

県内繁殖雌牛群の遺伝的特性および遺伝子マーカーの探索

新楽和孝、野澤久夫、櫻井由美、白井幸路、
福井えみ子¹⁾、松本浩道¹⁾、吉澤緑¹⁾

1)宇都宮大学農学部

要 約

当該及び県内農家で飼養される繁殖雌牛における成長ホルモン (GH) 遺伝子、脂肪酸不飽和化酵素 (SCD) 遺伝子及び脂肪酸合成酵素 (FASN) 遺伝子の遺伝子型出現頻度を調査するとともに、枝肉育種価を遺伝子型間で比較し、本県におけるこれらの遺伝子の遺伝子マーカーとしての有用性を検討した。

- 1) GH 遺伝子は LV 型、SCD 遺伝子は AV 型の出現頻度が高かった。
- 2) FASN 遺伝子は AR/AR 型の出現頻度が他の遺伝子型に比べて低く、本県においては FASN 遺伝子による改良の余地は少ないと考えられた。
- 3) GH 遺伝子が LL、LV 型の牛は、W 型の牛より枝肉重量、ロース芯面積の育種価が有意に高く、GH 遺伝子を用いることで効率的にこれらの枝肉形質を改良できると考えられた。
- 4) SCD 及び FASN 遺伝子については、遺伝子型の違いによる枝肉育種価への影響は認められなかったことから、これらの遺伝子を用いて牛肉中の脂肪酸組成の改良を図る際には、枝肉形質への影響を考慮する必要が無いと考えられた。

目 的

黒毛和種における枝肉重量、脂肪交雑等の枝肉形質に関する育種価は、(公社) 全国和牛登録協会による育種価評価事業が始まった 1990 年代以降、着実に向上してきた¹⁾。しかし、従来から用いられているアニマルモデル BLUP 法による育種価の推定には、後代の枝肉成績が必要であるため、数年の期間を要してしまうという課題がある。また、最近では肉眼的な肉質評価に加え、牛肉の食味に影響するとされる脂肪酸組成等^{2)~4)}の化学的な肉質評価を取り入れることで、ブランド化を図っている地域もある。しかし、牛肉中の脂肪酸組成等の育種価の推定は一般的には実施されおらず、遺伝的な改良を加えるための指標が無い状況である。

近年、牛の遺伝子研究の進展に伴い、牛の経済形質を左右する種々の遺伝子マーカーが報告されている。成長ホルモン (GH) 遺伝子の翻訳領域にはアミノ酸の置換 (ロイシン (L)/バリン (V)) を伴う塩基置換が存在し、この置換が枝肉成績に影響することが報告されている⁵⁾。また、脂肪酸不飽和化酵素 (SCD) 遺伝子にもアミノ酸置換 (アラニン (A) /バリン (V)) を伴う塩基置換が存在し、この置換は脂肪組織中の脂肪酸組成に影響することが報告されている⁶⁾。更に、脂肪酸合成酵素 (FASN) 遺伝子には、2つのアミノ酸置換 (スレオニンとトリプトファン (TW) /アラニンとアルギニン (AR)) を引き起こす連鎖する 2つの塩基置換が存在し、これらの置換も脂肪組織中の脂

肪酸組成に影響することが報告されている⁷⁾。こうした遺伝子の多型を活用した牛の能力評価においては、後代の枝肉成績等が必要とされないので早期に判定可能であることから、育種価の欠点を補う手法として期待される。また、牛肉の脂肪酸組成のように、育種価の推定が行われていない形質についても、それらに影響する多型が存在する遺伝子領域を遺伝子マーカーとして選抜、交配の指標に利用することで、効率的に改良できる可能性がある。

そこで、当該及び県内農家で飼養されている繁殖雌牛を対象に、GH、SCD、FASN 遺伝子の遺伝子型を解析し、本県の繁殖雌牛牛群の遺伝的特性を調査した。また、これらの遺伝子について、遺伝子型と枝肉育種価との関係を調査し、本県における遺伝子マーカーとしての有用性を検討した。

材料及び方法

1 DNA 抽出

当該及び県内農家で飼養されている黒毛和種繁殖雌牛 98 頭から、血液または毛根を採取し、血液からは DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen)、毛根からは ISOHAIR (Nippon Gene) を用いて DNA を抽出した。DNA 抽出後、分光光度計で DNA 濃度を測定した。

