

兵庫県内乳用牛における *PIT1* 遺伝子の多型と 泌乳形質の関連性

廣崎里麻*・小嶋 睦*・生田健太郎*・阿部雅一*・函城悦司*

要 約

Pituitary specific transcription factor-1 (*Pit-1*) 遺伝子はプロラクチンや成長ホルモンの発現, 下垂体の分化増殖などの働きを持つ。*Pit-1* には変異部位があり, 制限酵素 *Hinf I* により切断されないA座 (451bp) と一カ所が切断されるB座 (244bp と 207bp) が存在する。プロラクチンや成長ホルモンは乳腺の発達や泌乳に大きく関与しており, *Pit-1* の多型は泌乳形質に影響を与えている可能性がある。そこで, 検定サンプル乳 (以下サンプル乳と呼ぶ) からの *Pit-1* 遺伝子増幅, 県内乳用牛の *Pit-1* の *Hinf I* による多型, 多型と泌乳形質の関連性について検討した。

- 1 サンプル乳156検体中141検体で遺伝子増幅が可能であり, 体細胞数は増幅の可否に影響しなかった。
- 2 県内乳用牛207頭の *Pit-1* 遺伝子型は3グループに区分され, その頻度はAA型, AB型, BB型でそれぞれ3.9%, 43.5%, 52.6%であった。
- 3 207頭のうち信頼度50%以上の推定育種値 (Estimated Breeding Value, 以下EBVと呼ぶ) 評価値を持つ182頭について遺伝子型による区分を行って泌乳形質を比較した。AA型の泌乳形質はAB型やBB型よりも乳量・乳脂肪量・乳タンパク質量・無脂固形分量において高い傾向にあった。乳成分率についてはAA型, AB型, BB型間で差はなかった。

Relationships between *Pit-1* Genotypes and Performance Traits of Dairy Cows in Hyogo Prefecture

Rima HIROSAKI, Mutsumu KOKAMO, Kentarou IKUTA, Masakazu ABE
and Etsuji HAKOGI

Summary

The *Pit-1* gene is a pituitary specific transcription factor-1, which regulates either production of prolactin (PRL) and growth hormone (GH) or the pituitary cell differentiation and proliferation. Since PRL and GH are essential hormones for the mammary gland development and milk production, allelic frequencies of the *Pit-1* gene may affect performance traits of dairy cattle. This prompted us to investigate the relationship between allelic frequencies of the *Pit-1* gene and performance traits of dairy cows.

- (1) From 140 milk samples out of 150, the *Pit-1* gene was successfully amplified by the PCR method, using milk as the source of DNA.
- (2) Using the PCR-RFLP method employing *Hinf I* as a restriction enzyme, two alleles, A and B were observed. The genotypic frequencies of AA, AB and BB were 3.9%, 43.5% and 52.7%, respectively in a local dairy herd of Hyogo prefecture.
- (3) The estimated breeding values (EBV) for performance traits of milk production were compared between cows with different *Pit-1* genotypes. Animals with more than 50% reliability of EBV were selected for this analysis. The number of cows with AA genotype were not significant, but had the highest EBV values in yields of milk, protein and SNF. No differences were observed in fat, protein and SNF percentages between types.

キーワード：サンプル乳, *Pit-1*, *Hinf I*, 多型, 泌乳形質, 乳用牛

2000年8月30日

*淡路農業技術センター

緒 言

近年、家畜の経済形質や疾病に関するDNA育種手法の研究がすすめられている。マイクロサテライトなどのマーカーが開発され、連鎖地図へのマッピングが盛んに行われている^{2) 4)}。また、これらのマーカーと形質や疾病との連鎖解析もすすめられている。Anderssonら¹⁾は豚の成長、小腸長、脂肪蓄積の量的形質遺伝子座(以下QTLと呼ぶ)が第4番染色体にあるとし、龍田ら¹⁰⁾は「ひょうご味どり」の増体性のQTLが第1番染色体にあるとしている。乳用牛においては、Georgesら⁷⁾が泌乳形質に影響を及ぼすQTLが第1、第6、第9、第10及び第20番染色体にあると報告している。

Pituitary specific transcription factor-1 (*Pit-1*) は第1番染色体上セントロメア側、POUドメインに位置し^{8) 12)}、成長ホルモンやプロラクチンの発現、下垂体細胞の分化増殖などの働きを持つ遺伝子である^{3) 10)}。成長ホルモンは増体に重要な役割を持ち、*Pit-1*の変異によりマウスで矮小体が発生する¹⁰⁾ことが報告されている。また、成長ホルモンやプロラクチンはほ乳類の乳腺発達や泌乳に重要な役割を担っている。

