

岡山県固有の黒毛和種希少系統の遺伝学的特徴の解析

| | |
|-------|--|
| 誌名 | 日本畜産學會報 = The Japanese journal of zootechnical science |
| ISSN | 1346907X |
| 著者名 | 米田,一裕 奥田,ゆう 斯琴,函雅 西牧,孝洋 松本,大和 宮崎,義之 揖斐,隆之 辻,岳人 国枝,哲夫 |
| 発行元 | Zootechnical Science Society of Japan |
| 巻/号 | 87巻1号 |
| 掲載ページ | p. 1-10 |
| 発行年月 | 2016年2月 |

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



岡山県固有の黒毛和種希少系統の遺伝学的特徴の解析

米田一裕¹・奥田ゆう²・斯琴凶雅³・西牧孝洋³・松本大和²・
宮崎義之⁴・揖斐隆之²・辻 岳人²・国枝哲夫²

¹ 有限会社米田遺伝子型研究所, 高槻市 569-1017

² 岡山大学大学院環境生命学研究科, 岡山市 700-8530

³ 岡山大学大学院自然科学研究科, 岡山市 700-8530

⁴ 家畜改良事業団家畜改良技術研究所, 前橋市 371-0121

(2015. 6. 17 受付, 2015. 10. 29 受理)

要 約 黒毛和種では遺伝的多様性の確保が育種上の重要な課題となっているが、そのためには、固有の遺伝的特徴を持つ多様な系統を交配に利用することで、集団の遺伝的構成の均質化を防ぐことが重要であり、本研究では岡山県の希少系統の集団の遺伝的特徴について解析した。マイクロサテライトマーカーの解析では、アレリックリッチネスと平均ヘテロ接合度は、いずれも他の黒毛和種の地域集団と比べて低い値であった。集団の構造解析では、他の地域集団とは異なる単一のクラスターよりなる集団を形成した。ミトコンドリアDループ領域では、80%の個体が単一のハプロタイプを持っていたが、一方で新規のハプロタイプが存在していた。生産形質に関連する遺伝子では、調べた6遺伝子のうち2遺伝子で単一のアリルに固定されていた。以上のことから、本希少系統集団の遺伝的多様性は他の黒毛和種の集団と比べて低いが、他の集団とは異なる遺伝的特徴を持つことから、黒毛和種の遺伝的多様性を維持する上で貴重な集団であると考えられた。

日本畜産学会報 87 (1), 1-10, 2016

キーワード：黒毛和種, マイクロサテライトマーカー, ミトコンドリア DNA, 遺伝的多様性

近年、黒毛和種では、統計遺伝学的手法による正確な遺伝的能力評価と繁殖技術の向上等により、育種改良の効果は飛躍的に向上している。そのような中で、肉質に対して高い予測育種価をもつ優秀な種雄牛の中には、人工授精により地域集団を越えて全国的に広く供用され、また数世代をわたって供用されるような個体も存在している。このような特定の種雄牛の広範囲な供用の結果、黒毛和種における集団の有効な大きさは近年著しく減少しているだけでなく、従来、県を単位として互いにある程度隔離された地域集団として形成されていた集団の分化構造が消失することで、遺伝的に均質な集団となり、黒毛和種の遺伝的多様性は大きく減少していることが指摘されている (Nomura ら 2001 ; Nishimaki ら 2013)。したがって、黒毛和種の遺伝的多様性を確保するためには、現在全国的に利用されている主要な少数の系統以外に各県固有の遺伝的特色を持つ系統を積極的に利用することで、黒毛和種集団の遺伝的構成の均質化を防ぐことも必要と考えられる。したがって、現在その数が大きく減少しつつある各地域の固有の系統は、将来、黒毛和種の遺伝的多様性の維持と遺伝的改良のための重要な遺伝資源となる可能性があり、これら希少系統を積極的に維持保存するとともにその遺伝的特徴を明ら

かにすることは黒毛和種の育種において重要な課題である。

岡山県においては、古くから黒毛和種の独自の系統を多く飼養してきた歴史があり (岡山県畜産史編集委員会 1980)、これらの系統の中には個体数が大きく減少し消失しつつあるものもあるが、我々はこれまでに、固有の由来と特徴をとどめた系統を絶やすことのないように他系統との交配を避けて維持されてきた閉鎖集団が岡山県下に残されていることを報告している (米田 2008)。この系統 (清国・下前系、以下希少系統とする) は江戸時代後期の天保年間に成立した日本最古の「蔓牛」として知られる「竹の谷蔓」に由来する系統であり (井上 2003 ; 米田 2008)、現在では飼育頭数が大幅に減少しているこの系統を維持保存する努力が地元の篤農家によって進められてきた (米田 2008)。このような固有の歴史的背景を持つ希少系統の遺伝的特徴を明らかにするとともに、閉鎖的集団として維持されてきたこれらの集団がどの程度の遺伝的多様性を保持しているかを明らかにすることは、黒毛和種の育種上重要な課題である。

