .....
Albino2  : .....
Albino3  : .....

```

Figure 21 (Continued)



```

*           20           *           40           *           60
Holstein : MLLAALYCLLWSFRTSAGHFPRACASSKSLTEKECCPPWAGDGSPOGRSLSGRGSCQDVIL
Braunvieh : .....
Albino : .....

*           80           *           100          *           120
Holstein : STAPLGPQFPFTGVDDRESWPSIFYNRTCQCFSNFMGFNCGSCKFGFRGPRCTERRLLVR
Braunvieh : .....
Albino : .....

*           140          *           160          *           180
Holstein : RNIFDLSVPEKNKFLAYLTLAKHTTSPDYVIPTGTYGQMNHGTTPLFNDVSAYDLFVVMH
Braunvieh : .....V.....
Albino : .....V.....

*           200          *           220          *           240
Holstein : YYVSRDTLLGDSEVWRDIDFAHEAPGFLPWHRLLFLLLWEQEIQKLTGDENFTIPLYWDWRD
Braunvieh : .....
Albino : .....

*           260          *           280          *           300
Holstein : AENC DVCTDEYMGGRNPANPNLLSPASFFSSWQIVCSRLEEYNSRQALCNGTSEG PLLRN
Braunvieh : .....
Albino : .....R.....

*           320          *           340          *           360
Holstein : PGNHDKARTPRLPSSADVEFCLSLTQYESGSMDKAANFSFRNTLEGFADPVTGIADASQS
Braunvieh : .....EA.LLG-----
Albino : .....

*           380          *           400          *           420
Holstein : SMHNALHIYMNGTMSQVPGSANDPIFLLHHAFFVDSIFEQWLRKYHPLQDVYPEANAPIGH
Braunvieh : .....
Albino : .....

*           440          *           460          *           480
Holstein : NRESYMPFIPLYRNGDFFISSKDLGYDYSYLQDSEPDIFQDYIKPYLEQAQR IWPWLIG
Braunvieh : .....
Albino : .....

*           500          *           520          *
Holstein : AAVG SVLTAVLGGLTSLLCRRKRNLPEEKQPLLMEKEDYHNLMYQSHL
Braunvieh : .....
Albino : .....

```

Figure 22. Alignment of TYR protein sequences in normal from Holstein and two albinos from Braunvich and Hanwoo. Hanwoo albino (Albino) TYR protein sequences were determined in this study. Those of Holstein (Guibert et al., 2004) and Braunvieh albino (Schmutz et al., 2004) are previously reported. Dashes and dots indicate deletion and identical sequence to Holstein, respectively.

TYR 유전자의 c.871G>A 돌연변이는 단백질 서열에서 p.291G>R의 amino acid 치환을 나타내었다. *TYR* 단백질은 N-glycosylation site, protein kinase C phosphorylation site, casein kinase II phosphorylation site, EGF-like domain signature 1, microbodies C-terminal targeting site, tyrosinase CuA-binding region signature, tyrosinase and hemocyanins CuB-binding region signature, laminin-type EGF-like domain signature 등 9 가지의 domain pattern들을 내포하고 있으며, 이 중 tyrosinase의 활성화에 필요한 N-glycosylation site는 N-{P}-[ST]-{P}의 서열 구조를 갖는다. 본 연구에서 확인된 *TYR* c.871G>A, 즉 p.291G>R은 소의 *TYR* 단백질에 출현하는 다섯 개의 N-glycosylation site 중 세 번째 site(-NGTS-)에서 Glycine(G)이 Arginine(R)로 치환된 것으로 현재까지 알려진 무색소증 관련 아미노산의 변이와는 전혀 다른 형태로 확인되었다. Mouse 등에서 N-glycosylation site의 amino acid의 변화가 무색소증을 원인이 될 수 있음이 보고되었으나, 이 경우는 염기치환에 의해 glycosylation site의 시작부위인 N(Asparagine)이 다른 amino acid로 치환되어 나타나는 경우이다.

한우에서 정상 개체와 알비노 개체의 *TYR* 단백질의 구조적 차이를 확인하기 위해 PsiPred program(Jones, 1999)을 이용하여 예측된 이차구조를 비교하였다(Figure 23). 정상 개체와 알비노 개체의 *TYR* 단백질 서열에서 아미노산 변이는 p.291G>R 뿐이고 나머지는 모두 동일하였다. *TYR* 단백질의 p.291G>R 변이, 즉 비극성이며 전하를 띄지 않는 아미노산 glycine이 양전하를 띤 아미노산 Arginine으로의 변화는 아미노산간의 상호작용에 의해 전체적인 단백질 구조에서 몇몇 helix와 beta sheet 구조에 영향을 주어, 단백질 내 여러 부위에서 구조적 변화가 유발될 수 있는 것으로 나타났다(Figure 23).

또한 SWISS-MODEL workspace의 비교 모델링 방법(homology modeling method)으로 각각의 *TYR* 서열들의 예측된 3차 구조를 비교했을 때, 알비노 한우의 *TYR* 단백질은 정상 한우, 홀스타인의 구조와 현격히 다른 예측된 3차 구조를 형성하는 것으로 확인되었다(Figure 24). 이러한 *TYR* 단백질의 2차, 3차 구조의 변화가 무색소증을 유발하는 원인으로 추정되나, *TYR* p.291G와 p.291R의 구조변화가 *TYR* 단백질의 기능을 완전히 감소시킨다는 가설을 증명하기 위

해서는 향후 세포, 분자 수준의 심층적인 연구가 수반되어야 할 것이다. 또한 비교 모델링에 이용된 template와의 동일성은 15% 정도로 소 TYR 단백질의 정확한 구조를 예측하기에는 낮은 수치로 보다 정밀한 단백질 구조 분석 방법 등에 대한 검토가 필요한 것으로 사료된다.

