

黑素皮质激素受体 1 (MC1R) 基因与猪的毛色

邓素华, 黄路生, 高军, 任军, 陈克飞

(江西农业大学江西省动物生物技术重点开放实验室, 江西南昌 330045)

摘要 猪的真黑色素与褐黑色素的合成量与分布主要受控于黑素皮质激素受体 1 基因。本文综述了该基因的定位、突变与多态检测, 黑素皮质激素受体的作用机制, 提出了对黑素皮质激素受体 1 基因进一步研究的看法。

关键词 猪; 毛色; 黑素皮质激素受体 1 基因

中图分类号 S828

文献标识码 A

文章编号 0253-977X(2001)01-0089-04

Effect of *Melanocortin Receptor 1* Gene on the Formation of Coat Color in Pigs

Deng Su-hua, Huang Lu-sheng, Gao Jun, Ren Jun, Chen Ke-fei

(The Provincial Key Laboratory for Animal Biotechnology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract The amount and distribution of eumelanin and pheomelanin are mainly controlled by *Melanocortin Receptor 1* gene. The location, mutation and polymorphism testing of *Melanocortin Receptor 1* gene and mechanism of *Melanocortin Receptor 1* in pigs are discussed in the paper. The further research about the gene is also suggested.

Key words pig; coat colour; *melanocortin receptor 1* gene

猪的毛色类型很多, 主要由黑色素的种类和分布不同造成^[1]。黑色素有两种: 一种是“褐黑色素 (phaeomelanin), 为溶于碱的圆形红色颗粒, 表现黄和红毛色; 另一种是“真黑色素 (eumelanin), 包括黑色和褐色两种色素类型, 比褐黑色素难以溶解, 表现褐和黑毛色^[2,3]。小鼠、牛、马、狐、鸡、猪等动物中, 两种色素的合成数量及分布受控于“扩展位点 (Extension)”和“野灰色位点 (Agouti)”^[3], 而“野灰色位点”仅作用于毛囊周围, 从时、空上调控真黑色素的合成, 为旁分泌因子^[4]。小鼠、牛、马、狐、鸡、猪等动物中已证实: 毛色扩展位点 E 编码黑素皮质激素受体 1 (*Melanocortin Receptor 1*, *MC1R*) 对应不同的毛色与羽色。猪 *MC1R* 基因已定位于 6 号染色体短臂末端, 运用 PCR-RFLP 分析技术, 已测出猪 *MC1R* 基因存在 4 个等位基因, 对应 5 个 E 等位基因。

1 *MC1R* 基因对毛色决定作用的提出

黑素皮质激素受体存在多种形式。它们在黑色素细胞、肾上腺皮质细胞、神经系统和免疫系统中呈现出不同的药理学特性。各国学者们将存在于黑色素细胞中的黑素皮质激

素受体称为“黑素皮质激素受体 1 (*MC1R*)”, 又称为“促黑素细胞激素受体 (*MSH-R*)”。Robbins 等人在小鼠的研究中, 测定了 E 座位上携带不同等位基因的小鼠的 *MSH-R* 基因, 发现在基因型与表型特征上该基因序列与所编码受体的药理学特性与 E 座位保持一致, 从而证实了 E 座位编码 *MSH-R* 并指出隐性黄 (*e*) 鼠因该基因第 4 至 5 跨膜功能域处 (第 549 个核苷酸位置) 有一移码突变, 产生非功能性 *MSH-R* 受体所致; 浅黑色 (*E^{SO-3J}*) 鼠在第二功能域处 (第 274 个核苷酸位置) 有一点突变, 产生组成型活性受体; 烟色 (*E^{TOB}*) 鼠该基因在第一环处 (第 206 个核苷酸位置) 有一点突变, 产生过度活性受体^[4]。栗色马的 *MC1R* 基因在第 83 个密码子处 (第 2 跨膜功能域内) 发生错义突变 (missense mutation), 苯丙氨酸替换丝氨酸^[5]。Takeuchi 等人检测了鸡中 E 基因的变异与黑素皮质激素受体 1 结构、功能的变化关系, 发现黑素皮质激素受体 1 由 E 基因编码, 决定不同的羽色^[6]。牛中也测试了不同 E 等位基因对毛色的决定作用^[7]。