我々はこれまでに本希少系統集団について、マイクロサテライトマーカー 23 座位を用いた遺伝的解析を行い、こ

連絡者：米田一裕 (fax : 072-687-0699, e-mail : dradenoy@ybb.ne.jp)

の集団内の遺伝的多様性は他の黒毛和種集団に比べて低いことを明らかにしている(米田ら 2010a)。本研究では、この希少系統の集団についてより多くの 52 座位のマイクロサテライトマーカーを用いるとともに、新たにミトコンドリア DNA の塩基配列、および生産形質に関わる機能的遺伝子の多型を調べ、その結果を黒毛和種の他集団と比べることで、本希少系統の集団の遺伝的特徴と遺伝的多様性をより詳細に明らかにすること試みた。

材料および方法

1. 希少系統集団

本研究では、岡山県新見市にて飼育繁殖されている「竹の谷蔓」に由来する清国・下前系の黒毛和種希少系統集団に属する繁殖雌 21 頭の DNA を用いた。DNA はこれらの個体の毛根より常法にしたがって ProteinaseK 処理後、フェノール・クロロホルム抽出により精製した。

2. マイクロサテライトマーカー

遺伝学的解析のための多型マーカーとして、ウシの親子判定等に広く使用されている 52 個のマイクロサテライトマーカー(表 1)を用いた。各マイクロサテライト増幅用プ

ライマーセットの内、片方のプライマーの 5' 末端を蛍光色素 (FAM, HEX, NED) で標識した。PCR 反応は、DNA 溶液とプライマーおよび MultiPlexPCR kit (Qiagen, Germantown, MD, USA) を用いたマルチプレックス PCR によって、目的の配列を増幅した。PCR の反応条件は 94℃ 15 分間で予備変性を行った後、94℃で 30 秒間、59℃で 90 秒間、72℃で 90 秒間の条件で 30 サイクルの増幅を行った後、72℃ 10 分間の伸長を行った。得られた PCR 増幅産物を、塩基配列自動解析装置 (Applied Biosystems 3730xIDNA analyser) により分離し、GENOTYPER ソフトウェアを用いて遺伝子型を決定した。5% 以上の欠測値をもつ個体は、分析から除外した。本希少系統集団の遺伝的特徴と遺伝的多様性を評価するための対照として、Nishimaki ら (2013) による黒毛和種の 8 地域集団の同じマイクロサテライトマーカーによる各種データを用いた。

集団の平均アレル数、平均ヘテロ接合度の観察値および期待値は、the Excel Microsatellite Toolkit (Park 2001) を用いて計算した。アレリックリッチネスは、ある遺伝子座についての遺伝子型判定した最も少ない地域集団の個体

Table 1 Information of 52 microsatellite markers

| Marker name | Chromosome (BTA)* | Marker name | Chromosome (BTA)* |
|-------------|-------------------|-------------|-------------------|
| BM1824 | 1 | SPS115 | 15 |
| BM2113 | 2 | TGLA53 | 16 |
| DIK2204 | 2 | BM305 | 17 |
| DIK2719 | 2 | DIK3005 | 18 |
| DIK2962 | 2 | DIK4013 | 18 |
| INRA023 | 3 | DIK4232 | 18 |
| MNB84 | 3 | MNB74 | 18 |
| DIK026 | 4 | TGLA227 | 18 |
| MGTG4B | 4 | DIK2574 | 19 |
| BMS1248 | 5 | ETH3 | 19 |
| ETH10 | 5 | BM5004 | 20 |
| ETH152 | 5 | NRDIKM011 | 20 |
| TEXAN15 | 5 | NRDIKM021 | 20 |
| ILSTS097 | 6 | TGLA126 | 20 |
| BM9065 | 7 | TGLA122 | 21 |
| BMS2072 | 8 | BM2613 | 22 |
| ETH225 | 9 | BM1818 | 23 |
| DIK020 | 10 | CYP21 | 23 |
| DIK023 | 11 | DIK010 | 24 |
| DIK2110 | 11 | INRA222 | 25 |
| DIK4274 | 11 | BM4505 | 26 |
| DIK4301 | 12 | CSSM36 | 27 |
| TGLA36 | 12 | CSSM43 | 27 |
| AGLA232 | 13 | DIK2365 | 27 |
| INRA100 | 14 | DIK107 | 28 |
| HEL1 | 15 | OARHH22 | 29 |