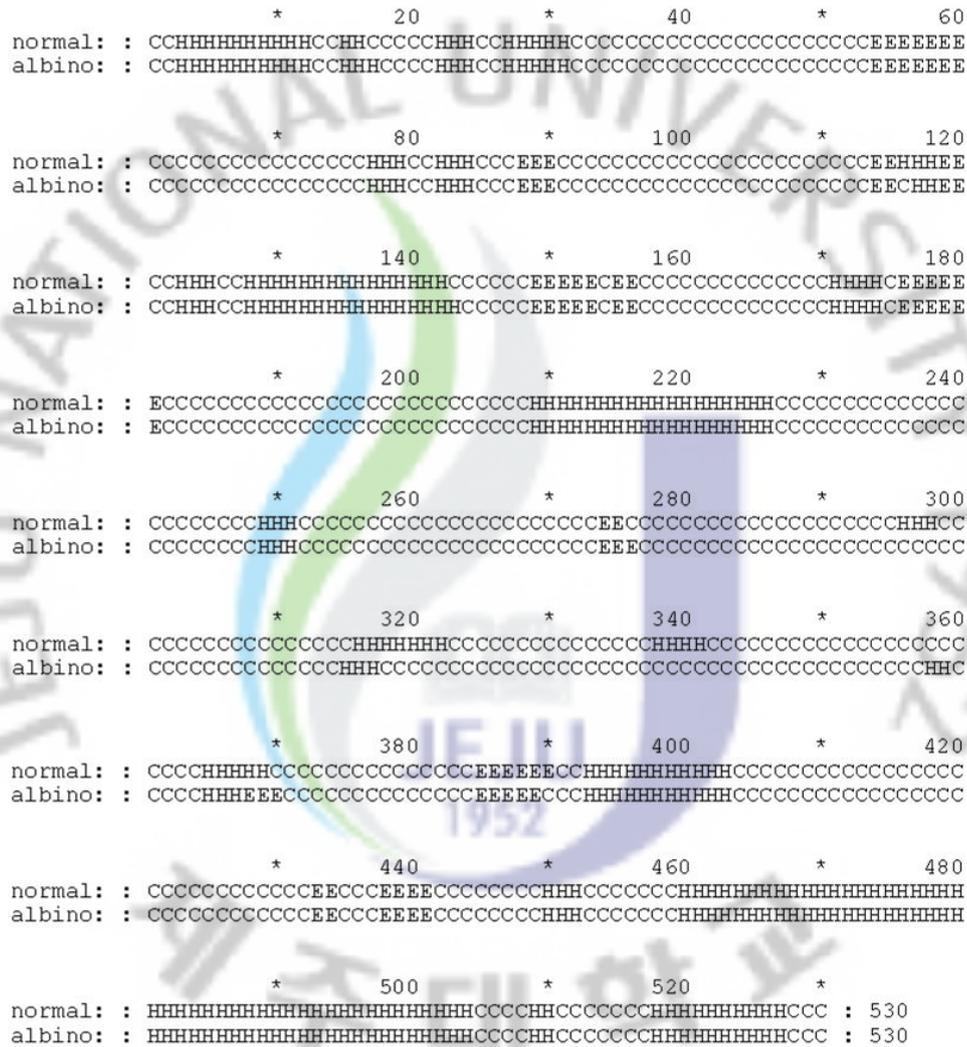


Figure 23. Prediction of secondary structure for TYR protein in Hanwoo (normal) and Hanwoo albino (albino). Symbols in the sequences C, E and H represent random coil, β -sheet and α -helix, respectively.

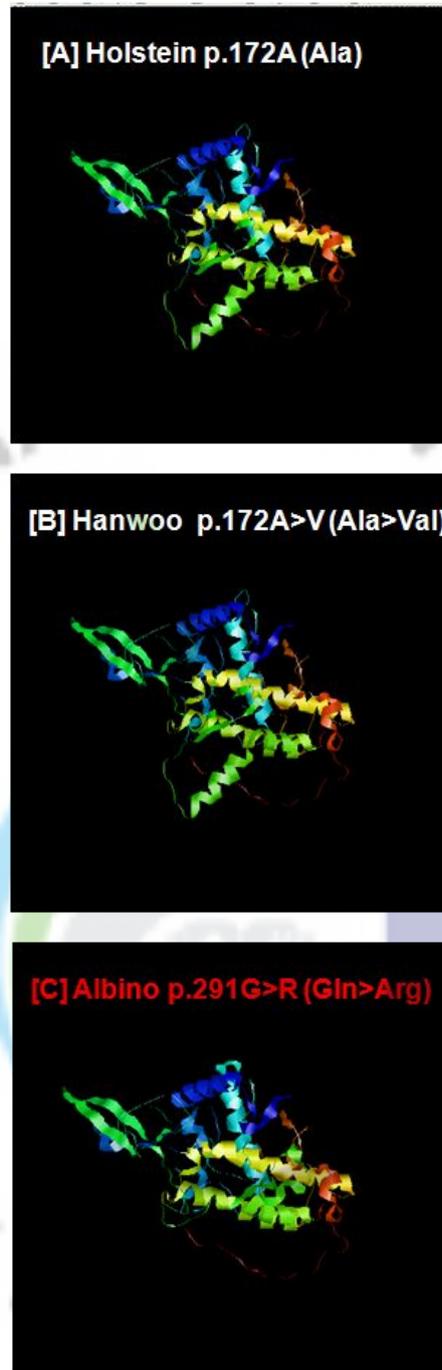


Figure 24. Structural models constructed by homology modeling of the bovine TYR proteins in Holstein, Hanwoo and albino Hanwoo. Missense mutations p.172A in Holstein (Guibert et al., 2004), p.172A>V in Hanwoo and p.291G>R in albino Hanwoo are presented in [A], [B] and [C].

현재까지 소에서 무색소증의 발생에 대한 유전적 원인이 보고된 사례는 캐나다의 Braunvieh 품종에서 “Snowdrop”이라고 명명된 개체뿐이다(Schmutz 등, 2004). Snowdrop의 경우는 멜라닌 합성에서 핵심적으로 작용하는 *TYR* 서열 내 엑손 2의 c.926 번째 염기부터 시작되는 CCCC서열에 C 하나가 삽입된 틀변경돌연변이(frame-shift mutation)가 발생하여 전체 517 개의 amino acid로 이루어진 *TYR*이 316 개의 amino acid에서 끝나는 돌연변이 단백질이 되는 것으로 보고되었다. 반면 한우에서 발생한 무색소증 개체의 경우 *TYR* 유전자에서 확인된 염기변이들 중에서 c.871G>A에 의한 동형접합인 경우 무색소증 발생과 정확히 일치하는 결과를 보여주었다. Figure 25는 한우 무색소증 개체들의 가계도이며, 농가에서 수집한 정보와 유전자 분석 결과 중 *MC1R*, *TYR* c.871G>A에 대한 유전자형을 함께 표시한 것이다.

