

## 但馬牛種雄牛の成長ホルモン遺伝子多型と枝肉形質育種価の関係

岡 章生\*・龍田 健\*・岩本英治\*

### 要 約

兵庫県産黒毛和種 (但馬牛) 種雄牛の凍結精液からDNAを抽出して成長ホルモン遺伝子多型を分析し、枝肉形質育種価との関連を検討した。

- 1 黒毛和種の成長ホルモン遺伝子には127番と172番のアミノ酸置換を伴う2箇所の塩基配列の違いから3つのハプロタイプ (A型:127番ロイシン・172番スレオニン, B型:127番バリン・172番スレオニン, C型:127番バリン・172番メチオニン) が存在するが, 兵庫県産黒毛和種種雄牛141頭におけるそれらの頻度はA型:6.4%, B型:52.1%, C型:41.5%であった。A型の頻度は城崎系が中土井及び熊波系よりも顕著に高い値を示した。
- 2 年代別に成長ホルモン遺伝子型頻度の推移を見るとB型は各年代ともに約50%であったが, A型は年代とともに減少し, 逆にC型は増加した。
- 3 枝肉重量育種価はC型遺伝子の存在により低くなる傾向が認められた。脂肪交雑育種価はAB及びAC型が他に比べ有意に低い値を示した。

以上のように成長ホルモン遺伝子多型により種雄牛の脂肪交雑育種価が異なったことから, 本遺伝子型はDNA育種のためのマーカー候補の一つになると考えられる。

## Relationship between Growth Hormone Gene Haplotypes and Breeding Values in Japanese Black Sires of Hyogo Prefecture

Akio OKA, Ken TATSUDA and Eiji IWAMOTO

### Summary

We investigated the relationship between growth haplotype of hormone gene genotypes and breeding values of carcass traits within Japanese Black sires of Hyogo strain.

- (1) There are three types of growth hormone gene having different amino acids at position 127 and 172 in Japanese Black cattle; A type (127:Leu, 172:Thr), B type (127:Val, 172:Thr) and C type (127:Val, 172:Met). Frequencies of the haplotype were 0.064 (A type), 0.521 (B type) and 0.415 (C type) in Japanese Black sires (n=141). The frequency of A type in Kinokuni strain was higher than those of Nakadoi and Kumanami strains.
- (2) Frequencies of B type were approximately 0.5 throughout periods, before the 1980s, the 1980s and after the 1980s. The frequency of A type decreased with the time, while that of C type increased.
- (3) The existence of C type was associated with lower breeding value of carcass weight. The breeding values of marbling in AB and AC types were lower than those in BB, BC and CC types.

These results suggested that these genetic variants of growth hormone could be used as DNA markers in breeding of Japanese Black cattle.

キーワード: 成長ホルモン遺伝子多型, 育種価, 黒毛和種

### 緒 言

成長ホルモンは動物の発育を支配する最も重要なホルモンで下垂体前葉から分泌される。その作用は、成長促進だけでなく、タンパク質や脂質の代謝促進、分化制御

などの作用もある。肥育牛に成長ホルモンを与えると増体量は多くなるが<sup>2, 7)</sup>、蓄積脂肪が減少することが報告されている<sup>3, 7)</sup>。牛の成長ホルモン遺伝子は191個のアミノ酸から構成されているが、黒毛和種では成長ホルモン遺伝子の127番と172番のアミノ酸置換を伴う2箇所の塩基配列の違いから、A型 (127番ロイシン (Leu)

2004年8月31日受理

\* 兵庫県立農林水産技術総合センター畜産技術センター

・172番スレオニン (Thr)), B型 (127番バリン (Val)・172番Thr) 及びC型 (127番Val・172番メチオニン (Met)) の3つの遺伝子型が存在することが報告されている<sup>1)</sup>。シンメンタール種では127番アミノ酸部位の多型により枝肉形質育種価が異なることが示されており<sup>9)</sup>、黒毛和種においても成長ホルモン遺伝子多型と枝肉形質との間に関連がある可能性が考えられる。