* Cattle chromosome number

数によって補正された対立遺伝子数であり (El Mousadik と Petit 1996 ; Petit ら 1998), FSTAT version 2.9.3 (Goudet 2002) を用いて計算した. 各地域集団間の遺伝的分化の程度については, ペアワイズ F_{ST} 推定値を FSTAT version 2.9.3 を用いて Weir と Cockerham (1984) の推定量により計算し, ボンフェローニ補正した. 地域集団間の遺伝距離は, Reynold の遺伝距離 (Reynolds ら 1983) により計算し, SplitsTree4 version 4.12.3 (Huson と Bryant 2006) を用いて Reynold の遺伝距離に基づく Neighbor-Net graph (Bryant と Moulton 2004) を構築した. ベイジアンクラスタリングは STRUCTURE version 2.3 (Pritchard ら 2000) を用いて行い, 個体を個々の分集団クラスターに分類することによって異なる分集団の存在を検出し, 集団構造を評価した. 仮定したクラスター数 (K) は, admixture model に基づき, burn-in を 100,000 回行った後, マルコフ連鎖モンテカルロ法によるサンプリングを 100,000 回行い, K 値が 1 から 9 のときに各々 10 回の独立試行を行って推定した.

3. ミトコンドリア DNA

ミトコンドリア DNA のハプロタイプの解析には, ウシミトコンドリア DNA の塩基配列 (Accession number : V00654) のうち, Loftus ら (1994) にしたがって 15738 bp から 992 bp の領域を増幅し, ハプロタイプ解析に一般に用いられている D-loop 領域の 15916 bp から 334 bp の領域の塩基配列を用いた (Mannen ら 1998). PCR は, フォワード 5'-CTGCAGTCTCACCATCAA-CC-3', およびリバース 5'-GATTATAGAACAGGCTC-CTC-3' のプライマーを用い, 94°C で 1 分間の予備変性を行った後, 94°C で 30 秒間, 57°C で 30 秒間, 72°C で 90 秒間の条件で, GoTaq DNA polymerase (Promega,

Madison, WI, USA) を用いて, 30 サイクルの増幅を行った後, 72°C で 4 分間の伸長を行った. PCR 終了後, ExoSAP-IT (Affymetrix/USB, Santa Clara, CA, USA) を用いて, PCR 産物を精製した. この PCR 産物を用いて, dideoxy 法により両方向の塩基配列を決定した. dideoxy 法に PCR 法に用いたプライマーと同じものを用いた. D-loop の塩基配列データは, 解析ソフト MEGA version 6 (Tamura ら 2013) を用いて解析した.

4. 生産形質に関連する遺伝子

黒毛和種の生産形質に関わる遺伝子である Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) については Taniguchi ら (2004), Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 (SREBP1) については Hoashi ら (2007), Fatty Acid Synthase (FASN) については Abe ら (2009), Non-SMC Condensin I Complex, Subunit G (NCAPG) については Eberlein ら (2009), 毛色に関する Melanocortin-1 receptor (MC1R) 遺伝子については Sasazaki ら (2005) および Klungland ら (1995), 遺伝性疾患である血液凝固第 XI 因子欠乏症の原因遺伝子である Factor XI (F11) については Kunieda ら (2005) によって記述された方法に従って PCR または PCR-RFLP 法により, 遺伝子型判定を行った. それぞれの PCR に用いたプライマーの配列は表 2 に示した. PCR の反応条件は 94°C 2 分間で予備変性を行った後, 94°C で 30 秒間, 表 2 に示したプライマーに対応したアニーリング温度で 30 秒間, 72°C で 30 秒間の条件で GoTaq DNA polymerase (Promega) を用いて, 35 サイクルの増幅を行った後, 72°C 5 分間の伸長を行った. その後, SREBP1 および F11 遺伝子は, 増幅された PCR 産物を 3% アガロースゲルにて電気泳動を行ったのち, 増幅断片長の違いにより遺伝子型を判別した. SCD, FASN, NCAPG およ

Table 2 Primer sequences, fragment lengths, annealing temperatures, and restriction enzymes for genotyping

| Gene | Primer sequence (5' to 3') | Length (bp)* | T _a (°C)† | Enzyme |
|--------|----------------------------------|--------------|----------------------|----------|
| SCD | F : GTGTCCTGTTGTTGTGCTTCATCCTGCC | 197 | 60 | Nco I |
| | R : AATATTCTCTCGGGGGTTGATGGTCTTG | 156, 41 | | |
| FASN | F : CTCACTGTCTGTCCCACAGG | 243 | 60 | Hha I |
| | R : GCCTTTGGAGGGCTTTTAG | 149, 94 | | |
| SREBP1 | F : CCACAACGCCATCGAGAAACGCTAC | 348, 432 | 65 | |
| | R : GGCTTCCCTGACCACCCAAGTTAG | | | |
| NCAPG | F : ATTTAGGAAACGACTACTGG | 129 | 51 | Tsp509 I |
| | R : ATTTGTATTCTTTATTATCATC | 66, 63 | | |
| MC1R | F : TGGTGAGTCTCGTGGAGAACG | 214 | 65 | Msp A11 |
| | R : TCGATGACATTGTCCAAGTCTGCTGC | 149, 65 | | |
| F11 | F : TCACATCTCAATATGTGCTTCTGC | 95, 110 | 60 | |
| | R : TCTACGATGTCCAGTTCTTCTCC | | | |

* Italicized letters indicate lengths of digested fragments.

