

2018年度 研究所個別プロジェクト報告書

プロジェクト名：熊本系褐毛和種の特性評価

松本 大和<sup>1</sup>、榎村 敦<sup>1</sup>、今井 早希<sup>1</sup>、稲永 敏明<sup>1</sup>、服部 法文<sup>2</sup>、神鷹 孝至<sup>2</sup>、今川 和彦<sup>3</sup>

1) 農学部応用動物科学科、2) 農学教育実習センター、3) 総合農学研究所

## I. 緒言

牛枝肉は牛枝肉取引規格に基づく格付けにより歩留等級と肉質等級から評価され、その市場価格が決定される。歩留等級は枝肉から得られる可食部を示す基準であり、胸最長筋面積、ばらの厚さ、枝肉重量、皮下脂肪の厚さから評価される。一方、肉質等級は脂肪交雑 (Beef Marbling Standard: BMS)、肉の色沢、肉の締まりおよびきめ、脂肪の色沢と質の4項目から評価される。枝肉価格はこれら評価基準の統合的な評価により決定されるが、中でも BMS ナンバーは市場価格に強く影響することが知られている。そのため、その脂肪交雑能力の高さで国内外に知られる黒毛和種が我が国では最大の飼養頭数を誇り、飼料および飼育方法の改良や育種選抜による BMS ナンバーの向上を目指した取り組みが盛んに行われている。

一方、東海大学農学部の位置する熊本県では褐毛和種の生産が盛んであり、阿蘇キャンパスでは放牧を主体とした生産を行っている。褐毛和種は和牛品種の一つであり、高知系と熊本系があるが、黒毛和種とはその性質が大きく異なるとされている。放牧を主体とした飼育管理は、土-草-家畜といった物質の循環だけでなく地域の生態系を基盤とした阿蘇地域の資源である草原(野草地)あるいは風土や文化合った畜産が成り立つ。この飼育管理によって生産された牛肉は霜降りが少なく、健康志向が進む現代社会のニーズに合った高い資質を備えると共に、地域資源を活用した持続型の動物生産の要として期待されている。しかし、褐毛和種独自の品質に対する科学的検証はほとんど行われておらず、一般的に BMS ナンバーの低い本品種の評価は低迷しているため、その生産基盤の衰退が問題となっている。また、本種の性質や生態系との関係については断片的な科学的検証や経験則に基づいた部分もある。品種の特性や性質とそれを生み出す分子機構、そして生態系との関係を明らかにすることにより、熊本系褐毛和種における評価基準の確立、ブランド力の強化を通じた地域再生だけでなく持続的な地域社会の発展に向けた波及効果が期待できる。

今年度は熊本系褐毛和種の性質についての行動学的解析、本種の放牧地利用の解明に向けた生理および管理学的解析、そして本種の特性についての遺伝学的解析といった多面的解析を行い (Fig. 1)、熊本系褐毛和種の行動特性やその遺伝的特徴の一部が明らかになった結果を報告する。