*Pit-1*にはエキソン6部分に塩基GからAへの変異が確認されている⁵⁾。そのため、PCR産物を塩基配列中の特異的な部位を切断する制限酵素 *Hinf I* (図1) で処理すると、切断されないA遺伝子型(変異あり)と切断されるB遺伝子型(変異なし)が検出される^{5) 10)}。泌乳形質の改良のためのマーカーを探る研究の中で *Pit-1* は注目されており、その多型の頻度や泌乳形質との関連性について研究がすすめられている^{12) 10)}。

酪農の生産性向上のためには、飼養管理技術の改善と共に遺伝的改良が必要である。1984年から1993年までの一乳期当たりの乳量の増加は年当たり約150kgにもなるが、最近ではその約4/5が遺伝的改良によるものとなり⁹⁾、遺伝的改良が非常に重要になっている。現在、乳用牛の改良は表現形質やコンピューターにより算出された遺伝的能力であるEBVを指標に行われているが、遺伝子情報の利用によりさらに効率的な改良が可能になる。

また、牛群検定に加入している乳牛は、毎月一度サン



図1 制限酵素 *Hinf I* の切断部位 (——)
Nは任意の塩基を表す。

プル乳を生乳検査所に送付して乳成分値などを測定するため、サンプル乳からの遺伝子増幅が可能であれば、遺伝子検査を簡単にかつ効率的に行うことができる。

そこで、本試験では、サンプル乳を用いた遺伝子増幅、県内乳用牛の *Pit-1* の多型、多型と泌乳形質との関連性について検討した。

材料及び方法

1 県内乳用牛の *Pit-1* 多型

(1) 調査牛

県内の乳用牛群検定加入農家19戸、207頭のサンプル乳を多型検査に供した。サンプル収集は1999年7月から2000年7月に行った。

(2) サンプル乳処理

1.5mlのサンプル乳を11,000gで1分間遠心分離し、上澄みを吸引除去した後、チューブ壁に付着した脂肪を綿棒でふき取った。洗浄のため、沈殿物に0.9%食塩水を加えて再度、遠心分離・上澄み除去・脂肪除去を行った。

沈殿物にTEN⁶⁾ 22 μ l、1M水酸化ナトリウム 3 μ lを加えて激しく攪拌し、95°Cで8分間加熱した。

(3) PCR (Polymerase Chain Reactions) 増幅

上記処理を行ったサンプル乳 1 μ l、2mMのMgCl₂、0.2mMのdNTPs、各々0.3 μ Mのプライマー、0.5UのTaq DNAポリメラーゼ(アマシヤムファルマシヤバイオテック社製)を含む50 μ lをPCR反応液とした。プライマーは、イントロンVからエキソン6にかけての451bp (bp: base pair, 塩基対, DNAの長さの単位)を増幅するため、Woollardら⁴⁾に従った(5'-AAACCATCATCTCCCTTCTT-3', 5'-AATGTACAATGTGCC TTCTGAG-3')。PCR条件は、94.5°C10分、94°C1分に続いて95°C30秒 56°C1分 72°C2分を35サイクル、最後に72°C10分とした。

(4) 型判定

前述の方法によりサンプル乳の処理とPCRを行った。PCR産物10 μ lに *Hinf I* (宝酒造社製) 10Uを加えて37°Cで一晩処理を行い、1 μ g/mlのエチジウムブロマイドを含む2%アガロースゲルで電気泳動して型を判定した。

2 泌乳形質の評価

調査牛を遺伝子型により区分し、泌乳形質(乳量、乳脂肪量、乳タンパク質量、無脂固形分量、乳脂肪率、乳タンパク質率、無脂固形分率)を比較した。

泌乳形質の評価には社団法人家畜改良事業団で1999年後期(12月)に算出されたEBVを用いた。1999年後期

表1 サンプル乳中体細胞を用いた PIT1 増幅

	増幅可能	増幅不可能	計
体細胞数10万未満	68	11	79
体細胞数10万以上	73	4	77
合計	141	15	156

の評価値を持たない牛20頭については、2000年前期（19頭）、1999年前期（1頭）の評価を用いた。なお、各年で評価値算出に用いる遺伝ベースが異なるため、2000年前期の評価についてはベース移動分の補正を行った¹⁰⁾。

雌牛のEBV評価では、娘牛数が限られているので信頼度が雄牛に比較して低くなる¹⁰⁾。そこで、多型調査牛207頭のうち、信頼度50%以上のEBV評価値を持つ182頭を採用した。

