

農業生物資源ジーンバンク事業  
動物遺伝資源部門  
平成21年度完了委託課題報告集  
(2010年4月)

目次

A. 新規特性

和牛等日本固有牛品種のグレリン受容体遺伝子構造の多様性の解明と育種応用への評価

(平成19年度～21年度)

農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所 家畜育種増殖研究チーム

## A 新規特性

### 和牛等日本固有牛品種のグレリン受容体遺伝子構造の 多様性の解明と育種応用への評価

小松正憲<sup>1</sup>・伊藤智仁<sup>2</sup>・藤森祐紀<sup>3</sup>・佐藤洋一<sup>4</sup>・  
佐藤正寛<sup>1</sup>・佐々木修<sup>1</sup>・高橋秀彰<sup>1</sup>

<sup>1</sup>独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構  
畜産草地研究所 家畜育種増殖研究チーム、  
<sup>2</sup>家畜改良事業団・家畜改良技術研究所、  
<sup>3</sup>茨城県畜産センター・肉用牛研究所、  
<sup>4</sup>岩手県農業研究センター・畜産研究所

#### 要約

グレリン受容体は主に視床下部および下垂体等で発現し、成長ホルモン(GH)分泌や摂食亢進作用を持つ「グレリン」の機能を発揮させる重要な受容体である。ウシ・グレリン受容体遺伝子とその多型に関する研究は最近までなされていなかった。我々は、黒毛和種、褐毛和種および日本短角種の和牛3品種、見島牛および和牛品種成立に関与したとされるヨーロッパ系品種、フィリピン在来牛やアメリカンブラーマン交雑種の*Bos indicus*系牛のサンプルも含めた13品種26頭のゲノムDNAを用い、5'フランキング領域から3'UTRまで約6.5キロ塩基対のウシ・グレリン受容体遺伝子全長にわたる塩基配列を決定し、塩基多型の全容を明らかにした。本遺伝子全体で53箇所の塩基多型を認め、うち一塩基多型(SNPs)および塩基の挿入/欠失は51箇所、マイクロサテライトは2箇所であった。5'UTRに存在するマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)の多型性は高く、ウシ13品種で17個のアリルを認めた。また、塩基多型の情報から19種類のハプロタイプが推定できた。このハプロタイプから本遺伝子の分子系統樹を作成したところ、和牛等*Bos taurus*系牛で2系統、*Bos indicus*系牛で1系統の3系統に大別できた。また、見島牛には特有のハプロタイプを認めた。日本短角種、褐毛和種、およびヨーロッパ系品種でエキソン1領域に3塩基挿入/欠失の変異DelR242を認め、このうち日本短角種におけるDelR242アリル頻度は0.43と高頻度であった。さらに、本遺伝子内のハプロタイプブロックとハプロタイプの品種分布を検討し、黒毛和種等和牛で本遺伝子の塩基多型と増体形質等との関連解析をする際に、検討すべき塩基多型として、5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)、nt-7(C>A)、L24V(nt+70(C>G))、DelR242とイントロン1マイクロサテライト((GTTT)<sub>n</sub>)の5種

類を選定した。このうちイントロン1マイクロサテライト((GTTT)<sub>n</sub>)は、*Bos indicus*系牛内で、ハプロタイプ2系統を区別できるDNAマーカーである。

黒毛和種でグレリン受容体遺伝子の塩基レベルでの多様性と増体能力との関連性を明らかにするため、1,285頭の黒毛和種後代検定牛集団を用い、本遺伝子の上記5箇所の塩基多型と増体形質との関連性を検討した。その結果、5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)とnt-7(C>A)座位が有意に増体形質と関連することが明らかになった。また、両座位のうち、5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)座位での有意水準が最も高かった。関連性が認められた産肉形質は、検定開始体重(WB)、検定終了時体重(WS)、枝肉重量(CW)、平均1日増体重(ADG)等の増体形質であり、脂肪交雑(BMS)や筋間脂肪厚(IFT)等との間には有意な関連性は認めなかった。5'UTRマイクロサテライトアリル((TG)<sub>n</sub>)座位のアリルの中で、[19-TG]アリル (TG反復19回) が枝肉重量を増加させる好ましい相加的効果を持つと推定された。黒毛和種集団における5'UTRマイクロサテライト[19-TG]アリル頻度は0.15程度とまだ低く、黒毛和種において枝肉重量を増体させる有効なDNAマーカーとして活用できることが明らかになった。黒毛和種繁殖肥育一貫経営農家が[19-TG]アリル・ホモ型の種雄牛の精液を交配し、子牛生産に利用した場合、精液差額が無ければ、5'UTRマイクロサテライトのタイピング料金が5千円であっても、利用1年目から1頭あたり1万円の収益上昇を期待できることがシミュレートできた。

## 緒言

グレリン受容体(以後GHSRと略)は主に視床下部および下垂体等で発現し、成長ホルモン(GH)分泌や摂食亢進作用を持つ「グレリン」の機能を発揮させる重要な受容体である<sup>1)</sup>。現在までヒト<sup>2),3)</sup>やラット<sup>4)</sup>などでは、本遺伝子の多型と肥満、低身長、増体との関連性が報告されてきている。しかしながら、ウシにおける本遺伝子とその多型に関する研究は最近まで皆無に近い状況であった<sup>5),6)</sup>。我々は、黒毛和種半きょうだい家系を用いた体重や体型形質のQTL連鎖解析研究から、生時体重と胸幅のQTLを染色体第1番の約100センチモルガン付近にマップし、その候補遺伝子の一つとしてヒト-ウシ比較地図からグレリン受容体遺伝子を推定した<sup>7),8)</sup>。ウシ・グレリン受容体遺伝子の全長にわたる塩基レベルの多様性に関する研究報告は皆無であったため、著者らは、ウシ・グレリン受容体遺伝子の全長にわたる塩基レベルでの変異を明らかにする研究を開始した。まず、本遺伝子の塩基変異の全容を明らかにするためのサンプルとして、日本に存在する牛肉資源品種として黒毛和種、褐毛和種および日本短角種の和牛3品種、および和牛の祖先型牛と考えられる「見島牛」<sup>9)</sup>、和牛品種成立に関与したとされるヨーロッパ系品種を用いることにした。また、アメリカンブラーマン交雑種やフィリピン在来牛の*Bos indicus*系牛のサンプルも含め出来るだけ多くの塩基多

型を把握できるようにした。

本研究では、ウシ・グレリン受容体遺伝子の全長にわたる塩基多型の全容を明らかにし、以下の4点につき検討と考察を行った。

- (1) 塩基多型の全情報からハプロタイプ構造を推定してウシ・グレリン遺伝子ハプロタイプの分子系統樹の作成し、グレリン受容体遺伝子の塩基多型からみた和牛、見島牛、ヨーロッパ系牛、*Bos indicus* 系牛の遺伝的関連性を考察する。
- (2) グレリン受容体遺伝子の塩基レベルでの多様性と増体能力との関連性を黒毛和種後代検定牛集団で検討する。
- (3) グレリン受容体遺伝子型情報を農家の経営に利用した場合の収益上昇額を推定し、その有用性を評価する。
- (4) グレリン受容体遺伝子配列のウシ特異的配列部分に関して分子進化の観点から考察する。

## 方法

### 1) グレリン受容体遺伝子5'UTRに存在するマイクロサテライトの多型解析と塩基配列の決定

遺伝子塩基多型の全貌を明らかにするためには、できるだけ少数個体で、かつ塩基レベルでの多様性ができるだけ大きくなるような個体を選択する必要がある。興味深いことにウシドラフトシーケンス (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/bovine/>) からウシ・グレリン受容体遺伝子5'フランキング領域内には(TG)<sub>n</sub>のマイクロサテライトが存在することが明らかとなった。しかし、ヒト、マウスやラットにはこのようなマイクロサテライトは存在しない。このマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)に多型が存在するなら、このマイクロサテライトは遺伝子塩基多型解析用個体選抜のマーカーになる。そこで、まずこのマイクロサテライトの多型解析を行った。マイクロサテライト多型解析サンプルは*Bos taurus*種として、黒毛和種93頭、日本短角種77頭、褐毛和種・熊本系20頭（これらは全て種雄牛）、褐毛和種・高知系11頭、見島牛58頭、ホルスタイン・フリージャン種34頭（全頭種雄牛）、ヨーロッパ系牛4品種30頭（ジャージー種7頭、スイスブラウン種6頭、ヘレフォード種9頭、アバディーン・アンガス種8頭）、また、*Bos indicus/Bos taurus*混交品種としてアメリカン・ブラーマン交雑種5頭、フィリピン在来種28頭（バタングス牛9頭、イロコス牛12頭、イロイロ牛7頭）の合計12種類356頭のゲノムDNAを解析した。このマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)部分（~44塩基）を増幅するように、プライマー（Fプライマー(Fam修飾：20bp)およびRプライマー(19bp)）を設計し、ゲノムDNAを鋳型としてPCR増幅を行った(約180bp)。1×TAE bufferによる2.5%アガロースゲルで増幅を確認後、ABI社のシーケンサーで増幅サイズを測定し、アレルの種類を判定

