

최 종
연구보고서

한우 조직내 성호르몬 수준 및 성호르몬 합성과
신호전달 관련 유전자에 대한 성별 발현 비교와
유전자원을 이용한 선발체계 구축에 관한 연구

Studies on comparison of expression levels of
sex steroid hormone receptor genes and sex hormone
levels among sex phenotype in muscle and adipose
tissues and its application for breeding and
selection in Hanwoo

연구기관
전남대학교 농업생명과학대학

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “한우 조직내 성호르몬 수준 및 성호르몬 합성과 신호전달 관련 유전자에 대한 성별 발현 비교와 유전자원을 이용한 선발체계 구축에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 10월 14일

주관연구기관명 : 전남대학교

총괄연구책임자 : 백명기

세부연구책임자 : 한옥수

협동연구기관명 : 축산연구소

협동연구책임자 : 손삼규

협동연구책임자 : 최연호

요 약 문

I. 제 목

한우 조직내 성호르몬 수준 및 성호르몬 합성과 신호전달 관련 유전자에 대한 성별 발현 비교와 유전자원을 이용한 선발체계 구축에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

일반적으로 한우 암컷과 거세우의 육질은 우수하고, 수컷은 저조하다는 사실은 잘 알려져 있다. 하지만, 아직까지 국내는 물론 국외에서도 성별 쇠고기 육질에 미치는 요인에 대한 연구는 미미한 실정이다. 따라서 한우에 있어 암컷과 수컷 및 거세우와 수컷 간에 고급육 출현빈도의 차이에 대한 생리적 기작과 분자 유전적 특성을 구명하는 연구가 요구된다. 또한 한우의 성별 고급육 출현 관련 유전적 정보를 우량 축군 조기조성을 위한 기초 자료로 이용하여 한우의 체계적인 육종 전략 구축이 필요하다.

성별 육질의 차이는 성별로 다른 내분비계의 작용과 대사작용의 차이에서 비롯될 것으로 추정하며, 그 중에서도 특히 성호르몬 계의 차이가 가장 큰 영향을 미칠 것으로 생각된다. 암컷은 난소에서 분비되는 estrogen 등의 성호르몬 계의 영향을 많이 받는 것이 수컷과 거세우와의 차이점으로 암컷은 estrogen 등 난소에서 분비되는 성호르몬 수준이 높다. 수컷과 거세우의 생리적인 차이는 정소의 유무에 있으며, 따라서 정소에서 분비되는 androgen계 성호르몬의 수준 차이가 육질 등급에 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료된다. 수컷은 정소에서 분비되는 androgen 계의 호르몬 지배를 받아 testosterone 등의 호르몬 수준이 높다. 거세를 통하여 정소를 제거하게 되면, 더 이상 정소에서 testosterone 등의 호르몬이 분비되지 않는다. 따라서 거세우는 estrogen과 testosterone 등의 성호르몬 수준이 낮다.

성호르몬 등 steroid 호르몬의 신호는 일반적으로 세포질에 존재하는 해당

receptor와 복합체를 이룬 후 이 복합체가 핵으로 이동, 전사인자로 작용하여 타겟 유전자의 발현을 촉진하는 방향으로 작용한다. 정소에서 분비되는 testosterone 신호역시 세포질에 존재하는 androgen receptor (AR)를 통해서 전달된다. 아직 한우의 근육조직과 지방조직에서 AR 유전자 발현 양상 및 발현 조절에 대한 연구는 없으며, 외국에서도 성별 AR mRNA 수준을 비교한 결과가 없어 이에 대한 연구가 필요하다. 또한, 한우에서도 estrogen이 지방대사에 미치는 영향에 대한 연구가 절실하다. 구체적으로, 지방조직과 근육조직에서 estrogen receptor alpha (ERα) 유전자 발현 양상, testosterone을 estrogen으로 전변시키는 데 작용하는 aromatase 효소의 activity와 mRNA 발현 양상, estrogen에 의해서 발현이 조절되는 LPL 유전자의 발현 양상을 성별로 비교·분석할 필요가 있다. 이러한 data는 한우 육질 개선방안을 모색하는데 중요한 자료로 이용될 수 있을 것이다. 현재 우리나라의 육류등급화에 관한 연구는 한우의 수입육에 대한 차별화를 위하여 산업적으로 매우 중요한 의미를 지닌다. 특히, 한우의 유전능력을 정확히 파악하고 선발의 정확도를 높이기 위해서는 보유하고 있는 집단의 혈통을 파악하고 유전적 자질을 알기위해서 태어난 자손과 그 개체에 대한 발육과 번식성적은 물론 도체성적을 주기적으로 조사하여야 한다. 이러한 자료와 1, 2과제에서 밝혀진 유용유전자 정보를 바탕으로 정확한 한우의 선발 체계를 구축할 수 있는 기초 연구가 절실하다.

본 연구의 목적은 성호르몬 및 성호르몬 신호전달 관련 요인들을 성별로 비교·분석하여 육질에 미치는 요인을 밝히는 것이다. 연구 결과는 한우 선발체계 구축 등 육질을 증진하기 위한 방안을 모색하는 지침으로 활용할 수 있을 것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 과제에서는 근육조직과 지방조직에서 성호르몬 합성 및 신호전달 관련 유전자 발현 분석 방법을 확립하고 이들 유전자에 대한 성별 발현 비교 및 육질과의 연관성을 분석하였다. 한우 근육조직과 지방조직에 존재하는 스테로이드 호르몬 (α-androsterone, dehydroepiandrotestosterone, epitestosterone, testosterone, androstenedione, pregnenolone, progesterone 17α-hydroxyprogesterone, cortisone, 17α-estradiol, 17β-estradiol 등) 수준과 testosterone을 estrogen으로 전변시키는 효소인 aromatase

activity를 비거세우, 거세우, 암소에서 분석하고, 그 결과를 거세우에 있어서 육질 등급과의 상호관계를 분석하였다. 또한, 혈통관리 및 교배계획에 의하여 생산된 암수별 우량 축군 구축 및 한우개량과 관련된 유전정보를 이용한 조기 선발체계 기반 조성에 대한 연구를 수행하였다. 이러한 연구 결과는 한우육의 육질 향상 방안을 모색하기 위한 중요한 자료로 활용할 수 있을 것이다. 세부과제별 연구개발내용은 아래와 같다.

1. 한우 조직내 성호르몬 합성 및 신호전달 관련 유전자에 대한 성별 발현 비교

가. RT-PCR에 의한 성별 유전자 발현 분석

등심조직과 피하지방 조직에서 성별 AR 유전자 발현 수준을 RT-PCR 방법으로 비교·분석하였다. 등심 조직 AR 유전자 발현 수준은 거세우나 암소보다 비거세우 수소에서 유의적으로 ($p < 0.05$) 높았다. 거세우와 암소의 등심 조직 AR 유전자 발현 수준은 유사하였다. 반면 피하지방 AR 유전자 발현 수준은 거세우, 암소, 비거세우 수소에서 유사하여 차이가 없었다. 등심 조직과 피하지방 조직 모두에서 ER α 유전자 발현 수준이 비거세우 수소나 암소보다 거세우에서 유의적으로 ($p < 0.05$) 높았다. 비거세우 수소와 암소의 경우는 등심 조직과 피하지방 조직 모두에서 유사한 발현 수준을 보였다.

나. RT-PCR에 의한 등급별 유전자 발현 분석

거세우에서 근내지방도 5이상을 high-marble로 분류하고, 근내지방도 4이하를 low-marble로 분류하여 두 group간에 유전자 발현의 차이를 RT-PCR로 비교하였다. 거세우 등심조직 및 피하지방 모두에서 high-marble과 low-marble 간에 AR 및 ER α 유전자 발현 수준의 차이는 없었다.

다. Northern에 의한 성호르몬 관련 유전자 발현 분석

Northern 방법으로 AR 유전자 발현을 분석하였다. AR mRNA message는 예상한 1.8 kb의 크기를 보였다. 비거세우 수소 등심조직에서 AR 유전자 발현 수준은 거세우 및 암소보다 높았으며($p < 0.05$), 거세우와 암소는 유사한 수준을 보였다. 반면, 피하지방 조직에서는 AR 유전자 발현 수준이 비거세우, 거세우 및 암소 간에

차이가 없었다. 등심조직 및 피하지방조직에서 이러한 northern 실험 결과는 위의 RT-PCR 실험 결과와 동일한 경향을 나타내고 있다. 거세우에서 근내지방도 등급별로 AR 유전자 발현수준을 northern 방법으로 비교하였다. 거세우 high-marble group의 등심 및 피하지방 조직 모두에서 AR 유전자 발현수준이 높은 경향을 보였으나, 유의적인 차이는 없었다 ($p>0.05$).

라. 육질과 유전자 발현 수준과의 상관분석

AR 및 ER α 유전자 발현 수준과 근내지방도, 지방함량 및 전단력과의 상관도를 분석하였다. 근내지방도는 피하지방 ER α 유전자 발현 수준과 가장 높은 상관($r=0.61$)을 나타냈다. Rib eye 조지방 함량 역시 피하지방 ER α 유전자 발현수준과 가장 높은 상관($r=0.59$)을 나타냈으며, 근육 ER α 유전자 발현 수준과도 유의적인 상관($r=0.48$)을 나타냈다. 전단력은 근육 AR 유전자 발현 수준과 유의적인 부의 상관(-0.42)을 보였다.

마. 지방조직 세포배양에서 성호르몬 처리에 의한 유전자 발현 분석

피하지방 explant culture system에서 성호르몬 처리에 의한 유전자 발현을 분석하였다. 여러 가지 성호르몬을 50 nM 또는 500 nM 두 가지 농도로 배지에 첨가하고 24h와 48h 동안 각각 배양한 후에 total RNA를 분리하여, RT-PCR 방법으로 AR mRNA 유전자 발현 수준을 분석하였다. 통계처리 결과, 호르몬 처리는 AR 유전자 발현에 유의적으로 영향을 주었다. 호르몬의 농도 효과는 없어서 50 nM과 500 nM 처리는 동일한 결과를 나타냈다. 7 β -estradiol 처리 24h에는 유전자 발현 수준이 변하지 않았지만, 17 β -estradiol 처리 48h에는 AR mRNA 수준이 감소하였다 ($p<0.05$). Progesterone 처리 역시 24h에는 유전자 발현 수준이 변하지 않았지만, progesterone 처리 48h에는 AR mRNA 수준이 감소하였다 ($p<0.05$). Testosterone 처리는 24h 및 48h 모두에서 AR mRNA 수준에 영향을 미치지 않았다. Dihydroxytestosterone 및 dexamethasone 처리는 24h 및 48h에 모두 AR mRNA 수준을 감소시켰다 ($p<0.05$).

2. 한우 조직내 성호르몬 수준 및 관련 효소에 대한 성별 비교

가. 스테로이드 호르몬 분석

근육조직에서 중성 steroid 호르몬인 α -androsterone, dehydroepiandrosterone,

epitestosterone, 5 α -dihydrotestosterone, androstenedione, testosterone, pregnenolone, progesterone, 17 α -hydroxyprogesterone 등은 비거세, 거세우 및 암소 성간에 차이가 없었다. Polar 및 phenolic steroid hormones 중에서 17 α -estradiol, estrone은 거세우에서 가장 높았고, estriol과 hydrocortisone은 거세우에서 가장 낮았다. 근육조직에서 musculinity index (MI) 값은 비거세우에서 가장 높았으나 성간에 유의적인 차이는 없었다. 근육조직에서 high-marble group이 low-marble group보다 높은 MI 값을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 지방조직에서 중성 steroid 호르몬인 α -androsterone, androstenedione, dehydroepiandrosterone, epitestosterone, 5 α -dihydrotestosterone, testosterone, pregnenolone, progesterone, 17 α -hydroxyprogesterone 등은 비거세, 거세우 및 암소 성간에 차이가 없었다. Polar 및 phenolic steroid hormones 중에서 17 α -estradiol, estrone은 거세우에서 가장 높았고, estriol, cortisone, hydrocortisone은 거세우에서 가장 낮았다. 지방조직에서 MI 값은 비거세우에서 가장 높았으나 성간에 유의적인 차이는 없었다. 지방조직에서 high-marble group이 low-marble group보다 높은 MI 값을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 근육조직과 지방조직의 steroid 호르몬 data를 모두 pooling하여 통계 처리를 하였다. Neutral 호르몬 중에서 α -androsterone, androstenedione은 거세우에서 가장 높았다. 반면, testosterone과 17 α -hydroxyprogesterone 비거세우에서 유의적으로 높았다. Polar 및 phenolic steroid hormone 중에서 17 α -estradiol, estrone은 거세우에서 가장 높았고, estriol, cortisone, hydrocortisone은 거세우에서 가장 낮았다.

거세우에서 steroid hormone 수준과 marbling group간에 관련성을 비교하였다. High-marble group이 low-marble group보다 pregnenolone 및 17 α -hydroxyprogesterone 수준은 유의적으로 높았다. 따라서, 이 두 호르몬은 근내지방도와 연관성이 높은 것으로 판단된다. Neutral steroid hormone 중에서 다른 호르몬들 (α -androsterone, dehydroepiandrosterone, epitestosterone, 5 α -dihydrotestosterone, androstenedione, testosterone, progesterone)은 high-marble group과 low-marble group간에 유의적인 차이가 없었다. Polar 및 phenolic steroid 호르몬인 17 α -estradiol, estrone, 17 β -estradiol, estriol, cortisone, hydrocortisone은 high-marble group과 low-marble group간에 유의적인 차이가 없었다. MI 값은 거세우에서 high-marble group이 low-marble group보다 높았으나 유의적인 차이는 없었다.

나. Aromatase 활성 분석

Testosterone을 estradiol로 전변시키는데 작용하는 효소인 aromatase의 활성은 지방조직에서는 거세우가 비거세우나 암소에 비하여 유의적으로 높았으나, 근육조직에서는 성간에 비슷한 수준을 보였다. 거세우의 경우 근육조직이나 지방조직에서 aromatase의 활성이 높을수록 MI는 감소하는 경향을 보였으나, 비거세우나 암소에서는 상관관계를 찾기가 어려웠다. 거세우의 경우 근육조직이나 지방조직에서 육질의 등급은 aromatase의 활성이 낮을수록, MI가 높을수록 증가하였다. 이러한 경향은 근육조직에서 더욱 뚜렷하였다.

3. 한우 유전자 정보를 이용한 선발체계 구축에 관한 연구

성호르몬 관련 유전자 발현과 성호르몬 수준을 이용한 한우의 선발모형을 개발하고자 시험을 수행하였다. 축산연구소 남원지소와 대관령지소에서 시험축으로 사육하고 있던 축군 중에서 수컷은 비거세 10두와 거세 10두를 도축하였고 암소는 16두를 도축하였다. 각 도체에서 온도체와 냉도체 등심을 시료 채취하여 온도체 시료는 성호르몬 농도와 관련 유전자 발현 분석에 사용하였고 냉도체는 물리화학적 정상 분석과 일부 관능 시험에 이용하였다. 일반 도체성적과 물리화학적 정상 간의 관계를 분석하기 위하여 같은 시기에 도축된 타 동기축들의 자료를 같이 이용하였으며 조지방과 등심내 근내지방도와의 관계를 규명하기 위하여 두 농장의 모든 도축기록을 활용하였다. 또한 년차별로는 각 농장별로 유전능력 평가를 실시하였고 두 농장에서 나온 시험축들의 성호르몬 수준 및 발현정도와와의 관계를 규명하고자 두 농장의 자료를 통합하여 육중가를 추정하였다. 주요 결과를 요약하면 다음과 같다.

근내지방도와 등심내 조지방함량간에는 0.7정도의 상관관계를 보였으며 농장에 따라 성별에 따른 차이가 존재하였으나 미약하였으며 도체평가 기준이 바뀐 2000년을 기준으로 구별을 하여 분석하였으나 유의적인 상관도의 차이를 보이지 않았다. 근육조직과 피하지방 조직에서 성별효과는 주로 estrogen 계열의 호르몬 농도에 영향을 미쳤으며 근내지방도의 효과는 androgen 계열과 estrogen 계열의 호르몬 농도에 영향을 미쳤다. 도체성적에서 근내지방도는 생체중 및 도체중 그리고 등지방 두께와 등심단면적등과 정의 간차상관을 보였으나 성별효과의 유의적인 차이는 보이지 않았다. 성별 효과는 등심의 물리화학적 정상에 유의적인 차이를 보였는데, 간차상관에서 근내지방도와 뚜렷한 상관을 보인 것은 조지방 함량과 정의 상관을 그

리고 전단력과 수분함량, 가열감량과는 부(-)의 상관을 보였다. 연도의 객관적 측정치라고 볼 수 있는 전단력은 근내지방도와 부(-)의 상관을 보였으며 pH 및 보수력과는 정(+)의 상관을 보였다. 관능검사에서 근내지방도는 주로 다즙성과 연도와 높은 상관관계를 보였으나 향미와는 상관이 없는 것으로 나타났다. 한편, 연도에 주로 관련된 특성으로는 가열감량과 다즙성, 보수력의 물리적 조직구조로 나타났다. 육종가 추정치와 도체특성 및 성호르몬 관련 유전자 발현정도와의 관계에서는 주로 androgen receptor 유전자 발현이 근육세포 성장과 정의 상관이 있었으며 피하지방에서 분석한 estrogen receptor 유전자 발현수준이 등심내 근내지방도와 정의 상관관계가 있는 것으로 나타났다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구를 통하여 성 관련 또는 육질과 관련된 다음과 같은 몇 가지 사실을 발견하였다. 근내지방도는 피하지방 estrogen receptor alpha 유전자 발현 수준과 높은 상관 ($r=0.61$)이 있고, 전단력은 근육 androgen receptor 유전자 발현 수준과 유의적인 부의 상관 (-0.42)이 있음을 알았다. 거세우에서 high-marble group이 low-marble group보다 pregnenolone 및 17β -hydroxyprogesterone 수준은 유의적으로 높음을 관찰하여, 이 두 호르몬은 근내지방도와 연관성이 높은 것으로 판단된다. 거세우에서 육질 등급은 근육조직이나 지방조직에서 aromatase의 활성이 낮을수록, MI가 높을수록 증가하였다. 이러한 경향은 근육조직에서 더욱 뚜렷하였다. 육종가 추정치와 도체특성 및 성호르몬 관련 유전자 발현정도와의 관계 분석을 통하여 androgen receptor 유전자 발현은 근육세포 성장과 정의 상관이 있었으며, 피하지방 estrogen receptor 유전자 발현수준은 근내지방도와 정의 상관관계가 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 향후 고급육 생산 기술개발을 위하여 유용한 자료로 활용할 수 있을 것이다. 궁극적으로 한우의 도체특성을 조기 예측 선발에 이용함으로써 유전적 개량량을 향상시킬 수 있을 것이다.

SUMMARY

I. Title

Studies on comparison of expression levels of sex steroid hormone receptor genes and sex hormone levels among sex phenotype in muscle and adipose tissues and its application for breeding and selection in Hanwoo

II. Objectives and importance of the project

There are differences in yield and quality grade among sex phenotype in Korean cattle. Generally, carcass quality grades of steer are better than those of cow or bull, while bull shows higher carcass yield than cow or steer. Factor(s) that affects quality grade of beef among sex has not been clearly understood. Main physiological differences among sex phenotype are circulating steroid hormone profiles. Bulls have relatively high levels of circulating androgen mainly secreted from testis, while cows have relatively high levels of circulating estrogen mainly secreted from ovary. Steers have relatively low levels of androgen and estrogen due to castration. Steroid hormone profiles in muscle and adipose tissues are expected to be different among sex classes. Presently, there is no report on relationship of steroid hormone levels, gene expression levels of steroid synthesis and its signal transduction, and related enzyme activities with beef quality of Hanwoo.

Objective of this study was to compare expression levels of sex steroid hormone signal transduction related genes, sex steroid hormone levels, and

related enzyme activities among sex phenotype in muscle and adipose tissues of Hanwoo. Gene expression levels were also compared between high- and low marble groups in muscle and adipose tissues. Hanwoo selection models were studied using information of genetic expression.

Expression levels of androgen receptor and estrogen receptor α genes were compared among sex phenotypes (bull, steer, cow) in muscle and adipose tissues of Hanwoo. Those expression levels were also compared between high- and low marble groups in muscle and adipose tissues. Gene expression was analyzed by both RT-PCR and northern methods. Correlation between selected meat quality characteristics and gene expression levels were analyzed. Various steroid hormonal effects on AR mRNA levels were determined by RT-PCR in explant culture of subcutaneous adipose tissues. Various steroid hormone levels were compared among sex phenotypes (bull, steer, cow) in muscle and adipose tissues of Hanwoo. Aromatase enzyme activities were measured in muscle and adipose tissues. Hanwoo selection models were studied using information of genetic expression.

III. Contents and ranges of the project

1. Comparison of expression levels of sex steroid hormone receptor genes among sex phenotype in muscle and adipose tissues of Korean cattle.

The mRNA levels of androgen receptor (AR) gene determined by RT-PCR were higher ($p < 0.05$) in bull at *longissimus* muscle tissues than those in cow or steer, while mRNA levels of androgen receptor at subcutaneous adipose tissues were similar among sex classes. Northern analysis of AR gene also showed similar results as RT-PCR data: AR expression levels were higher ($p < 0.05$) in

bull at *longissimus* muscle tissues than those in cow or steer. The mRNA levels of estrogen receptor alpha gene in steer were higher ($p < 0.05$) at *longissimus* muscle and subcutaneous adipose tissues than those in cow or bull. There were no significant differences in mRNA levels of AR and estrogen receptor alpha genes in both *longissimus* muscle and adipose tissues of steer between high (marbling score ≥ 5) and low (marbling score < 4) marble beef.

Correlation between selected meat quality characteristics and gene expression levels were analyzed. mRNA levels of ER α gene in adipose tissues showed strong correlation ($r = 0.61$) with marbling score, and ER α mRNA levels also showed strong correlation ($r = 0.59$) with crude fat content in rib eye. AR mRNA levels in muscle tissues showed negative correlation ($r = -0.42$) with shear force.

Various hormonal effects on AR mRNA levels were determined by RT-PCR in explant culture of subcutaneous adipose tissues with the 50 nM and 500 nM levels after 24h and 48h treatments. Hormone treatments affected AR mRNA levels. But, there was no dose effect on AR mRNA levels. Both 17 β -estradiol and progesterone did not affect AR mRNA levels after 24h, but these decreased ($p < 0.05$) mRNA levels after 48h. Testosterone did not affect AR mRNA levels after both 24h and 48h. Dihydroxytestosterone and dexamethasone decreased ($p < 0.05$) AR mRNA levels after both 24h and 48h.

2. Comparison of steroid hormone levels and related enzymes among sex phenotypes in muscle and adipose tissues of Hanwoo

Difference in the distribution of sex steroid hormones is the most important physiological factor among bulls, steers and cows. In this research, the contents of steroid hormones (α -androsterone, dehydroepiandrosterone, epitestosterone, testosterone, androstendione, pregnenolone, progesterone 17 α -hydroxyprogesterone, cortisone, 17 α -estradiol, 17 β -estradiol etc.) in muscle tissues and fat tissues of bulls, steers and cows were compared and correlated with sex, meat grades and aromatase activities. Results indicated that mutually dependent steroid pairs

were pregnenolone–progesterone and testosterone–hydroxyprogesterone commonly found in muscle and adipose tissues, cortisol–cortisone found in muscle tissues only, and DHEA–testosterone in adipose tissues only. Most of these steroid pairs are composed of substrate and product of a single step, which could be in a rapid equilibrium.

Levels of estrogens and corticoids were higher than those of androgens and progestogens in all tissues regardless of sex, and the level of testosterone was higher in bulls compared with steers and cows as previously reported in other species of bovines. The meat grade was inversely correlated with masculinity index in steers, and this tendency was more apparent in muscle tissues. It seems that a sex is the major factor to determine the level of steroid hormones, which can be correlated with the meat grade. The aromatase activity was generally higher in steers than bulls and cows in fat tissues and was inversely correlated with masculinity index in steers.

3. Hanwoo selection models using information of genetic expression

Concentrations of sex hormones and their receptor gene expression levels in terms of mRNA's were analyzed to find out their relationship with carcass characteristics of Hanwoo especially the marbling scores (intra-muscular fat levels) and the effects of sexes on those characteristics. To take the loin eye samples for hormonal and gene expression analyses, carcasses of 10 steers, 10 bulls and 16 cows were taken from Namwon and Daekwanryung branches of National Livestock Research Institute (NLRI). Sampling was made twice for each carcass. Hot carcass samples were sent to Chonnam University for hormone and genetic analyses and the cold carcass samples were sent to the meat science lab of NLRI for analyses of chemical and physical properties. Panel test results from Daekwanryung bulls were also collected. To find out the relationship between carcass measures and laboratory analysis results of physical and chemical properties, data of contemporary groups slaughtered at the same days were also collected. And for the estimation of individual breeding

values for growth and carcass traits, whole pedigree and performance test records were obtained from two brach farms. Annual genetic evaluations were done separately by each brach. However, to figure out the relationships of carcass traits with gene expression levels, two database were combined together and breeding values of only carcass traits were estimated. Followings are the major results from this study.

Correlation coefficients between marbling scores and crude fat contents in the rib eye were estimated to be around 0.7. These correlations were not greatly different by sexes or by years of evaluations before and after 2000 when marbling scoring system changed from 1-5 scale to 1-7 scale. Sex effect was a significant source of variation for estrogenic sex hormones in both muscle and adipose tissues while marbling was a significant source of variation for both estrogenic and androgenic sex hormone levels. Marbling score of carcass was positively correlated with fasted live weight at slaughter, carcass weight, back fat thickness or rib eye area in terms of residual correlation coefficients where sex was not a significant source of variation for all these carcass traits. Sex effects were significant sources of variation of physical and chemical properties of loin eye muscles. Residual correlations showed that there were positive relationship between marbling scores and shear force or moisture content and negative relationship between marbling scores and cooking loss. Marbling scores were also positively correlated with pH or with water holding capacity. Tenderness or juiciness evaluated from panel test was highly correlated with carcass marbling score. And the other properties in significant relationships with tenderness on panel test were cooking loss, juiciness and water holding capacity. Significant positive relationships with estimated breeding values of body and carcass weights at slaughter or with rib eye area were found in the expression levels of androgen receptor genes. And estrogen receptor gene expression level in adipose tissues was positive and significant related with marbling scores in the loin eye area.

IV. Suggestions for research results and its application

This study was performed to compare expression levels of sex steroid hormone signal transduction related genes, sex steroid hormone levels, and related enzyme activities among sex phenotype in muscle and adipose tissues of Hanwoo. Gene expression levels were also compared between high- and low marble groups in muscle and adipose tissues. Hanwoo selection models were studied using information of genetic expression. Some useful results were obtained from the study.

mRNA levels of estrogen receptor alpha gene in adipose tissues showed strong correlation ($r=0.61$) with marbling score, and ER α mRNA levels also showed strong correlation ($r=0.59$) with crude fat content in rib eye. AR mRNA levels in muscle tissues showed negative correlation ($r=-0.42$) with shear force. In the steer, levels of pregnenolone and 17 α -hydroxyprogesterone were significantly higher in high-marble group than in low-marble group. The meat grade was inversely correlated with masculinity index in steers, and this tendency was more apparent in muscle tissues. It seems that a sex is the major factor to determine the level of steroid hormones, which can be correlated with the meat grade. The aromatase activity was generally higher in steers than bulls and cows in fat tissues and was inversely correlated with masculinity index in steers. Significant positive relationships with estimated breeding values of body and carcass weights at slaughter or with rib eye area were found in the expression levels of androgen receptor genes. These information will be useful to develop method(s) to produce high quality beef.

CONTENTS

Chapter 1 Objectives and importance of the project	1
Chapter 2 Research background	8
Chapter 3 Research contents and results	10
Section 1 Comparison of gene expression levels involved in steroid hormone synthesis and its signal transduction among sex phenotypes in Hanwoo	10
1. Introduction	10
2. Materials and Methods	13
a. Tissue sampling	13
b. Analysis of gene expression	13
c. Adipose tissue explant culture	16
d. Statistical analysis	16
3. Results and discussion	17
a. Comparison of gene expression levels by RT-PCR among sex phenotypes	17
b. Comparison of gene expression levels by RT-PCR between marbling grades	27
c. Analysis of gene expression levels by northern method	31
d. Correlation between meat quality characteristics and gene expression levels	35
e. Effect of steroid hormone treatments on gene expression in explant culture	37

Section 2 Comparison of steroid hormone levels and related enzymes among sex phenotypes in muscle and adipose tissues of Hanwoo	42
1. Introduction	42
2. Materials and Methods	45
a. Analysis of steroid hormone levels	45
b. Assay of aromatase activity	49
c. Statistical analysis	50
3. Results and discussion	51
a. Steroid hormone levels	51
b. Aromatase levels	73
c. Correlation of marbling score, masculinity index and aromatase activities in steers	77
Section 3 Hanwoo selection models using information of genetic expression	78
1. Introduction	78
2. Materials and Methods	78
a. Animals	78
b. Statistical Analyses	78
3. Results and discussion	79
a. Sampling animals and performances	79
b. Breeding populations of Hanwoo and selection programs to utilize genetic informations	83
c. Marbling scores and crude fat contents in the loin eye	85
d. Marbling score and steroid hormonal concentrations	88
e. Sex effects on carcass characteristics	89
f. Gene expression levels and carcass characteristics	93

Chapter 4 Achievement and contribution	98
Chapter 5 Application plan of results	100
Chapter 6 Knowledge from foreign countries	100
Chapter 7 References	101

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황	8
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	10
제 1 절 한우 조직내 성호르몬 합성 및 신호전달 관련 유전자에 대한 성별 발현 비교	10
1. 서설	10
.....	13
가. 근육 및 지방조직 확보	13
나. 유전자 발현 분석	13
다. 지방조직 세포배양	16
라. 통계처리	16
3. 결과 및 고찰	17
가. RT-PCR에 의한 성별 유전자 발현 분석	17
나. RT-PCR에 의한 등급별 유전자 발현 분석	27
다. Northern에 의한 유전자 발현 분석	31
라. 육질과 유전자 발현 수준과의 상관 분석	35
마. 호르몬 처리에 의한 유전자 발현 분석	37
제 2 절 한우 조직내 성호르몬 수준 및 관련 효소에 대한 성별 비교	42
1. 서설	42
.....	45

가. Steroid 호르몬 분석	45
나. Aromatase activity 분석	49
다. 통계처리	50
3. 결과 및 고찰	51
가. 스테로이드 호르몬 수준	51
나. Aromatase 활성	73
다. 거세우에서 육질등급, masculinity Index 및 aromatase 활성 간의 상호관계	77
제 3 절 한우 유전자 정보를 이용한 선발체계 구축에 관한 연구	78
1. 서설	78
.....	78
가. 공시축	78
나. 자료분석	78
3. 결과 및 고찰	79
가. 공시축 선정 및 일반능력	79
나. 한우 성별 집단 조성과 유전자 정보를 이용한 선발체계 구축	83
다. 근내지방도와 조지방 함량간의 관계 규명	85
라. 근내지방도와 조직내 스테로이드 호르몬 수준간의 관계 규명	88
마. 도체특성과 성별 효과	89
바. 유전자 발현수준과 도체 특성간의 관계	93
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	98
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	100
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	100
제 7 장 참고문헌	101

제 1 장

연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 필요성

1) 기술적 측면

(1) 한우육의 성별 육질 비교: 일반적으로 암컷과 거세우의 육질은 우수하고, 수컷은 저조하다.

일반적으로 한우육에서 암컷과 거세우의 근내지방도 등 육질은 수컷의 육질보다 우수한 것으로 보고되고 있다. 2001년도 한우도체 육질 분석 결과, 1등급 이상 고급육 출현율은 암컷과 거세우는 똑같이 46.6%로써 육질이 매우 우수한 반면, 수컷은 2.0%로써 현저하게 육질이 저조하였다. 성별 한우육의 육량과 육질 분석에 관한 논문에서도 수컷은 거세우나 암컷보다 육량 등급은 우수하나, 거세우나 암컷보다 근내지방도 등의 육질 등급이 매우 낮았다 (Park 등, 2002).

이와 같이 한우 암컷과 거세우의 육질은 우수하고, 수컷은 저조하다는 사실은 잘 알려져 있으나, 아직까지 국내는 물론 국외에서도 성별 쇠고기 육질에 미치는 요인에 대한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 한우에 있어 암컷과 수컷 및 거세우와 수컷간에 고급육 출현빈도의 차이에 대한 생리적 기작과 분자 유전적 특성을 구명하는 분석기술 개발이 요구된다. 또한 한우의 성별 고급육 출현 관련 유전적 정보를 육량 축군 조기조성을 위한 기초 자료로 이용하여 한우의 체계적인 육종 전략 구축이 필요하다.

현재 우리 나라 육질 등급은 주로 근내지방도에 의존하고 있다. 하지만 향후에는 소비자의 선호도에 따라 외국에서와 같이 연도가 육질 등급에 영향을 미칠 가능성이 높다. 하지만 아직 국내에서는 연도와 관련한 자료가 미비한 상태이고, 연도에 영향을 미치는 요인에 대한 연구는 거의 없다. 성별 차이는 근내지방도뿐만 아니라 쇠고기의 연도 (tenderness)에도 영향을 미친다. 본 연구진에서는 한우 등심의 연도

(shear force, kg.core)를 분석한 결과, 거세우 등심의 연도는 수컷 등심의 연도보다 우수하였다. 일반적으로 암소 육의 연도는 좋은 것으로 알려져 있다. 한우 성별로 연도의 차이가 있다는 분석 결과는 있으나, 어떠한 요인이 연도에 영향을 미치는가에 대한 연구는 전무하다. 본 연구진에서는 한우 거세우 등심과 하와이 거세우 (Hereford와 Angus 교잡종) 등심의 연도를 비교 분석하였다. 그 결과, 한우 거세우 등심보다 하와이 거세우 등심의 연도가 훨씬 낮았다. 이러한 결과는 한우육의 육질을 향상시켜 수입육과 경쟁력을 갖추기 위해서는 앞으로 근내지방도뿐만 아니라 연도를 고려해야 함을 시사하고 있다 (백명기, 2001).

(2) 쇠고기의 성별 육질에 영향을 미치는 요인

이와 같이 한우 암컷과 거세우육의 육질 등급이 수컷보다 우수하다는 사실은 알려져 있으나, 어떠한 요인들이 성별 육질 차이에 영향을 미치는가에 대한 연구는 국내·외에 미미한 실정이다.

성별 육질의 차이는 성별로 다른 내분비계의 작용과 대사작용의 차이에서 비롯될 것으로 추정하며, 그 중에서도 특히 성호르몬 계의 차이가 가장 큰 영향을 미칠 것으로 생각된다. 우선 수컷과 거세우의 생리적인 차이는 정소의 유무에 있으며, 따라서 정소에서 분비되는 androgen계 성호르몬의 수준 차이가 육질 등급에 영향을 미칠 것으로 판단하였다. 즉, 수컷은 정소에서 분비되는 testosterone 등의 androgen 계의 호르몬 지배를 받는다. 거세를 통하여 정소를 제거하게 되면, 더 이상 정소에서 testosterone 등의 호르몬이 분비되지 않는다. 물론, 성호르몬은 시상하부-뇌하수체 내분비계 호르몬들의 분비에 영향을 미치므로, 거세우에서 정소 제거에 의한 시상하부-뇌하수체 내분비계의 변화가 탄수화물, 지방, 에너지대사 등에 영향을 미치어 수컷과 거세우에서 육질의 차이가 생길 수도 있다. 암컷은 난소에서 분비되는 estrogen 등의 성호르몬 계의 영향을 많이 받는 것이 수컷과 거세우와의 차이이다.

(3) 한우 조직내 성호르몬 수준에 대한 분석의 필요성

성별 혈청 (serum)내 호르몬 수준의 차이를 보면, 3/8 Simmental-5/8 Hereford 교잡종에서 암컷은 성장호르몬 수준이 낮고 insulin과 cortisol 등의 수준은 높아, 이러한 내분비계 시스템이 근육내 지방축적을 높이는 작용을 한다고 보고하였다.

반면 수컷은 성장호르몬 및 testosterone 수준이 높고, cortisol 등의 수준이 낮은 내분비계가 육량은 증진시키고 지방축적은 감소시켜 육질이 우수하지 않은 것으로 보고하였다 (Gettys 등, 1988). 거세우는 수컷과 유사한 높은 수준의 성장호르몬, proteolytic activity가 있는 높은 수준의 cortisol, lipogenic 효과가 있는 높은 수준의 insulin 및 정소제거에 의한 낮은 수준의 testosterone 등의 내분비계의 영향을 받는다고 보고하였다 (Gettys 등, 1988).

혈액 중에 circulating하는 내분비계가 성별 육질 차이에 영향을 미칠 수 있지만 최근 사람과 rodent를 대상으로 한 연구에서 근육조직과 지방조직 내에 존재하는 성호르몬이 지방대사와 에너지 대사에 중요한 역할을 하고 있음이 밝혀지고 있다. 소에서는 이러한 분야에 대한 연구는 전무한 실정이고 단지 독일의 Steinhart 중심의 연구 그룹은 Simmental에서 고기 내에 존재하는 스테로이드 호르몬을 분석, 보고하였다. 수컷의 고기에서는 거세우보다 androgen계 호르몬인 testosterone과 androgen precursor인 dehydroepiandrosterone 수준은 높은 반면, 수컷은 거세우보다 성호르몬의 기본적인 precursor인 pregnenolone과 catabolic corticosteroid인 cortisol 수준은 낮았다 (Fritsche와 Steinhart, 1998; Fritsche 등, 1988b). Circulating 호르몬이 고기의 근육조직과 지방조직에 축적되어 수컷과 거세우의 고기에서 이러한 호르몬 수준의 차이가 보일 가능성이 높다. 하지만 최근의 연구에 의하면, 근육조직과 지방조직에서 스테로이드 호르몬이 endogenous하게 합성된다는 보고가 많다. 따라서, 수컷과 거세우 고기에서 보이는 스테로이드 호르몬 양의 차이는 근육조직과 지방조직에서 합성된 스테로이드 호르몬 양의 차이에 의한 요인도 생각할 수 있다. Fritsche 등 (1998a)은 또한 쇠고기의 visible한 근간지방과 근내지방 부위를 제거한 low fat 고기와 지방조직을 제거하지 않은 high fat 고기에서 호르몬 수준을 비교하였다. 그 결과, testosterone, dehydroepiandrosterone (DHEA), androstendione, androsterone, pregnenolone과 progesterone 수준은 high fat 고기에서 높은 반면, cortisol 양은 high fat 고기에서 더 낮았다. 이러한 data는 근내지방 또는 근간지방에는 근육조직보다 더 많은 양의 androgen계 호르몬이 축적되거나 또는 endogenous하게 지방조직에서 합성될 수 있음을 시사하는 결과이다.

