

高精度のDNAマーカーを利用した和牛育種に関する研究

藤森祐紀・笹沼清孝¹⁾・大川清充²⁾・木村安之・横内耕³⁾・杉本喜憲³⁾

Research on the Japanese black cattle breeding using a high precision DNA marker

Yuuki FUJIMORI, Kiyotaka SASANUMA, Kiyotaka OHKAWA, Yasuyuki KIMURA,
Kou YOKOUCHI, Yoshikazu SUGIMOTO

要 約

黒毛和種雄牛の経済形質の遺伝情報を探索し、種雄牛造成の一助とするため、(社)畜産技術協会附属動物遺伝研究所と共同で大規模家系解析を実施した。本県基幹種雄牛「明光4」の産子370頭について、220のマーカーでDNAの型判定を行い、連鎖解析を実施した結果、2番染色体と9番染色体から検出された脂肪交雑やロース芯面積の経済形質に関与する遺伝子が存在する染色体領域(Quantitative Trait Loci以下QTL)において、経済的にプラスになる効果を確認することができた。このことから2番染色体と9番染色体上に、経済形質に関与する遺伝子が存在することが示唆された。

キーワード：種雄牛、和牛、遺伝子、DNAマーカー、改良

緒 言

黒毛和種の育種改良は枝肉重量、ロース芯面積、脂肪交雑などの経済形質の改良を目的として行われ、統計遺伝学や集団遺伝学的手法により成果をあげてきた。さらに経済形質に関与している優良遺伝子が特定されれば、より効率的かつ正確度の高い育種改良を図ることが可能となる。近年、遺伝子解析技術の発展にともない、DNAマーカーの1つであるマイクロサテライトマーカーと経済形質との連鎖解析により、経済形質に関与する遺伝子が存在する染色体領域(Quantitative Trait Loci以下QTL)を同定する試みが各県で行われている(1,2,3)。そこで、本県においてもDNA情報を利用し、育種改良へ応用するため、県有種雄牛「明光4」とその産子を用いた大規模半きょうだい家系の連鎖解析を行い、枝肉重量、ロース芯面積及び脂肪交雑と連鎖する染色体領域の絞り込みを行うとともに、明らかになった「明光4」の遺伝子型とその産子の遺伝子型を照合し、「明光4」から優良遺伝子領域を受継いでいるか検証する。

材料および方法

「明光4」及び(株)茨城県中央食肉公社に出荷されたその産子肥育牛370頭(去勢260頭、雌110頭)からゲノムDNAを抽出すると共に、経済形質との連鎖解析のために産子の格付成績を収集した。

2 DNAの調整

凍結保存した腎周囲脂肪組織500mgにProteinase K (20mg/ul)10ul, 2% SDS 4ul, 1M DTT 16ul, 10× PCR Buffer 40ul, 蒸留水320ulを加え、45度で一晩加温した。その後、95度で10分間加熱処理後フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿を行い、DNAを抽出した。得られたDNAは吸光度を測定し20ng/ulに希釈調整した。

3 解析に用いるマイクロサテライトマーカーの選定

動物遺伝研究所から供与されたマイクロサテライトの蛍光標識プライマーの中から、10~30cM間隔に配置したマイクロサテライトマーカーを1次連鎖解析用として178個を選定した。さらに、2次連鎖解析用として42個のマイクロサテライトマーカーを追加選定した。

- 1) 茨城県県北農林事務所
- 2) 茨城県立農業大学校
- 3) (社)畜産技術協会附属動物遺伝研究所

4 産子の遺伝子型判定

1次連鎖解析における遺伝子型判定では「明光4」と同種雄牛産子285頭のDNAを178個のマイクロサテライトマーカーを用いて判定した。PCR反応を行い、DNAシーケンサー (ABI3700) により電気泳動し、得られた結果をGENSCANとGenotyperのDNA解析ソフトを用い遺伝子型判定を行った。2次連鎖解析は同種雄牛産子85頭のDNAと42個のマイクロサテライトマーカーを追加し、遺伝子型の判定を行った。