† Annealing temperature for PCR reaction.

び *MC1R* 遺伝子は、増幅された PCR 産物を表 2 に示した制限酵素にて消化した後、3% アガロースゲルにて電気泳動を行ったのち、制限酵素断片の長さの違いにより遺伝子型を判別した。本希少系統集団の遺伝的特徴を評価するための対照として、Nishimaki ら (2015) による上記遺伝子に関する黒毛和種の 8 地域集団のデータを用いた。

結 果

1. マイクロサテライトマーカー

希少系統集団の 21 個体について、52 座位のマイクロサテライトマーカーの遺伝子型を決定し、対照群としての Nishimaki ら (2013) により報告されている 8 県の黒毛和種の地域集団のデータと比較した結果、表 3 に示したように平均対立遺伝子数 (MNA) は、希少系統で 3.48、対照群では 4.21 から 6.90 であり、平均対立遺伝子数をサンプル数で補正したアレリックリッチネス (AR) は、希少系統で 3.48、対照群では 3.44 から 5.39 であった。また、希少系統を含めてすべての集団において、単一の対

立遺伝子に固定されている遺伝子座は存在しなかった。ヘテロ接合度の平均値は、それぞれ実測値 (H_o) で希少系統は 0.514、対照群では 0.553 から 0.710、推測値 (H_e) で希少系統は 0.511、対照群では 0.535 から 0.685 であった。希少系統集団は、閉鎖集団として長年維持されていることが知られている地域集団 E を除く、黒毛和種の他の地域集団と比較していずれも有意に低い値を示した。

各地域集団間の遺伝的分化の程度を評価するためにペアワイズ F_{ST} を推定した結果、希少系統集団は、E 地域集団との間で最も高い値を示し、他の地域集団との間でも比較的高い値を示した (表 4)。また、Reynold の遺伝距離は、希少系統集団と E 地域集団との間で最も大きかった (表 4)。さらに、Reynold の遺伝距離に基づく Neighbor-Net graph によって得られた地域集団間の系統ネットワークでは、E 地域集団を除く他の地域集団は、互いに比較的近いところに分布しているのに対し、希少系統集団は、他の地域集団から最も離れた位置に分布していた (図 1)。

各集団間の遺伝的類縁関係は、ベイジアンクラスタリン

Table 3 Summary statistics for the sample size (N), mean number of alleles (MNA), allelic richness (AR), observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities

| Subpopulation | N | MNA | AR | H_o | H_e |
|---------------|-----|--------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
| A† | 95 | 6.54 ± 2.51 ^a | 5.25 ± 1.57 ^a | 0.702 ± 0.007 ^a | 0.685 ± 0.014 ^a |
| B† | 130 | 6.71 ± 2.23 ^a | 5.16 ± 1.42 ^a | 0.710 ± 0.006 ^a | 0.671 ± 0.017 ^a |
| C† | 86 | 6.44 ± 2.10 ^a | 5.18 ± 1.52 ^a | 0.686 ± 0.007 ^a | 0.668 ± 0.019 ^a |
| D† | 138 | 6.65 ± 2.56 ^a | 4.98 ± 1.37 ^a | 0.673 ± 0.006 ^a | 0.633 ± 0.017 ^a |
| E† | 95 | 4.21 ± 1.49 ^b | 3.44 ± 1.10 ^b | 0.553 ± 0.007 ^b | 0.535 ± 0.025 ^b |
| F† | 173 | 6.83 ± 2.58 ^a | 5.30 ± 1.51 ^a | 0.700 ± 0.005 ^a | 0.680 ± 0.017 ^a |
| G† | 100 | 6.90 ± 2.34 ^a | 5.39 ± 1.52 ^a | 0.681 ± 0.006 ^a | 0.672 ± 0.017 ^a |
| H† | 189 | 6.83 ± 2.32 ^a | 5.12 ± 1.42 ^a | 0.671 ± 0.005 ^a | 0.651 ± 0.019 ^a |
| Rare | 21 | 3.48 ± 1.15 ^c | 3.48 ± 1.15 ^b | 0.514 ± 0.015 ^b | 0.511 ± 0.027 ^b |

