

島根県における牛成長ホルモン遺伝子の多型について (第 2 報)

安田康明・佐々木恵美・山田彰司・長谷川清寿・安部茂樹

要 約 牛成長ホルモン遺伝子は DNA 育種に利用可能な候補遺伝子として注目され、SSCP や PCR-RFLP での多型確認とシークエンスによる一塩基多型も確認され報告されている。本研究では島根県が所有している黒毛和種種雄牛の牛成長ホルモン遺伝子第 5 エキソン型をダイレクトシークエンス法により判定し、アリルの頻度および遺伝子型と推定育種価との関係について検討した。A 型が 44%、B 型が 24.6%そして C 型が 31.4%であった。A 型の中で 2,291 番目が C に変異したアリルは 7 例認められ頻度は 5.93%であり 1 個体はホモでこの変異を認めた。また、アミノ酸の置換を伴う 2,277 番目の変異は 59 個体で 1 アリルにのみ認められその頻度は 0.85%となった。個体では AC 型が 18 個体と最も多く、BB 型 CC 型が 5 個体と少なかった。推定育種価との関係では GenotypeBC 型が AA 型より脂肪交雑基準値の推定育種価において高い傾向が認められ、DNA 育種のためのマーカー候補としての可能性が示された。

島根県立畜産試験場研究報告第 35 号, 5-8,2002

近年、遺伝子解析は畜産においても様々な新しい知見と共に技術として導入され、遺伝子病の診断や品種鑑別あるいは個体識別に利用されている。一方、家畜の育種に利用する試みも盛んに行われ、マイクロサテライトマーカーなどを利用した量的形質遺伝子座を究明する研究も行われており、島根県立畜産試験場も平成 10 年度から DNA 育種実用化のための研究に取り組んでいる。1980 年に塩基配列が決定された牛成長ホルモン遺伝子は DNA 育種に利用可能な候補遺伝子として注目され、Single-strand conformation polymorphism (SSCP) や Restriction fragment length polymorphism (RFLP) での多型確認とシークエンスによる一塩基多型も確認され報告されている^{2,6,8)}。第 5 エキソンは唯一多型が認められるエキソンであり、黒毛和種の多型解析の結果第 5 エキソン内に新しいアミノ酸置換を伴う変異を千国らが報告し、第 5 エキシソンの多型解析方法である ASM-PCR も開発された¹⁾。著者らは島根県の種雄牛凍結精液より調製した DNA を用いて第 5 エキシソンをダイレクトシークエンスした結果、新しいアミノ酸置換を伴う変異とホルスタイン種で報告されているアミノ酸の置換を伴わない変異を認め第 96 回畜産学会にて報告した。この変異は 2,291 番目の塩基で ASM-PCR の GHABR プライマーの塩基配列内に存在することから、ASM-PCR による判定に与える影響を検討した。また 59 個体の種雄牛の第 5 エキソン型判と育種価との関係に

ついて検討を加えたので報告する。

材料および方法

島根県が所有している 59 個体の黒毛和種種雄牛凍結精液から DNA を調製し試料とした。2,291 番目のアデニンをシトシンに置換した GHABR プライマーと従来のプライマーそれぞれにより ASM-PCR を実施し、Yao ら⁹⁾の GH6 プライマーを利用し得られた 404bp の PCR 断片をダイターミネーター法により直接シークエンシングし多型を判定した成績と比較検討した。

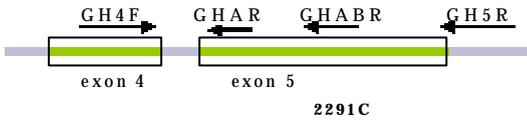
試料 DNA の調整

凍結精液試料は約 0.5ml (ストロー 1 本) を PBS 緩衝液 1ml に懸濁後 800G の遠心分離による精子沈殿を 3 回繰返し、500 μ l の 10mM Tris-HCl (pH8.5)、10mM EDTA、0.33% SDS、25mM DTT、30 μ g のプロテナーゼ K (Kodak) の溶液で 55 度 48 時間加熱溶解し、EASY-DNA Kit (InvitrogenTM) により Genomic DNA を調整した。

ASM-PCR 法による型判定にあたる 2,291 番目の変異の影響

プライマーとしたオリゴヌクレオチドは千国ら¹⁾の報告で示された配列を外注し利用した。ASM-PCR の原理は図 1 に示すとおりで、第 5 エキソン中に認められる 1 塩基多型が 3' 末端になるよう設計されたリバースプライマーにより目的の塩基を持つ断片のみを増幅させることで型を判定するものである。2,291 番目の変異はこ