そこで、兵庫県産黒毛和種である但馬牛の種雄牛について成長ホルモン遺伝子多型を分析し育種価との関連を調べることに、牛成長ホルモン遺伝子がDNA育種に利用可能かどうかを検討した。

材料及び方法

1 対象牛

兵庫県産黒毛和種である但馬牛の種雄牛の中で凍結精液が保存されている種雄牛141頭を対象とし、父系により中土井、熊波、城崎の3系統に分類した。種雄牛の生年は1957年から2001年までであった。

2 育種価評価

兵庫県下で肥育、と畜された36, 389頭の枝肉成績を基に全国和牛登録協会のアニマルモデルプログラムによって算出された枝肉形質(枝肉重量、ロース芯面積、バラ厚、皮下脂肪厚及び脂肪交雑)育種価を用いた。

3 牛成長ホルモン遺伝子多型分析

但馬牛種雄牛の凍結精液約0.5ml (ストロー1本) からDneasy Tissue Kit (QIAGEN) を用いてDNAを抽出した。

PCR (Polymerase Chain Reactions) は、牛成長ホルモン遺伝子の塩基配列情報<sup>1)</sup>に基づき、同遺伝子のエキソン部分において唯一多型を示す第5エキソンの全領域をカバーするように設計されたプライマーペア、GH 6 F (5'-TAGGGGAGGGTGGAAAATGGA-3'), GH 6 R (5'-GACACCTACTCAGACAATG CG-3') を用いて行った<sup>12)</sup>。PCR 反応液14.5 μl は、30ng のDNA試料、50mM のKCl、10mM のTris-HCl (pH 8.3)、1.5mM のMgCl<sub>2</sub>、200 μM の4つのdNTPs、0.31U のAmpli Taq Gold DNA polymerase(Perkin - Elmer Applied Biosystems)、5 pmol のプライマーペアの組成で調整した。PCR 条件は、始めに予備変性95℃ / 9分、次に、変性95℃ / 30秒、アニーリング温度(60℃) / 45秒、伸長72℃ / 45秒を40サイクル行い、最後に、予備伸長72℃ / 10分で行った。これによるPCR断片の塩基長は404bpとなる。

シーケンス反応は、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Kit(Perkin - Elmer Applied Biosystems) を用いて

行った。シーケンス反応液10.0 μl は、1.0 μl のPCR 生成物、4.0 μl のTerminator Ready Reaction Mix、5 pmol のGH 6 Fの組成で調整した。反応条件は始めに94℃ / 2分、次に、95℃ / 30秒、50℃ / 10秒、60℃ / 4分を35サイクルで行った。シーケンス反応液の精製は、Gel Filtration Cartridge または V 3 96well Short Plate(Edge Biosystems) を用いて行った。

シーケンスはアクリルアミドゲル ABI PRISM Geluxe(Perkin - Elmer Applied Biosystems) をシーケンサー ABI 377XL (Perkin - Elmer Applied Biosystems) に4時間かけ、Sequencing Analysis(Perkin - Elmer Applied Biosystems) のソフトウェアを用いて解析を行った。

4 統計処理

統計処理はSAS (1997) のGLMプロシージャを用いて、有意性の検討を5%水準で行った<sup>8)</sup>。

結果

1 系統別の成長ホルモン遺伝子型頻度

但馬牛種雄牛141頭の成長ホルモン遺伝子型頻度はB型が最も多く52.1%となり、次いでC型が41.5%、A型が最も少なく6.4%であった(表1)。中土井系と熊波系との間には大きな差は見られなかったが、城崎系はA型が42.9%を占め他の系統と異なる分布を示した。

表1 但馬牛種雄牛の系統別成長ホルモン遺伝子型

系統	頭数	成長ホルモン遺伝子型(頭数)						遺伝子型頻度(%)		
		AA	AB	AC	BB	BC	CC	A	B	C
中土井	109	0	3	1	30	53	22	1.8	53.2	45.0
熊波	18	0	0	2	6	6	4	5.6	50.0	44.4
城崎	14	2	6	2	3	1	0	42.9	46.4	10.7
合計	141	2	9	5	39	60	26	6.4	52.1	41.5

