

DNA マーカーを指標とした牛の育種手法の開発に関する研究 (第 2 報)

黒岩 恵*・平本圭二**・溝口 康***・杉本喜憲***

Research on the development of breeding technique of Japanese black cattle used of the DNA marker (2nd)

Megumi KUROIWA, Keiji HIRAMOTO, Yasushi MIZOGUCHI and Yoshikazu SUGIMOTO

要 約

牛の経済形質と連鎖する染色体領域を特定し、DNA マーカーを用いた DNA 育種手法を確立するため、県基幹種雄牛「利花号」とその産子において大規模半兄弟連鎖解析を実施した。その結果、脂肪交雑に関して 8 番染色体に、ロース芯面積に関して 14 番染色体に形質と有意に連鎖する領域が認められた。

キーワード：牛、黒毛和種、DNA マーカー、QTL、マーカーアシスト選抜

緒 言

黒毛和種において枝肉重量、脂肪交雑などの経済形質に関する育種改良は、BLUP 等の統計遺伝学的手法で算出した育種価(Breeding Value)を用いるのが一般的である。これに加えて個体の優良遺伝子を特定し、遺伝情報を活用することにより、選抜の正確度が向上し、効率のよい育種改良を行うことができる。

牛では、増体や脂肪交雑など経済的に重要な形質は、複数の遺伝子による複雑な表現型を示す量的形質であることから、遺伝子特定は困難であった。しかし、近年これらの経済形質に関連する遺伝子座 (QTL) が多数同定され^{1) 2)}、DNA マーカーを用いた選抜手法の検討³⁾も行われている。

岡山県においても新たな種雄牛造成並びに選抜指標としての DNA マーカーを育種改良へ応用するため、県種雄牛「利花」号とその産子を用いた大規模半兄弟家系での連鎖解析を行ったので、本報ではその結果について報告する。

材料及び方法

1 家系の構成

基幹種雄牛「利花号」を父とした産子による半兄弟家系を対象とした。

2 材料

材料は「利花号」産子去勢牛 298 頭の腎周囲脂肪組織及び血液を DNA サンプルとし採取した。

また、環境効果の補正に育種価を用いる報告があることから⁴⁾、平成 17 年 8 月に公表された第 22 回育種価⁵⁾で算出された肥育牛 288 頭の育種価も併せて用いた。

3 DNA の調製

凍結保存した材料約 500 mg に ProtenaseK (20mg/μl) 10μl、2% SDS 16μl、10 × PCR Buffer 40μl、蒸留水 318μl を加え、50 °C で一晩加温した。その後 95 °C で 15 分加熱後クロロホルム処理、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/μl に希釈調製した。

4 多型解析

多型解析に用いた染色体は、前報⁶⁾の 1 次スクリーニングにおいて染色体レベル 5% 有意水準で検出された 8 番染色体 (脂肪交雑) 及び、9, 14 番染色体 (ロース芯面積) とし、2 次スクリーニングを実施した。動物遺伝研究所より供与されたマイクロサテライトマーカーを、各染色体に 28 個ずつ均等に配置し、PCR を行った。得られた PCR 産物は、DNA Sequencer (Applied Biosystems, 373, 377, 3100 型式) を用いて電気泳動し、ソフトウェア GENESCAN672™、GENOTYPER™ (Applied Biosystems) により遺伝子型を決定した。

5 連鎖解析

経済形質との連鎖解析は、解析プログラム「glissardo build 131」を用いて実測値並びに育種価について実施した。

6 産子のハプロタイプ保持調査

「利花号」産子である直接検定牛・候補種雄牛8頭について優良ハプロタイプを持っているか否かについて調査を実施した。

結 果

1 「利花号」産子の表現型値

サンプルに用いた「利花号」産子の各形質の表現型値の平均は、脂肪交雑については、BMS No. で 6.0 ± 1.7 、ロース芯面積については $52.3 \pm 6.6\text{cm}^2$ であった。

2 連鎖解析結果

(1) 脂肪交雑 (BMS No.)

