

1 肉用牛の産肉性向上に関する研究

(3)DNAマーカーを用いた肉用牛の育種システム実用化に関する研究

ア．MCSU欠損症遺伝子近傍領域が肉用牛経済形質に及ぼす影響の検討

Association Analysis between the Deletion Mutant Allele of MCSU Deficiency and Carcass Traits
in Japanese Black Cattle

藤田達男・志村英明・梅木英伸・久々宮公二・伊藤雅之・志賀一穂

要 約

黒毛和種の常染色体性劣性遺伝性疾患であるウシモリブデン補酵素 (MCSU) 欠損症の原因となる変異遺伝子 (原因遺伝子 m) と産肉成績との関連性について解析を行った。屠場で採取した黒毛和種去勢肥育牛サンプルの中から父、祖父、曾祖父のいずれかが原因遺伝子 m キャリア種雄牛であり、かつ 2 頭以上のサンプルがある種雄牛 22 頭の息牛 316 頭の MCSU 遺伝子型を調査した結果、正常遺伝子ホモ型 (MM)240 頭、キャリア (Mm) 76 頭であった。MCSU 遺伝子型と産肉成績との関連性を調べるため、出荷年度、肥育農家、屠殺時日齢などの非遺伝的要因を補正し、その補正值について種雄牛と MCSU 遺伝子型を要因として取り上げた二元配置分散分析を行った。種雄牛間では日増体重(D.G) ($p<0.01$)、皮下脂肪の厚さ ($p<0.01$) および枝肉重量 ($p<0.05$) で有意な差がみられたが、MCSU 遺伝子型に有意に関連する形質はみられなかった。MCSU 遺伝子型と産肉成績との間に有意な関連性がみられなかったため、黒毛和種集団から原因遺伝子 m を排除しても育種改良に影響はないと推察された。

(キーワード： ウシモリブデン補酵素 (MCSU) 欠損症 産肉成績との関連性)

緒 言

ウシ MCSU 欠損症は黒毛和種にみられる常染色体性劣性遺伝病であり、Watanabe ら¹⁾によって原因遺伝子 m が確認された。原因遺伝子 m を持つキャリア (Mm) どうしの交配によって 4 分の 1 の確率で生まれる原因遺伝子ホモ型 (mm) の産子では、生後 3 カ月前後から発育障害と蹄の異常伸長がみられ、多くは生後 7 ヶ月前後で死亡するか、またはそれ以前に予後不良として淘汰された。発症牛の病理学的所見は腎臓の異常を主徴とし、尿細管内から腎盂にかけ黄白色または黄褐色の砂粒状の結石が蓄積し、この結石はキサンチンを主成分とするものであった²⁾。Watanabe ら¹⁾が開発した遺伝子診断技術によって、原因遺伝子 m を持つキャリア種雄牛の識別が可能となり、キャリア種雄牛の淘汰とキャリア種雄牛精液の使用規制によって本病の発生は終息し

た。しかし、キャリア種雄牛のなかには優れた産肉能力を持ち、市場性の高い種雄牛がいたことから、黒毛和種育種集団から原因遺伝子 m を排除することは、産肉能力を重視した育種改良においてマイナスの効果をもたらすことが危惧された。

黒毛和種の常染色体性劣性遺伝病であるクローデイン 16 欠損症³⁾の遺伝子型と産肉成績との間のアソシエーション解析を行った小林ら⁴⁾の報告では、原因遺伝子と有意に関連する経済的形質はなかったとする一方で、ブラウンスイス種にみられるウィーバー病⁵⁾では、原因遺伝子の遺伝子座は乳量、乳脂肪量に連鎖していることが報告⁶⁾されており、MCSU 欠損症においても経済形質との関連性を検証しておく必要があった。そこで著者らは、屠場で採取した黒毛和種去勢肥育牛サンプルを用いて、MCSU 欠損症遺伝子型と産肉成績との間に関連性があるかど

