

プロジェクト名：熊本系褐毛和種の特性評価

松本 大和¹、櫻村 敦¹、今井 早希¹、稲永 敏明¹、服部 法文²、神鷹 孝至²、今川 和彦³

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および衛生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

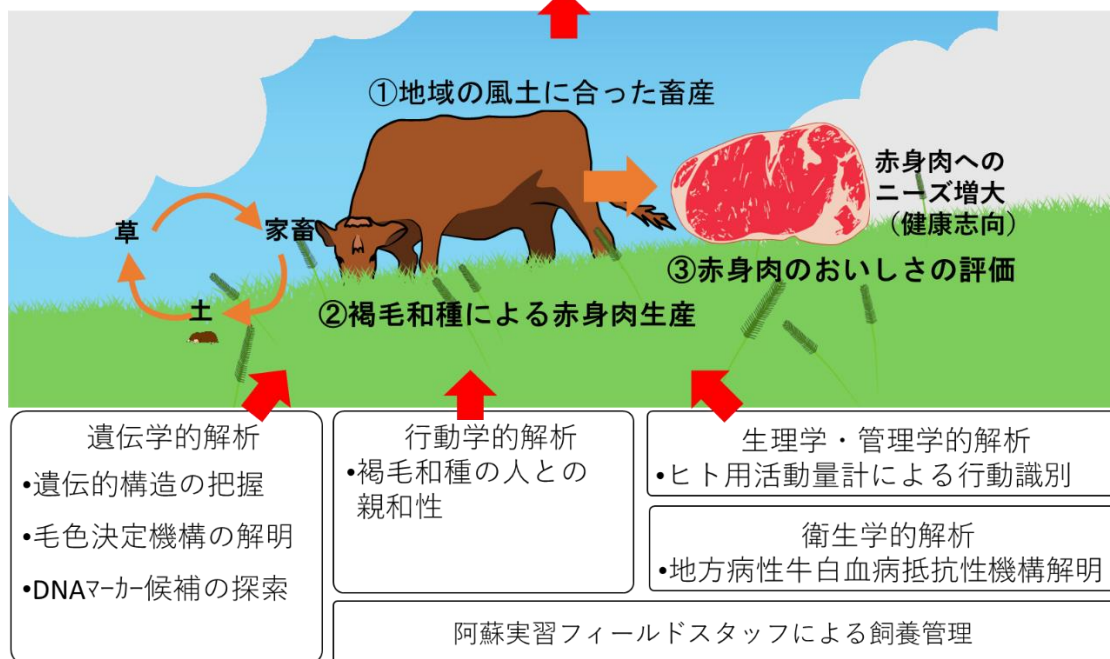


Fig. 1. 本プログラムの目標とその達成に向けた各課題の実施体制。

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・管理学的解析は樫村が、行動学的解析は今井が、遺伝学的解析は松本が、衛生学的解析は稲永がそれぞれ担当した。

II. 行動的解析および生理学的解析

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。ウシは遺伝的多様性をある程度維持しているため、昨年度に引き続き対人反応性の行動学的解析を実施し、サンプル数を増加して比較検討した。加えて、ストレス応答の指標として利用されているコルチコステロン値を測定し生理学的検討をおこなった。また、褐毛和種の特長としてあげられる耐暑性を対象とし、体温や呼吸数など体温調整に関する項目を対象とし、比較検討した。

1. 対人反応性および唾液中コルチゾール濃度の品種間差

熊本県家畜市場に出展された全てのウシ (215 ~ 394 日齢) を対象とし繋留されている

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 (Table 1)、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) を示した個体は黒毛和種で 175 頭であったのに対し、褐毛和種では 288 頭と、褐毛和種でスコア 1 と評価された頭数が有意に多かった。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 122 頭に対し、褐毛和種では 66 頭であり、褐毛和種で少ない傾向が認められた (Fig. 2)。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。

さらに、対人反応性試験においてスコア 1 およびスコア 4 と評価されたウシを選抜し、ストレス反応性の指標に用いられる唾液中コルチゾールを測定した。その結果、スコア 1 の黒毛和種では 0.14 ± 0.04 、褐毛和種では 0.17 ± 0.02 、スコア 4 の黒毛和種では 0.13 ± 0.05 、褐毛和種では 0.18 ± 0.02 を示し有意差は認められなかった。本年度は解析対象頭数を増やすことで、褐毛和種の気質は穏やかで管理がしやすいと言われてきた根拠の一端をより強く証明する結果が得られた。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、同一環境で飼育されている黒毛和種および褐毛和種を対象として環境要因のばらつきを排除した上での行動学的解析およびコルチゾール値の比較検討を行う。