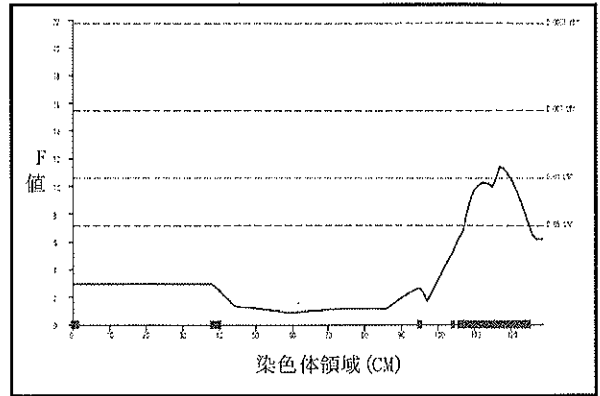


図1 2番染色体における連鎖解析結果

5 連鎖解析

産子370頭の枝肉重量, ロース芯面積, 脂肪交雑(BMS No.)と得られた遺伝子型との連鎖解析をQTL解析ソフトにより実施した。

結 果

1 1次連鎖解析結果

常染色体を対象とした1次連鎖解析で枝肉重量では3, 4, 12及び14番染色体上に, ロース芯面積では4, 9及び12番染色体上に, 脂肪交雑では1, 2及び6番染色体上に5%有意水準以下を示す領域を検出した。

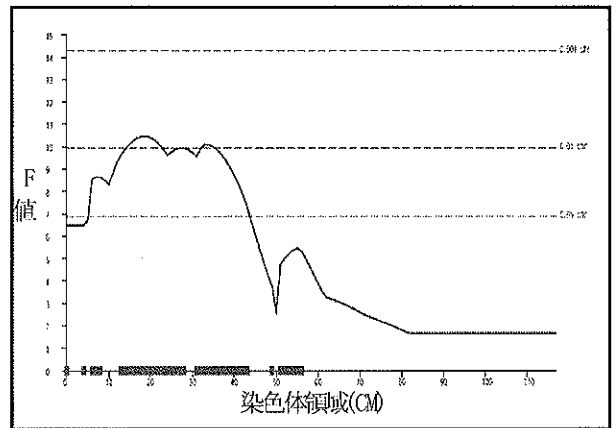


図2 9番染色体における連鎖解析結果

2 2次解析結果

1次連鎖解析の結果を元に1, 2, 3, 4, 9及び12番染色体上にマイクロサテライトマーカーを更に密に追加配置して1次連鎖解析と同様に2次解析を行った。2次連鎖解析により脂肪交雑では, 2番染色体上, ロース芯面積では, 9番染色体上に5%有意水準以下を示す領域を推定した。脂肪交雑における2番染色体の解析 (図1) では110cM~120cMの領域で最大F値11を示した。ロース芯面積における9番染色体の解析 (図2) では, 15cM~25cMの領域1及び30cM~40cMの領域2で最大F値10を示した。よって, これらの間に脂肪交雑やロース芯面積のQTLが存在することが示唆された。

次に脂肪交雑で最大F値を示した領域におけるマイクロサテライトマーカーを用いて, 遺伝子型の違いによるアレル効果 (平均値の差) を検証し, その結果を図3に示した。縦軸は頭数を, 横軸は脂肪交雑ナンバーを示した。脂肪交雑において優良遺伝子領域を受け継いだ息牛は133頭, 受け継いでない息牛は101頭であった。それぞれの脂肪交雑ナンバーの平均は 5.5 ± 5.5 , 4.6 ± 4.0 であり, T検定の結果, 有意差 ($P < 0.01$) が認められた。アレル効果は0.9と推測された。