するフラグメント解析を行った。**PCR溶液**（使用DNAポリメラーゼ： TOYOBO KOD Plus）： 1 サンプル当たり： 10 X Buffer  $2\mu\text{l}$ 、 dNTP  $2\mu\text{l}$ 、  $\text{MgSO}_4$   $1\mu\text{l}$ 、 FおよびRプライマー（ $10\text{pmol}/\mu\text{l}$ ）各 $1\mu\text{l}$ 、 KOD Plus（酵素） $0.3\mu\text{l}$ （0.3U）、蒸留水 $11.7\mu\text{l}$ 、 DNAサンプル $1\mu\text{l}$ 、計  $20\mu\text{l}$ 。**PCR条件**： (1)  $94^\circ\text{C}$  2 min、 (2)  $94^\circ\text{C}$  30秒、  $62^\circ\text{C}$  45秒 35サイクル、  $68^\circ\text{C}$  30秒、  $68^\circ\text{C}$  1分、  $4^\circ\text{C}$  保持<sup>10)</sup>（表1）。

なお、本遺伝子5'フランキンク領域内のマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)はウシ脳弓状核の全RNAを用いた5'-rapid amplification of cDNA ends (RACE)による検討で非スプライシング型mRNA(1bタイプ；GHSR1b)として転写されることが判明している<sup>10)</sup>。したがって、本マイクロサテライトは5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)とする。なお、スプライシング型mRNA(1aタイプ；GHSR1a)として転写されるmRNAは7回膜貫通型Gタンパク質結合型受容体としてグレリン認識機能をもつ通常型グレリン受容体(GHSR1a)に翻訳される。また、非スプライシング型のGHSR1bのmRNA(1bタイプ)は、5回膜貫通型Gタンパク質結合型受容体(GHSR1b)に翻訳される。このGHSR1bにはグレリン認識機能はない。

## 2) 塩基多型の全容解明に用いたサンプル

マイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)を解析したサンプルの中で、異なるアリル・ホモ型個体15頭（ホモ型アリルサイズ (bp)： 174, 178, 180, 182, 184, 186, 192）およびヘテロ型11頭の（156/174, 174/182, 174/194, 174/204, 176/188, 178/182, 178/204, 180/188, 180/192, 182/184, 182/204）計26頭のゲノムDNAを用いて遺伝子全体をPCR増幅し、塩基配列を決定した。品種の内訳は、*Bos taurus*種として、黒毛和種8頭、褐毛和種5頭（熊本系4頭、高知系1頭）、日本短角種1頭、見島牛2頭、ホルスタインーフリージャン種2頭、ヨーロッパ系牛4品種（ジャージー種1頭、スイスブラウン種2頭、ヘレフォード種1頭、アバディーン-アンガス種1頭）、アメリカン-ブラーマン交雑種1頭、フィリピン在来種2品種（イロイロ牛、バタンガス牛各1頭）合計13品種であった。

表1. 和牛3品種、見島牛、ホルスタイン種およびインド系牛におけるグレリン受容体遺伝子(*GHSR1a*)の5'UTRマイクロサテライト(*(TG)<sub>n</sub>*)の多型.

品 種	解析 頭数	アリルの種類とその頻度 ((TG) n)																	$\chi^2$ #	H <sup>‡</sup>	
		156 (10) <sup>5)</sup>	166 (15)	168 (16)	172 (18)	174 (19) <sup>†</sup>	176 (20)	178 (21) <sup>†</sup>	180 (22) <sup>†</sup>	182 (23) <sup>†</sup>	184 (24) <sup>†</sup>	186 (25) <sup>†</sup>	188 (26)	190 (27)	192 (28) <sup>†</sup>	194 (29)	198 (31)	202 (33)			
<i>Bos taurus</i> 系牛																					
和牛																					
黒毛和種	93	-	-	-	-	<b>0.220</b> <sup>§</sup>	-	0.011	0.086	<b>0.242</b>	<b>0.366</b>	-	-	-	-	0.038	-	0.038	<i>a</i>	0.798	
日本短角種	77	-	-	-	-	0.019	<b>0.201</b>	0.013	0.110	<b>0.221</b>	0.058	<b>0.143</b>	0.026	-	<b>0.201</b>	-	0.006	-	<i>b</i>	0.833	
褐毛和種 <sup>1)</sup>	31	-	-	-	-	0.032	0.081	<b>0.177</b>	<b>0.177</b>	<b>0.161</b>	<b>0.226</b>	-	0.129	-	-	-	-	0.016	<i>c</i>	0.836	
(熊本系)	(20)	(-)	(-)	(-)	(-)	(0.025)	(-)	(0.250)	(0.150)	(0.175)	(0.225)	(-)	(0.150)	(-)	(-)	(-)	(-)	(0.024)	-	(0.811)	
(高知系)	(11)	(-)	(-)	(-)	(-)	(0.045)	(0.227)	(0.045)	(0.227)	(0.136)	(0.227)	(-)	(0.091)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	(0.814)	
見島牛	58	-	-	-	-	-	-	0.009	-	0.138	<b>0.353</b>	<b>0.500</b>	-	-	-	-	-	-	<i>d</i>	0.606	
ホルスタイン-フリージャン種	34	-	-	-	-	<b>0.294</b>	0.029	<b>0.132</b>	<b>0.162</b>	0.074	<b>0.162</b>	0.015	0.075	-	-	-	-	0.059	<i>ce</i>	0.828	
ヨーロッパ系牛4品種 <sup>2)</sup>	30	-	-	-	-	<b>0.167</b>	0.017	<b>0.250</b>	<b>0.167</b>	<b>0.183</b>	-	0.050	0.100	0.017	0.050	-	-	-	<i>e</i>	0.833	
<i>Bos indicus/Bos taurus</i> 混合系牛																					
フィリピン在来牛 <sup>3)</sup>	28	<b>0.107</b>	0.018	0.036	0.071	0.054	-	0.018	<b>0.571</b>	0.071	-	0.018	0.036	-	-	-	-	-	<i>f</i>	0.645	
アメリカン-ブラーマン交雑種 <sup>4)</sup>	5	0.100	-	-	-	-	-	0.100	<b>0.600</b>	0.100	-	-	0.100	-	-	-	-	-	-	0.600	
合計頭数	356																				

<sup>1)</sup> 熊本系 (20頭) + 高知系(11頭); <sup>2)</sup> ジャージー種(7頭) + スイスブラウン種 (6頭) + ヘレホード種 (9頭) + アバディーン-アングス種 (8頭)

<sup>3)</sup> バタンガス牛(9頭) + イロコス牛 (12頭) + イロイロ牛 (7頭); <sup>4)</sup> フィリピン大学ロスバニオス校牛群; <sup>5)</sup> TG反復数

# アリル頻度の品種間差異(異なる符号間でアリル頻度に有意差あり( $\chi^2$ テスト;  $P < 0.05/21$ , 21回検定のBonferroni 補正))

§ 太字は各品種での主要なアリル

‡  $H = 1 - \sum p_i^2$

† 塩基配列決定アリル(塩基配列は以下)

アリル156 (10)、バタンバス牛(サンプル)、TG(10)(塩基配列: 5'→3'; ( )内は反復数)

アリル174 (19)、黒毛和種、TG(10)TC(1)TG(8)

アリル174 (19)、黒毛和種、ホルスタイン種、TG(10)TC(1)TG(8)

アリル174 (19)、バタンガス牛、TG(19)

アリル178 (21)、アバディーン-アングス種、TG(12)TC(1)TG(8)

アリル180 (22)、褐毛和種、アメリカン-ブラーマン交雑種、TG(13)TC(1)TG(8)

アリル182 (23)、黒毛和種、TG(14)TC(1)TG(8)

アリル184 (24)、黒毛和種、TG(15)TC(1)TG(8)

アリル186 (25)、見島牛、TG(16)TC(1)TG(8)

アリル192 (28)、日本短角種、TG(19)TC(1)TG(8)

### 3) 5'UTRマイクロサテライト(TG)<sub>n</sub>アリの塩基配列決定

興味深いことにウシドラフトシーケンスから、本ウシ・グレリン受容体遺伝子マイクロサテライトのTG反復配列中には1箇所TC配列が存在していた。本マイクロサテライトのTG反復配列数に多型性があるとすると、この1箇所TC配列をマーカーとすれば、TG反復は5'→3'方向に反復数を増加また減少させたのか、あるいは3'→5'方向なのか明らかにできる。そこで、マイクロサテライトのアリル・ホモ型7種類(174, 178, 180, 182, 184, 186, 192)へテロ型1種類(156/174)計8種類の計10個体の5'UTRマイクロサテライトの塩基配列を決定し、TG反復の増減方向を決定した。品種の内訳は、黒毛和種3頭、褐毛和種1頭(熊本系)、日本短角種1頭、見島牛1頭、ホルスタインフリージャン種1頭、アバディーンアンガス種1頭、アメリカン-ブラーマン交雑種1頭、フィリピン在来種1頭(Batangas 1頭)8品種であった。

