

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1報）

安田康明・遠藤 治・森脇秀俊・板垣勝正

要約

島根県の種雄牛および平成9、10年度間接検定種雄牛の牛成長ホルモン遺伝子第5エキソン型判定をAS-PCRにより実施し、その枝肉形質との関係を最少自乗分散分析により検討した。その結果、種雄牛のアリルの頻度は既に報告されている頻度と比較してAアリルが低く、Bアリルが大きい傾向が認められた。また、間接検定の成績では、1日増体量とBMSにおいて、種雄牛は有意な効果であった($p < 0.05$)が遺伝子型は全ての形質で有意な効果ではなかった。各形質の最小自乗平均値は、1日増体量ではAA型が、ロース芯面積ではCC型が、BMSではBB型が優れている傾向を示した。

牛成長ホルモン遺伝子のcDNA配列はMillerら⁵⁾によって1980年に決定され、その後様々な研究報告がなされている¹⁷⁾。特に第5エキソンの多型解析方法であるASM-PCRが千国ら³⁾により報告され、その型判定はPCRとアガロースゲルを利用した電気泳動と簡易化されたことにより、牛成長ホルモンのアミノ酸配列の変化を伴う多型解析が身近なものになった。また、これまでに発表された報告では、成長ホルモン遺伝子型と乳形質や食肉形質との関係について一致した効果は示されておらず、枝肉形質との関係についても今後の研究課題である。ここでは、島根県の種雄牛の第5エキソン多型と平成9、10年度の間接検定牛の第5エキソン型多型と枝肉形質との関係について調べた。

材料および方法

遺伝子型の分析は黒毛和種114頭について行った。種雄牛51頭については島根県立種畜センターに保存されていた凍結精液を、平成9、10年の間接検定個体8セット63頭については島根県食肉公社でと殺時に採取した耳片32頭と枝肉検査時に採取した皮下脂肪あるいは腎周囲脂肪31頭を試料として用いた。

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回繰り返す、500 μ lの10mM Tris-HCl(PH8.5)、10mMEDTA、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。耳片および脂肪は約100mgの組織片からFastPrepTM、FastDNATM Kitを利用しGenomic DNAを調整した。

AS-PCR法によるDNAの増幅と電気泳動による型判定

プライマーとしたオリゴヌクレオチドは千国ら³⁾の報告で示された配列を外注し利用した。反応液は20 μ lとし、その構成は試料DNA20ng、dNTP20 μ M(each)、10 \times PCR Buffer(Perkin Elmer)2 μ l、DNAポリメラーゼ(AmpliTaq Gold Perkin Elmer)0.5ユニットであった。プライマーはGH4F、GH5Rをそれぞれ10pM、GHAR3.2pMと調整した反応液をA型判定反応液、GH4F、GH5Rをそれぞれ10pM、GHBR3.2pMと調整した反応液をB型判定反応液とした。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、10 μ lを3%NuSieve GTG(FMC)アガ

ローソゲル電気泳動で DNA 断片を分離し、エチジウムブロマイドで染色した泳動図から遺伝子型を判定した。

第 5 エキソン型多型と枝肉形質の関係

平成 9、10 年度間接検定牛の第 5 エキソン型多型の影響について最小自乗分散分析により検討した。なお、最小自乗分散分析には LSMLMW⁶⁾を用い、種雄牛を变量効果に、第 5 エキソン型を母数効果として 1 日増体量、ロース芯面積、BMS について分析を行った。

結果

第 5 エキソン型判定

アリル特異的 PCR による泳動像を図 1 に示した。A 型特異的プライマーは B、C 型と競合し、B 型特異的プライマーは C 型と競合することから、A 型反応液の泳動像は A 型と他の B、C 型の

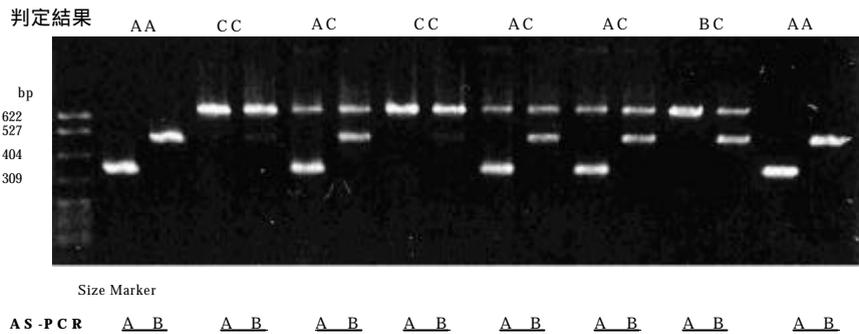


図1 AS-PCR (アリル特異的PCR) 反応法を用いた牛成長ホルモン第5エキソン断片の泳動像

どちらかを持つ試料では約 350bp (左のサイズマーカーの上から 3 番目と 4 番目のラインの間) と約 650bp (サイズマーカーの一番上より上) の 2 本のバンドを認める。また、C 型を持つ場合は B 型反応液の泳動像に約 650bp の C 型特異的バンドを、A、B 型を持つ場合は約 500bp のバンドを認める。この、AB 2 つのアリル特異的 PCR 泳動像から遺伝子型を判定した。