2 遺伝子型の判定

PCR-RFLP 法により GH、SCD、FASN 遺伝子の多型解析を行った。

(1) PCR 法

千国ら⁸⁾の報告に基づき、GH 遺伝子第 5 エクソン上の第 2141 番目の塩基を含む領域を PCR により増幅した。PCR 反応液の容量は 20 μ l とし、10 \times PCR Buffer を 2 μ l 添加したうえで最終濃度が dNTP Mixture 200 μ M、プライマー (表 1) 各 2 μ M、Taq Polymerase 1U/20 μ l、鋳型 DNA 100ng/20 μ l となるように調整した。PCR の反応条件は、93 $^{\circ}$ C で 2 分反応後、93 $^{\circ}$ C で 60 秒、60 $^{\circ}$ C で 60 秒、72 $^{\circ}$ C で 60 秒を 1 サイクルとして 35 サイクル繰り返した。

SCD 遺伝子については、Taniguchi ら⁶⁾の報告に基づき、第 5 エクソン上の第 878 番目の塩基を含む領域を増幅した。PCR 反応液の容量は 20 μ l とし、10 \times PCR Buffer を 2 μ l 添加したうえで、最終濃度が dNTP Mixture 200 μ M、プライマー (表 1) 各 0.5 μ M、Taq Polymerase 1U/20 μ l、鋳型 DNA 20ng/20 μ l となるように調整した。PCR の反応条件は、94 $^{\circ}$ C で 2 分反応後、94 $^{\circ}$ C で 30 秒、65 $^{\circ}$ C で 30 秒、72 $^{\circ}$ C で 1 分を 1 サイクルとして 30 サイクル繰り返し、最後に 72 $^{\circ}$ C で 7 分とした。

FASN 遺伝子については、Abe ら⁷⁾の報告に基づき、第 34 エクソン上の第 16024 番目と第 16039 番目の塩基を含む領域を増幅した。PCR 反応液は PCR 反応液の容量は 20 μ l とし、10 \times PCR Buffer を 2 μ l 添加したうえで、最終濃度が dNTP Mixture 200 μ M、プライマー (表 1) 各 0.5 μ M、Taq Polymerase 1U/20 μ l、鋳型 DNA 20ng/20 μ l となるように調整した。PCR の反応条件は 94 $^{\circ}$ C で 5 分反応後、94 $^{\circ}$ C で 30 秒、60 $^{\circ}$ C で 30 秒、72 $^{\circ}$ C で 30 秒を 1 サイクルとして 30 サイクル繰り返し、最後に 72 $^{\circ}$ C で 7 分とした。

表 1 PCR に用いたプライマーの配列

遺伝子	プライマーの配列 (5'-3')
GH	TATGAGAAGCTGAAGGACCTGGAGGAA
	AGAATAGAATGACACCTACTCAGACAAT
SCD	ATGTATGGATACCGCCCTTATGAC
	TTCTGGCAGCTAACCTAATACCTAAGC
FASN	CTACCAAGCCAGGCAGGTC
	GCCATTGTAAGTGGGCTTGT

(2) RFLP 法

各遺伝子の PCR 産物を用い、RFLP 法により遺伝子型の判定を行った。制限酵素として GH 遺伝子には AluI を、SCD 遺伝子には Fnu4HI を、FASN 遺伝子には NciI 及び HhaI を用いた。各 PCR 産物 10 μ l に対し 2.0unit の制限酵素を添加し、37 $^{\circ}$ C で 4 時間の酵素処理を行った。

酵素処理後、エチジウムブロマイドを添加した 2%アガ

ロースゲル上において、100V で約 30 分電気泳動し、紫外線照射下で PCR 産物の切断パターンを観察した。

3 調査項目

供試牛における GH、SCD、FASN 遺伝子の遺伝子型出現頻度を調査した。

また、供試牛のうち、枝肉重量、胸最長筋面積、バラ厚、皮下脂肪厚、歩留り、脂肪交雑の県内における推定育種価が判明している牛について、遺伝子型と育種価の関係を分析した。

