

長野県黒毛和種繁殖雌牛におけるグレリン受容体遺伝子塩基多型 (nt-7(C>A)) の判定と枝肉重量および皮下脂肪厚の育種価との関連性

藤森祐紀・佐藤隆・市川祐司・高橋秀彰*・小松正憲*・西條勝宜

* (独) 畜産草地研究所

Nt-7(C>A) nucleotide polymorphisms of the bovine growth hormone secretagogue receptor 1a gene (GHS-R1a) and its genetic association with breeding value of carcass weight and subcutaneous fat thickness in Japanese Black cows in Nagano prefecture

Yuuki FUJIMORI, Takashi SATO, Yuji ICHIKAWA, Hideaki TAKAHASHI,
Masanori KOMATSU, Katsuyoshi NISHIJO

要約 成長ホルモン分泌や摂食亢進作用を持つ「グレリン」の機能を発揮させる重要な受容体であるグレリン受容体は、細胞膜を7回貫通するGタンパク質共役型受容体のひとつで、本遺伝子のnt-7(C>A)座位の塩基多型は産肉形質に影響を及ぼすことが明らかにされている。そこで畜産試験場繋養繁殖雌牛の遺伝子型を調査した結果、AC型とCC型間では枝肉重量と皮下脂肪厚の育種価に有意な差が認められた(AC型>CC型)。このことにより、グレリン受容体遺伝子の塩基多型を判定することで、推定育種価判明前に枝肉重量と皮下脂肪厚の遺伝的能力を推定することが可能であることが示唆された。

キーワード: グレリン受容体, 塩基多型, 育種価

ウシ・グレリン受容体遺伝子は視床下部や下垂体で発現し、成長ホルモンの分泌や摂食行動の促進、脂肪蓄積効果等多様なエネルギー代謝調整作用を有する「グレリン」の機能を発揮させる重要な受容体である(CruzとSmith 2008)。2005年、ウシにおける体重・体型のQTL連鎖解析研究から、これらの形質に影響を及ぼすQTLの1つは第1染色体の約90~120センチモルガン付近にマップされるグレリン受容体遺伝子であると報告された(Malau-Aduliら 2005a、2005b)。また、これら形質に影響を与えている塩基変異は本遺伝子のどの場所であるかつきとめるために研究がなされ、2010年、グレリン受容体遺伝子の全長にわたる塩基レベルの変異の全容が明らかになった(Komatsuら 2010)。さらに、2011年、黒毛和種集団において本遺伝子の塩基多型と産肉形質との関連性が報告された

(Komatsuら2011)。

しかし、本遺伝子の塩基多型と産肉形質の育種価との関連性については明らかにされていない。そこで産肉形質の推定育種価が判明している当场繋養繁殖雌牛を用い、その関連性について検討をおこなった。

材料及び方法

(1)試験供試牛

場繋養繁殖雌牛で推定育種価判明牛14頭を用いた。

(2)DNAの調整

14頭より血液採血後、白血球を遠心分離し、定法に従いゲノムDNAを抽出した。

(3)遺伝子型判定

Komatsu(2010)らの報告に基づきPCR-RFLPにて

判定した。増幅ターゲットをnt-7 (C>A) 座位とし、プライマーセット1 (4457F/4794R) およびプライマー2(2666F/2856R)を用い、Applied Biosystems社製 GeneAmp® PCR System 9700サーマルサイクラーを用いた。PCRは2段階で行った。すなわち、プライマー1を持ちいたPCR後、得られたPCR産物を40倍希釈し、それを鋳型とし、プライマー2を用いてPCRを行った(表1)。

得られたPCR産物5ulを制限酵素(Msp1) 10u/ulにて処理後、15%ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動を行い、切断の有無により遺伝子型を判定した(図1)。

表1 PCR条件

反応液	
1st PCR	
Genomic DNA	10ng
KOD Plus (TOYOBO)	0.3U
10×PCR Buffer	2ul
25mM MgSO ₄	1ul
2mM dNTPs	1ul
Primer	
1484F	(5'-CTTTCCAAGCATCCTCCCTGAG-3')
2067R	(5'-GAAGCAGATGGCGAAGTAGCG-3')
反応条件	
Pre Denature	94°C 2min
Denature	94°C 15sec
Annealing	60°C 30sec
Extension	68°C 30sec
反応液	
2nd PCR	
1stPCR product 1/40	2ul
KOD Plus (TOYOBO)	0.3U
10×PCR Buffer	2ul
25mM MgSO ₄	1ul
2mM dNTPs	1ul
Primer	
2666F	(5'-CAGTCGCGTCCCTGAACC-3')
2856R	(5'-CACGCAGGTGGCTGTGAC-3')
反応条件	
Pre Denature	94°C 2min
Denature	94°C 15sec
Annealing	60°C 30sec
Extension	68°C 30sec

結果

(1) 遺伝子型判定

推定育種価判明牛 14 頭の遺伝子型は AA 型 1 頭、AC 型 6 頭、CC 型 7 頭であった。遺伝子頻度は A 型 : 0.29、C 型 : 0.71 であった。繁殖雌牛で AC 型を示す個体の枝肉重量および皮下脂肪厚の育種価の平均は各 38.4Kg、-0.22cm、CC 型を示す個体のそれらは、-13.8kg、-0.50cm で AC 型と CC 型間個体で統計的に有意な差異 (P<0.05) が認められた(表2)

(2) 経費

DNA シーケンサーと RFLP との判定に係る時間および経費を比較すると、両者の判定時間には差がなく、経費について RFLP は DNA シーケンサーの 10 分の 1 となった。