試料の第 5 エキソン型判定

表 1 に試料の型判定結果を示した。種雄牛の遺伝子型は AB 型と CC 型が 5 例であり、他の遺伝子型の出現数に比べて少ない傾向であった。今回解析対象とした間接検定の種雄牛の遺伝子型は AC、BC、BC、BC、BB、BC、BC、AA であり、A アリルの頻度が低い傾向があるが、間接検定息牛のアリルの頻度は種雄牛とほぼ同程度であり、今回の息牛は母牛から比較的 A 型のアリルを多く引き継いでいた。間接検定息牛個体では AA、BB、CC というホモの遺伝子型を持つ個体は少ない傾向が認められた。

表1 牛成長ホルモン遺伝子型とアリルの頻度

区分	n	遺伝子型						アリルの頻度		
		AA	AB	AC	BB	BC	CC	A	B	C
種雄牛	51	9	5	11	10	11	5	0.33	0.36	0.31
間接検定息牛	63	3	16	16	3	19	5	0.32	0.33	0.35

遺伝子型と肉質に関わる各形質との関係

表 2 に今回解析に用いた各形質の基本的統計量を示した。対象個体の中で、著しい発育遅延を認める個体が 1 例存在したので、解析対象から除外した。BMS は変動係数が大きく、他の形質に比べ

倍以上の値であった。表 3 に各形質の最小自乗分散分析の結果を示した。1 日増体量と BMS は種雄牛で有意な変数効果 ($p < 0.05$) であったが遺伝子型は全ての形質で有意な母数効果ではなかった。表 4 に各形質の最小自乗平均値を示したが、1 日増体量では AA 型が、ロース芯面積では CC 型が、BMS では BB 型が優れている傾向を示した。

考察

アリル特異的 PCR を用いることにより、これまでに煩雑であった遺伝子型を容易に判定できることが確認された。また、今回の判定では 2 つのアリル特異的プライマーを別々に PCR し泳動したが、千国ら³⁾のマルチプレックス PCR を用いれば更に簡便化できると思われる。今回の成績には加えていないが、著者らもマルチプレックス PCR による判定を確認している。

今回のアリルの頻度は既に報告されている頻度²⁾と比較して A アリルが低く、B アリルが大きくなっている。このことは地域によりアリルの頻度に差があることを示しており、県内においても雌牛のアリルの頻度は地域差が認められる可能性もある。

第 5 エキソン内には今回の多型以外にもアミノ酸の変異を伴わない変異が報告されており⁴⁾、この変異の部分は B 型特異的プライマーの設計されている部分と競合している。今後はこの部分の変異が無いことを確認する必要がある。

成長ホルモン遺伝子において最も多型が報告されている部分は第 1 エキシソンの上流部分であり、この場所にはタンパク質が結合する部分も含まれていることから、この部分の多型と今回の成績とを合わせて検討する必要がある。

肉質との関係では有意な解析結果を得なかった。1 種雄牛の息牛頭数は 8 頭であり、種雄牛の特性が解析結果に強く反映したためと考えられる。しかし、1 日増体量の最小自乗平均値は千国ら²⁾が報告した遺伝子型に伴う変化と類似しており、今後は特定種雄牛の産子の解析を実施することにより種雄牛の影響を取り除き更に検討する必要がある。

表 2 間接検定成績の基本的統計量

n = 62

	単位	平均値	標準偏差
一日増体量	kg	0.91	0.10
ロース芯面積	cm ²	48.0	5.00
脂肪交雑(BMS No.)	-	8.66	2.00

表 3 各形質の最小自乗分散分析結果

一日増体量					
項目	自由度	平方和	平均平方	F値	P値
種雄牛	7	0.144	0.021	2.593	0.023
GH型*	5	0.063	0.013	1.584	0.182
残差	49	0.390	0.008		
ロース芯面積					
項目	自由度	平方和	平均平方	F値	P値
種雄牛	7	204.498	29.214	1.236	0.302
GH型*	5	226.644	45.329	1.917	0.109
残差	49	1158.606	23.645		
BMS No.					
項目	自由度	平方和	平均平方	F値	P値
種雄牛	7	65.721	9.389	2.930	0.012
GH型*	5	14.174	2.835	0.885	0.499
残差	49	157.034	3.205		

* 成長ホルモン遺伝子型

表 4 各形質の最小自乗平均値

GH type	一日増体量	ロース芯面積	BMS No.
AA	1.01	48.16	9.70
AB	0.94	49.42	8.26
AC	0.90	45.93	8.33
BB	0.89	51.33	10.31
BC	0.87	46.96	8.73
CC	0.94	52.54	9.14

謝辞

今回の解析手法修得において御指導いただいた、農林水産省畜産試験場遺伝子機能研究室 三橋忠由室長に感謝します。

文献

- 1) 千国幸一ら. 日畜会報, 62:660-666, 1991.
- 2) 千国幸一. 日畜会報, 65:340-346, 1994.
- 3) Chikuni K, et al. Genet.,28:230-232, 1997.
- 4) 千国幸一. J. Anim. Genet.,26(2):61-67, 1998
- 5) Miller WL, et al. J. Biol. Chem.,255:7521-7524,1980
- 6) Walter R.Harvey. 1-20,1990
- 7) Yao J, Aggrey et al. Genetics, 144 : 1809-1816, 1996 .