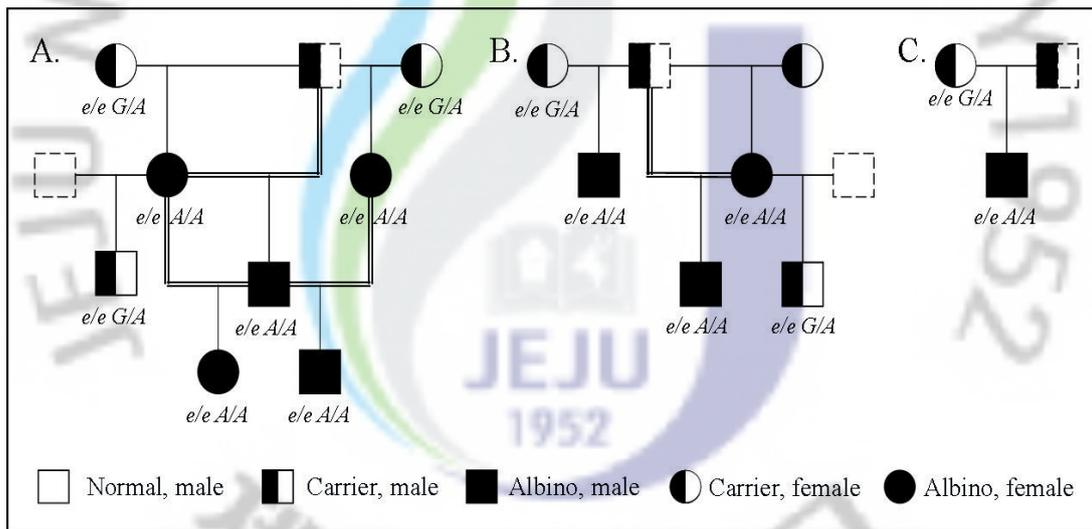


Figure 25. Three pedigrees for albino Hanwoo families. A, B, and C were collected from Joungeup and Sunchang in Jeollanam-do and Daejeon in Chungcheongbuk-do, respectively. The genotypes under the symbols indicate the *MC1R* and *TYR* c.871G>A, respectively.

Figure 25에서 무색소증 표현형은 상동염색체 열성동형접합 개체에서만 출현하였으며, 이형접합자는 정상적인 황색 모발을 나타내는 것으로 미루어 보인자

(carrier)인 것으로 판단되었다. cDNA 및 DNA sequencing에서는 정읍 농가의 무색소증 한우 개체들(Figure 25 A)을 먼저 조사하였으며, 조사 결과에서 나타난 *TYR* 유전자의 c.871G>A 염기치환이 무색소증 한우가 발생한 전라북도 순창(Figure 25 B)과 충청남도 대전(Figure 25 C) 농가의 개체들에게도 같은 양상을 보이는지를 조사하였다. 먼저 DNA 서열의 변이 c.871G>A를 관독하기 위해 PCR 증폭 primer의 염기서열을 변형하여 *MspI* 제한효소의 인지부위가 생성되도록 하였다. 이후 PCR로 증폭한 순창과 대전 농가의 무색소증 한우들, 이들과 혈연관계가 높은 개체들에 대한 *TYR* c.871G>A를 DNA 시료를 이용하여 확인하였다(Figure 26). 제한효소 *MspI*으로 제한 절단한 PCR 산물은 3 가지 유전자형(A/A, A/G, G/G)으로 분리되었으며, 무색소증을 나타낸 순창의 무색소증 한우 3 두와 대전 1 두에서 모두 A/A 유전자형이 검출되었고, 이들을 생산한 황색 어미소에서는 모두 이형접합자인 A/G로 확인되었다. 무색소증 한우 중 암소가 생산한 황색 송아지는 A/G의 이형접합으로 확인되었다.

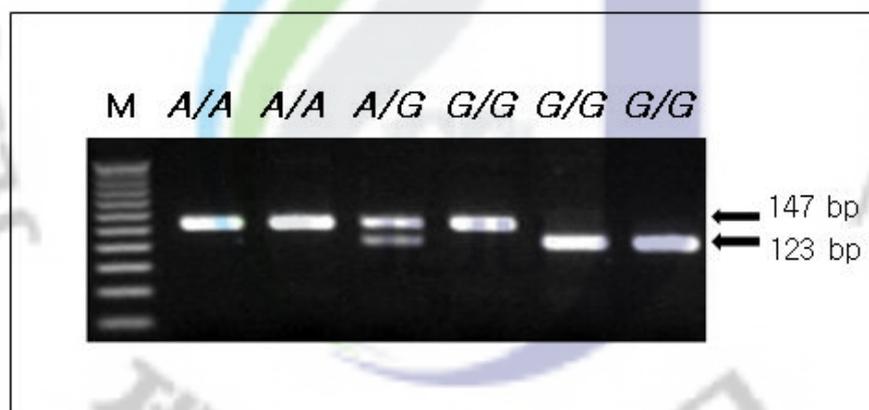


Figure 26. PCR-RFLP for *TYR* c.871G>A in the Hanwoo albino families. One of PCR primers were modified one nucleotide at near 3'-OH to form the *MspI* restriction site in wild type sequences. Bovine albinos were observed in the homozygotes A/A but not in heterozygote A/G and homozygotes G/G.