連鎖解析の結果、8番染色体に BMS No. と関連する領域が、実測値で $0 \sim 20$ 、 $30 \sim 34\text{cM}$ の領域に 0.1% 有意水準で検出された。また、育種価を用いた場合の領域は、 $0 \sim 22\text{cM}$ 、 $32 \sim 34\text{cM}$ であり、実測値と同様の領域に 0.1% 有意水準で検出された(図1)。この BMS No. に対する効果は実数値で最大 1.02 、寄与率は 7% であった。

このハプロタイプ別の頭数の割合を図2に示した。2つのハプロタイプをそれぞれハプロタイプ1、ハプロタイプ2とし、その平均値を比較した。ハプロタイプ1の産子の BMS No. の平均値は、 6.35 ± 1.69 、ハプロタイプ2の平均値は 5.21 ± 1.53 であり、BMS No. が高くなるほどハプロタイプ1の割合も増加していた。

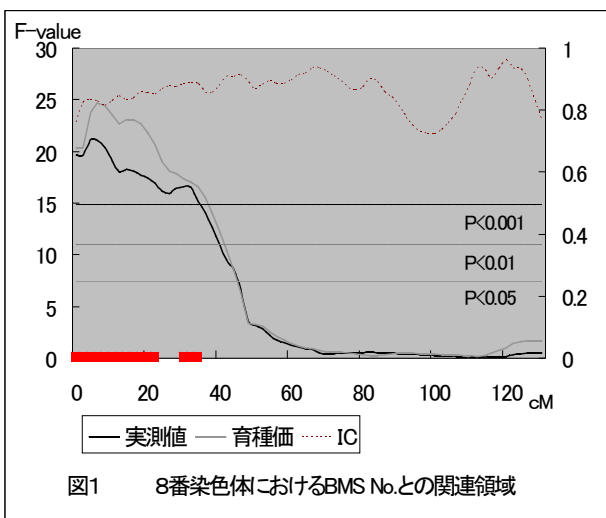


図1 8番染色体におけるBMS No.との関連領域

(2) ロース芯面積

14番染色体に、ロース芯面積と関連する領域

が2カ所認められた。実測値で $40 \sim 42\text{cM}$ 、 56 c

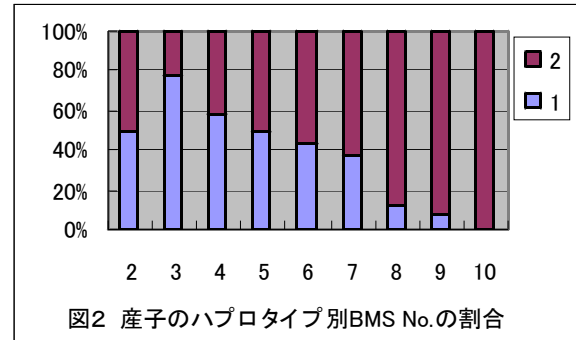


図2 産子のハプロタイプ別BMS No.の割合

M 、 $66 \sim 82\text{cM}$ の領域に 0.1% 有意水準で検出された(図3)。また、育種価を用いた場合の領域は $32 \sim 34\text{cM}$ 、 $40 \sim 46\text{cM}$ 、 $66 \sim 82\text{cM}$ の領域で 0.1% 有意水準、また $52 \sim 56\text{cM}$ で 1% 有意水準で検出された。実測値、育種価ともに 0.1% 有意水準を満たした領域は $40 \sim 42\text{cM}$ 、 $66 \sim 82\text{cM}$ の範囲であり、この2カ所をロース芯面積の優良遺伝子領域LおよびRとした。このロース芯面積に対する効果は最大 3.89cm^2 であった。

Lのハプロタイプ1の産子のロース芯面積の平均値は 53.89cm^2 、ハプロタイプ2の平均値は、 50.48cm^2 であり、ハプロタイプ1を受け継いだ産子はハプロタイプ2を受け継いだ産子に比べ、高い成績であった。同様にRのハプロタイプ1の産子のロース芯面積の平均値は 53.88cm^2 、ハプロタイプ2の平均値は、 49.76cm^2 であった。