# 褐毛和種 の 特 性 を 多 角 的 に 明 ら か に し た 持 続 的 畜 産 と 放 牧 に よ る 赤 身 肉 生 産

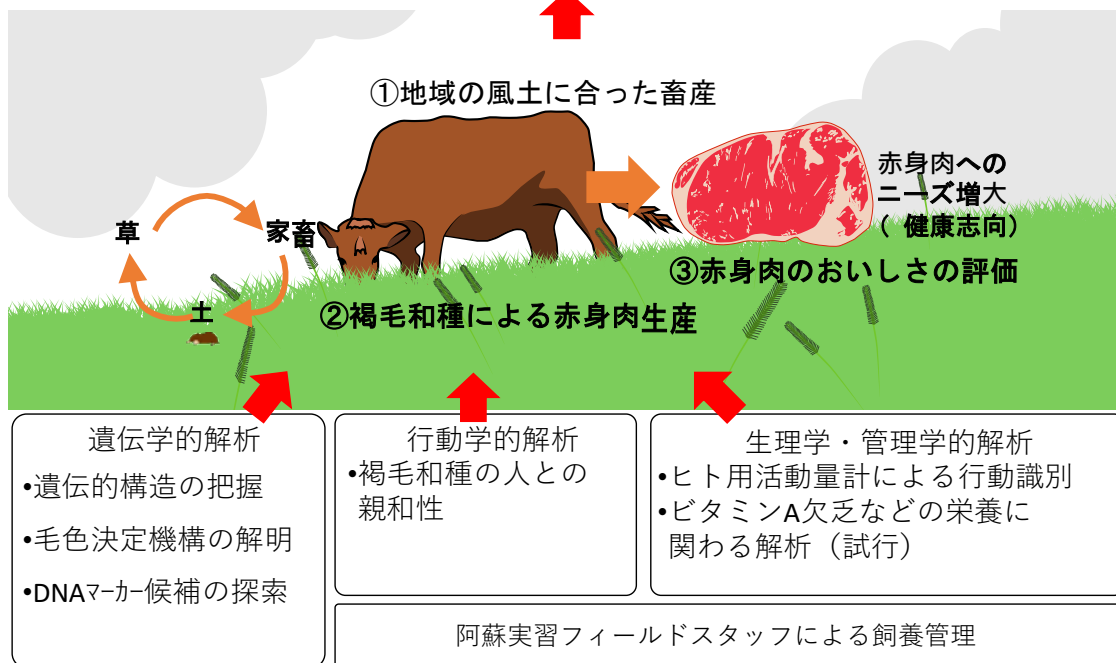


Fig. 1. 本プログラムの目標とその達成に向けた各課題の実施体制.

褐毛和種の放牧による飼養管理は服部、神鷹が担当し、このウシに対する生理学・管理学的解析は榎村および稲永が、行動学的解析は今井が、遺伝学的解析は松本がそれぞれ担当した。

## II. 行動的解析

現在の生産現場において、ウシの扱いやすさ、従順さ、攻撃性の低さ、といった行動特性は管理飼養者にとっての安全性や作業効率性に関わる重要な因子である。体格が大型な品種で、近年の健康志向に沿う赤身肉生産に特化した品種として知られている褐毛和種は、黒毛和種と比べて気質が穏やかで管理がしやすいと言われてきた。しかし、これらの行動特性における科学的根拠は乏しい。そこで、今年度は、褐毛和種の行動特性を明らかにすることを目的とし、人の誘導時における従順性、および、対人反応性を調査した。

### 1. 人の誘導時における従順性の品種間差

熊本県家畜市場に出展された全てのウシ（215～394日齢）は人の誘導に従い、同じ経路を移動する。そこで、周回時の行動、および、直線通路における歩行時の行動を対象とし、5段階の評価基準に従いスコア化し（Table. 1）、褐毛和種の従順性を黒毛和種と比較した。その結果、周回時の行動において、黒毛和種ではスコア2と評価された個体が全体の44.0%と最も多かったのに対し、褐毛和種では全固体のうち50.0%がスコア1と評価され

Table 1 人の誘導時における従順性および対人反応性における評価基準

スコア	人の誘導時の従順性	対人反応性
1	全くためらいがなく、 誘導に従う	自発的な接近 (匂いを嗅ぐ、または舐める)
2	頭部と尾が時折動くが、 誘導に従う	反応しない (動かず、顔も背けることはない)
3	頭部と尾が頻繁に動き、 誘導に逆らうことがある	やや反応する (後ずさり、または顔を背ける)
4	頭部と尾が連続的な動きを示し、 保持がやや困難	非常に高い反応を示す (激しい逃避行動を示す)
5	頭部と尾が激しく動き、 保持が困難	