うかを調査した。

材料および方法

1. 供試牛

大分県内の同一屠畜場において、1998 年 6 月～2003 年 5 月の間に採取した黒毛和種去勢肥育牛腎臓周囲脂肪サンプル 3,897 頭のなかから、当該牛の父、祖父および曾祖父のいずれかがキャリア種雄牛であり、かつ 2 頭以上のサンプルがある種雄牛の息牛 316 頭を調査対象とした。脂肪組織からの DNA の抽出は、ProtainaseK を用いた常法で行い 10mM Tris-HCl (pH 8.0) 1mM EDTA に溶解し、DNA 濃度を 20ng/μl に調整した。

2. ウシ MCSU 欠損症遺伝子診断

ウシ MCSU 欠損症の遺伝子診断は Watanabe ら¹⁾の方法で行った。すなわち、原因遺伝子 *m* にみられる 3 塩基欠損領域を挟むプライマーペア (MCSU-F : 5'-TGGCCTGGGCGCTCTGCTGGTGAATAAC-3'、MCSU-R : 5'-AGGTACGCAGCGCCGTGCCTCCTC-3') を用いる PCR によって正常遺伝子 *M* (87bp) と原因遺伝子 *m* (84bp) を検出した。PCR は DNA 20ng を鋳型としてそれぞれのプライマー 10pmole、10mM Tris-HCl (pH8.8)、1mM MgSO₄、5mM KCl、5mM (NH₄)₂SO₄、0.05% Triton-X、0.05mg/ml BSA、0.1mM dNTP および 0.625unit *PfuTurbo* polymerase (STRATAGENE, US) を加え、総量 25 μl の反応系として、熱変性 94℃、1分、アニーリング 68℃、1分、伸長反応 72℃、20秒を 30 回繰り返した。PCR 増幅産物は 12 % ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動 (200V、3.5 時間) 後、臭化エチジウム溶液で染色し、紫外線照射下で特異的バンドを観察した。MCSU 欠損症遺伝子型の診断は、正常遺伝子 *M* (87bp) のみ検出された場合は正常ホモ型 (*MM*)、正常遺伝子 *M* と原因遺伝子 *m* (84bp) の両方を検出した場合はキャリア (*Mm*) と診断した。

3. 統計処理

産肉成績は、日増体重、枝肉重量、胸最長筋面積、ばらの厚さ、皮下脂肪の厚さ、および BMS ナンバーの 6 項目とした。日増体重は、屠畜場出荷時体重と子牛市場時体重の差を肥育日数で除した肥育期間の日増体重とし、その他は、社団法人日本食肉格付協会の規格を使用した。これらの数値について、出荷年度と肥育農家を母数効果とし共変量として肥育日数および終了日齢への二次までの回帰効果を取り上げた最良線形不偏推定値 (BLUE) によって非遺伝的要因を排除した補正值⁷⁾を求めた。この補正した産肉成績について、種雄牛と種雄牛内の MCSU 遺伝子型を要因として取り上げた二元配置の分散分析を行った。

結果および考察

MCSU 欠損症遺伝子診断技術によって、原因遺伝子 *m* を持つキャリア種雄牛が識別され、キャリア種雄牛の淘汰とキャリア種雄牛精液の使用規制によって本病の発生は終息した。しかし、キャリア種雄牛のなかには優れた産肉能力を持ち、市場性の高い種雄牛がいたことから、黒毛和種育種集団から原因遺伝子 *m* を排除することは、産肉能力を重視した育種改良においてマイナスの効果をもたらすことが危惧され、MCSU 遺伝子型と産肉成績の関連性を明らかにしておく必要があった。そこで、大分県内の同一屠畜場に出荷された黒毛和種去勢肥育牛サンプルのなかから、父、祖父および曾祖父のいずれかがキャリア種雄牛であり、かつ 2 頭以上のサンプルがある種雄牛の息牛の MCSU 遺伝子型を調査し、MCSU 遺伝子型と産肉成績の間に関連性があるかどうかを調べた。

まず、今回の調査対象牛 316 頭に関係したキャリア種雄牛は Sire-A ~ Sire-F の 6 頭であった。調査対象牛 316 頭の父、祖父および曾祖父のなかにキャ