由于多数哺乳动物中 E 位点的同源性, Kijas 等人^[3]采

用 PCR-RFLP、PCR-SSCP 及克隆、测序等手段,进一步分析了猪中 *MC1R* 基因(*MC1R* 位点与 *E* 位点无重组, $Z = 10.2$, $\beta = 0.00$)对毛色的决定作用,在 7 个猪品种中共发现 *E* 座位有 5 个等位基因,分别对应不同的毛色表型。其中 *MC1R**1 等同于 E^+ , 对应于野生型毛色(成年猪毛色为深灰褐色,四或五月龄的小猪略带红颜色,体侧有乳白色纵条纹^[2]); *MC1R**2 等同于 E^{D1} , 对应于欧洲大黑猪、中国梅山猪的黑毛表型;*MC1R**3 等同于 E^{D2} 和 E^P , 对应于汉普夏(E^{D2}) 大约克(E^P)皮特兰(E^P)的黑毛及花斑表型;*MC1R**4 等同于 e , 对应于杜洛克的红棕色表型^[3]。此后, Ciobanu 等人检测了罗马尼亚的稀有品种红色的曼格利察猪 *E* 位点的基因型为 E^+/E^P , 而红色杜洛克的基因型却为 e/e , 这就为品种的起源、趋异研究提供了参考依据^[8]。

2 猪 *MC1R* 基因的突变与表型

小鼠、鸡、牛、马等动物中 *MC1R* 位点的突变与表型的关系已先于猪报道。猪中该基因由 948bp 的单一外显子构成。Kijas 等人于 1998 年克隆并测序了 7 个品种(欧洲野猪、欧洲大黑猪、梅山猪、汉普夏、大白、皮特兰、杜洛克)中该基因的 758bp 片段^[3]。*MC1R* 基因在哺乳动物中共编码 7 个转运膜功能域,此基因的突变扰乱了这些功能域的正常作用。隐性红毛色(e , *MC1R**4)序列与野生型(E^+ , *MC1R**1)序列相比,发生两处错义突变:A161V(第 161 个密码子处,发生缬氨酸替换丙氨酸),A240T(第 240 个密码子处,苏氨酸替换丙氨酸)。其中 A240T 处的突变发生在高度保守的(已测试的六种哺乳动物中,此处都保守)跨膜功能域(TM)₆处,使之成为对应隐性红毛色的强候选突变。A240T 的突变可能改变了跨膜功能域结合袋处的 α -螺旋结构。梅山和欧洲大黑猪的黑毛色基因(*ED1*, *MC1R**2)序列发生两处同义突变和两处非同义突变。非同义突变为 L99F(第 99 个密码子处,发生脯氨酸替换亮氨酸的突变),N92M(第 92 个密码子处,甲硫氨酸替换缬氨酸,此处突变作用还不清楚),其中 L99P 导致受体的组成型活性,对促黑素细胞激素不具有敏感性,在黑素细胞中广泛表达。汉普夏(E^{D2} , *MC1R**3),大白、皮特兰(E^P , *MC1R**3)三品种在已检测的 758bp 的片段中,序列一致,与 E^+ 比较,存在一个错义突变:D121N(第 121 个密码子处,天冬酰胺替换天冬氨酸),该突变位于 TM₃ 处,扰乱了此结构域内的分子内氢键^[3](图 1)。

3 猪 *MC1R* 基因的定位与多态检测

Andersson 及 Johansson 研究组建起由 2 头野公猪与 8 头瑞典大白母猪杂交得到 4 头 F₁ 公猪、22 头 F₁ 母猪以及 200 头 F₂ 母猪组成的家系,并测定了括毛色、生长、胴体、肉质、免疫等性状在内的多个表型性状^[9]。Mariani 等人用此家系构建了猪的 6 号染色体的连锁图谱。经连锁与比较图谱分析,将毛色扩展座位 *E* 定位在 6 号染色体的短臂末端,靠近端粒区^[10]。*E* 位点与微卫星 S0035 ($Z = 39.6$, $\beta = 0.03$), S0497 ($Z = 38.5$, $\beta = 0.02$) 紧密连锁, Kijas 等人用荧光原位杂交