た (Fig. 2)。また、直線通路における歩行時の行動においても、黒毛和種はスコア 2 と評価された個体が全体の 50.7 % を占める一方で、褐毛和種ではスコア 1 評価の個体が 46.9 % を占めた。本試験では、誘導時の環境や経路によらず、同様の傾向が検出されたことから、褐毛和種は人の誘導における従順性が高い特性を有することが明らかとなった。

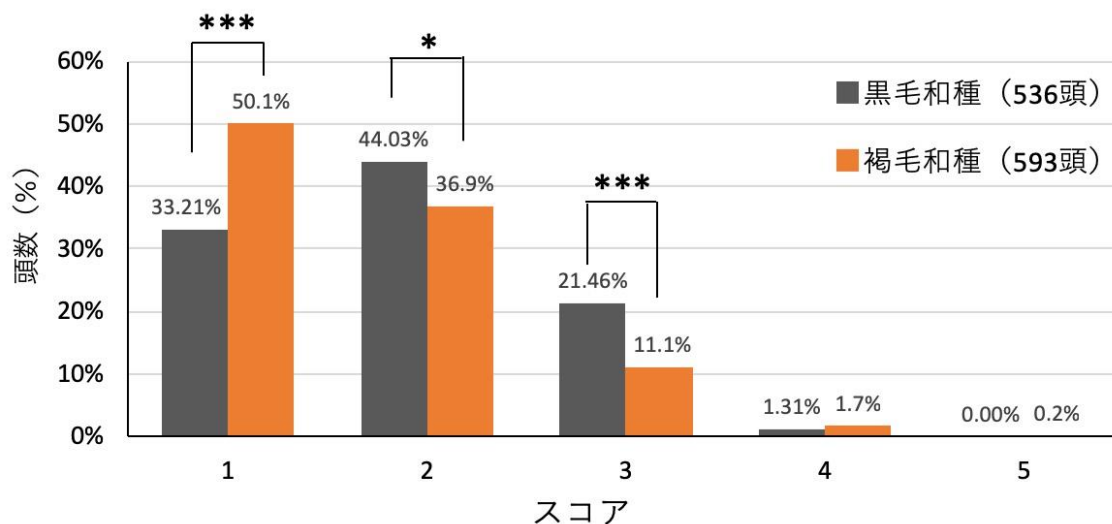


Fig. 2 人の誘導時における従順性のスコア分布.

各品種内における頭数割合を示す。セリ中の周回時における行動の評価結果。カイ二乗検定、 $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ 。

## 2. 対人反応性の品種間差

褐毛和種における人への反応性を数値化するため、繋留されているウシの前方からゆっ

くり手を鼻鏡へ近づけた際のウシが示す行動を 4 段階の基準に従ってスコア化し、黒毛和種と比較検討した。その結果、自発的に接近する行動（スコア 1）を示した個体は 44 頭であったのに対し、褐毛和種では 75 頭であった。一方で、ロープが強く張るほど激しい逃避行動（スコア 4）を示した個体は、黒毛和種では 46 頭、褐毛和種では 24 頭であった。各品種内の全個体のスコアの偏りにおいても、黒毛和種はスコア 3 と評価された個体が最多であるのに対し、褐毛和種ではスコア 2 と、品種間差が認められた。以上の結果から、黒毛和種と比較して褐毛和種は人に対する反応性が低く、穏やかな傾向を有する品種であることが示唆された。

上記、2 種類の評価により、褐毛和種の気質が穏やかで管理がしやすいと言われてきた根拠の一端を明らかにすることが出来た。今後の研究では、行動特性は遺伝要因のみならず、環境要因との相互作用により決定することに着目し、放牧経験の有無や飼養環境に着目し、行動特性との関連性を明らかにしてゆく。