Steinhart 그룹은 쇠고기 내에 존재하는 스테로이드 호르몬을 GC-MS를 이용하여 분석하였다. 그 이유는 고기 내에는 적은 함량의 호르몬이 존재하므로 일반적인 호르몬 분석 방법인 radioimmunoassay 방법으로는 분석의 한계가 있기 때문이다.

외국에서도 고기내 스테로이드 호르몬 분석에 관한 논문은 위의 그룹 이외에는 거의 없고, 한우육에서 호르몬 분석에 관한 연구는 전무하다. 특히, 한우육은 근내지방도 축적이 수입육에 비하여 우수하므로 한우육에서 스테로이드 호르몬 양을 성별 및 육질 등급별로 분석한 자료는 근내지방도 축적 증진 방안을 모색하는데 중요한 지침으로 이용할 수 있을 것이다.

(4) 근육조직과 지방조직의 대사 과정에서 성호르몬의 중요성

위에 기술한 바와 같이 혈액 중에 circulating하는 내분비계가 성별 (암컷과 수컷, 수컷과 거세우, 암컷과 거세우) 육질 차이에 영향을 미칠 수 있지만 최근 사람과 rodent를 대상으로 한 연구에 의하면 근육조직과 지방조직 내에 존재하는 성호르몬이 지방대사와 에너지 대사에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다. 따라서, 소의 근육조직과 지방조직에서 성호르몬에 의한 지방 축적과 방출 조절에 관한 연구와 나아가서 성호르몬이 쇠고기의 연도에 미치는 영향에 대한 연구는 한우육의 육질 개선을 위한 방안을 모색하기 위한 중요한 자료를 제공해 줄 것으로 판단된다. 사람과 rodent에서는 testosterone과 estrogen 등 성호르몬이 지방대사와 에너지 대사 조절에 중요한 역할을 하고 있음이 밝혀지고 있다.

Testosterone 신호는 androgen receptor (AR)를 통해서 전달된다. 아직 한우의 근육조직과 지방조직에서 AR mRNA expression에 대한 연구는 없으며, 외국에서도 성별 AR mRNA 수준을 비교한 결과가 없어 이에 대한 연구가 필요하다. 또한, 한우에서도 estrogen이 지방대사에 미치는 영향에 대한 연구가 필요하다. 구체적으로, 지방조직과 근육조직에서 estrogen receptor 발현 양상, testosterone을 estrogen으로 전변시키는 데 작용하는 aromatase 효소의 activity와 mRNA 발현 양상, estrogen에 의해서 발현이 조절되는 LPL 유전자의 발현 양상을 성별로 비교·분석할 필요가 있다. 이러한 data는 한우 육질 개선방안을 모색하는데 중요한 자료로 이용될 수 있을 것이다.

(5) 성호르몬이 연도에 미치는 영향

현재 우리 나라 육질 등급은 주로 근내지방도에 의존하고 있다. 하지만 향후에는 소비자의 선호도에 따라 외국에서와 같이 연도가 육질 등급에 영향을 미칠 가능성이 높다. 하지만 아직 국내에서는 연도와 관련한 자료가 미미한 실정이다. 본 연구

진은 한우 수컷보다는 거세우의 shear force가 낮아서, 거세우의 연도가 우수한 것으로 확인하였다. 또한, 한우 거세우보다는 거세 하와이 육의 연도가 우수한 것을 확인하였다 (백명기 등, 2001). Fritsche와 Steinhart (1998)는 근육내 총 pregnenolone 농도에서 androgen계 steroid 농도가 차지하는 비율로써 masculinity index를 계산하였는데, masculinity index는 연도와 관련이 있다고 주장하였다. 한우 성별로 연도의 차이가 있다는 분석 결과는 있으나, 어떠한 요인이 연도에 영향을 미치는가에 대한 연구는 전무하다. 일부 연구자에 의해서 연도가 성호르몬과 연관성이 있다는 주장이 제기되고 있다. 따라서 근육내 성호르몬 수준 및 관련 유전자의 발현 양상과 연도와의 연관성을 밝히는 연구가 필요하다.

(6) 한우 유전자 정보를 이용한 선발체계 구축에 관한 연구의 필요성

국내외에서 활발히 개발이 진행되고 있는 동물체 생명공학기술 중에서 가축의 경제성과 관련하여 생산성 향상에 응용될 수 있는 분야는 양적형질 유전자 좌위 또는 유전자 지문의 개발이라고 볼 수 있다. 그러나 이 작업이 매우 방대하고 또 기본적인 데이터베이스의 구축이 없이는 불가능한 개발과정이기도 하다. 더구나 이런 양적형질 유전자들이 유전적으로는 서로 독립적으로 작용하지만 개체의 형질이 발현되는 데에는 환경적인 요인들과 더불어 유전자 상호간의 작용 또는 생리적 환경적 요인과의 상호작용으로 인하여 그 유전적인 현상을 밝히는 것은 매우 어려운 작업이 아닐 수 없다. 더구나 닭이나 돼지와 같은 중소 동물은 순계 계통의 조성이나 동질성을 가진 유전적 구성을 만드는데 비교적 짧은 기간이 소요되지만 소나 말과 같은 대동물은 번식기간이 길고 단태성 가축이기 때문에 이러한 순수 유전적 조성 집단을 구성하는 것은 거의 불가능하고 또 비용면에서도 매우 방대한 사업이 아닐 수 없다. 따라서 선진 외국에서도 일부 순수 계통끼리의 교잡을 통해서나 아예 개방 축군에서 유전적 연구를 시도하고 있는 실정이다.

따라서, 본 연구는 이러한 유전적 연구의 어려운 특성을 가진 한우에 있어서 비교적 혈통 및 검정기록관리가 철저한 축산연구소의 축군을 이용하여 근내지방도와 관련된 성호르몬의 생리적 수준과 관련 유전자의 발현양상을 규명함으로써 가축의 선발에 활용할 수 있는 기초 자료를 생성하고자 한다.

2) 경제 · 산업적 측면

우리 나라 쇠고기의 자급률은 1988년에 89%이던 것이, 1990년에는 53%, 1992년에는 44%, 1994년에는 55%로 약간 증가추세를 보이나, 전반적으로 최근에 급속히 감소하고 있다. 외국산 쇠고기 수입 자율화와 생우의 수입이 이루어진 현실에서 한우 사육기반이 급속도로 무너지는 있음으로 한우의 생존경쟁과 고급육을 생산을 통한 차별화로 경쟁력 제고 방안을 모색해야 한다. 외국산 소고기와 가격 경쟁력을 위하여 저비용 투자를 통하여 고급육을 생산할 수 있는 기술을 개발함으로써 한우 농가의 사육의욕을 고취시킴과 동시에 한우 사육기반의 안정화가 필요하다.

이러한 노력 속에서 반드시 전제가 되어야 할 것은 한우가 가지고 있는 우수한 잠재적 유전형질을 효율적으로 개발하는 것이다. 이러한 목표에 이르기 위한 지금까지의 방법은 주로 후대검정방법에 의존하여 한우의 개량을 도모하는 것이었으나, 근래의 분자유전학의 발달에 힘입은 유전현상에 대한 이해와 유전자 조작기법을 이용하여 새로운 접근이 가능하게 되었다. 따라서 기존의 고전적인 후대검정 방법의 토대 위에 이들 최신 분자유전학적 방법을 적용시키면 한우의 우수한 형질을 효율적으로 개량시켜 나갈 수 있을 것으로 기대된다. 한우 산업의 국제 경쟁력을 확보하기 위해서는 고품질 한우육을 생산하는 방안을 모색하는 것이 필수적이다. 이러한 과정에서 한우의 육질에 영향을 미치는 요인들을 규명하여, 육질개선 방안을 위한 자료로 활용해야 할 것이다.

3) 사회 · 문화적 측면

우리 나라 농업에 있어서 한우는 특별히 중요한 의미를 지닌다. 한우는 한민족과 함께 유사이전부터 한반도에 정착하여 다른 품종과의 교잡 없이 동종번식 되어온 고유 품종의 소이다. 우리 농민에게 있어서는 한우는 정신적, 경제적으로 중요한 지주적 역할을 해왔음은 물론 육류 단백질의 공급원으로써 중요한 위치를 차지하고 있다. 그러나 쇠고기 수입개방이 현실화된 작금의 현실은 한우 산업에 대한 크나큰 위협이 되고 있다.

그러나, 경쟁 사회인 현재의 어려운 상황을 극복하고 한우산업의 경쟁력을 높이는 방안을 모색해야 한다. 쇠고기 시장 개방된 상황에서 한우 산업이 살아남을 수 있는 방법은 한우고기 특유의 맛을 되찾기 위한 과학적인 방안을 마련하여 소비자

가 즐겨 찾을 수 있는 고급육을 생산하는 길만이 최선이라 생각된다.

한우육은 암소와 거세우는 육질이 매우 우수한데, 수소의 육질은 열등하다. 본 과제에서는 왜 한우 성별로 육질이 다른가를 규명하는 연구를 수행하고자 한다. 성별로 가장 큰 생리적인 차이는 암컷은 estrogen 등 난소에서 분비되는 성호르몬 수준이 높고, 수소는 정소에서 분비되는 testosterone 등 androgen계 호르몬 수준이 높으며, 거세우는 estrogen과 testosterone 등 성호르몬 모든 수준이 낮은 것이다. 본 연구에서는 근육조직과 지방조직에서 성호르몬 수준, 스테로이드 호르몬 합성 및 관련 주요 효소 및 이와 관련한 유전자 발현 수준을 성별로 비교·분석하여 육질과의 연관성을 규명하고자 한다. 이러한 연구 결과는 한우육의 육질 향상 방안을 모색하기 위한 중요한 자료로 활용할 수 있을 것이다.

2. 연구개발의 목적 및 범위

한우 암컷과 거세우의 육질은 우수하나, 수컷의 육질은 열악하다는 사실은 잘 알려져 있으나, 이러한 성별 육질 등급에 미치는 요인은 전혀 밝혀지지 않았다. 성별로 가장 중요한 생리적인 요인은 성 스테로이드 호르몬 수준의 차이이다. 본 과제는 성호르몬 및 성호르몬 신호전달 관련 요인들을 중심으로 성별로 비교·분석하여 육질에 미치는 요인을 밝히기 위하여 수행하였다. 연구 결과는 한우 선발체계 구축 등 육질을 증진하기 위한 방안을 모색하는 지침으로 활용할 수 있을 것이다.

본 연구는 구체적으로 근육조직과 지방조직에서 성호르몬 수준의 성별 비교 및 육질과의 연관성 규명, 근육조직과 지방조직내 estrogen receptor와 androgen receptor 발현 수준의 성별 비교 및 육질과의 연관성 규명, 근육조직과 지방조직내 steroid 합성에 관여하는 aromatase activity와 유전자 발현 수준의 성별 비교 및 육질과의 연관성 규명, 지방조직 culture system에서 성호르몬 처리에 의한 유전자 발현 양상 규명, 혈통관리 및 교배계획에 의하여 생산된 암수별 우량 축군 구축 및 한우개량과 관련된 유전정보를 이용한 조기 선발체계 기반 조성을 위하여 수행하였다.

제 2 장

국내외 기술개발 현황

한우 암컷과 거세우의 육질은 우수하고, 수컷은 열등하다는 사실은 잘 알려져 있으나, 성별 쇠고기 등급에 미치는 요인에 대한 연구는 국내·외에서 미미한 실정이다. 성별로 가장 큰 생리적인 차이는 암컷은 estrogen 등 난소에서 분비되는 성호르몬 수준이 높고, 수소는 정소에서 분비되는 testosterone 등 androgen 계 호르몬 수준이 높으며, 거세우는 estrogen과 testosterone 등 성호르몬 모든 수준이 낮은 것이다. 사람과 실험동물에서는 근육조직과 지방조직에 존재하는 성호르몬이 지방축적과 방출 과정에서 중요한 역할을 하고 있다는 것이 밝혀지고 있으나, 국내는 물론 외국에서도 소에서는 성호르몬이 지방대사에 미치는 영향에 대한 연구는 미미하다. 근육과 지방조직에 존재하는 성호르몬의 함량이 얼마나 되는 가를 알아야 성호르몬과 지방대사 간의 관련성을 밝힐 수 있는데, 외국에서도 Simmental 품종에서만 수소와 거세우에서 성호르몬 함량이 밝혀져 있을 뿐이다 (Fritsche와 Steinhart, 1998). 특히, 한우에서는 근육조직과 지방조직 내에 성호르몬 수준에 대한 연구는 전무한 실정이다. 그 이유는 근육이나 지방조직에는 적은 함량의 호르몬이 존재하므로 일반적인 호르몬 분석 방법인 radioimmunoassay 방법을 적용하기가 어렵기 때문이다. 본 연구에서는 GC-MS를 이용하여 한우 조직 내에 존재하는 성호르몬 양을 성별로 비교·분석하였다.

일반적으로 androgen은 지방축적을 감소시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 경향은 testosterone 수준이 높은 수컷보다 testosterone 수준이 낮은 거세우의 근내지방 축적도가 훨씬 더 높은 것과는 일치한다. 거세에 의해서 testosterone 수준이 낮아지면 aromatase에 의한 testosterone으로부터 estrogen으로 전변되는 양도 비례하여 낮아질 가능성이 높다. 따라서 거세에 의해서 근내지방 축적도가 높아진 것이 antiadipogenic 효과가 있는 testosterone 수준이 낮아짐에 따라 지방축적이 증가된 결과인지 아니면, estrogen 수준이 저하된 결과인지는 불분명하다. Testosterone 신호는 androgen receptor (AR)를 경유하여 핵으로 전달되고 있음에도 불

구하고, 아직 한우의 근육조직과 지방조직에서 AR mRNA expression에 대한 연구는 없으며, 외국에서도 성별 AR mRNA 수준을 비교한 연구가 미미하다.

사람, rat, 소등의 연구에서 estrogen은 지방축적을 억제하는 작용이 있는 것으로 보고되고 있다. 하지만 일부 연구에서는 estrogen이 proadipogenic 효과가 있는 것으로 보고되어 (Dieudonne 등, 2000), estrogen은 지방대사에 미치는 영향은 복잡한 것으로 사료된다. 한우에서도 estrogen이 지방대사에 미치는 영향에 대한 연구가 절실하다. 구체적으로, 지방조직과 근육조직에서 estrogen receptor 발현 양상, testosterone을 estrogen으로 전변시키는 효소인 aromatase의 activity와 발현 양상, estrogen에 의해서 발현이 조절되는 LPL의 activity와 유전자 발현 양상을 성별로 비교·분석할 필요가 있다. 이러한 data는 한우육질 개선방안을 모색하는데 중요한 자료로 이용될 수 있을 것이다. 특히, 한우 암컷은 혈중 estrogen 농도가 거세우나 수소보다 아주 높은데도 불구하고 암소 육은 거세우와 마찬가지로 근내지방도가 수컷보다 월등하게 우수하다. 이러한 경향은 estrogen이 지방조직 축적을 억제하는 작용을 한다는 연구 보고와는 상반되는 양상이다. Rat을 이용한 연구에서 estrogen이 proadipogenic 효과가 있음이 보고되었다 (Diedonne 등, 2000). 아직까지 동물과 성별에 따라 estrogen이 지방대사에 미치는 효과가 명확하게 정립된 상태는 아니다. 따라서, 한우에서 성별, 지방조직 부위별로 estrogen이 지방대사에 미치는 영향에 대한 연구가 필요하다.

사람과 실험동물에서는 성호르몬이 지방축적과 방출 과정에 미치는 영향에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있는 반면, 국내는 물론 외국에서도 소에서는 성호르몬이 지방대사에 미치는 영향에 대한 연구는 미미하다. 이러한 분야에 대한 한우에서의 연구는 한우육의 육질 향상 방안 개발을 위한 중요한 분야를 선점하게 되어 궁극적으로 한우 산업의 국제경쟁력 제고에 기여할 수 있을 것이다.

제 3 장

연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 한우 조직내 성호르몬 합성 및 신호전달 관련 유전자에 대한 성별 발현 비교

1. 서설

일반적으로 한우육에서 암컷과 거세우의 육질 (근내지방도 등)은 수컷의 육질보다 월등하게 우수한 것으로 알려져 있다. 이러한 한우 성별 육질의 차이는 성별로 다른 내분비계의 작용과 대사작용의 차이에서 비롯될 것으로 추정하며, 그 중에서도 특히 성호르몬 계의 차이가 가장 큰 영향을 미칠 것으로 생각된다. 우선 수컷과 거세우의 생리적인 차이는 정소의 유무에 있으며, 따라서 정소에서 분비되는 androgen계 성호르몬의 수준 차이가 육질 등급에 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료된다. 수컷은 정소에서 분비되는 testosterone 등의 androgen 계의 호르몬 지배를 받는다. 거세를 통하여 정소를 제거하게 되면, 더 이상 정소에서 testosterone 등의 호르몬이 분비되지 않는다. 암컷은 난소에서 분비되는 estrogen 등의 성호르몬 계의 영향을 많이 받는 것이 수컷과 거세우와의 차이점이다.

Testosterone 호르몬 signal은 androgen receptor (AR)를 경유하여 핵내에 target gene transcription을 촉진하는 경로로 전달된다. 사람과 rat의 지방조직에 AR이 존재한다는 것은 확인되었고, 특히 AR mRNA 수준이 adipogenesis 과정에서 증가되어 adipose tissue development를 조절하는 것으로 보고되었다 (Dieudonne 등, 1998). Bovine에서는 Montbeliard 품종의 근육 조직에서 AR mRNA 수준을 조사한 결과, 수소보다 거세우에서 AR mRNA 수준이 더 높았다 (Branstetter 등, 2000). 그들은 testosterone 수준이 높은 수소에서 AR mRNA가 낮게 발현되는 이유는 androgen이 AR expression을 억제하기 때문이라고 설명하였다. 하지만 AR protein data는 위와는 반대 결과를 보여 면양이나 rat prostate에서 거세에 의해서 nuclear

AR immunoreactivity가 감소하였다 (Goyal 등, 1998). 조직내 testosterone은 aromatase에 의해서 estrogen으로 전변될 수 있기 때문에 estrogen에 의한 AR expression 조절 기작과 estrogen receptor를 통한 muscle growth 조절에 대한 연구가 추가적으로 진행되어야 할 것이다. 아직 한우의 근육조직과 지방조직에서 AR mRNA expression에 대한 연구는 없으며, 외국에서도 성별 AR mRNA 수준을 비교한 결과가 미미하여 이에 대한 연구가 필요하다.

사람, rat, 소등의 연구에서 estrogen은 지방축적을 억제하는 작용이 있는 것으로 알려져 있다. 하지만 일부 연구에서는 estrogen이 proadipogenic 효과가 있는 것으로 보고되어 (Dieudonne 등, 2000), estrogen이 지방대사에 미치는 영향은 복합적인 요소가 작용하는 것으로 사료된다. 미국에서는 90% 이상의 heifer와 거세우에 estrogenic과 androgenic compound가 포함되어 있는 implant를 이용하여 성장률을 촉진시키고, lean meat 생산을 유도하고 있다. 비육우 암컷에 estradiol 17- β 또는 합성 estrogen zeranol을 처리하면 지방축적은 감소하고, 근육 축적은 증가하였다 (Moran 등, 1991). Estrogen implant 처리가 지방축적 감소를 유도하는 기작은 아직 알려져 있지 않다.

Rodent를 대상으로 한 연구에서 ovariectomized한 암컷에서 지방축적이 증가하고, estrogen 처리로 지방축적이 감소하는 결과를 볼 때 (Wade 등, 1985), estrogen은 지방축적을 감소시키는 효과가 있다. 여성의 경우에도 폐경으로 인하여 estrogen 생산이 감소하면 지방축적이 증가하고, estrogen을 처리하면 지방축적이 감소하는 결과를 보여주어 (Tchernof 등, 1998), rodent에서와 유사한 결과를 보여주고 있다. Estrogen은 지방조직에서 lipoprotein lipase (LPL)의 활성화에 영향을 미쳐서 지방대사를 조절하고 있음이 확인되었다. LPL은 혈액내 중성지방이 지방조직으로 축적을 촉진하는 과정에서 key enzyme으로 작용한다. 즉, chylomicron내의 중성지방을 free fatty acid와 glycerol로 가수분해한 후 다시 free fatty acid를 reesterification하여 지방축적을 촉진하는 역할을 한다. Homma 등 (2000)은 estrogen은 LPL activity와 mRNA 수준 모두를 감소시킴으로써 지방축적을 억제하는 작용을 한다고 보고하였다.

Estrogen의 작용은 estrogen receptor (ER)에 binding하여 신호가 전달된다. ER type은 ER α type과 ER β type이 알려져 있다. 두 type은 서로 다른 gene에 의하여 만들어진다. 두개의 subtype은 서로 공통의 기능을 수행하고 있지만 독특한 기능도

하는 것으로 알려져 있다. Female의 지방조직에서 ER α 와 ER β 모두가 발현되는 것이 확인되었다. 두 type이 동시에 발현될 때 ER β 는 ER α 의 작용을 억제하는 기능이 있는 것으로 보고되고 있다 (Smith 등, 2004).

Male에서 estrogen 수준이 female 보다 훨씬 낮은 관계로 estrogen이 male에서 지방대사에 미치는 영향에 대해서는 명확하지 않았다. 그러나, 최근 estrogen-receptor- α 유전자가 결여된 (knock-out) 생쥐를 이용하여 male에서도 estrogen이 지방대사 조절에 중요한 역할을 하고 있다는 사실이 밝혀졌다. Estrogen receptor- α 유전자가 결여된 (knock-out) 생쥐 암컷과 수컷 모두에서 지방조직 함량이 증가하였고, insulin resistance와 impaired glucose tolerance 현상을 보였으며, energy expenditure가 감소하였다 (Cooke 등, 2001; Heine 등, 2000). Endogenous estrogen을 생산할 수 없는 aromatase 유전자가 결여된 (knock-out) 생쥐 암컷과 수컷 모두에서도 지방조직 함량이 증가하였고, insulin resistance와 impaired glucose tolerance 현상을 보였다 (Jones 등, 2000). 이러한 결과는 estrogen 함량이 수컷은 암컷보다 훨씬 적지만, 암컷과 수컷 모두에서 estrogen은 estrogen receptor α 를 통하여 지방 축적 조절 등의 에너지 대사 과정에서 중요한 역할을 하고 있음을 시사하고 있다.

Estrogen의 주요 합성장소는 난소이지만, 암컷과 수컷 모두의 근육이나 지방조직에 존재하는 aromatase는 testosterone을 estrogen으로 전변시켜 ovary-independent estrogen 생산 과정에서 중심적인 역할을 한다. 사람의 지방조직에서는 aromatase 효소에 의해서 많은 양의 estrogen이 testosterone으로부터 전변되고 있음이 확인되었고, 지방 축적 함량이 증가하면 testosterone에서 estrogen으로 전변되는 양도 증가한다. Estrogen이 leptin 생산을 높이는 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, leptin 또한 지방조직에서 aromatase 활성을 높여 estrogen으로의 전변 양을 높이는 역할을 하는 것으로 보고되었다. Glucocorticoid는 aromatase activity를 증가시켜 지방조직에서 testosterone으로부터 estrogen으로 전변시키는 강력한 촉진제 (potent stimulator) 역할을 하고 있다 (Joyner 등, 2000). 이러한 작용은 사람에서 남자와 여자가 다른 것으로 보고되었다. McTernan 등 (2000)은 여자의 복부지방조직에서는 insulin과 cortisol이 aromatase 활성을 촉진하였으나, 남자의 지방조직에서는 insulin과 cortisol이 aromatase 활성을 억제시키는 작용을 하는 것을 관찰하였다. 이러한 암수 성에 따른 aromatase의 활성 조절 양상의 차이는 궁극적으로는 성별

스테로이드 대사 작용에 영향을 미침으로써, 성별로 지방 축적과 방출 작용을 조절하는 역할을 할 것으로 사료된다. 이와 같이 estrogenic compound implant가 소에서 성장률을 촉진시키고 지방축적은 감소시킨다는 것은 알려져 있지만, estrogen이 지방축적을 감소시키는 기작은 국내는 물론 외국에서도 아직 알려져 있지 않다. 따라서 한우에서도 estrogen이 지방대사에 미치는 영향에 대한 연구가 절실하다. 구체적으로, 지방조직과 근육조직에서 estrogen receptor 발현 양상, testosterone을 estrogen으로 전변시키는 데 작용하는 aromatase 효소의 activity와 mRNA 발현 양상을 성별로 비교·분석할 필요가 있다. 이러한 data는 한우 육질 개선방안을 모색하는데 중요한 자료로 이용될 수 있을 것이다.

2. 재료 및 방법

가. 근육 및 지방조직 확보

한우 암컷, 거세우와 수소의 등심조직과 피하지방 및 근내지방은 협동기관인 축산기술연구소 남원지소와 협조하여 성별로 10두 이상의 sample을 각각 확보하였다. 도살 즉시 등심을 취하여 근육조직, 피하지방 및 근내지방 조직별로 구분하여 -70°C 에 저장하였다.

나. 유전자 발현 분석

본 과제에서는 한우 근육조직과 지방조직에서 성호르몬 합성과 신호 전달 및 지방 축적과 방출 관련 유전자들의 발현 수준을 RT-PCR 및 northern 방법으로 비교·분석하였다.

1) Total RNA 분리

Total RNA는 Chomozenski와 Sacchi (1987) 방법으로 다음과 같이 분리하였다. 1.5 ml 튜브에 600 μl denaturing solution에 용해되어 있는 tissue 용액, 60 μl 2M Na acetate (pH 4), 600 μl acidified phenol, 120 μl chloroform을 첨가후, RNA 용액과 phenol 용액이 완전히 희석될 때까지 강하게 vortexing하고 -20°C 에서 5분 저장하였다. 4°C , 15,000 rpm, 20분간 원심분리하고 상등액을 1.5ml 튜브에 옮겼다. 상등액 약 600 μl 에 600ul의 phenol(25):chloroform(25):isoamylalcohol(1) 용액을 넣은

후 완전히 희석될 때까지 vortexing하였다. 4°C, 15,000 rpm, 10분간 원심분리한 후 상등액을 새로운 1.5 ml 튜브에 옮겼다. RNA 용액 (약 600 μ l)과 같은 volume의 2-propanol과 희석한 후 -20°C에서 2시간 저장하였다. 4°C, 15,000 rpm, 20분간 원심분리하여 RNA를 침전시키고 RNA pellet을 70% ethanol에 세척하였다. RNA pellet을 말린 후 적당량의 0.5% SDS, DEPC-treated ddH₂O에 녹여 완전히 용해시킨 후 흡광도를 측정하여 RNA 농도를 (OD 1=40 ug/ml RNA) 계산하였다. 0.1 volume의 3M sodium acetate (pH 5.2)와 2.5 volume의 ethanol을 첨가하여 RNA를 저장하였다. 필요시 4°C, 15,000 rpm, 20분간 원심분리하여 pellet을 70% ethanol로 세척한 후 DEPC-treated 0.5% SDS 용액에 녹여 이용하였다.

2) RT-PCR에 의한 유전자 발현 분석

Bovine에서 알려진 염기서열을 바탕으로 primer를 작성하여, 아래의 reverse transcribed-polymerase chain reaction (RT-PCR) 방법으로 각각의 유전자 발현 양상을 조사하였다. 또한 northern 분석을 위한 cDNA를 확보하였다.

위에서 분리한 total RNA를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. Total RNA 4 μ g을 PCR tube에 넣고 oligo d(T)를 첨가한 70°C에서 5분간 heating하여 annealing을 유도하고 ice에서 5분간 cooling하였다. Cooling후에 dNTPs mix (2.5mM), RNasin ribonuclease inhibitor (40unit/ μ l), AMV Reverse transcriptase를 첨가하고 42°C에서 1시간 반응하였다. PCR에 필요한 primer는 주문하여 준비하였다. 제조회사에서 제시한 volume의 ddH₂O를 첨가하여 100 pmoles/ μ l 농도로 primer를 녹인 후 10pmol/ μ l로 희석하여 사용하였다. PCR 반응을 위하여 RT cDNA template 4 μ l, forward primer (10 pmoles/ μ l), reverse primer (10 pmoles/ μ l), 10 \times PCR Buffer, dNTPs mix (2.5mM each), ex Taq enzyme (5unit/ μ l)를 각각 첨가 후 물로 50 μ l로 volume을 조정하고 mix하였다. Mineral oil 30 μ l 정도를 tube 위에 도포하였다. 94°C, 5 min first denaturation 반응 후 cycle 과정 (94°C 30 sec denaturation, 50-60°C 1 min primer annealing, 72°C 1 min primer extension)을 수행하였다. 30 cycle후 5 μ l를 취하여 전기영동으로 증폭 정도를 확인하였다. 추가 증폭이 필요하면, 5 cycle 씩 증폭하였다. 이러한 과정으로 최적 증폭 cycle을 결정한 후, PCR을 재 수행하였다. PCR 증폭에 대한 정량을 위하여 control로 β -actin을 이용하였다. PCR product는 agarose 전기영동으로 확인하였다.

3) RT-PCR product 정제 및 TA cloning

PCR product는 PCR Purification Kit를 이용하여 정제하였다. 정제한 product를 agarose 전기영동으로 확인하고 아래와 같이 TA cloning system을 이용하여 PCR product를 cloning하였다.

pGEM-Easy TA cloning vector (Promega)를 이용하여 RT-PCR product를 cloning하였다. Androgen receptor cDNA에 대한 PCR product를 정제하여 ligation 하였다. Ligation solution을 JM109 competent cells 50ul에 넣은 후 ice에서 20분간 incubation하였다. 42°C에서 45초 동안 heat-shock을 준 후 ice에서 2분간 반응하고 950ul의 SOC medium을 첨가하여 1시간 30분 동안 150rpm의 shaking incubator에서 반응하였다. 준비된 LB/ampicillin(100ug/ml) /IPTG(0.5mM) /X-Gal(80ug/ml) plate에 각각 10ul, 50ul, 100ul, 200ul를 smearing하고 37°C에서 overnight incubation하였다. 다음날 white colony를 취하여 LB/ampicillin broth에 배양한 후 plasmid를 분리하고 EcoRI으로 절단하여 insert 삽입 유무를 조사하였다. 예상 크기를 갖고 있는 clone에 대하여 염기서열을 분석하여 해당 유전자임을 재확인하였다.

4) Northern 분석에 의한 유전자 발현 분석

근육조직 및 지방조직에서 total RNA를 분리하고, total RNA 20ug을 1.0% formaldehyde agarose gel 전기영동으로 분리하였다. 전기영동 (100V, 1 - 2 시간)후 UV에서 28S와 18S를 band 확인하고 형광자와 함께 사진을 찍어서 나중에 mRNA band 크기를 결정하는데 이용하였다. Agarose gel 상의 RNA는 capillary 반응으로 membrane에 전이하였다. 전이 후 membrane을 microwave oven에서 2.5분 baking하여 membrane에 RNA가 영구적으로 흡착되도록 하였다.

cDNA insert를 이용하여 hybridization에 필요한 ³²P-labeled probe를 random priming kit (Stratagene)를 사용하여 제조하였다. Membrane을 제조한 probe와 hybridization하여 clone의 발현양상을 다음과 같이 조사하였다. 0.5% SDS, 6X SSC, 10% dextran sulfate, 100 ug/ml sperm DNA로 구성된 hybridization 용액을 이용하였다. 65°C에서 2시간 동안 prehybridization후 ³²P-labeled probe를 첨가하여 hybridization을 12시간 이상 실시하였다. Hybridization후에 membrane을 2X SSC/0.1 % SDS (상온에서 10분 2회), 2X SSC/0.1 % SDS (42°C에서 30분), 0.1X SSC/0.1 % SDS (42°C에서 30분), 0.1X SSC/0.1 % SDS (55°C에서 30분), 0.1X SSC/0.1 % SDS 용액에서 (65°C에서 30분) 각각 washing하였다. Washing후에 membrane을 rap으로 짜서 image plate에서 노출시키고, phosphoimage analyzer를 이용하여 northern 결과

를 분석, 정량하였다.

다. 지방조직 explant culture에서 성호르몬 처리에 의한 유전자 발현 분석

지방조직 explant culture는 Kristensen 등 (1999)과 Houseknecht 등 (2000)의 방법을 혼합, 조정하여 수행하였다. 도축장에서는 오염 가능성이 매우 높으므로 조직 채취 과정에서 오염되지 않도록 각별한 주의를 하였다. 멸균된 수술용 가위로 도축 과정에 있는 소의 등심에 붙어있는 피하지방조직 100g 정도를 절단, 채취하였다. 지방조직을 호일로 싼 도마위에 올려 놓고 바깥쪽의 오염된 조직은 떼어서 버리고, 안쪽의 깨끗한 피하 지방조직 또는 등심조직 20 - 30g 정도를 손가락 한마디 정도의 크기로 절단하여 2-3개 덩어리를 20ml M199 용액이 들어있는 50ml tube에 넣고, paraffin film으로 sealing하였다. Tube는 ice box에 넣어 세운 상태로 실험실로 운반하였다.

실험실에 도착한 후 모든 작업은 clean bench에서 무균적으로 수행하였다. 실험 기구나 뚜껑을 flame으로 멸균하면서 실험하였다. 피하지방은 바깥쪽 조직, blood clot 등은 제거하고 오염되지 않은 안쪽 지방조직을 이용하였다. 지방조직은 M199 용액으로 petri dish에서 2회 washing한 후에 ET를 이용하여 1.0g을 정량하여 10cm petri dish에 옮겼다. Medium은 10 cm plate 당 15 ml를 이용하였다. Bovine albumin 농도는 원래 5%를 조정하여 1%로 낮추어 이용하였다. 조직을 가위로 잘게 잘라서 10 mg 이하의 크기로 0.1mm diameter explant를 준비하였다.

Basal medium은 M199 medium으로 25 mM Hepes, 1% bovine albumin 및 antibiotics를 첨가, 이용하였다. Basal medium에 각종 성호르몬의 첨가하여 그 효과를 분석하였다. 17 β -estradiol, testosterone, dihydroxytestosterone, progesterone 및 dexamethasone을 50nM 및 500nM 두 가지 농도로 basal medium에 첨가하고 24h와 48h 동안 각각 배양한 후에 RNA 분리를 위한 sampling을 하였다. Total RNA를 분리하여 RT-PCR 방법으로 유전자 발현양상을 분석하였다.

라. 통계처리

분석방법 (RT-PCR vs Northern) 간의 비교와 조직간의 발현수준 비교는 짝지은 표본에 대한 t-test를 이용하였으며 성별 유전자 발현수준의 비교와 근내지방도에 기준한 high marbling group (MS 5 이상)과 low marbling group (MS 4 이하)간의 발현비교는 독립표본에 대한 t-test를 하였다. 이때, 비교하는 두 독립표본간의

분산은 F-test 결과 차이가 없었으므로 두 표본간의 모분산이 동일하다고 가정하여 오차분산을 가중평균하여(pooling)하여 검정하였다. 모든 t-test와 F-test는 95%의 신뢰수준에서 SAS proc ttest procedure를 이용하여 분석하였다.

성별 유전자 발현수준의 비교는 SAS proc glm procedure를 이용하였으며 산술 평균간 비교는 t-test (LSD test)를 통하여 95% 신뢰수준에서 행하였다. 분산분석 모형은 조직별로 성별 효과만을 고려하였다.

근내지방도와 등심내 조지방함량(ether extract %), 전단력(Warner-Bratzler shear force, kg/5in²)와 유전자 발현수준간 또는 이들과 성호르몬 농도와의 관계는 근육조직과 지방조직별로 단순 상관(Pearson's correlation coefficient)계수로 추정하였다. 이는 SAS 의 proc corr procedure를 통하여 추정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. RT-PCR에 의한 성별 유전자 발현 분석

1) 한우 조직 확보

한우 암컷, 거세우와 수소의 등심조직과 피하지방조직은 협동기관인 축산연구소와 협조하여 확보하였다. 도살 즉시 등심을 취하여 근육조직과 피하지방으로 구분하여 -70℃에 저장하였다. 거세우 14두, 비거세 10두 및 암소 10두 총 34두에서 조직을 채취하였으며, 성별 sample 확보 현황은 표 1-1과 1-2에 나타나 있다. 거세우는 high-marble group (근내지방도 5 이상)과 low-marble group (근내지방도 4이하)으로 sample을 구분하여 marbling 등급별 유전자 발현 비교에 활용하였다.

2) 성호르몬 신호전달 관련 유전자 확보

한우 근육조직과 지방조직에서 성호르몬 합성과 신호 전달 및 지방 축적과 방출 관련 유전자 중에서 androgen의 신호를 전달하는 androgen receptor 유전자 (Brandstetter 등, 2000), estrogen의 신호를 전달하는 estrogen receptor α , testosterone으로부터 estradiol 합성에 관여하는 aromatase 유전자 (Hinshelwood 등, 1993) 및 lipoprotein lipase 유전자 (Senda 등, 1987)를 확보하여 성별 (수소, 거세우, 암소) 및 등급별 (high-marble, low-marble) 유전자 발현 수준을 비교하였다.

Table 1-1. Steer used for sampling of adipose and muscle tissues

High-marble steer				Low-marble steer			
Individual number	Sample ID	Marbling score	Quality grade, Final grade	Individual number	Sample ID	Marbling score	Quality grade, Final grade
0050	H1	7	0, A1+	0064	L1	3	2, B2
0052	H2	5	1, A1	0068	L2	2	2, B2
1018	H3	5	1, B1	0070	L3	2	2, A2
184(99)*	H4	6	0	0051	L4	2	2,A2
232(100)*	H5	5	1	1004	L5	3	2, B2
212(106)*	H6	6	0	1012	L6	3	2, B2
184(107)*	H7	5	1	1028	L7	3	2, A2

* 서산개체의 종모우 명호. 괄호안의 숫자는 도축번호임. 4.7개월령 거세.