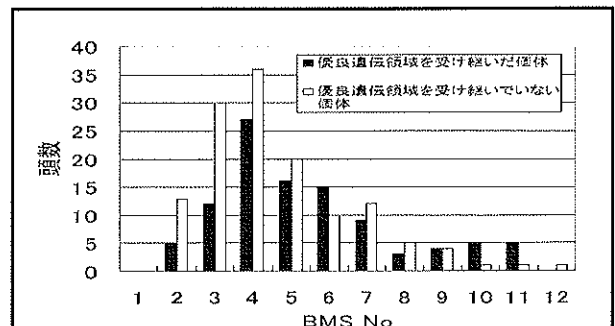


図3 脂肪交雑におけるヒストグラム

さらに、ロース芯面積で最大F値を示した領域におけるマイクロサテライトマーカーを用いて、遺伝子型の違いによるアリル効果を検証し、その結果を図4に示した。縦軸は頭数を、横軸はロース芯面積を示した。ロース芯面積領域1において優良遺伝子領域を受け継いだ息牛は96頭、受け継いでない息牛は122頭であった。それぞれの平均は 56.3 ± 8.2 , 53.9 ± 7.8 で cm^2 あり、T検定の結果、有意差($P < 0.01$)が認められた(図4)。アリル効果は 2.4cm^2 と推測された。

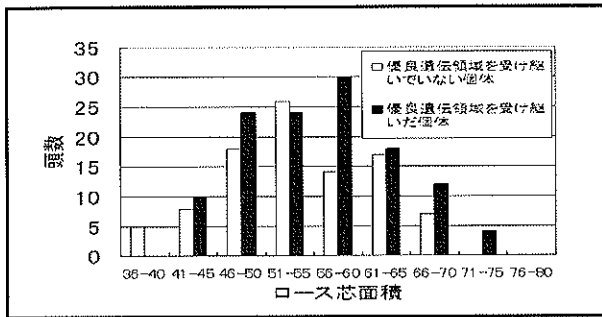


図4 ロース芯面積におけるヒストグラム(領域1)

ロース芯面積領域2において優良遺伝子領域を受け継いだ息牛は85頭、受け継いでない息牛は76頭であった。それぞれの平均は 57.8 ± 8.9 , 53.7 ± 7.3 で cm^2 あり、T検定の結果、有意差($P < 0.01$)が認められた(図5)。アリル効果は 4.1cm^2 と推測された。

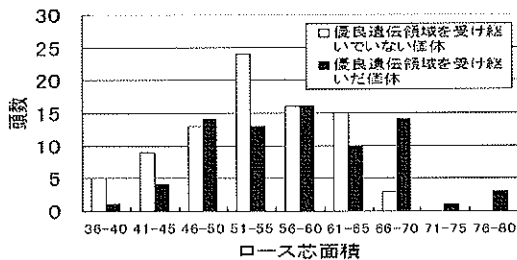


図5 ロース芯面積におけるヒストグラム(領域2)

また、ロース芯面積の2つの領域(領域1及び領域2)について、優良遺伝領域を両方受け継いだ個体と両方受け継いでいない個体と比較した。ロース芯面積領域1と2の両方を受け継いだ息牛は39頭、受け継いでない息牛は26頭であった。それぞれの平均は 61.3 ± 8.0 , 51.7 ± 6.2 cm^2 あり、T検定の結果、有意差($P < 0.01$)が認められた(図6)。アリル効果は 9.6cm^2 と推測された。

