

プロジェクト名：熊本系褐毛和種の衛生学的および遺伝学的特性解明

今川 和彦、村田 浩平、櫻村 敦、松本 大和、稲永 敏明

(1) 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、その高い放牧特性や赤身肉の生産能力から近年注目されている。褐毛和種の飼育頭数の増加は我が国の食の多様性を担保するものであり、本品種に対する迅速な育種改良が必要とされているが、本品種の遺伝的特性は十分には解明されていない。そこで、本研究では昨年度までに褐毛和種の淡色化を引き起こす原因多型として同定した *PMEL* p.L18del が毛色以外の表現型にどのような効果を持つかを検討した。また、遺伝病の原因遺伝子である *LIMBIN*, *F11*, *LYST* 遺伝子における発症因子の頻度についても調査した。更に、脂肪酸組成や繁殖率等に影響することの知られる *LEP* 遺伝子の褐毛和種における効果についても解析した。

1. 褐毛和種の毛色淡色化原因多型が経済形質に与える効果

これまでの研究により我々は *PMEL* p.L18del が褐毛和種の毛色淡色化原因多型であることを明らかにしているが、現生集団におけるこの多型の頻度は不明であり、肉質等の経済形質への影響についても未検証である。そこで、本研究では褐毛和種 313 個体対象として PCR - RFLP 法による遺伝子型判定を行った。その結果、遺伝子型頻度は L/L 型が 0.68 (n = 214)、L/del 型が 0.30 (n = 94)、del/del 型が 0.02 (n = 5) であり、対立遺伝子頻度は L 型が 0.83、del 型が 0.17 だった。この多型が表現型値（枝肉重量、ロース芯面積、バラ厚、皮下脂肪厚、推定歩留、BMS、BCS、肉の光沢、肉の締まり、肉のきめ、BFC、脂肪の色沢と質）に与える効果を調べたところ、BMS ($p = 0.03$)、肉の光沢 ($p = 0.02$)、肉の締まり ($p = 0.01$)、肉のきめ ($p = 0.03$) に有意性が認められた。遺伝子型とこれら形質との相関を分析した結果、肉の締まりでは L/del 型 (3.34 ± 0.09) が L/L 型 (3.06 ± 0.06) より有意に高い値を示した (Table 1)。他の形質においても同様の傾向であり、褐毛和種の経済形質においては毛色淡色化を引き起こす del 型が優良対立遺伝子であることが示唆された。今後の研究では *PMEL* 遺伝子が肉質に影響を及ぼす具体的なメカニズムの解明が求められる。

Table 1 *PMEL* p.L18del の枝肉形質への効果

枝肉形質	<i>PMEL</i> p.L18del	
	L/L (n = 214)	L/del (n = 94)
BMS	4.29 ± 0.12 ^b	4.73 ± 0.17 ^a
肉の光沢	3.37 ± 0.06 ^b	3.60 ± 0.09 ^a
肉の締まり	3.06 ± 0.06 ^b	3.34 ± 0.09 ^a
肉のきめ	3.51 ± 0.05 ^b	3.72 ± 0.08 ^a

異なる肩文字は有意差を示す。

2. 褐毛和種における遺伝性疾患発症因子の分布

育種改良においては遺伝的不良形質を後代に残さないことも重要で、遺伝性疾患の保因牛は淘汰の対象となる。遺伝性疾患の保因牛の把握は生産性の低下を防ぐために重要だが、熊本系褐毛和種における遺伝性疾患に

ついで知見は限られている。本研究では、軟骨異形成性矮小体軀症の原因突然変異である *LIMBIN* c.2054-2055delCAinsG および c.1356T>C、血液凝固第 XI 因子欠損症を引き起こす *F11* c.870_884ins、チェデアックヒガシ症候群の発症因子 *LYST* p.His2015Arg について、褐毛和種現生集団における状況を調査した。遺伝子型判定には 28 頭の種雄牛の産仔から構成される熊本系褐毛和種 92 頭を用いた。その結果、軟骨異形成性矮小体軀症および血液凝固第 XI 因子欠損症では保因牛が検出された (Table 2)。軟骨異形成性矮小体軀症は c.2054-2055delCAinsG が G/G 型の時発症するが、c.2054-2055delCAinsG と c.1356C>T の G アリルと T アリルを各々ヘテロ接合で保持する場合も発症に至る。c.2054-2055delCAinsG の CA/G 型の個体が 1 頭検出されたが、この個体の半きょうだいは全て CA/CA 型だったため、G アリルは母牛に由来することが示唆された。また、c.1356C>T の C/T 型と T/T 型の個体が各 1 頭ずつ検出されたため、種雄牛中に c.1356C>T の T アリルを保因するものがあることが判明した。軟骨異形成性矮小体軀症は複合ヘテロ接合体で発症するため、今後本症の発症個体が現れる危険性が強く示唆された。血液凝固第 XI 因子欠損症の原因変異である L アリルは 16 頭の種雄牛の産仔で検出された。そのうち 6 頭の種雄牛の産仔には遺伝子型が L/L 型のものがいたことから、これらは保因牛であることが明らかになった。