Table 2. Genotype and allele frequencies for *TYR* c.871G>A mutation in cattle

Breed	Coat color	n	<i>TYR</i> c.871G>A			Allele	
			genotype			frequency	
			<i>G/G</i>	<i>G/A</i>	<i>A/A</i>	<i>G</i>	<i>A</i>
Hanwoo ¹	yellowish brown/red	506	506	0	0	1.000	0.000
Hanwoo albino	white	9	0	0	9	0.000	1.000
Hanwoo carrier ²	yellowish brown	6	0	6	0	0.500	0.500
Hanwoo KPN ³	yellowish brown	154	154	0	0	1.000	0.000
Jeju Black cattle	brownish black/black	55	55	0	0	1.000	0.000
BK ⁴	yellowish black/black	29	29	0	0	1.000	0.000
Korean Brindle cattle	brindle(brown/black)	20	20	0	0	1.000	0.000
Charolais	white	15	20	0	0	1.000	0.000
Hereford	yellowish brown/red	10	10	0	0	1.000	0.000
Angus	black	5	5	0	0	1.000	0.000
Holstein	black or red with white spots	60	60	0	0	1.000	0.000
UI Crossbred ⁵	various	108	107	1	0	0.005	0.995
Total		977	966	6	9	0.015	0.985

¹ Normal, yellowish brown Hanwoo unrelated with albino families collected from Jeju(Jeju-do), Suwon(Gyeonggi-do), and Gangwon-do.

² Carriers were closely related with albinos.

³ KPN DNAs were isolated from freezing sperm provided from National Institute of Animal Science, Suwon in Gyeonggi-do.

⁴ BK were crossbred individuals produced between Hanwoo and Jeju Black cattle.

⁵ Breed-unidentified individuals collected from the Slaughterhouse of Jeju Agricultural Cooperation produced for commercial uses in farms.

무색소증의 원인인 *TYR* 유전자의 c.871A 대립인자가 정상인 한우와 다른 유색 품종들에서도 발견되지 않는지를 확인하기 위해 각 품종에 대한 집단유전학 분석을 수행하였다. Table 2는 조사 결과를 정리한 것이다. 제주도, 경기도, 강원

도에서 수집한 정상적인 황갈색 모색을 나타내는 한우 3 집단과 국립축산과학원에서 보관 중인 보증종모우(KPN) DNA 등에 대한 조사 결과 어느 집단에서도 *TYR* c.871A 대립인자는 발견되지 않았다. 한편, 제주축협 공판장으로 출하된 소들 중에서 1 두에서 *TYR* c.871A의 대립인자가 확인되어 제주도 지역 내에서 보인자를 갖는 개체들이 존재하고 있을 가능성이 있었다.

본 연구 조사에서 국립축산과학원에서 보관 중인 KPN DNA 154 두 중에서 *TYR* c.871A 대립인자가 출현하지 않은 점은 조사된 KPN 중에는 정읍, 순창, 대전의 무색소증 한우의 생산에 이용된 보증종모우가 없다는 것을 의미한다. 농가 현장 조사에서 인공수정용을 사용했었던 KPN에 대한 자료들을 일부 가지고 있었고, 그 중 일부가 본 연구에서 유전자형 분석에도 활용되었으나, 보인자인 개체들도 발견되지 않았으며, 현재 보유 중인 KPN DNA만으로는 정액을 제공한 KPN을 찾는 것은 불가능 할 것으로 판단되었다.

농림수산식품통계연보(2009)에 따르면 한우 사육 두수는 2008년 12월말 현재 2,430,389 두로 보고되고 있다. 이 중 본 연구에서 공시된 9 두의 알비노 한우를 적용하여 보면 발생률은 1:270,043으로 약 270,000 두 중 1 두가 발생하는 것으로 추정된다. 사람에서 보고되는 *TYR* 유전자 변이에 의한 OCA1 형의 발생률인 1:40,000 보다는 낮은 수치를 보인다. 그렇지만 열성 유전하는 알비노 유전양식의 특성상 보인자는 생각보다 많을 수 있다. 유전적 평형상태의 가정 하에서 한우 전체 집단의 알비노 보인자는 약 1:260 즉, 황색 한우 약 260 두 중 1 두는 보인자라는 추정이 가능하나, 현재 발생하고 있는 추세로 미루어 전라북도와 충청남도 등 서부지역에서의 빈도가 더 높고, 특정 지역이나 농가별 차이도 심할 것으로 추정된다. 또한 본 연구에서 조사한 KPN 154 두에서는 보인자가 전혀 발견되지 않았으나, 현재까지 보급된 KPN의 수가 480 여 두인 점을 감안하면 향후 무색소증을 나타내는 송아지의 출현 빈도는 더 높아질 수도 있는 것으로 추정된다.

본 연구에서 무색소증 한우의 출현이 *TYR* 유전자의 c.871G>A 돌연변이에 의한 결과인 점이 확인되었으나, 아직까지 *TYR* c.871G>A 돌연변이의 발생이 melanin 대사에 있어 단백질의 기능에서 어떠한 변화를 나타내는지에 대한 정확한 근거 자료는 마련되어 있지 않아, 향후 돌연변이 *TYR* 단백질의 기능에 심층

적인 연구가 수반되어야 할 것으로 사료된다. 그럼에도 불구하고 유전자 돌연변이의 발생이 가계도 상에서의 열성유전양상과 정확히 일치하고, 해당 유전자형이 정상적인 모색 양상을 나타내는 다른 소들에서는 전혀 발견되지 않는다는 점에서 한우 무색소증 발생에 대한 가장 강력한 원인으로 사료된다.

한우의 기본모색을 황색으로 규정하고 있는 한우의 등록체계 하에서 지금껏 이모색을 지닌 개체들은 타 품종과 교잡이 의심되는 개체로 취급되고 있으며, 혈통등록에서도 탈락사유가 되어 왔다. 본 연구 결과에서 순수 한우 집단에서도 무색소증을 유발하는 원인유전자에 의한 이모색 순수 한우의 출현이 확인된 바, 향후 한우 집단의 유지와 순수성 판정 기법에 반드시 점검되어야 할 것으로 사료된다. 또한 다양한 모색 양상이 거의 배제되고 황색 한 가지만을 채택하게 되었던 외모심사의 기준에 대한 재설정이 요구되며, 아울러 혈통 등록 및 보증종모우 선정에도 분자유전학적 분석결과들이 반영되어야 할 것이다.