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	対人反応性の行動学的指標
1	自発的な接近 (匂いを嗅ぐ、または舐める)
2	反応しない (動かず、顔も背けることはない)
3	やや反応する (後ずさり、または顔を背ける)
4	非常に高い反応を示す (激しい逃避行動を示す)

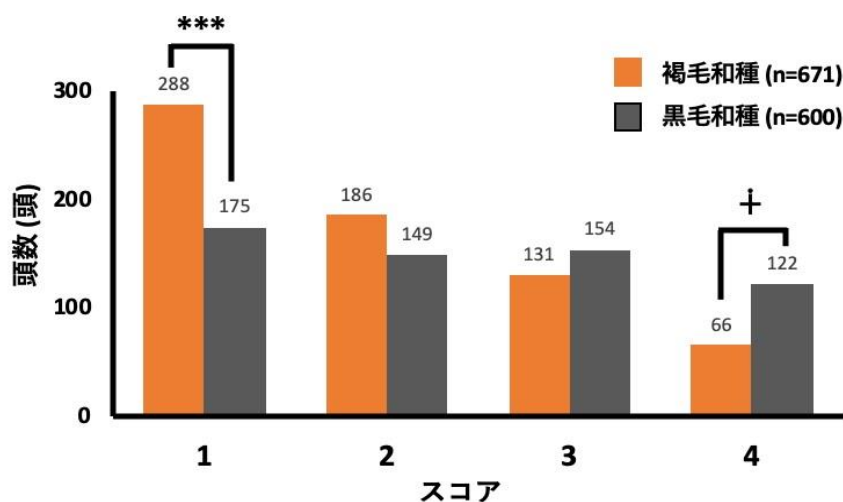


Fig. 2 対人反応性のスコア分布

各品種内における頭数のスコア分布を示す。家畜市場において、実験者が一定の速度で対象牛に近づいた際に示す行動を評価した。カイニ乗検定, *** $P < 0.001$, + $P < 0.1$ 。

2. 耐暑性の品種間差

先行研究から、ウシは気温および湿度より算出される THI が 72 以上で暑熱ストレスを感知し、乳生産量など経済形質へ影響が生ずるとされている。そこで、本研究では褐毛和種の耐暑性を検証するため、同一環境下で飼育されている繁殖肉用牛の黒毛および褐毛和種を対象とし THI が 72 以上または以下の際の体温および呼吸数、直腸温度を数値化し比較検討した。その結果、いずれの環境下においても呼吸数は暑熱環境下 (NE) で上昇を示した。一方で、直腸温度は周年放牧されている褐毛和種で暑熱環境下、また、夏期のみ放牧を行う夏山冬里の飼養形態で両品種ともに有意にて低下する結果が得られた (Fig. 3)。しかし、直腸温度の変化は肉用牛の平均体温範囲内での変化であり、生体機能へ影響を及ぼす変化であると言えない。先行研究では、代謝量を変化させずに体温維持できる環境を最適温度域、深部体温の増加により代謝率が上昇する温度を上臨界温度と定義している。呼吸数は熱性多呼吸のため最適温度域を逸脱しているという指標として、直腸温度の上昇は上臨界温度に達したことを示すとされている。本結果では、呼吸数は暑熱環境 (THI > 72) により有意に上昇したが直腸温度は平熱の範囲内であったことから、繁殖肉用牛にとって阿蘇の実験環境 ($72 < \text{THI} < 78.8$) は暑熱環境でない可能性が示唆され、暑熱ストレスを受けにくい環境であると考えられる。今後、本実験では生理学的指標を比較検討したが、細胞および遺伝子レベルでの変化も含め、褐毛和種の耐暑性を総合的に比較検討して行く予定である。