結果及び考察

1 遺伝子型出現頻度

当场及び県内農家で飼養されている繁殖雌牛の遺伝子型を調査したところ、GH 遺伝子 (n=96) の各遺伝子型の出現頻度は、LL 型が 5 頭 (5.1%)、LV 型が 66 頭 (67.3%)、VV 型が 27 頭 (27.6%) と、LV 型が他の遺伝子型に比べて多かった (表 2)。黒毛和種においては、ロイシンとバリンのアミノ酸置換の他に、スレオニン (T) とメチオニン (M) のアミノ酸置換を伴う塩基置換が存在することも明らかにされており⁹⁾、これらの塩基置換の組み合わせにより GH 遺伝子の対立遺伝子を A (127L/172T) 型、B (127V/172T) 型、C (127V/172M) 型の 3 タイプの分類について報告されている。この分類方法を用いた鳥取県有種雄牛を対象とした調査では、AA 型の出現頻度が高いと報告されている¹⁰⁾。逆に、兵庫県の但馬系種雄牛¹¹⁾、岐阜県有種雄牛¹²⁾、島根県有種雄牛¹³⁾を対象とした調査では、いずれも BB 型、BC 型及び CC 型の遺伝子型の出現頻度が高い結果となっている。このように、GH 遺伝子の遺伝子型出現頻度は地域によって偏りがある。これは、地域ごとに閉鎖的な育種が行われてきたためと考えられる。一方、本県は県有種雄牛を保有せず、様々な地域に由来する種雄牛の精液を用いて交配が重ねられてきた経緯があり、このことが、本調査においてヘテロ (LV 型) の出現頻度が高かった要因として考えられた。

SCD 遺伝子 (n=96) においても、本調査では AA 型が 27 頭 (27.6%)、AV 型が 53 頭 (54.1%)、VV 型が 18 頭 (18.4%) と、ヘテロ (AV 型) の出現頻度が高かった (表 3)。SCD 遺伝子の遺伝子型出現頻度も地域によって偏りがあるとされていることから⁶⁾、本調査でヘテロの出現頻度が高かったことも、GH 遺伝子の場合と同様に、様々な地域に由来する種雄牛の精液を用いて交配が重ねられてきたことによるものと考えられた。

本調査における FASN 遺伝子の各遺伝子型 (n=65) の出現頻度は、TW/TW 型が 28 頭 (43.1%)、TW/AR 型が 31 頭 (47.7%) に対し、AR/AR 型が 6 頭 (9.2%) と顕著に低かった (表 4)。黒毛和種肥育牛における FASN 遺伝子の遺伝子型を調査した松橋ら¹⁴⁾の報告においても、TW/TW、

TW/AR型に対し、AR/AR型の出現頻度が極めて低い結果となっている。また、Abeら⁷⁾はFASN遺伝子について品種間の比較を行っており、TW対立遺伝子の頻度はホルスタイン種、アンガス種、ヘレフォード種に比べ、黒毛和種ではAR/AR型の出現頻度が高いと報告している。本調査におけるTW型の対立遺伝子頻度も0.669と、Abeらの報告に近い値であることから、TW対立遺伝子頻度が高いことは黒毛和種に共通した特徴であり、FASN遺伝子を活用した改良の余地は、SCD遺伝子を用いる場合に比べて少ないと推察された。

表2 GH遺伝子の遺伝子型出現頻度

遺伝子型	頭数 (頭)	割合 (%)
LL型	5	5.1
LV型	66	67.3
W型	27	27.6
合計	98	100.0

表3 SCD遺伝子の遺伝子型出現頻度

遺伝子型	頭数 (頭)	割合 (%)
AA型	27	27.6
AV型	53	54.1
V型	18	18.4
合計	98	100.0

表4 FASN遺伝子の遺伝子型出現頻度

遺伝子型	頭数 (頭)	割合 (%)
TW/TW型	28	43.1
TW/AR型	31	47.7
AR/AR型	6	9.2
合計	65	100.0

表5 GH遺伝子と枝肉育種価の関係

遺伝子型	枝肉重量 (kg)	ロース芯面積		皮下脂肪厚		脂肪交雑	n
		(cm ²)	バラ厚 (cm)	(cm)	歩留		
LL	46.9±5.3a	9.3±2.1a	0.5±0.1	0.5±0.2a	0.6±0.2	1.2±0.3	5
LV	24.5±4.0a	6.9±0.5a	0.4±0.0	-0.1±0.1b	1.0±0.1	1.3±0.1	41
VV	-13.9±11.4b	4.5±1.0b	0.0±0.1	-0.3±0.1b	1.1±0.1	1.2±0.1	11

同列異符号間で有意差 (p<0.05)