† These data have been published in Nishimaki *et al.* (2013)

^{a-c} Mean ± standard deviation within the same column with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

Table 4 Pairwise F_{ST} estimates (above diagonal) and Reynolds' genetic distance (below diagonal) among the nine subpopulations of Japanese Black cattle

| Subpopulation | A | B | C | D | E | F | G | H | Rare |
|---------------|-------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| A† | | 0.023*** | 0.014*** | 0.041*** | 0.091*** | 0.017*** | 0.017*** | 0.044*** | 0.156*** |
| B† | 0.027 | | 0.005*** | 0.043*** | 0.098*** | 0.013*** | 0.012*** | 0.041*** | 0.155*** |
| C† | 0.019 | 0.010 | | 0.029*** | 0.082*** | 0.007*** | 0.005** | 0.036*** | 0.153*** |
| D† | 0.044 | 0.046 | 0.033 | | 0.089*** | 0.030*** | 0.025*** | 0.057*** | 0.176*** |
| E† | 0.096 | 0.103 | 0.087 | 0.095 | | 0.084*** | 0.068*** | 0.111*** | 0.236*** |
| F† | 0.021 | 0.016 | 0.011 | 0.033 | 0.090 | | 0.006*** | 0.034*** | 0.147*** |
| G† | 0.022 | 0.016 | 0.010 | 0.029 | 0.073 | 0.009 | | 0.030*** | 0.153*** |
| H† | 0.047 | 0.044 | 0.039 | 0.060 | 0.118 | 0.037 | 0.034 | | 0.162*** |
| Rare | 0.180 | 0.180 | 0.176 | 0.198 | 0.250 | 0.173 | 0.177 | 0.186 | |

† These data have been published in Nishimaki *et al.* (2013)

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

グを用いた構造解析によって解析した。仮定したクラスター数 (K) が 1 から 9 のときについて推定を行った結果、希少系統集団は、K が 3 および 4 のとき、共通祖先を持つ H 地域集団とは同様のクラスターを形成したが、他の地域集団とは分離した。また、K が 5 のときに単一のクラスターを形成、他の全ての集団と分離した (図 2)。K が 6 以上においても同様の傾向が見られた。

2. ミトコンドリア DNA

希少系統集団の 21 個体のうちの 20 個体について、ミトコンドリア DNA の D-loop 領域の塩基配列を決定した

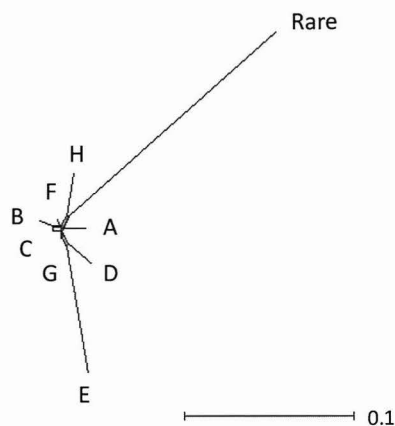


Figure 1 Neighbor-Net graph among the nine subpopulations of Japanese Black cattle based on Reynolds' genetic distances. A to H indicate local subpopulations of Japanese Black cattle described in Nishimaki *et al.* (2013) and Rare indicate the rare line of Japanese Black cattle.

ところ、希少系統集団には 2 つのハプロタイプしか存在しないことが明らかとなった。これらの 20 個体のうち 16 個体はこれまでに黒毛和種でも報告されているハプログループ T4 (Mannen ら 2004) に属する単一の J5 ハプロタイプ (Mannen ら 1998) を持っていた (図 3)。この J5 ハプロタイプは黒毛和種の集団においては主要なハプロタイプである。残りの 4 個体は別のハプロタイプを持っていたが、このハプロタイプはこれまで黒毛和種を含め既存のウシの各品種において報告されていない新規のハプロタイプであった。我々はこのハプロタイプを仮に J19 とした。J19 ハプロタイプは J5 ハプロタイプとはミ

| haplotype | variable nucleotide positions | | | | | |
|-----------|-------------------------------|---|---|---|---|---|
| | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | |
| | 0 | 0 | 1 | 2 | 3 | 1 |
| | 4 | 9 | 2 | 6 | 0 | 6 |
| | 2 | 3 | 2 | 0 | 2 | 9 |
| V00654 | T | G | T | C | G | A |
| J5 (16) | C | A | · | · | A | G |
| J19 (4) | C | A | C | T | A | G |

Figure 3 Sequence variation in cattle D-loop sequences of 20 animals of the rare line of Japanese Black cattle. V00654 is the taurine reference sequence published by Anderson *et al.* (1982) (Genbank accession number V00654). Dots indicate the identical nucleotide with the reference sequence. Numbers in parentheses indicate number of animals in the population.