### 4) 塩基配列決定と塩基多型検出

本遺伝子の5'フランキング領域から3'非翻訳領域までを含む全遺伝子領域全体約6.5キロ塩基対を増幅するようにプライマーセットを17セット(各600塩基対程度を増幅)を設計した。これらのプライマーセットを用いてゲノムDNAを鋳型としてPCR増幅を行い、ABI社のシーケンサーでDye Terminator法によりダイレクトシーケンス(両鎖解析)を行い塩基配列決定した。**PCR溶液**(使用DNAポリメラーゼ: TaKaRa LA Taq (5U/μl): 1サンプル当たり: 10 X GC Buffer I 10 μl, dNTP(2.5mM each) 3.2 μl, FおよびRプライマー (10 μM)各1 μl, TaKaRa LA Taq (酵素) 1 μl (5U)、DNAサンプル(10ng/μl) 1 μl、蒸留水で計 20 μl。**PCR条件**: (1) 94°C 4 min、(2) 94°C 30秒、60°C 45秒、72°C、60秒 35サイクル、72°C 60秒、72°C 2分、4°C 保持。**多型塩基検出**: シーケンス波形データを用いてPhred/Phrap/PolyPhredソフトウェアおよびSEQUENCHER(米国Genecodes社)ソフトウェアを用いて各塩基の精度(クオリティ値)の算出を行い多型塩基の検出を行った。最終的に波形の目視確認を行い、多型を選択した。

### 5) ハプロタイプ構築と系統樹解析

塩基多型を解析した26個体の全塩基多型とマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)型を比較しながら、本遺伝子全体にわたる塩基多型の組み合わせ、すなわちハプロタイプを推定した。さらに、これらのハプロタイプ情報から、ハプロタイプブロックを推定するプログラム、HAPLOVIEWver3.31<sup>11)</sup>を用いて、本遺伝子内のハプロタイプブロックを推定した。また、プログラムMEGA4<sup>12)</sup>を用いて近隣結合法による全ハプロタイプの系統樹解析を行い、ハプロタイプの分子進化を推定した<sup>10)</sup>。

## 6) 黒毛和種におけるグレリン受容体遺伝子の塩基多型と産肉形質との関連性

グレリン受容体遺伝子の塩基多型が黒毛和種の産肉形質に影響を与えるかを明らかにするため、家畜改良事業団プロジェクト黒毛和種後代検定牛1,285頭（種雄牛117頭）を用いて、グレリン受容体遺伝子の塩基多型と黒毛和種産肉形質を統計遺伝学的に解析した。解析した塩基多型は、推定した本遺伝子内のハプロタイプブロックを参考にして多型性に富むと推測した5'UTRに存在するマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)、nt-7(C>A)、L24V(nt70(C>G))、DelR242、イントロン1に存在するマイクロサテライト((GTTT)<sub>n</sub>)を解析した<sup>13)</sup>。統計解析を行った産肉形質は、検定開始体重(WB)、検定終了時体重(WS)、枝肉重量(CW)、平均1日増体重(ADG)、ロース芯面積(REA)、バラ厚(RT)、歩留基準値(YE)、皮下脂肪厚(SFT)、筋間脂肪厚(IFT)、脂肪交雑(BMS)であった。検定方法は、生後7～8ヶ月齢で後代検定去勢牛を2群に分け、各検定場で20日の予備飼育の後、52週間（364日間）規定の飼料と飼養条件で飼養したものである。

統計解析モデルは、以下の線形アニマルモデルを用いた。

$$y = X_1b + X_2g + Zu + e$$

y: 表現型値のベクター

b: 生年月、出生地、検定場所、検定開始年齢等の母数効果ベクター

g: グレリン受容体遺伝子の塩基多型の遺伝子の相加的効果のベクター

u: 形質に関与するポリジーンのランダムな相加的効果のベクター

e: 残差のベクター

X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, Z: 関連マトリックス

## 7) 黒毛和種繁殖肥育一貫経営農家における収益上昇額の推定

著者らが開発したプログラム(BeefIncome)<sup>14)</sup>を用いて黒毛和種繁殖肥育一貫経営農家における収益上昇額を推定した。簡単に述べると、枝肉重量を増加させる効果を持つ5'UTRマイクロサテライト[19-TG]アリルを1個持つことで得られる枝肉重量上昇分を8.12kg (=6.5kg × 440kg(一般的な黒毛和種の枝肉重量) ÷ 352kg(後代検定牛の平均枝肉重量))、去勢枝肉単価を「1,900円/kg」と仮定した。農家が使用する種雄牛個体の5'UTRマイクロサテライト型情報を得る経費（必要経費）として①DNAタイピング料金(特許使用料を含む)と②精液差額（農家が以前から使用していた種雄牛の精液から[19-TG]アリル型がホモ型の種雄牛精液に変更する際の費用）を想定した。対照集団として、DNAタイピングを行わない通常の集団としてハーディーワインバーグ集団を想定した。肥育牛および肥育繁殖牛1頭当たりの販売収益上昇額の推定は、繁殖雌牛集団の肥育牛から得られた収益上昇総額から、ハーディー

一・ワインベルグ集団の肥育牛から得られた収益上昇総額を減じ、さらに、必要経費である①精液差額の総額、②種雄牛または繁殖雌牛のDNAタイピング料金の総額を減じたものを、総販売牛頭数で除した推定式により求めた<sup>14)</sup>。

## 結果

### 1) 5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)座位のアリルとアリル頻度の品種間差異

5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)のフラグメント解析から、本座位のアリル数は13品種で17種類、そのサイズ(bp)は156、166、168、172、174、176、178、180、182、184、186、188、190、192、194、198、202塩基対であった(表1)。これらアリルの2塩基反復回数は、10回から33回まで広い範囲に分布し、これらアリル頻度には品種間差異が認められた。主要なアリルは、黒毛和種では174、182、184の3種類、日本短角種では176、182、186、192の4種類、褐毛和種(熊本系と高知系を合わせる)では178、180、182、184の4種類、見島牛では184、186の2種類、ホルスタイン-フリージャン種では174、178、180、184の4種類、ヨーロッパ系牛4品種は174、178、180、182の4種類、*Bos indicus*系牛の遺伝子をもつフィリピン在来牛では156、180の2種類、アメリカン-ブラーマン交雑種では180の1種類であった。アリルの種類とその頻度には和牛3品種間で差異が認められるとともに、ヨーロッパ系牛やフィリピン在来牛間でも特徴が認められた。特に、特にフィリピン在来牛では*Bos taurus*系牛である和牛やヨーロッパ系牛には存在しないか、あるいは存在しても極めて低頻度で塩基数サイズが172bp以下のアリルが特徴的に認められた。

### 2) 5'UTRマイクロサテライト(TG)<sub>n</sub>アリルの塩基配列の特徴

5'UTRマイクロサテライトのアリル・ホモ型(174, 178, 180, 182, 184, 186, 192)と一部ヘテロ型(156/174)個体の計10個体の本マイクロサテライトの塩基配列を決定した(表1脚注)。マイクロサテライトの特徴的塩基配列"TC"は、常に3'側から9反復目に位置していた[5'-(TG)<sub>n</sub>TC(TG)<sub>8</sub>-3']。したがって、本マイクロサテライトアリルのTG反復回数の増加は、3'→5'方向であることが判明した。さらに興味深いことに、mtDNA型が明確に*Bos indicus*タイプをもつフィリピン在来牛(バタンガス牛)(マイクロサテライトアリル:156/174ヘテロ型)のマイクロサテライトには、両アリルともにこの"TC"配列は存在せず、全てTGの反復のみであった。また、mtDNA型が明確に*Bos taurus*タイプをもつアメリカン-ブラーマン交雑種(マイクロサテライトアリル:174ホモ型)のマイクロサテライトは、*Bos taurus*系牛と同様に"TC"配列が3'側から9反復目に位置して存在した。これらの結果から、5'UTRマイクロサテライト(TG)<sub>n</sub>アリルには*Bos taurus*系牛タイプと*Bos indicus*系牛タイプの2つのタイプの存在が明らかになった。

### 3) 塩基多型の全容、ハプロタイプおよびハプロタイプに基づく系統樹解析

①塩基多型の全容：13品種26頭シークエンス波形データから確認できた多型塩基箇所は全体で53箇所認められ、その内、SNPsおよび塩基の挿入/欠失は51箇所、マイクロサテライトは2箇所であった（表2）。また、塩基多型の部位は、5'フランキング領域（5'UTRを含む）：18箇所、エキソン1領域：5箇所、イントロン1領域：26箇所、エキソン2領域：1箇所、3'UTR：3箇所であった。挿入/欠失の種類は、①1塩基挿入/欠失：2箇所（5'フランキング領域、イントロン1領域各1）、②3塩基挿入/欠失：2箇所（エキソン1領域、イントロン1領域各1）、③SNPs（1塩基置換）：47箇所（5'フランキング領域（5'UTRを含む）：16箇所、エキソン1領域：4箇所、イントロン1領域：23箇所、エキソン2領域：1箇所、3'UTR：3箇所）であった。