### III. 生理および管理学的解析

放牧は草地においてウシを飼育する方法のひとつであり、地域資源を利用できる点からも我が国の畜産を支える技術落として着目される一方で、技術確立が課題となっている。放牧地でのウシの採食状況や行動について明らかにすることで、適切な放牧区の変更や草地管理における技術確立の一助になり得る。しかし、放牧地におけるウシの行動の解明には、直接観察が最も有効ではあるものの、労力面から長期的な観察が困難である。また、ウシの活動量計を用いた方法もあるものの、舎飼い用に開発されたものが多く放牧地において用いることは難しい。そこで、今年度は、より安価なヒト用活動量計を用いてウシの採食行動評価の可否について検証した。

#### 1. ヒト用活動量計における歩数とウシの行動の関係

農学教育実習センターの肉用牛舎内に飼育されている褐毛和種育成牛 2 個体において、頸部にバックルベルト装着し、そこに活動量計を入れて活動量計の歩数を記録するとともに、牛房の柵にビデオカメラを設置してウシの行動も記録した。そしてウシの行動を採食、歩行、横臥、佇立そして闘争や体をなめるといったその他の 5 つの行動に分け、1 分間隔で記録して 1 時間あたりの各行動の発現頻度と活動量計の歩数との関係を比較した。その結果、採食行動の発現頻度と活動量計の歩数に正の相関がみられた（Fig. 3; 歩数=1.474・採食行動+30.289,  $P=0.012$ ）。また、その他の行動（ $P=0.04$ ）を除いていずれも相関がみられなかった（ $P>0.05$ ）。そして、全ての行動の発現頻度を説明変数、活動量計の歩数を目的変数としたステップワイズ法による変数選択により、採食とその他の行動が選択され、採食がカウント数の増加に影響することが明らかになった。これらのことから、ヒト用活動量計をウシの頸部に装着することで、採食時の首の動きを記録することで採食行動が記録できる

ことが示された。今後は、活動量計と併せて GPS を装着することで、放牧地においてウシが採食に利用する区域を明らかにすることができると考えられる。そして、そのデータを用いることで、採食地としての利用と野生生物の生息地利用の関係を明らかにすることができるだろう。

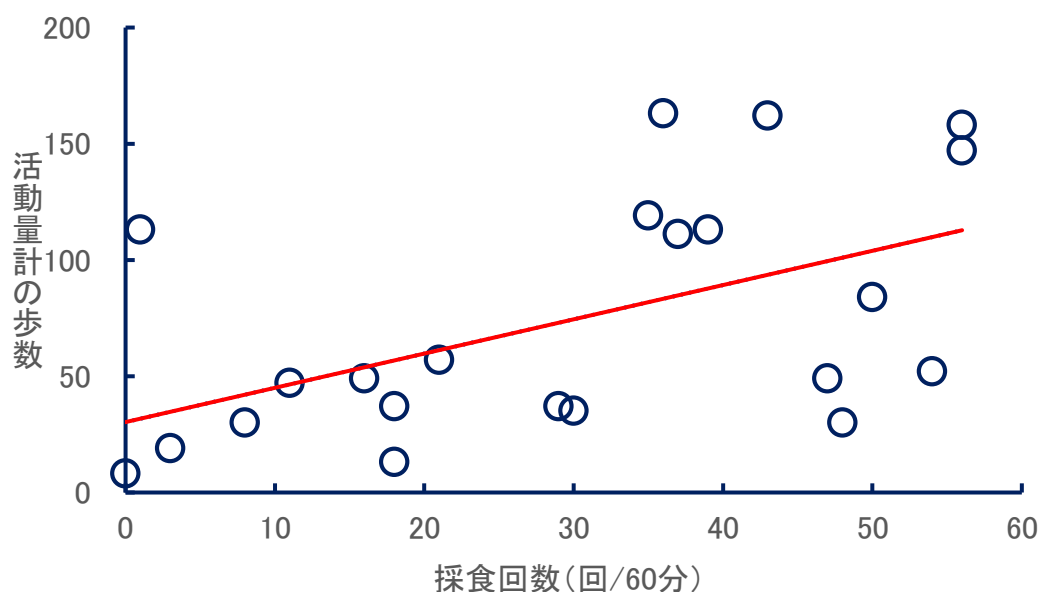


Fig. 3 採食行動と活動量計の歩数の関係.