Table 2 褐毛和種における *LIMBIN*, *F11*, *LYST* 遺伝子の遺伝子型頻度・対立遺伝子頻度

突然変異	遺伝子型頻度			対立遺伝子頻度	
	wt/wt	wt/A	A/A	wt	A
<i>LIMBIN</i>	0.98	0.01	0.01	0.98	0.02
c.1356T>C	(n = 90)	(n = 1)	(n = 1)		
c.2054-2055 delCAinsG	0.99 (n = 91)	0.01 (n = 1)	0.00 (n = 0)	0.99	0.01
<i>F11</i>	0.62	0.33	0.05	0.78	0.22
c.870_884ins	(n = 57)	(n = 30)	(n = 5)		
<i>LYST</i>	1.00	0.00	0.00	1.00	0.00
p.His2015Arg	(n = 92)	(n = 0)	(n = 0)		

3. *LEP* 遺伝子内多型の褐毛和種における効果

LEP 遺伝子では様々なウシ品種で多岐にわたる形質への影響が報告されている。これまでに我々は褐毛和種における本遺伝子の多型性を調査し、複数の DNA 多型を同定したが、それらの具体的な効果については不明である。本研究では他品種での効果が確認されているミスセンス変異 p.A80V (c.239C>T) およびサイレンス変異だが遺伝子発現に影響する可能性がある c.399T>C に着目して解析を行った。供試動物は褐毛和種 313 頭であり、遺伝子型と格付け値 (枝肉重量、ロース芯面積、バラ厚、皮下脂肪厚、推定歩留、BMS、BCS、肉の光沢、肉の締まり、肉のきめ、BFC、脂肪の色沢と質) の相関を調査した。p.A80V の遺伝子型頻度は A/A 型が 0.85 (n = 268)、A/V 型が 0.14 (n = 44)、V/V 型が 0.01 (n = 1) で、対立遺伝子頻度は A 型が 0.93、V 型が 0.07 だった。c.399T>C では遺伝子型頻度が T/T 型が 0.05 (n = 16)、T/C 型が 0.36 (n = 113)、C/C 型が 0.59 (n = 184) であり、対立遺伝子頻度は T 型が 0.23、C 型が 0.77 だった。統計解析の結果、p.A80V は BMS (p = 0.01)、肉の光沢 (p = 0.04)、肉の締まり (p = 0.01)、肉のきめ (p = 0.04) に有意な効果が認められた。BMS は A/A 型 (4.55 ± 0.11) が A/V 型 (3.84 ± 0.25) に比べ有意に高い値を示した (Table 3)。その他の形質についても A/A 型は A/V 型より有意に高い値であったため、調査した形質においては A 型が褐毛和種の優良対立遺伝子であり、*LEP* p.A80V は褐毛和種においても DNA マーカーとして利用可能であると考えられた。

Table 3 LEP p.A80V の枝肉形質への効果

枝肉形質	p.A80V	
	A/A (n = 268)	A/V (n = 44)
BMS	4.55 ± 0.11 ^a	3.84 ± 0.25 ^b
肉の光沢	3.49 ± 0.05 ^a	3.22 ± 0.12 ^b
肉の締まり	3.21 ± 0.06 ^a	2.84 ± 0.13 ^b
肉のきめ	3.63 ± 0.05 ^a	3.38 ± 0.11 ^b

異なる肩文字は有意差を示す。

(2) 衛生学的解析

1. 褐毛和種における地方病性牛伝染性リンパ腫 (EBL) の発症抵抗性に関する解析

地方病性牛伝染性リンパ腫 (EBL) は牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV) 感染が原因で起こる牛の伝染病である。EBL の原因病原体である BLV はレトロウイルスであり、血液中の B リンパ球に感染し、宿主細胞のゲノムに「プロウイルス」として組み込まれ、やがて B リンパ球の腫瘍化を起こし、感染牛の 30%程度に持続性リンパ球増多症をもたらす。感染牛にはこの段階でもとくに症状はないものの、一部は全身に多発性のリンパ腫を発症し、起立不能や食欲不振といった牛伝染性リンパ腫の症状を発症する。本研究では、多くが熊本県内で飼養されている和牛の一品種である熊本系褐毛和種 (褐毛和種) において、牛伝染性リンパ腫の発生が非常に稀であることに注目した。2018 年度より、熊本県と共同で疫学調査を行ったところ、褐毛和種の抗体陽性牛において、血中プロウイルス量が、黒毛和種やホルスタイン種と比べて顕著に低く保たれていることを明らかにした。これらのことから、本年度は、褐毛和種の BLV 感染牛における血中プロウイルス量が低いレベルで保たれるメカニズムを解明することを目的とする。