表 1 . 調査対象牛316頭の父、祖父、曾祖父に該当するキャリア種雄牛別サンプル数およびキャリア頭数

Carrer Sire	父	祖父	曾祖父
Sire- A	35(18)*	3 (0)	
-B	43(22)	4 (0)	
-C		75(20) {A:2(2), B:1(0)}**	109(12) {A:3(1), B:3(2)}
-D		10 (1) {B:1(0)}	3 (0)
-E		1 (0)	29 (7) {A:2(2)}
-F		1 (0)	17 (2) {A:2(1)}
Total	78(40)	94(21) {A:2(2), B:2(0)}	158(21) {A:7(4), B:3(2)}

* ()内の数値はキャリア頭数

** { }内は父がSire-A、またはSire-Bである頭数。()内の数値はキャリア頭数

表 2 . 調査対象牛の種雄牛(父: 22頭)別、遺伝子型別供試頭数

MCSU遺伝子型	A	B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	合計
<i>MM</i>	17	21	64	23	20	16	18	11	7	8	7	4	3	3	4	1	3	3	1	2	2	2	240
<i>Mm</i>	18	22	9	3	3	5	2	3	2	1		2	2	1		2			1				76
合計	35	43	73	26	23	21	20	14	9	9	7	6	5	4	4	3	3	3	2	2	2	2	316

* A, B : キャリア種雄牛、1 ~ 20 : MCSU正常種雄牛

表 3 . 種雄牛と種雄牛内のMCSU遺伝子型を要因として取り上げた二元配置分散分析結果

変動因	自由度	不偏分散					
		枝肉重量	日増体重	ロース芯面積	バラの厚さ	皮下脂肪厚	BMSNo.
MCSU遺伝子型	1	811.98	4568.42	28.62	6.24	54.37	7.17
種雄牛	21	2029.14 *	19578.72 **	40.29	47.38	110.85 **	5.34
交互作用	21	564.20	3750.40	17.92	25.66	16.92	1.66
誤差	272	1216.11	9336.72	41.92	47.28	51.65	3.99

* : 有意差あり(p<0.05)、** : 有意差あり(p<0.01)

表 4 . MCSU遺伝子型別の産肉成績 (平均値 ± 標準偏差)

MCSU遺伝子型	頭数	枝肉重量(Kg)	日増体重(g)	ロース芯面積(cm)	バラの厚さ(mm)	皮下脂肪厚(mm)	BMSNo.
<i>MM</i>	240	409.7 ± 35.6	717.4 ± 100.9	52.7 ± 6.1	69.6 ± 6.8	24.1 ± 7.6	8.5 ± 2.1
<i>Mm</i>	76	406.0 ± 33.0	708.5 ± 89.2	52.0 ± 7.0	69.3 ± 6.6	23.2 ± 6.1	8.1 ± 1.6

リア種雄牛がどのように分布しているかを表 1 に示した。父がキャリア種雄牛であったサンプルは Sire-A、Sire-B を父とする合計 78 頭、それらの遺伝子型は *MM* 38 頭、*Mm* 40 頭とほぼ 1 : 1 に分離し、メンデルの法則に従っていることが示唆された。祖父がキャリア種雄牛であったサンプルは Sire-A ~

Sire-F を祖父とする合計 94 頭、この内 21 頭がキャリアであった。このなかで Sire-C を祖父とする 75 頭のなかの 3 頭は、キャリア種雄牛が続けて交配されており、Sire-A が父であった 2 頭は 2 頭ともキャリアであり、Sire-B が父であった 1 頭は *MM* であった。同じく Sire-D を祖父とする 10 頭のなかで Sire-B

が父であった 1 頭は *MM* であった。曾祖父がキャリア種雄牛であったものは Sire-C ~ Sire-F を曾祖父とする合計 158 頭、この内 21 頭がキャリアであった。曾祖父と祖父の間で連続してキャリア種雄牛が交配された例はなかった。曾祖父がキャリア種雄牛であった合計 158 頭中、7 頭は Sire-A が父であり 4 頭がキャリア、3 頭は Sire-B が父であり 2 頭がキャリアであった。