Table 1-2. Bulls and cows used for sampling of adipose and muscle tissues

Bulls				Cows			
Individual number	Sample ID	Marbling score	Quality grade, Final grade	Individual number	Sample ID	Marbling score	Quality grade, Final grade
21009	B1	2	2	0003	C1	1	3, C3
21011	B2	1+	3	0027	C2	1	3, B3
21012	B3	1+	3	2007	C3	1	4, D
21013	B4	1++	3	3019	C4	1	3, B3
21014	B5	2++	2	3023	C5	1	4, D
21015	B6	2	2	3025	C6	1	3, C3
21032	B7	5	1	3030	C7	1	4, D
21034	B8			3011	C8	1	3, B3
21035	B9			3013	C9	2	3, B3
21036	B10			4003	C10	3	3, C3

3) RT-PCR에 의한 성별 유전자 발현 분석

Total RNA 분리

Total RNA는 Chomozenski와 Sacchi (1987) 방법으로 분리하였으며, 등심에서 분리한 total RNA 사진이 **그림 1-1**에 제시되어 있다.

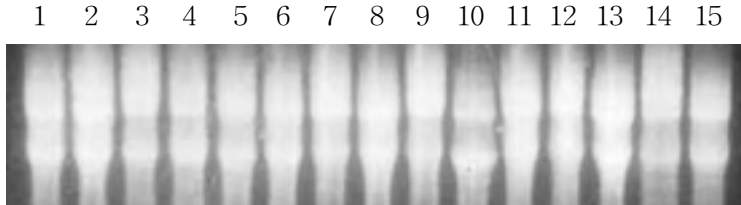


Figure 1-1. Total RNA isolated from muscle tissues

Lane	Sample ID	Lane	Sample ID	Lane	Sample ID
1	C1	6	H1	11	B1
2	C2	7	H2	12	B2
3	C3	8	H3	13	B3
4	C4	9	H4	14	B4
5	C5	10	H5	15	B5

RT-PCR conditions

위에서 분리한 total RNA를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. Total RNA 4 μ g을 template로 이용하여 AMV reverse transcriptase 반응으로 first-stranded cDNA를 확보하였다. PCR에 필요한 각각의 유전자에 대한 primer는 **표 1-3**에 제시되어 있는 sequence를 이용하였다. PCR product는 agarose 전기영동으로 확인하였다. 피하 및 등심조직에서 RT-PCR을 수행한 결과가 **그림 1-2A**에 나타나 있다. Androgen receptor cDNA는 피하지방조직, 근내지방조직, 등심근육조직 모두에서 RT-PCR (56 $^{\circ}$ C annealing, 35 cycles)에 의해서 예상 172bp band가 증폭되었다.

RT-PCR product TA-cloning

PCR product정제한 후 TA cloning system을 이용하여 cloning하였다. Transformation하고 white colony를 취하여 LB/ampicillin broth에 배양한 후 plasmid를

분리하고 EcoRI으로 절단하여 insert 삽입 유무를 조사하였다. 그 결과, pGEM-Easy androgen receptor insert는 172 bp임을 확인하였다. 염기서열을 분석하여 해당 유전자임을 확인하였다.

Table 1-3. RT-PCR primer information

Gene name (Ref)	5' primer	3' primer	PCR product size, bp	Product
androgen receptor (Brandstetter et al., 2000)	ttgattttcagcccatccactgga	cctggttttcaatgagtaccgcatg	172bp	ok
estrogen receptor α	tttgacatgttgctggctac	ttgcactcatgctgtatag	320bp	ok
estrogen receptor β (Malayer & Woods, 1998)	tctcctgtctctataactgcg	tagtgatatcccgacgcata	440bp	not expressed
aromatase	agagaatgtaaaccagtgca	tctcagaagggtgaccagga	490bp	low expression
β -actin	ggcaccacaccttctacaat	atctccttctgcatcctgctc	693bp	ok

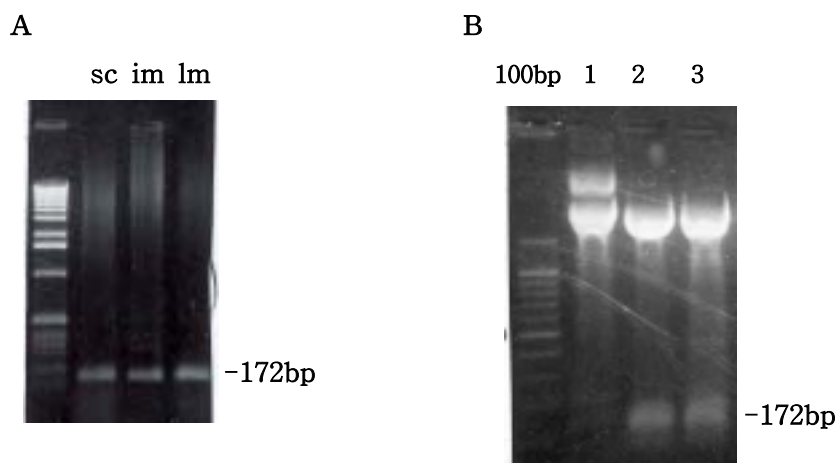
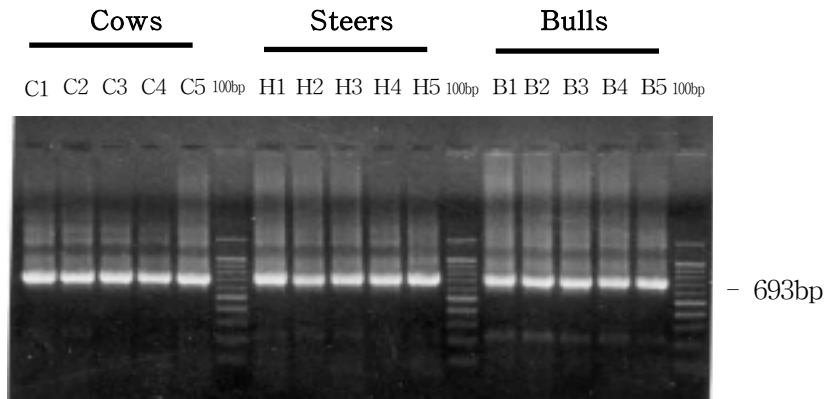


Figure 1-2. RT-PCR amplification (A) and TA cloning of androgen receptor cDNA in subcutaneous (sc), intramuscular (im) adipose tissues and in *longissimus* muscle tissues (lm). B. EcoR I digestion of pGEM-Easy androgen receptor clones 1, 2, and 3.

β-actin cDNA 증폭

PCR 증폭에 대한 정량을 위하여 control로 β-actin primer를 이용하였다. Annealing temperature 55°C 하에서 RT-PCR로 35 cycles을 증폭한 결과, 그림 1-3에 나타난 바와 같이 β-actin cDNA는 근육 및 피하지방 조직 모두에서 sample간에 유사한 수준으로 예상한 693 bp band가 증폭되었다.

Muscle tissues



Subcutaneous adipose tissues

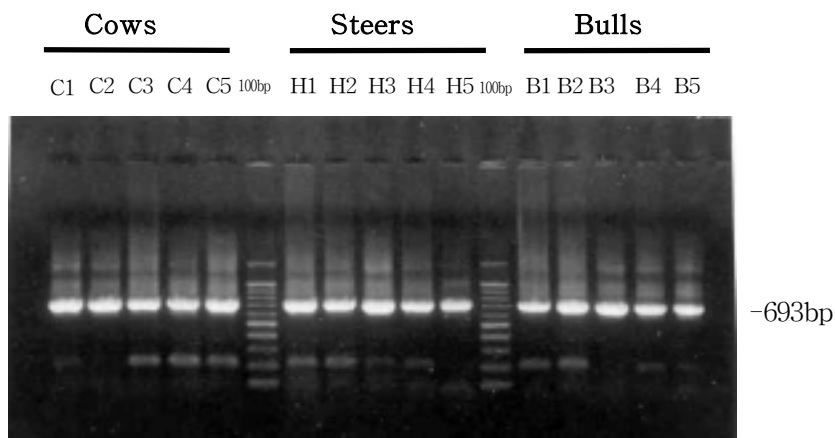


Figure 1-3. RT-PCR amplification of β-actin cDNA in muscle and subcutaneous adipose tissues.

Androgen receptor (AR) 유전자 증폭

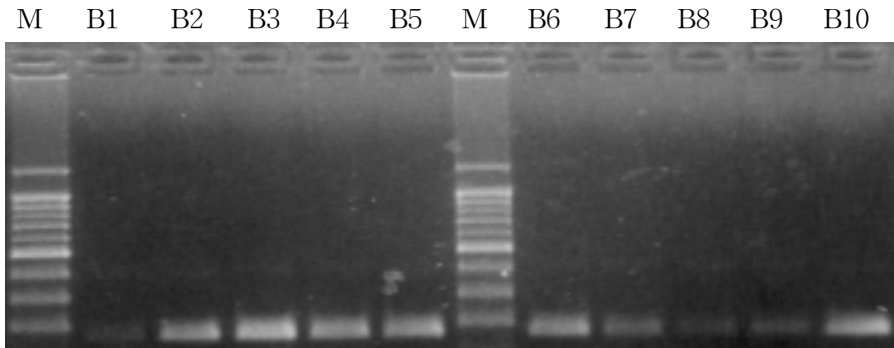
등심조직과 피하지방 조직에서 성별 AR 유전자 발현 수준을 RT-PCR 방법으로 비교·분석하였다. 등심 조직 AR 유전자 발현 수준은 거세우나 암소보다 비거세 수소에서 유의적으로 ($p < 0.05$) 높았다 (그림 1-4, 1-5, 1-6). 거세우와 암소의 등심조직 유전자 발현수준은 유사하였다. 반면, 피하지방 AR 유전자 발현 수준은 거세우, 암소, 비거세 수소에서 유사하여 성간에 차이가 없었다. 전체 data를 pooling 하였을 때, 근육조직의 AR 유전자 발현수준이 지방조직 보다 높았다 ($p < 0.01$).

일반적으로 androgen은 anabolic agent로서의 기능을 하고 있어 지방축적을 감소시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 양상은 testosterone 수준이 낮은 거세우의 고기가 수컷보다 근내지방 축적도가 훨씬 더 높은 결과와도 일치하는 것이다. 거세에 의해서 testosterone 수준이 낮아지면 aromatase에 의한 testosterone 으로부터 estrogen으로의 전변 양도 비례하여 낮아질 가능성이 높다. 따라서, 거세에 의해서 근내지방 축적도가 높아진 것이 antiadipogenic 효과가 있는 testosterone 수준이 낮아짐에 따라 지방축적이 증가된 결과인지 아니면, estrogen 수준이 저하된 결과인지는 불분명하다.

Testosterone 호르몬 signal은 androgen receptor (AR)를 경유하여 핵내에 target gene transcription을 촉진하는 경로로 전달되기 때문에 androgen receptor에 대한 연구가 중요하다. 사람과 rat의 지방조직에 AR이 존재한다는 것은 확인되었고, 특히 AR mRNA 수준이 adipogenesis 과정에서 증가되어 adipose tissue development를 조절하는 것으로 보고되었다 (Dieudonne 등, 1998). Bovine에서는 Montbeliard 품종의 근육 조직에서 AR mRNA 수준을 조사한 결과, 수소보다 거세우에서 AR mRNA 수준이 더 높았다 (Branstetter 등, 2000). Testosterone 수준이 높은 수소에서 AR mRNA가 낮게 발현된 것은 androgen이 AR expression을 억제한다는 것을 시사하고 있다. 그러나 조직내 testosterone은 aromatase에 의해서 estrogen으로 전변될 수 있기 때문에 estrogen에 의한 AR expression 조절 기작과 estrogen receptor를 통한 muscle growth 조절에 대한 연구가 추가적으로 진행되어야 할 것이다.

하지만 본 연구에서는 거세우나 암소보다 비거세 수소의 등심 조직에서 AR 유전자 발현 수준이 높았다. 아래의 northern data도 같은 양상을 보였다.

Muscle tissues



Subcutaneous adipose tissues

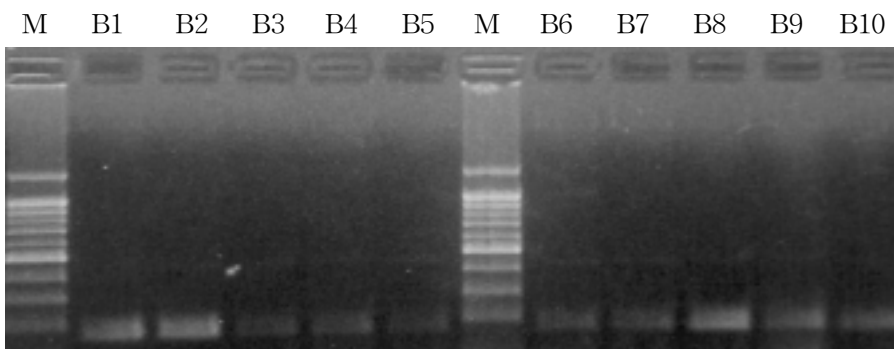
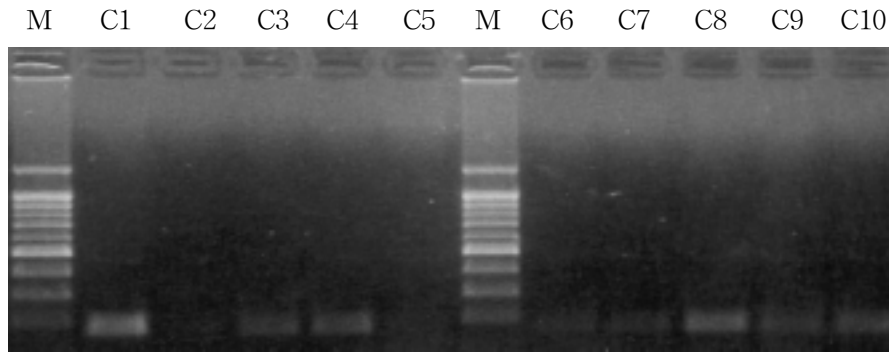


Figure 1-4. RT-PCR amplification of androgen receptor (AR) cDNA in muscle and subcutaneous adipose tissues of bulls.

Muscle tissues



Subcutaneous adipose tissues

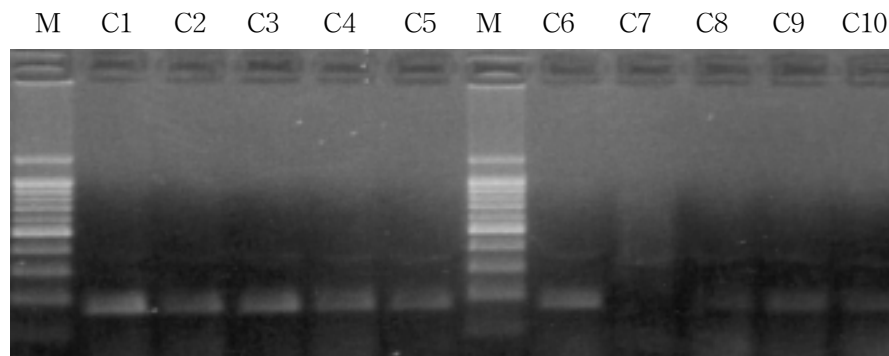


Figure 1-5. RT-PCR amplification of androgen receptor (AR) cDNA in muscle and subcutaneous adipose tissues of cows.

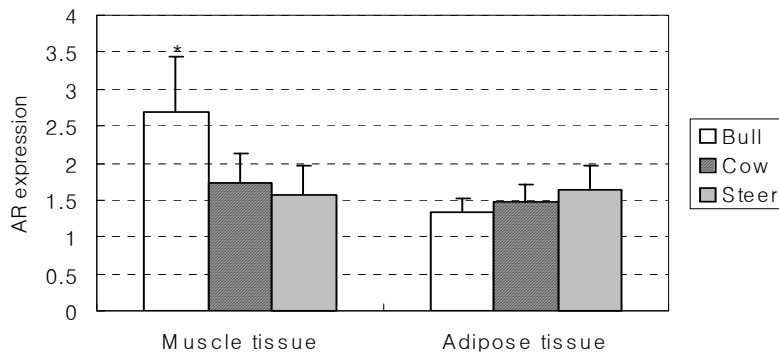


Figure 1-6. Expression levels of bovine androgen receptor (AR) gene in muscle and subcutaneous adipose tissues among sex phenotype in Korean cattle. Steer=14, Bull=10, Cow=10. * Higher in muscle of bull than that in steer and cow ($p<0.05$). Higher at muscle tissues than adipose tissues ($p<0.01$).

Estrogen receptor α (ER α) 유전자 증폭

등심조직과 피하지방조직에서 성별 ER α 유전자 발현 수준을 RT-PCR 방법으로 비교·분석하였다. 등심 조직과 피하지방 조직 모두에서 ER α 유전자 발현 수준은 비거세 수소나 암소보다 거세우에서 유의적으로 ($p<0.05$) 높았다 (그림 1-7). 비거세 수소와 암소의 경우는 등심 조직과 피하지방 조직 모두에서 유사한 발현 수준을 보였다. 전체 data을 pooling하였을 때, 근육조직의 ER α 유전자 발현수준은 지방조직과 비슷하였다. 향후 등심조직 ER α 유전자 발현수준이 왜 거세우에서 가장 높게 나타나는가에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Estrogen의 지방조직에서 작용은 estrogen receptor를 경유하여 매개되며, female의 지방조직에서 estrogen receptor α 와 estrogen receptor β 모두가 발현되는 것으로 보고되었다. Male에서 estrogen 수준이 female 보다 훨씬 낮은 관계로 estrogen이 male에서 지방대사에 미치는 영향에 대해서는 명확하지 않았다. 그러나 최근 estrogen-receptor- α 유전자가 결여된 (knock-out) 생쥐를 이용하여 male에서도 estrogen이 지방대사 조절에 중요한 역할을 하고 있다는 사실이 밝혀졌다. Estrogen receptor- α 유전자가 결여된 (knock-out) 생쥐 암컷과 수컷 모두에서 지방조직 함량이 증가하였고, insulin resistance와 impaired glucose tolerance 현상을

보였으며, energy expenditure가 감소하였다 (Cooke 등, 2001; Heine 등, 2000). Endogenous estrogen을 생산할 수 없는 aromatase 유전자가 결여된 (knock-out) 생쥐 암컷과 수컷 모두에서도 지방조직 함량이 증가하였고, insulin resistance와 impaired glucose tolerance 현상을 보였다 (Jones 등, 2000). 이러한 결과는 estrogen 함량이 수컷은 암컷보다 훨씬 적지만, 암컷과 수컷 모두에서 estrogen은 estrogen receptor α 를 통하여 지방 축적 조절 등의 에너지 대사 과정에서 중요한 역할을 하고 있음을 시사하고 있다.

특히, 한우 암컷은 혈중 estrogen 농도가 거세우나 수소보다 아주 높은데도 불구하고 암소 육은 거세우와 마찬가지로 근내지방도가 수컷 보다 우수하다. Rat을 이용한 연구에서 estrogen이 proadipogenic 효과가 있음이 보고되었다 (Diedonne 등, 2000). 아직까지 동물과 성별에 따라 estrogen이 지방대사에 미치는 효과가 명확하게 정립된 상태는 아니다. 따라서 한우에서 성별로 estrogen이 지방대사에 미치는 영향에 대한 연구가 필요하다.

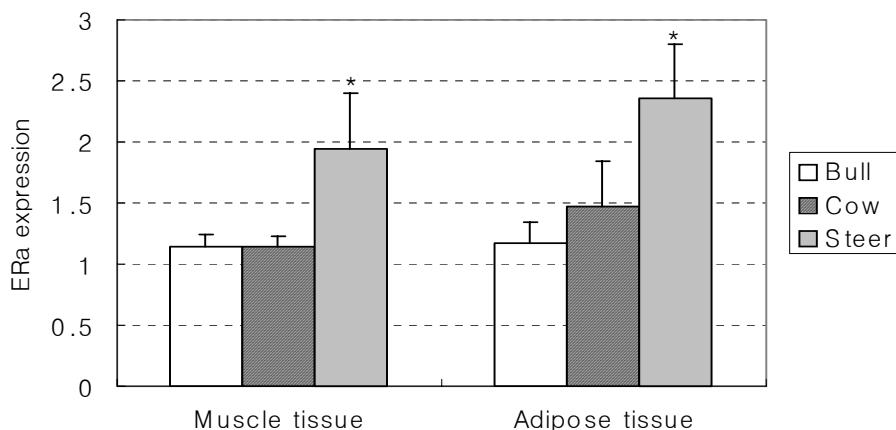


Figure 1-7. Expression levels of bovine estrogen receptor α (ER α) gene in muscle and subcutaneous adipose tissues among sex phenotype in Korean cattle. Steer=14, Bull=10, Cow=10. * Higher in steer than in bull and cow $p < 0.05$. No differences between muscle and adipose tissues ($p > 0.05$).

Aromatase 유전자 증폭

Aromatase 유전자 RT-PCR은 annealing 온도를 51°C에서 1°C씩 올려가면서 55°C까지 수행하였다. 실험 결과, aromatase 유전자 발현 수준은 estrogen의 주요합성 조직인 난소에서 가장 높았고, 다음으로 근내지방에서 약간 발현되었다 (그림 1-8). 피하지방 조직에서 성별 aromatase 유전자 발현 수준을 조사한 결과, 발현수준이 대체적으로 낮고 개체 간에 차이를 보여 정량하기는 어려웠다 (그림 1-9).

나. RT-PCR에 의한 등급별 유전자 발현 분석

거세우에서 근내지방도 5이상을 high-marble로 분류하고, 근내지방도 4이하를 low-marble로 분류하여 두 group간에 유전자 발현의 차이를 RT-PCR로 비교하였다. AR 유전자 발현 수준은 거세우 등심조직 및 피하지방 모두에서 low-marble group보다 high-marble group에서 약간 높은 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다 ($p>0.05$) (그림 1-10). ER α 유전자 발현수준은 거세우 등심조직 및 피하지방 모두에서 high-marble과 low-marble group간에 차이가 없었다 (그림 1-11).

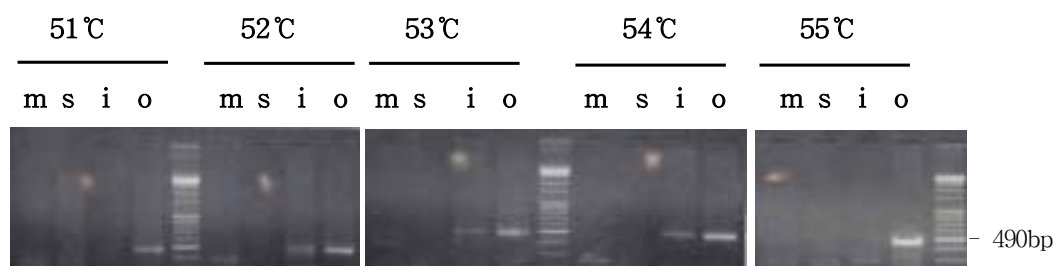
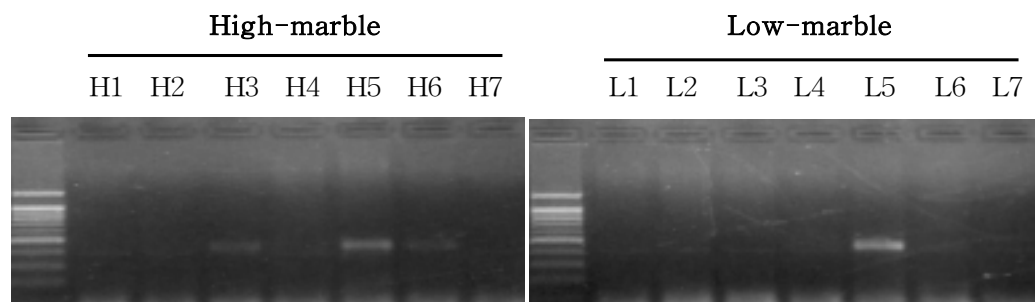
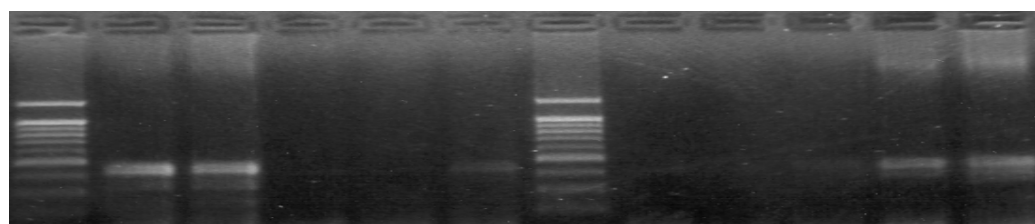


Figure 1-8. RT-PCR of aromatase cDNA with increasing annealing temperature in muscle (m), subcutaneous (s), intramuscular (i) adipose tissues and ovary (o) of Korean cattle.

Subcutaneous adipose tissues of steers



Subcutaneous adipose tissues of bulls



Subcutaneous adipose tissues of cows

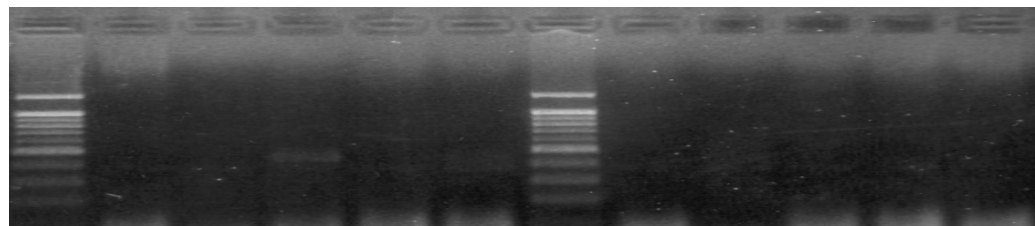
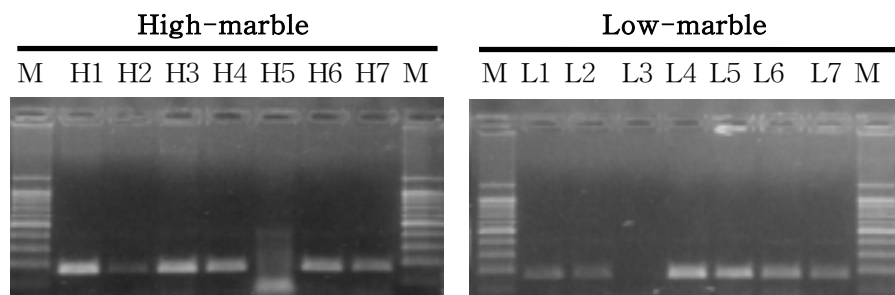
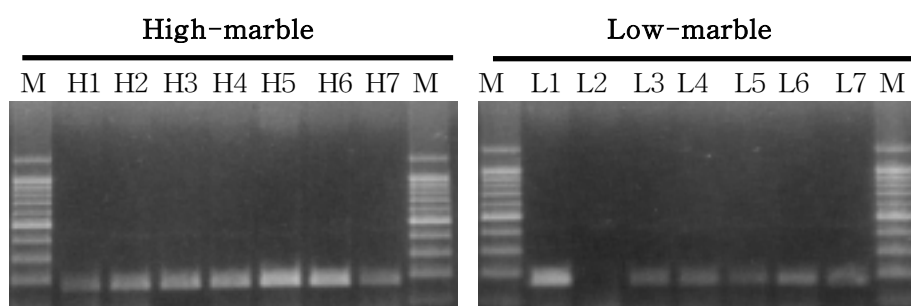


Figure 1-9. RT-PCR of aromatase cDNA in subcutaneous adipose tissues of Korean cattle.

Muscle tissues



Subcutaneous adipose tissues



Quantitation of RT-PCR product

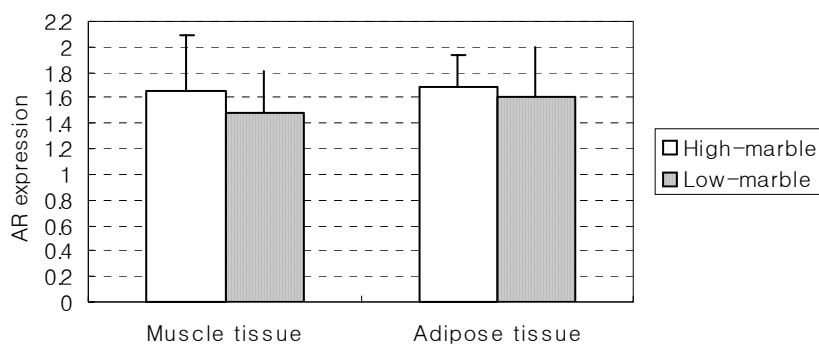
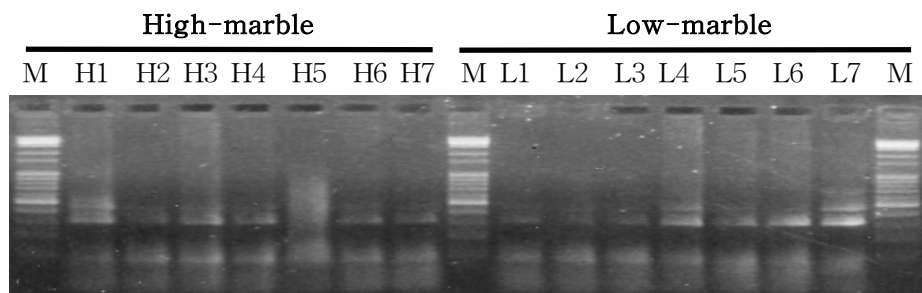
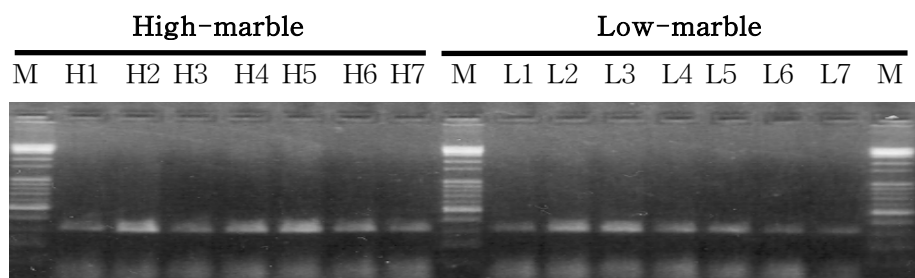


Figure 1-10. Comparison of expression levels of androgen receptor gene by RT-PCR in high-marble- (marbling score ≥ 5) and low-marble group (marbling score <4) in steer of Korean cattle. $n=7$. No difference between high- and low-marble group ($p > 0.05$).

Muscle tissues



Subcutaneous adipose tissues



Quantitation of RT-PCR product

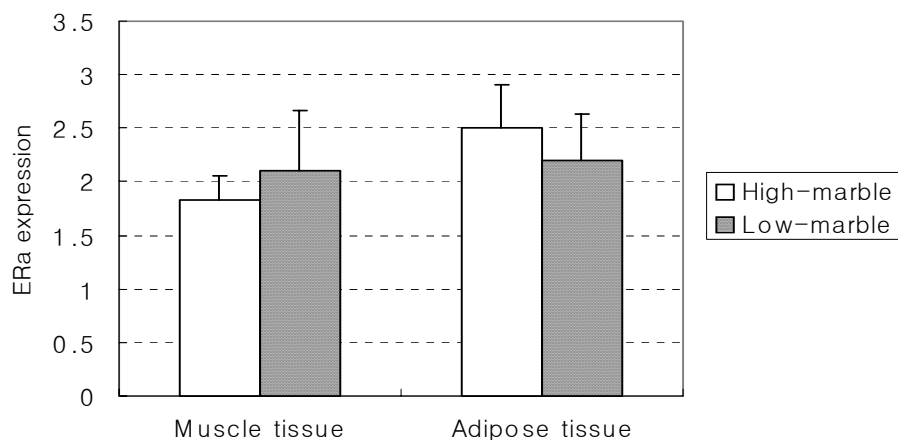


Figure 1-11. Comparison of expression levels of estrogen receptor α (ER α) gene by RT-PCR in high-marble- and low-marble group in steer of Korean cattle. n=7. No difference between high- and low-marble group ($p > 0.05$).

다. Northern에 의한 유전자 발현 분석

Northern 방법으로 AR 및 lipoprotein lipase 유전자 발현을 분석하였다. 위와 같은 방법으로 근육 및 지방조직에서 total RNA를 분리하고, total RNA 20ug을 1.0% formaldehyde agarose gel 전기영동으로 분리하였다. cDNA insert를 이용하여 hybridization에 필요한 ³²P-labeled probe를 random priming kit (Stratagene)를 사용하여 제조하였다. Membrane을 제조한 probe와 hybridization하여 clone의 발현 양상을 조사하였다.

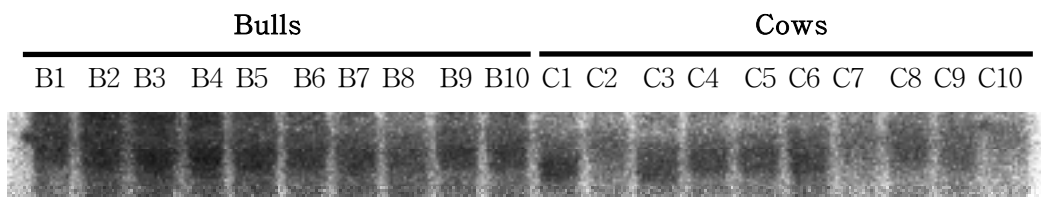
1) Androgen receptor (AR) 유전자 northern

등심근육에서 androgen receptor 유전자 (message 1.8 kb)의 성별 northern 분석 결과는 **그림 1-12**에 나타나 있다. Northern 후 message를 phosphoimage analyzer로 정량하고, total RNA band의 28S RNA band도 정량하여 normalization하여 발현수준을 비교하였다.

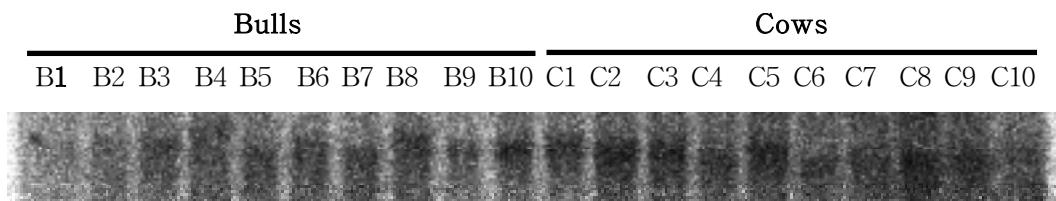
비거세 수소 등심조직에서 AR 유전자 발현 수준은 거세우 및 암소보다 높았으며 ($p < 0.05$), 거세우와 암소는 유사한 수준을 보였다. 반면, 피하지방 조직에서는 AR 유전자 발현 수준이 비거세우, 거세우 및 암소 간에 차이가 없이 유사하였다. 전체 data를 pooling하였을 때, 근육조직의 AR 유전자 발현수준이 지방조직 보다 높았다 ($p < 0.01$). 등심조직 및 피하지방조직에서 이러한 northern 실험 결과는 위의 RT-PCR 실험 결과와 동일한 경향을 보여주고 있다.

거세우에서 근내지방도 등급별로 AR 유전자 발현수준을 northern 방법으로 비교하였다 (**그림 1-13**). 거세우 high-marble group의 등심 및 피하지방 조직 모두에서 AR 유전자 발현수준이 low-marble group보다 높은 경향을 보였으나, 유의적인 차이는 없었다 ($p > 0.05$).

Muscle tissues



Subcutaneous adipose tissues



Quantitation of northern message

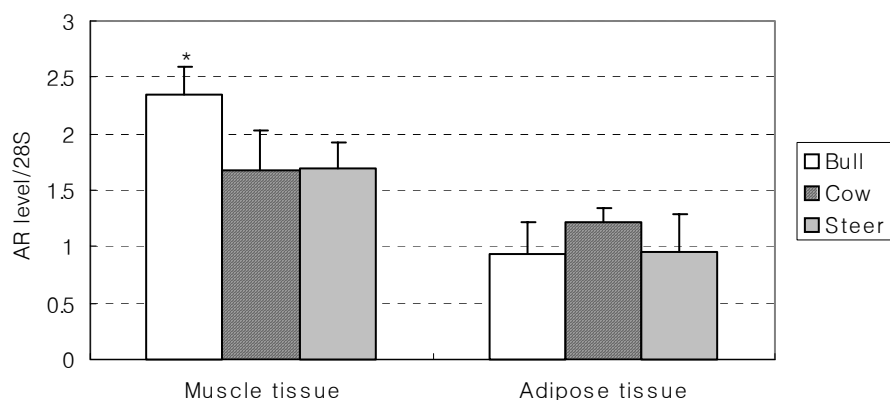
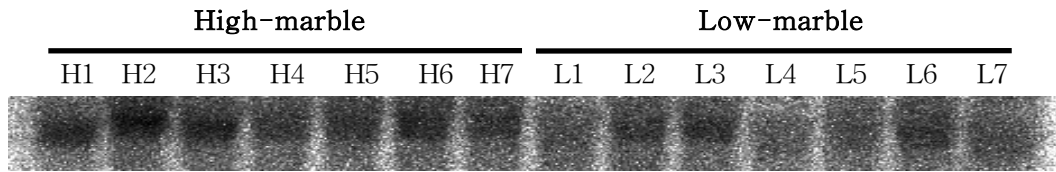
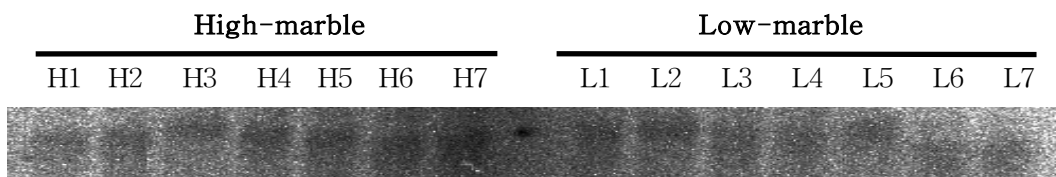


Figure 1-12. Expression levels of bovine androgen receptor (AR) gene in muscle and subcutaneous adipose tissues among sex phenotype in Korean cattle. Total RNA was analyzed by northern method. Bottom. Expression level of AR gene was normalized by band intensity of 28S ribosomal RNA. Steer=14, Bull=10, Cow=10. * higher in bull than in steer and cow at muscle tissues ($p < 0.05$). Higher at muscle tissues than adipose tissues ($p < 0.01$).