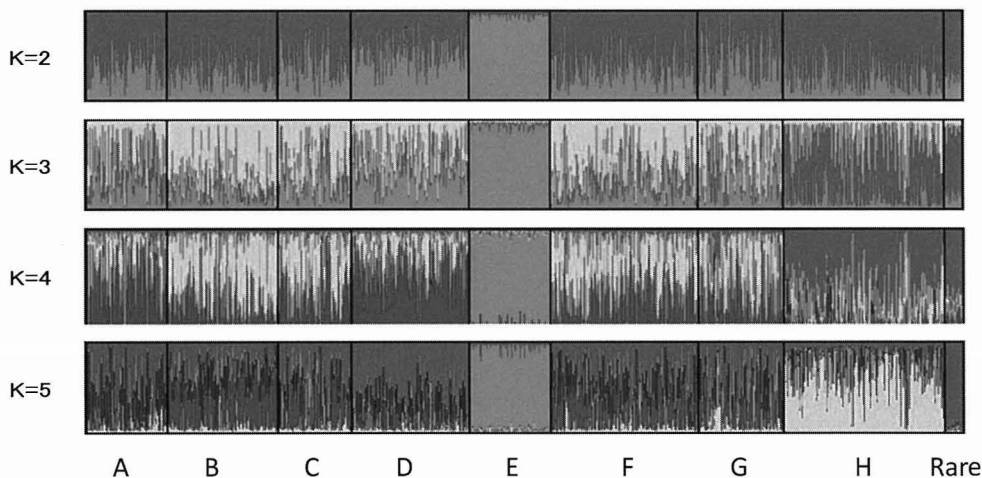


Figure 2 Bayesian clustering of the nine subpopulations of Japanese Black cattle obtained by STRUCTURE analyses. Each individual is represented by a single vertical line divided into K colors, where K is the number of assumed clusters and the colored segment shows the proportion of the individual's genome corresponding to a particular cluster. The subpopulations are separated by vertical black lines. A to H indicate local subpopulations of Japanese Black cattle described in Nishimaki *et al.* (2013) and Rare indicate the rare line of Japanese Black cattle.

トコンドリア DNA の塩基配列 (Accession number : V00654) の 16,122 番目と 16,260 番目の塩基が異なるが、黒毛和種の主要なハプログループである T4 ハプログループに属するハプロタイプと考えられた。

3. 生産形質に関連する遺伝子

希少系統集団の 21 個体について、*SCD*, *SREBP1*, *FASN*, *NCAPG*, *MC1R*, および *F11* 遺伝子の遺伝子型を調べ、これまでに報告されている黒毛和種の 8 地域集団の平均の遺伝子頻度 (Nishimaki ら 2015) と比較した (表 5)。*SCD* 遺伝子では、黒毛和種の平均では優良対立遺伝子である A 対立遺伝子の頻度は 0.77 であるのに対し、希少系統集団では 0.60 であり、大きな差異は認められなかった。*SREBP1* 遺伝子では、黒毛和種の平均では S 対立遺伝子の頻度は 0.40、L 対立遺伝子の頻度は 0.60 であるのに対し、希少系統集団では L 対立遺伝子のみが認められた。*FASN* 遺伝子では、黒毛和種の平均では B 対立遺伝子の頻度は 0.82、L 対立遺伝子の頻度は 0.18 であるのに対し、希少系統集団では B 対立遺伝子の頻度は 0.48、L 対立遺伝子の頻度は 0.52 であった。*NCAPG* 遺伝子では、黒毛和種の平均では G 対立遺伝子の頻度は 0.19、T 対立遺伝子の頻度は 0.81 であるのに対し、希少系統集団では T 対立遺伝子だけが認められた。*MC1R* 遺伝子では、黒毛和種の平均では E⁺ 対立遺伝子の頻度が 0.46 であるのに対し、希少系統集団における E⁺ 対立遺伝子の頻度は 0.93 であった。*F11* 遺伝子では、変異を持つ (-) 対立遺伝子の頻度は黒毛和種の平均では 0.29 であるのに対し、希少系統集団では 0.19 であった。

考 察

黒毛和種では、県を単位として優秀な遺伝的能力をもった種雄牛が造成され、その地域集団内でこれらの種雄牛が広く供用されることで、他の地域集団とは異なる固有の遺伝的特徴を持つ地域集団が各県を単位として形成される傾向にあった。しかし近年では、家畜改良事業団や民間の人工授精所で供用されている種雄牛が全国的に広く用いられることで、これらの種雄牛が主に用いられる地域では、従