3 統計処理

PCR法での増幅については、増幅の可否と体細胞数（10万未満と10万以上）で分割してFisherの直接確率検定を行った。

Pit-1遺伝子型間での泌乳形質の分析については、一元配置分散分析により平均値の差を検定し、有意差が認められた場合は、Scheffeの多重比較を行った。

結 果

1 サンプル乳中体細胞を用いた Pit-1 遺伝子増幅

156検体のうち141検体で遺伝子増幅が可能であった（表1）。増幅が可能であった検体と不可能であった検体間で体細胞数に有意差は認められなかった。

2 県内乳用牛の Pit-1 多型

PCR産物は451bpであった。PCR産物をHinf Iで処理すると切断されない（451bp）A座と一カ所で切断される（244bpと207bp）B座が見られた（図2）。調査牛207頭について、A座とB座の遺伝子頻度はそれぞれ25.6%、74.4%であった。個体は両親由来の二本の染色体を持ったため、個体の遺伝子型はAA型、AB型、BB型の3パターンに分離し、頻度はそれぞれ3.9%、43.5%、52.6%であった（表2）。

3 泌乳形質の評価

信頼度50%以上のEBV評価値を持つ個体は調査牛207頭のうち182頭であり、その遺伝子型頻度はAA、AB、BB型でそれぞれ3.3%、47.8%、48.9%であった（表2）。

AA型、AB型、BB型において、EBV評価値の信頼度の平均はそれぞれ58%、57.2%、57.2%であり、ほぼ同程度であった。

表2 県内乳用牛の PIT1 多型

	遺伝子型調査数	形質評価数
AA	8 (3.9%)	6 (3.3%)
AB	90 (43.5%)	87 (47.8%)
BB	109 (52.6%)	89 (48.9%)
計	207 (100%)	182 (100%)

AA型を持つ個体の乳量、乳脂肪量、乳タンパク質量、無脂固形分量のEBV平均値はAB型及びBB型よりも高い傾向にあった（表3）。しかし、一元配置分散分析では乳量、無脂固形分量についてのみ3グループ間で有意差が認められた（ $P < 0.1$ ）ものの多重比較では各グループ間に有意差は認められなかった。

乳成分率EBVについては、AA型、AB型、BB型間で差は見られなかった（表4）。

考 察

Lipkinら¹¹⁾はQTL解析に利用し得る程度の精製DNAを抽出するためには、乳中体細胞数が少なくとも 17×10^6 必要であると報告している。今回の試験ではPCR法と制限酵素による多型の検出を行ったが、QTL解析ほどのDNA精製度を必要としないので、簡易法で処理した乳中体細胞を利用した。遺伝子増幅は90%の検体で可能であり、体細胞数は増幅の可否に影響を与えなかった。最も体細胞数が少なかった（体細胞数は8000/ml）検体からも増幅ができ、サンプル乳をDNA源とした遺伝子増幅は可能であると考えられた。また、増幅が可能

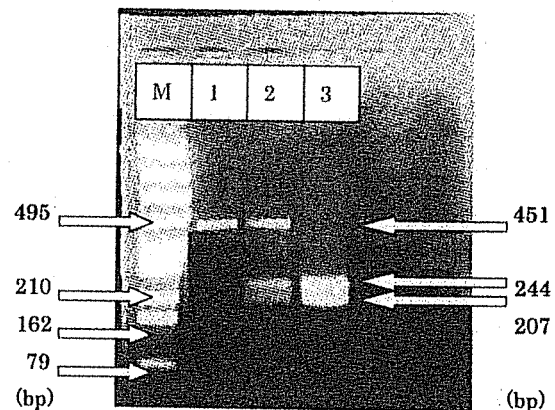


図2 PIT1 遺伝子の Hinf I による遺伝子型

- 1 : AA型
- 2 : AB型
- 3 : BB型
- M : サイズマーカー (ϕ x174 Hinc II 消化物)

表3 産乳量のEBV評価

遺伝子型	例数(頭)	乳量EBV(kg) a	乳脂肪量(kg)	乳タンパク質量(kg)	無脂固形分量(kg) b
AA	6	+767.0±520.2	+34.2±18.8	+23.3±13.2	+66.8±39.2
AB	87	+250.4±598.5	+11.4±26.5	+7.6±19.3	+22.2±52.3
BB	89	+346.8±571.3	+14.0±24.8	+9.2±16.8	+30.0±47.8
計	182	+314.6±587.9	+13.4±25.6	+8.9±18.1	+27.5±50.2

平均±標準偏差 a, b: AA, AB, BB型間で有意差(p<0.1)