Muscle tissues of steers



Subcutaneous adipose tissues of steers



Quantitation of northern message

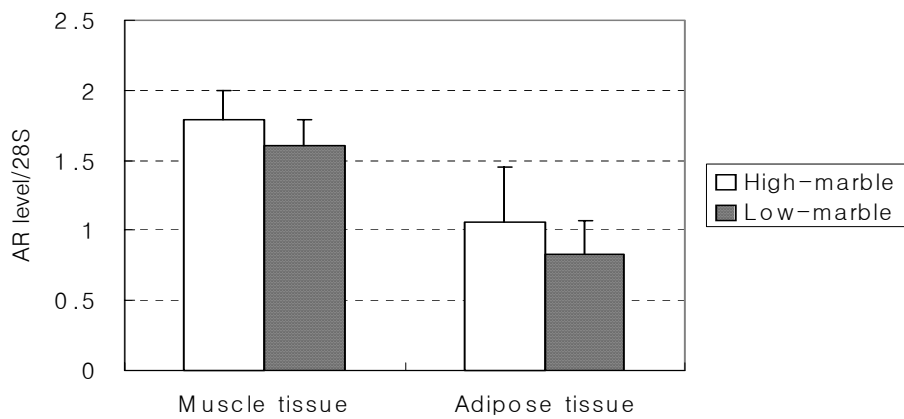
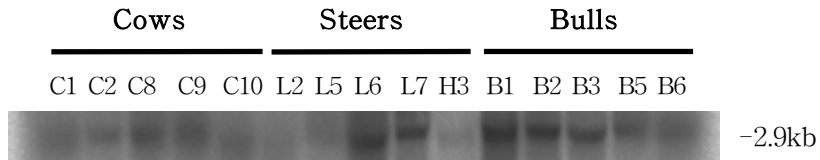


Figure 1-13. Comparison of expression levels of androgen receptor gene by northern analysis in high-marble- and low-marble group in steer of Korean cattle. n=7. No difference between high- and low-marble group ($p > 0.05$).

2) Lipoprotein lipase (LPL) northern

등심근육에서 LPL mRNA의 northern 분석은 그림 1-14에 나타난 바와 같이, 비거세우에서 가장 높았으며, 거세우와 암소는 낮은 수준을 보였다.

A



B

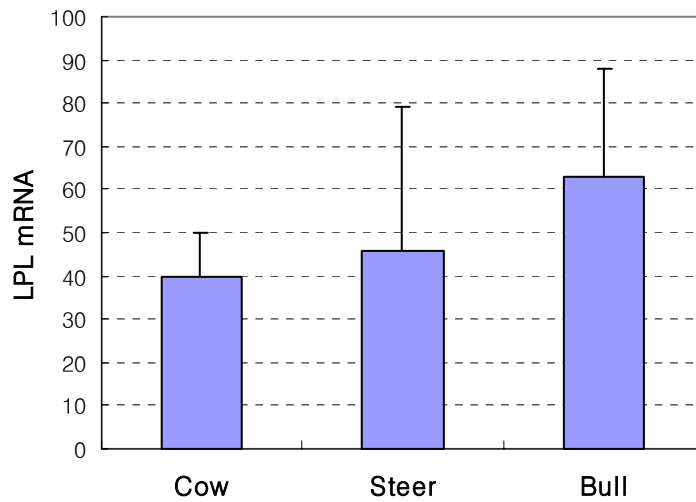


Figure 1-14. Lipoprotein lipase (LPL) mRNA levels among sex phenotype in muscle tissues of Korean cattle. Northern data were quantitated by phosphoimage analyzer. Mean+standard deviation (n=5).

라. 육질과 유전자 발현 수준과의 상관 분석

AR 및 ERa 유전자 발현 수준과 근내지방도 (marbling score; ms), 지방함량 (crude fat content in the rib eye, ether extract; ee) 및 전단력 (Warner-Bratzler shear force; wbsf)과의 Pearson 상관도를 분석하였다 (표 1-4). 근내지방도는 피하지방 ERa 유전자 발현 수준과 가장 높은 상관 ($r=0.61$)을 나타냈다. 이러한 결과는 거세(castration)가 일반적으로 근내지방도를 향상시키며, ERa 유전자 발현 수준이 비거세우나 암소보다 거세우에서 높다는 본 연구의 결과와 일치하는 data이다. 근내지방도는 피하지방 AR 유전자 발현 수준 및 근육 ERa 유전자 발현 수준과는 각각 0.4 및 0.39의 유의적인 상관도를 보였으며, 근육 AR 유전자 발현 수준과는 낮은 상관 ($r=-0.28$)을 보였다. Rib eye 조지방 함량 역시 피하지방 ERa 유전자 발현수준과 가장 높은 상관 ($r=0.59$)을 나타냈으며, 근육 ERa 유전자 발현 수준과도 유의적인 상관 ($r=0.48$)을 나타냈다. 전단력은 근육 AR 유전자 발현 수준과 유의적인 부의 상관 (-0.42)을 보였다. 전단력은 피하지방 AR 유전자 발현 수준, 근육 ERa 유전자 발현 수준 및 피하지방 ERa 유전자 발현 수준과는 낮은 상관을 보였다.

근육조직 AR 유전자 발현 분석방법에 있어서 RT-PCR 방법과 northern 방법간에 높은 상관 (0.68)을 나타냈다. 이러한 높은 상관은 두 방법 모두 AR 유전자 발현 분석을 위해 사용할 수 있음을 보여주는 결과이다.

Table 1-4. Pearson's correlation coefficients (top) and probability (bottom) between selected meat quality characteristics and gene expression levels in muscle and adipose tissues of Hanwoo

Trait	armrt	armn	arart	aran	eramrt	eraart
ms	-0.28	-0.26	0.40	0.04	0.39	0.61
	0.15	0.18	0.03	0.82	0.04	0.0004
ee	-0.20	-0.53	0.12	-0.44	0.48	0.59
	0.36	0.01	0.59	0.04	0.02	0.004
wbsf	-0.42	-0.40	0.27	-0.02	0.02	0.14
	0.05	0.07	0.22	0.93	0.93	0.52

ms = marbling score

ee = crude fat content in the rib eye (ether extract)

wbsf = Warner-Bratzler shear force (higher the tensile and lower the tenderer)

armrt = Androgen receptor (AR) mRNA levels determined by RT-PCR in muscle tissues.

armn = AR mRNA levels determined by northern in muscle tissues.

arart = AR mRNA levels determined by RT-PCR in adipose tissues.

aran = AR mRNA levels determined by northern in adipose tissues.

eramrt = Estrogen receptor alpha (ERa) mRNA levels determined by RT-PCR in muscle tissues.

eraart = ERa mRNA levels determined by RT-PCR in adipose tissues.

마. 지방조직 세포배양에서 성호르몬 처리에 의한 유전자 발현 분석

피하지방에서 성호르몬 처리에 의한 유전자 발현 비교는 explant culture system을 이용하여 Kristensen 등 (1999)의 방법에 준하여 수행하였다. 여러 가지 성호르몬 (17 β -estradiol, progesterone, testosterone, dihydroxytestosterone, dexamethasone)을 50 nM 또는 500 nM 두 가지 농도로 배지에 첨가하고 24h와 48h 동안 각각 배양한 후에 total RNA를 분리하여, RT-PCR 방법으로 AR mRNA 유전자 발현 수준을 분석하였다 (그림 1-15). GLM 통계처리 결과 호르몬 처리는 AR 유전자 발현에 유의적으로 영향을 주었다. 호르몬의 농도 효과는 없어서 50 nM과 500 nM 처리는 동일한 결과를 나타냈다.

개별 호르몬 처리 결과를 보면, 17 β -estradiol 처리로 배양 24h에는 유전자 발현 수준이 변하지 않았지만, 17 β -estradiol 처리후 배양 48h에는 AR mRNA 수준이 감소하였다 ($p < 0.05$) (그림 1-16). Estradiol 처리시간을 24시간에서 48시간으로 늘렸을 때 AR mRNA 수준이 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.05$). Progesterone 처리 역시 배양 24h에는 유전자 발현 수준이 변하지 않았지만, progesterone 처리 48h에는 AR mRNA 수준이 감소하였다 ($p < 0.05$) (그림 1-17). Progesterone 처리시간을 24시간에서 48시간으로 늘렸을 때 AR mRNA 수준이 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.05$). Testosterone 처리는 24h 및 48h 모두에서 AR mRNA 수준에 영향을 미치지 않았다 (그림 1-18). Dihydroxytestosterone 처리는 24h 및 48h에 모두 AR mRNA 수준을 감소시켰다 ($p < 0.05$) (그림 1-19). Dexamethasone 처리는 24h 및 48h에 모두 AR mRNA 수준을 감소시켰다 ($p < 0.05$) (그림 1-20). 전체적으로 성호르몬 처리는 AR mRNA 수준에 영향을 미치지 않았거나, 감소 효과를 주었다.

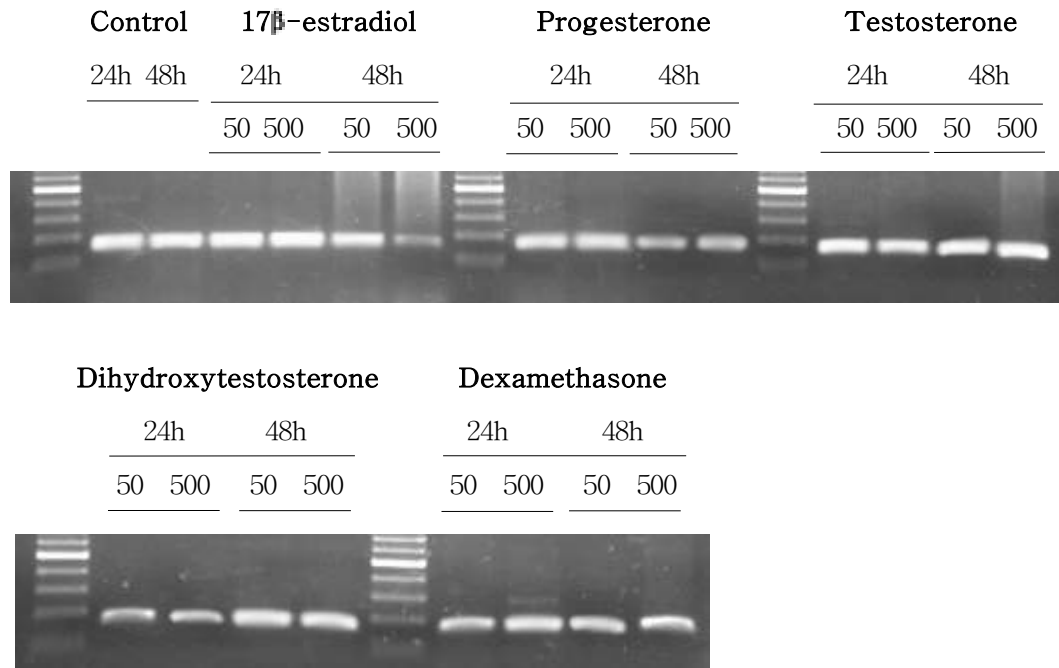


Figure 1-15. Effect of various steroid hormones on expression of androgen receptor (AR) gene in explant culture of bovine subcutaneous adipose tissues. Explant cultures were performed for 24h or 48h with the hormone treatments (50 nM and 500 nM). RT-PCR (58°C annealing temp., 40 cycles) products were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis.

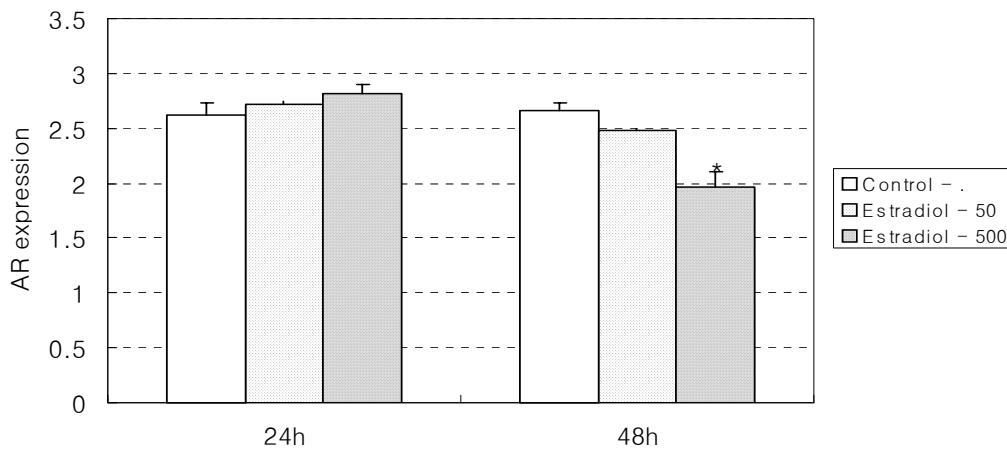


Figure 1-16. Expression levels of androgen receptor (AR) gene in explant culture of subcutaneous adipose tissues with 17 β -estradiol treatment (50 nM or 500 nM) for 24 and 48h. * lower in estradiol treatment at 48h ($p < 0.05$). lower at 48h than at 24h in estrogen-treated group ($p < 0.05$).

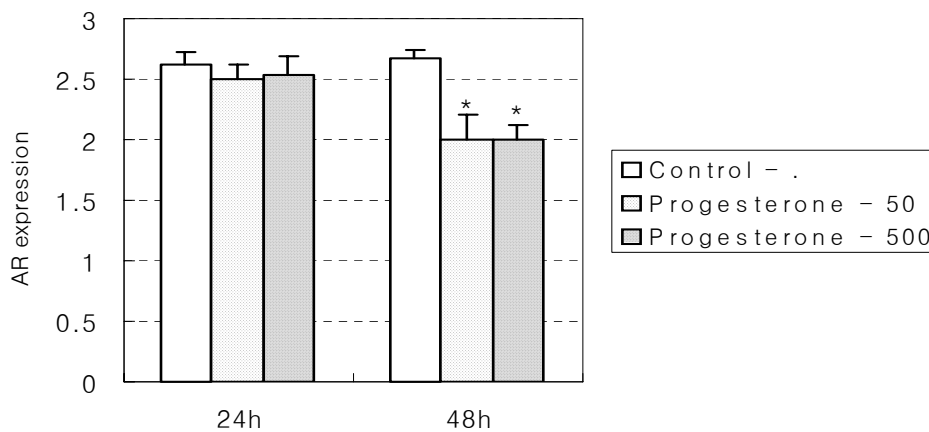


Figure 1-17. Expression levels of androgen receptor (AR) gene in explant culture of subcutaneous adipose tissues with progesterone treatment (50 nM or 500 nM) for 24 and 48h. * lower in progesterone treatment at 48h ($p < 0.05$). lower at 48h than at 24h in progesterone-treated group ($p < 0.05$).

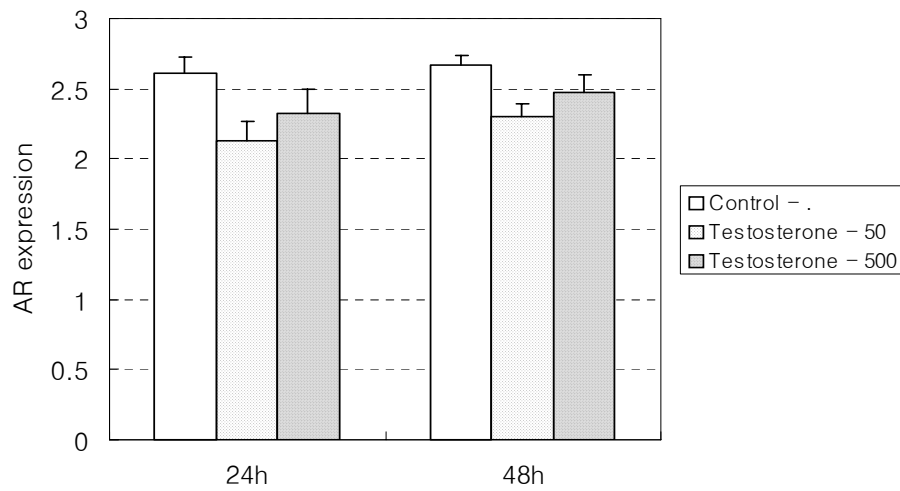


Figure 1-18. Expression levels of androgen receptor (AR) gene in explant culture of subcutaneous adipose tissues with progesterone treatment (50 nM or 500 nM) for 24h and 48h. No difference in testosterone treatment ($p > 0.05$). no incubation time effect.

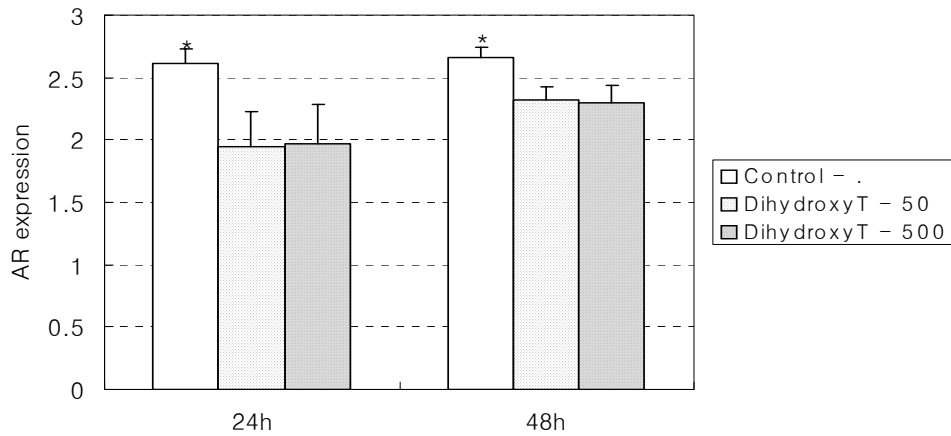


Figure 1-19. Expression levels of androgen receptor (AR) gene in explant culture of subcutaneous adipose tissues with dihydroxytestosterone treatment (50 nM or 500 nM) for 24 and 48h. * higher in control at both 24h and 48h ($p < 0.05$). no incubation time effect.

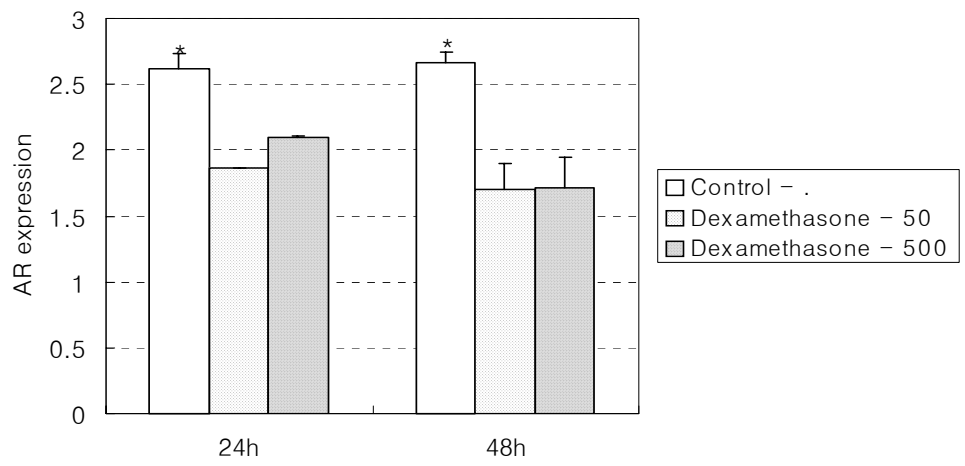


Figure 1-20. Expression levels of androgen receptor (AR) gene in explant culture of subcutaneous adipose tissues with dexamethasone treatment (50 nM or 500 nM) for 24 and 48h. * higher in control at both 24ha and 48h ($p < 0.05$). no incubation time effect.

제 2 절 한우 조직내 성호르몬 수준 및 관련 효소에 대한 성별 비교

1. 서설

성별 육질의 차이는 성별로 다른 내분비계의 작용과 대사작용의 차이에서 비롯될 것으로 추정하며, 그 중에서도 특히 성호르몬 계의 차이가 가장 큰 영향을 미칠 것으로 생각된다. 우선 수컷과 거세우의 생리적인 차이는 정소의 유무에 있으며, 따라서 정소에서 분비되는 androgen계 성호르몬의 수준 차이가 육질 등급에 영향을 미칠 것으로 판단하였다. 성별 혈청 (serum)내 호르몬 수준의 차이를 보면, 3/8 Simmental-5/8 Hereford 교잡종에서 암컷은 낮은 수준의 성장호르몬과 높은 수준의 insulin과 cortisol 등의 내분비계 시스템이 근육내 지방축적을 높이고, 수컷은 높은 수준의 성장호르몬 및 testosterone과 낮은 수준의 cortisol 등의 내분비계가 육량을 증진시키고 지방축적을 감소시켜 육질이 우수하지 않은 것으로 보고하였다 (Gettys 등, 1988). 반면, 거세우는 수컷과 유사한 높은 수준의 성장호르몬, proteolytic activity가 있는 높은 수준의 cortisol, lipogenic 효과가 있는 높은 수준의 insulin 및 정소제거에 의한 낮은 수준의 testosterone 등의 내분비계의 영향을 받는다고 보고하였다 (Gettys 등, 1988). 일반적으로 성호르몬은 사료 섭취량, 에너지 소비, 체중 및 지방 축적 조절 대사와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다 (Mystkowsi 등, 2000). Androgen과 estrogen 등의 성호르몬은 지방축적을 감소 (antiadipogenic)시키는 효과가 있는 것으로 알려져 있으나, 생각처럼 간단하지 않고 복잡한 요소가 작용하는 것으로 보고되고 있다.

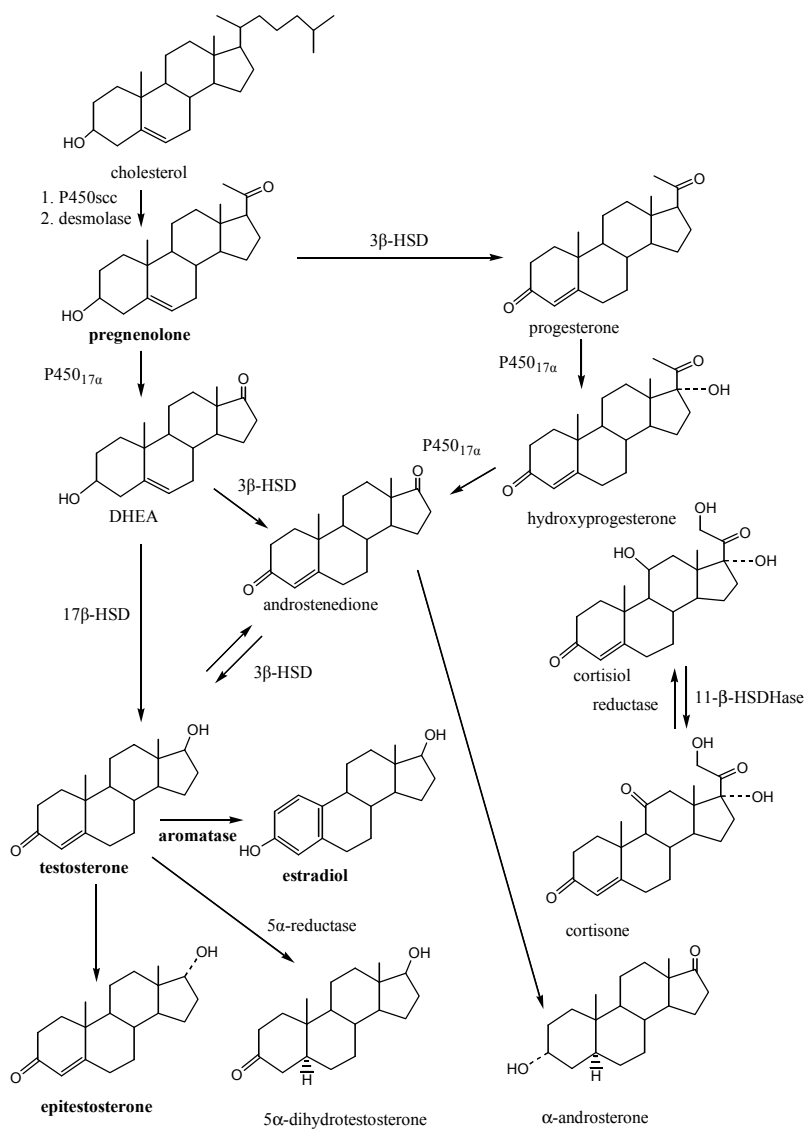
소에서는 이러한 분야에 대한 연구는 전무한 실정이고 단지 독일의 Steinhart 중심의 연구 그룹은 Simmental에서 고기 내에 존재하는 스테로이드 호르몬을 분석, 보고하였다. 수컷의 고기에서는 거세우보다 androgen계 호르몬인 testosterone과 androgen precursor인 dehydroepiandrosterone 수준은 높은 반면, 수컷은 거세우보다 성호르몬의 기본적인 precursor인 pregnenolone과 catabolic corticosteroid인 cortisol 수준은 낮았다 (Fritsche와 Steinhart, 1998; Fritsche 등, 1988b). Circulating 호르몬이 고기의 근육조직과 지방조직에 축적되어 수컷과 거세우의 고기에서 이러한 호르몬 수준의 차이가 보일 가능성이 높다. 하지만 최근의 연구에

의하면, 근육조직과 지방조직에서 스테로이드 호르몬이 endogenous하게 합성된다는 보고가 많다. 따라서 수컷과 거세우 고기에서 보이는 스테로이드 호르몬 양의 차이는 근육조직과 지방조직에서 합성된 스테로이드 호르몬 양의 차이에 의한 요인도 생각할 수 있다. Fritsche 등 (1998a)은 또한 쇠고기의 visible한 근간지방과 근내지방 부위를 제거한 low fat 고기와 지방조직을 제거하지 않은 high fat 고기에서 호르몬 수준을 비교하였다. 그 결과, testosterone, dehydroepiandrosterone (DHEA), androstendione, androsterone, pregnenolone과 progesterone 수준은 high fat 고기에서 높은 반면, cortisol 양은 high fat 고기에서 더 낮았다. 이러한 data는 근내지방 또는 근간지방에는 근육조직보다 더 많은 양의 androgen계 호르몬이 축적되거나 또는 endogenous하게 지방조직에서 합성될 수 있음을 시사하는 결과이다.

Estrogen의 주요 합성장소는 난소이지만, 암컷과 수컷 모두의 근육이나 지방조직에 존재하는 aromatase는 testosterone을 estrogen으로 전변시켜 ovary-independent estrogen 생산 과정에서 중심적인 역할을 한다. 사람의 지방조직에서는 aromatase 효소에 의해서 많은 양의 estrogen이 testosterone으로부터 전변되고 있음이 확인되었고, 지방 축적 함량이 증가하면 testosterone에서 estrogen으로 전변되는 양도 증가한다. Estrogen이 leptin 생산을 높이는 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, leptin 또한 지방조직에서 aromatase 활성을 높여 estrogen으로의 전변 양을 높이는 역할을 하는 것으로 보고되었다. Glucocorticoid는 aromatase activity를 증가시켜 지방조직에서 testosterone으로부터 estrogen으로 전변시키는 강력한 촉진제 (potent stimulator) 역할을 하고 있다 (Joyner 등, 2000). 이러한 작용은 사람에서 남자와 여자가 다른 것으로 보고되었다. McTernan 등 (2000)은 여자의 복부지방조직에서는 insulin과 cortisol이 aromatase 활성을 촉진하였으나, 남자의 지방조직에서는 insulin과 cortisol이 aromatase 활성을 억제시키는 작용을 하는 것을 관찰하였다. 이러한 암수 성에 따른 aromatase의 활성 조절 양상의 차이는 궁극적으로는 성별 스테로이드 대사 작용에 영향을 미침으로써, 성별로 지방 축적과 방출 작용을 조절하는 역할을 할 것으로 사료된다. 상기에 기술한 바와 같이 estrogenic compound implant가 소에서 성장률을 촉진시키고 지방축적은 감소시킨다는 것은 알려져 있지만, estrogen이 지방축적을 감소시키는 기작은 국내는 물론 외국에서도 아직 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 한우 근육조직과 지방조직에 존재하는 스테로이드 호르몬 (α -androsterone, dehydroepiandrotestosterone, epitestosterone, testosterone, andro-

stendione, pregnenolone, progesterone 17 α -hydroxyprogesterone, cortisone, 17 α -estradiol, 17 β -estradiol 등; 아래 steroid hormone 생합성 경로 참조) 수준과 testosterone을 estrogen으로 전변시키는 효소인 aromatase activity를 비거세우, 거세우, 암소에서 비교 분석하고, 그 결과를 육질등급 및 masculinity index 와의 상호관계를 분석하였다.



Biosynthetic pathway of steroid hormones

2. 재료 및 방법

가. Steroid 호르몬 분석

조직내 steroid 호르몬은 아래의 **steroid hormone 분석 flow chart**에 제시한 순서대로 추출 후 GS-MS를 이용하여 분석하였다

1) 시료의 채취

한우 암소, 수소 및 거세우의 등심 조직을 1Kg 이상을 채취하여 근육조직, 피하 지방, 근내 지방으로 분리한 후 -20°C 에 저장하였다. 약 10g의 시료를 호르몬 분석에 사용하였다.

2) Steroid 추출(Hartmann과 Steinhart, 1997)

약 10g의 시료에 35 ml 의 methanol을 넣고 0.2-2.0 ug/kg의 standard hormone 을 methanol에 녹여 첨가하고 분쇄시켰다. 분쇄된 suspension 용액을 ice-bath에 넣고 10 ml의 증류수를 가하였다. 혼합물을 homogenizer(PolyTron PT3000)로 homogenize한 후, 60°C 로 15분 동안 가열하여 단백질을 침전시켰다. 혼합물을 식힌 후, 2000 g에서 10 분 동안 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 상등액을 20 ml의 hexane으로 추출하여 지방을 제거하였다. Methanol 수용액 층을 45°C 에서 Rota-Vap으로 진공 가열하여 methanol을 증발시킨다. 얻어진 수용액을 solid-phase extraction하였다.

3) Solid-phase extraction

Crude extract의 분리 및 clean up: C_8 -SPE cartridge를 2 ml의 methanol과 3 ml의 증류수로 순차적으로 conditioning하고, 추출된 수용액을 loading하고 약한 진공으로 뽑아준다. 추출용기와 cartridge를 2x1 ml의 증류수와 1 ml의 methanol/water (40:60, v/v)로 elution하여 8 ml의 tube에 받았다. 1.5 ml의 methanol/water(60:40, v/v)로 elution하여 polar steroid (fraction 1)를 8 ml의 tube에 받았다. 1.5 ml의 methanol로 elution하여 nonpolar steroid (fraction 2)를 8 ml의 tube에 받았다. 45°C 에서 Rota-Vap으로 진공 가열하여 solvent를 증발시켰다.

Polar steroid의 clean up: 용매를 날린 fraction 1을 2 ml의 water-saturated ethyl acetate에 ultrasonication하여 녹였다. Si-SPE cartridge를 4 ml의 water-

saturated ethyl acetate로 conditioning하고, 시료를 loading하여 진공 없이 filtration 하였다. tube와 cartridge를 2x1 ml의 water-saturated ethyl acetate로 elution시켰다. 분획된 용액을 8 ml tube에 합하고 45°C에서 Rota-Vap으로 진공 가열하여 solvent를 증발시켰다.

Phenolic steroid와 neutral steroid의 분리 (phenolate의 추출): 용매를 날린 fraction 2를 200 ul의 water-saturated chloroform에 ultrasonication하여 녹인 후 1.8 ml의 hexane을 가하고 잘 섞어 준다. 2 ml의 0.25 M KOH 용액을 가하고 1 분 동안 완전히 섞어준 후, 2분 동안 원심분리하여 층을 분리시켰다 (층 분리가 원활하지 않으면 몇 방울의 ethanol을 첨가할 수도 있다). 위층(유기층)이 fraction 2a이고 아래층(수용액층)이 fraction 2b이다. 위층은 nonpolar steroid의 clean up을 위하여 보관하였다. 아래층(fraction 2b)을 0.5 ml의 1 M HCl을 포함한 8 ml tube에 옮겼다. 필요하다면 용액의 pH를 검사하였다(용액의 pH는 중성이거나 약산성이어야 한다).

Nonpolar neutral steroid의 clean up: phenolate extraction에서 보관한 유기층(fraction 2a)을 2 ml의 hexane/ethyl acetate(90:10, v/v)로 두 번 condition된 cartridge에 loading하고, 1 ml의 hexane/ethyl acetate(90:10, v/v)로 두 번 씻고, 2.5 ml의 hexane/ethyl acetate(25:75, v/v)로 nonpolar neutral steroid를 elution하여 8 ml의 tube에 받는다. 45°C에서 Rota-Vap으로 진공 가열하여 solvent를 증발시켰다.

Nonpolar phenolic steroid의 clean up: phenolic steroid는 다음과 같은 방법으로 fraction 2b로부터 재 추출하였다. fraction 2b를 3x2 ml의 diethyl ether에 1분 동안 완전히 agitation시켰다. 필요하다면 약 1분 동안 원심분리하여 수용액 층을 분리시켰다. Ether 층을 합하고 용매를 날린 후, 1 ml의 ethyl acetate/methanol(80:20, v/v)에 녹였다. NH₂-SPE cartridge를 2 ml의 water-saturated ethyl acetate와 2ml의 ethyl acetate/methanol(80:20, v/v)으로 순차적으로 condition 시키고, 시료(fraction 2b)를 loading한 후, 3x1 ml의 ethyl acetate/methanol(80:20, v/v)으로 시료 tube를 씻어 elution 시켰다. 분획을 8 ml의 tube에 받고, 45°C에서 Rota-Vap으로 진공 가열하여 solvent를 증발시켰다.

4) Steroid의 trimethylsilylation

Internal standards: methyltestosterone(0.5 ug/kg), medroxyprogesterone (1.0 ug/kg)의 methanol 용액을 각각의 sample에 넣어 steroid의 분실과 비교하여 internal standard로 사용하였다.

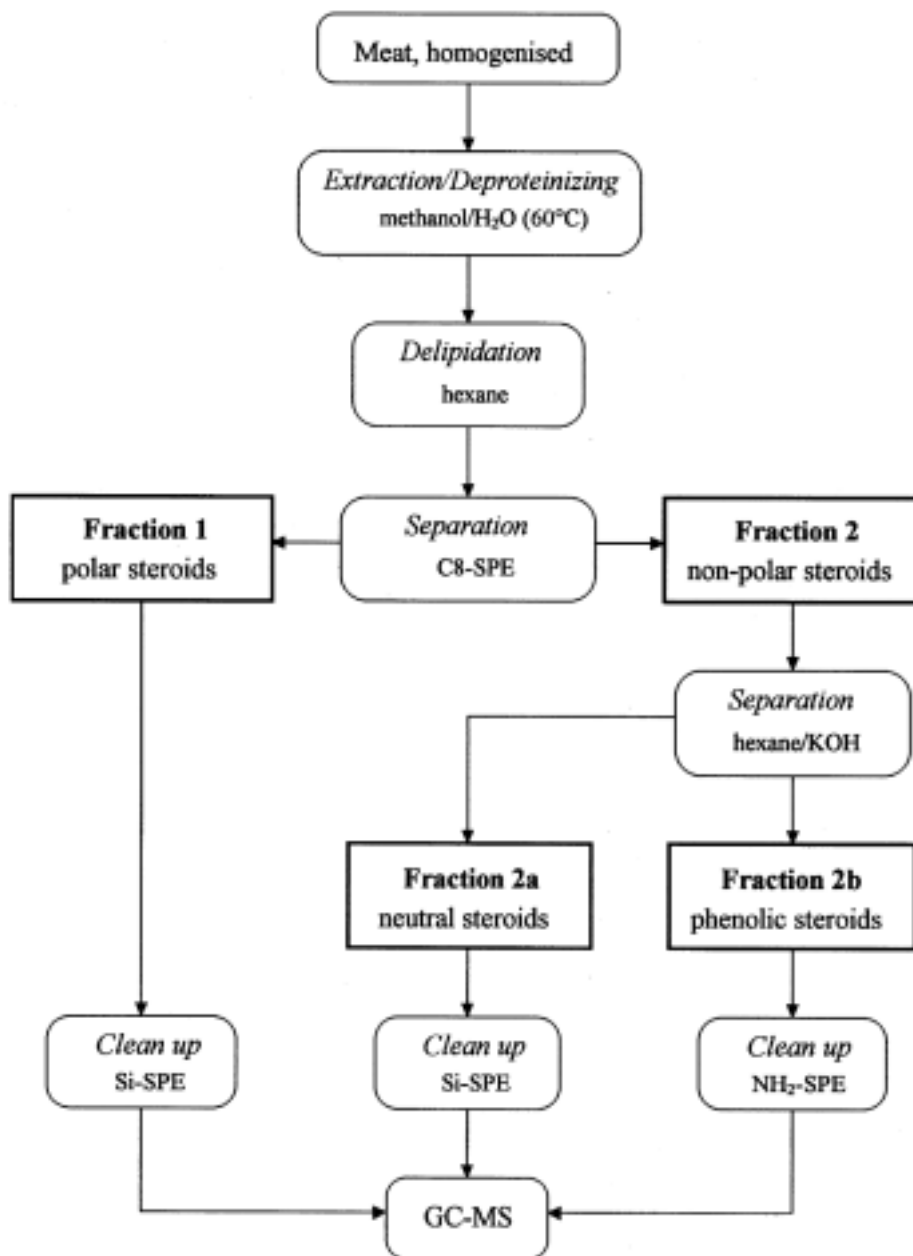
Silylation: 정제된 steroid 추출물의 methanol을 질소가스로 날리고, 40 ul의 MSTFA/TMIS/DTE(1000:2:2, v/v/w)를 가한 후, tube를 밀봉한 다음, 60°C에서 15 분 동안 가열하였다. C-17에 side chain을 가지고 있는 steroid는 반응을 완결시키기 위해 4°C에서 overnight하였다.