来形成されていた固有の地域集団としての遺伝的特徴が失われ、遺伝的な均質化が進んでいる可能性も指摘されている。最近、Nishimaki ら (2013) は、黒毛和種の 8 県の地域集団についてマイクロサテライトマーカーを用いてこれらの集団の遺伝的多様性と集団間の遺伝的分化を調べたところ、長年、単一の系統を用いて閉鎖集団として維持されている特定の県等の一部の地域集団を除くと、多くの県の地域集団間では明確な遺伝的分化が認められず黒毛和種全体では遺伝的均質化が進んでいる可能性が示唆されている。

家畜における有効な集団サイズは、選抜育種の結果として一般に減少しやすい傾向にあることから、家畜集団の遺伝的多様性を維持するためには、集団の主流を占める系統とは異なる希少な系統を保存することの必要性が指摘されている (Taberlet ら 2008)。特に、近年黒毛和種では、人工授精の普及や能力の高い特定の種雄牛が集中的に供用されることなどにより、有効な集団サイズは極度に小さくなってきており、遺伝的多様性をいかに維持するかが重要な課題となっている (Nomura ら 2001 ; Taberlet ら 2008 ; Nishimaki ら 2013)。また、遺伝的多様性の減少は、近交退化および遺伝性疾患の発生頻度の増加をもたらす可能性があり (Kunieda 2005)、さらに将来の家畜生産における経済要求の変化や環境の変化に適応するための選抜反応を維持するのにも、家畜集団の遺伝的多様性を保持することは必須である。したがって、黒毛和種の育種においては、現在の市場の要求に対応した肉質や増体などの特定の改良目標に沿った選抜を行って肉生産を行う集団とは別に、遺伝資源として次世代に遺伝的多様性を継承するために、固有の形質や能力をもった特徴ある集団 (系統) を数多く基礎育種集団として維持する必要性も指摘されている。

本研究において、日本最古の「蔓牛」として知られる「竹の谷蔓」に由来する岡山県の希少系統の集団について、マイクロサテライトマーカーを用いた遺伝的な構造解析によって集団間の類縁関係を調べたところ、黒毛和種の他の地域集団とは明確に区別される単一の遺伝的組成を持った

Table 5 Allelic frequencies of 6 genes in the rare population and Japanese Black cattle

| Gene | Alleles | Allelic frequencies | | | |
|---------------|--------------------------------|---------------------|--------|---------------------------------------|--------|
| | | Rare | | Japanese Black (average) [†] | |
| <i>SCD</i> | A*/V | 0.60 | / 0.40 | 0.77 | / 0.23 |
| <i>FASN</i> | B*/L | 0.48 | / 0.52 | 0.82 | / 0.18 |
| <i>SREBP1</i> | S*/L | 0 | / 1 | 0.40 | / 0.60 |
| <i>NCAPG</i> | G*/T | 0 | / 1 | 0.19 | / 0.81 |
| <i>MC1R</i> | E ⁰ /E ⁺ | 0.07 | / 0.93 | 0.54 | / 0.46 |
| <i>F11</i> | +/- | 0.81 | / 0.19 | 0.71 | / 0.29 |

* : Excellent allele, [†] These data have been published in Nishimaki *et al.* (2015)

集団としての分化が示された。さらにミトコンドリア DNA のハプロタイプの解析から、黒毛和種を含めた他の集団にはこれまで報告されていない固有のハプロタイプ J19 が認められた。これらのことから、本希少系統集団は、固有の遺伝的特徴を持つ集団であり、黒毛和種の遺伝的多様性を維持していくための基礎育種集団として維持保全していくことが必要であると考えられた。

一方で、本希少系統集団の遺伝的多様性について評価したところ、遺伝的多様性の指標となる AR は 3.48 ± 1.15 であり、黒毛和種の他の地域集団と比較して遺伝的多様性は顕著に低いことが認められた。また、生産形質関連遺伝子でも *SREBP1* と *NCAPG* 遺伝子は他の黒毛和種の集団と異なり、単一のアリルに固定されていた。さらに、ミトコンドリア DNA のハプロタイプでは 20 個体中 16 個体が同じハプロタイプを持つことから、母系の遺伝的多様性も顕著に低いことが示唆された。このように本希少系統集団の遺伝的多様性が低い理由としては、「蔓牛」の時代より血統が明らかな家系からなる集団としての系統維持を行うため、系統外の個体との交配を避けた閉鎖育種が継続されてきたこと（米田ら 2010a）、系統としての特徴をもつ個体を選抜しつつ、少数の農家で集団が維持されてきたことなどが考えられた。集団の遺伝的特性の固定化に伴う遺伝的多様性の低下は、特定の特徴を持った系統を造成するにあたっては不可避なことであるが、極端な近交化は近交退化および遺伝性疾患の発生頻度の増加をもたらす可能性があることから、系統内で一定のレベルの遺伝的多様性を維持することが家畜育種上好ましい。今後、本希少系統を維持していくためには、系統の遺伝的特性を維持しつつ、集団内の遺伝的多様性を如何に確保するかが重要な課題となるものと思われる。なお、黒毛和種とは異なるが、我が国において隔離された少数の集団として飼育あるいは棲息している在来牛として、見島牛および口之島牛が知られている。これらのウシの集団において、マイクロサテライトマーカーを用いて遺伝的多様性を調べた報告（Nagamine ら 2008；印牧と安藤 2013）と本希少系統の結果とを比較して見ると、平均対立遺伝子数では見島牛では 1.85、口之島牛では 1.43 であるのに対し、本希少系統では 3.48 であり、また単一の対立遺伝子に固定されている遺伝子座の数では見島牛では 21 遺伝子座中 9 遺伝子座、口之島牛では 52 遺伝子座中 16 遺伝子座であるのに対し、本希少系統では 52 遺伝子座中 0 遺伝子座であった。したがって、本希少系統集団の遺伝的多様性は見島牛、口之島牛の集団の遺伝的多様性に比べると高い傾向が見られた。