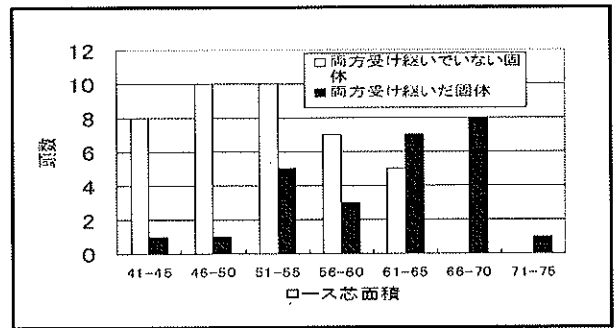


図6 ロース芯面積におけるヒストグラム

考 察

和牛の育種改良は能力検定や育種価に基づく選抜により進められている。しかし、育種価の高い牛から生産された牛が、経済形質における優良遺伝子を受け継いでいるか判定するには、後代の表現型判明まで待つ必要があり、優良後継牛の選抜には多くのコストと労力がかかる。一方、経済形質に關与する遺伝子を特定できれば、優良遺伝子の保有状況を明らかにできる。したがって、現在の育種価や表現型に基づく選抜体系にDNA情報を併用することにより早期かつ効率的に選抜することも可能になってくる。

今回は「明光4」の父方半きょうだい家系を対象にして、経済形質の中でも、枝肉重量、ロース芯面積及び脂肪交雑に注目してQTL解析を行った。黒毛和種における経済形質のQTL領域は、いくつか報告されているが(1,2,3)、今回推定した脂肪交雑とロース芯面積におけるQTL候補領域は、和牛における集団では新領域である可能性が示唆された。

さらに、2番染色体と9番染色体で検出された脂肪交雑やロース芯面積のQTLについて、5%有意水準以下を示す領域を推定することができ、脂肪交雑やロース芯面積に及ぼすプラスの効果を確認することができた。このため、これらの領域内に経済形質に關与する遺伝子が存在することが示唆され、5%有意水準以下を示す領域内のマーカー型を判定することにより、優良遺伝子を保有するかどうかを判定することが可能となった。これにより、脂肪交雑やロース芯面積を対象とした選抜において、選抜精度の向上や効率化が図られると期待される。

また、黒毛和種の経済形質の複数のQTLは、相加的な効果作用を示すという報告がある(4,5)。今

回の我々が推定したロース芯面積のQTL候補領域にも,これらの報告と同様な作用が認められた。

しかし,今回の研究では枝肉重量に関しては,有意なQTLは見つけられなかった。その理由として,解析に用いるマイクロサテライトマーカーの選定を行った際,ホモ化している領域が多数存在し,マーカーを詳細に設定できなかった。さらに黒毛和種における優良遺伝子領域はホモ化しているという報告も複数なされており(1,2,4)このために,有意なQTLを検出することができなかったものとする。今後,それら優良ホモ領域を特定するには様々な系統の牛を解析し,由来を把握するとともに種雄牛間の遺伝子型の比較などが必要であるとする。これらQTLのマーカー情報の育種改良への実用化のためには,実際の種雄牛選抜や優良雌牛の選定に活用することによって,選抜マーカーとして有用性を実証していく必要がある。今後は,この成果をもとに「明光4」の後継種雄牛の選抜指標の1つとして活用するとともに,QTL解析が学術的知見だけに終わることがないように,育種改良の現場で発揮できるようにしていく努力が必要である。

参考文献

- 1) 古川恵ら,2004年,DNAマーカーを指標にした牛の育種手法の開発に関する研究(第1報),岡山県総合畜産センター研究報告,15号34-38
- 2) 瀬戸口浩二ら,2001年,牛の発育及び肉質に関する遺伝子の探索(第3報),鹿児島県肉用牛改良研究所研究報告,6号,23-25.
- 3) K.Mizoshita,et.al. 2004,Quantitative trait loci analysis for growth and carcass traits in a half-sib family of purebred Japanese Black (Wagyu) cattle. J.Anim.Sci.3415-3420.
- 4) 小林直彦ら,2007年,DNA情報を利用した飛騨牛の育種改良手法に関する研究(第3報),岐阜県畜産研究所研究報告,1-9.
- 5) 安部亜津子ら,2005年,黒毛和種基幹種雄牛における脂肪交雑に関するQTL領域の探索,島根県立畜産試