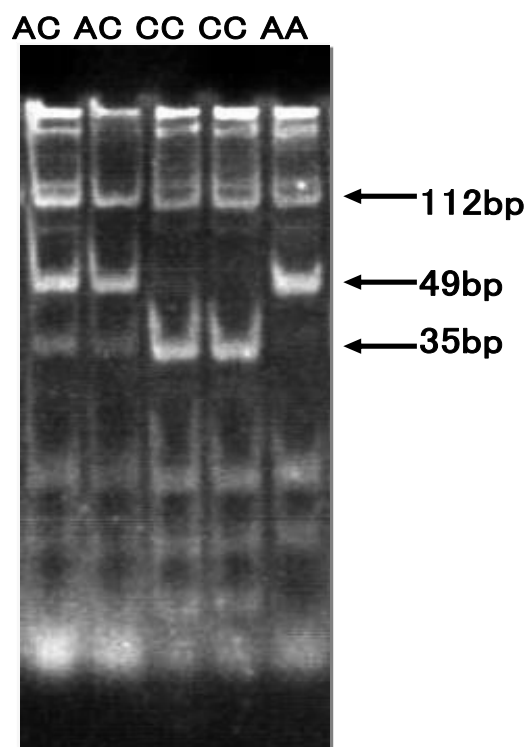


図1 RFLP 法により SNPs を判定した結果を示す写真
AA 型は 49bp、CC 型は 35bp のみにバンド、AC 型は 35bp と 49bp にバンドが見られる。

表2 遺伝子型と推定育種価の平均値

遺伝子型	枝肉重量(kg)※	ロース芯面積 (cm ²)	バラの厚さ (cm)	皮下脂肪厚 (cm)※	脂肪交雑
AC	38.4±10.0	9.4±1.1	0.60±0.33	-0.22±0.10	1.27±0.37
CC	-13.8±13.4	7.1±3.3	0.04±0.40	-0.50±0.15	1.08±0.53

※5%水準で有意差あり。育種価の平均±SDで表記

考察

育種価は家畜の経済形質の能力を数値化したもので、家畜の改良はこれまで育種価や血統を参考にして進められてきた。しかし育種価が判明するまでに時間がかかるため、せっかく判明してもすでに死亡しているなど、すぐにこの育種価を使うことは出来ない。今回、繁殖雌牛の推定育種価と塩基多型の関連がみられたことは、育種価判明前、生後すぐに枝肉重量と皮下脂肪厚の遺伝的能力を推定することが可能であることが示唆される。また遺伝子型頻度は A 型：0.29、C 型：0.71 であり、枝肉重量により大きな効果をもつ A 型遺伝子の頻度は繁殖雌牛集団では少ないことが明らかとなった。さらに Komatsu ら (2010、2011) も同様の報告をしている。このことから本遺伝子塩基多型情報を利用することで、本県黒毛和種集団の枝肉重量の遺伝的改良につながるということが示唆される。

塩基多型の判定には DNA シーケンサーを使用し判定をおこなうが、今回は簡便な RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism、制限酵素断片長多型) で判定する方法を用いて、当场繋用牛について本遺伝子の nt-7(C>A)座位の 1 塩基多型判定をおこない、遺伝子型と育種価との関連性を検討した。

DNA シーケンサーを使用した場合と、今回おこなった RFLP との解析に要する時間およびコストを比較すると、時間はほぼ同じではあるが、コストに関して RFLP は DNA シーケンサーの 10 分の 1 となった。多検体の処理になれば、DNA シーケンサーを使用したほうが良いと思われるが、少量の検体数であれば、利活用の面も含め RFLP が有効だと考えられる。

今回、本遺伝子のみの塩基多型の検討をおこなったのみであったが、家畜の経済形質に関与する遺伝子は、現在判明しているものだけでも多数あり、本遺伝子のみだけでは遺伝的改良につながるものではないと考えられる。今後は他の遺伝子も組み合わせて塩基多型を判定していくことが家畜の改良に重要であると考えられる。

引用文献

- Cruz C R, Smith R G. The growth hormone secretagogue receptor. 2008. *Vitamins and Hormones*, 77: 47-88.
- Komatsu M, Fujimori Y, Sato Y, Okamura H, Sasaki S,

Itoh T, Morita M, Nakamura R, Oe T, Furuta M, Yasuda J, Kojima T, Watanabe T, Hayashi T, Malau-Aduli AEO, Takahashi H. 2010. Nucleotide polymorphisms and the 5'-UTR transcriptional analysis of the bovine growth hormone secretagogue receptor 1a (GHS-R1a) gene. *Animal Science Journal*, 81: 530-550.

Komatsu M, Itoh T, Fujimori Y, Satoh M, Myazaki Y, Takahashi H, Shimizu K, Malau-Aduli AEO, Morita M. 2011. Genetic association of GHS-R1a 5'UTR microsatellite and nt-7 (C>A) loci on growth and carcass traits in Japanese Black cattle. *Animal Science Journal*, 82: 396-405.

Malau-Aduli AEO, Niibayashi T, Kojima T, Oshima K, Mizoguchi Y, Komatsu M. 2005a. Interval mapping of growth quantitative trait loci in Japanese Black cattle using microsatellite DNA markers and half-sib regression analysis. *Animal Science Journal*, 76: 11-18.

Malau-Aduli AEO, Niibayashi T, Kojima T, Oshima K, Mizoguchi Y, Komatsu M. 2005b. Mapping the quantitative trait loci (QTL) for body shape and conformation measurements on BTA1 in Japanese Black cattle. *Animal Science Journal*, 76: 19-27.