このため、供試牛の中から、褐毛和種の BLV 抗体陰性牛 4 頭、抗体陽性牛 8 頭 (低 PVL 牛 4 頭、高 PVL 牛 4 頭) の血液から抽出した RNA を用い、RNA シーケンス解析を行い、とくに低 PVL 牛と高 PVL 牛の間で発現レベルに差の見られた遺伝子や Gene Ontology (GO) 解析の結果、有意に発現変動遺伝子が多く含まれていた GO より候補遺伝子を選抜した。また、近縁なウイルスであるヒト T 細胞指向性リンパ腫ウイルス 1 型 (HTLV-1) の知見からも候補遺伝子を選抜した。その結果選抜された遺伝子 A~U までの、計 21 個の候補遺伝子について、リアルタイム定量 PCR による発現レベルの解析を実施した。供試牛として、5 農場由来の褐毛和種 18 頭および黒毛和種 6 頭 (Table 4) を用い、実験 1 と実験 2 に分けて行った。実験 1 は褐毛和種の陰性牛 6 頭、低 PVL 牛 7 頭、高 PVL 牛 5 頭の 3 区間で比較し、実験 2 は月齢や PVL の量が同等な、褐毛和種の低 PVL 牛 3 頭、高 PVL 牛 2 頭を、また黒毛和種の低 PVL 牛 3 頭、高 PVL 牛 3 頭を用い、二元配置の計 4 区間で比較した。なお、遺伝子名については都合により伏せており、以下の実験 1 と実験 2 で同じ遺伝子名のもは同一遺伝子である。

Table 4 The information of cattle used in the real-time quantitative PCR tests.

A				
Test 1		sample number	PVL(copies/10 ⁵ cells)	age(month-old)
not-infected		6	not tested	18.4~108.3
infected	low PVL	7	not detected~286	29.0~67.8
	high PVL	5	27122~34510	18.1~177.9
B				
Test 2		sample number	PVL(copies/10 ⁵ cells)	age(month-old)
Japanese Brown	low PVL	3	6~19	60.9~67.0
	infected high PVL	2	27122~27568	65.0~68.5
Japanese Black	low PVL	3	10~12	50.7~59.5
	infected high PVL	3	29881~34680	50.7~71.2

PVL: proviral loads

age: months from the birth day until the sampling day

実験1 褐毛和種間での比較

21 個の候補遺伝子のうち、一元配置分散分析の結果、 $P < 0.1$ まで含めると遺伝子 A~E までの 5 遺伝子に、発現レベルの差が認められた。遺伝子 A：陰性牛 vs 低 PVL 牛 vs 高 PVL 牛（平均相対発現量 \pm 標準偏差、以下同様） $= 0.0169 \pm 0.0079$ vs 0.0189 ± 0.0086 vs 0.0071 ± 0.0017 ($P < 0.05$)、遺伝子 B： 0.0002 ± 0.0000 vs 0.0001 ± 0.0000 vs 0.0002 ± 0.0001 ($P < 0.05$)、遺伝子 C： 0.1912 ± 0.0316 vs 0.1323 ± 0.0488 vs 0.0481 ± 0.0236 ($P < 0.001$)、遺伝子 D： 16.8932 ± 3.4748 vs 15.7634 ± 3.9229 vs 10.5748 ± 1.2537 ($P < 0.05$)、遺伝子 E： 0.1444 ± 0.1016 vs 0.1708 ± 0.1025 vs 0.0447 ± 0.0187 ($P < 0.1$)。多重比較検定の結果も併せると、遺伝子 A、D、E は高 PVL 牛が他の 2 区に比較して発現量が低く、遺伝子 C は PVL が上がるにつれて発現量が低下していた。また、遺伝子 B は低 PVL 牛に比べて高 PVL 牛で発現量が上昇していた。これらの遺伝子については、BLV の感染が起こっても発現レベルが維持されることで PVL の上昇を抑制している可能性が考えられる。その一方で、これらの現象が、PVL の差による結果である可能性も考えられ、またサンプル数も十分とは言えない。このため、サンプル数を追加するとともに、これらの遺伝子のタンパクレベルや、さらに、これらの遺伝子の上流にあたる遺伝子の発現レベルを比較する必要がある。また、併せて、PVL の差による影響を排除するために、PVL が同程度の褐毛和種および黒毛和種を比較することを目的として、実験 2 を実施した。