②ハプロタイプおよびハプロタイプに基づく系統樹解析：これら塩基多型の組み合わせ、すなわちハプロタイプを検討したところ、13品種26頭で19種類のハプロタイプが構築できた。これらのハプロタイプを比較してみると、塩基変異の多様性は、5'フランキング領域やエキソン2および3'UTRでは低く、エキソン1およびイントロン1で高かった。さらに、本遺伝子全体でハプロタイプブロックを検討してみると、和牛など*Bos taurus*系牛ではエキソン1の後半部分（nt667(C>T)）からイントロン1のほぼ末端部位（nt2991(G>A)）までの約2.3キロ塩基対のハプロタイプブロックを確認した。このハプロタイプブロックの塩基の多様性を検討したところ、和牛など*Bos taurus*系牛では大きく2グループに大別できることが示された。これらの結果は、塩基多型情報を用いた系統樹解析から確認できた（図1）。さらに、ウシ・グレリン受容体遺伝子の19種類のハプロタイプの系統樹解析から、本遺伝子は、祖先型ハプロタイプ（Hap43）から別の*Bos indicus*系牛タイプのハプロタイプが派生するとともに（Hap41, 42）、*Bos taurus*系牛タイプのハプロタイプが派生し、さらにこのハプロタイプは大きく2つの方向に分化したことが示された（グループ1、Hap01～Hap10；グループ2、Hap21～Hap26）（図1）。またこの系統樹解析から、和牛等*Bos taurus*系牛ハプロタイプとそれらの品種分布をみると、品種を超えて最も多く共有されているハプロタイプはHap07であった（保有品種：黒毛和種、褐毛和種（熊本）、ホルスタイン-フリージャン種、アバディーン-アンガス種、スイスブラウン種）。見島牛のもつハプロタイプHap04、Hap05はグループ1に属し、特異的なサブグループを形成した。このうちハプロタイプHap04は黒毛和種にも認められた。グループ2はアミノ酸置換を伴う特徴的な塩基多型（L24V, D191N）をもつHap21、Hap22、Hap23が属し、黒毛和種、褐毛和種、スイスブラウン種がこれらハプロタイプを保有していた。黒毛和種、褐毛和種（熊本系）、ホルスタイン-フリージャン種、スイスブラウン種のもつハプロタイプは両グループに分布していたが、日本短角種、褐毛和種（高知系）、ジャージー種のそれらはグループ1のみに属していた。

表2 ウシ・グレリン受容体遺伝子(*GHSR1a*) の塩基多型のまとめ

遺伝子領域 塩基多型クラス		塩基多型箇所数			
		小計	<i>B. taurus</i> 系牛のみ	<i>B. taurus</i> 系牛 と <i>B. indicus</i> 系牛	<i>B. indicus</i> 系牛のみ
5'-フランキ ング領域 + 5-UTR	SNP	16	5	2	9
	1塩基 挿入/欠失 <sup>1</sup>	1	1	0	0
エキソン 1	SNP <sup>2</sup>	4	4	0	0
	3塩基 挿入/欠失	1	1	0	0
イントロン 1	SNP	23	6	7	10
	1塩基 挿入/欠失 <sup>4</sup>	1	0	1	0
	3塩基 挿入/欠失 <sup>5</sup>	1	0	0	1
エキソン 2	SNP	1	0	0	1
3'-UTR	SNP	3	0	1	2
	合計	51	17	11	23
5'-UTR	マイクロサテライト (TG) <sub>n</sub>	(17) <sup>6</sup> (10-33) <sup>7</sup>	( 3) (27-33)	( 8) (19-26)	( 5) (10-18)
イントロン 1	マイクロサテライト (GTTT) <sub>n</sub>	(4) <sup>6</sup> (4,5,6,8) <sup>8</sup>	( 1) ( 8)	( 2) (5, 6)	( 1) ( 4)

<sup>1</sup>nt-1117(A>-). <sup>2</sup>L24V(nt70(C>G), nt456(G>A), D191N(nt580(G>A), nt667(C>T).

<sup>3</sup>DelR242(nt724-726(AGG>-)). <sup>4</sup>nt2323(T>-). <sup>5</sup>nt1449-1451(TTT>-). <sup>6</sup>アリル数. <sup>7</sup>(TG)反復数. <sup>8</sup>(GTTT)反復数.

以上、本遺伝子の塩基多型、ハプロタイプブロックおよびハプロタイプの品種分布を検討し、本遺伝子の塩基多型と黒毛和種等和牛で増体形質等との関連解析をする際に最低検討すべき塩基多型として、5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)、nt-7(C>A)、L24V(nt+70(C>G))、DeIR242とイントロン1マイクロサテライト((GTTT)<sub>n</sub>)の5座位を選定した。

#### 4) 5座位のアリル頻度とハプロタイプおよびこれらの品種の特徴

5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)のアリルとその頻度の品種の特徴は、既に上述した(表1)。したがってこれ以外の4座位、すなわち、nt-7(C>A)、L24V(nt+70(C>G))、DeIR242、イントロン1マイクロサテライト((GTTT)<sub>n</sub>)のアリル頻度とそれらの品種の特徴を述べる。

①nt-7(C>A)座位：アリルA頻度は日本短角種とホルスタイン-フリージャン種、アバディーン-アンガス種、ヘレフォード種、ジャージー種で優勢であり、アリルCは黒毛和種、見島牛、スイスブラウン種で優勢であった。特に見島牛でのアリルC頻度は、0.96と高かった。褐毛和種やフィリピン在来牛では両アリル頻度は同程度であった。

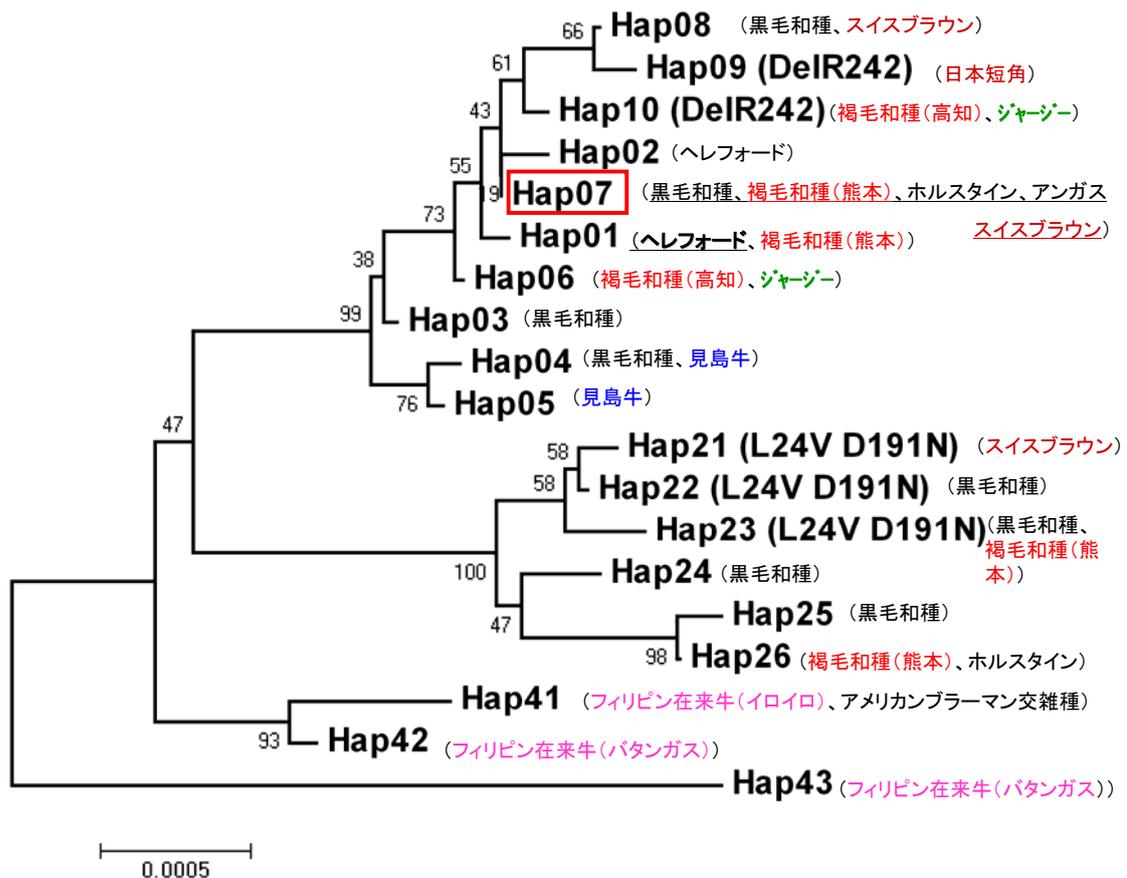


図1 ウシ・グレリン受容体遺伝子の塩基多型に基づくハプロタイプの進化系統樹 (近隣結合法) 分岐に示す数値は、Bootstrap 値

②L24V(nt+70(C>G))座位：アシルGはスイスブラウン種で比較的高頻度で認められた（アシル頻度：0.67）、熊本系の褐毛和種（同0.10）や黒毛和種（同0.05）では低頻度で認められた。しかし、アシルGは、日本短角種、高知系の褐毛和種、見島牛、ホルスタイン-フリージャン種、アバディーン-アンガス種、ヘレフォード種、ジャージー種、フィリピン在来牛には認められなかった。

③DelR242座位：エキソン1領域で認められた塩基多型DelR242は、翻訳開始点から724～726番目の3塩基AGGが欠失するものがある。この部位は7回膜貫通型受容体の細胞内第3ドメインで4個のアルギニンが連続する部位(--RRRR--)の2番目のアルギニンが欠失する。この”AGG”3塩基欠失遺伝子であるDelR242アシルは、日本短角種には高頻度で認められ（アシル頻度:0.43）、褐毛和種（2系統）、ヨーロッパ系品種4品種、ホルスタイン-フリージャン種、フィリピン在来牛、アメリカンブリーダーマン交雑種では低頻度で認められた。しかし、黒毛和種や見島牛ではDelR242アシルは見いだされなかった。