調査対象牛 316 頭の父は Sire-A、Sire-B を含めて 22 頭の種雄牛の息牛であった。表 2 に、調査対象牛の父である 22 頭の種雄牛別供試頭数と遺伝子型別頭数を示した。2 頭のキャリア種雄牛 Sire-A、Sire-B および 20 頭の MCSU 正常種雄牛の息牛 316 頭中、240 頭が平常ホモ型 (*MM*)、76 頭がキャリア (*Mm*) であった。MCSU 遺伝子型と産肉成績との関連性を調べるため、枝肉重量、日増体重、ロース芯面積、バラの厚さ、皮下脂肪の厚さおよび BMSNo. の補正值について、種雄牛と種雄牛内の MCSU 遺伝子型を要因として取り上げた二元配置の分散分析を行い、その結果を表 3 の分散分析表に示した。表 4 には、調査対象牛 316 頭を *MM* 群と *Mm* 群に区分し、両群の産肉成績の平均値と標準偏差を示した。

表 3 の分散分析表で示したように、種雄牛を要因とした場合には、日増体重 ($p < 0.01$)、皮下脂肪の厚さ ($p < 0.01$) および枝肉重量 ($p < 0.05$) との間に関連性がみられたが、MCSU 遺伝子型を要因とした場合には、産肉成績との間に有意な関連性はみられなかった。このことから MCSU 遺伝子型と産肉成績との関連性は無いと推察され、MCSU 欠損症原因遺伝子 *m* およびその近傍領域には産肉成績に連鎖する経済形質遺伝子座が存在する可能性は低いと推察された。

小林ら⁴⁾は、黒毛和種におけるクローディン 16 欠損症遺伝子型と産肉成績との間のアソシエーション解析において、キャリア種雄牛 3 頭の肥育産子の産肉成績、およびキャリア種雄牛 1 頭の繁殖雌牛産子の予測育種価を用いた解析によって、原因遺伝子が産肉成績に直接影響を与える結果が得られなかったとしている。また、クローディン 16 欠損症原因遺伝子にみられる欠損領域は約 30cM に及び、こ

の遺伝子座領域のマイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析からも産肉成績との関連性を否定している。

いっぽう、Hoeschele と Meinert⁶⁾は、ブラウンスイス種にみられるウィーバー病において、キャリア牛群の乳量、乳脂量が非キャリア牛群のそれより有意に優れていたこと、およびウィーバー病原因遺伝子の遺伝子頻度が増加傾向にあることから、乳量、乳脂量に關与する遺伝子がウィーバー病原因遺伝子座と強く連鎖するところに位置し、乳量、乳脂量を重視した育種改良によってウィーバー病原因遺伝子が必然的に保存されてきたと指摘している。

近年、黒毛和種集団では、肉質の高品質化を目指した産地間競争の激化に伴い、地域によっては供用される種雄牛は産肉能力が優れていると評価された特定の系統に偏る傾向がみられる。その結果として近親交配が行われる頻度が高まり、遺伝性疾患が顕在化しやすい傾向にある。これまでに、黒毛和種において牛第 13 因子欠損症、牛バンド 3 欠損症⁸⁾、牛クローディン 16 欠損症⁹⁾、チェディアックヒガン症候群¹⁰⁾、およびモリブデン補酵素欠損症¹⁾が解明された。小林ら⁴⁾が報告したクローディン 16 欠損症原因遺伝子と今回の MCSU 欠損症原因遺伝子については、産肉成績との関連性は見出せなかったものの、ブラウンスイス種にみられるウィーバー病⁶⁾のように経済的形質遺伝子座と関連した遺伝性疾患もあるため、他の遺伝性疾患においても、キャリアとして保持された原因遺伝子が経済形質に及ぼす影響を詳細に調べておく必要がある。このとき枝肉格付成績には、出荷時期や肥育農家の技術レベル、肥育期間などの様々な非遺伝的な要因が含まれているため、これらの非遺伝的要因を排除した補正值を用いた解析が解析の精度を向上させると考える。本研究では、出荷年度と肥育農家を母数効果とし共変量として肥育日数および終了日齢への二次までの回帰効果を取り上げた最良線形不偏推定値 (BLUE) によって非遺伝的要因を排除した補正值を求めた。この手法によって得た補正值は、マイクロサテライトマーカーを用いた QTL 解析などにも応用可能と考えられる。