(FISH)检测细菌人工染色体克隆(BAC clone)978E4,明确显示 *MC1R* 位点的确位于 6 号染色体的短臂末端。

在已测序的 7 个不同品种猪中,已知产生两处限制性酶切位点的多态。大黑猪、梅山猪、杜洛克因突变,无限制性内切酶 *AccII* 的酶切位点,只产生所扩增的一个完整 405bp 片段(由一对引物扩增);野猪、汉普夏、大白猪、皮特兰在该处无突变,有一处 *AccII* 酶切位点,产生 222bp、183bp 两个片段。野猪、大黑猪、梅山猪、杜洛克等品种在限制性内切酶 *BspHI* 酶切位点处无突变,没有 *BspHI* 的酶切位点,电泳只可见所扩增的 428bp(由另一对引物扩增)的一条带;汉普夏、大白猪、皮特兰因突变产生一个 *BspHI* 酶切位点,电泳可观察到 256bp、172bp 的两条带。

4 *MC1R* 作用的生化机制

Mountjoy 等人体外扩增了两个编码 G 蛋白耦合受体的亚克隆,经 Northern 印迹杂交分析,这两个克隆只在黑色素细胞和肾上腺皮质中表达。以这两个亚克隆进一步扫描鼠的 cDNA 文库及人的基因组文库,发现它们即为编码 *MSH-R* 和 *ACTH-R* (促肾上腺皮质激素受体)的基因。从而证实了 *MC1R* 为 G 蛋白耦合受体家族成员,并且由于在胞间功能域处,抗黑素肾上腺皮质激素受体有一短-NH₂ 末端,胞内功能域处有一短的-COOH 端,第四、五转运膜功能域过短,第二个胞间环(loop)过小,而将其归为最小的 G 蛋白耦合受体^[11]。

促黑素细胞激素(MSH)为多肽类激素,它对物质的作用遵循第二信使(cAMP)学说。激素为第一信使,它与靶细胞膜上具有立体构型的专一性受体结合,使 G 蛋白由无活性的二磷酸鸟苷(GDP)型转变为有活性的三磷酸鸟苷(GTP)型,激活膜上的腺苷酸环化酶系统,在镁离子存在的条件下,三磷酸腺苷(ATP)转变为环腺苷酸(cAMP),cAMP 即为第二信使,信息由第一信使传给第二信使,cAMP 使无活性的蛋白激酶转为有活性型,从而激活磷酸化酶,引起靶细胞的固有反应。

当促黑素细胞激素与膜上的受体结合时,激活膜上的 cAMP 酶系统,产生 cAMP,进一步激活酪氨酸激酶,活化在粗面型内质网及游离核糖体上合成的酪氨酸酶,催化黑素细胞从血液中摄取的酪氨酸,经高尔基复合体变成多巴^[12],多巴在黑色素小体内积聚到一定的量后,释放出黑色素。如果黑素细胞中的酪氨酸酶过少,酪氨酸则经多巴和多巴醌,转化为半胱氨酰多巴,导致褐黑色素的广泛表达。反之,过量的多巴及多巴醌将通过各自的通道合成多巴铬的衍生物——真黑色素。动物中即呈现出不同的毛色或羽色。(图 2)

Tamate 等人对小鼠的 *E* 位点研究表明,黑素细胞中该基因在 cAMP 的上游起作用,这一结果与促黑素细胞受体的作用机制一致。双丁酰环腺苷酸、a-MSH 对隐性黄鼠(e/e)和致死黄鼠(由野灰色位点决定, A^Y/a)鼠的试验结论为:双丁酰环腺苷酸能诱导隐性黄鼠(e/e)中黑素细胞内真黑色素的合成,而 a-MSH 却不能,两种物质都能诱导致死黄鼠中真黑色素的合成^[13]。这也与 *e* 位点编码非功能性促黑素细胞受体的结论一致。