5) GC-MS 분석

GC-MS 조건: HP-5 capillary column(30m × 0.25 mmID, 0.25µm film thickness), carrier gas(helium:purity, 5.0), flow rate:1.0 ml/min, oven temperature: from 130°C(1 분) to 290°C at 12°C/min, 20 min 등온, injector temp: 260°C(1 min, splitless), transfer line: 290°C, EI ionization: electron energy:70 eV, ion source temp: 180°C의 조건을 사용하였으며, Table. Molecular mass for the SIM-MS analysis of steroids 에서 나타낸 바와 같은 질량을 사용하여 SIM 분석하였다.

Molecular mass for the SIM-MS analysis of steroids

Steroid	SIM-MS	Steroid	SIM-MS
α-androsterone	434, 419	cortisone	630, 615
5α-dihydrotestosterone	434, 405	hydrocortisone	632, 617
dehydroepiandrotestosterone	432, 417	17α-estradiol	416, 326
epitestosterone		17β-estradiol	
testosterone			
androstendione	430, 415	estrone	414, 399
pregnenolone	460, 445	estriol	504, 414
progesterone	458, 443		
17α-hydroxyprogesterone	546, 441		
medroxyprogesterone	560, 545		



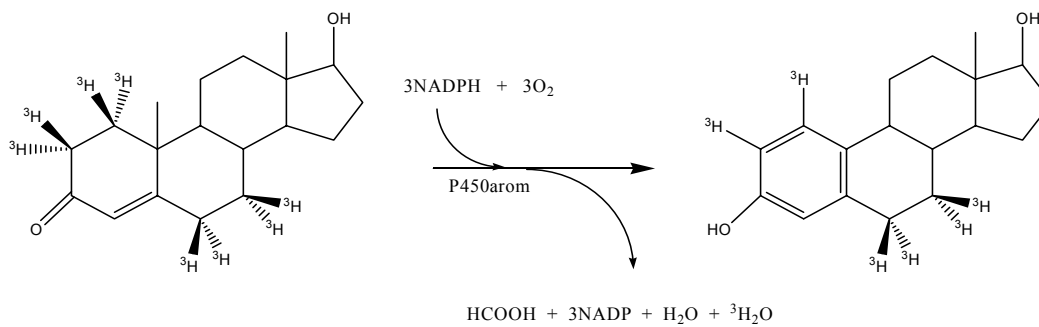
Flow chart of steroid hormone analysis

나. Aromatase activity 측정

Testosterone을 기질로 하여 17- β -estradiol을 형성하는 aromatase (**Scheme of aromatase reaction**)의 활성은 생성된 estradiol과 남아있는 testosterone의 percent를 다음과 같이 계산하여 측정하였다 (Larionov *et al*, 2003).

$$\bullet \text{ estradiol percent} = \frac{\text{estradiolCPM} \times \frac{4}{3}}{\text{testosteroneCPM} + \text{estradiolCPM} \times \frac{4}{3}} \times 100$$

$$\bullet \text{ testosterone percent} = \frac{\text{testosteroneCPM} \times \frac{4}{3}}{\text{testosteroneCPM} + \text{estradiolCPM} \times \frac{4}{3}} \times 100$$



Scheme of aromatase reaction

Enzyme assay : 동결된 500mg의 sample를 액체 질소에 넣고 분쇄한 후 분쇄된 powder를 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) 에 넣고 sonicator로 sonication시켰다. 4,000g에서 10분간 centrifugation 후 상등액만을 다시 70,000g에서 2시간 centrifugation시킨 후 pellet을 1ml 의 0.1M phosphate(pH 7.4)에 넣어서 재 용해시켰다. 재 용해된 pellet fraction에 NADPH generating system(10mM Nicotinamide, 2mM NADP, 2mM NAD, 2mM ATP, 10mM glucose-6-phosphate, 2U/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase)와 [1,2,6,7-³H] testosterone(10 μ Ci, 96Ci/mmol) 과 60nM의 radio-inert testosterone을 첨가한 후 5시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 shaking incubation시켰다. Incubation 후 4ml 의 methanol을 첨가하여(80%) 효소반응을 중지시켰다. Procedural losses를 monitor하기 위해 radio-inert estradiol 500 μ g을 첨가한 후 -20 $^{\circ}$ C에서 overnight시켰다. Overnight 한 후에 centrifuge시켜서 상등액만

을 조심히 옮긴 후 methanol을 evaporate시킨다. evaporate후 남은 수용액에 3×2ml의 diethyl ether 로 agitation후 ether fraction만을 모아서 evaporate시켰다.

Steroid의 clean up: solvent를 날린 fraction을 hexane:chloroform(80:20, v/v)에 용해시켰다. C18 SPE cartridge를 4ml의 hexane:chloroform(80:20, v/v)으로 conditioning하고 hexane:chloroform(80:20, v/v)에 용해된 sample을 loading하여 진공없이 filtration시킨다. hexane:chloroform(80:20, v/v)으로 steroid fraction을 elution시킨 후 solvent를 evaporate시켰다.

Thin liquid chromatography: fraction을 약 50 μ 이하로 증발시킨 후 silica gel F₂₅₄ TLC plate에 spotting 한 후 chloroform:acetyl acetate(55:45, v/v)를 solvent로 사용하여 분리시켰다. UV₂₅₄에서 확인해서 estradiol이 있는 부위만 긁어모아 methanol에 용해시켰다. 원심분리하여 TLC의 silica gel particle을 제거한 후 solvent를 evaporate시켰다.

Estradiol fraction의 농도 측정: silica gel particle을 제거한 estradiol fraction을 500 μ l의 ethanol에 용해시킨 후 AB₂₈₀에서 농도를 측정하였다.

Liquid scintillation counter를 이용한 radioactivity측정: estradiol fraction을 scintillation vial에 넣은 후, 20ml의 Scintillation cocktail을 넣는다. control과 함께 estradiol fraction sample과 함께 scintillation counting하였다.

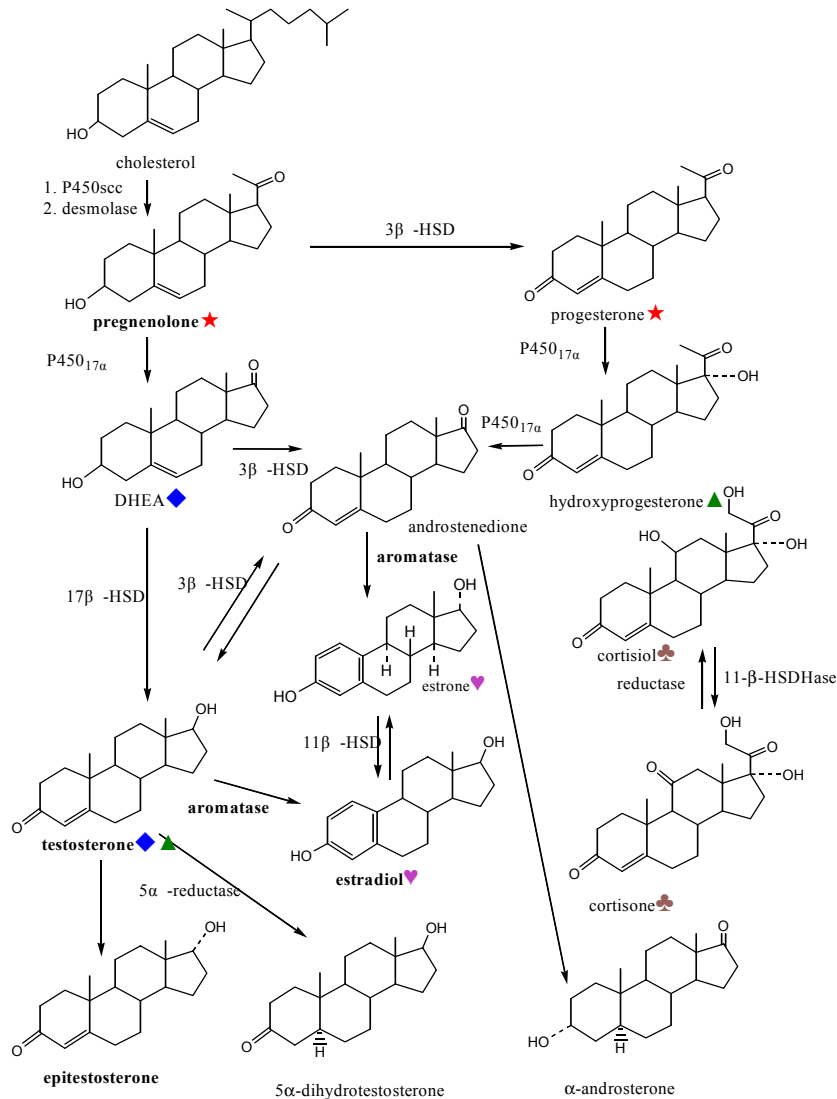
다. 통계 처리

성호르몬은 androgen 계열 6가지 호르몬과 estrogen 계열 4가지, progesterone 계열 3가지 및 corticoid 계열 2가지를 근육조직과 지방조직에서 분석한 결과 각 개별 호르몬 농도와 계열별 호르몬 농도의 단순 합을 산출하여 농도들 간의 관계를 도체의 근내지방도 및 등심내 조지방함량(ether extract %) 과 전단력(Warner-Bratzler shear force, kg/5in²)과 함께 분석하였다. 상관관계는 SAS의 proc corr procedure를 이용하였으며 상관계수는 Pearson의 단순상관계수로 추정하였다.

성별 또는 high marbling group (MS 5 이상)과 low marbling group (MS 4 이하) 간 호르몬 수준의 평균간 비교는 SAS proc glm procedure (일반선형모형)를 이용하여 95% 신뢰수준에서 t-test를 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 스테로이드 호르몬 분석



Mutual dependence of steroid hormone content and biosynthetic pathway.

Pairs of steroid hormones with $r > 0.9$ and $p \leq 0.0001$ were selected in muscle and fat tissues ♣: found in muscle tissue only; ◆, ♥: found in fat tissue only; ★ ▲: found in muscle and fat tissue.

근육조직과 지방조직에서 23개의 스테로이드 함량을 분석한 결과, cortisol-cortisone 함량은 근육조직에서만, DHEA-testosterone과 estrone-estradiol 함량은 지방조직에서만 상호 의존이 관찰되었으며, pregnenolone-progesterone과 testosterone-hydroxyprogesterone 함량은 근육조직과 지방조직에서 공통적으로 상호 의존이 관찰되었다. 이들 대부분의 스테로이드(testosterone-hydroxyprogesterone 제외)는 생합성 경로에서 서로 직접적으로 이웃하고 있는 호르몬들으로써(**Mutual dependence of steroid hormone content and biosynthetic pathway** 그림 참조), 이들 호르몬의 생합성이 rapid equilibrium을 이루고 있음을 시사하고 있다. 모든 시료에서 estrogen이나 corticoid의 함량은 androgen이나 progestogen의 함량보다 상대적으로 높았다 (Fig. 2-1, 2-2, 2-3, 2-8, 2-9, 2-10).

근육조직에서 중성 steroid 호르몬인 α -androsterone, dehydroepiandrosterone, epitestosterone, 5α -dihydrotestosterone, androstenedione, testosterone, pregnenolone, progesterone, 17α -hydroxyprogesterone 등은 비거세, 거세우 및 암소 성간에 차이가 없었다. Polar 및 phenolic steroid hormones 중에서 17α -estradiol, estrone은 거세우에서 가장 높았고, 반면 estriol과 hydrocortisone은 거세우에서 가장 낮았다 (그림 2-5). MI 값은 아래의 식에 의하여 계산하였다. 근육조직에서 MI 값은 비거세우에서 가장 높았으나 성간에 유의적인 차이는 없었다 (그림 2-6). 근육조직에서 high-marble group이 low-marble group보다 높은 MI 값을 보였으나 유의적인 차이는 없었다 (그림 2-7).

$$MI = \frac{T + epiT \times 0.64}{\sqrt{preg}} \times 100$$

지방조직에서 중성 steroid 호르몬인 α -androsterone, androstenedione, dehydroepiandrosterone, epitestosterone, 5α -dihydrotestosterone, testosterone, pregnenolone, progesterone, 17α -hydroxyprogesterone 등은 비거세, 거세우 및 암소 성간에 차이가 없었다 (그림 2-11). Polar 및 phenolic steroid hormones 중에서 17α -estradiol, estrone은 거세우에서 가장 높았고, 반면 estriol, cortisone, hydrocortisone은 거세우에서 가장 낮았다 (그림 2-12). 지방조직에서 MI 값은 비거세우에서 가장 높았으나 성간에 유의적인 차이는 없었다 (그림 2-13). 지방조직에서 high-marble group이 low-marble group보다 높은 MI 값을 보였으나 유의적인 차이는 없었다 (그림 2-14).

근육조직과 지방조직의 steroid 호르몬 data를 모두 pooling하여 통계 처리를 하

었다. Neutral 호르몬 중에서 α -androsterone, androstenedione은 거세우에서 가장 높았다 (그림 2-15; 2-20). 반면, testosterone과 17 α -hydroxyprogesterone 비거세우에서 유의적으로 높았다 (그림 2-15). Polar 및 phenolic steroid hormone 중에서 17 α -estradiol, estrone은 거세우에서 가장 높았고, estriol, cortisone, hydrocortisone은 거세우에서 가장 낮았다 (그림 2-16; 2-21).

호르몬을 group 별로 androgens (α -androsterone, dehydroepiandrosterone, epitestosterone, 5 α -dihydrotestosterone, androstenedione, testosterone), progestogens (pregnenolone, progesterone, 17 α -hydroxyprogesterone), estrogens (17 α -estradiol, estrone, 17 β -estradiol, estriol), corticoids (cortisone, hydrocortisone)로 합하여 pooling한 data를 분석한 결과, androgen과 progestogen은 성간에 유의적인 차이는 없었다 (그림 2-17). 반면, estrogen은 steer에서 유의적으로 높았고, corticoid는 유의적으로 낮았다 (그림 2-18).

거세우에서 steroid hormone 수준과 marbling group간에 관련성을 비교하였다. High-marble group이 low-marble group보다 pregnenolone 및 17 α -hydroxyprogesterone 수준은 유의적으로 높았다 (그림 2-22, 2-27). 따라서 이 두 호르몬은 근내지방도와 연관성이 높은 것으로 판단된다. Neutral steroid hormone 중에서 다른 호르몬들 (α -androsterone, dehydroepiandrosterone, epitestosterone, 5 α -dihydrotestosterone, androstenedione, testosterone, progesterone)은 high-marble group과 low-marble group간에 유의적인 차이가 없었다. Polar 및 phenolic steroid 호르몬인 17 α -estradiol, estrone, 17 β -estradiol, estriol, cortisone, hydrocortisone은 high-marble group과 low-marble group간에 유의적인 차이가 없었다 (그림 2-23).

호르몬을 group 별로 androgens, progestogens, estrogens, corticoids로 합하여 거세우에서 steroid hormone 수준과 marbling group간에 관련성을 비교하였다. Androgens, progesterones, estrogens, corticoids 모두 high-marble group과 low-marble group간에 유의적인 차이가 없었다 (그림 2-24, 2-25). MI 값은 거세우에서 high-marble group이 low-marble group보다 높았으나 유의적인 차이는 없었다 (그림 2-26).

1) 근육조직 성호르몬 수준

Table 2-1. Content of steroid hormones in muscle tissues of bulls

		단위 nmol/kg							
Group	Class	개체 번호	21009	21011	21012	21013	21014	21015	평균
Neutral	Androgens	α -androsterone	0.06	0.28	0.24	0.06	0.04	0.03	0.12
		dehydroepiandrosterone	0.05	0.30	0.25	0.05	0.03	0.03	0.12
		epitesterone	0.08	0.24	0.28	0.08	0.04	0.03	0.12
		5α -dihydrotestosterone	0.08	0.24	0.31	0.09	0.04	0.03	0.13
		androstenedione	0.08	0.46	0.37	0.11	0.05	0.06	0.19
		testosterone	0.07	0.25	0.35	0.09	0.05	0.04	0.14
	Progestogens	pregnenolone	0.04	0.23	0.28	0.07	0.03	0.03	0.11
		progesterone	0.04	0.24	0.27	0.07	0.03	0.03	0.11
		17α -hydroxyprogesterone	0.03	0.20	0.20	0.04	0.02	0.02	0.09
Phenolic	Estrogens	17α -estradiol	3.25	3.23	3.24	5.98	5.06	5.61	4.39
		estrone	1.75	2.57	2.47	4.63	4.35	4.83	3.43
		17β -estradiol	7.62	5.65	6.06	12.96	9.38	8.88	8.43
		estriol	3.10	3.41	3.47	5.01	4.85	5.33	4.20
Polar	Corticoids	cortisone	2.24	2.01	1.86	2.18	2.19	2.02	2.08
		hydrocortisone	1.96	1.82	1.61	1.82	1.85	1.61	1.78
Total amount of androgens			0.41	1.77	1.80	0.48	0.25	0.22	0.82
Total amount of progestogens			0.11	0.67	0.75	0.18	0.08	0.08	0.31
Total amount of estrogens			15.72	14.86	15.24	28.58	23.64	24.65	20.45
Total amount of corticoids			4.20	3.83	3.47	4.00	4.04	3.63	3.86
Masculinity index			28.76	42.68	51.9	27.17	21.81	17.63	31.66

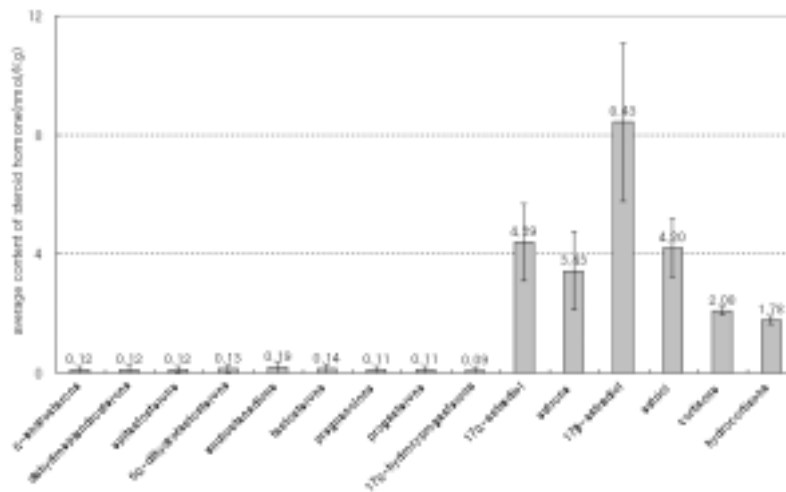


Figure 2-1. Average content of steroid hormones in muscle tissues of bulls.

Table 2-2. Content of steroid hormones in muscle tissues of steers

단위 nmol/kg

Group	Class	개체 번호	1004	1012	1018	1028	0064	0068	0070	0050	0051	0052	평균	
Neutral	Androgens	α-androsterone	0.13	0.38	0.05	0.04	0.23	0.15	0.28	0.14	0.11	0.20	0.17	
		dehydroepiandrosterone	0.03	0.15	0.05	0.04	0.02	0.02	0.02	0.02	0.12	0.03	0.04	0.05
		epitesterone	0.03	0.28	0.06	0.04	0.05	0.03	0.04	0.15	0.10	0.14	0.09	
		5α-dihydrotestosterone	0.04	0.25	0.06	0.04	0.26	0.16	0.37	0.13	0.15	0.22	0.17	
		androstenedione	0.10	0.15	0.11	0.06	0.42	0.41	0.38	0.14	0.36	0.54	0.27	
		testosterone	0.04	0.14	0.07	0.05	0.04	0.05	0.04	0.14	0.04	0.06	0.07	
	Progestogens	pregnenolone	0.03	0.06	0.05	0.03	0.08	0.07	0.06	0.12	0.11	0.07	0.07	
		progesterone	0.05	0.07	0.05	0.03	0.07	0.06	0.07	0.12	0.06	0.08	0.07	
		17α-hydroxyprogesterone	0.03	0.05	0.04	0.02	0.02	0.02	0.02	0.11	0.02	0.02	0.04	
Phenolic	Estrogens	17α-estradiol	3.83	4.45	4.44	3.99	5.38	16.96	12.60	16.22	14.92	12.65	9.54	
		estrone	3.38	3.18	4.20	3.40	10.62	19.20	13.87	12.78	10.15	12.91	9.37	
		17β-estradiol	3.03	3.36	5.27	4.81	5.05	13.59	26.04	23.50	11.66	8.86	10.52	
		estriol	4.92	4.70	5.60	4.71	2.53	3.21	2.44	2.97	2.86	2.43	3.64	
Polar	Corticoids	cortisone	2.12	1.60	1.92	1.59	2.03	1.85	1.75	1.81	1.71	2.77	1.91	
		hydrocortisone	1.61	0.57	1.44	1.16	1.67	1.30	1.22	1.24	1.10	1.44	1.27	
Total amount of androgens			0.37	1.35	0.4	0.27	1.02	0.82	1.13	0.82	0.79	1.2	0.82	
Total amount of progestogens			0.11	0.18	0.14	0.08	0.17	0.15	0.15	0.35	0.19	0.17	0.17	
Total amount of estrogens			15.16	15.69	19.51	16.91	23.58	52.96	54.95	55.47	39.59	36.85	33.07	
Total amount of corticoids			3.73	2.17	3.36	2.75	3.7	3.15	2.97	3.05	2.81	4.21	3.19	
Masculinity index			16.11	68.91	24.15	19.77	14.02	13.87	12.74	34.43	16.29	28.51	24.88	

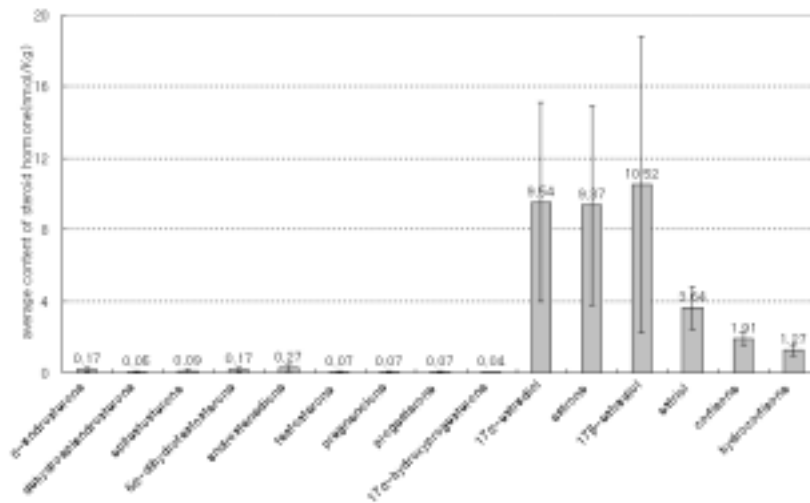


Figure 2-2 Average content of steroid hormones in muscle tissues of steers.

Table 2-3. Content of steroid hormones in muscle tissues of cows

단위 nmol/kg

Group	Class	개체 번호	2007	2013	3001	3019	3023	3025	3030	평균
Neutral	Androgens	♂-androsterone	0.15	0.04	0.07	0.19	0.04	0.04	0.04	0.08
		dehydroepiandrosterone	0.10	0.09	0.06	0.15	0.04	0.12	0.03	0.08
		epitestosterone	0.16	0.22	0.10	0.21	0.04	0.22	0.03	0.14
		5 α -dihydrotestosterone	0.18	0.22	0.11	0.26	0.05	0.21	0.04	0.15
		androstenedione	0.26	0.28	0.15	0.34	0.06	0.19	0.05	0.19
	testosterone	0.09	0.04	0.09	0.12	0.07	0.09	0.040	0.08	
	Progestogens	pregnenolone	0.13	0.13	0.09	0.18	0.04	0.20	0.03	0.11
	progesterone	0.13	0.05	0.08	0.18	0.03	0.12	0.03	0.09	
	17 α -hydroxyprogesterone	0.07	0.02	0.05	0.09	0.02	0.09	0.02	0.05	
Phenolic	Estrogens	17 α -estradiol	5.02	2.68	4.10	4.24	3.90	2.96	4.33	3.89
		estrone	4.42	5.79	3.76	3.96	3.99	5.04	4.17	4.44
		17 β -estradiol	6.11	16.98	4.93	5.35	4.79	7.55	5.86	7.36
		estriol	5.58	5.93	5.58	5.66	5.72	6.15	5.77	5.77
Polar	Corticoids	cortisone	1.88	2.48	1.93	1.85	1.90	2.40	1.96	2.06
		hydrocortisone	1.39	2.20	1.47	1.41	1.42	2.08	1.46	1.63
Total amount of androgens			0.94	0.89	0.58	1.27	0.30	0.87	0.23	0.73
Total amount of progestogens			0.33	0.20	0.22	0.45	0.09	0.41	0.08	0.25
Total amount of estrogens			21.13	31.38	18.37	19.21	18.4	21.7	20.13	21.47
Total amount of corticoids			3.27	4.68	3.4	3.26	3.32	4.48	3.42	3.69
Masculinity index			37.70	25.66	26.48	30.98	23.30	25.75	18.15	26.86

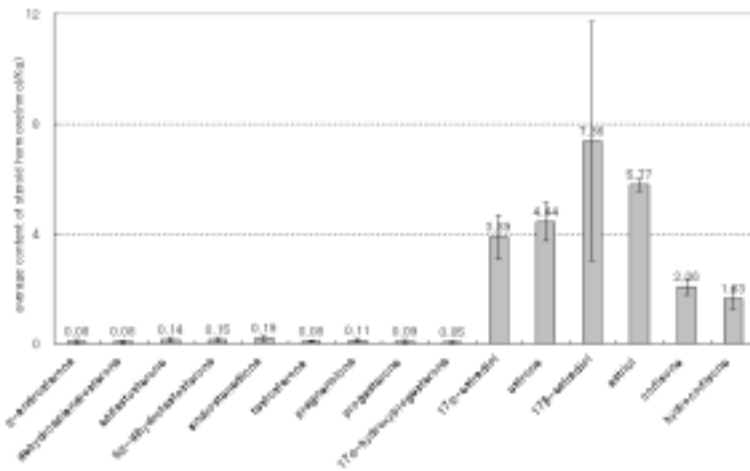


Figure 2-3. Average content of steroid hormones in muscle tissues of cows.

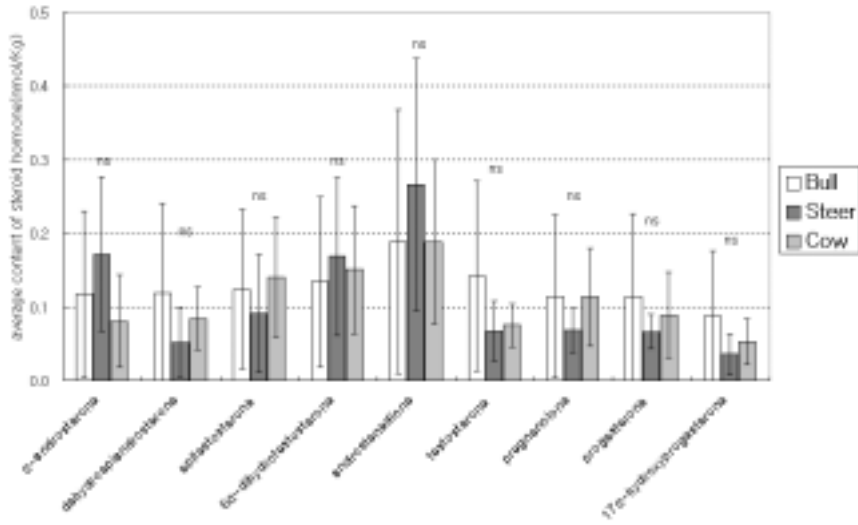


Figure 2-4. Sex-dependency of average content of neutral steroid hormones in muscle tissues. ns, not significant.

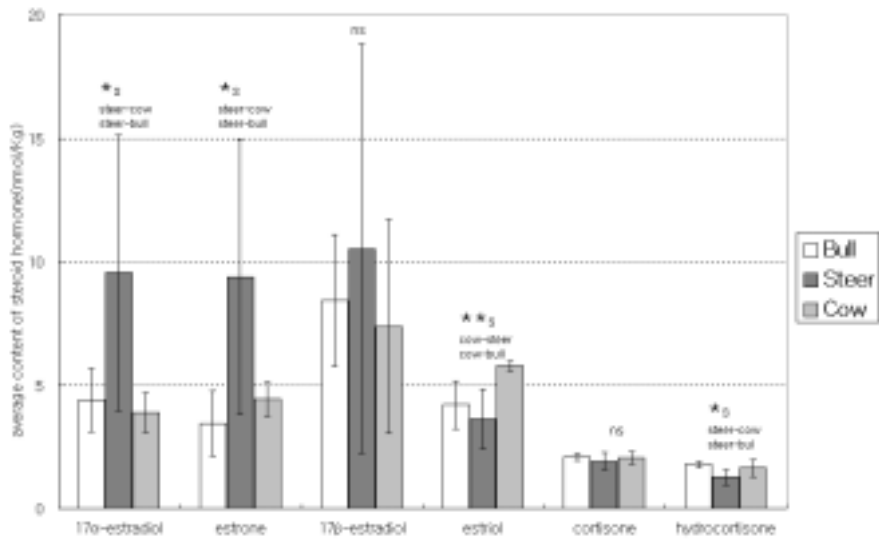


Figure 2-5. Sex-dependent average content of polar & phenolic steroid hormones in muscle tissues. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; S, sex; M, marbling score; ns, not significant.

Table 2-4. Pearson correlation coefficient of ms, ee, wbsf with each steroid hormones in muscle tissues

Group	Class	Name	ms		ee		wbsf	
			coefficient	P value	coefficient	P value	coefficient	P value
neutral	androgens	α -androsterone	-0.019	0.932	0.053	0.810	0.221	0.310
		dehydroepiandrosterone	-0.172	0.432	0.007	0.974	0.178	0.417
		epitestosterone	-0.059	0.788	0.161	0.463	-0.025	0.911
		5α -dihydrotestosterone	-0.108	0.625	0.051	0.817	-0.085	0.699
		androstenedione	-0.076	0.732	-0.074	0.736	-0.053	0.810
	testosterone	-0.157	0.474	-0.040	0.858	0.120	0.587	
	progestogens	pregnenolone	-0.225	0.302	-0.044	0.842	-0.054	0.806
progesterone		-0.235	0.281	-0.112	0.611	0.102	0.644	
17α -hydroxyprogesterone		-0.164	0.455	-0.028	0.901	0.156	0.476	
phenolic	estrogens	17α -estradiol	0.339	0.113	0.268	0.215	-0.306	0.156
		estrone	0.302	0.161	0.246	0.259	-0.285	0.187
		17β -estradiol	0.319	0.138	0.408	0.053	-0.481	0.020
		estriol	-0.195	0.374	-0.186	0.395	0.133	0.545
polar	corticoids	cortisone	0.046	0.833	0.002	0.991	-0.238	0.274
		hydrocortisone	-0.195	0.373	-0.133	0.544	-0.188	0.390

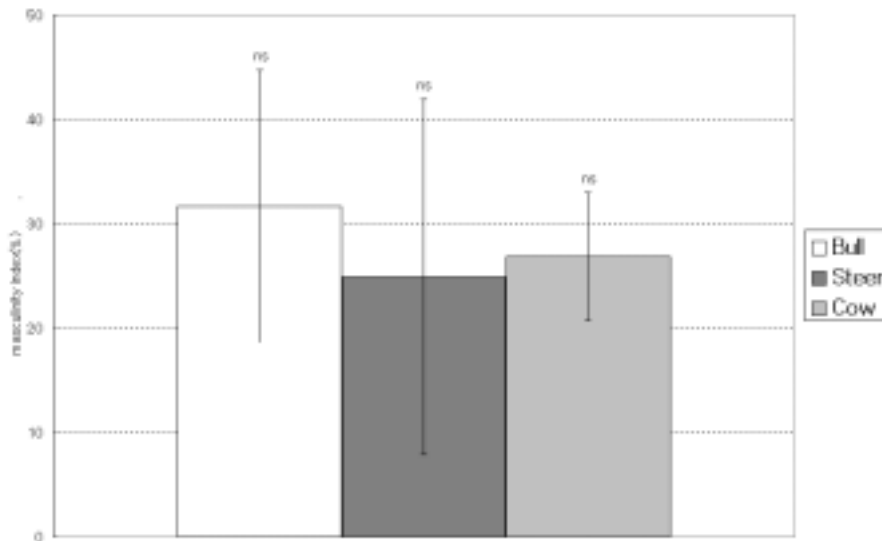


Figure 2-6. Relationship between sex and MI in muscle tissues. ns, not significant.

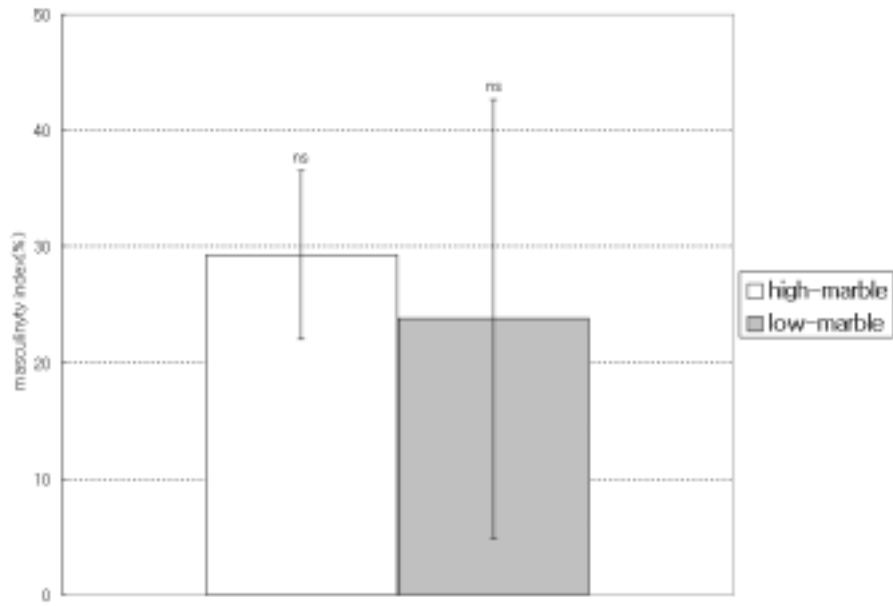


Figure 2-7. Relationship between MS and MI in muscle tissues of steer. ns, not significant.

2) 지방조직에서의 분석결과

Table 2-5. Content of steroid hormones in fat tissues of bulls

		단위 nmol/kg							
Group	Class	name	21009	21011	21012	21013	21014	21015	평균
Neutral	Androgens	α -androsterone	0.04	0.04	0.25	0.12	0.05	0.05	0.09
		dehydroepiandrosterone	0.03	0.04	0.26	0.11	0.04	0.07	0.09
		epitestosterone	0.04	0.04	0.27	0.18	0.04	0.06	0.11
		5α -dihydrotestosterone	0.04	0.04	0.29	0.22	0.04	0.07	0.12
		androstenedione	0.06	0.06	0.33	0.27	0.07	0.09	0.15
		testosterone	0.05	0.03	0.38	0.22	0.06	0.07	0.14
	Progestogens	pregnenolone	0.03	0.03	0.26	0.16	0.03	0.06	0.10
		progesterone	0.03	0.03	0.27	0.16	0.03	0.06	0.10
17α -hydroxyprogesterone		0.04	0.02	0.22	0.09	0.02	0.05	0.07	
Phenolic	Estrogens	17α -estradiol	2.83	3.66	3.88	4.29	6.28	5.02	4.33
		estrone	2.77	2.86	2.88	2.61	4.58	4.33	3.34
		17β -estradiol	7.68	6.26	8.27	6.66	10.40	6.11	7.56
		estriol	3.03	3.55	4.54	4.08	4.97	5.09	4.21
Polar	Corticoids	cortisone	2.43	2.17	2.27	2.00	2.14	2.17	2.20
		hydrocortisone	2.22	1.95	1.91	1.46	1.76	1.75	1.84
Total amount of androgens			0.26	0.25	1.78	1.12	0.30	0.41	0.69
Total amount of progestogens			0.10	0.08	0.75	0.41	0.08	0.17	0.27
Total amount of estrogens			16.31	16.33	19.57	17.64	26.23	20.55	19.44
Total amount of corticoids			4.65	4.12	4.18	3.46	3.90	3.92	4.04
Masculinity index			22.90	17.07	55.16	43.31	24.22	23.30	30.99

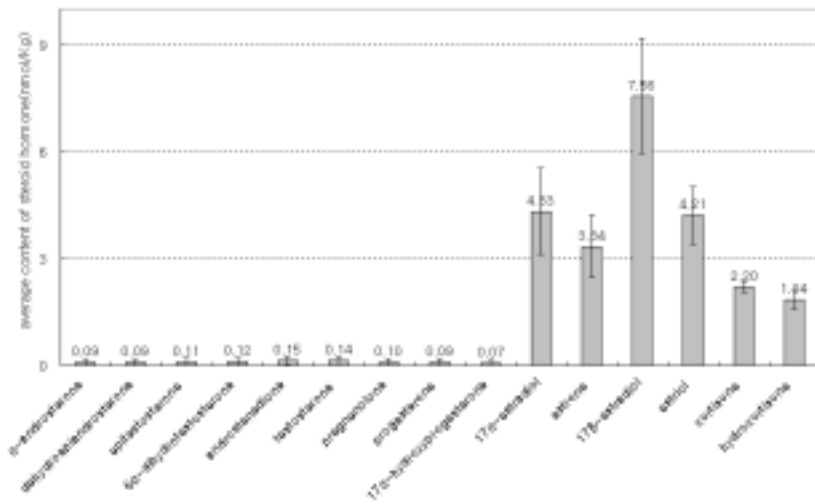


Figure 2-8 Average content of steroid hormones in fat tissues of bulls.