60 分間あたりの採食行動記録頻度と活動量計の歩数/60 分を示し、赤直線は歩数=1.474・採食行動+30.289 (P=0.012, R2=0.276) を示す。

#### IV. 遺伝学的解析

脂肪交雑を始めとしたウシ経済形質の改良には遺伝学的アプローチが有効だが、育種改良を効率的に行うためには遺伝的特性の把握が必須である。しかしながら、熊本系褐毛和種に対する遺伝学的特性は十分に理解されているとは言い難い。そのため、今年度は経済形質に影響することが既に明らかにされている 7 個の遺伝子を対象として優良アリル頻度を調査すると共に、枝肉重量や脂肪酸組成の他、繁殖率や行動性等の多岐にわたる形質に影響する *Leptin* 遺伝子の多型性を調査した。また、*MC1R*、*PMEL*、*LYST* 遺伝子が本品種の毛色に与える影響も調査した。

##### 1. 熊本系褐毛和種における経済形質関連遺伝子の遺伝子構造

ウシ経済形質に対する効果が確認されている *EDG1*、*SREBP-1*、*SCD*、*FASN*、*LYST*、*F11* の優良アリル頻度を熊本県下で飼養された褐毛和種集団と黒毛和種集団で比較した。その結果、*SCD*、*FASN*、*NCAPG* では褐毛和種集団でより高い優良アリル頻度が確認され

た。一方、*EDG1*、*SREBP-1*の優良アリル頻度は黒毛和種集団で高かった。また、*F11*の発症アリルが褐毛和種集団で多数検出された (Fig. 4)。次いで、1990年代の褐毛和種集団と2018年の褐毛和種集団の優良アリル頻度を比較した。現在の集団ではSCDの優良アリル頻度は中程度増加していた。しかしながら、*F11*の発症アリル頻度は約8倍も増加していた。現在の集団に対し、種雄牛ごとに解析を行ったところ、この*F11*発症アリルの増加には種雄牛Aが大きく関与していることが分かった。種雄牛Aの産仔は*SCD*、*FASN*、*NCAPG*の優良アリルが他の種雄牛の産仔と比べて高頻度であることから、この種雄牛の使用により2018年の褐毛和種集団において優良アリル頻度が増加したことが示唆された。すなわち、種雄牛Aが優れた経済形質を保持していたため*F11*発症アリルが拡散したと考えられる。以上の結果より、熊本系褐毛和種は枝肉重量のみならず脂肪酸組成においても秀でた品種であることが示唆されたが、今後の育種選抜においては集団内より*F11*発症アリルを排除する必要がある。

