

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)

古川 恵・平本圭二

Research on development of the breeding technique of the Japanese black cattle which made the DNA marker the index

Megumi FURUKAWA and Keiji HIRAMOTO

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1頭とその産子において大規模半兄弟連鎖解析を実施した。脂肪交雑に関しては2カ所の領域で、ロース芯面積に関しても2カ所の領域で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、連鎖解析、ハプロタイプ

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。しかし、これら経済形質に関わる優良遺伝子自体が特定できれば、より正確度の高い選抜が可能となる。そして選抜速度が向上し、効率のよい育種改良を図ることができる。

近年の遺伝子解析技術の進展によってDNA情報の利用が可能となり、畜産分野においてもDNAマーカーを用いた遺伝病診断や個体識別などの技術が確立されてきている¹⁾。牛の経済形質は、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ため、これまで遺伝子の特定が困難であった。しかしながら、動物遺伝研究所、各道県および家畜改良事業団との共同研究により、平成6年度から「DNA育種基盤整備事業」を実施し、経済形質に関連する染色体領域の推定が可能となり、DNAマーカーを用いた選抜手法の検討も行われている²⁾³⁾。そこで本県においても新たな種雄牛造成並びに選抜指標としてDNA情報を利用し、これを育種改良へ応用するため、県種雄牛1頭とその産子を用いた大規模半兄弟家系の連鎖解析を行った。

材料及び方法

1 対象家系およびDNAサンプル

家系は、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。DNAサンプルは平成12年6月～平成15年12月まで岡山県営食肉地方卸売市場に出荷された「利花号」の産子(去勢牛)112頭とし、採材サンプルは腎周囲脂肪組織及び血液とした。合わせて、枝肉成績および平成15年10月に公表された第18回育種価⁴⁾で算出された肥育牛の育種価を調査した。

2 DNAの調整および増幅

凍結保存した材料約500mgにProtenaseK(20mg/μl) 10μl、2%SDS 16μl、10×PCR Buffer 40μl、蒸留水318μlを加え、50度で一晩加温した。その後95度で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に希釈調整した。

3 多型解析

動物遺伝研究所から供与されたマイクロサテライトの蛍光標識プライマーの中から10～30cM間隔に配置したヘテロマーカー194個を選定した。PCR産物の調整法によりサンプルから抽出したDNAをこれらのプライマーを用いて増幅した。得られたPCR産物は、DNASEQUENCER(Perkin-Elmer, 373A)を用いて電気泳動し、ソフトウェアGENESCAN672™、GENOTYPER™(Perkin-Elmer)を使用して遺伝子型を決定した。

4 連鎖解析

遺伝子型と対象産子の表現型値（枝肉重量、脂肪交雑およびロース芯面積）との連鎖解析を解析プログラム「Exploler/Half-sib」により実施した。

結果及び考察

1 枝肉成績

利花産子112頭と県下産子995頭を供試して各形質の表現型値の平均を算出した。利花産子と県下産子の平均はそれぞれ枝肉重量は $432.1 \pm 37.9\text{kg}$ 、 $436.2 \pm 44.9\text{kg}$ 、BMS No. は 6.0 ± 1.7 、 4.9 ± 2.0 、ロース芯面積は $51.9 \pm 6.9\text{cm}^2$ 、 $50.6 \pm 7.0\text{cm}^2$ であり、利花産子は県下産子の全体平均と比べ特に脂肪交雑が優れていた。また、各形質の表現型値の分布図を図1～3に示した。利花産子は脂肪交雑、ロース芯面積で県下産子の全体平均より高い表現型値を示し、対象牛の優良遺伝子の存在が示唆された。