表2 但馬牛種雄牛の成長ホルモン遺伝子型別育種価(最小2乗平均値)

遺伝子型	頭数	枝肉重量	ロース芯面積	バラ厚	皮下脂肪厚	脂肪交雑
AB	7	-4.42	-1.36	0.08	-0.30	0.10 <sup>a</sup>
AC	3	-6.83	-0.87	-0.19	-0.11	-0.09 <sup>a</sup>
BB	23	-4.29	1.56	0.18	-0.49	0.61 <sup>b</sup>
BC	50	-13.17	1.63	0.02	-0.44	0.83 <sup>b</sup>
CC	15	-8.51	1.50	-0.05	-0.32	0.96 <sup>b</sup>

a, b: 異符号間に有意差あり (P < 0.05)

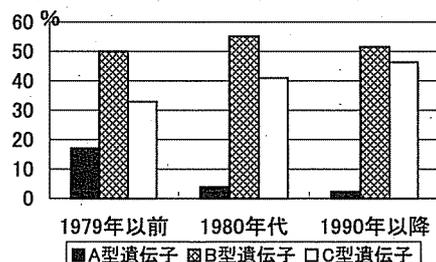


図 但馬牛種雄牛における成長ホルモン遺伝子型の年代別頻度

## 2 年代別の成長ホルモン遺伝子型頻度

種雄牛の生年によって1979年以前, 1980年代, 1990年以降に分けるとそれぞれの頭数は35, 39及び67頭となった。成長ホルモン遺伝子型頻度の推移を見るとB型は各年代ともに約50%であったが, A型は年代を経るにしたがい減少し, 1990年以降は2.2%まで減少した(図)。逆にC型は増加し1990年以降は46.3%となった。

## 3 成長ホルモン遺伝子型別の枝肉形質育種価

141頭の種雄牛の中で育種価の正確度が0.8以上の牛98頭について成長ホルモン遺伝子型別に枝肉形質育種価の最小2乗平均値を表2に示した。

枝肉重量育種価はC型遺伝子の存在により低くなる傾向が認められたが, 有意な差ではなかった。ロース芯面積, バラ厚及び皮下脂肪厚の育種価は各型により有意な差は認められなかった。しかし, 脂肪交雑はAB及びAC型が他に比べ有意に低い値を示した。またCC型の脂肪交雑育種価はBB型よりも高い傾向( $P=0.51$ )を示した。

## 考 察

但馬牛種雄牛の成長ホルモン遺伝子多型は, B型が約50%と最も多くを占め, A型が6.4%と極端に少なかった。片岡ら<sup>5)</sup>は岡山県の種雄牛24頭を調べた結果, A及びC型は40%以上を占めたがB型は10.4%と少なかったと報告している。一方, 鳥根県でも51頭の種雄牛について同様の調査が行われ, A型33%, B型36%及びC型31%と各型とも同程度の頻度を示している<sup>10)</sup>。兵庫県では閉鎖育種が行われており, 岡山県においても県外からの種雄牛の導入は限られていたため, 兵庫県と岡山県では成長ホルモン遺伝子多型の分布が大きく異なったものと考えられる。鳥根県では兵庫県や岡山県から種雄牛を導入しており, そのためA, B及びC型の分布が均等になったものと思われる。

系統別の成長ホルモン遺伝子多型では, 中土井系と熊波系にはA型がわずしか見られなかったが, 城崎系ではA型が42.9%を占めていた。城崎系の特徴の一つに乳徴が良好であることが挙げられている<sup>13)</sup>。127番アミノ酸部位変位においてA型(Leu/Leu)は非A型よりも泌乳能力が高いとの報告があり<sup>6)</sup>, 城崎系の乳徴が良好であることには成長ホルモン遺伝子多型が関与している可能性が考えられる。