Table 2-6. Content of steroid hormones in fat tissues of steers

단위 nmol/kg													
Group	Class	name	1004	1012	1018	1028	0064	0068	0070	0050	0051	0052	평균
Neutral	Androgens	α -androsterone	0.07	0.11	0.13	0.03	0.20	0.16	0.18	0.40	0.29	0.05	0.16
		dehydroepiandrosterone	0.06	0.12	0.12	0.04	0.02	0.02	0.02	0.14	0.03	0.07	0.06
		epitestosterone	0.05	0.15	0.17	0.04	0.04	0.02	0.04	0.17	0.06	0.09	0.08
		5 α -dihydrotestosterone	0.07	0.18	0.20	0.04	0.28	0.17	0.20	0.28	0.31	0.31	0.21
		androstenedione	0.13	0.23	0.23	0.06	0.41	0.38	0.33	0.16	0.35	0.11	0.24
		testosterone	0.12	0.17	0.19	0.05	0.06	0.04	0.05	0.09	0.06	0.09	0.09
	Progestogens	pregnenolone	0.06	0.13	0.16	0.03	0.05	0.07	0.07	0.29	0.11	0.13	0.11
		progesterone	0.06	0.13	0.16	0.03	0.06	0.07	0.07	0.21	0.09	0.14	0.10
		17 α -hydroxyprogesterone	0.05	0.08	0.10	0.02	0.02	0.02	0.02	0.08	0.02	0.04	0.05
Phenolic	Estrogens	17 α -estradiol	4.58	3.69	4.05	4.21	7.34	7.33	19.34	6.68	19.40	16.26	9.29
		estrone	2.96	3.91	4.25	3.23	10.09	8.51	14.98	17.10	13.26	11.11	8.94
		17 β -estradiol	5.71	4.68	4.88	5.19	6.83	17.67	21.12	9.44	22.14	17.88	11.55
		estriol	5.21	5.87	5.99	5.03	1.53	1.41	3.71	4.84	3.29	3.03	3.99
Polar	Corticoids	cortisone	2.01	1.82	1.91	1.91	1.69	1.67	1.94	2.07	1.82	1.70	1.85
		hydrocortisone	1.43	1.28	1.40	1.27	1.13	1.05	1.51	1.70	1.28	1.31	1.34
Total amount of Androgens			0.50	0.96	1.04	0.26	1.01	0.79	0.82	1.24	1.10	0.72	0.84
Total amount of progestogens			0.17	0.34	0.42	0.08	0.13	0.16	0.16	0.58	0.22	0.31	0.26
Total amount of Estrogens			18.46	18.15	19.17	17.66	25.79	34.92	59.15	38.06	58.09	48.28	33.77
Total amount of Corticoids			3.44	3.10	3.31	3.18	2.82	2.72	3.45	3.77	3.10	3.01	3.19
Masculinity index			32.59	37.23	38.17	19.97	17.26	10.62	13.88	19.06	15.65	19.84	22.43

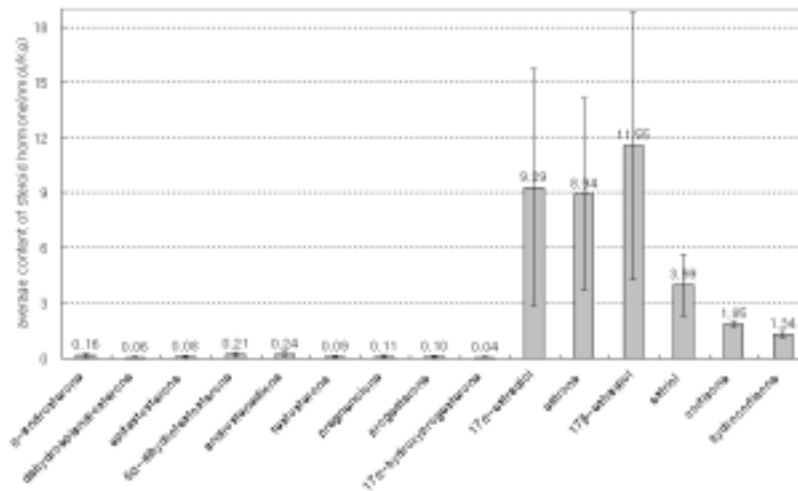


Figure 2-9 Average content of steroid hormones in fat tissues of steers

Table 2-7. Content of steroid hormones in fat tissues of cows.

		단위 nmol/kg								
Group	Class	개체 번호	2007	2013	3001	3019	3023	3025	3030	평균
Neutral	Androgens	♂-androsterone	0.04	0.03	0.09	0.05	0.11	0.03	0.04	0.05
		dehydroepiandrosterone	0.03	0.21	0.09	0.05	0.05	0.25	0.04	0.10
		epitestosterone	0.04	0.15	0.13	0.05	0.05	0.12	0.04	0.08
		5♂-dihydrotestosterone	0.04	0.12	0.17	0.06	0.09	0.21	0.04	0.11
		androstenedione	0.07	0.21	0.18	0.09	0.07	0.25	0.06	0.13
		testosterone	0.04	0.05	0.10	0.05	0.07	0.09	0.05	0.07
	Progestogens	pregnenolone	0.03	0.09	0.10	0.05	0.05	0.09	0.03	0.07
		progesterone	0.03	0.02	0.12	0.04	0.06	0.02	0.03	0.05
17♂-hydroxyprogesterone		0.02	0.01	0.07	0.03	0.05	0.02	0.02	0.03	
Phenolic	Estrogens	17♂-estradiol	5.47	3.56	4.71	4.17	4.30	4.25	4.25	4.39
		estrone	4.83	3.62	4.58	3.84	5.37	4.77	4.18	4.46
		17♂-estradiol	7.35	3.65	7.50	4.57	3.81	21.57	5.13	7.65
		estriol	5.58	4.98	5.74	5.98	4.71	2.41	6.02	5.06
Polar	Corticoids	cortisone	1.96	2.60	1.94	1.85	2.10	1.96	1.78	2.03
		hydrocortisone	1.49	2.54	1.43	1.38	1.56	1.48	1.27	1.59
Total amount of Androgens			0.26	0.77	0.76	0.35	0.44	0.95	0.27	0.54
Total amount of progestogens			0.08	0.12	0.29	0.12	0.16	0.13	0.08	0.14
Total amount of Estrogens			23.23	15.81	22.53	18.56	18.19	33.00	19.58	21.56
Total amount of Corticoids			3.45	5.14	3.37	3.23	3.66	3.44	3.05	3.62
Masculinity index			19.89	24.62	28.96	20.26	22.98	27.29	22.39	23.77

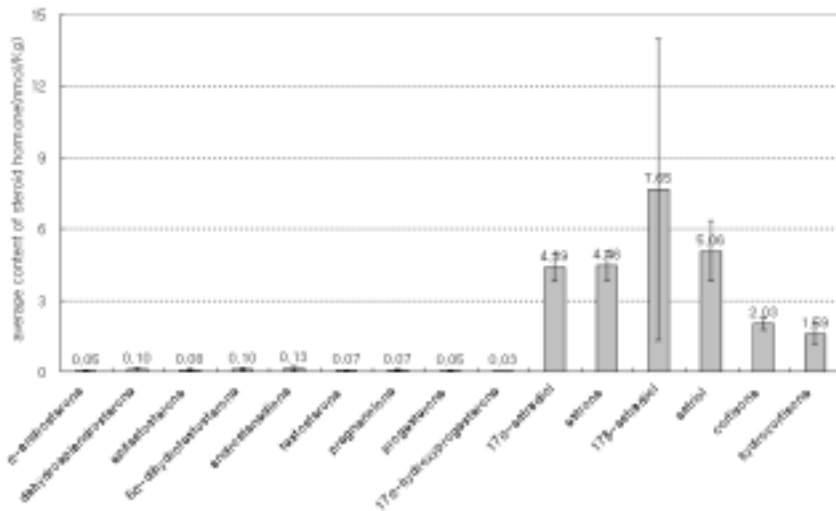


Figure 2-10. Average content of steroid hormones in fat tissues of cows.

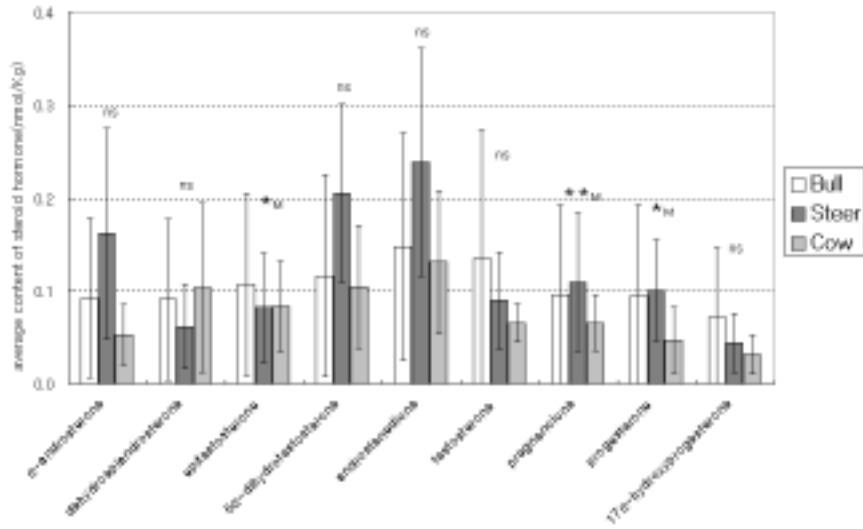


Fig. 2-11. Sex-dependency of average content of neutral steroid hormones in fat tissues. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; S, sex; M, marbling score; ns, not significant.

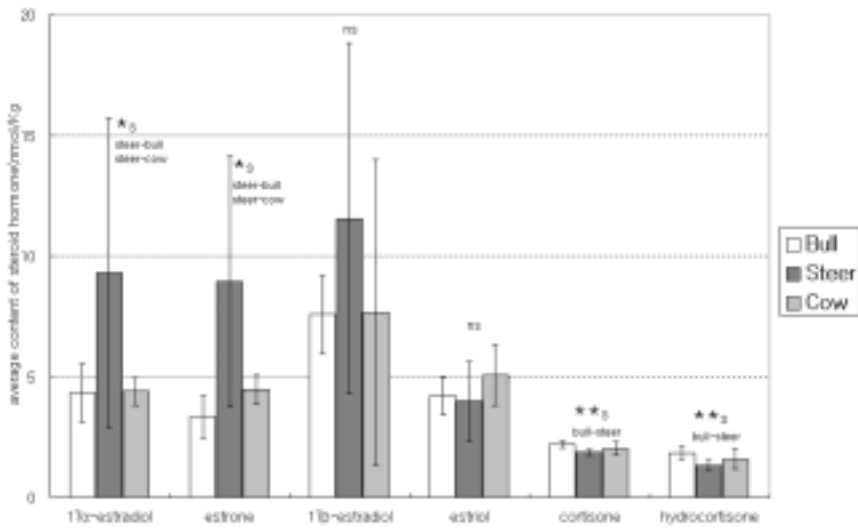


Figure 2-12. Sex-dependency of average content of polar & phenolic steroid hormones in fat tissues. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; S, sex; M, marbling score; ns, not significant.

Table 2-8. Pearson correlation coefficient of ms, ee, wbsf with each steroid hormones in fat tissue.

Group	Class	Name	ms		ee		wbsf	
			coefficient	P value	coefficient	P value	coefficient	P value
neutral	androgens	α -androsterone	0.402	0.057	0.361	0.091	-0.271	0.210
		dehydroepiandrosterone	0.148	0.500	0.288	0.183	-0.336	0.117
		epitestosterone	0.306	0.155	0.311	0.149	-0.347	0.105
		5α -dihydrotestosterone	0.371	0.081	0.263	0.225	-0.431	0.040
		androstenedione	0.078	0.723	0.057	0.797	-0.316	0.142
		testosterone	-0.013	0.953	-0.060	0.787	-0.088	0.691
	progestogens	pregnenolone	0.488	0.018	0.459	0.028	-0.382	0.072
		progesterone	0.393	0.064	0.265	0.222	-0.265	0.221
		17α -hydroxyprogesterone	0.108	0.625	0.058	0.793	-0.074	0.738
phenolic	estrogens	17α -estradiol	0.091	0.680	-0.025	0.911	-0.262	0.228
		estrone	0.444	0.034	0.391	0.065	-0.302	0.161
		17β -estradiol	-0.070	0.752	-0.056	0.799	-0.328	0.127
		estriol	0.139	0.526	0.110	0.619	0.142	0.519
polar	corticoids	cortisone	-0.009	0.967	0.147	0.504	-0.144	0.513
		hydrocortisone	0.034	0.877	0.213	0.329	-0.167	0.446

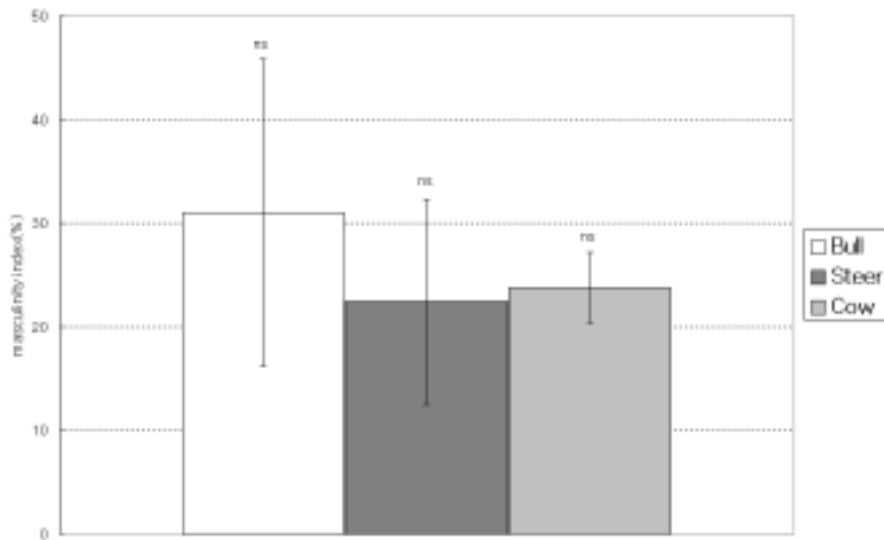


Figure 2-13. Relationship between sex and MI in fat tissues. ns, not significant.

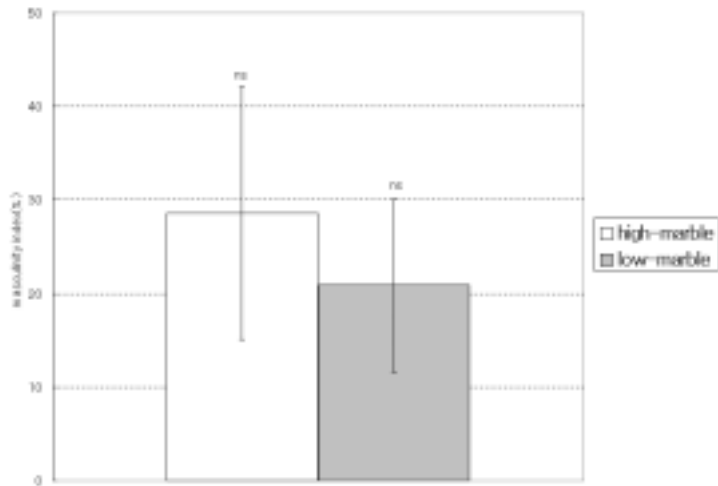


Figure 2-14. Relationship between MS and MI in fat tissues. ns, not significant.

3) 성별에 따른 조직전체의 steroid 함량 비교분석

Table 2-9 Sex-dependency of average content of steroid hormones

단위: nmol/Kg

Group	Class	sex steroid	Bull		Cow		Steer	
			평균값	표준편차	평균값	표준편차	평균값	표준편차
Neutral	Androgens	17 α -androsterone	0.11	0.08	0.07	0.05	0.17	0.11
		dehydroepiandrosterone	0.11	0.10	0.09	0.07	0.06	0.05
		epitesterone	0.12	0.10	0.11	0.07	0.09	0.07
		5 α -dihydrotestosterone	0.13	0.11	0.13	0.08	0.19	0.10
		androstenedione	0.17	0.15	0.16	0.10	0.25	0.15
		testosterone	0.14	0.13	0.07	0.03	0.08	0.05
	Progestogens	pregnenolone	0.11	0.10	0.09	0.06	0.09	0.06
		progesterone	0.10	0.10	0.07	0.05	0.08	0.05
		17 α -hydroxyprogesterone	0.08	0.08	0.04	0.03	0.04	0.03
Phenolic	Estrogens	17 β -estradiol	4.36	1.19	4.14	0.73	9.42	5.87
		estrone	3.39	1.07	4.49	0.64	9.15	5.25
		17 β -estradiol	8.00	2.15	7.51	5.22	11.04	7.61
		estriol	4.20	0.85	5.42	0.95	3.81	1.43
Polar	Corticoids	cortisone	2.14	0.15	2.04	0.26	1.88	0.26
		hydrocortisone	1.81	0.20	1.61	0.38	1.31	0.25
masculinity index			31.33	13.33	24.55	3.56	0.06	0.05

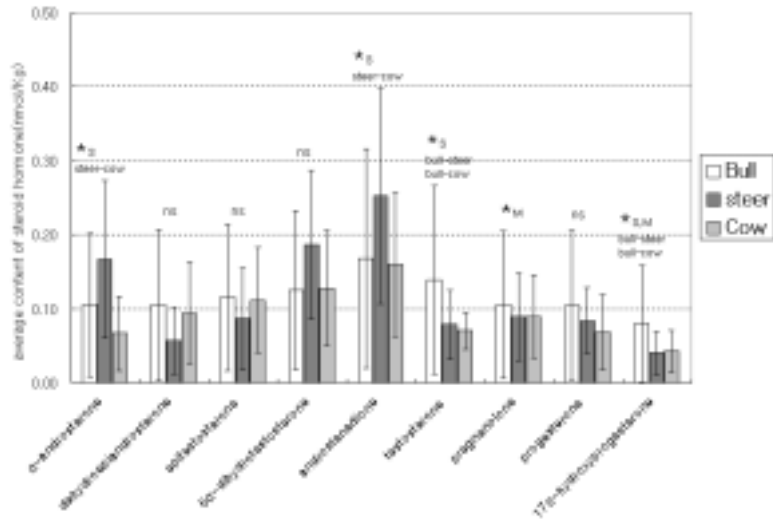


Figure 2-15. Sex-dependency of average content of neutral steroid hormones. *, P<0.05.; **, P<0.01; S, sex; M, marbling score; ns, not significant.

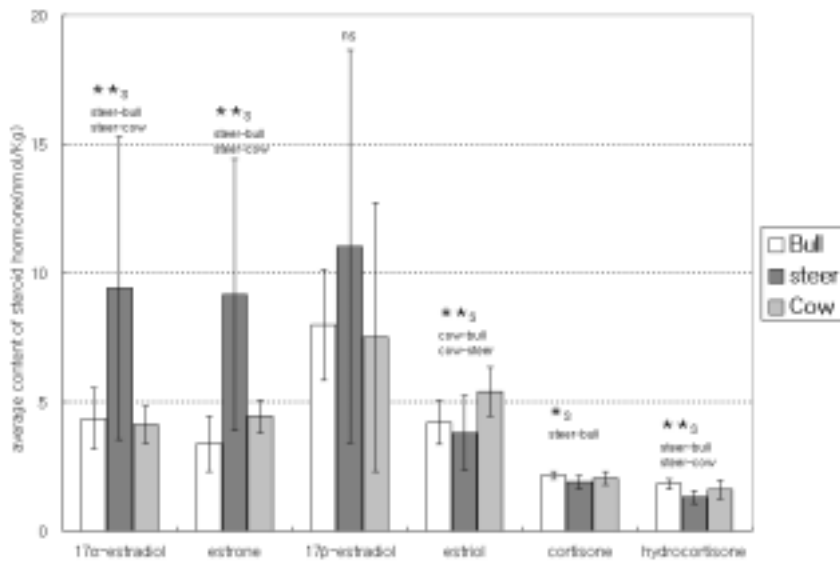


Figure 2-16. Sex-dependency of average content of polar & phenolic steroid hormones. *, P<0.05.; **, P<0.01; S, sex; M, marbling score; ns, not significant.

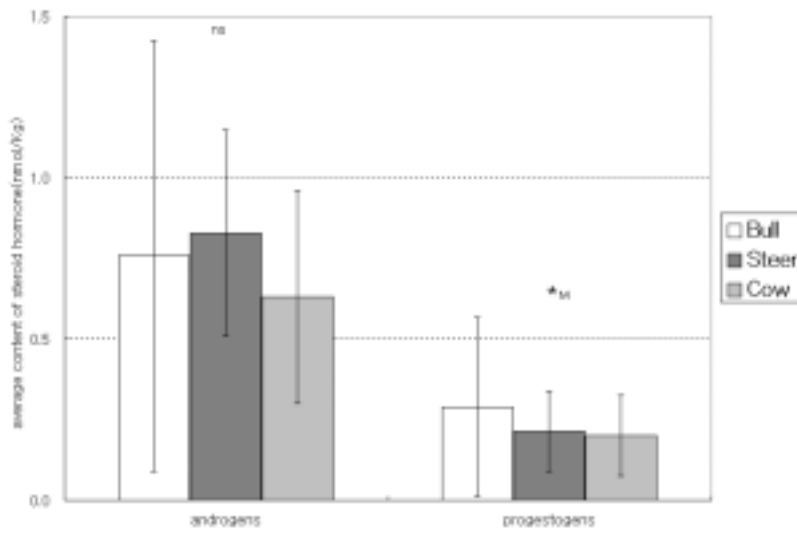


Figure 2-17. Sex-dependency of average content of androgens and progestogens. *, $P < 0.05$; M, marbling score; ns, not significant.

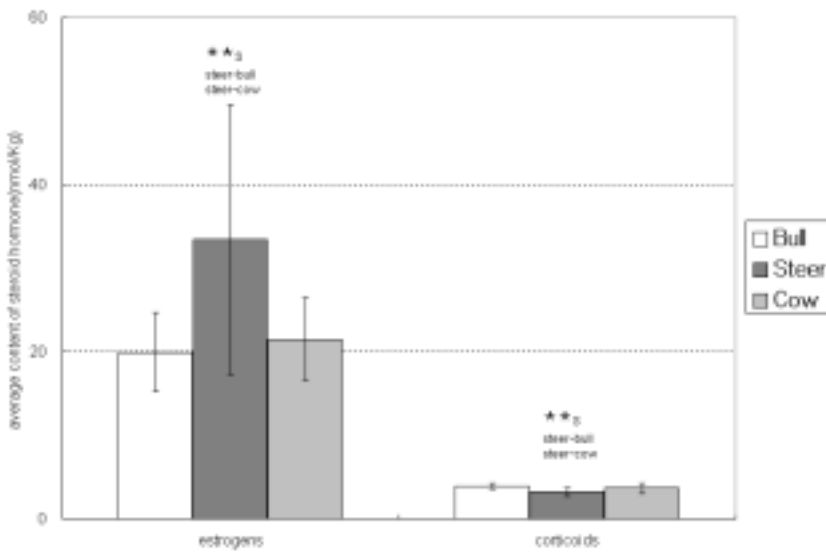


Figure 2-18. Sex-dependency of average content of estrogens and corticoids. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; S, sex; M, marbling score; ns, not significant.

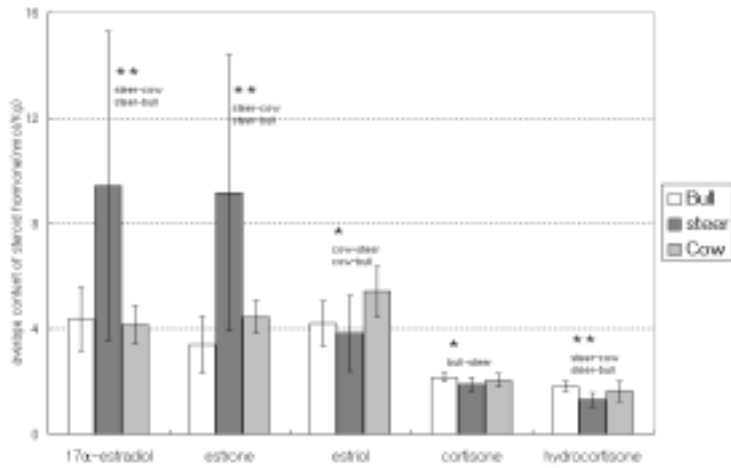


Figure 2-19. Average content of polar & phenolic steroid hormones statistically correlated with sex. ($P > F = 0.0003$ 17- α -estradiol), 0.0002(estrone), 0.0002(estriol), <0.0001 hydrocortisone). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; S, sex; M, marbling score; ns, not significant.

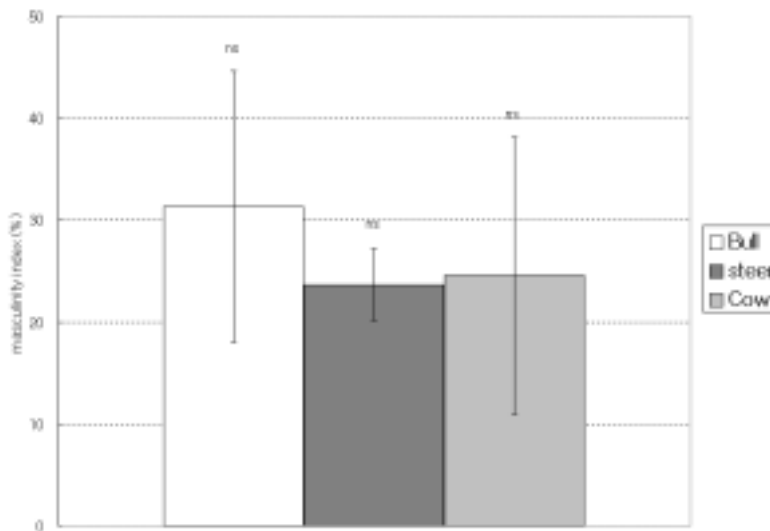


Figure 2-20. Relationship between sex and average of MIs. ns, not significant.

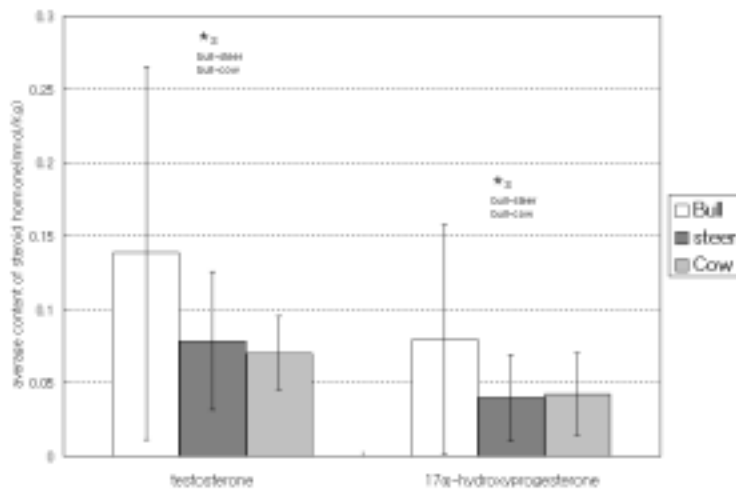


Figure 2-21. Average content of neutral steroid hormones statistically correlated with sex. ($P > F = 0.02$ (androsterone), 0.0169 (17- α -hydroxyprogesterone)). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; S, sex; M, marbling score; ns, not significant.

4) 거세우의 경우 근내지방도에 따른 그룹별의 steroid hormone 비교 분석

Table 2-10 MS and average content of steroid hormones of steer

단위 : nmol/kg

Group	Class	Sex		high marble($ms \geq 5$)		low marble($ms < 5$)	
		Steroid	MS Group	평균	표준편차	평균	표준편차
Neutral	Androgens	α -androsterone		0.16	0.15	0.16	0.10
		dehydroepiandrosterone		0.11	0.04	0.04	0.04
		epitestosterone		0.14	0.05	0.07	0.07
		5 α -dihydrotestosterone		0.17	0.09	0.19	0.11
		androstenedione		0.16	0.05	0.28	0.15
		testosterone		0.12	0.05	0.07	0.04
	Progestogens	pregnenolone		0.16	0.10	0.07	0.03
		progesterone		0.14	0.07	0.07	0.03
		17 α -hydroxyprogesterone		0.08	0.03	0.03	0.02
Phenolic	Estrogens	17 α -estradiol		7.85	5.70	9.81	6.02
		estrone		9.58	6.43	9.05	5.16
		17 β -estradiol		10.77	8.73	11.10	7.62
		estriol		4.85	1.34	3.56	1.37
Polar	Corticoids	cortisone		1.93	0.11	1.87	0.29
		hydrocortisone		1.45	0.19	1.27	0.26
masculinity index				28.95	8.87	22.33	14.47

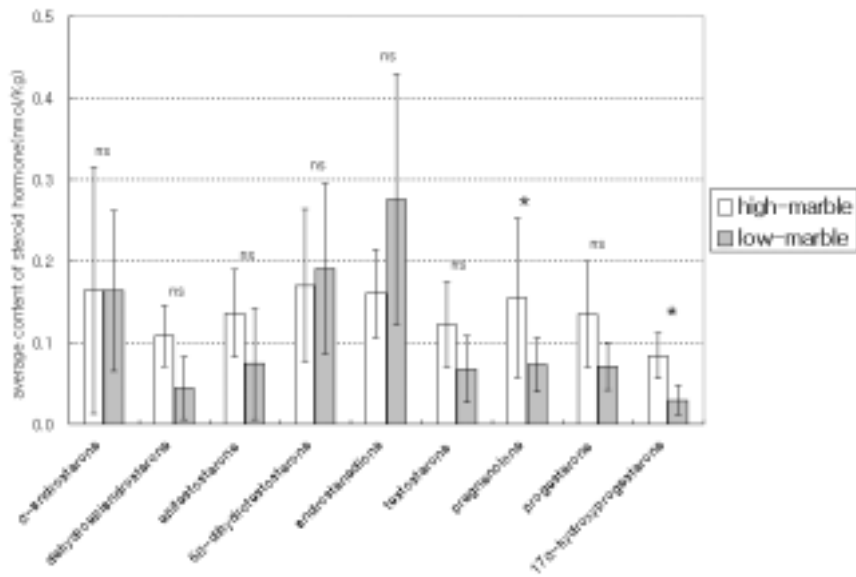


Figure 2-22. MS and average content of neutral steroid hormones of steers. *, $P < 0.05$; ns, not significant.

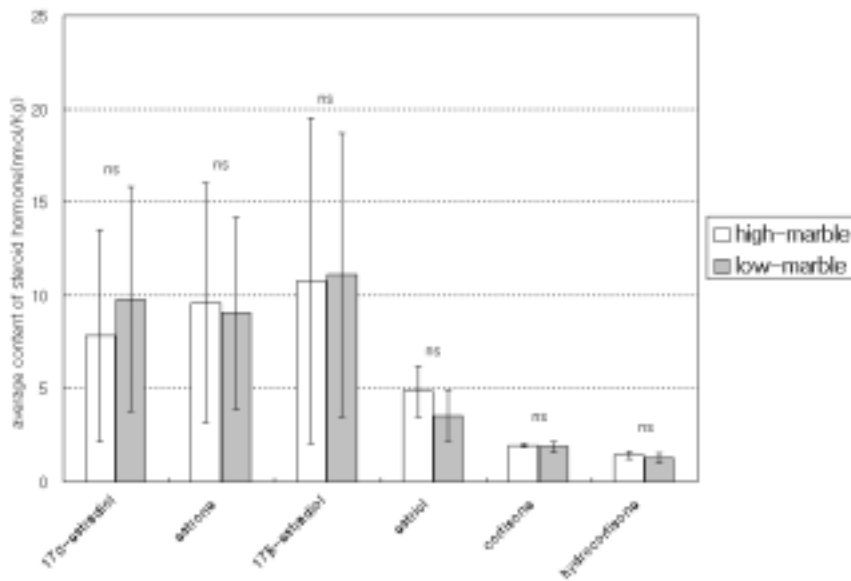


Figure 2-23. MS and average content of polar & phenolic steroid hormones of steers. ns, not significant.

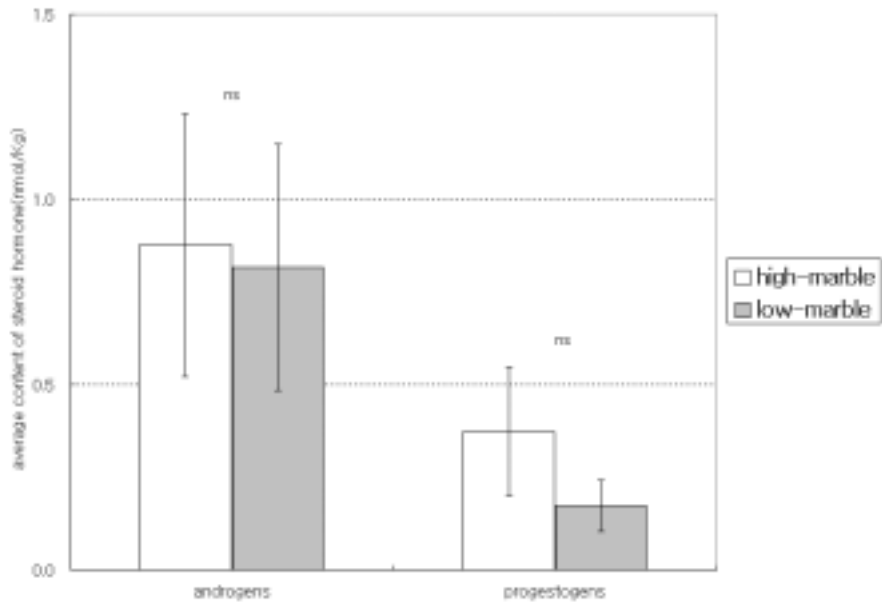


Figure 2-24. MS and average content of androgens and progestogens of steers. ns, not significant.

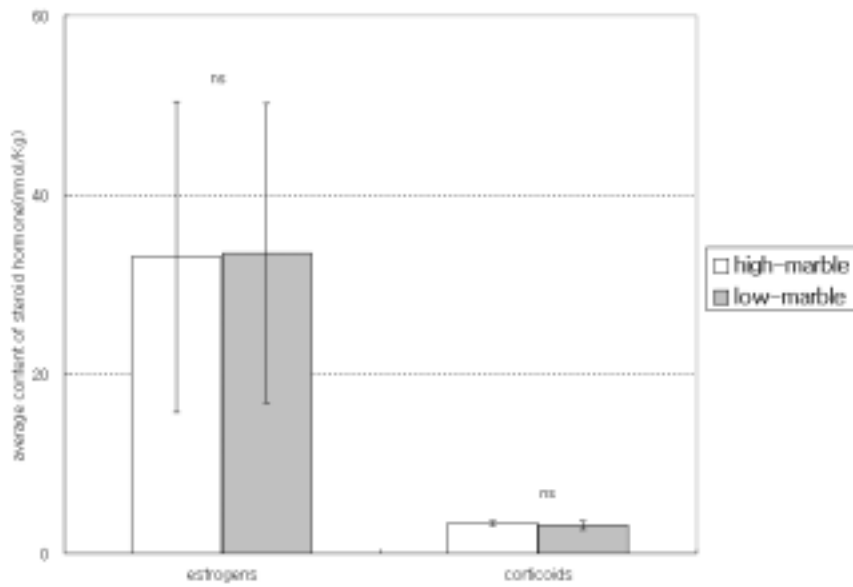


Figure 2-25. MS and average content of estrogens and corticoids of steers. ns, not significant.

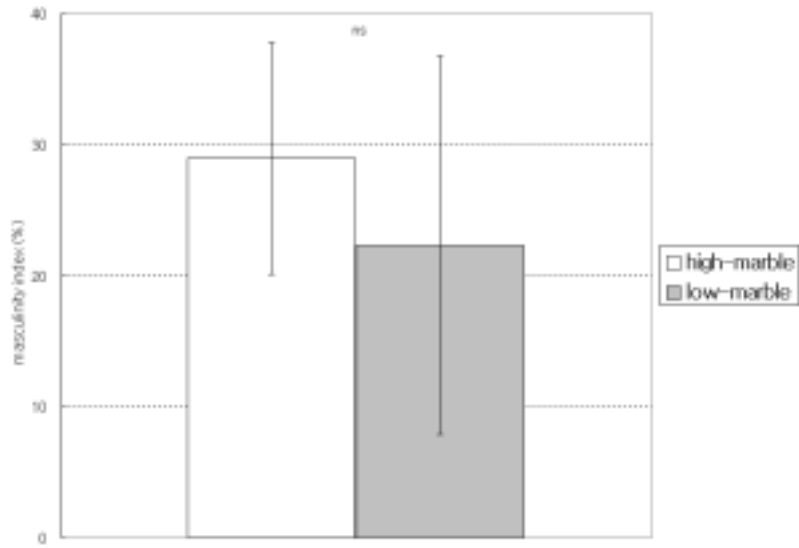


Figure 2-26. Inverse co-relation of MS and average of MIs in steer. ns, not significant.

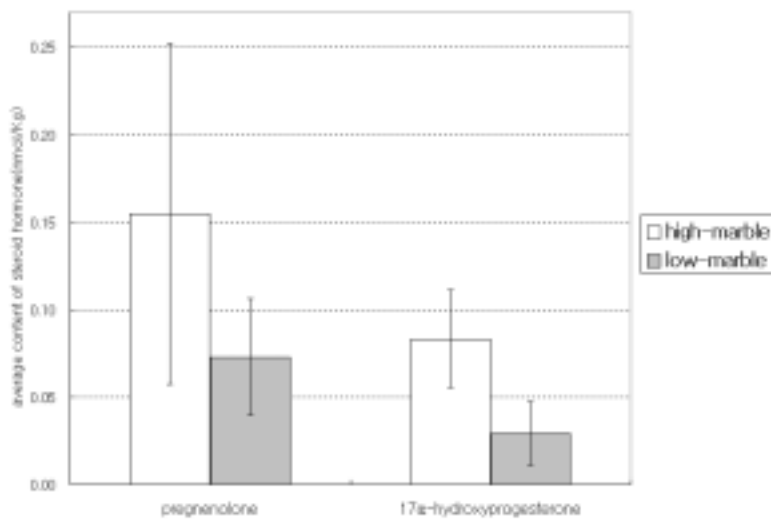


Figure 2-27. Average content of progesterones statistically correlated with MS. ((Pr>F)=0.038(pregnenolone), 0.037(17- α -hydroxyprogesterone)).