V. 요약

본 연구는 우리나라 재래소인 한우와 제주흑우 모색 특성을 설명하고, 한우에서 무색소증 발생에 대한 유전적 기초를 결정하고자 수행하였다.

소에서 모색 출현 양상의 특성을 살펴보기 위해, 모발에서 전체 melanin 함량을 정량적으로 분석하여 소 품종들 간에서 비교하였다. 전체 melanin의 수준은 다양한 소 품종들에서 모발을 수집하여 분광광도분석법으로 측정하였다. 흑모색 품종들 중에서 제주흑우의 전체 melanin 함량은 Holstein과 Angus에 비해 유의적($P < 0.001$)으로 낮았다. 반면 제주흑우의 전체 melanin 함량 수준은 황갈색 품종인 한우, 적색 품종인 Red Angus와 Red Holstein에 비해서는 유의적($P < 0.001$)으로 높았다. 또한 황색/적색 계열인 품종들 중에서는 한우의 전체 melanin 함량이 Red Angus와 Red Holstein에 비해 유의적($P < 0.001$)으로 낮았고, 한우 × Charolais 사이에서 생산된 미황색 교배 잡종들에 비해서는 유의적($P < 0.001$)으로 높은 수준을 나타내었다. 흑모색 Angus와 제주흑우, Red Holstein과 한우에서 pheomelanin에 대한 eumelanin의 상대 비는 각각 0.382, 0.359, 0.112, 0.124로 확인되었다. 이러한 결과들은 전체 melanin 함량과 eumelanin의 수준이 높은 소들이 피부에서 흑색 외피가 발생하고 전체 melanin 함량과 eumelanin 수준이 낮으면 황색/적색 외피가 발생함을 나타내어, 소의 모발과 모색 양상들이 전체 melanin과 eumelanin의 수준에 따라 결정된다는 것을 제안하고 있다.

모색 출현 양상과 유전자 발현의 상관관계를 밝히기 위해, 색소세포 내에서 melanin 생합성에 결정적인 역할들을 수행하는 *Tyrosinase* (*TYR*), *Tyrosinase-related protein 1* (*TYRP1*), and *Dopachrome tautomerase* (*DCT*) 세 유전자의 발현 양상을 반정량적 real time RT-PCR 기법으로 분석하였다. 세 유전자의 발현 수준에 대한 조사는 사전에 조사된 *MC1R* 유전자형에 따라 4 가지 대표적인 모색 부위 - *MC1R* e/e 한우의 황갈색, E^+/E^+ 제주흑우의 야생형 흑모색, E^D/E^D Holstein 우성 흑모색 부위와 백반 부위를 대상으로 수행하였다. Holstein 흑반에서 *TYR*, *TYRP1*, *DCT*의 발현 수준은 제주흑우에 비해 각각 4.5, 2.3, 2.5배 이상 유의적($P < 0.001$)으로 높았다. 또한, 제주흑우에서 이들 세 유

전자의 발현 수준은 한우보다 유의적($P < 0.001$)으로 높았다. 이러한 결과들은 한우, 제주흑우, Holstein에서 모색 표현형이 *TYR*, *TYRP1*, *DCT*의 전사 수준과 직접적인 상관관계가 있음을 보여주고 있다. 게다가, 이들 유전자의 발현 수준은 품종별로 대표적인 한우(e/e), 제주흑우(E^+/E^+), Holstein(E^D/E^D)의 대표적인 *MC1R* 유전자형 분포와 부합된 결과를 나타내었다. 이상의 결과들은 *MC1R* 유전자형이 소 피부에서 전체 melanin 함량을 결정하고 melanin 생합성을 책임지는 *TYR*과 하위 유전자들의 전사활성을 유도함을 나타내었다. 한우와 제주흑우에서 *TYR*과 *TYRP1*의 상보적 DNA 전체 서열을 결정하였다. 기존에 다른 품종들에서 보고된 서열들과 비교했을 때, *TYR* cDNA의 전체 암호화 서열들은 차이점이 없었다. 반면, 한우뿐만 아니라 제주흑우의 일부에서 몇 개의 exon들이 결실되어 형성된 짧은 변이 전사체가 새롭게 발견되었다. 이러한 발견에 기초하여 소에서 이 변이형 전사체와 모색 출현 양상의 상호관계에 대한 심층적인 연구가 요구되었다.

최근 우리나라 한우 농장들에서 백모색 송아지들이 보고되었다. 전체 9 두의 흰색 송아지들이 전라북도과 충청남도의 3 한우 농장에서 발견되었다. 가계 분석과 유전학적 조사를 위해 각각의 농장에서 해당 백색 송아지와 이들과 혈연관계가 높은 황갈색 한우 개체들을 수집하였다. 피부, 모발, 안구의 색에 대한 관찰 소견을 바탕으로 송아지들은 안피부무색소증(OCA)에 의해 발생한 무색소증으로, 이는 소 품종 중 전신 백색이 품종의 특징인 Charolais와 연관되지 않은 것으로 확인되었다. 송아지들은 눈과 피부를 포함한 모든 색소발생기관에서 melanin성 색소들을 결핍되어 있었다. 또한, 이들은 다른 포유동물의 OCA와 같은 상동염색체성 열성유전양상을 나타내었다. 무색소증 한우의 모발은 Holstein의 백반을 포함하여 조사에 이용된 모든 소 품종 중에서 가장 낮은 전체 melanin 함량을 나타내었다. 색소세포 특이 항원들을 이용한 조직면역화학 염색 분석 결과는 무색소증 한우 귀 피부에 색소세포가 존재한다는 증거를 제공하였다. 또한 색소세포 표지인자들을 이용한 flowcytometry 분석과 면역형광 염색 분석에서도 무색소증 한우에서 색소세포의 존재에 대한 조직학적 증거들을 추가로 확인하였다.