2 GH、SCD、FASN遺伝子と枝肉育種価との関係

調査対象牛のうち、県内における枝肉育種価が判明している牛を用い、GH、SCD、FASN遺伝子の遺伝子型の違いが枝肉育種価に与える影響を調査した。

GH遺伝子については、枝肉重量、ロース芯面積の育種価においてLL、LV型の牛がVV型の牛より有意に高く、皮下脂肪厚の育種価においてLL型の牛が他の遺伝子型の牛より有意に高かった(表5)。この結果はGH遺伝子と枝肉重量¹⁵⁾、ロース芯面積^{16)、17)}、皮下脂肪厚¹⁷⁾との関係を指摘した過去の報告を支持するものである。これらのことから、L対立遺伝子は枝肉重量とロース芯面積の育種価に良い影響をもたらすが、皮下脂肪厚の育種価には好ましくない影響をもたらすものと推察された。従って、GH遺伝子によって枝肉重量、ロース芯面積の増加を図る場合、皮下脂肪厚の増加が問題として残る可能性がある。しかし、一つの経済形質に関与する遺伝子は複数存在すると考えられることから、今後、GH遺伝子以外に皮下脂肪厚に関与する新たな遺伝子マーカーが発見されれば、それを組み合わせて活用することで、この問題は解決することができると考えられる。一方、本調査では遺伝子型間で脂肪交雑の育種価に有意な差は認められなかった。GH遺伝子については、遺伝子型と脂肪交雑との関連を指摘する報告もある^{17)、18)}が、それらの多くはA、B及びC型の3つの対立遺伝子を用いて遺伝子型を判定している。本調査では、L、V型の2つの対立遺伝子で遺伝子型を判定しており、このことが既報と異なる結果となった要因のひとつと推察された。

SCD及びFASN遺伝子については、いずれの枝肉育種価においても、遺伝子型間に有意差は認められなかった(表6、7)。これらの遺伝子は、脂肪組織中の不飽和脂肪酸割合に影響することが報告されている^{6)、7)}ものの、枝肉成績との関連を調査した報告は少ない。本調査においては、SCD遺伝子、FASN遺伝子とも遺伝子型の違いによる枝肉育種価への影響は認められなかった。このことから、SCD、FASN遺伝子を用いることで、他の枝肉形質への影響を考慮することなく、脂肪酸組成のみを個別に改良できると考えられた。

表6 SCD 遺伝子と枝肉育種価の関係

遺伝子型	枝肉重量(kg)	ロース芯面積 (cm ²)	バラ厚 (cm)	皮下脂肪厚 (cm)	歩留	脂肪交雑	n
AA	10.3±12.7	4.9±0.8	0.3±0.1	-0.2±0.1	0.9±0.1	1.2±0.1	11
AV	16.9±5.9	6.9±0.6	0.3±0.1	-0.1±0.1	1.1±0.1	1.3±0.1	28
VV	24.0±9.1	6.4±1.5	0.3±0.1	0.0±0.1	0.8±0.2	1.1±0.1	10

表7 FASN 遺伝子と枝肉育種価の関係

遺伝子型	枝肉重量(kg)	ロース芯面積 (cm ²)	バラ厚 (cm)	皮下脂肪厚 (cm)	歩留	脂肪交雑	n
TW/TW	21.6±12.5	6.0±1.2	0.4±0.1	-0.1±0.1	0.9±0.1	1.2±0.1	12
TW/AR	22.1 ±5.6	7.5±0.8	0.4±0.1	0.1±0.1	1.0±0.1	1.4±0.1	19
AR/AR	34.6±8.3	7.1±1.2	0.4±0.2	-0.3±0.2	1.1±0.1	1.2±0.2	3