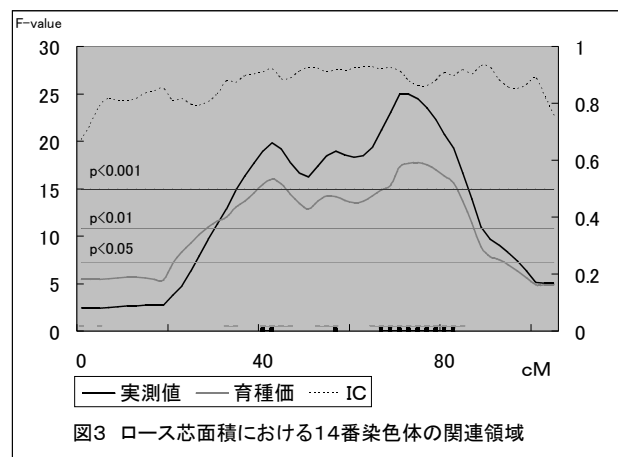


図3 ロース芯面積における14番染色体の関連領域

(3) 産子のハプロタイプ保持調査

「利花号」産子である直接検定牛・候補種雄牛8頭について優良遺伝子領域の保持調査を行った結果を表2に示した。各優良遺伝子領域を受け継いだものについてはQ、受け継いでいないものについてはqで表した。また、途中組み替えが起こり、判定が不明なものについてはNとした。調査の結果、父を同じとする産子の間にも優良ハプロタイプの保持にばらつきが見られたことから、選抜におけるDNAマーカーの有効性が示唆された。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、ご指導ご助言頂きました動物遺伝研究所の方々、並びに共同研究関係機関、関係者各位の方々、また、サンプル採取に御協力頂きました農協、農家の方々に深謝いたします。

引用文献

- 1) 牛 DNA マーカー育種手法の開発 動物遺伝研究所年報第 12 号:7-10. 2003
- 2) K. Mizoshita, T. Watanabe, H. Hayashi, C. Kubota, H. Yamakuchi, J. Todoroki, and Y. Sugimoto. : Quantitative trait loci analysis for growth and carcass traits in a half-sib family of purebred Japanese Black (Wagyu) cattle J. Anim. Sci. 2004. 82:3415-3420
- 3) 小江ら. 黒毛和種・気高系種雄牛の父方半兄弟家系における枝肉形質の QTL 解析: 第 104 回日本畜産学会講演要旨 2005
- 4) 溝下和則・西浩二・山口浩・窪田力・轟木淳一・杉本喜憲・田原則雄: 牛の発育及び肉質に関する遺伝子の探索 (第 3 報), 鹿児島県肉用改良研究所報告第 6 号, 2001, 23-25
- 5) 岡山県総合畜産センター: 第 22 回育種価評価概要, 2005 公表
- 6) 古川恵・平本圭二: DNA マーカーを指標と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第 15 号, 2004, 34-38
- 7) 瀬戸口浩二・溝下和則・林史弘・窪田力・山口浩・杉本喜憲: 牛の発育及び肉質に関する遺伝子の探索 (第 7 報), 鹿児島県肉用改良研究所報告第 10 号, 2005, 17-19
- 8) 阿部亜津子・渡邊敏夫・杉本喜憲・長谷川清寿・佐々木恵美・高仁敏光: 黒毛和種基幹種雄牛における脂肪交雑に関する QTL 領域の検索. 島根県立畜産試験場研究報告第 38 号, 2005, 9-13

形質	BMS	ロース芯面積	
染色体領域	8	14	
		L	R
A	Q ₈	q _{14L}	N
B	q ₈	N	Q _{14R}
C	Q ₈	Q _{14L}	q _{14R}
D	Q ₈	q _{14L}	q _{14R}
E	Q ₈	Q _{14L}	N
F	N	Q _{14L}	Q _{14R}
G	q ₈	q _{14L}	q _{14R}
H	q ₈	Q _{14L}	N

表 2 優良遺伝子領域保持調査結果

考 察

今回の解析で、8 番染色体に脂肪交雑と関連する領域が、14 番染色体にロース芯面積に関連する領域がそれぞれ検出された。なお、1 次スクリーニングで 9 番染色体についてロース芯面積に関連する領域が検出されていたが、2 次スクリーニングで頭数とマーカー数を増加した結果、5% 有意水準に達しなかった。解析頭数が少なかったことから偽陽性として検出されたものと思われる。一方で 14 番染色体については、これまで他の家系でもロース芯面積⁷⁾の他、脂肪交雑⁸⁾や枝肉重量²⁾で検出されている報告が複数あり、これらの QTL との関連性については今後詳細な分析が必要と思われる。

また、これまで直接検定牛の選抜は、血統、発育能力、体型などの形質によって選抜が行われており、その個体の産肉能力の判断は期待育種価のみで判定されていた。直接検定時にこれら DNA マーカーによる遺伝子情報を用いることにより、選抜精度の向上が図られ、優良遺伝子を確実に選抜することが期待できる。

しかし、今回検出された QTL は長いもので約 20cM の領域に及んだため、直接検定牛の保持調査では途中組み替えを起こしている可能性のある判定不明の牛が生じた。さらに精度高い判定を実施するためには、新規にマーカーを追加し、QTL 領域を絞り込むことが必要である。

現在、岡山県では、優良種雄牛の作出において、DNA マーカー情報を活用したマーカーアシスト選抜をモデル的に実施している。今後は、後代検定の結果などをもとにこの選抜方法の効果について検討していく計画である。