무색소증 한우와 이들과 혈연관계인 15 두의 DNA 시료들을 수집하여 포유류에서 강력한 후보 유전자들로 알려진 *SILV*와 *TYR* 유전자에 대한 무색소증의 발생에 대한 원인 돌연변이 검출에 이용하였다. 염기서열 분석 결과 *TYR* 유전자의 c.871G>A가 무색소증-특이 돌연변이로 확인되었으나 *SILV* 유전자에서는 전혀 특이할만한 염기변이가 없었다. 모든 무색소증 한우들은 *TYR* c.871A/A (C 유전자 좌위 인자형 c/c), 이들의 황갈색 어미소들과 형제-자매들은 모두 이형접합성인 *TYR* c.871A/G (C/c)를 나타내었다. 반면, 무색소증과 혈연관계가 없는 모든 한우 개체들은 동형접합성 *TYR* c.871G/G (C/C)를 나타내었다. *TYR* c.871G>A 돌연변이에 대한 유전자형 분포는 한우에서 무색소증 유전양상과 정확히 일치하였다. 집단유전학적 분석에 이용한 모든 DNA 시료들 중에서 단지 1 개체의 DNA에서만 *TYR* c.871G/A 이형접합자로 확인되었다. 하지만, 해당 개체가 품종식별이 되지 않은 채 도축된 개체여서 품종확인 불가능하였다. 소 품종들에서 각각의 모색에 대한 가계도 분석과 유전자형 분석의 결과들은 *TYR* c.871G>A 돌연변이가 한우에서 무색소증 개체와 보인자들을 검출하는 진단 분자표지인자가 될 수 있음을 보여주었다.

결론적으로, 소의 모색들은 주로 MSH 신호전달에 대한 1 차 반응 유전자인 *MC1R*, 색소세포 내에서 melanin 생합성을 담당하는 *TYR*, *TYRP1*, *DCT* 등의 유전자형을 유전적 배경으로 하여 조절되고 있다. 또한, 최근 우리나라에서 발생한 무색소증 한우들은 *TYR* 유전자의 돌연변이가 원인인 것으로 확인되었다. 본 연구의 결과들은 우리나라 재래 소 품종인 한우와 제주흑우의 품종식별체계와 모색 유전학에 대한 과학적 기초를 제공할 수 있을 것이다. 본 연구를 통해서 정립된 새로운 연구기법들은 모색 양상의 결정, melanin 함량의 측정, 무색소증 한우 및 보인자의 검출뿐만 아니라 우리나라 소 산업에서 분자유종을 가속화하는데 기여할 것으로 사료된다.

핵심어: 소, 모색, 색소세포, melanin, eumelanin, pheomelanin, *MC1R*, *TYR*, *TYRP1*, *DCT*, *SILV*, albino, 안피부무색소증, 한우, 제주흑우.

VI. 참고문헌

- Aigner, B., Besenfelder, U., Muller, M and Brem, G. 2000. Tyrosinase gene variants in different rabbit strains. *Mamm. Genome* 11:700-702.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. and Schwede, T. 2006. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22:195-201.
- Benkel, B. F., Rouvinen-Watt, K., Farid, H. and Anistoroaei, R. 2009. Molecular characterization of the Himalayan mink. *Mamm. Genome* 20:256-259.
- Bennett, D. C. and Lamoreux, M. L. 2003. The color loci of mice - a genetic century. *Pigment Cell Res.* 16:333-344.
- Blaszczky, W. M., Arning, L, Hoffmann, K.-P. and Epplen, J. T. 2005. A tyrosinase missense mutation causes albinism in the Wistar rat. *Pigment Cell Res.* 18:144-145.
- Blaszczky, W. M., Distler, C., Dekomien, G., Arning, L, Hoffmann, K.-P. and Epplen, J. T. 2007. Identification of a tyrosinase (TYR) exon 4 deletion in albino ferrets (*Mustela putorius furo*). *Anim. Genet.* 38:421-423.
- Borges, C. R., Roberts, J. C., Wilkins, D. G. and Rollins, D. E. 2001. Relationship of melanin degradation products to actual melanin content: application to human hair. *Anal. Biochem.* 290:116-125.

- Barrington, A. and Pearson, K. 1906. On the inheritance of coat-colour in cattle. I. Shorthorn crosses and pure Shorthorn. *Biometrika* 4:427-437.
- del Marmol, V. and Beermann, F. 1996. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS Letters* 381:165-168.
- Ding, B., Ryder, O. A., Wang, X., Bai, S. C., Zhou, S. Q. and Zhang, Y. P. 2000. Molecular basis of albinism in the rhesus monkey. *Mutation Research* 449:1-6.
- Giebel, L. B., Strunk, K. M. and Spritz, R. A. 1991. Organization and nucleotide sequences of the human tyrosinase gene and a truncated tyrosinase-related segment. *Genomics* 9:435-445.
- Girardot, M., Guibert, S., Laforet, M.-P., Gallard, Y., Larroque, H. and Oulmouden, A. 2006. The insertion of a full-length *Bos taurus* LINE element is responsible for a transcriptional deregulation of the Normande agouti gene. *Pigment Cell Res.* 19:346-355.
- Greene, H. J., Leipold, H. W., Gelatt, K. M. and Huston, K. 1973. Complete albinism in Beef shorthorn calves. *J. Hered.* 64:189-192.
- Gronskov, K., Ek, J. and Brondum-Nielsen, K. 2007. Orphanet J. Rare Dis. 2:43.
- Grosz, M. D. and MacNeil, M. D. 1999. The "spotted" locus maps to bovine chromosome 6 in a Hereford-Cross population. *J. Hered.* 90:233-236.

- Guibert, S., Girardot, M., Leveziel, H., Julien, R. and Oulmouden, A. 2004. Pheomelanin coat colour dilution in french cattle breeds is not correlated with the TYR, TYRP1 and DCT Transcription levels. *Pigment Cell Res.* 17:337-345.
- Gutierrez-Gil, B., Wiener, P. and Williams, J. L. 2007. Genetic effects on coat colour in cattle: dilution of eumelanin and phaeomelanin pigments in an F2-backcross Charolais × Holstein population. *BMC Genetic* 8:56.
- Haase, B., Brooks, S. A., Schlumbaum, A., Azor, R. J., Bailey, E., Alaeddine, F., Mevissen, M., Burger, D., Poncet, P.-A., Rieder, S. and Leeb, T. 2007. Allelic heterogeneity at the equine *KIT* locus in dominant white (*W*) horses. *PLoS Genetics* 3:e195.