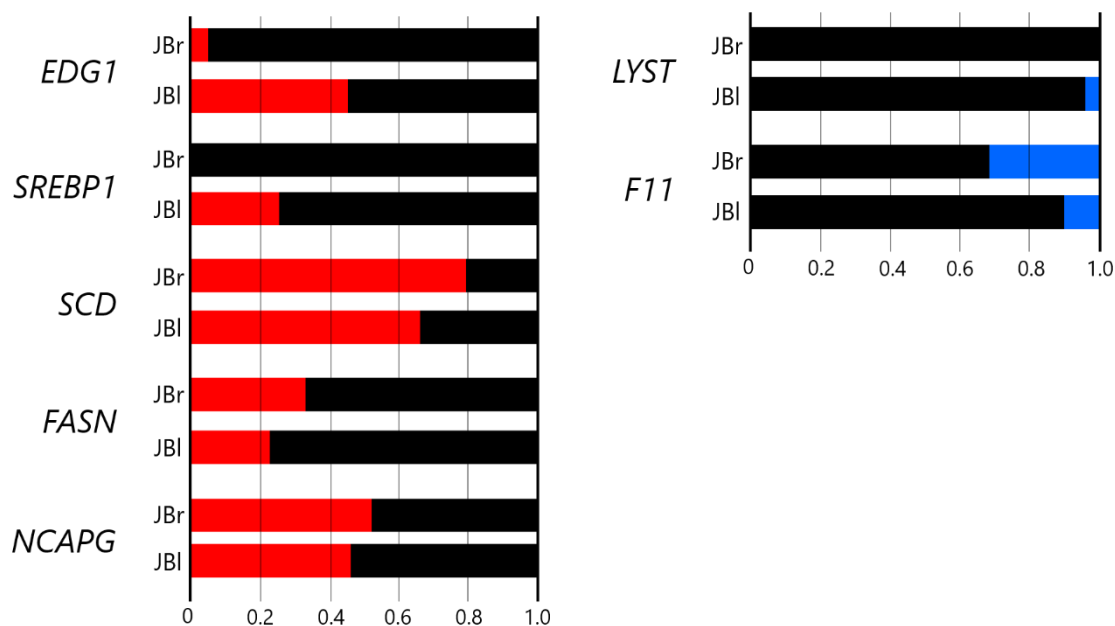


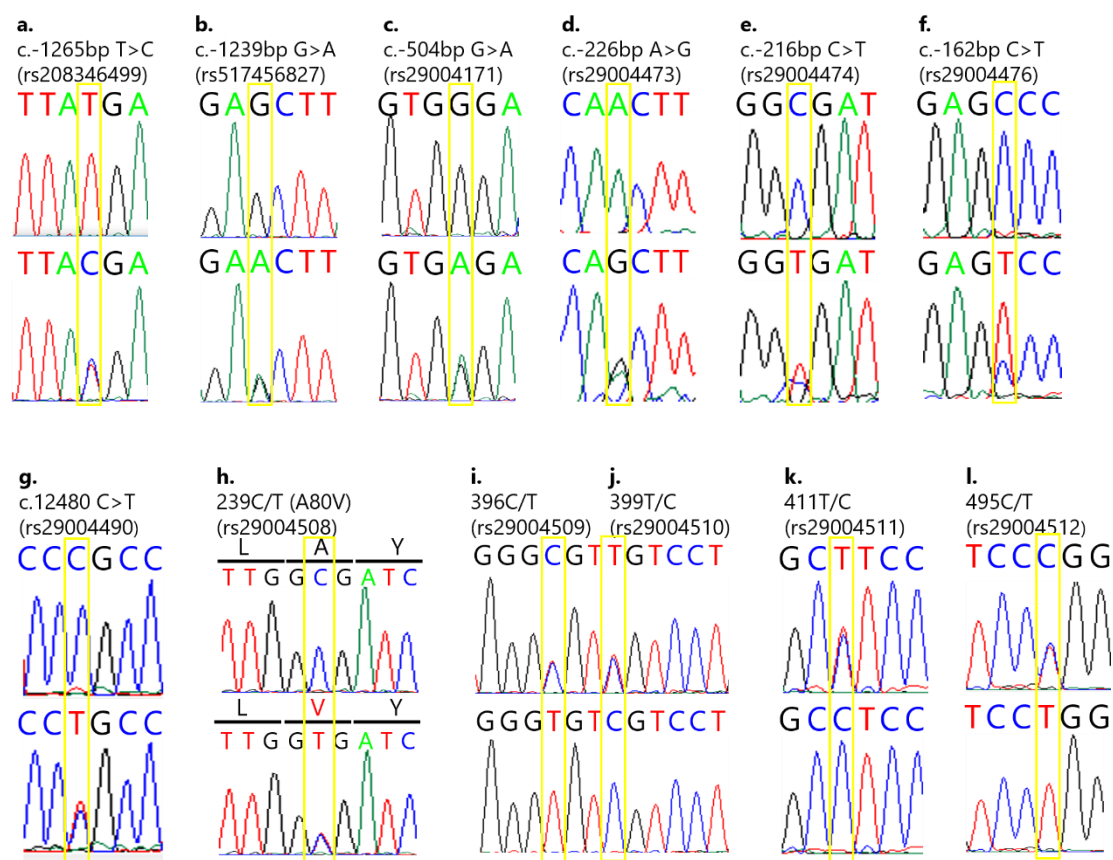
Fig. 4 熊本系褐毛和種における経済形質関連遺伝子の遺伝子構造.