表4 乳成分率のEBV評価

遺伝子型	例数(頭)	乳脂肪率EBV(%)	乳タンパク質率(%)	無脂固形分率(%)
AA	6	+0.073±0.242	-0.015±0.068	-0.007±0.105
AB	87	+0.027±0.189	-0.003±0.079	+0.004±0.103
BB	89	+0.014±0.218	-0.023±0.091	-0.005±0.126
計	182	+0.022±0.205	-0.013±0.085	-0.001±0.114

平均±標準偏差

であったサンプル乳141検体のうち34検体について *Hinf* I による処理を行って遺伝子型を判定したが、血液から抽出したDNAを用いて判定した遺伝子型と全サンプルで一致した。PCR法と制限酵素による多型の検出には本試験で用いたサンプル乳の簡易処理法が利用できると思われる。

Georgesら⁷⁾は、第一染色体上に乳量・乳タンパク質量に影響を及ぼすQTLが存在することを報告している。Renavilleら¹⁰⁾は *Pit-1* のA遺伝子が乳量、タンパク質量を増加させ、体の深みや線形性を増し、足を強くすること、乳量増加の結果として乳脂肪率を減少させることを報告している。今回の調査では体型についての調査を行っていないが、泌乳形質についてはAA型を持つ個体は乳量、乳脂肪量、乳タンパク質量、無脂固形分量においてAB、BB型よりも優れている傾向にあった。*Pit-1* の多型は乳用牛の泌乳形質改良のマーカーの一つとなる可能性があると思われるが、AA型の例数が少ないため、さらにAA型を持つ個体について調査する必要がある。

県内乳用雌牛では、A遺伝子の頻度は26%とB遺伝子よりも低かった。A遺伝子の頻度については、雌牛を対象にした調査では、1994年アメリカで15%¹⁰⁾、種雄牛を対象にした調査では、1997年イタリアで19%¹⁰⁾、1998年ドイツで32%⁵⁾であったと報告されている。新しい調査でA遺伝子の頻度が高い傾向にあるとすれば、牛群改良と共にA遺伝子の割合が増加していると考えられる。し

かし、改良が急速にすすんでいると思われる種雄牛においても、未だA遺伝子の割合は低い。今回の調査では、AB型を持つ個体とBB型を持つ個体間で泌乳形質に差が認められなかったが、それがAA型が急速に増加しないことの要因の一つとなっていることが考えられる。

Georgesら⁷⁾は、マーカーを利用した乳用牛の改良について検討するため、通常は極端に異なる形質を持つ家系を用いて行うQTL解析を強い選抜を受けたエリート種雄牛の家系について行い、まだ多型が見られる遺伝子座が存在することを報告している。現在でも、種雄牛の改良は驚くほど急速であるが、遺伝子情報の利用によりさらに速まり、雌牛の改良も進むと考えられる。

乳用牛の改良は種雄牛の効果によるところが大きい、近年では雌牛側からの改良も積極的に行われている。牛群検定加入雌牛についてもEBVの算出が開始され、高能力牛作出のために受精卵移植技術の利用が推進されている。本試験はサンプル乳を利用した遺伝子型調査を行ったが、遺伝情報を利用した改良が実用化段階に入れば、毎月生乳検査所に送付される牛群検定加入牛のサンプル乳で乳成分分析と共に遺伝子検査を行うことにより県内乳用牛の改良が非常に速やかにまた効率的に進むものと考えられる。