나. Aromatase 활성 분석결과

Testosterone을 estradiol로 전변시키는데 작용하는 효소인 aromatase 활성은 지방조직에서는(Fig. 2-30; 표 2-14, 표 2-15, 표 2-16) 거세우가 비거세우나 암소에 비하여 유의적으로 높았으나, 근육조직에서는(Fig. 2-28; 표 2-11, 표 2-12, 표 2-13) 성간에 비슷한 수준을 보였다. 거세우는 근육조직이나 지방조직에서 aromatase의 활성이 높을 수록 MI는 감소하는 경향을 보였으나, 비거세우와 암소는 상관관계를 찾기가 어려웠다 (Fig. 2-29, Fig. 2-31). 거세우의 경우 근육조직이나 지방조직에서 육질의 등급은 aromatase의 활성이 낮을수록, MI가 높을수록 증가하였다. 이러한 경향은 근육조직에서 더욱 뚜렷하였다 (Fig. 2-32, Fig. 2-33).

1) 근육 조직 aromatase 활성

Table 2-11. Aromatase activity in muscle tissues of bulls.

ID No	% conversion in 5h	conversion in 5h (pmol/mg)	conversion in h (pmol/mg/h)
21009	6.00	7.20	1.44
21011	6.46	7.75	1.55
21012	7.26	8.71	1.74
21013	3.44	4.13	0.83
21014	2.42	2.90	0.58
		average	1.23

Table 2-12. Aromatase activity in muscle tissues of steers.

ID No	% conversion in 5h	conversion in 5h (pmol/mg)	conversion in h (pmol/mg/h)
0050	4.55	5.46	1.09
0051	4.17	5.01	1.00
0052	3.77	4.52	0.90
0064	6.21	7.46	1.49
0068	7.89	9.46	1.89
0070	5.18	6.22	1.24
1004	4.80	5.76	1.15
1012	5.96	7.16	1.43
1018	4.81	5.77	1.15
1028	4.98	5.97	1.19
		average	1.25

Table 2-13. Aromatase activity in muscle tissues of cows.

ID No	% conversion in 5h	conversion in 5h (pmol/mg)	conversion in h (pmol/mg/h)
2007	2.99	3.58	0.72
2013	3.53	4.23	0.85
3001	3.52	4.22	0.84
3019	7.91	9.49	1.90
3023	4.19	5.03	1.01
3025	4.12	4.95	0.99
		average	1.05

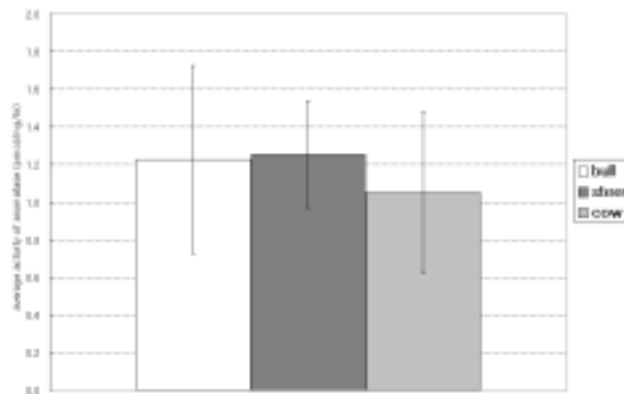


Figure 2-28. Sex-dependency of average aromatase activity in muscle

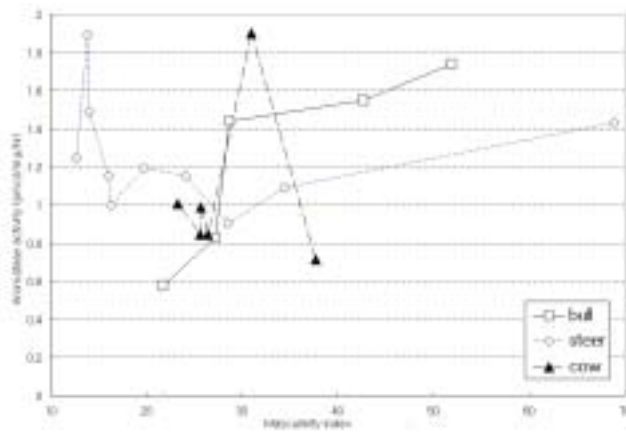


Figure 2-29. Sex-dependency of MI and aromatase activity in muscle tissues

2) 지방조직 aromatase 활성

Table 2-14. Aromatase activity in fat tissues of bulls

	% conversion in 5h	conversion in 5h (pmol/mg)	conversion in h (pmol/mg/h)
21009	2.72	3.27	0.65
21011	3.56	4.27	0.85
21012	3.56	4.28	0.86
21013	2.45	2.93	0.59
21014	2.88	3.46	0.69
		average	0.73

Table 2-15. Aromatase activity in fat tissues of steers

	% conversion in 5h	conversion in 5h (pmol/mg)	conversion in h (pmol/mg/h)
0050	4.10	4.92	0.98
0051	5.06	6.08	1.22
0052	3.80	4.56	0.91
0064	3.74	4.49	0.90
0068	10.46	12.55	2.51
0070	5.90	7.08	1.42
1004	4.15	4.98	1.00
1012	5.04	6.05	1.21
1018	4.16	5.00	1.00
1028	6.52	7.83	1.57
		average	1.27

Table 2-16. Aromatase activity in fat tissues of cows

cow	% conversion in 5h	conversion in 5h (pmol/mg)	conversion in h (pmol/mg/h)
2007	2.87	3.45	0.69
2013	3.91	4.69	0.94
3001	2.79	3.35	0.67
3019	2.43	2.91	0.58
3023	3.56	4.27	0.85
3025	2.35	2.82	0.56
		average	0.71

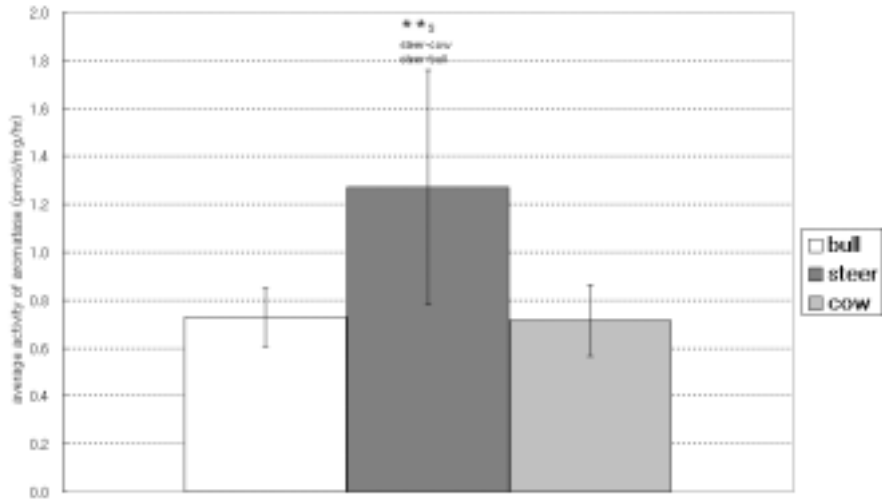


Figure 2-30. Sex-dependency of average aromatase activity in fat tissues. **, $P < 0.01$; s, sex.

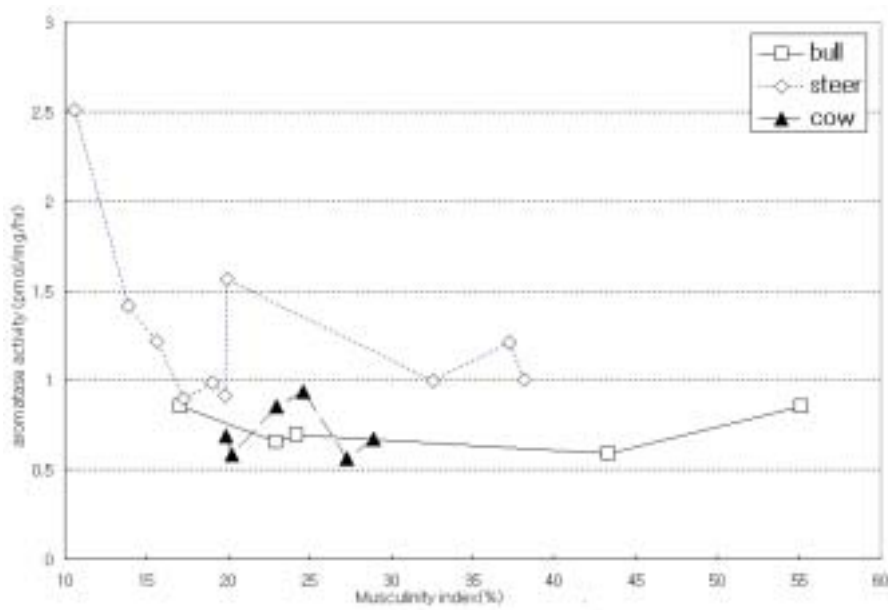


Figure 2-31. Sex-dependency of MI and average aromatase activity in fat tissues.

다. 거세우에서 육질등급과 masculinity index 및 aromatase 활성의 상호관계

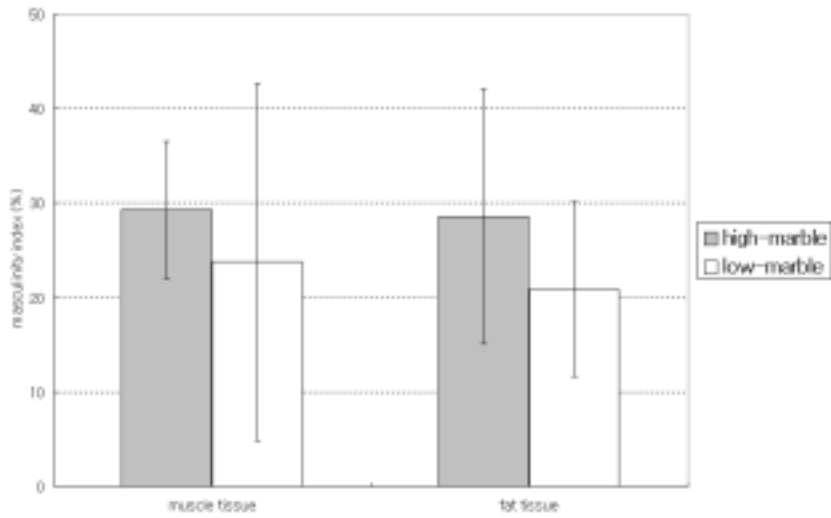


Fig. 2-32. Masculinity index and marbling score in muscle and fat tissues of steers.

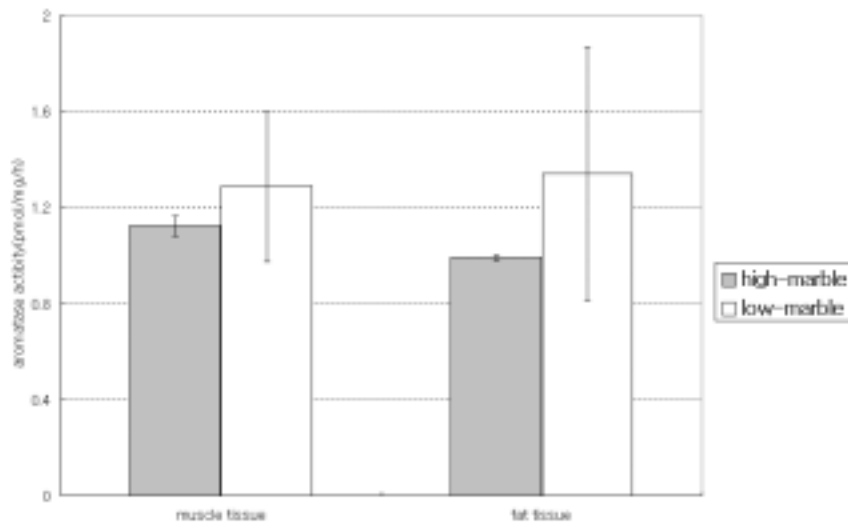


Fig. 2-33. Aromatase activity and marbling score in muscle and fat tissues of steers.

제 3 절 한우 유전자 정보를 이용한 선발체계 구축에 관한 연구

1. 서설

최근 급속도로 연구개발이 가속화되고 있는 분자생물학적 접근 방법의 발전에 힘입어 한우 산업의 발전을 위한 개량 분야에 있어서도 다가적인 시도가 이루어지고 있다. 근본적인 육종 전략이 되는 종축의 선발과 교배계획의 수립에 있어서 유전자 지문의 정보를 활용하기도 하고 차츰 국내 한우 번식 농가의 개량에 대한 육구 종축의 요구가 높아지고 있다. 본 연구는 유전자 지문의 정보 활용을 극대화하기 위하여 성별로 조직내 성호르몬 수준의 차이와 이에 따른 성호르몬 합성을 위한 효소 활성 정도를 발현되는 유전자의 양으로 규명한 후 이들 정보를 활용하여 한우 유전 능력 평가의 정확도를 향상시키고 한우의 선발 정확도를 높이고자 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 공시축

- 김정대상우 : 연구소 자체축(남원, 대관령) 및 한우 육종농가 보유축
- 교배종모우 : 농가의 육종목표에 의거 중우모 정액선정
- 사양방법 : 농가 관행에 따름.
- 조사내용 : 체중, 체위, 도체성적, 변동사항(이동, 출하, 판매, 폐사 등)
 - 발육성적 : 생시, 이유시, 12개월령, 출하체중
 - 도체특성: 근내지방도, 배장근단면적, 등지방두께, 도체중, 도체율, 연도, 정육율

나. 자료분석 : 국가 단위 한우 유전능력 평가 모형을 적용(1년차) 분석

- 1) 분석내용 : 농장별 기초능력, 유전능력(육종가 등)
- 2) 분석방법 : SAS 패키지(일반능력 및 분산분석), 유전능력(MTDFREML, TKBLUP in Animal Breeder's Tool Kit)
- 3) 분석모델 : 개체모형(animal model) BLUP
 - 생시체중, 이유시 체중

$$y = X\beta + Z_1a + Z_2m + e$$

- 12개월령 체중

$$y = X\beta + Za + e$$

- 출하체중 및 도체성적

$$y = X\beta + Za + e$$

여기에서,

y : 관측치

β : 고정효과(출생농장-년도-계절, 성)

a : 상가적 유전효과

m : 모체 효과

e : 환경 잔차 효과

X, Z_1, Z_2 : 관측치와 관련한 고정 및 임의효과에 대한 계획행렬

3. 결과 및 고찰

가. 공시축 선정 및 일반능력

1) 농가 자료의 수집 : 남원지소 및 대관령지소

- 암소와 거세수소(남원지소) 및 비거세 수소(대관령지소)
- 초음파를 이용한 등심의 특성 조사

2) 공시축 선정 및 시료채취 : '02. 12. 5. ~ '03. 7. 29. (총 8회) (표 3-1)

- 총 67두를 공시 초음파 측정 결과에 의한 시료채취 대상축 도축: 36두
- 시료채취는 농협 축산물공판장 서울지소에서 실시
- 온도체 시료(도축당일)와 냉도체 시료(도축 익일)를 채취 : 온도체는 성호 르몬 분석용, 냉도체는 연도 등 육질 분석용(축산기술연구소 축산물이용과 협조)으로 각기 사용

Table 3-1. Number of Hanwoo cattle slaughter and rib eye sampled for analyses by sexes and by date slaughtered

Date Slaughtered	No. Heads Slaughtered(No. Sampled)			Total
	Cow	Steer	Bull	
'02.12.05.		8 (3)		8 (3)
'02.12.23.	10 (4)			10 (4)
'02.12.26.	5 (2)	5 (3)		10 (5)
'03.04.21			3 (3)	3 (3)
'03.05.06,08.	8 (7)	12 (4)		20 (11)
'03.05.12.			4 (3)	4 (3)
'03.06.03.	8 (3)			8 (3)
'03.07.28.			4 (4)	4 (4)
Total	31 (16)	25 (10)	11 (10)	67 (36)

3) 도축시 연령과 도체중 (표 3-2)

- 한우 암소의 도축시 연령은 876~4190일로 노령의 암소를 이용하였고, 거세 수소와 비거세 수소는 해당 농장의 비육일정에 따라 도축한 결과 약 24개월령에서 도축하였다.
- 도체중은 비거세 수소, 거세 수소, 암소의 순으로 컸으며, 시료를 채취한 공시축들의 도체중에 있어서의 표준편차(SD)는 암소, 비거세 수소, 거세 수소의 순으로 거세수소의 편차가 가장 작았다.
- 암소에 있어서는 노령으로 인하여 등외판정을 받은 개체들이 많아서 근내지방도보다는 성숙도와 지방색에 의한 불량판정이 많았다.
- 비거세 및 거세 수소의 경우에는 도축시의 연령이 24개월을 기준으로 한 결과, 1등급의 비율이 낮고, 2~3등급의 비율이 높았다.

Table 3-2. Ages at slaughter and carcass weights of Hanwoo cattle on test (only sampled in parentheses)

Sex	Quality Grade	No.Heads	Age at Slaughter (days)			Carcass Weight (kg)	
			Ave	Max	Min	Ave	SD
Cow	3	16(8)	2866(2988)	3998(3779)	876(894)	260.7(268.5)	56.5(66.9)
	4	15(8)	3620(3601)	4190(3964)	3052(3288)	239.3(245.4)	51.0(63.3)
Bull	1	1(0)	708	708	708	406	-
	2	6(5)	747(742.2)	770(765)	722(722)	439.0(441.2)	39.2(43.4)
	3	17(5)	737(742.8)	775(775)	709(720)	408.6(414.2)	30.7(25.8)
Steer	1+	5(1)	828(843)	851	789	366.4(341)	57.3
	1	5(2)	815(823)	840(840)	787(805)	312.4(351)	41.2(8.5)
	2	15(7)	803(798)	843(843)	749(749)	307.9(313.3)	30.0(27.5)

4) 성별 육질등급별 도체특성 (표 3-3)

- 성별로 볼 때 육질 2~3등급의 비율이 높았으므로 모든 성별에서 근내지방도의 평균이 낮게 나타났다.
- 암소와 비거세 수소에 있어서 등지방 두께에 대한 표준편차가 거세 수소에 비해 상당히 크게 나타났으며 이는 비육방법 및 기간에 따른 차이가 반영된 결과로 짐작할 수 있다.
- 등심단면적에 있어서는 등지방두께에 비해 적은 표준편차를 볼 수 있었으나 암소의 변이가 거세 수소에 비해서 크게 나타났다.

Table 3-3. Carcass characteristics of Hanwoo cattle of only sampled for analyses

Sex	Quality Grade	Marbling Score (1-7)		Back Fat Thickness (mm)		Rib Eye Area (cm ²)	
		Ave	SD	Ave	SD	Ave	SD
Cow	3	1.8	1.2	10.3	5.5	70.5	12.9
	4	1.8	1.5	18.0	15.7	66.3	6.7
Bull	2	2.8	1.1	8.0	3.3	94.2	14.3
	3	1.8	1.1	6.6	4.1	86.8	8.3
Steer	1+	7.0	-	7.0	-	79.0	-
	1	4.5	0.7	9.0	1.4	78.5	7.8
	2	2.6	0.5	8.3	2.1	73.4	5.7

5) 한우 등심의 물리 화학적 특성 (표 3-4)

- Warner-Bratzler shear force로 본 등심육의 연도는 암소육이 수소(거세 또는 비거세)육에 비해 질기게 나타났으며 이는 암소육의 연령에 따른 영향으로 추정해 볼 수 있다.
- 그러나 연도는 각 성별로 볼 때, 육질등급이 올라갈수록 연해지는 것을 볼 수 있었다.
- 가열감량(cooking loss)과 보수력(water holding capacity)을 보면, 육질등급이 향상될수록 가열감량이 커지고 보수력은 높아지는 경향이 있었으나 성별이나 등급간에 뚜렷한 차이는 볼 수 없었다.
- pH와 수분함량에 있어서도 성별이나 등급간 뚜렷한 차이를 볼 수 없었으나 거세우 등심육의 수분함량은 암소육이나 비거세육의 수분함량에 비해 낮은 경향이였다.
- 조지방 함량은 육질등급이 높아짐에 따라 높아지는 경향이였으며, 특히 비거세 1+등급의 경우에는 1~2등급에 비해 현저히 높은 조지방량을 보였으나 1두에서만 조사된 바이므로 변이를 알 수 없었다.

Table 3-4. Physical and chemical properties of Hanwoo beef of only sampled

Sex	Quality Grade	Shear Force (kg/0.5in ²)		Cooking Loss (%)		Water Holding Capacity (%)		pH		Crude Fat (%)		Moisture (%)	
		Ave	SD	Ave	SD	Ave	SD	Ave	SD	Ave	SD	Ave	SD
Cow	3	7.7	2.7	24.5	2.6	49.7	4.4	5.6	0.1	5.1	2.5	71.3	3.1
	4	8.3	4.2	26.6	3.4	51.5	4.6	5.6	0.1	4.1	3.5	71.6	2.7
Bull	2	5.3	2.5	22.1	0.6	50.6	2.6	5.5	0.1	5.7	1.6	70.9	1.1
	3	7.9	3.9	23.3	1.8	51.7	3.4	5.5	0.1	3.4	1.3	72.0	1.1
	processing	6.3	0.8	23.1	1.4	49.7	1.5	-	-	3.2	1.4	72.0	1.1
Steer	1+	3.8	-	14.4	-	54.3	-	5.6	-	15.9	-	64.4	-
	1	6.8	1.8	22.8	1.3	51.0	0.5	5.6	0.1	7.5	0.9	69.9	1.6
	2	7.6	2.0	21.9	0.6	52.4	1.8	5.5	0.1	6.3	1.5	70.2	1.3

6) 발육능력

생시체중에는 암수간에 차이가 없었으며, 이유시 체중에서는 수컷(남원지소 및 대관령지소)이 암컷보다 큰 경향이 있었으며, 일년령의 송아지에 있어서는 비거세 수소>거세 수소>암소의 순으로 체중의 변화가 나타났다.

나. 한우 성별 집단 조성 및 유전자 정보를 이용한 선발체계 구축

1) 혈통관리를 통한 공시축의 다양성 확보

- 남원지소 및 대관령지소에서는 출생축에 대한 개체식별 관리 및 부모 혈통 기록의 관리
- 발육능력은 매 3개월마다 전 축군에 대한 체중 및 체위 조사 실시
- 체중측정 주요 연령 : 생시, 이유시, 12개월령, 18개월령, 24개월령, 출하시
- 종모우별 축군의 발육능력 조사 : 연차별로 수집된 혈통자료와 성장 및 도체 자료를 근거로 하여 남원지소와 대관령지소축의 각기 따로 유전능력을 분석
- 한우 암수별 능력에 따른 선발과 도태 지침 마련 : 농장별로 개체별 육종가에 근거한 교배계획 수립
- 선발지수 모형(남원지소) : 형질별 육종가를 토대로 다음과 같이 산출 순위를 정하여 암소 및 송아지 선발에 활용하였음.

성장능력지수 : $I(\text{growth}) = [\text{생시체중 육종가}] + [\text{이유체중 육종가}] + [12\text{개월령 체중 육종가}] \times 2.0$

육량생산지수 : $I(\text{yield}) = [\text{등심단면적 육종가}] \times 8.8 - [\text{등지방두께 육종가}] \times 39.3 - [\text{도체중 육종가}] \times 0.8$

포육능력지수 : $I(\text{maternal}) = [\text{생시체중 모체효과 육종가}] + [\text{이유체중 모체효과 육종가}] \times 2.0$

- 유전능력 평가 모형 : 개체모형 (Animal Model BLUP) 이용

2) 한우 유용 유전자 정보를 활용한 유전능력 평가모형 정립

- 도체성적에 대한 육종가를 개체별로 추정하기 위하여 남원지소와 대관령지

소 보유축 및 선조들에 대한 혈통과 도체성적이 수집되었다.

- 성별간 차이를 보기 위해서 남원지소와 대관령지소의 자료를 통합하여 도체 성적에 대한 분석을 실시하였다.
- 자료의 연결 : 이들 두 농장의 자료는 종모우로서만 연결시켰다.
- 혈통의 추적 : 종모우로 연결된 자료에서 혈통은 선조 5세대까지 추적이 가능하였다.
- 분석모형은 출생 herd-year-season을 동기그룹으로 하고, 성별효과를 고정효과로 하고 국가단위 한우 유전능력 평가시와 동일하게 (축산기술연구소, 2003) 도축연령을 일차식효과의 공변량으로 적용하였다.
- 분석은 ABTK (animal breeders tool kit, B.L. Golden et al., 1992)의 tkblup tool kit을 활용하였으며 도축시 생체중(SWT)과 도체중(CWT), 등지방두께(BF), 등심단면적(REA), 근내지방도(MS) 5개 형질에 대해 Gaus-Seidel iteration을 10^{-10} 까지 수렴하도록 하였다.
- BLUP model에 적용된 환경분산-공분산(E) 행렬과 유전분산-공분산(G) 행렬을 다음과 같다.

	SWT	CWT	BF	REA	MS
E= SWT	2047.11	700	30	150	0
CWT	700	707.6	51.6	72.04	2.8
BF	30	51.6	5.17	8.147	0.377
REA	150	72.04	8.147	43.59	2.36
MS	0	2.8	0.377	2.36	0.837

	SWT	CWT	BF	REA	MS
G= SWT	635.13	400	15	70	0
CWT	400	300.38	2.7	48.5	4.58
BF	15	2.7	3.84	-2.1	0.239
REA	70	48.5	-2.1	16.45	0.29
MS	0	4.58	0.239	0.29	1.0352

- 다형질 BLUP Animal Model로부터 얻어진 고정효과의 해(BLUE)를 (herd-year-season 효과 제외) 다음 표 3-5에 제시한다.

Table 3-5. The Best Linear Unbiased Estimators (BLUE) and summary statistics of the Best Linear Unbiased Predictors (BLUP) from multivariate Animal Model

BLUE	SWT	CWT	BF	REA	MS
mean	560.16	321.33	4.48	80.56	2.19
sex					
Cow	-48.23	-32.93	-1.52	-4.35	-0.33
Bull	76.76	39.49	-2.06	13.34	-2.32
Steer	0	0	0	0	0
b(slage)	0.0335	0.0379	0.0044	0.0050	0.0003
BLUP					
N	1961	1961	1961	1961	1961
Mean	0.02	-0.04	-0.08	0.16	-0.02
SD	14.54	12.19	2.07	3.68	0.52

다. 근내지방도와 조지방 함량간의 관계 규명

- 남원지소와 대관령지소에서 도축되어 도체성적과 조지방 함량 분석이 이루어진 개체들에 대하여 이들 두 형질간의 관계를 규명하고자 상관도를 보았다. 본 연구에 사용된 시료는 모두 동일한 도체평가 방법에 따라 실시되었으나 개체별 유전능력 평가시에는 이전의 자료들이 혈통에 따라 사용되어져야 하므로 이들간의 관계를 먼저 규명할 필요가 있었다.
- 표 3-6에는 근내지방도 체계가 1~7점제로 변화가 이루어진 1998년을 기준으로 전체와 그 이전 이후, 그리고 농장별, 성별에 따른 평균과 이들 두 형질간의 단순상관계수가 나와 있다.
- 농장과 성별에 관계없이 전체적으로 조지방 함량과 근내지방도와의 관계를 보았을 때는 1-7점제와 1-5점제 간에 큰 차이는 없었으며 전체 연도를 포함한 경우와 1998년 이후만을 고려한 경우에 있어서도 별 차이가 없었으며 0.68~0.70의 정의 상관관계를 보였다.
- 출생농장별로 보았을 때는 남원지소(NW)의 경우가 대관령지소(DKR)의 경우에 비해 높은 상관관계를 보였는데 이는 남원지소에서 도축된 자료들이 주로

암소와 거세우에 국한되어 있으며 이들의 조지방 함량과 근내지방도의 변이가 대관령지소 축이나 비거세 수소에서의 변이보다 다소 높은 경향으로 나타난 결과라고 보인다.

- 한편 1998년 출생 이후 축들만의 자료를 이용한 경우나 1-5점의 근내지방도 체계를 활용한 경우에 있어서 모든 년도 및 1-7점 체계 근내지방도 점수하에서와 상관도가 크게 차이가 나지 않았다. 1-5점으로 분석한 결과는 현재 1-7점제의 경우에 비해 근내지방도에 대한 평균값이 낮아졌으며 변이에는 큰 차이가 없었던 결과로 판단된다.

Table 3-6. Correlation between crude fat (Cfat) content in the rib eye and marbling scores

MS scoring	years	farm	sex	Cfat mean	Cfat SD	MS mean	MS SD	N	r
1-7	all	both	all	6.14	3.34	2.60	1.44	318	0.680
		DKR	all	6.18	3.34	2.59	1.40	296	0.665
		NW	all	5.71	3.34	2.72	1.85	22	0.859
		both	bull	5.85	2.97	2.38	1.22	272	0.614
			cow	4.60	2.98	1.43	0.98	12	0.790
			steer	9.19	4.59	3.98	1.66	34	0.674
	>1998	both	all	5.56	2.77	2.23	1.52	211	0.703
		DKR	all	5.54	2.69	2.12	1.42	189	0.674
		NW	all	5.71	3.34	2.72	1.85	22	0.859
		both	bull	5.22	2.45	1.76	1.02	174	0.608
			cow	4.60	2.98	1.43	0.98	12	0.790
			steer	8.54	2.94	3.84	1.72	25	0.729
1-5	all	both	all	6.14	3.34	2.55	1.31	318	0.669
		DKR	all	6.18	3.34	2.55	1.29	296	0.659
		NW	all	5.71	3.34	2.54	1.50	22	0.795
		both	bull	5.85	2.97	2.36	1.18	272	0.637
			cow	4.60	2.98	1.43	0.98	12	0.790
			steer	9.19	4.59	3.70	1.30	34	0.568
	>1998	both	all	5.56	2.77	2.15	1.31	211	0.701
		DKR	all	5.54	2.69	2.06	1.26	189	0.684
		NW	all	5.71	3.34	2.54	1.50	22	0.795
		both	bull	5.22	2.46	1.74	0.95	174	0.608
			cow	4.60	2.98	1.43	0.98	12	0.790
			steer	8.54	2.94	3.56	1.30	25	0.693

- 1-7점제를 도입한 이후 국내 소고기의 근내지방도가 오히려 더 증가하였다고 보이며 따라서, 본 연구 분석에서는 출생년도나 근내지방도 점수의 변화와는 무관하게 개체별 유전능력을 평가하였다.
- 다음 그림 3-1에서는 본 연구에서 시료로 사용된 시험축을 포함한 출하 동기 우들의 도체성적과 조지방함량 간의 관계를 나타내었다. 남원지소에서 출하된 거세 수소 (NW-Steer)의 경우에는 2~7점까지 고른 분포를 보이며 근내지방도의 증가에 따라 조지방함량이 거의 직선적으로 증가함을 보이고 있다. 그러나 암소 (NW-Cow)나 대관령에서 출하된 비거세 수소 (DKR-Bull)의 경우에 있어서는 근내지방도의 분포가 1~5점에 머물렀으며 1점에서 2, 3점까지는 약간의 수직적인 증가를 보였으나 3-4점간에는 지방함량의 차이가 나타나지 않음을 볼 수 있었다. 이는 낮은 지방함량을 보이는 경우에 그 분석결과의 차이를 보기 어려움을 알 수 있다.

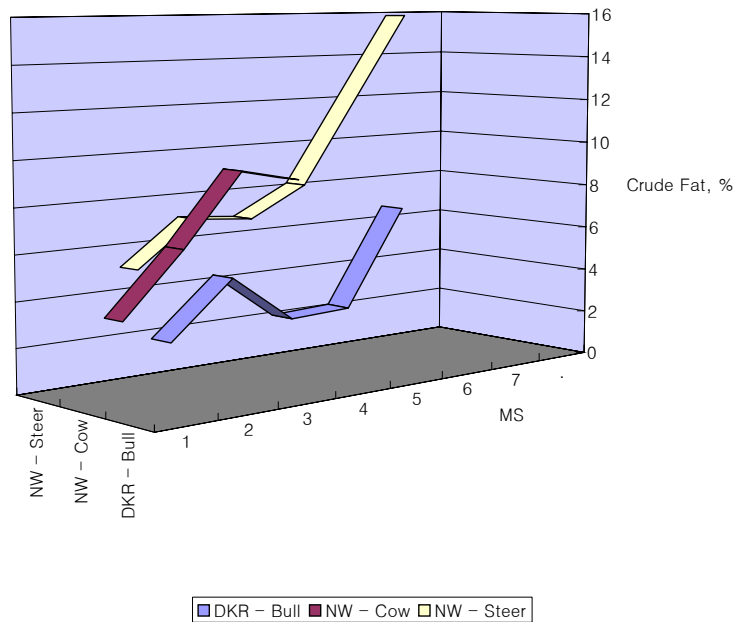


Figure 3-1. Relationship between marbling scores and crude fat contents (ether extracts) in the rib eye by sexes

라. 근내지방도와 조직내 스테로이드 호르몬 수준간의 관계 규명

- 전남대학교에서 분석한 등심 근육조직과 지방조직내 스테로이드 호르몬 수준에 대하여 성별 효과와 근내지방도(1-7점) 효과에 대한 유의성 검정을 실시하였다.

Table 3-7. Effect of sex and marbling score on hormonal levels (mol %) in loin eye muscle and fat tissues (unit of hormonal levels, nmol/kg)

Effect	Hormones	p-value / R ²	
		Muscle	Fatty
Sex	■-andosterone	0.2024 /0.90	0.8158 /0.85
	dehydroepiandrosterone	0.2502 /0.49	0.9888 /0.21
	epitesterone	0.9607 /0.70	0.1104 /0.96
	5■-dihydrotestosterone	0.6841 /0.88	0.2157 /0.99
	androstenedione	0.4168 /0.25	0.0726 /0.64
	testosterone	0.3807 /0.29	0.7344 /0.91
	pregnenolone	0.4640 /0.84	0.5818 /0.85
	progesterone	0.3595 /0.61	0.5779 /0.61
	17■-hydroxyprogesterone	0.1156 /0.61	0.2994 /0.46
	17■-estradiol	0.0000 /0.95	0.0003 /0.86
	estrone	0.0003 /0.80	0.0002 /0.85
	17β-estradiol	0.0841 /0.71	0.0037 /0.95
	estriol	0.0015 /0.75	0.1850 /0.37
	cortisone	0.1114 /0.64	0.0041 /0.58
	hydrocortisone	0.0592 /0.49	0.0101 /0.56
	MS	■-andosterone	0.0000
dehydroepiandrosterone		0.4797	0.7421
epitesterone		0.0025	0.0000
5■-dihydrotestosterone		0.0000	0.0000
androstenedione		0.7658	0.1048
testosterone		0.9888	0.0000
pregnenolone		0.0000	0.0000
progesterone		0.0265	0.0422
17■-hydroxyprogesterone		0.0731	0.2010
17■-estradiol		0.0000	0.0002
estrone		0.0043	0.0006
17β-estradiol		0.0095	0.0000
estriol		0.0592	0.4055
cortisone		0.0193	0.3176
hydrocortisone		0.8406	0.3316

- 표 3-7에는 분산분석의 결과가 제시되어 있는데 Model I에서는 근육 조직내 호르몬 수준만을, Model II에는 지방조직내 호르몬 수준만을 사용하였다.
- 근육조직과 지방조직에 존재하는 성호르몬 수준은 성별 차이와 근내지방도 차이에 따라 유의적인 차이가 있었으나 성호르몬의 종류에 따라 차이가 심하게 나타났다 ($R^2=0.21\sim0.99$).
- 성별에 따른 차이가 유의하게 나타난 호르몬은 17α -estradiol, estrone, 17β -estradiol과 estriol 등 estrogen 계열이었으며 cortisone 함량도 지방조직에서는 차이가 있음을 보였다. 그러나 androgen 계열 호르몬에서는 성별에 따른 차이가 나타나지 않았다.
- 근내지방도의 차이에 따른 호르몬 수준의 차이는 androgen 계열과 progesterone 및 estrogen 계열에서 나타났다. androgen 계열 중에서 α -andosterone, epitestosterone과 5α -dihydrotestosterone, 그리고 progesterone 계열에서 pregnenolone과 progesterone, estrogen 계열에서는 17α -estradiol, estrone, 17β -estradiol에서 유의적인 차이를 보였다. Testosterone 수준은 지방조직에서만 근내지방도에 따른 유의적 차이를 보였을 뿐 근육조직 내에서는 아무런 차이를 보이지 않았다. 결과적으로 볼 때, 근내지방의 축적에 따라 androgen 계열의 androstenedione과 testosterone 이 aromatase에 의해 estrone과 estradiol로 전환됨을 엿볼 수 있다.

마. 도체 특성과 성별 효과

- 도체특성의 일반적 성적과 물리화학적 특성 및 비거세우의 등심시료에 대한 panel test 결과에 대해 성별 효과와 잔차간 상관관계를 보았으며 이 결과가 표 3-8 ~ 3-11에 제시되어 있다.
- 분석모형은 성별효과와 도축시 연령(일수)의 일차식 효과를 각 성별내에서 공변량으로 사용하였다.
- 도체성적에 대한 성별 효과는 각 성별로 도축연령에 대한 공변이 보정함으로써 유의적인 차이를 보이지 않았다.
- 도축시 연령에 대한 성별 회귀효과는 도축시 생체중(SWT)과 도체중(CWT) 및 등지방두께(BF)와 등심단면적(REA)에서 유의적인 직선효과가 나타났다.