年代別に成長ホルモン遺伝子型の推移を見ると, 年代を経るにしたがいA型が減少し, C型が増加した。これにはA型が多く認められた城崎系の種雄牛が近年減少したことが関与していると考えられる。

Schleeら<sup>9)</sup>はシンメンタール種の成長ホルモン遺伝子多型を調べ127番アミノ酸部位変位において非A型(Val/Val)はA型(Leu/Leu)よりも肉質が良いことを報告している。我々の結果もBB, BC及びCC型がAB及びAC型よりも脂肪交雑育種価が有意に高く, 同様の結果となっている。安田ら<sup>11)</sup>も鳥根県の種雄牛について型別の脂肪交雑育種価を調べ, BC型がAA型よりも有意に高かったと述べている。

また, 野外の黒毛和種肥育牛298頭の成長ホルモン遺伝子多型を調べたところ, 脂肪交雑はC型遺伝子の存在により有意に高くなることが確認されている(未発表)。

以上のように成長ホルモン遺伝子多型により種雄牛の脂肪交雑育種価が異なったことから, 本遺伝子型はDNA育種のためのマーカー候補の一つになると考えられる。

## 引用文献

- 1) 千国幸一・長妻常人・田畑利幸・門間美千子・斎藤昌義・小沢忍・小堤恭平(1994): 和牛において見いだされた成長ホルモン遺伝子の多型: 日畜会報 65, 340-346
- 2) Dalke B.S., Roeder R.A., Kasser T.R., Veenhuizen J.J., Hunt C.W., Hinman D.D. and Schelling G.T. (1992): Dose-response effects of recombinant bovine somatotropin implants on feedlot performance in steers: J.Anim.Sci. 70, 2130-2137
- 3) Enright W.J., Quirke J.F., Gluckman P.D., Breier B.H., Kennedy L.G., Hart I.C., Roche J.F., Coert A. and Allen P. (1990): Effects of long-term administration of pituitary-derived bovine growth hormone and estradiol on growth in steers: J.Anim.Sci. 68, 2345-2356
- 4) Gordon D.F., Quick D.P., Erwin C.R., Donelson J.E. and Maurer R.A. (1983): Nucleotide sequence of the bovine growth hormone chromosomal gene: Mol. Cell Endocrinol. 33, 81-95
- 5) 片岡博行・馬場誠・石川和人・塚本章夫(2000): 岡山県の黒毛和種における牛成長ホルモン遺伝子の多型と産肉性: 岡山総畜セ研報 11, 1-4
- 6) Lucy M.C., Hauser S.D., Eppard P.J., Krivi G.G., Clark J.H., Bauman D.E. and Collier R.J. (1993): Variants of somatotropin in cattle: gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production: Domest. Anim. Endocrinol. 10, 325-333
- 7) Preston R.L., Bartle S.J., Kasser T.R., Day J.W., Veenhuizen J.J. and Baile C.A. (1995): Comparative effectiveness of somatotropin and anabolic steroids in

- feedlot steers: J.Anim.Sci. 73, 1038-1047
- (8) SAS (1997): SAS/STAT User's Guide (Version 6.12). (SAS Institute. Inc.)
- (9) Schlee P., Graml R., Rottmann O. and Pirchner F. (1994): Influence of growth-hormone genotypes on breeding values of Simmental bulls: J. Anim. Breed. Genet. 111, 253-256
- (10) 安田康明・遠藤治・森脇秀俊・板垣勝正 (2000): 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) : 島根畜試研報 33, 17-19
- (11) 安田康明・佐々木恵美・山田彰司・長谷川清寿・安部茂樹 (2002): 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) : 島根畜試研報 35, 5-8
- (12) Yao J., Aggrey S.E., Zadworny D., Hayes J.F. and Kuhnlein U. (1996): Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and their association with milk production traits in Holsteins: Genetics 144, 1809-1816
- (13) (社)全国和牛登録協会(1982): 和牛種雄牛系統的集大成改訂第2版 ((社)全国和牛登録協会)19-61