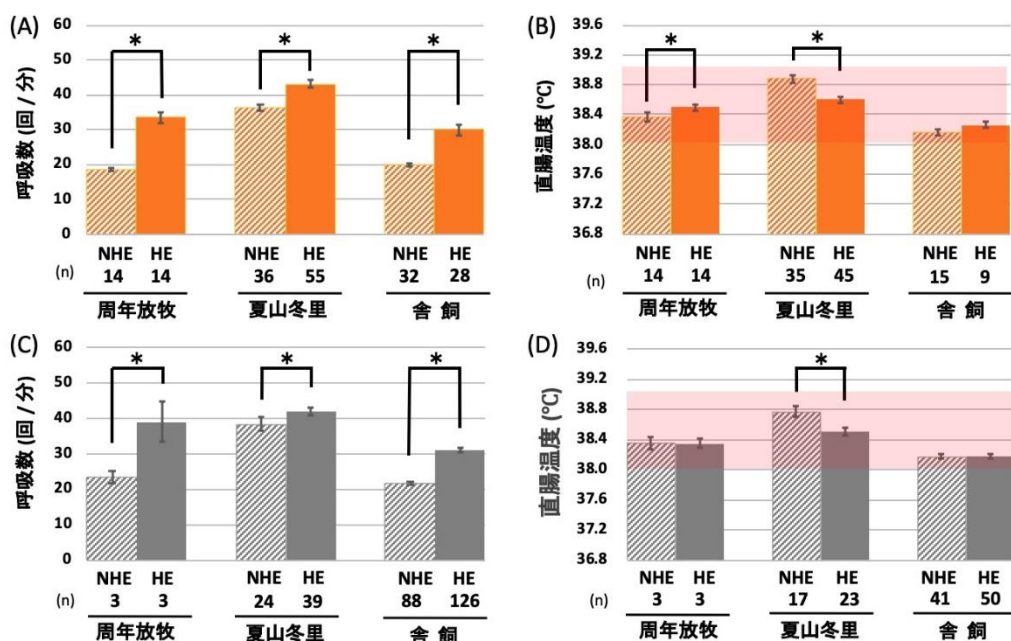


Fig. 3 品種ごとの温湿度変化への反応性

褐毛和種における (A) 呼吸数 および (B) 直腸温度の変化。黒毛和種における (C) 呼吸数 および (D) 直腸温度の変化を示す。NHE は非暑熱環境 (THI>72), HE は暑熱環境 (THI≤72) を示す。Mann-Whitney U test, *P < 0.05。

III. 生理学・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として着目される一方で、技術確立が課題となっている。例えば、傾斜地の多い中山間地域の放牧地では、放牧牛がいかに関放牧地を利用しているかが不明であり、地形による利用の偏りすなわち選択性が存在すると考えられた。また、この放牧牛による放牧地の選択的な利用や採食、あるいは放牧地という開放空間の創出によって、野生哺乳類の生息地としても放牧地が多様な機能を有することが考えられた。そこで、今年度は、放牧牛の生息地利用を検証するとともに、放牧地周辺に生息する野生小型哺乳類について調査した。

1. 放牧した褐毛和種の生息地利用

東海大学阿蘇実習フィールド放牧地のうち、人工草地で構成された平坦な放牧地と、半自然草地で構成された傾斜のある放牧地において、ヒト用活動量計と GPS ロガーを装着した放牧牛 1 個体の生息地利用について検証した。実際の行動観察を元に採食の有無と活動量から作成した決定木解析により採食行動を判定した。そして、GPS ロガーの座標情報から採食場所を決定し、傾斜区分図上で利用している傾斜区分と存在する傾斜区分の比較から選択性について検証した。その結果、農学教育実習センターの放牧地において、平坦地では急斜面を回避することが明らかになった (Table 2) 傾斜地においては入牧後数日の間に平坦地を選択し、日数の経過とともに、傾斜地を利用していき、その後再度平坦地を利用することが明らかになった (Table 2)。このことから、平坦地を選択的に利用する可能性が示唆

Table 2 平坦地および傾斜地における放牧牛の傾斜区分毎の選択性とその時間的推移。

	入牧後 日数	傾斜度区分 (°)						
		低 0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	高 30-35
平坦地	3	+	+		-	-	-	-
	4				-	-	-	-
	5			+		-	-	-
	6	+	-		-	-	-	-
	7	-	-			-	-	-
	8							
	9							
傾斜地	2							
	4	+	+		-	-	-	-
	6	-	-		+		-	-
	7	-	-					-
	8	-	-					-
	9	-	-		+			-
	11							
	13							
14	+	+	-	-	-		+	
15	-	-		-			+	
16								