ASM-PCR



2291Cの変異はChikuniらのASM-PCRのABRの配列

5-atgaccctcaggtacgtctccg-3 GHAB2291AR

5-atgaccggcaggtacgtctccg-3 GHAB2291CR

図1 ASM-PCR判定と2,291番目の変異の関係

のGHABRプライマーの塩基配列中に存在するため図1のような変異に対応したGHAB2291CRプライマーと従来のプライマーGHAB2291ARと判定結果を比較した。反応液は50μlであり、その構成は試料DNA25ng、dNTP50μM (each)、10×PCR Buffer (Perkin Elmer)5μl、DNAポリメラーゼ(AmpliTaq Gold Perkin Elmer)1.25ユニットとした。プライマーはGH4F、GH5Rをそれぞれ10pM、GHARとGHABRをそれぞれ3.2pMとした。反応はGeneAmp PCR System 9600(Perkin Elmer)で95 9分間の加熱後、94 30秒、60 45秒、72 45秒のサイクルを40回繰り返す、最後に72 7分加熱した。PCR終了後、10μlをエチジウムブロマイドを添加した2%アガロースゲルで70V30分電気泳動することでDNA断片を分離し、泳動図から遺伝子型を判定した。

PCRダイレクトシーケンス

YaoらのGH6プライマーを用いて上記の条件でPCR反応し得られた第5エキソン全てをカバーする404bpの断片を含む反応液50μlはGFX™ DNA and Gel Band Purification Kitにより精製しGH6フォワードプライマーを利用してダイターミネーター法によりシーケンスを実施し、ASM-PCR法による判定結果と比較した。同様に59個体の種雄牛DNAの第5エキソン型判定を実施した。

推定育種価算出に用いられたデータ及び効果

母性効果の推定育種価(MEBV)は市場子牛の出荷時体重を体重・体高比を利用して抽出し子牛の性、農協、子牛の出荷年と季節などを母数効果に、回帰効果に2次までの出荷日齢を取り推定したものを利用した。

枝肉重量、ロース芯面積、脂肪交雑基準値の推定育

種価(CWBV、RABV、BMSBV)は枝肉成績を利用し年次、食肉市場を母数効果に、農家を変量効果に、回帰効果に近交系数と月齢を取り島根県立種畜センターが推定したものを利用した。

これらの育種価と第5エキソン型多型の関係について分散分析により検討した。

結果

ASM-PCR法による型判定にあたる2,291番目の変異の影響

2,291番目の塩基は通常アデニンであるがシトシンに変異しているアリルが認められるが、これは2,141番目、および2,277番目が共にシトシンであるA型にのみ認められるが、図2に示すように2,291番目の塩基をTからGに置換したプライマーでも判定に影響は認められなかった。特にBB型の個体で2,291番目がGのプライマーをもちいたASM-PCRでもBアリルの増幅が認められた。また2,291Cの変異を認める個体(2,291Cホモ1例、ヘテロ3例)についてもダイレクトシーケンスの結果と同様であった。