④イントロン1マイクロサテライト((GTTT)<sub>n</sub>)座位：*Bos taurus*系牛や*Bos indicus*系牛および品種を問わず、アシル(GTTT)<sub>5</sub>が優勢であった（アシル頻度:0.82以上）。アシル(GTTT)<sub>6</sub>はスイスブラウン種で比較的高頻度で認められ（アシル頻度:0.44）、褐毛和種（両系統）、ホルスタイン-フリージャン種、黒毛和種、フィリピン在来牛では低頻度で認められた。しかし、日本短角種、アバディーン-アンガス種、ヘレフォード種、ジャージー種には本アシルは認められなかった。また、”GTTT”反復回数が優勢タイプより1回少ないアシル(GTTT)<sub>4</sub>がフィリピン在来牛にのみ低頻度で認められた（アシル頻度：0.09）。さらに、”GTTT”反復回数が優勢タイプより3回多いアシル(GTTT)<sub>8</sub>が見島牛、黒毛和種の特異的な種雄牛系統およびジャージー種にのみ低頻度で認められた<sup>10)13)</sup>（表3）

⑤5座位におけるハプロタイプの品種間差異：上記座位におけるアシル頻度の品種の特徴をさらに明確化するために、5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)、nt-7(C>A)、L24V、DelR242およびイントロン1マイクロサテライト((GTTT)<sub>n</sub>)の5座位のアシルの組み合わせを用いたハプロタイプ頻度の品種の特徴を検討した（表4）。和牛を含む10品種で計42種類のハプロタイプが観察された。うち、*Bos taurus*系牛のグループ1では28ハプロタイプ、グループ2では8種類、*Bos indicus*系牛では6種類のハプロタイプが推定できた。これらハプロタイプには品種に特徴が認められた。すなわち、グループ2のハプロタイプ頻度は黒毛和種（グループ全体の頻度：0.075）、ホルスタイン-フリージャン種（同：0.075）、フィリピン在来牛（同0.075）で低く、褐毛和種（両系統：0.2程度）でやや低く、スイスブラウン種ではかなり高い傾向

表3 和牛等におけるnt-7(C>A), L24V, DelR242 とイントロン1マイクロサテライト ((GTTT)<sub>n</sub>) 座位におけるアリル頻度と遺伝子型頻度

品種	頭数 (n)	nt-7(C>A)			L24V (nt+70(C>G))			DelR242 (3-bp 挿入/欠失)			イントロン1マイクロサテライト ((GTTT) <sub>n</sub> )				
		A	C	$\chi^2$ <sup>#</sup>	C	G	$\chi^2$	AGG	DelR242	$\chi^2$	(GTTT) <sub>4</sub>	(GTTT) <sub>5</sub>	(GTTT) <sub>6</sub>	T(GTTT) <sub>8</sub>	$\chi^2$
<b>(Bos taurus系牛)</b>															
<b>和牛</b>															
黒毛和種	93	0.34	<b>0.66</b> <sup>S</sup>	a	<b>0.99</b>	0.01	a	<b>1.00</b>	0.00	a	—	<b>0.93</b>	0.07	—	a
								(n=104)			(n=104)				
日本短角種	77	<b>0.71</b>	0.29	b	<b>1.00</b>	0.000	a	<b>0.57</b>	<b>0.43</b>	b	—	<b>1.00</b>	—	—	b
褐毛和種	31	<b>0.47</b>	<b>0.53</b>	ac	<b>0.94</b>	0.06	ab	<b>0.79</b>	0.21	c	—	<b>0.82</b>	0.18	—	c
(熊本系)	(20)	A/A=6; A/C=5; C/C=9			C/C=16; C/G=4			AGG/AGG=15; AGG/DelR242=4; DelR242/DelR242=1			(GTTT) <sub>5</sub> /(GTTT) <sub>5</sub> =14; (GTTT) <sub>5</sub> /(GTTT) <sub>6</sub> =6				
(高知系)	(11)	A/A=1; A/C=8; C/C=1			C/C=11			AGG/AGG=5; AGG/DelR242=5; DelR242/DelR242=1			(GTTT) <sub>5</sub> /(GTTT) <sub>5</sub> =7; (GTTT) <sub>5</sub> /(GTTT) <sub>6</sub> =4				
見島牛	58	0.04	<b>0.96</b>	f	<b>1.00</b>	0.00	ab	<b>1.00</b>	0.00	a	—	<b>0.99</b>	—	0.01	b
ホルスタイン種	34	<b>0.88</b>	0.12	d	<b>1.00</b>	0.00	ab	<b>0.91</b>	0.09	cd	—	<b>0.93</b>	0.07	—	acd
ヨーロッパ系牛4品種	30	<b>0.78</b>	0.22	bde	<b>0.87</b>	0.13	b	<b>0.77</b>	0.23	bcd	—	<b>0.84</b>	0.13	0.03	acd
(アバディーン-アンガス種)	(8)	A/A=5; A/C=3			C/C=7			AGG/AGG=5; AGG/DelR242=3			(GTTT) <sub>5</sub> /(GTTT) <sub>5</sub> =7				
(ヘレフォード種)	(9)	A/A=7; A/C=2			C/C=7			AGG/AGG=5; AGG/DelR242=2; DelR242/DelR242=2			(GTTT) <sub>5</sub> /(GTTT) <sub>5</sub> =7				
(ジャージー種)	(7)	A/A=7			C/C=7			AGG/AGG=4; AGG/DelR242=3			(GTTT) <sub>5</sub> /(GTTT) <sub>5</sub> =5; (GTTT) <sub>5</sub> /(GTTT) <sub>6</sub> =2				
(スイスブラウン種)	(6)	A/C=4; C/C=2			C/G=4; G/G=2			AGG/AGG=4; AGG/DelR242=2			(GTTT) <sub>5</sub> /(GTTT) <sub>6</sub> =4; (GTTT) <sub>6</sub> /(GTTT) <sub>6</sub> =2				
<b>(Bos indicus and /or Bos taurus 交雑系)</b>															
フィリピン在来牛	28	<b>0.55</b>	<b>0.45</b>	abce	<b>1.00</b>	0.00	ab	<b>0.98</b>	0.02	ad	0.09	<b>0.86</b>	0.05	—	d
アメリカン-ブラーマン交雑種	5	A/A=3; A/C=1; C/C=1			C/C=5			AGG/AGG=3; AGG/DelR242=2			(GTTT) <sub>5</sub> /(GTTT) <sub>5</sub> =5				

<sup>#</sup>異なるアルファベットは遺伝子頻度が統計的に有意 ( $\chi^2$  test;  $P < 0.05/21$ , 21回検定ボンフェローニ補正). <sup>S</sup>太字は主要遺伝子

表4 和牛、見島牛、ホルスタイン種およびフィリピン在来牛等における5' UTRマイクロサテライト((TG)n)、nt-7(C>A)、L24V、DelR242およびイントロン1マイクロサテライト((GTTT)n)の5座位ハプロタイプとそれら頻度の品種特徴