+が選択であることを示し、-が回避を示す。空欄については選択性がない、つまり機会的に利用していることを示す。

されるものの、餌資源としての草本類の種構成や質、あるいは餌資源量としてのバイオマスの減少などが、その選択性により強い要因として係わっていると考えられた。

2. 野生哺乳類の生息地としての放牧地の多面的機能

野生哺乳類としては、放牧牛の採食活動によって植生被度や草丈の減少と行った環境改変の影響を受ける地表徘徊性の小型哺乳類、踏圧や採食によって土壌環境の改変の影響を受ける地下生哺乳類、そして放牧地による開放空間の創出といった改変の影響を受ける飛翔生哺乳類の3タイプの生息型の野生小型哺乳類に着目した。自動撮影カメラによる野生小型哺乳類（齧歯目やトガリネズミ形目）の出現頻度は、カメラ設置地点の草高が高いほど多くなることが明らかになった

(Fig. 4: 推定値 = 0.0362, $p < 0.001$)。地下生哺乳類の生息分布の指標としてモグラ塚の形成数に着目すると、人工草地よりも半自然草地の方がモグラ塚の形成数は少ないことが明らかとなった (Fig. 5)。また、飛翔性哺乳類のコウモリ類については、超音波の周波数毎の記録から飛翔する種を推定した結果、放牧地や耕作地において開放空間で飛翔するアブラコウモリが発する 45 ~ 50 kHz の周波数帯が記録され、放牧地に隣接する人工林内ではそれらより低い 20 ~ 25 kHz, 65 kHz 以上の周波数帯だけが記録された。

これらの結果から、褐毛和種による放牧地での地形だけでなく餌資源の選択的利用により、植生の多様化、特に草高の多様化が生じて小型野生哺乳類相の放牧地内での個体数を、草地の土地利用によるモグラ類の生息分布を、さらには放牧による開放空間の創出によりコウモリ相を多様化させている可能性が示唆された。今後も褐毛和種の放牧地における生息地選択の解明を試みるとともに、これによりもたらされる環境の異質性がいかに野生哺乳類相の生息分布を多様化させる要因になり得るかの詳細を明らかにしていく。

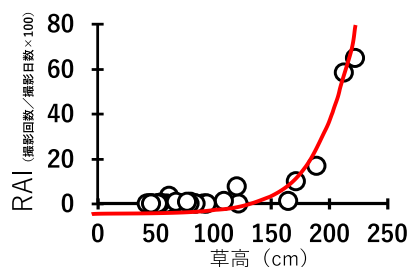


Fig. 4 草高と小型哺乳類の相対的撮影頻度の関係. 赤線が散布図にモデルを宛てはめた際の曲線を示す.

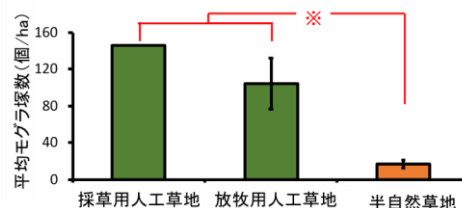


Fig. 5 人工草地と半自然草地におけるモグラ塚数の比較. 人工草地については、採草用と放牧用を合わせて日火半自然草地と比較した.

IV. 遺伝学的解析

褐毛和種は黒毛和種に次いで飼育頭数が多い和牛品種であり、赤身肉生産に適した品種であることから近年注目されている。品種名の由縁は「あか一枚」と称される褐色単色の毛色を有することに起因するが、稀に淡色化した個体が現れる。この表現型は品種特性に負の

効果を持ち、淡色化した個体は淘汰の対象となる。従って、家畜の毛色は潜在的な経済形質であると考えられる。これまでにウシ淡色化の原因候補 DNA 多型がいくつか報告されているが、褐毛和種の淡色化を引き起こす分子基盤は不明である。そこで、本年度は淡色化個体を対象とした全ゲノム解析により、この表現型を引き起こす原因 DNA 多型の探索を試みた。