- Halaban, R. S., Svedine, E., Cheng, Y., Smicun, R., Aron, N. and Heber, N. 2000. Endoplasmic reticulum retention is a common defect associated with tyrosinase-negative albinism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:5589-5894.
- Hennessy, A., Oh, C., Diffey, B., Wakamatsu, K., Ito, S. and Rees, J. 2005. Eumelanin and pheomelanin concentrations in human epidermis before and after UVB irradiation. *Pigment Cell Res.* 18:220-223.
- Hoekstra, H. E. 2006. Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates. *Heredity* 97:222-234.
- Imes, D. L., Geary, L. A., Grahn, R. A. and Lyons, L. A. 2006. Albinism in the domestic cat (*Felis catus*) is associated with a tyrosinase (*TYR*) mutation. *Anim. Genet.* 37:175-178.

- Ito, S. and Jimbow, K. 1983. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in hair and melanomas. *J. Investigative Dermatology* 80:268-272,
- Ito, S. and Wakamatsu, K. 2003. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review. *Pigment Cell Res.* 16:523-531.
- Jackson, I. J. 1993. Colour-coded swiches. *Nature* 362:587-589.
- Jackson, I. J. 1994. Molecular and developmental genetics of mouse coat color. *Annu. Rev. Genet.* 23:189-217.
- Jayasekera, U. and Leipold, H. W. 1981. Albinism in US Charolais cattle. *Ann. Genet. Sel. anim.* 13:213-218.
- Joerg, H., Fries, H. R., Meiferink, E. and Stranzinger, G. F. 1996. Red coat color in Holstein cattle is associated with a deletion in the MSHR gene. *Mamm. Genome* 7:317-318.
- Johansson-Moller, M., Chowdhary, R., Hellmen. E., Hoyheim, b., Chowdhary, B. and Andersson, L. 1996. Pigs with the dominant white coat color phenotype carry a duplication of the KIT gene encoding the mast/stem cell growth factor receptor. *Mamm. Genome* 7:822-830.
- Jones, D. T. 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* 292:195-202
- Kiefer, F., Arnold, K., Künzli, M., Bordoli, L. and Schwede, T. 2009. The

SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Research* 37, Database issue:D387-D392.

King, R. A., Mentink, M. M. and Oetting, W. S. 1991. Non-random distribution of missense mutations within the human tyrosinase gene in type I (tyrosinase-related) oculocutaneous albinism. *Molec. Biol. Med.* 8:19-29.

Klungland, H., Vage, D. I., Gomez-Raya, 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.

Kwon, B. S., Haq, A. K., Pomerantz, S. H. and Halaban, R. 1987. Isolation and sequence of a cDNA clone for human tyrosinase that maps at the mouse c-albino locus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84:7473-7477

Kwon, B. S., Halaban, R. and Chintamaneni, C. 1989a. Molecular basis of mouse Himalayan mutation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161:252-260.

Kwon, B. S., Haq, A. K., Wakulchik, M., Kestler, D., Barton, D. E., Franke, U., Lanoreux, M. L., Whitney, J. B., and Halaban, R. 1989b. Isolation, chromosomal mapping, and expression of the mouse tyrosinase gene. *J. invest. Derm.* 93:589-594.

Lamoreux, M. L., Wakamatsu, K. and Ito, S. 2001. Interaction of major coat color gene functions in mice as studied by chemical analysis of eumelanin and pheomelanin. *Pigment Cell Res.* 14:23-31.

Leipold, H. W., Huston, K. and Gelatt, K. N. 1968. Complete albinism in a

Guernsey calf. J. Hered. 59:218-220.

Lyons, L. A., Imes, D. L., Rah, H. C. and Grahn, R. A. 2005. Tyrosinase mutations associated with Siamese and Burmese patterns in the domestic cat (*Felis catus*). Anim. Genet. 36:119-126.

Miller, S. A., Dukes, D. D. and Polesky, H. F. 1988. Simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 16:1215.

Oetting, W. S., Fryer, J. P., Shriram, S. and King, R. A. 2003. Oculocutaneous albinism type 1: The last 100 years. Pigment Cell Res. 16:307-311.

Olson, T. A. 1980. Choice of a wild-type standard in colour genetics of domestic cattle. J. Hered. 71:442-444

Olson, T. A. 1999. Genetics of colour variation. In The genetics of cattle, pp. 33-53. edited by Fries, R. and Ruvinsky, A, CABI Publishing,

Ozeki, H., Ito, S., Wakamatsu, K. and Thody, A. J. 1996. Spectrophotometric characterization of eumelanin and pheomelanin in hair. Pigment Cell Res. 9:265-270.

Peitsch, M. C. 1995. Protein modelling by E-mail. Biotechnology 13:658-660.

Pielberg, R. G., Golovko, A., Sundstrom, E., Curik, I., Lennartsson, J., Seltenhammer, M. H., Druml, T., Binns, M., Fitzsimmons, C., Lindgren, G., Sandberg, K., Baumung, R., Vetterlein, M., Stromberg, S., Grabherr, M., Wade, C., Lindblad-Toh, K., Ponten, F., Heldin, C. H., Solkner, J. and

- Andersson, L. 2008. A *cis*-acting regulatory mutation causes premature hair graying and susceptibility to melanoma in the horse. *Nat Genet.* 40:1004-1009.
- Renieri, C., Ceccarelli, P., Gargiulo, A. M., Lauvergne, J-J. and Monacelli, G. 1993. Chemical and electron microscopic studies of cattle (*Bos taurus*) with four types of phenotypic pigmentation. *Pigment Cell Res.* 6:165-170.
- Robbins, L. S., Nadeau, J. H., Johnson, K. R., Kelly, M. A., Roselli-Rehfuss, L., Baack, E., Mountjoy, K. G. and Cone, R. D. 1993. Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 72:827-834.
- Santschi, E. M., Purdy, A. K., Valberg, S. J., Vrotsos, P. D., Kaese, H. and Mickelson, J. R. 1998. Endothelin receptor B polymorphism associated with lethal white foal syndrome in horses. *Mamm. Genome* 9:306-309.