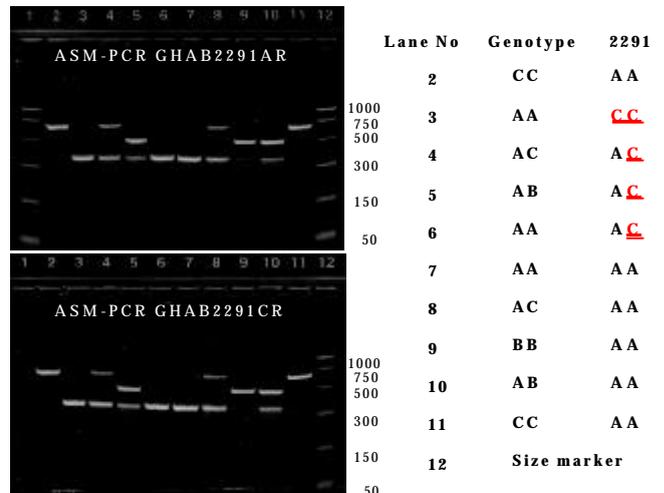


図2 ASM-PCR法による型判定にあたる2,291番目の変異の影響

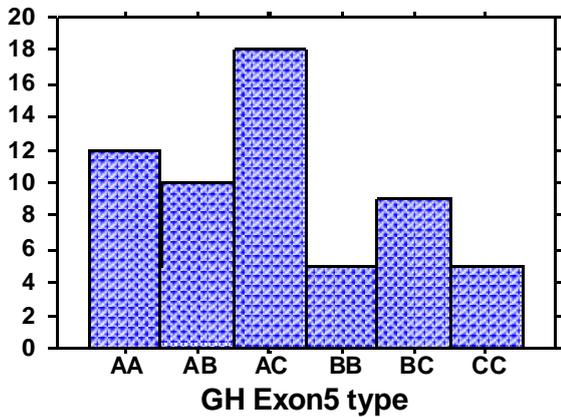
牛成長ホルモン遺伝子第5エキソン型判定結果

59個体の型判定の結果を表1に示した。アリルの頻度は千国らが区分したA型が44%、B型が24.6%そしてC型が31.4%であった。A型の中で2,291番目がCに変異したアリルは7例認められ頻度は5.93%であり1個体はホモでこの変異を認めた。また、アミノ酸の置換を伴う2,277番目の変異は59個体で1アリルにのみ認められその頻度は0.85%となった。個体ではAC

型が 18 個体と最も多く、BB 型 CC 型が 5 個体と少なかった (図 3)。

表 1 種雄牛の牛成長ホルモン遺伝子第 5 エキソン型の頻度

		Genotype		Number of alleles(%)
DNA sequence	C ²¹⁴¹ C ²²⁵⁸ C ²²⁷⁷ A ²²⁹¹	A		44
Amino acid sequence	L ¹²⁷ R ¹⁶⁶ T ¹⁷² R ¹⁸²			
DNA sequence	C ²¹⁴¹ C ²²⁵⁸ C ²²⁷⁷ C ²²⁹¹	A		7
Amino acid sequence	L ¹²⁷ R ¹⁶⁶ T ¹⁷² R ¹⁸²			
DNA sequence	C ²¹⁴¹ T ²²⁵⁸ C ²²⁷⁷ A ²²⁹¹	A		1
Amino acid sequence	L ¹²⁷ W ¹⁶⁶ T ¹⁷² R ¹⁸²			
52 (44.0)				
DNA sequence	G ²¹⁴¹ C ²²⁵⁸ C ²²⁷⁷ A ²²⁹¹	B		29 (24.6)
Amino acid sequence	V ¹²⁷ R ¹⁶⁶ T ¹⁷² R ¹⁸²			
DNA sequence	G ²¹⁴¹ C ²²⁵⁸ T ²²⁷⁷ A ²²⁹¹	C		37 (31.4)
Amino acid sequence	V ¹²⁷ R ¹⁶⁶ M ¹⁷² R ¹⁸²			



2291C hetero 2 2 1
2291C homo 1

図 3 個体の遺伝子型の頻度

推定育種価との関係

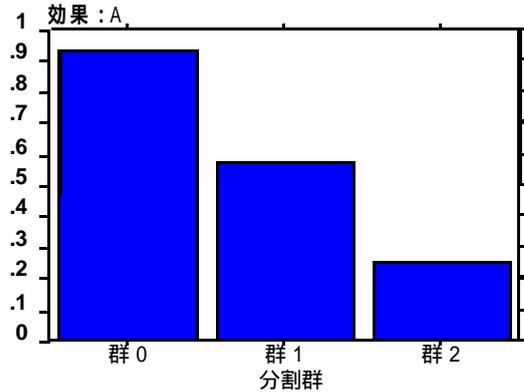
分散分析に用いた育種価の基本的統計量は表 2 に示すとおりであった。2,291 C の変異は今回の分析では有意な効果ではなかった。また、図 4 に示すように MEBV との関係では B 型のアリルを持たない個体が最も低くホモで持つ個体が最も高い結果となったが有意

表 2 推定育種価の基本統計量

	平均値	標準偏差	標準誤差	最小値	最大値	例数
MEBV	0.609	1.639	0.232	-3.033	4.405	50
CWBV	15.925	23.711	3.087	-51.605	59.914	59
RABV	4.102	5.081	0.661	-9.724	16.222	59
BMS	0.873	0.606	0.79	-0.383	2.125	59

では無かった。CWBV、RABV と第 5 エキソン型との関係は特徴的な傾向は認められず、有意な効果では無かった。BMSBV との関係では図 5 に示すように個体の第 5 エキシソンの遺伝子型が有意な効果となり、GenotypeBC 型が AA 型より脂肪交雑基準値の推定育種価において高い傾向が認められた (p < 0.05)。