1. 熊本系褐毛和種における毛色異常発生機序の解明

淡色化を呈した熊本系褐毛和種 1 個体を全ゲノム解析によるエクソーム解析に供した。また、コントロール群として通常の毛色を呈する褐毛和種、黒毛和種各 5 頭のプールサンプルを用い、同定した DNA 多型の毛色への影響を評価した。既知の毛色関連遺伝子を対象として多型探索を行った結果、*PMEL* と *LYST* が原因候補遺伝子として浮上し、*PMEL* 遺伝子では 4 個、*LYST* 遺伝子では 2 個の DNA 多型が淡色化の候補原因 DNA 多型と考えられた。解析した DNA 多型には毛色の淡色化への関与が示唆されるものが複数存在したが、その後の遺伝子型判定により、*PMEL* p.L18del のみが淡色化個体特異的な DNA 多型であり、この多型こそが褐毛和種の淡色化を引き起こす原因 DNA 多型であると考えられた (Table 3)。*PMEL* タンパク質の第 18 番目のアミノ酸はシグナルペプチドドメインに位置するため、*PMEL* p.L18del はこのドメインの機能に影響し、*PMEL* タンパク質の輸送や局在に影響すると考えられた。今後の研究では本学実習フィールドの飼養する淡色化個体を含む褐毛和種集団を対象とした遺伝子型判定を行い、*PMEL* p.L18del と毛色との相関を調査すると共に、細胞学的解析により *PMEL* p.L18del が当該遺伝子に及ぼす影響を分析することを予定している。

Table 3 候補原因 DNA 多型と毛色との関連

サンプル ID	毛色	<i>PMEL</i>				<i>LYST</i>	
		p.L18del	p.A22G	p.S36L	p.A612E	p.H2015R	p.A2575V
KJBR-1	褐色	+/+	A/A	S/S	E/E	H/H	A/A
KJBR-4	褐色	+/-	A/A	S/L	A/E	H/H	A/A
KJBR-17	褐色	+/+	G/G	S/L	A/E	H/H	A/V
KJBR-44	褐色	+/-	G/G	S/L	A/E	H/H	V/V
KJBR-56	褐色	+/+	A/G	L/L	A/E	H/H	V/V
KJBR-61	褐色	+/+	A/A	L/L	A/E	H/H	A/A
KJBR-70	褐色	+/-	A/A	L/L	E/E	H/H	A/V
KJBR-75	淡色	-/-	A/A	L/L	E/E	H/R	A/A
KJBR-76	淡色	-/-	A/A	L/L	E/E	H/H	A/V
KJBR-77	淡色	-/-	A/A	L/L	E/E	H/H	A/V

V. 衛生学的解析

地方病性牛白血病 (EBL) は、牛白血病ウイルス (BLV) の感染が原因の家畜伝染病の一つである。抗体陽性率が高いのに対し、現在のところワクチンはなく、また発症した場合、治療法もないことから、全国で問題となっている。熊本系褐毛和種は、以前より本疾病の発生が少ないことが知られていたため、本品種は遺伝的に本疾病に抵抗性を持つ可能性が考えられた。そこで本研究では、熊本県内の一般の繁殖農家 (熊本系褐毛和種および黒毛和種飼養農場) や酪農家において採材し、本品種と他品種 (黒毛和種およびホルスタイン種) の EBL に関する疫学的調査を実施した。これらは現在解析中であるため、データは示さないが、本品種の EBL 抵抗性メカニズムを明らかにすることで、EBL 抵抗性育種が可能となる可能性があるだけでなく、EBL の予防法や治療法に関する新たな知見が得られる可能性がある。

VI. 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、放牧という管理あるいは褐毛和種の放牧地利用によって、地表徘徊、地下生、飛翔性それぞれの野生哺乳類の生息分布を左右する一端を明らかにすることができた。また、遺伝学的解析により、熊本系褐毛和種の毛色異常を引き起こす最有力 DNA 多型を同定した。

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。

VII. 業績

研究成果

【国内学会発表】

1. 木村聡志・續凜・今井早希・樫村敦・稲永敏明・松本大和. 全ゲノムシーケンスによる熊本系褐毛和種の淡色化を引き起こす原因候補遺伝子の探索. 日本動物遺伝育種学会第 20 回大会. 2019 年 11 月 (優秀発表賞受賞)

【学術論文】

1. Matsumoto H, Kojya M, Takamuku H, Kimura S, Kashimura A, Imai S, Yamauchi K,

Ito S. (2020) *MC1R* c.310G>- And c.871G > A determine the coat color of Kumamoto sub-breed of Japanese Brown cattle. *Anim. Sci. J.* **91**(1): e13367. doi: 10.1111/asj.13367.

【紀要論文】

1. 今井早希・関口瑠璃賀・松本大和・樫村敦・稲永敏明・森友靖生. (2020) 市場における褐毛和種の従順性と対人反応性に関する行動学的研究. *東海大学紀要農学部*. **39**: 21-26.