- SAS. 1999. SAS/STAT software for PC. Release 8.01. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Sasazaki, S., Usui, M., Mannen, H., Hiura, C. and Tsuji, S. 2005. Allele frequencies of the extension locus encoding the melanocortin-1 receptor in Japanese and Korean cattle. *Anim. Sci. J.* 76:129-132.
- Schmidt-Kuntzel, A., Eizirik, E., O'Brien, S. J. and Menotti-Raymond, M. 2005. Tyrosinase and tyrosinase related protein 1 alleles specify domestic cat coat color phenotypes of the albino and brown loci. *J. Hered.* 96:289-301.

- Schmidtz, B. H., Buchanan, F. C., Plante, Y. and Schmutz, S. M. 2001. Linkage mapping of the tyrosinase gene to bovine chromosome 29. *Anim. Genet.* 32:119-120
- Schmutz, S. M., Berryere, T. G., Ciobanu, D. C., Mileham, A. J., Schmidtz, B, H. and Fredholm, M. 2004. A form of albinism in cattle is caused by a tyrosinase frameshift mutation. *Mamm. Genome* 15:62-67.
- Searle, A. G. 1968. Comparative genetics of coat colour in mammals. Logos Press. pp. 67-73
- Slominski, A., Tobin, D. J., Shibahara, S. and Wortsman, J. 2004. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol. Rev.* 84:1155-1228.
- Sponenberg, D. P., Ito, S., Eng, L. A. and Schwink, K. 1988. Pigment types of various color genotypes of horses. *Pigment Cell Res.* 1:410-413.
- Spritz, R. A., Strunk, K. and King, R. A. 1989. Molecular analysis of the tyrosinase gene in patients with tyrosinase-deficient oculocutaneous albinism. *Am. J. Hum. genet.* 47(suppl.): A221.
- Strum, R. A., O'sullivan, B. J., Box, N. F., smith, A. G., smit, s. E., Puttick, E. R. J., Parsons, P. G. and Dunn, I. S. 1995. Chromosomal structure of the human TYRP1 and TYRP2 loci and comparison of the tyrosinase-related protein gene family. *Genomics* 29:24-34.
- Sturm, R. A., Teasdale, R. D. and Box, N. F. 2001. Human pigmentation genes: identification, structure and consequences of polymorphic variation.

Gene 277:49-62.

Sulaimon, S. S. and Kitchell, B. E. 2003. The biology of melanocytes. *Vet. Dermatol.* 14:57-65.

Tomita, Y., Takeda, A., Okinaga, S., Tagami, H. and Shibahara, S. 1989. Human oculocutaneous albinism caused by single base insertion in the tyrosinase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164:990-996.

Tripathi, R. K., Strunk, K. M., Giebel, L. B., Weleber, R. G. and Spritz, R. A. 1992. Tyrosinase gene mutations in type I (tyrosinase-deficient) oculocutaneous albinism define two clusters of missense substitutions. *Am. J. Med. Genet.* 43:865-871.

Wakamatsu, K. and Ito, S. 2002. Advanced chemical methods in melanin determination. *Pigment Cell Res.* 15:174-183.

Yamamoto, H., Takeuchi, S., Kudo, T., Makino, K., Nakata, A., Shinida, T. and Takeuchi, T. 1987. Cloning and sequencing of mouse tyrosinase cDNA. *Jpn. J. Genet.* 62:271-274.

공업진흥청, 한국방송공사. 1991. 한국표준색표집. KBS 문화사업단

김동호, 오정엽. 1997. 색채 용어와 표색계. 한국색채학회 논문집 9:125-144.

김봉선, 배용철, 백선용, 석대현, 신동훈, 최인장, 황영일. 2004. 번역조직화학기법. 법문사

- 김태현, 윤두학, 박응우, 이해영, 오성중, 정일정, 탁태영, 김경남, 한재용. 2000. 소 품종별 melanocortin receptor 1 (MC1R) 유전자의 유전자형 빈도에 관한 연구. 한국동물자원과학회지 42:735-744.
- 김환경. 1963. 제주지방우의 모색분포에 관한 연구. 동아논총 제1집:33-45.
- 농림수산식품부. 2009. 농림수산식품통계연보. 농림수산식품부. pp. 126.
- 농촌진흥청 축산연구소. 2005. 축산연구 사업보고서 -권업모범장- 1906-1915. 농촌진흥청 축산연구소 pp. 213, 229.
- 박영일, 한성욱. 1971. 제주한우의 모색빈도에 관한 연구. 한국축산학회지 13:352-355.
- 신동원. 2004. 마문화연구총서 VIII 한국마의학사. 한국마사회 마사박물관. pp 204-209.
- 육종용, 김환경, 박항균, 윤희섭, 설동섭, 정창국. 1976. 한우. 향문사. pp. 11-13.
- 이기만, 박영일, 오봉국. 1998. 가축육종학. 향문사. pp 143-146.
- 이기만. 1970. 한우의 형질과 그 상관에 관한 연구. 한국축산학회지 12:141-142.
- 이성수, 양영훈, 강승률, 오운용, 양보석, 고서봉, 오성중, 김규일. 2000. 한우, 제주재래흑우, 흑모화우와 갈모화우에서의 MSH receptor(MC1R) 유전자의 유전자형과 빈도 비교. 한국동물자원과학회지 42:253-260.
- 정의룡, 김우태, 김연수, 한상기. 2000. 소 모색관련 유전자 MC1R의 PCR-RFLP Marker를 이용한 한우육 판별. 한국동물자원과학회지 42:379-390.

한국동물자원과학회 한우연구회. 2009. 한우컨설팅지침서. 한우자조금관리위원회.
pp. 36-37.

한상현, 김영훈, 조인철, 장병귀, 고문석, 정하연, 이성수. 2008. 소 MC1R 우성혹
모색 대립인자를 구분하는 변형 프라이머를 이용한 소 품종들의 유전자형 분
포 분석. 한국동물자원과학회지 50:633-640.

한성욱. 1996. 가축의 품종. 선진문화사. pp. 53-80.