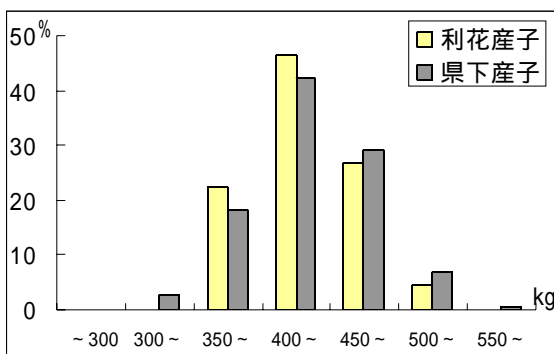


図1 枝肉重量分布図

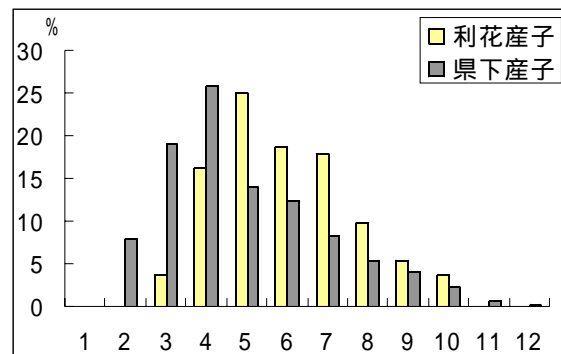


図2 脂肪交雑分布図

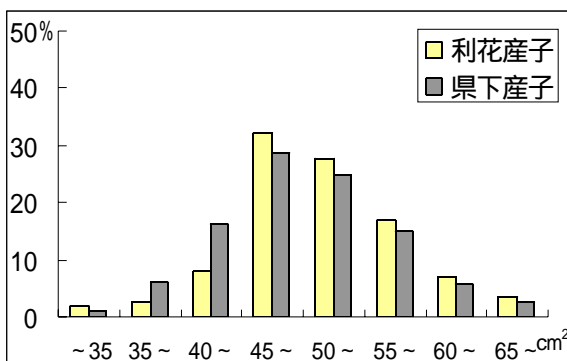


図3 ロース芯面積分布図

2 連鎖解析結果

(1) 枝肉重量

枝肉重量については表現型値、育種価ともに5%を越える有意差水準での領域は検出されなかった。

(2) 脂肪交雑

脂肪交雑について見ると、表現型値で深く関与している領域はA、B、C、Dの4カ所で検出された（図4～7）。それぞれの染色体上の関連領域の範囲は約16cM（5%有意水準）、約14cM（5%有意水準）、約18cM（5%有意水準）、約10cM（5%有意水準）で示唆された。また、環境効果を取り除く手法として肥育牛の実数値を補正して算出された育種価数値を用いた結果がより有効であると報告されていることから⁵⁾⁶⁾、育種価も用いた連鎖解析を行った。表現型値を用いた場合と育種価を用いた場合では、いずれも同様な曲線を示した。しかし、A染色体の領域では育種価を用いた場合の有意水準が高くなったのに対し、それ以外では逆に育種価を用いた場合の水準が低くなり、特にBおよびC染色体上では5%有意水準に達しなかった。