参考文献

- 1) (独) 家畜改良センター, 全国域での種雄牛及び繁殖雌牛の遺伝的能力の推移について, 2013.
- 2) Mandell IB, Buchanan JG, Campbell CP(1998). Effect of forage vs grain feeding on carcass characteristics, fatty acid composition, and beef quality in Limusin-Cross steers when time on feed is controlled. Journal of Animal Science. 76: 2619-2630.
- 3) Melton SL, Amiri M, Davis GW, Vackus WR(1982). Flavor and chemical characteristics of ground beef from grass-, forage-, grain- and grain-finished steers. Journal of Animal Science. 55:77-87
- 4) Westerling and DB, Hedrick HB(1979). Fatty acid composition of bovine lipids as influenced by diet, sex, and anatomical location and relationship to sensory characteristics. Journal of Animal Science. 48:1343-1348.
- 5) Schlee P, Graml R, Rottmann O, Pirchner F (1994) .Influence of growth-hormone genotypes on breeding values of Simmental bulls. J Anim Breed Genet.111:253-256.
- 6) Taniguchi M, Utsugi T, Oyama K, Mannen H, Kobayashi M, Tanabe Y, Ogino A, Tsuji S (2004). Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. Mammalian Genome. 14:142-148.
- 7) Abe T, Saburi J, Hasebe H, Nakagawa T, Misumi S, Nade T, Nakajima H, Shoji N, Kobayashi M, Kobayashi E(2009). Novel mutation of the FASN gene and their effect on fatty acid composition in Japanese black beef. Biochemical Genetics. 47:397-411.
- 8) 千国幸一, 寺田文典, 陰山聡一, 小石川常吉, 加藤貞雄, 小堤恭平(1991). PCR法を用いた牛成長ホルモン遺伝子127番アミノ酸部位塩基配列の多型検出. 日本畜産学会報. 62 (7) :660-666.
- 9) 千国幸一, 長妻常人, 田畑利幸, 門間美千子, 斎藤昌義, 小沢忍, 小堤恭平(1994). 和牛において見出された成長ホルモン遺伝子の多型. 日本畜産学会報. 65 (4) :340-346.
- 10) 塩崎達也, 西谷公志, 高取等(2004). 鳥取和牛における牛成長ホルモン遺伝子多型と産肉特性について. 鳥取県畜産試験場研究報告. 30:23-28.
- 11) 岡章生, 龍田健, 岩本英治 (2005) . 但馬牛種雄牛の成長ホルモン遺伝子多型と枝肉形質育種価の関係. 兵庫県立農林水産技術総合センター研究報告 (畜産) . 41:6-9.

- 12) 小林直人, 傍島英雄, 松橋珠子, 星野洋一郎, 林登, 酒井謙司, 山田英信(2007). 黒毛和種雄牛のウシ成長ホルモン遺伝子多型が子牛市場体重の母性遺伝効果・直接遺伝効果の推定育種価に及ぼす影響. 動物遺伝育種研究. 35:235.
- 13) 安田康明, 遠藤治, 森脇秀俊, 板垣勝正(2000). 島根県における牛成長ホルモン遺伝子の多型について. 島根県畜産試験場研究報告. 33:17-19.
- 14) 松橋珠子, 丸山新, 小林直人, 阿部剛, 坂口慎一, 加藤勉(2009). 岐阜県の黒毛和種肥育牛における脂肪酸合成酵素の多型と胸最長筋内脂肪の脂肪酸組成との関連. 岐阜県畜産研究所研究報告. 9: 18-25.
- 15) 片岡博行, 馬場誠, 石川和人, 塚本章夫(2000). 岡山県の黒毛和種における牛成長ホルモン遺伝子の多型と産肉性. 岡山県総合畜産センター研究報告. 11:1-4.
- 16) 福本泰之, 千国幸一, 小澤忍, 細井栄嗣, 富田利恵, 永田好彦(1997). ウシ成長ホルモン遺伝子の多型が黒毛和種枝肉成績に及ぼす影響. 第90回日本畜産学会講演要旨. 2005.
- 17) 竹下浩伸, 安部亜津子, 錦織美智子, 安達章(2006). 黒毛和種肥育での成長能および産肉性に及ぼすウシ成長ホルモン遺伝子型の影響に関する解析技術の開発と体内動態解析. 島根県立畜産技術センター研究報告. 39:11-14.
- 18) 安部亜津子, 安田康明, 成相伸久, 長谷川清寿, 佐々木恵美, 高仁敏光(2004). 黒毛和種牛の成長ホルモン遺伝子多型が枝肉成績に及ぼす影響. 島根県畜産技術センター研究報告. 37:11-15.

Genetic features of Dams in Tochigi Prefecture and Search for Marker Genes

In order to examine whether growth hormone (GH), stearoyl-CoA desaturase (SCD) and fatty acid synthase (FASN) genes were useful as marker genes, we researched for these genotypic frequencies of dams at Tochigi Prefectural Livestock & Dairy Experimental Center Haga Branch and commercial farms in Tochigi prefecture, and compared breeding value among the genotypes.

- 1) Genotypic frequencies of LV and AV were highest among GH and SCD genotypes respectively.
- 2) Since the frequency of AR/AR among FASN genotypes was lowest, in Tochigi prefecture there is not expectation of much genetic improvement by the FASN gene.
- 3) In comparison breeding values for carcass traits among GH genotypes, breeding values for carcass weight and rib eye area of LL and LV Dams were higher than those of VV dams. This finding indicates that the GH gene is useful for improvement of carcass traits.
- 4) Since effects of SCD and FASN genotypes on carcass traits were not visible, by these genes it is possible to improve only fatty acid compositions, taking no notice of effects on carcass traits.