交互作用棒グラフ : MEBV



交互作用棒グラフ : MEBV
効果 : B

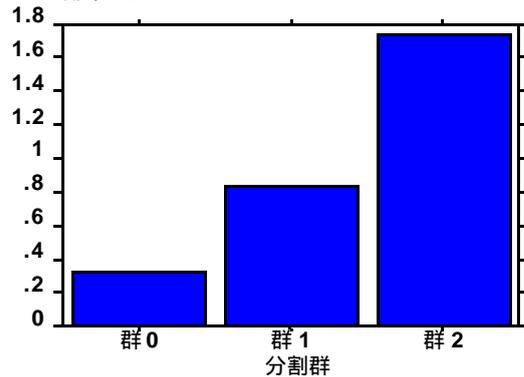


図 4 アリル A および B と推定育種価 (MEBV) との関係について

交互作用棒グラフ : BMSBV

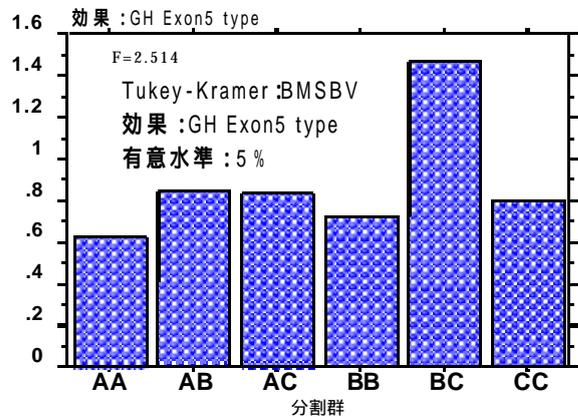


図 5 GH Exon5 型と推定育種価 (BMSBV) との関係

考 察

2,291C の置換は全て 2,141C、2,277C (GenotypeA)にのみ認められる変異でありASM-PCRの判定には影響を与えなかった。このことにより3'末端に特異的な配列を持つアリル特異的PCRが部位にもよるが配列内にミスマッチしていてもプライマーとしての能力を発揮する推察され、ASM-PCRが第5エキソンの有効な型判定法であることを示している。しかし、DNA合成酵素やPCRの条件により再現性は異なってくるであろう。また、黒毛和種は雌牛の育種が地域で大きく異なっている経緯があることから、これだけ多型の認められる第5エキソンには更に多型が存在する可能性もありそのスクリーニングとしてはダイレクトシーケンスが優れているように思われ、PCR産物の生成も市販のキットを利用して簡単に行えることから有効な手法である。牛成長ホルモンと量的形質との関係については、そのレセプター遺伝子や成長ホルモン遺伝子放出ホルモン遺伝子の解析とともに様々な報告がなされているが決定的な報告は無い²⁾。我々の分析ではBMSBVと個体の遺伝子型との間に有意な関係を認め、GenotypeBC型がAA型より高い傾向を認めた。第98回畜産学会において岡山県の片岡らが中国4県の第5エキソンの遺伝子型頻度について、県により大きく異なっていると報告しており、県内で用いられている県外種雄牛と県内優良雌牛との交配による種雄牛作成という育種手法とその結果が今回の遺伝子型に反映されている可能性が高い。2,141番目の変異はアミノ酸の置換を伴うものであり、乳量や肉質との関係が報告されている³⁾が、生理学的な根拠は示されて無くこの多型が牛成長ホルモ

ンの放出に対して関係が無いという報告も存在する⁵⁾。また、Frakiら⁴⁾はフリージアン種を用いて牛成長ホルモン受容体遺伝子型と乳量、乳タンパク質量および率との間に有意関係を報告しているが、MspIを用いた区分した牛成長ホルモン遺伝子型と乳量、乳成分との有意な関係は見いだせなかったとしている。牛成長ホルモンの遺伝子型の分類にも明確なものは存在しないが、第5エキソンは多型の認められる唯一のエキソンであることから生理学的な影響が最も強いと思われることから候補遺伝子として検討するべきであり、今後は父方半兄弟家系をタイピングやプロモーターの多型との関係などと共に解析する必要がある。また、牛成長ホルモン放出ホルモン遺伝子型の判定法についても報告されている⁷⁾ことから牛成長ホルモン受容体遺伝子型も含めて解析を進めていく考えである。

文 献

- 1)ChikuniK,etal. Genet.,28:230-232, 1997.
- 2)千国幸一. J. Anim.Genet.,26(2):61-67,1998
- 3) Eppard PJ,etal.J.Endocrino.,132:47-56,1992
- 4) Falaki M, et al. J Dairy Sci 1996 Aug;79(8):1446-53
- 5) Grochowska R, et al. Reprod Nutr Dev 1999 Mar-Apr;39(2):171-80
- 6) Lagziel A, et al. Anim Genet 1999 Aug;30(4):296-9
- 7) Moody DE, et al. J Anim Sci 1995Dec;73(12):3789
- 8)Unanian MM, et al J Anim Sci 1994Aug;72(8):2203
- 9)Yao J, Aggrey et al. Genetics, 144 : 1809-1816, 1996.