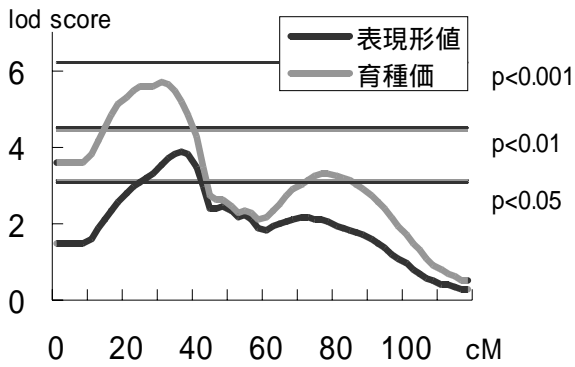


図4 染色体Aにおける解析結果

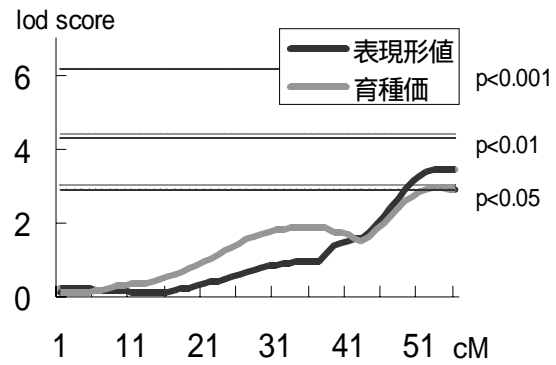


図5 染色体Bにおける解析結果

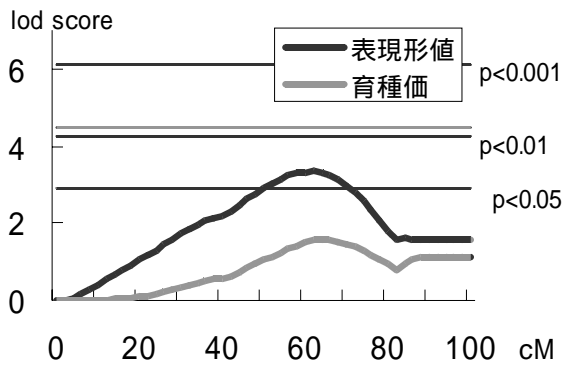


図6 染色体Cにおける解析結果

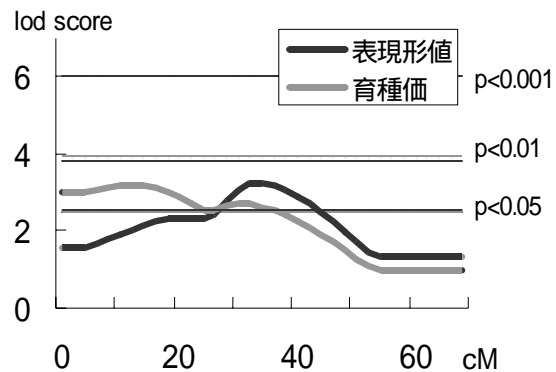


図7 染色体Dにおける解析結果

次に、それぞれの染色体について有意な領域が示唆されたハプロタイプを受け継いだ場合とそうでない場合の差（QTL効果）を表1に示した。最もロッドスコア値の高かったA染色体でのQTL効果は 0.99 ± 0.03 であった。

表1 脂肪交雑における各染色体のQTL効果

染色体		位置	QTL効果
A	表現型値	24 ~ 40cM	0.99 ± 0.03 *
	育種価	14 ~ 36cM	**
B	表現型値	96 ~ 110cM	1.19 ± 0.03 *
	育種価		
C	表現型値	52 ~ 70cM	1.00 ± 0.01 *
	育種価		
D	表現型値	32 ~ 42cM	0.94 ± 0.02 *
	育種価	0 ~ 38cM	*

注) *は $p < 0.05$ **は $p < 0.01$

(3) ロース芯面積

ロース芯面積について見ると、表現型値で深く関与している領域はE、FおよびGの3カ所で検出された（図8～10）。それぞれの染色体上の関連領域の範囲は約20cM範囲（1%有意水準）、約8cM（5%有意水準）、約5cM（1%有意水準）が示唆された。EおよびF染色体の領域では育種価を用いた場合の有意水準が高くなったのに対し、G染色体上では逆に育種価を用いた場合の水準が低くなり、5%の有意水準に達しなかった。