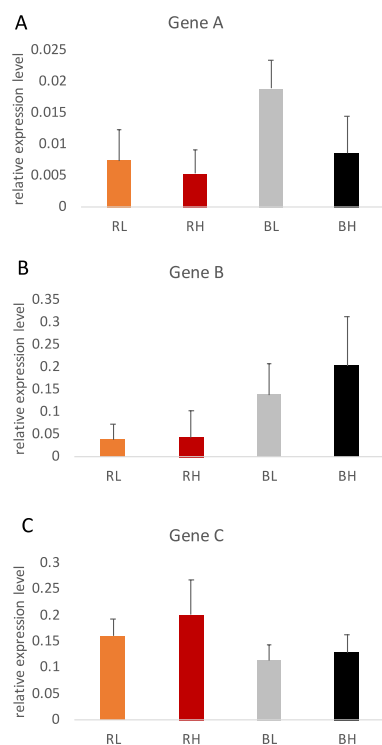


Figure 1 Relative expression levels of 3 genes which significantly differed between 2 breeds. data are mean \pm standard deviation(SD)
RL: Japanese Brown with low PVL
RH: Japanese Brown with high PVL
BL: Japanese Black with low PVL
BH: Japanese Black with high PVL

実験2 褐毛和種および黒毛和種間の比較

供試牛の中から、褐毛和種および黒毛和種の、それぞれ PVL を同程度とした低 PVL 牛と高 PVL 牛を選抜き、実験 1 と同様に、21 個の候補遺伝子の発現レベルの比較を行った。二元配置であるが、実験 2 の目的から、品種の差による影響が有意であった 3 遺伝子（遺伝子 A、B および C）の発現レベルのデータを Figure 1 に示した。遺伝子 A および B は、黒毛和種比べて褐毛和種で有意に低く、遺伝子 C は逆に、褐毛和種で有意に高かった（いずれも $P < 0.01$ ）。これらの遺伝子は、いずれも実験 1 における、褐毛和種間での比較でも差が見られており、これらの遺伝子の発現レベルの差は PVL の差による結果ではない可能性が示唆され、本研究の目的で

ある、褐毛和種と黒毛和種における BLV 感染牛における PVL の差に影響を及ぼしている可能性がある。実際に、これらの遺伝子は、HTLV-1 やその他のレトロウイルスの細胞から細胞への伝播などへの関与が知られているため、BLV の伝播において、これらの遺伝子が関与していることが考えられる。ただし、これらの遺伝子の発現量の差が、本研究の最終的な目的である、褐毛和種と黒毛和種の BLV 感染牛における PVL の差に影響を及ぼす根本原因であるとは断定できず、一現象を捉えているに過ぎない。このために、これらの遺伝子においても、サンプル数を増やすとともに、これらの遺伝子のタンパクレベルや、さらに、これらの遺伝子の上流にあたる遺伝子の発現レベルを比較する必要がある。

(3) 業績

研究成果

【国内学会発表】

1. 木村聡志・畠山東子・今井早希・稲永敏明・樫村敦・松本大和「*PMEL* p.L18del は熊本系褐毛和種における毛色の淡色化を引き起こす」第 21 回日本動物遺伝育種学会. 2020 年 11 月.
2. 畠山東子・木村聡志・稲永 敏明・樫村敦・松本大和「熊本系褐毛和種の毛色を制御する因子についての研究」日本畜産学会第 128 回大会. 2021 年 3 月.
3. 木村聡志・永井洋輔・福田雄太・稲永敏明・今井早希・樫村敦・松本大和「*Leptin* p.A80V は熊本系褐毛和種の BMS に影響する」日本畜産学会第 128 回大会. 2021 年 3 月.
4. 永野智大・村田浩平・中内拓海・稲永敏明・今川和彦・岡田工「阿蘇地域の草原における牧野管理がマダニ科の生息状況に及ぼす影響」日本蜘蛛学会第 52 回大会. 2020 年 11 月.

【学術論文】

1. Kimura S, Kurihara T, Inoue A, Imai S, Kashimura A, Matsumoto H. (2021) Elucidating genetic characteristics of the Kumamoto sub-breed of Japanese Brown cattle with DNA markers for economically important traits. *The Journal of Animal Genetics*. (印刷中)