本研究によって、MCSU 欠損症遺伝子型と産肉成績との間に有意な関連性が見出せなかったことから、黒毛和種集団から原因遺伝子 *m* を排除しても、産肉成績を低下させる可能性は低いと考えられた。この結果は、現在我々が行っている候補種雄牛や供卵牛の選抜方針と矛盾していなかった。

謝 辞

本研究において、統計的な解析方法についてご助言いただいた京都大学大学院農学研究科佐々木義之教授に深謝する。また、脂肪組織採取や血統情報の提供に協力していただいた、大分県畜産公社および J A 全農おおいとの関係者に深謝する。

引用文献

- 1) Watanabe T, Ihara N, Itho T, Fujita T, Sugimoto Y, Deletion Mutation in *Drosophila ma-1* Homologous, Putative Molybdopterin Cofactor Sulfurase Gene is Associated with Bovine Xanthinuria Type . The Journal of Biological Chemistry, 275:21789-21792. 2000.
- 2) Hayashi M, Ide Y, Shoya S, Enomoto C, Mizoguchi H, Observation of Xanthinurea and Xanthine Calculosis in Beef Calves. Jap. J. vet. Sci, 41:505-510. 1979.
- 3) Kobayashi N, Hirano T, Maruyama S, Matsuno H, Mukoujima K, Morimoto H, Noike T, Tomimatsu H, Hara K, Itho T, Imakawa K, Nakayama H, Sugimoto Y, Genetic mapping of locus associated with bovine chronic interstitial nephritis to chromosome 1. Animal Genetics, 31:91-95. 2000.
- 4) 小林直彦・平野 貴・揖斐隆之・大谷 健・杉本喜憲 . 黒毛和種における *Claudin-16*(*CL-16*)欠損症遺伝子型と産肉成績とのアソシエーション解析 . 日畜会報、73 : 19-23 . 2000 .
- 5) Georges M, Dietz AB, Mishra A, Nielsen D, Sargeant LS, Sorensen A, Steele MR, Zhao XY, Leipold HW, Womack JE, Larthop M, Microsatellite mapping of the gene causing weaver disease in cattle will allow the study of an associated quantitative trait locus. Proceeding of the National Academy of Science of the USA, 90:1058-1062. 1993.
- 6) Hoechele I, Meinert TR, Association of genetic defects with yield and type traits : The weaver locus effect on yield. Journal of Dairy Science, 73:2503-2515. 1990.
- 7) 伊藤雅之 . 枝肉成績を利用した肥育農家の技術評価 . 大分県畜産試験場試験成績報告書、29 : 63-66. 2000 .
- 8) Inaba M, Yawata A, Koshino I, Sato K, Takeuchi M, Takakuwa Y, Manno S, Yawata Y, Kanzaki A, Sakai J, Ban A, Ono K, Maeda Y. Detective anion transport and marked spherocytosis with membrane instability caused by hereditary total deficiency of red cell Band 3 in cattle due to a nonsense mutation. Journal of Clinical Investigation, 97:1804-1817. 1996.
- 9) Hirano T, Hirotsune S, Sasaki S, Kikuchi T, Sugimoto Y, A new deletion mutation in bovine Claudin-16(*CL-16*) deficiency and diagnosis. Animal Genetics, 33 : 118-122. 2000.
- 10) Yamakuchi H, Agaba M, Hirano T, Hara K, Todoroki J, Mizoshita K, Kubota C, Tabara N, Sugimoto Y, Chediak-Higashi syndrome mutation and genetic testing in Japanese black cattle(Wagyu). Animal Genetics, 31:13-19. 2000.