謝 辞

サンプル収集にご協力頂きました兵庫県酪農農業協同

組合連合会生乳検査所・三原郡酪農農業協同組合指導部の皆様に感謝致します。

引用文献

- (1) Andersson L., Haley C. S., Ellegren H., Knott S. A., Johansson M., Andersson K., Andersson-Eklund L., Edfors Lilja I., Fredholm M., Hansson I., Hakansson J. and Lundstrom K. (1994) : Genetic Mapping of Quantitative Trait Loci for Growth and Fatness in Pigs : *Science* 263, 1771-1774
- (2) Barendse W., Vaiman D., Kemp S. J., Sugimoto Y., Armitage S. M., Williams J. L., Sun H. S., Eggen A., Agaba M., Aleyasin S. A., Band M., Bishop M. D., Buitkamp J., Byrne K., Collins F., Cooper L., Coppettiers W., Denys B., Drinkwater R. D., Easterday K., Elduque C., Ennis S., Erhardt G., Ferretti L., Flavin N., Gao Q., Georges M., Gurung R., Harlizius B., Hawkins G., Hetzel J., Hirano T., Hulme D., Jorgensen C., Kessler M., Kirkpatrick B. W., Konfortov B., Kostia S., Kuhn C., Lenstra J. A., Leveziel H., Lewin H. A., Leyhe B., Lol L., Burriel I. M., McGraw R. A., Miller J. R., Moody D. E., Moore S. S., Nakane S., Nijman I. J., Olsaker I., Pomp D., Rando A., Ron M., Shalom A., Teale A. J., Thieven U., Urquhart B. G. D., Vage D. I., Weghe A. V., Varvio S., Velmala R., Vikki J., Weikard R., Woodside C., Womack J. E., Zanotti M., Zaragoza P. (1997) : A Medium Density Genetic Linkage Map of the Bovine Genome : *Mamm. Genome* 8, 21-28
- (3) Bauman, D. E., Eppard P. J., DeGeeter M. J., and Lanza G. M. (1985) : Response of High Producing Dairy Cows to Long Term Treatment with Pituitary-and Recombinant-Growth Hormone : *J. Dairy Sci.* 68, 1352
- (4) Bishop M. D., Kappes S. M., Keele J. W., Stone R. T., Sunden S. L. F., Hawkins G. A., Toldo S. S., Fries R., Grosz M. D., Yoo J., and Beattie C. W. (1994) : A Genetic Linkage Map for Cattle : *Genetics* 136, 619-639
- (5) Dierkes B., Kriegesmann B., Baumgartner B. G., Brenig B. (1998) : Partial Genomic Structure of the Bovine *Pit-1* Gene and Characterization of *Hinf I* Transition Polymorphism in Exon6 : *Anim. Genet.* 29(5), 405
- (6) Dietz A. B., Cohen N. D., Timms L., and Kehrli M. E., Jr. (1997) : Bovine Lymphocyte Antigen Class II Alleles as Risk Factors for High Somatic Cell Counts in Milk of Lactating Dairy Cows : *J. Dairy Sci.* 80, 406-412
- (7) Georges M., Nielsen D., Mackinnon M., Mishara A., Okimoto R., Pasquino A. T., Sargeant L. S., Sorensen A., Steel M. R., Zhao X., Womack J. E., and Hoeschele I. (1995) : Mapping Quantitative Trait Loci Controlling Milk Production in Dairy Cattle by Exploiting Progeny Testing : *Genetics* 139(2), 907-920
- (8) Harlizius B., Hetzel J., Barendse W. (1995) : Comparative Mapping of the Proximal Part of Bovine Chromosome1 : *Mamm. Genome* 6, 481-483
- (9) 磯貝保 (1998) : 生産性向上のためには「優良な後継牛の確保=改良」がポイント : *LIAJ News* 55, 1-5
- (10) Li S., Crenshaw E. B. 3rd, Rawson E. J., Simmons D. M., Swanson L. W., and Rosenfeld M. G. (1990) : Dwarf Locus Mutants Lacking Three Pituitary Cell Types Results from Mutations in the POU-Domain Gene *Pit-1* : *Nature (Lond.)* 347, 528
- (11) Lipkin E., Shalom A., Khatib H., Sollar M., and Friedmann A. (1993) : Milk as a Source of Deoxyribonucleic Acid and as a Substrate for the Polymerase Chain Reaction : *J. Dairy Sci.* 76, 2025-2032
- (12) Moody D. E., Pomp D., and Barendse W. (1995) : Restriction Fragment Length Polymorphism in Amplification Products of the Bovine *Pit-1* Gene and Assignment of *Pit-1* to Bovine Chromosome1 : *Anim. Genet.* 26(1), 45-47
- (13) Peel, C. J., and Bauman D. E. (1987) : Somatotropin and Lactation : *J. Dairy Sci.* 70, 474
- (14) Renaville R., Gengler N., Verch E., Prandi A., Massart S., Corradini C., Bertozzi C., Mortiaux F., Burny A., and Portetelle D. (1997) : *Pit-1* Gene Polymorphism, Milk Yield, and Conformation Traits for Italian Holstein-Friesian Bulls : *J. Dairy Sci.* 80(2), 3431-3438
- (15) 龍田 健・藤中邦則・山崎宗延 (2000) : 鶏における増体性の QTL マッピング : 兵庫農技研報 (畜産) 36, 7-14

- (16) Woollard J., Schmitz C.B., Freeman A. E., and Tuggle C. K. (1994) : Rapid Communication : *Hinf* I Polymorphism at the Bovine *Pit* I Locus : J. Anim. Sci. 72, 3267
- (17) 吉泉努 (2000) : 2000- I 乳用牛評価からの変更事項と評価成績への影響について : LIAJ News 63, 11-24
- (18) 吉泉努 (2000) : 我が国の乳牛改良の成果と課題①- 評価値の有効利用が改良の決め手 : LIAJ News 61, 1-12