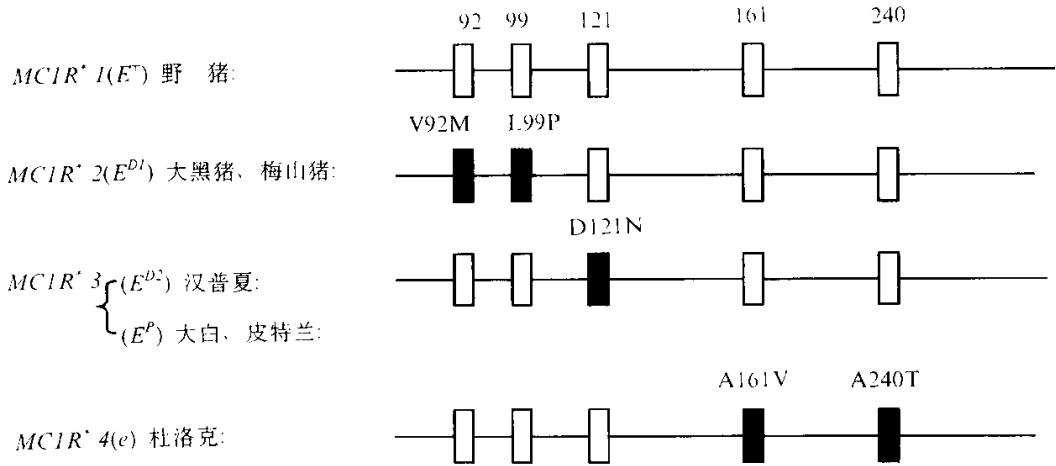


图 1 7 品种猪 MC1R 基因的突变位置

V92M :第 92 个密码子处 甲硫氨酸替换缬氨酸 ;I99P :第 99 个密码子处 脯氨酸替换亮氨酸 ;
 D121N :第 121 个密码子处 天冬酰胺替换天冬氨酸 ;A161V :第 161 个密码子处 缬氨酸替换丙氨酸 ;
 A240T :第 240 个密码子处 苏氨酸替换丙氨酸 ;
 ■—发生突变的密码子 □—没有突变的密码子。

Fig.1 Mutation sites of MC1R gene in seven pig breeds

V92M :Met replace val at the 92th codon ;I99P :Pro replace Leu at the 99th codon ;
 D121N :Asn replace Asp at the 121st codon ;A161V :Val replace Ala at the 161st codon ;A240T :Thr replace Ala at the 240th codon ;
 ■—mutation codon □—normal codon.

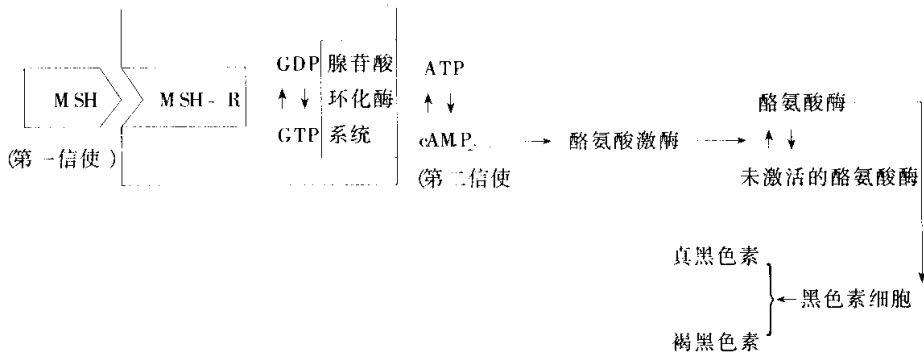


图 2 黑素皮质激素受体 1 作用机制

Fig.2 The mechanism of MC1R and its ligand

5 猪 MC1R 位点的研究展望

猪的 *MC1R* 基因已定位 ,并且已建立起 PCR - RFLP 技术检测不同猪种等位基因的多态。但该基因的突变对受体与配体结合机制的改变还未见报道 ,这方面的进一步研究 ,将有助于我们对此受体决定毛色的理性认识。