ハプロタイプ区分		黒毛和種	日本短角種	褐毛和種		見島牛	ホルスタイン種	ヨーロッパ系牛4品種				フィリピン在来牛
				(熊本系)	(高知系)			(アバディーンアンガス種)	(ヘレフォード種)	(ジャージー種)	(スイスブラウン種)	
グループ番号	ハプロタイプ <sup>1</sup>	(93) <sup>2</sup>	(77)	(20)	(11)	(58)	(34)	(8)	(9)	(7)	(6)	(28)
<i>Bos taurus</i>												
1-1	19-A-C-AGG-5	0.215 <sup>#</sup>	0.019	0.025	0.045	—	0.279	0.125	0.333	—	—	0.018
1-2	20-A-C-AGG-5	—	0.201	—	0.227	—	0.029	0.063	—	—	—	—
1-3	21-A-C-AGG-5	0.011	0.013	0.250	0.045	—	0.132	0.438	0.111	0.214	—	0.018
1-4	22-A-C-AGG-5	0.081	0.091	—	—	—	0.147	0.063	0.111	0.357	0.083	0.500
1-5	23-A-C-AGG-5	—	—	—	—	—	0.029	—	—	—	—	—
1-6	24-A-C-AGG-5	—	—	0.025	—	0.034	0.132	—	—	—	—	—
1-7	25-A-C-AGG-5	—	0.143	—	—	0.009	—	0.063	0.056	—	—	—
1-8	26-A-C-AGG-5	—	0.019	—	—	—	0.029	—	0.111	—	0.083	—
1-9	28-A-C-AGG-5	—	—	—	—	—	—	0.063	0.056	0.071	—	—
1-10	29-A-C-AGG-5	0.038	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1-11	19-C-C-AGG-5	0.005	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.036
1-12	22-C-C-AGG-5	0.005	0.019	0.125	—	—	0.015	—	0.111	—	—	0.054
1-13	23-C-C-AGG-5	0.199	—	0.050	—	0.138	0.015	—	—	—	—	0.036
1-14	24-C-C-AGG-5	0.360	0.058	0.200	0.136	0.319	0.015	—	—	—	—	—
1-15	25-C-C-AGG-5	—	—	—	—	0.491	—	—	—	—	—	—
1-16	26-C-C-AGG-5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.036
1-17	33-C-C-AGG-5	0.011	—	0.025	—	—	0.015	—	—	—	—	—
<i>DelR242</i>												
1-18	19-A-C-DelR242-5	—	—	—	—	—	0.015	—	0.111	—	—	—
1-19	23-A-C-DelR242-5	—	0.013	—	—	—	0.015	0.188	—	—	—	—
1-20	24-A-C-DelR242-5	—	—	—	0.091	—	—	—	—	—	—	—
1-21	25-A-C-DelR242-5	—	—	—	—	—	0.015	—	—	—	—	0.018
1-22	26-A-C-DelR242-5	—	0.006	0.150	0.091	—	0.029	—	—	0.143	0.167	—
1-23	27-A-C-DelR242-5	—	—	—	—	—	—	—	—	0.071	—	—
1-24	28-A-C-DelR242-5	—	0.201	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1-25	31-A-C-DelR242-5	—	0.006	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1-26	33-A-C-DelR242-5	—	—	—	—	—	0.015	—	—	—	—	—
1-27	22-C-C-DelR242-5	—	—	—	0.045	—	—	—	—	—	—	—
1-28	23-C-C-DelR242-5	—	0.208	—	0.091	—	—	—	—	—	—	—
<i>L24V</i>												
2-1	23-C-G-AGG-6	0.005	—	0.100	—	—	—	—	—	—	0.667	—
2-2	22-A-C-AGG-6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.018
2-3	26-A-C-AGG-6	—	—	—	—	—	0.015	—	—	—	—	—
2-4	22-C-C-AGG-6	—	—	0.025	0.182	—	—	—	—	—	—	—
2-5	23-C-C-AGG-6	0.038	—	0.025	0.045	—	0.015	—	—	—	—	0.036
2-6	24-C-C-AGG-6	0.005	—	—	—	—	0.015	—	—	—	—	—
2-7	33-C-C-AGG-6	0.027	—	—	—	—	0.029	—	—	—	—	—
2-8	21-A-C-AGG-8	—	—	—	—	0.009	—	—	—	0.143	—	—
<i>Bos indicus</i>												
3-1	10-C-C-AGG-5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.107
3-2	16-C-C-AGG-5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.018
3-3	18-C-C-AGG-5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.018
3-4	15-C-C-AGG-4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.018
3-5	16-C-C-AGG-4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.018
3-6	18-C-C-AGG-4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.054

<sup>1</sup>ハプロタイプ: [5' UTRマイクロサテライト(TG反復数)] - [nt-7(C>A)座位のアリル] - [L24V座位のアリル] - [DelR242座位のアリル] - [イントロン1マイクロサテライト(GTTT反復数)]

<sup>2</sup>頭数 <sup>#</sup>太字は主要なハプロタイプ

が認められた。スイスブラウン種ではL24V座位Gアシルを含むハプロタイプ（グループ番号2-1）がほとんどであった。このハプロタイプは、熊本系褐毛和種（頻度0.10）と黒毛和種（頻度0.005）にも低頻度で観察された。また、イントロン1マイクロサテライトGTTTの反復回数8回のアシル((GTTT)<sub>8</sub>)を含むハプロタイプ、グループ番号2-8は、見島牛とジャージー種に特徴的に認められた。さらに、このハプロタイプは黒毛和種でも極めて低頻度（0.007）ではあるが特定種雄牛系統に認められた<sup>13</sup>。GTTTの反復回数4回のアシル((GTTT)<sub>4</sub>)を含むハプロタイプ（グループ番号3-4, 3-5, 3-6）はフィリピン在来牛のみに認められた。

アシルDelR242は黒毛和種と見島牛を除く全ての品種（系統）で認められた。DelR242を含むハプロタイプは全体で11種類が推定された。このうちグループ1-22は比較的多くの品種系統で認められ、日本短角種（0.006）、熊本系褐毛和種（頻度0.15）、高知系褐毛和種（0.091）、ホルスタイン-フリースタン種（0.029）、ジャージー種（0.14）、スイスブラウン種（0.17）、アメリカン-ブラーマン交雑種（0.10）に認められた。グループ1-24とグループ1-28が日本短角種では主要なハプロタイプになっており、グループ1-24は今回調べた品種の中では日本短角種でしか見だされなかった。

## 5) 「黒毛和種集団」における5座位のアシル頻度とハプロタイプ

家畜改良事業団プロジェクト黒毛和種後代検定牛1,285頭（種雄牛117頭）において5座位の塩基多型を検討した。

①5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)：9種類のアシルが認められ、既に上記で解析した黒毛和種集団のアシルの種類と頻度とは基本的に同じだった。すなわち4種類の主要なアシル：19-TG（19回のTG反復アシル。以下同様）、22-TG, 23-TG, 24-TGと、5種類のマイナーなアシル：15-TG, 21-TG, 26-TG, 29-TG, 33-TGを認めた。このうち15-TG（頻度0.0004）と26-TGアシル（0.015）は低頻度であるが黒毛和種にもあることが判明した。

②nt-7(C>A)、L24V、DelR242およびイントロン1マイクロサテライト((GTTT)<sub>n</sub>)：これら3種類の塩基多型座位でのアシル頻度は、同様に既に上記で解析した黒毛和種集団のアシルの種類と頻度とは基本的に同じだった。各座位におけるマイナーなアシル頻度は0.05以下であった。イントロン1マイクロサテライト座位における8回反復アシル((GTTT)<sub>8</sub>)の頻度は0.007で、見島牛やジャージー種で観察されたもの同様に、[21-TG]-[A(nt-7(C>A))]-[C(L24V)]-[(GTTT)<sub>8</sub>]のハプロタイプを形成し、特定の種雄牛系統にのみ観察された。なお、DelR242アシルは観察されなかった。マイナーアシル頻度が0.10以上で統計解析に供せる座位は5座位のうち、5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)とnt-7(C>A)の2座位となったので、この2座位に基づくハプロタイプを検討したところ、11種類のハプロタイ

プが推定された。このうちハプロタイプ頻度が0.1以上のものは、[19-TG]-[A](5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)とnt-7(C>A)のアリルの組み合わせ)、[22-TG]-[A]、[23-TG]-[C]、[24-TG]-[C]の4種類であった。なお、ハプロタイプ頻度が0.1以下のマイナーなハプロタイプとして、[15-TG]-[A]、[21-TG]-[A]、[22-TG]-[C]、[24-TG]-[A]、[26-TG]-[A]、[29-TG]-[A]、[33-TG]-[C]の7種類が観察された。

## 6) 黒毛和種集団における5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)とnt-7(C>A)座位の産肉形質に及ぼす効果

上記解析により、黒毛和種集団でグレリン受容体遺伝子の塩基多型と産肉形質との関連性を検討する多型座位は5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)とnt-7(C>A)の2座位に絞ることができた。これら2座位における塩基多型と産肉形質との関連性を統計的に検討すると、5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)とnt-7(C>A)座位に共に有意差を認めた。このうち、5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)座位での有意水準が最も高かった。また、有意差を認めた産肉形質は、検定開始体重(WB)、検定終了時体重(WS)、枝肉重量(CW)、平均1日増体重(ADG)等の増体形質であり、脂肪交雑(BMS)や筋間脂肪厚(IFT)等との間には有意な関連性は認めなかった。5'UTRマイクロサテライトアリル((TG)<sub>n</sub>)の中で、[19-TG]アリルが増体形質に最も大きな好ましい相加的效果を持つと推定された。後代検定の飼養条件下で、[19-TG]アリルは枝肉重量を約6.5kg増加させる相加的效果をもつことが判明した。nt-7(C>A)座位では、アリルAが同様に枝肉重量(CW)等増体形質に増加の相加的效果を認めた。さらにハプロタイプで検討してみると、[19-TG]-[A]タイプ(5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)とnt-7(C>A)のアリルの組み合わせ)が最も枝肉重量に大きな効果をもつことがわかった。なお、[19-TG以外]-[A]タイプホモ型は最も枝肉重量が低い結果となった。これらの結果から、5'UTRマイクロサテライト座位の[19-TG]アリルは、黒毛和種集団ではアリル頻度が0.15程度とまだ低く、黒毛和種において枝肉重量を増体させる有効なDNAマーカーとして活用できることが明らかになった<sup>13)</sup>。

## 7) 黒毛和種繁殖肥育一貫経営農家における収益上昇額の推定

[19-TG]アリルは枝肉重量を有意に増加させる相加的效果をもつことが判明したことから、黒毛和種繁殖肥育一貫経営農家が[19-TG]アリル・ホモ型の種雄牛の精液を交配し、子牛生産利用した場合、精液差額がなければ5'UTRマイクロサテライトのタイプンル料金が5千円であっても、利用1年目から1頭あたり1万円の収益上昇が期待できることがシミュレートできた<sup>14)</sup>。