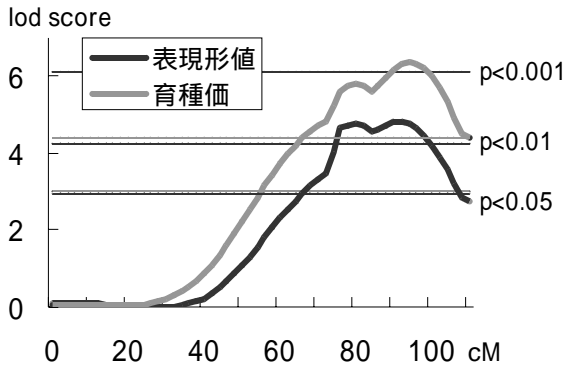


図8 染色体Eにおける解析結果

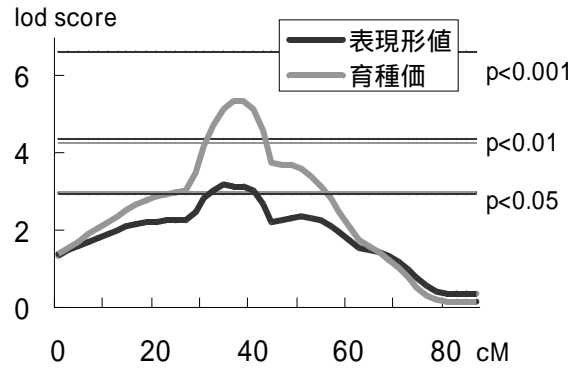


図9 染色体Fにおける解析結果

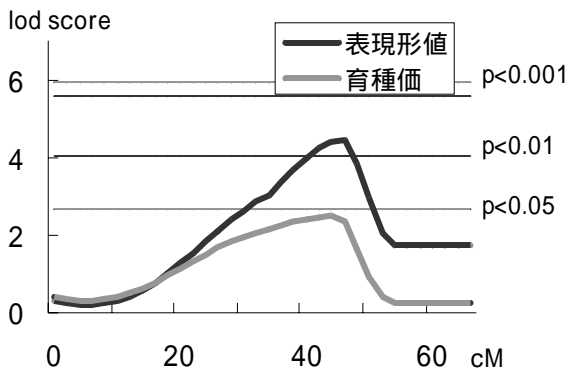


図10 染色体Gにおける解析結果

また、染色体E～Gについて有意な領域が示唆されたハプロタイプを受け継いだ場合とそうでない場合の差（QTL効果）を表2に示した。最もロッドスコア値の高かったE染色体でのQTL効果は $5.18 \pm 0.45 \text{cm}^2$ であった。

染色体		位置	QTL効果
E	表現型値	76～96cM	5.18 ± 0.45 **
	育種価	92～96cM	— ***
F	表現型値	32～40cM	4.14 ± 0.05 *
	育種価	32～42cM	— **
G	表現型値	52～70cM	4.31 ± 0.29 *
	育種価	—	—

注) *は $p < 0.05$ **は $p < 0.01$

今回行ったDNAサンプルの解析によって、経済形質と関連の強い領域が複数の染色体で示唆された。表現型値と育種価の両データを用いた解析の結果、表現型値と育種価ではピークの形は類似しており、有意水準も上昇して見られたことより、育種価数値を用いた解析は有効であると示唆された。また、実数値より育種価数値の結果が減少して見られた場合、環境効果による誤差の可能性が考えられ、これらの領域ではデータ数を増加することで誤差が少なくなり、検出されなくなる可能性も考えられる。従って、両データ共に有意な水準で検出される領域について特定を検討する必要がある。

今後これら染色体の中で、さらに経済形質と関連する正確度の高いマーカーを検出するため、データ数を増やして信頼性を高めること、およびマーカーを詳細に配置して候補領域を狭め、優良なQTL領域を特定する必要があると考える。さらに、今後利花産子の選抜基準としてこれら検出されたマーカーを用いたマーカーアシスト選抜による、優良後継牛の作出に活用を検討したい。

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諸先生方、並びに共同研究関係機関、関係者各位の皆様に深謝いたします。

引用文献

- 1) 社団法人畜産技術協会(2000):家畜ゲノム解析と新たな家畜育種戦略.
- 2) 溝下和則・原一夫・西浩二・山口浩・窪田力・轟木淳一・杉本喜憲・田原則雄(2000):牛の発育及び肉質に関する遺伝子の探索(第2報),鹿児島県肉用牛改良研究所報告第5号,31-33.
- 3) 牛DNAマーカー育種手法の開発(2002) 動物遺伝研究所年報9号:3-9,91-92.
- 4) 岡山県総合畜産センター:第18回育種価評価概要,2003 公表.
- 5) 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(2001):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,23-25.
- 6) 小邦朋子・成田暁・井原直也・松本道夫・杉本喜憲・佐々木義之(2003):ハーフシブデザイン家系を用いたQTL効果における環境要因補正の効果.日本畜産学会第101回大会講演要旨,112.