経済形質に関わる各遺伝子の優良アリル頻度を赤で示し、遺伝病の発症アリルを青で示した。JBr: 褐毛和種、JBl: 黒毛和種

## 2. 熊本系褐毛和種における *Leptin* 遺伝子の多型性調査

様々な形質への効果が知られる *Leptin* 遺伝子における多型探索を行い、同定された DNA 多型の効果の検証を行った。プロモータ領域では 6 個 (c.-1265bp T>C、c.-1239bp G>A、c.-504bp G>A、c.-226bp A>G、c.-216bp C>T、c.-162bp C>T) の DNA 多型が同定され、タンパク質翻訳領域である第 3 エキソンではミスセンス変異が 1 個 (239C/T) とサイレンス変異が 4 個 (396C/T、399T/C、411T/C、495C/T) 同定された (Fig. 5)。プロモータ領域

の DNA 多型ではその全てで結合する転写因子に変化が予測された。ミスセンス変異は黒毛和種における脂肪酸組成への影響が明らかにされている多型だった。サイレンス変異の 4 個の DNA 多型の内、399T/C が mRNA 二次構造に大きく変化させることが予測された。従って、399T/C は *Leptin* タンパク質の発現量に影響し、経済形質に関与することが示唆される。本研究により、ウシ経済形質に影響する可能性がある DNA 多型を複数同定したが、多くはその影響が不明である。また、品種によって効果の表れ方が異なる DNA 多型も存在するため、今後の研究ではこれらの DNA 多型に対する集団解析により、熊本系褐毛和種における具体的な効果の検証を行う必要がある。



**Fig. 5** 熊本系褐毛和種における *Leptin* 遺伝子の多型性.

本研究で同定された DNA 多型の位置と波形データを記した。各々上段でデータベース上の配列を下段で同定された多型の配列を表しており、黄色の枠で囲われた部分が多型位置である。括弧内は各 DNA 多型の Reference SNP ID number である。a から f はプロモータ領域で、g は第 2 イントロンで、h から l は第 3 エキソンで同定された DNA 多型である。第 3 エキソンで同定された DNA 多型の内、h はミスセンス変異で第 80 番目のアミノ酸をアラニンからバリンへと置換する。



### 3. 熊本系褐毛和種の毛色決定機構の解明

熊本系褐毛和種はその被毛が褐色であることから命名された品種だが、どのような遺伝子とその毛色決定に関わるのかについては不明である。昨年度の研究で *MC1R* 遺伝子において熊本系褐毛和種の毛色決定に関わる候補 DNA 多型を同定したが、その具体的な影響は不明である。そこで、本研究では熊本系褐毛和種における *MC1R* g.1154G>A の対立遺伝子頻度を調査した。その結果、先行研究で確認された理論上は優性黒色を呈する対立遺伝子である E<sup>D</sup> アリルを持つ個体は全て g.1154G>A の A アリルを持つことが示された (Table 2)。このことより、g.1154G>A の A アリルは毛色の褐色化を引き起こす突然変異であり、その効果は E<sup>D</sup> アリルに対して優性であることが示唆され、熊本系褐毛和種の毛色は *MC1R* 遺伝子の g.593G>- における e アリルおよび g.1154G>A における A アリルによって生じると考えられた。また、熊本系褐毛和種では毛色が通常より淡い褐色となる異毛色の個体が度々出生されるが、淡色化を引き起こす具体的な機構は不明である。ウシでは毛色の淡色化に関与する遺伝子として *PMEL* 遺伝子および *LYST* 遺伝子が報告されているため、本研究では淡褐色の熊本系褐毛和種を対象としてこれらの遺伝子における既知の DNA 多型に対する遺伝子型判定を行ったが、これらの DNA 多型では熊本系褐毛和種における毛色の淡色化は説明できないことが明らかにされた。今後の研究では全ゲノムシーケンスによる網羅的解析を行い、淡褐色個体に特異的な DNA 配列を同定することを予定している。