## 考察

ウシ・グレリン受容体遺伝子5'フランキング領域から3'UTRまで約6.5キロ塩基対のなかに一塩基多型(SNPs)47箇所、挿入/欠失4箇所、マイクロサテライト2箇所の計53箇所の塩基多型を明らかにした。これら多くの塩基多型の中から、増体・肉質形質との関連解析に使用する本遺伝子の多型部位を選択する必要がある。我々は、以下のような考察により、増体形質との関連解析に使用する多型部位として5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)、nt-7(C>A)、L24V(nt70(C>G))、DelR242、イントロン1マイクロサテライト((GTTT)<sub>n</sub>)の5箇所の塩基多型部位を提案した。すなわち、(1) 約6.5キロ塩基対の配列の中に、5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)からnt2884(A>G) (イントロン1領域)まで約3.2キロ塩基対領域が非常に多型性に富んでいる。(2) この約3.2キロ塩基対領域の中で、nt667(C>T) (エキソン1) からnt2884(A>G)まで約2.3キロ塩基対領域のハプロタイプブロックが存在し、この領域の中でイントロン1マイクロサテライト((GTTT)<sub>n</sub>)がハプロタイプブロックを代表する塩基多型となりえる。特に、ハプロタイプグループ1と2を区別するのに非常に良いマーカーである。なぜなら、このマイクロサテライト((GTTT)<sub>n</sub>)は3塩基反復回数の多型のためフラグメント解析で多型解析が容易であるためである。(3) 5'フランキング領域約2.2キロ塩基対には17箇所の塩基多型が認められたが、これら塩基多型のなかで転写因子認識サイトの配列が変化するものはnt-2022(G>A)のみである(Wエレメントのコンセンサス配列)。また、このnt-2022(G>A)塩基多型はハプロタイプグループ2に属している。したがって、5'フランキング領域17箇所の塩基多型を解析する必要性はあまり無い。(4) 黒毛和種、褐毛和種(熊本系)、スイスブラウン種では、L24V(nt70(C>G))のGアリルはD191NのAアリルと連鎖している。(5) 日本短角種、褐毛和種(高知系)、ジャージー種ではnt456(G>A)のアリルAはDelR242と連鎖している。したがって、L24V(nt70(C>G))とDelR242の両座位でエキソン1内の塩基多型のハプロタイプを代表できる。

*Bos taurus*系牛で5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)の3'側から9番目に存在する"TC"配列は*Bos indicus*系牛に存在していない(増幅サイズ156, 174のアリル)。この結果は、グレリン受容体遺伝子の分子進化が*Bos taurus*系牛と*Bos indicus*系牛間で異なることを示唆している。さらに、5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)の"TG"反復回数は*Bos taurus*系牛が*Bos indicus*系牛より多く、また同様に、イントロン1マイクロサテライト((GTTT)<sub>n</sub>) "GTTT"反復回数も*Bos taurus*系牛が*Bos indicus*系牛より多い。また、グレリン受容体遺伝子ハプロタイプの系統樹解析結果を考えれば、ウシ・グレリン受容体遺伝子は、これら2種類のマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>, (GTTT)<sub>n</sub>)の中で、(TG)<sub>10</sub>や(GTTT)<sub>4</sub>のように反復回数の少ない*Bos indicus*系牛のタイプがまず存在しており、これらのマイクロサテライト反復回数が増加しながらアリルが進化・多様化し、さらに*Bos taurus*系牛の分化で一塩基多型を含む塩基多型を含めて大きく

進化してきたと考えられる。*Bos taurus*系牛の本遺伝子塩基多型の大きな多様性は、「産肉量を大きく」あるいは「泌乳量を増やす」等ウシ品種別に行われてきた異なる育種目標のもとでの選抜圧に反応したグレリン受容体遺伝子の変異蓄積の結果と推察される。

見島牛は和牛のルーツと考えられている<sup>9)</sup>。グレリン受容体遺伝子ハプロタイプの系統樹解析から、この見島牛にはグループ1に属する特有なハプロタイプHap04およびHap05が主要タイプとして存在し、このうちHap05は黒毛和種にも存在していた。黒毛和種や褐毛和種（熊本系）、ホルスタイン-フリージャン種やスイスブラウン種のハプロタイプはグループ1とグループ2に属するものがある。また、日本短角種や褐毛和種（高知系）のそれらはグループ1のみに属するものであった。これらの結果から、ハプロタイプHap04およびHap05は和牛の基本的なハプロタイプであり、各和牛品種におけるハプロタイプの多様性は、各品種成立にかかわったヨーロッパ系牛の影響を反映しているものと推察される。例えば、黒毛和種や褐毛和種（熊本系）に低頻度で認められたグループ番号2-1ハプロタイプ、23-C-G-AGG-6は、これら品種成立途中で交雑されたスイスブラウン種由来と推定される。また、黒毛和種のある特異的な種雄牛系統に見いだされたハプロタイプ21-A-C-AGG-8（グループ番号2-8）の頻度は極めて低頻度であるは、おそらく見島牛から由来したものと推察される。

DelR242アリルは、見島牛や黒毛和種では観察できなかったが、フィリピン在来牛やヨーロッパ系牛品種など低頻度ながら幅広い品種に認められた。これらの結果から、アリルDelR242は世界中の広範囲なウシ品種に存在すると推定できる。日本短角種種雄牛集団におけるアリルDelR242の頻度は“0.44”と他の品種と比較すると群を抜いて高い。日本短角種はもともと現在の岩手・青森地域で古来より繋養されていた南部牛に、米国また豪州から輸入したショートホーン種種雄牛等を交配して成立した経緯がある。残念ながらショートホーン種におけるDelR242アリルの有無とその頻度はまだ明らかにされていない。本研究において、DelR242アリルを含むハプロタイプには、日本短角種のみに見いだされるもの（グループ番号1-24, 1-25）さらに、日本短角種と褐毛和種（高知系）にだけ認められるハプロタイプ（グループ番号1-28）が存在することから、日本短角種に認められるアリルDelR242の由来の多くは、南部牛由来と推定される。今後、ショートホーン種におけるDelR242のアリルの有無とその頻度、また、なぜ日本短角種でDelR242アリル頻度はかなり高いのか？DelR242アリルは増体形質などに何らかの影響を与えているのか？その理由を明らかにしていく必要がある。

家畜改良事業団黒毛和種後代検定牛集団1,285頭を用いたグレリン受容体遺伝子5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)とnt-7(C>A)座位の産肉形質に及ぼす効果を検討し、両遺伝子座は枝肉重量(CW)や平均1日増体重(ADG)等産肉形質に有意に影響を及ぼし、特に5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)座位がnt-7(C>A)座位よりも強い影響を与えていた。さらに、5'UTRマイ

クロサテライト((TG)<sub>n</sub>)座位、[19-TG]アリルが増体形質に最も大きな好ましい相加的効果を持ち、後代検定の飼養条件下で、[19-TG]アリルは枝肉重量に対し約6.5kg増加させる相加的効果をもつことが明らかとなった。この効果は、概ね体重を約2%程度上昇させる効果である。さらに、この遺伝子情報を黒毛和種繁殖肥育一貫経営農家の経営に利用した場合の収益上昇額をシミュレートしたところ、以下の結果が得られた。すなわち、5'UTRマイクロサテライト[19-TG]アリル頻度は黒毛和種集団では0.15~0.20程度とまだ低いため、黒毛和種繁殖肥育一貫経営農家が[19-TG]アリル・ホモ型の種雄牛の精液を交配し、子牛生産利用した場合には、精液差額が無ければ5'UTRマイクロサテライトのタイピングル料金が5千円であっても、利用1年目から1頭あたり1万円の収益上昇が期待できる。以上の結果から、グレリン受容体遺伝子5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)座位の遺伝子型情報は、黒毛和種においては非常に重要であり、かつ農家レベルでも本遺伝子型情報は収益上昇に十分に利用できると考えられる。本遺伝子型情報を農家の収益上昇に利用するための現実的な方法としては、府県等の公的試験研究機関が所有する基幹種雄牛あるいは販売されている種雄牛精液について本遺伝子型情報を解析し、[19-TG]アリル・ホモ型種雄牛の精液を農家に提供することが考えられる。また、一定の繁殖雌牛集団に関しても本遺伝子型を判定して、種雄牛造成過程に本遺伝子型情報を取り入れ、積極的にホモ型個体になるようにすることも考えられる。

黒毛和種における5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)座位の優良なアリル、[19-TG]アリルの由来はどこからなのか？同様に興味深い問いである。[19-TG]アリルは和牛のルーツ見島牛には認められず、また褐毛和種、日本短角種、フィリピン在来牛では低頻度で認められ、ホルスタイン-フリージャン種、ヘレフォード種、アバディーン-アンガス種では黒毛和種程度の頻度で存在する。これらの結果を考えると、[19-TG]アリルは黒毛和種成立に関与したホルスタイン-フリージャン種等ヨーロッパ系牛に由来した可能性が高いと推察される。

グレリン受容体遺伝子5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)は増体形質に関わる真の塩基変異 (QTN: Quantitative Trait Nucleotide) そのものなのか？あるいは別にこの5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)座の極近傍に真のQTNがあるのか？非常に興味ある点である。著者らは、グレリン受容体遺伝子mRNAの2次構造の検討から、この5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)座位がQTNそのものであると考えている<sup>13)</sup>。