Table 3-8. Effect of sex on carcass characteristics - solutions and partial regression coefficients (n=63)

LSMeans(sex)	SWT, kg	CWT, kg	DP, %	BF, mm	REA, cm ²	MS, 1~7
P-value	0.245	0.258	0.375	0.868	0.394	0.218
Bull	-58.1	32.0	72.3	-6.7	79.0	11.2
Steer	902.8	636.7	74.9	22.3	161.4	18.1
Cow	407.3	222.2	54.5	5.7	59.3	1.1
Age Effect: b (age/sex)						
P-value	0.001	0.010	0.376	0.009	0.006	0.167
Bull	-0.88	-0.46	37.7	-0.02	-0.01	0.01
Steer	0.47	0.43	17.0	0.02	0.12	0.02
Cow	0.05	0.03	15.5	0.00	0.01	0.00

- 표현형 분산에 해당하는 잔차 분산 및 공분산으로부터 얻어진 잔차 상관관계를 보면 (표 3-9), 도축시 생체중과 도체중간에는 거의 1에 가까운 상관을 보였으며 도축시 생체중이나 도체중과 등심단면적 간에도 높은 정의 상관관계를 보였다.
- 근내지방도 또한 기타 체중이나 등심단면적 및 등지방 두께 등 정육량적인 형질들과 정의 표현형적 상관을 보였으나 그 상관정도는 낮았다.
- 성별에 따른 효과가 도체 지방생성 관련 형질 (등지방두께 및 근내지방도)과 등심근육조직의 이화학적 성상에 미치는 차이를 보았는데 (표 3-10), 성별에 따라 유의적인 차이를 보인 형질은 전단력 (Warner-Bratzler shear force, WBSF), 가열감량 (cooking loss), pH, 보수력 (water holding capacity, WHC) 및 수분함량 (moisture)이었다.
- 표 3-11에는 이들 지방생성 관련 도체형질과 등심근육조직의 이화학적 성상 간의 성별효과 모형으로부터 얻어진 잔차상관을 제시하였다.

Table 3-9. Residual correlation coefficients between carcass characteristics

Trait	CWT	DP	BF	REA	MS
SWT	0.97	0.38	0.39	0.67	0.38
CWT	1	0.58	0.41	0.71	0.38
DP		1	0.34	0.46	0.22
BF	Symmetric		1	-0.00	0.30
REA				1	0.19

Table 3-10. Effect of sex on carcass characteristics related with tenderness (n=39)

LSM (sex)	BF, cm	MS, 1~7	WBSF, kg/5in ²	Cooking Loss, %	pH	WHC,%	Moist, %	C.Fat, %
P-value	0.929	0.349	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.805
Bull	-6.2	10.8	239.4	-253.2	615.9	373.8	-894.1	11.5
Steer	17.6	16.7	2.2	-1.8	6.0	50.5	61.9	24.0
Cow	6.2	1.2	8.6	24.3	5.7	48.1	73.3	3.1
Age Effect: \bar{M} (age/sex)								
P-value	0.141	0.264	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.280
Bull	-0.02	0.01	0.29	-0.35	0.76	0.40	-1.21	0.01
Steer	0.01	0.02	-0.01	-0.03	0.00	-0.00	-0.01	0.02
Cow	0.00	0.00	-0.00	0.00	-0.00	0.00	-0.00	0.00

Table 3-11. Residual correlation coefficients between carcass characteristics and physical or chemical composition of loin eye area

Trait	MS	WBSF	C.Loss	pH	WHC	Moist	C.Fat
BF	0.33	-0.35	-0.06	-0.25	0.03	0.12	0.49
MS	1	-0.36	-0.51	0.15	0.23	-0.34	0.78
WBSF		1	0.14	0.42	0.29	-0.35	-0.44
C.Loss	Symmetric		1	-0.54	-0.67	0.67	-0.49
pH				1	0.53	-0.95	-0.17
WHC					1	-0.63	0.21
Moist						1	-0.08

- 그러나 등지방두께와 등심내 조지방 함량 (crude fat, C.fat in Table 10)간에는 정의 상관관계를 보였다. 이는 등지방의 축적과 등심내 근내지방의 생성간에 관련이 있음을 시사한다.
- 물리적 특성으로 나타낸 연도에 해당하는 전단력은 도체의 등지방두께나 근내지방도와 부(-)의 상관관계를 보였다. 즉, 등지방이 두꺼울수록 또는 근내지방도가 높을수록 다소 연한 고기가 생성된다는 것을 알 수 있다.
- 등지방두께와 등심조직의 가열감량, pH나 보수력 및 수분함량간의 관계는 없는 것으로 나타났으며 이는 등심의 조직인 등지방과 등심조직의 물리적 특성간에는 상관이 없음을 나타낸다.
- 등심내 근내지방도와 조지방함량간에는 높은 정(+)의 상관관계를 보였으며 근내지방도가 증가함에 따라 전단력 및 가열감량, 수분함량이 적어짐을 보이고

- 있으나 보수력은 오히려 증가함을 나타내고 있다. 이는 지방함량이 증가함에 따라 전단력, 가열감량이 줄어들고 보수력이 증가하는 경향과 유사한 결과이다.
- 표 3-12와 3-13에는 관능검사 결과에 대한 성별효과의 효과 분석 결과를 제시하였다.
 - 관능검사에 있어서 성별 효과의 유의적인 차이는 향미 (flavor)에서만 나타났으며 조직감 (texture), 다즙성 (juiciness)이나 연도 (tenderness, Tender in Table 3-12)에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다.
 - 근내지방도가 증가함에 따라 다즙성이나 연도는 증가하는 상관관계를 보였으며 (표 3-13) 향미에는 유의적인 차이를 보이지 않았다.
 - 근내지방도는 조직감과 약한 부(-)의 상관관계를 보였는데, 이는 다즙성이나 연도가 조직감과 역시 약한 부(-)의 상관관계를 보인 결과와 유사하다.

Table 3-12. Effect of sex on marbling score and panel properties of beef (n=30)

LSM (sex)	MS, 1~7	Textr, 1~3	Mature, 1~3	WBSF, kg/.5in ²	C.Loss, %	pH	WHC, %	Juicy, 1~5	Tender, 1~5	Flavor, 1~5
P-value	0.309	0.974	0.192	0.000	0.000	0.000	0.000	0.917	0.116	0.000
Bull	23.8	2.0	2.0	298.9	-336.6	791.8	462.4	-3.4	25.8	373378.1
Steer	4.2	1.4	2.0	46.3	10.7	5.5	77.2	1.2	5.1	6.5
Cow	0.8	1.8	6.8	6.3	23.1	5.5	50.9	6.2	4.8	5.6
Age Effect: ♀ (age/sex)										
P-value	0.290	0.973	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000	0.298	0.147	0.000
Bull	0.02	0.00	0.00	0.29	-0.36	0.78	0.41	-0.01	0.02	371.2
Steer	0.00	-0.00	0.00	0.04	-0.01	0.00	0.03	-0.00	0.00	0.00
Cow	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.00	-0.00	-0.00	-0.00

Table 3-13. Residual correlation coefficients between panel properties of beef

Trait	Textr	Mature	WBSF	C.Loss	pH	WHC	Juicy	Tender	Flavor
MS	-0.27	-0.36	-0.49	-0.34	0.05	0.22	0.63	0.63	0.03
Textr	1	0.22	0.29	0.31	0.00	-0.26	-0.17	-0.29	-0.00
Mature		1	0.17	0.49	0.00	-0.31	-0.27	-0.31	-0.00
WBSF	Symmetric		1	0.08	0.47	0.33	-0.51	-0.28	0.49
C.Loss				1	-0.56	-0.71	-0.35	-0.70	-0.55
pH					1	0.55	-0.04	0.44	0.99
WHC						1	0.10	0.58	0.56
Juicy							1	0.65	-0.05
Tender								1	0.45
Flavor									1

- 도체의 성숙도 (표 3-12, 3-13의 maturity, mature)는 근내지방도와 부(-)의 상관관계를 보였는데, 이는 본 연구에 공시된 암소의 성숙도가 높으나 근내지방도 분포가 낮은 것이 영향을 미친 것으로 짐작된다. 한편, 도체의 성숙도가 높아지면서 등심내 조직의 보수력이나 다즙성 및 연도가 떨어지는 것을 부(-)의 상관관계에서 추측할 수 있다.
- 등심시료의 연도와 특히 강한 상관관계를 보이는 특성에는 근내지방도를 비롯하여 가열감량, 다즙성, 수분함량 등이 있었다.
- 향미에 주로 영향을 미칠 수 있는 특성으로는 pH와 보수력, 전단력 및 가열감량이 있었다.

바. 유전자 발현 수준과 도체 특성간의 관계

- 표 3-14는 성호르몬 receptor 유전자의 발현수준과 육질과 상관분석 자료이다.

Table 3-14. Summary statistics of carcass properties and sex hormone reception gene expressions for animals used for expression analyses (relative concentrations)

Variables*	N	Mean	SD	Median	Min	Max
ms	22	2.182	1.220	2.000	1	5
wbsf	22	5.074	2.213	4.935	0.54	9.44
ee	22	7.930	3.109	7.410	3.84	12.79
armrt	22	2.157	0.738	1.880	1.24	3.93
arart	22	1.420	0.221	1.375	1	1.7
armn	22	1.976	0.457	1.975	1	2.76
aran	22	1.003	0.289	1.080	0.42	1.43
eramrt	22	1.366	0.557	1.135	1	3.11
eraart	22	1.413	0.415	1.330	0.95	2.44
bvslwt	22	-3.660	22.298	-10.143	-36.291	53.905
bvcwt	22	-3.291	19.386	-7.535	-25.913	37.607
bvbf	22	-0.417	2.670	-0.466	-5.688	4.520
bvrea	22	0.032	5.039	-1.548	-7.796	9.964
bvms	22	-0.291	0.539	-0.305	-1.263	0.990

* ms: marbling score (1-7), wbsf: Warner-Bratzler shear force (kg/5in²), ee: ether extract (%), armrt: androgen receptor in muscle tissues by RT-PCR, arart: androgen receptor in adipose tissues by RT-PCR, armn: androgen receptor in muscle tissues by Northern blot, aran: androgen receptor in adipose tissue by Northern blot, eramrt: estrogen receptor in muscle tissues by RT-PCR, eraart: estrogen receptor in adipose tissues by RT-PCR, bvslwt: estimated breeding values for body weight at slaughter (kg), bvcwt: estimated breeding values for carcass weight (kg), bvbf: estimated breeding values for back fat thickness (mm), bvrea: estimated breeding values for rib eye area (cm²), bvms: estimated breeding values for marbling scores

- 표 3-15에는 앞의 표 3-14에서 나타낸 변량들간의 단순상관 및 순위상관계수 추정치를 나타내었다.
- 전반적으로 단순상관계수와 순위상관계수 추정치들 간에는 유사한 경향을 보였으며 도체성적과 유전자 발현수준 및 도체형질에 대한 추정 육종가 간에 중저의 상관관계를 보였다. 이는 유전적인 요인 외에 성별 효과 등 일반 환경요인이 크게 작용함을 짐작할 수 있다.
- 근내지방도는 지방조직내 androgen receptor 유전자 발현수준과는 상관관계가 RT-PCR 방법으로 분석한 경우에는 없는 것으로 나타났으나 Northern 방법으로 분석한 경우에는 중정도의 정(+)의 상관관계가 나타났다.
- 근내지방도와 근육조직내 androgen receptor 유전자 발현수준과의 상관관계는 RT-PCR과 Northern 방법 모두에서 낮게 또는 부(-)의 낮은 상관을 보였다.
- 근내지방도와 근육조직 또는 지방조직 내에서의 estrogen receptor 유전자 발현수준과는 정(+)의 중정도의 단순 상관관계를 보였으나 순위 상관에서는 낮은 상관도를 보였다.
- 등심 조지방함량에 있어서도 역시 estrogen receptor 유전자 발현과는 정(+)의 중정도 상관을 보이고 androgen receptor 유전자 발현수준과는 부(-)의 상관관계를 보였다. 그러나 조지방함량에 있어서는 androgen receptor 유전자 발현수준에서 RT-PCR 방법보다는 Northern 방법에서 나온 결과와 높은 상관관계를 보였다.
- 전단력에 있어서는 근육조직내 androgen receptor 유전자 발현과는 부(-)의 상관관계를 그리고 estrogen receptor 유전자 발현수준과는 상관이 없는 것으로 나타났다.
- Androgen receptor 유전자 발현수준과 추정 육종가 간의 상관관계 : RT-PCR 방법을 통하여 본 androgen receptor 유전자의 발현수준은 근육조직에서는 도체중이나 도축시 생체중과 정(+)의 중정도의 상관관계를 보였으며, 지방조직에서는 생체중 및 도체중 그리고 등심단면적과는 중정도의 부(-)의 상관관계를 보였으며 등지방두께와는 중정도의 정(+)의 상관관계를 보였다. 따라서 androgen receptor 유전자의 발현수준은 근육세포의 발달과 관련이 높으며 상대적으로 피하지방의 생성과는 역작용을 함을 짐작할 수 있고 이를 보는 데는 RT-PCR 방법이 Northern 방법보다 정확함을 엿볼 수 있다.

Table 3-15. Pearson's simple correlation coefficients (upper right off-diagonals) and Spearman's rank correlation coefficients (lower right off-diagonals) between carcass properties, sex hormone receptor gene expressions and breeding values of carcass traits*

n=22	ms	ee	wbsf	armrt	arart	armn	aran	eramrt	eraart	bvslwt	bvcwt	bvbf	bvrea	bvms
ms	1	0.38	-0.34	-0.12	0.05	-0.16	-0.42	0.41	0.32	0.21	0.23	0.10	0.07	0.58
p		0.078	0.118	0.587	0.840	0.476	0.052	0.057	0.143	0.341	0.313	0.654	0.751	0.005
ee	0.34	1	-0.04	-0.20	0.12	-0.54	-0.44	0.48	0.59	0.17	0.05	0.36	-0.06	0.32
p	0.127		0.857	0.364	0.585	0.010	0.042	0.024	0.004	0.455	0.820	0.102	0.788	0.149
wbsf	-0.35	0.07	1	-0.42	0.27	-0.40	-0.02	0.02	0.14	-0.62	-0.65	0.33	-0.53	-0.22
p	0.114	0.770		0.054	0.223	0.068	0.936	0.933	0.521	0.002	0.001	0.129	0.012	0.336
armrt	0.00	-0.11	-0.47	1	-0.40	0.68	-0.11	-0.20	-0.32	0.37	0.43	-0.35	0.39	0.03
p	0.993	0.634	0.028		0.067	0.001	0.630	0.361	0.141	0.090	0.047	0.106	0.075	0.892
arart	0.00	0.13	0.35	-0.36	1	0.01	-0.43	0.38	0.39	-0.40	-0.51	0.53	-0.54	-0.16
p	0.996	0.558	0.113	0.095		0.967	0.046	0.083	0.072	0.066	0.015	0.012	0.009	0.471
armn	-0.16	-0.60	-0.54	0.55	-0.08	1	-0.01	-0.23	-0.56	0.14	0.21	-0.28	0.17	-0.10
p	0.469	0.003	0.010	0.008	0.708		0.949	0.310	0.007	0.544	0.343	0.202	0.451	0.673
aran	-0.56	-0.35	0.01	-0.19	-0.40	0.04	1	-0.52	-0.39	0.06	0.19	-0.41	0.26	0.03
p	0.007	0.110	0.952	0.385	0.062	0.855		0.013	0.076	0.796	0.404	0.061	0.249	0.886
eramrt	0.18	0.16	-0.13	0.13	0.22	0.04	-0.30	1	0.51	-0.20	-0.27	0.22	-0.25	-0.20
p	0.428	0.468	0.572	0.553	0.316	0.861	0.172		0.016	0.364	0.232	0.326	0.272	0.372
eraart	0.11	0.47	0.27	-0.30	0.57	-0.48	-0.31	0.50	1	0.10	-0.07	0.51	-0.19	0.24
p	0.642	0.028	0.217	0.182	0.006	0.024	0.167	0.018		0.673	0.765	0.014	0.385	0.273
bvslwt	0.19	0.02	-0.64	0.47	-0.27	0.33	-0.03	0.01	-0.15	1	0.95	-0.36	0.84	0.35
p	0.386	0.913	0.001	0.029	0.221	0.132	0.891	0.960	0.519		<.0001	0.100	<.0001	0.116
bvcwt	0.23	-0.05	-0.67	0.47	-0.46	0.34	0.09	-0.13	-0.39	0.89	1	-0.58	0.92	0.38
p	0.303	0.818	0.001	0.026	0.033	0.120	0.696	0.572	0.071	<.0001		0.005	<.0001	0.082
bvbf	0.14	0.40	0.33	-0.24	0.49	-0.33	-0.33	0.03	0.65	-0.36	-0.61	1	-0.80	0.18
p	0.522	0.066	0.139	0.291	0.019	0.138	0.138	0.907	0.001	0.097	0.003		<.0001	0.417
bvrea	0.11	-0.11	-0.55	0.35	-0.44	0.27	0.17	-0.05	-0.41	0.84	0.94	-0.75	1	0.08
p	0.633	0.622	0.008	0.106	0.040	0.230	0.439	0.842	0.057	<.0001	<.0001	<.0001		0.719
bvms	0.49	0.16	-0.30	0.16	-0.21	0.04	0.03	-0.30	-0.01	0.22	0.34	0.24	0.08	1
p	0.022	0.470	0.175	0.474	0.352	0.855	0.881	0.182	0.974	0.334	0.121	0.280	0.736	

* ms: marbling score (1-7), wbsf: Warner-Bratzler shear force ($\text{kg}/5\text{in}^2$), ee: ether extract (%), armrt: androgen receptor in muscle tissues by RT-PCR, arart: androgen receptor in adipose tissues by RT-PCR, armn: androgen receptor in muscle tissues by Northern blot, aran: androgen receptor in adipose tissue by Northern blot, eramrt: estrogen receptor in muscle tissues by RT-PCR, eraart: estrogen receptor in adipose tissues by RT-PCR, bvslwt: estimated breeding values for body weight at slaughter (kg), bvcwt: estimated breeding values for carcass weight (kg), bvbf: estimated breeding values for back fat thickness (mm), bvrea: estimated breeding values for rib eye area (cm^2), bvms: estimated breeding values for marbling scores, p: p-values ($H_0: p=0$)

- Estrogen receptor 유전자 발현수준과 추정 육종가 간의 상관관계 : 반면 지방조직에서 분석한 estrogen receptor 유전자의 발현수준은 등지방두께에 있어서 정의 상관관계를 보였으며 생체중, 도체중과는 아무런 상관관계가 나타나지 않았으며 등심단면적과는 순위상관에서 중정도의 부(-)의 상관관계를 나타내었다.
- 성별 효과를 제외한 후 근내지방도, 연도 (Warner-Bratzler shear force)와 근육과 지방조직에서 나타난 androgen receptor 와 estrogen receptor 유전자의 발현수준 (mRNA 상대적 농도)간의 관계를 규명하기 위하여 다변량 분산분석을 실시하였다.
- 분산분석은 근내지방도, 연도, mRNA 발현 수준 및 개체별 육종가에 미치는 성별 효과만을 주효과로 모형에 넣은 일반선형모형 (generalized linear model)으로 분석하였다.
- 분산분석결과, 성별효과의 유의적인 차이는 근내지방도와 조지방함량, RT-PCR 나 Northern 방법에 의한 근육조직내 androgen receptor 나 estrogen receptor 유전자들의 발현수준 그리고 Northern 방법에 의한 지방조직내 androgen receptor 유전자와 RT-PCR에 의한 지방조직내 estrogen receptor 유전자 발현수준에 대해서 나타났다.
- 다변량 모형에서의 성별효과는 Hotelling-Lawley 검정이나 Pillai 검정에 있어서 고도의 유의성이 인정되었다. 이에 따른 잔차 상관계수 추정치와 분산-공분산 추정치를 표 3-16에 제시하였다.
- 도체 근내지방도는 앞의 결과와 같이 전단력과 부(-)의 상관관계를 보였으며 근육조직내 androgen receptor 유전자 발현수준과 부(-)의 상관관계를 보이고 있다. 반면 지방조직의 androgen receptor 발현수준과는 그 상관도가 낮았으며 근육내 estrogen receptor 유전자 발현수준과도 약한 부(-)의 상관관계를 보이고 있다.
- 등심내 조지방 함량은 근육조직과 지방조직내의 Northern 방법에 의한 androgen receptor 유전자 발현수준과 부(-)의 상관을 보이면서 지방조직의 estrogen receptor 유전자 발현수준과는 정(+)의 상관관계를 보이고 있다.
- 도축시 체중이나 도체중 그리고 등심단면적은 앞의 단순상관분석과 마찬가지로 RT-PCR 방법에 의한 근육내 androgen receptor 유전자 발현과는 정(+)의

상관을 보이면서 등지방두께와는 부(-)의 상관을 보이고 있다. 그러나 Northern 방법에 의한 androgen receptor 유전자 발현 수준은 이들 네 개 형질들과 모두 부(-)의 약한 상관관계를 보이고 있어 분석 방법에 따른 차이가 있음을 시사한다.

- Estrogen receptor 유전자의 발현수준은 근육조직의 분석에서 근내지방도와 부(-)의 상관을 보이고 있으나 지방조직에서의 발현수준은 근내지방도와 정(+)의 상관관계를 보이고 있다.

Table 3-16. Residual variance (diagonals)-covariances (upper right off-diagonals) and partial correlation coefficients (lower left off-diagonals, italic fonts in shaded area) of and between carcass properties, sex hormone receptor gene expressions and estimated breeding values of carcass traits*

df=19	ms	wbsf	ee	armrt	arart	armn	aran	eramrt	eraart	bvslwt	bvcwt	bvbf	bvrea	bvms
ms	18.98	-18.74	10.26	-3.90	-0.62	-2.86	0.17	-1.17	1.117	126.3	135.6	-2.68	21.1	7.792
wbsf	<i>-0.35</i>	145	-29.05	-3.59	2.0	-0.51	-3.46	-2.85	-2.352	-665.3	-595.1	43.08	-134.6	-5.628
ee	<i>0.28</i>	<i>-0.28</i>	71.27	1.77	-1.25	-5.31	-3.36	0.19	4.021	338.2	228.7	20.93	27.9	9.035
armrt	<i>-0.36</i>	<i>-0.12</i>	<i>0.08</i>	6.21	-0.65	1.22	0.20	0.10	0.202	50.0	52.9	-8.77	16.4	-0.366
arart	<i>-0.16</i>	<i>0.18</i>	<i>-0.16</i>	<i>-0.29</i>	0.83	0.52	-0.39	0.02	0.163	-28.1	-31.5	4.66	-9.4	-0.320
armn	<i>-0.48</i>	<i>-0.03</i>	<i>-0.46</i>	<i>0.36</i>	<i>0.42</i>	1.90	0.41	0.14	-0.611	-24.7	-13.1	-3.09	-1.42	-0.922
aran	<i>0.04</i>	<i>-0.30</i>	<i>-0.43</i>	<i>0.09</i>	<i>-0.46</i>	<i>0.32</i>	0.87	-0.04	-0.494	10.9	20.0	-4.40	5.51	0.185
eramrt	<i>-0.27</i>	<i>-0.24</i>	<i>0.02</i>	<i>0.04</i>	<i>0.02</i>	<i>0.10</i>	<i>-0.05</i>	0.96	-0.276	-7.1	-3.3	-2.57	0.78	-1.033
eraart	<i>0.19</i>	<i>-0.14</i>	<i>0.35</i>	<i>0.06</i>	<i>0.13</i>	<i>-0.33</i>	<i>-0.39</i>	<i>-0.21</i>	1.850	59.7	33.5	6.48	1.53	1.422
bvslwt	<i>0.30</i>	<i>-0.57</i>	<i>0.42</i>	<i>0.21</i>	<i>-0.32</i>	<i>-0.19</i>	<i>0.12</i>	<i>-0.08</i>	<i>0.46</i>	9209	7423	-335.4	1730	77.800
bvcwt	<i>0.38</i>	<i>-0.60</i>	<i>0.33</i>	<i>0.26</i>	<i>-0.43</i>	<i>-0.12</i>	<i>0.26</i>	<i>-0.04</i>	<i>0.30</i>	<i>0.95</i>	6612	-499.6	1625	74.181
bvbf	<i>-0.05</i>	<i>0.31</i>	<i>0.22</i>	<i>-0.31</i>	<i>0.45</i>	<i>-0.20</i>	<i>-0.41</i>	<i>-0.23</i>	<i>0.41</i>	<i>-0.30</i>	<i>-0.53</i>	132.1	-194	6.216
bvrea	<i>0.22</i>	<i>-0.50</i>	<i>0.15</i>	<i>0.30</i>	<i>-0.47</i>	<i>-0.05</i>	<i>0.27</i>	<i>0.04</i>	<i>0.05</i>	<i>0.83</i>	<i>0.92</i>	<i>-0.77</i>	475	2.993
bvms	<i>0.73</i>	<i>-0.19</i>	<i>0.44</i>	<i>-0.06</i>	<i>-0.14</i>	<i>-0.27</i>	<i>0.08</i>	<i>-0.43</i>	<i>0.43</i>	<i>0.33</i>	<i>0.37</i>	<i>0.22</i>	<i>0.06</i>	6.030

* ms: marbling score (1-7), wbsf: Warner-Bratzler shear force (kg/5in²), ee: ether extract (%), armrt: androgen receptor in muscle tissues by RT-PCR, arart: androgen receptor in adipose tissues by RT-PCR, armn: androgen receptor in muscle tissues by Northern blot, aran: androgen receptor in adipose tissue by Northern blot, eramrt: estrogen receptor in muscle tissues by RT-PCR, eraart: estrogen receptor in adipose tissues by RT-PCR, bvslwt: estimated breeding values for body weight at slaughter (kg), bvcwt: estimated breeding values for carcass weight (kg), bvbf: estimated breeding values for back fat thickness (mm), bvrea: estimated breeding values for rib eye area (cm²), bvms: estimated breeding values for marbling scores

제 4 장

목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표 달성도

구 분	연 구 개 발 목 표 및 내 용	달 성 도
1년차 (2002)	○ 제 1 세부과제 한우 조직내 성호르몬 합성 및 신호전달 관련 유전자 발현 분석 방법 확립	100%
	○ 제 2 세부과제 한우 조직내 스테로이드 호르몬의 분석 방법 확립: Steroid 호르몬의 추출, siliation, GC/MS 분석	100%
	○ 협동과제 한우의 암수별 능력차별화 집단 조성: 암소 및 거세우와 비 거세우의 발육능력 조사, 공시축군의 주요 경제형질의 유전 능력 분석 및 평가	100%
2년차 (2003)	○ 제 1 세부과제 한우 조직내 성호르몬 합성 및 신호전달 관련 유전자에 대한 성별 발현 비교: 성별 유전자 발현비교, 지방조직 explant culture system에서 성호르몬 처리에 의한 유전자 발현 비교, 육질 등급별 유전자 발현 비교, 유전자 발현 양상과 육질과의 연관성 분석	100%
	○ 제 2 세부과제 한우 조직내 효소 활성 분석: aromatase 활성 분석 및 육질 과 연관성 분석	100%
	○ 협동과제 한우 성별 유전자 정보를 이용한 선발체계 구축	100%

제 2 절 관련분야의 기술 발전에의 기여도

1. 한우 근육조직과 지방조직에서 유전자 발현분석 기술, 스테로이드 호르몬의 추출, 분리, 정제, 분석 기술을 확립함으로써 다른 포유동물의 경우로도 확장할 수 있는 스테로이드 분석 방법을 확립하였다.
2. 한우 근육조직과 지방조직에서 aromatase의 활성을 측정하는 기술을 확립하여 다른 포유동물의 경우에도 적용될 수 있는 aromatase 활성 측정 방법을 확립하였다.
3. 분자생물학적 연구를 통하여 선발 교배를 통한 육종 방법의 효율성을 향상시킬 수 있는 기초 기술을 확립하였다. 성별 호르몬 수준과 합성관련 유전자 발현 및 도체 특성과의 관계를 규명함으로써 보다 과학적인 개량 및 사양관리 기술의 개발이 가능하게 되었다.

제 5 장

연구개발결과의 활용계획

본 연구결과는 한우 고급육 생산과 관련하여 거세효과에 대한 유전적 특성에 대한 지속적인 검정과 생리적 요인 규명 연구 개발에 대한 기초 자료로 활용할 수 있을 것이다. 본 연구를 통하여 성 관련 또는 육질과 관련된 다음과 같은 몇 가지 사실을 발견하였다. 근내지방도는 피하지방 estrogen receptor alpha 유전자 발현 수준과 높은 상관 ($r=0.61$)이 있고, 전단력은 근육 androgen receptor 유전자 발현 수준과 유의적인 부의 상관 (-0.42)이 있음을 알았다. 거세우에서 high-marble group이 low-marble group보다 pregnenolone 및 17α -hydroxyprogesterone 수준은 유의적으로 높음을 관찰하여, 이 두 호르몬은 근내지방도와 연관성이 높은 것으로 판단된다. 거세우에서 육질 등급은 근육조직이나 지방조직에서 aromatase의 활성이 낮을수록, MI가 높을수록 증가하였다. 이러한 경향은 근육조직에서 더욱 뚜렷하였다. 육종가 추정치와 도체특성 및 성호르몬 관련 유전자 발현정도와의 관계 분석을 통하여 androgen receptor 유전자 발현은 근육세포 성장과 정의 상관이 있었으며, 피하지방 estrogen receptor 유전자 발현수준은 근내지방도와 정의 상관관계가 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 향후 고급육 생산 기술개발을 위하여 유용한 자료로 활용할 수 있을 것이다. 궁극적으로 한우의 도체특성을 조기 예측 선발에 이용함으로써 유전적 개량량을 향상시킬 수 있을 것이다.

제 6 장

연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당없음

제 7 장

참고문헌

- Brandstetter, A. M., M. W. Pfaffl, J. F. Hocquette, D. E. Gerrard, B. Picard, Y. Geay and H. Sauerwein. 2000. Effects of muscle type, castration, age, and compensatory growth rate on androgen receptor mRNA expression in bovine skeletal muscle. *J. Anim. Sci.* 78:629-637.
- Brinks, J. S., R. T. Clark, N. M. Kieffer and J. J. Urick. 1964. Estimates of genetic, environmental and phenotypic parameters in Hereford females. *J. Anim. Sci.* 23:711-716.
- Brinks, J. S., R. T. Clark, N. M. Kieffer and J. R. Quesenberry. 1962. Mature weight in Hereford range cows -heritability, repeatability, and relationship to calf performance. *J. Anim. Sci.* 21:501-504.
- Brody, S. 1945. *Bioenergetics and Growth*. Reinhold Publishing Co., NY.
- Chomozenski, P. and N. Sacchi. 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Choy, Y. H., J. S. Brinks and R. M. Bourdon. 1996. Genetic evaluation of mature weight, hip height, and body condition score in an Angus herd. *J. Anim. Sci.* 74(Suppl. 1):107 (Abstr.).
- Choy, Y. H. 1997. Genetic evaluation of mature weight, hip height and body condition score in an Angus herd. Dissertation. Colorado State University. Fort Collins, CO.
- Cooke, P. S., P. A. Heine, J. A. Taylor and D. B. Lubahn. 2001. The role of estrogen and estrogen receptor- α in male adipose tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology* 178:147-154.
- Dieudonne, M. N., R. Pecquery, M. C. Leneuve and Y. Giudicelli. 2000. Opposite

- effects of androgens and estrogens on adipogenesis in rat preadipocytes: evidence for sex and site-related specificities and possible involvement of insulin-like growth factor 1 receptor and peroxisome proliferator-activated receptor α 2. *Endocrinology* 141:649-656.
- Dieudonne, M. N., R. Pecquery, A. Boumediene, M. C. Leneuve and Y. Giudicelli. 1998. Androgen receptors in human preadipocytes and adipocytes: regional specificities and regulation by sex steroids. *Am. J. Physiol.* 274: C1645-C1652.
- Fitzhugh, H. A. Jr. and St. C. S. Taylor. 1971. Genetic analysis of degree of maturity. *J. Anim. Sci.* 33:717-725.
- Fritsche, S. and H. Steinhart. 1998. Differences in natural steroid hormones patterns of beef from bulls and steers. *J. Anim. Sci.* 76:1621-1625.
- Fritsche, S., F. J. Schwarz, M. Kirchgebner, C. Augustini and H. Steinhart. 1998a. Influence of sampling on steroid hormone patterns of beef from bulls and steers. *Meat Science* 50(2):257-264.
- Fritsche, S., G. Schmidt, F. J. Schwarz, M. Kirchgebner, C. Augustini, H. Steinhart. 1998b. Natural hormone patterns of meat from steers and bulls depending on slaughter age. *Z Lebensm Unters Forsch A* 207:183-188.
- Gettys, T. W., D. M. Henricks and B. D. Schanbacher. 1988. An assessment of the relationship between tissue growth patterns and selected hormone profiles among sex phenotypes in cattle. *Anim. Prod.* 47:335-343.
- Golden, B. L., W. M. Snelling and C. H. Mallinchrodt. 1992. Animal breeder's tool kit - user's guide and reference manual. Colorado State University. LTB92-2.
- Goyal, H. O., F. F. Bartol, A. A. Wiley, M. K. Khalil, C. S. Williams and M. M. Vig. 1998. Regulation of androgen and estrogen receptors in male excurrent ducts of the goat: An immunohistochemical study. *Anat. Rec.* 250:164-171.
- Hartmann, S. and Steinhart, H. 1997. Simultaneous determination of anabolic and catabolic steroid hormones in meat by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 704:105-117.

- Heine, P. A., J. A. Taylor, G. A. Iwamoto, D. B. Lubahn and P. S. Cooke. 2000. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- α knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(23):12729-12734.
- Hinshelwood, M. M., C. J. Corbin, P. C. W. Tsang and E. R. Simpson. 1993. Isolation and characterization of a complementary deoxyribonucleic acid insert encoding bovine aromatase cytochrome P450. *Endocrinology* 133:1971-1977.
- Homma H., H. Kurachi, Y. Nishio, T. Takeda, T. Yamamoto, K. Adachi, K. I. Morishige, M. Ohmichi, Y. Matsuzawa and Y. Murate. 2000. Estrogen suppresses transcription of lipoprotein lipase gene. *The Journal of Biological Chemistry* 275(15):11404-11411.
- Houseknecht, K. L., C. P. Portocarrero, S. Ji. R. Lemenager and M. E. Spurlock. 2000. Growth hormone regulates leptin gene expression in bovine adipose tissue: correlation with adipose IGF-1 expression. *J. Endocrinol.* 164:51-57.
- Jones, M. E. E., A. W. Thorburn, K. L. Britt, K. N. Hewitt, N. G. Wreford, J. Proietto, O. K. Oz, B. J. Leury, K. M. Robertson, S. Yao and E. R. Simpson. 2000. Aromatase-deficient(ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(23):2735-2740.
- Johnson, D. E. 1984. Maintenance requirements for beef cattle: Importance and physiological and environmental causes of variation. *Proc. Beef Cow Efficiency Forum.* pp. 6-14.
- Johnson, D. W. and R. A. Wichern. 1992. *Applied multivariate statistical analysis.* Prentice Hall.
- Joyner J. M., Hutley L. J. and Cameron D. P. 2000. Glucocorticoid receptors in human pre-adipocytes: regional and gender differences. *J. Endocrinol.* 166: 45-152.
- Kristensen, K., S. B. Pedersen and B. Richelsen. 1999. Regulation of leptin by steroid hormones in rat adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259:624-630.
- Larionov, A.A., D.A. Vasylyev, J.I. Mason, A.F. Howie, L.M. Berstein, W.R.

- Miller. 2003. Aromatase in skeletal muscle. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 84:485-492.
- Machinal, F., M. N. Dieudonne, M. C. Leneveu, R. Pecquery, and Y. Giudicelli. 1999. In vivo and in vitro ob gene expression and leptin secretion in rat adipocytes: evidence for a regional specific regulation by sex steroid hormones. *Endocrinology* 140:1567-1574.
- Malayer, J. R. and V. M. Woods. 1998. Development of oestrogen receptor expression and hormone response in the uterus of the bovine fetus. *Journal of Reproduction and fertility* 112:289-300.
- McTernan P. G., Anwar A, Eggo M., Barnett A. H., Stewart P. M. and Kumar S. 2000. Gender differences in the regulation of P450 aromatase expression and activity in human adipose tissue. *Int. J. Obes.* 24:875-881.
- Moran, C., Quirke, J.F., Prendiville, D. J., Bourke, S., Roche, J. F. 1991. The effects of estradiol, trenbolone acetate, or zeranol on growth rate, mammary development, carcass traits, and plasma estradiol concentrations of beef heifers. *J. Ani. Sci.* 69:4249-4258.
- Mystkowski, P. and M. W. Schwartz. 2000. Gonad steroids and energy homeostasis in the leptin era. *Nutrition.* 16:937-946.
- Northcutt, S.L. and D.E. Wilson. 1993. Genetic parameter estimates and expected progeny differences for mature size in Angus cattle. *J.Anim.Sci.* 71:1148-1153.
- Park, G. B., S. S. Moon, Y. D. Ko, J. K. Ha, J. G. Lee, H. H. Chang and S. T. Joo. 2002. Influence of slaughter weight and sex on yield and quality grades of Hanwoo(Korean native cattle) carcasses. *J. Anim. Sci.* 80:129-136.
- Senda, M., K. Oka, W. V. Brown, P. K. Qasba and Y. Furuichi. 1987. Molecular cloning and sequence of a cDNA coding for bovine lipoprotein lipase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:4369-4373.
- Smith, L. H., S. R. Coats, H. Qin, M. S. Petrie, J. W. Covington, M. Su, M. Eren and D. E. Vaughan. 2004. Differential and opposing regulation of PAI-1 promoter activity by estrogen receptor α and estrogen receptor β in endothelial cells. *Circ. Res.* 95:269-275.

- Tchernof, A., Calles-Escandon, J., Sites, C. K., Poehlman, E. T. 1998. Menopause, central body fatness, and insulin resistance: effects of hormone-replacement therapy. *Coronary Artery Dis.* 9:503-511.
- Vettor, R., G. D. Pergola, C. Pagano, P. Englaro, E. Lauadio, F. Giorgino, W. F. Blum, R. Giorgino and G. Federspil. 1997. Gender differences in serum leptin in obese people: relationships with testosterone, body fat distribution and insulin sensitivity. *European Journal of Clinical Investigation.* 27:1016-1024.
- Wade, G. N., Gray, J. M. and Bartness, T. J. 1985. Gonadal influences on adiposity. *Int. J. Obes.* 9:83-92.
- Xiangqin C., J. T. Gene Hwang, J. Qiu, N. J. Blades and G. A. Churchill. 2004. Improved statistical tests for differential gene expression by shrinkage variance components estimates.
- 농촌진흥청 축산연구소. 2004. 한우유전능력 평가보고서 제 13호. 발간등록번호 11-1390217-0000045-09.
- 백명기. 2001. 한우 고급육 생산을 위한 지방대사조절 유전자원의 개발. 농림기술개발사업 최종보고서. 연구기관 전남대학교, 농림부.