**Table 2 *MC1R* 遺伝子の遺伝子型頻度および対立遺伝子頻度**

DNA 多型	頭数	遺伝子型頻度			対立遺伝子頻度	
		E <sup>D</sup> /E <sup>D</sup>	E <sup>D</sup> /E <sup>+</sup>	E <sup>+</sup> /E <sup>+</sup>	E <sup>D</sup>	E <sup>+</sup>
g.579T>C	74	0.04 (3*)	0.04 (3*)	0.92 (68)	0.06	0.94
		E/E      E/e      e/e      E      e				
g.593G>-	74	0.00 (0)	0.08 (6*)	0.92 (68)	0.04	0.96
		G/G      G/A      A/A      G      A				
g.1154G>A	70	0.79 (57)	0.14 (11**)	0.07 (6*)	0.86	0.14

遺伝子型頻度に併記した数字は個体数を表す。\*: これらの個体は同じ個体である。\*\*: g.593G>- が E/e 型だった個体が 1 個体含まれる。

### V. 総括

今年度は、行動学的解析により、これまでの経験則で言及されてきた穏やかで管理がしやすい熊本系褐毛和種の性質について、黒毛和種と比較した従順性や対人反応性の評価によってその一端を明らかにすることが出来た。生理および管理学的解析においては、ヒト用活動量計による採食行動の記録技術が確立できた。また、遺伝学的解析により、褐毛和種の遺



伝的特性が一部明らかになるとともに、DNA 育種で用いるマーカーの候補となる DNA 多型を同定した。さらに、熊本系褐毛和種の毛色決定への関与が示唆される新規 DNA 多型の同定に成功した。

これらの結果を踏まえて、熊本系褐毛和種の特性を解明し、その性質についても明らかにするだけでなく、放牧管理における採食地としての利用と野生生物との関係についての詳細な検討を行っていくことで、熊本系褐毛和種における評価基準の確立、ブランド力の強化を通じた地域再生だけでなく持続的な地域社会の発展に貢献できるだろう。

## VI. 業績

### 研究成果

#### 【国内学会発表】

1. 高向紘子・古謝政長・伊藤秀一・松本大和. *MC1R* 遺伝子におけるウシ毛色の褐色化に関わる候補 DNA 多型の同定. 日本動物遺伝育種学会第 19 回大会. 2018 年 9 月 (優秀発表賞受賞)
2. 栗原哲哉・井上彬・今井早希・樫村敦・松本大和. 熊本系褐毛和種集団の遺伝的特性. 日本畜産学会第 125 回大会. 2019 年 3 月
3. 今井早希・樫村敦・松本大和・森友靖生. 市場におけるウシの扱いやすさと対人反応性行動に関する研究. 動物の行動と管理学会 2019 年度春季研究発表会. 2019 年 3 月

#### 【国際学会発表】

1. Kurihara T, Inoue A, Matsumoto H. The present situation of Japanese Brown cattle in Kumamoto prefecture based on genotype frequency. The 18th Asian Agricultural Symposium. December, 2018
2. Nagai Y, Inoue A, Kurihara T, Matsumoto H. Polymorphism identification in the *leptin* promoter of Japanese Brown cattle. The 18th Asian Agricultural Symposium. December, 2018