5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)はヒトやマウスのゲノムには存在せず、ウシ特異的なゲノム配列である。また、ウシ、ヒトおよびマウスともに5'UTRにはmRNAスプライシングする配列領域が存在する。なぜウシにだけ5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)領域が存在するのだろうか？この領域は進化の過程でヒトやマウスゲノムからは消失してしまったのか？それともウシにだけ進化の過程でこの配列が挿入されたのだろうか？この疑問に対する考察として、ウシ、ヒトおよびマウス間でmRNAが、「GT-AGルール」でスプライシング

する領域のゲノム配列を比較した (図2)。その結果、ヒトやマウスでは5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)領域が進化の過程でゲノムから消失し、ウシでは維持されてきた可能性が高い。また、マウスでは5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)領域だけに限定したゲノム領域の消失であり、ウシでは5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)は保持したものの、この配列の3'側下流の配列の一部を消失、ヒトではこれら領域全体を消失したと推定できる。ウシでは長い進化の過程で維持されてきた5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)のTG反復回数に高度な変異を育種過程で蓄積し、ウシにおける選抜圧に柔軟に対応する遺伝的変異ソースにしたと考えられるのではないだろうか？進化の観点からもウシ5'UTRマイクロサテライト((TG)<sub>n</sub>)の変異は非常に興味深い。

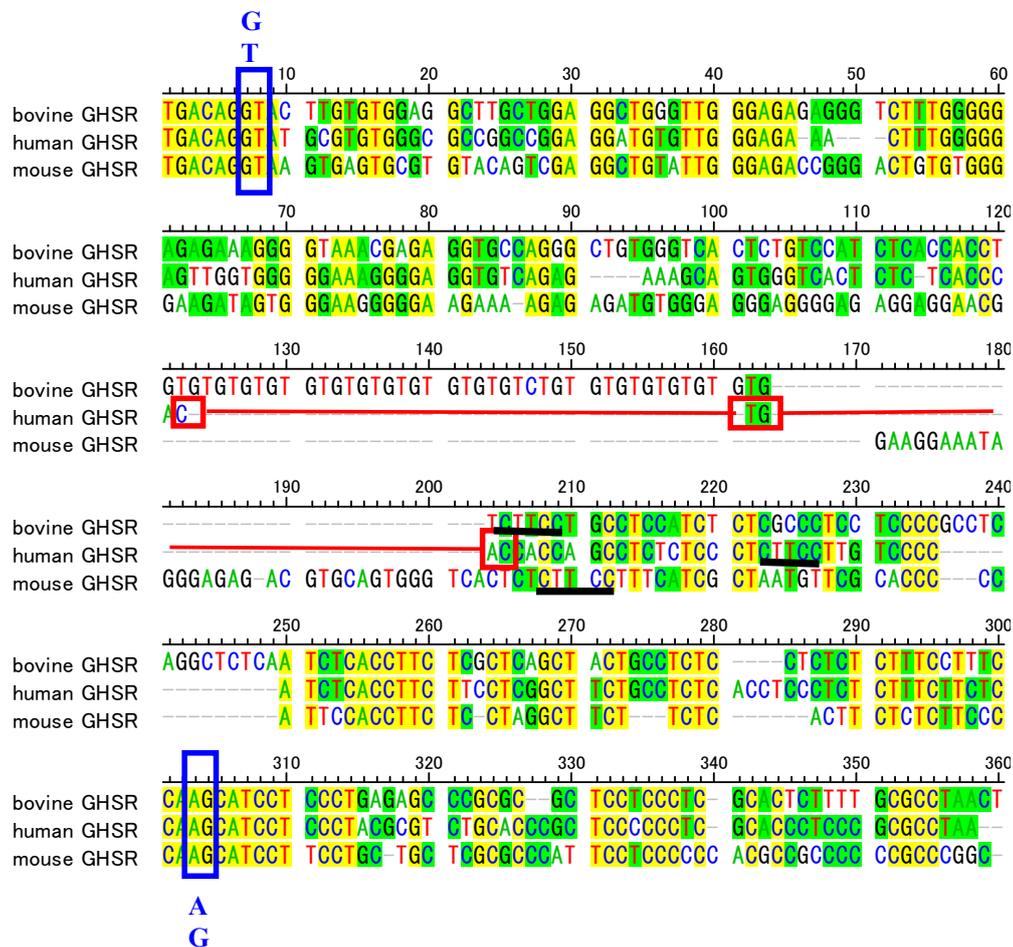


図2 ウシ、ヒトおよびマウス・グレリン受容体遺伝子 5'UTR 領域中スプライシング領域前後の塩基配列の進化を考慮した比較

bovine GHSR: ウシ・グレリン受容体遺伝子 ; human GHSR: ヒト・グレリン受容体遺伝子 ; mouse GHSR: マウス・グレリン受容体遺伝子。青ボックスに挟まれた配列は、GT-AG 規則により 1a 型 mRNA ではスプライシングする領域。Human GHSR の 3 箇所赤ボックスの連続配列 (CTGAC) は Branch Point Sequence(BPS) として mRNA スプライシングに関与する配列。3 種の GHSR 遺伝子に存在する黒アンダーライン配列 (CTTCC) も同様に BPS として mRNA スプライシングに関与すると推定できる配列。

## 引用文献

- 1) Cruz CR, Smith RG. The growth hormone secretagogue receptor. *Vitamins and Hormones*, **77**: 47-88. 2008
- 2) Wang HJ, Geller F, Dempfle A, Schäuble N, Friedel S, Lichtner P, Fontenla-Horro F, Wudy S, Hagemann S, Gortner L, Huse K, Remschmidt H, Bettecken T, Meitinger T, Schäfer H, Hebebrand J, Hinney A. Ghrelin receptor gene: identification of several sequence variants in extremely obese children and adolescents, healthy normal-weight and underweight students, and children with short normal stature. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **89**: 157-162. 2004.
- 3) Baessler A, Hasinoff MJ, Fischer M, Reinhard W, Sonnenberg GE, Olivier M, Erdmann J, Schunkert H, Doering A, Jacob HJ, Comuzzie AG, Kissebah AH, Kwitek AE. Genetic linkage and association of the growth hormone secretagogue receptor (ghrelin receptor) gene in human obesity. *Diabetes*, **54**: 259-267. 2005.
- 4) Shuto Y, Shibasaki T, Otagiri A, Kuriyama H, Ohata H, Tamura H, Kamegai J, Sugihara H, Oikawa S, Wakabayashi I. Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity *Journal of Clinical Investigation*, **109**: 1429-1436. 2002.
- 5) Colinet FB, Vanderick S, Charlotiaux B, Eggan A, Gengler N, Renaville B, Brasseur R, Portetelle D, Renaville R. Genetic location of the bovine growth hormone secretagogue receptor (GHSR) gene and investigation of genetic polymorphism. *Animal Biotechnology*, **20**: 28-33. 2009.
- 6) Zhang B, Chen H, Guo Y, Zhang L, Zhao M, Lan X, Zhang C, Pan C, Hu S, Wang J, Lei C. Associations of polymorphism within the GHSR gene with growth traits in Nanyang cattle. *Molecular Biological Reports*, DOI: 101007/s11033-008-9442-x. 2009.
- 7) Malau-Aduli AEO, Niibayashi T, Kojima T, Oshima K, Mizoguchi Y, Komatsu M. Interval mapping of growth quantitative trait loci in Japanese Black cattle using microsatellite DNA markers and half-sib regression analysis. *Animal Science Journal*, **76**, 11-18. 2005.

- 8) Malau-Aduli AEO, Niibayashi T, Kojima T, Oshima K, Mizoguchi Y, Komatsu M. Mapping the quantitative trait loci (QTL) for body shape and conformation measurements on BTA1 in Japanese Black cattle. *Animal Science Journal*, **76**: 19-27. 2005.
- 9) Nagamine Y, Nirasawa K, Takahashi H, Sasaki O, Ishii K, Minesawa M, Oda S, Visscher PM, Furukawa T. Estimation of the time of divergence between Japanese Mishima island cattle and other cattle populations using microsatellite DNA markers. *Journal of Heredity*, **99**: 202-207. 2008.
- 10) Komatsu M, Fujimori Y, Sato Y, Okamura H, Sasaki S, Itoh T, Morita M, Nakamura R, Oe T, Furuta M, Yasuda J, Kojima T, Watanabe T, Hayashi T, Malau-Aduli AEO, Takahashi H. Nucleotide polymorphisms and the 5'-UTR transcriptional analysis of the bovine growth hormone secretagogue receptor 1a (*GHSR1a*) gene. *Animal Science Journal*, 印刷中 2010.
- 11) Barret JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotypes maps *Bioinformatics*, **21**: 263-265. 2005.
- 12) Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis ,MEGA Software Version 4.0. [\*Molecular Biology and Evolution\*](#), **24**: 1596-1599. 2007.
- 13) Komatsu M, Itoh T, Fujimori Y, Satoh M, Myazaki Y, Takahashi H , Shimizu K, Malau-Aduli AEO, Morita M. Genetic association of GHSR1a 5'UTR-microsatellite and nt-7(C>A) loci on growth and carcass traits in Japanese Black cattle. *Animal Science Journal*, 投稿中 2010.
- 14) 小松正憲、西尾元秀、佐藤正寛、千田雅之、広岡博之 黒毛和種繁殖肥育一貫経営農家経営におけるDNAマーカー情報活用による肥育牛販売収益上昇額の推定 日本畜産学会報 **80**:157-169. 2009.