不同品种猪的基因型很可能有多种等位基因的组合方式 ,*E*⁺/*E*^P 的罗马尼亚红色曼格利察猪及 *E*^{D1}/*E*^P 的黑色白环带 Bazna 猪就是一例。

汉普夏 (*E*^{D2}) 与大白 (*E*^P)、皮特兰 (*E*^P) 均发生 D121N 突变 ,而它们却对应不同的表型 ,这就提示我们 ,点性状有可能由检测片段 (758bp) 以外的调节突变所致 ,或者由另一紧密

连锁的位点突变引起。*MC1R* 基因侧翼序列的分析将有助于解决这一问题。红色曼格利察猪 (*E*⁺/*E*^P) 与杜洛克 (*e/e*) 表型一致 ,但基因型却不同 ,也促使我们开展对毛色基因的进一步研究。

随着不同品种猪毛色研究的广泛开展 ,*MC1R* 位点的全面检测也将为猪品种资源的保存与利用提供参考。

参考文献 (References) :

[1] 陈清明 ,王连纯主编 . 现代养猪生产 [M] .北京 :中国农业大学出版社 ,1997.
 [2] I. 约翰森 ,J. 伦德尔著 . 遗传学与家畜育种学 [M] .上海 :上海科技出版社 ,1982.

- [3] Kijas J M H , *et al.* Melanocortin Receptor 1 (MCIR) Mutation and Coat Color in Pigs , *Genetics* , 1998 , 150 : 1177 ~ 1185.
- [4] Linda S. Robbins *et al.* Pigmentation Phenotypes of Variant Extension Locus Alleles Result from Point Mutations That Alter MSH Receptor Function [J]. *Cell* , 1993 , 72 : 827 ~ 834.
- [5] Marklund L , *et al.* A Missense Mutation in the Gene for Melanocyte-stimulating Hormone Receptor (MCIR) Is Associated with the Chestnut Coat Color in Horses [J]. *Mammalian Genome* , 1996 , 7 : 895 ~ 899.
- [6] Sakae Takeuchi , *et al.* A possible involvement of melanocortin 1 - receptor in regulating feather color pigmentation in the chicken [J]. *Biochimica et Biophysica Acta* , 1996 , 1308 : 164 ~ 168.
- [7] Adalsteinsson S , *et al.* Brown Coat Color in Icelandic Cattle Produced by the Loci Extension and Agouti [J]. *The Journal of Heredity* , 1995 , 86 (5) : 395 ~ 398.
- [8] Ciobanu D C , *et al.* Genetic Variation of Two Local Romanian Pig Breeds Assessed Using DNA Markers [A]. 50th Annual Meeting of the EAAH [C]. Zurich , August 22 ~ 26 , 1999.
- [9] Andersson L , *et al.* The Use of a Wild Pig \times Domestic Pig Intercross to Map Phenotypic Trait Loci [J]. *Journal of Heredity* , 1997 , 88 : 380 ~ 383.
- [10] Mariani P , *et al.* The Extension Coat Color Locus and the Loci for Blood Group O and Tyrosine Aminotransferase Are on Pig Chromosome 6 [J]. *Journal of Heredity* , 1996 , 87 : 272 ~ 276.
- [11] Kathleen G Mountjoy , *et al.* The Cloning of a Family of Genes That Encode the Melanocortin Receptor [J]. *Science* , 1992 , 257 : 1248 ~ 1251.
- [12] 黄奕生主编. 畜禽组织学与胚胎学 [M]. 成都 : 成都科技大学出版社 , 1990.
- [13] Hidetoshi B , *et al.* Action of the e Locus of Mice in the Response of Phaeomelanin Hair Follicles to α - Melanocyte - Stimulating Hormone *in vitro* [J]. *Science* , 1984 , 224 : 1241 ~ 1242.