本研究ではマイクロサテライトマーカー、ミトコンドリア DNA に加えて、これまでに黒毛和種において、枝肉重量、脂肪酸組成、遺伝性疾患等の和牛の生産性に関与することが報告されている遺伝子について、希少系統集団内における遺伝子頻度を求めた。その結果、*SREBP1* 遺伝子（Hoashi ら 2007）および *NCAPG* 遺伝子（Eberlein ら

2009；Setoguchi ら 2009）では、希少系統集団内にそれぞれ S 対立遺伝子、G 対立遺伝子は検出されず、L 対立遺伝子、T 対立遺伝子に固定していることが示唆された。また毛色に関わる *MC1R* 遺伝子では、黒色の E^p 、黒褐色の E^+ 、褐色の e の 3 対立遺伝子が存在するが（Klungland ら 1995）、希少系統集団では E^p の頻度が 0.07 と、黒毛和種他集団に比べてきわめて低いことが明らかとなった（Nishimaki ら 2015）。本集団の毛色は基本的に黒褐色であることから、この *MC1R* 遺伝子の対立遺伝子頻度と実際の毛色の間に矛盾は認められなかった。*NCAPG* 遺伝子では、黒毛和種全体ではこの G 対立遺伝子の遺伝子頻度は 0.19 である一方で（Nishimaki ら 2015）、日本在来牛といわれる見島牛および口之島牛の集団では本希少系統集団と同様に G 対立遺伝子は検出されず、T 対立遺伝子に固定されていることが報告されている（米田ら 2010b；斯琴図雅ら 2014）。明治以降の和牛の近代化の過程で体型の大型化を目的として黒毛和種等は西欧から導入された外来品種との交雑が進められたのに対し、離島にて長年にわたって飼育あるいは棲息していた見島牛および口之島牛はこれら外来品種の影響を受けておらず、日本固有の在来牛の特徴を強く残していると考えられている（Nagamine ら 2008；印牧 2014）。したがって、日本の在来牛は G 対立遺伝子を持たず、G 対立遺伝子は体型の大型化を目的に導入された外来品種に由来する可能性が指摘されている（斯琴図雅ら 2014）。同様に、ウシの毛色に関わる *MC1R* 遺伝子では、黒毛和種では E^p の対立遺伝子頻度が 0.54 であるのに対し（Nishimaki ら 2015）、見島牛、口之島牛では E^p は見られないことから、黒毛和種に広く見られる E^p は黒毛和種成立の過程で導入された外来品種に由来する可能性が指摘されている（斯琴図雅ら 2014）。本希少系統集団の個体数が少ないため、これらの遺伝子の遺伝子頻度が黒毛和種と大きく異なることは単に遺伝的浮動の結果とも考えられるが、本希少系統集団は歴史的に外来品種の影響が比較的少ない形で維持されてきた可能性も考えられ、本集団の由来を考える上でこれら遺伝子の分布は興味深い知見と考えられた。

以上、本研究では、マイクロサテライトマーカー、ミトコンドリア DNA、生産形質に関わる遺伝子の多型の解析の結果から、「竹の谷蔓」に由来する岡山県の希少系統の集団は、集団内の遺伝的多様性は黒毛和種他集団に比べて低いが、他集団とは明確に区別される固有の遺伝的特徴を持つことが明らかとなった。これらの結果から、本希少系統集団は、黒毛和種集団の遺伝的多様性を維持するための遺伝資源として有用であるが、この系統を維持保全していくためには、集団のサイズを大きくし計画的な交配を行うことなどにより、集団内の遺伝的多様性の減少を防止していくことが必要であると考えられた。今後、一塩基多型による SNPs の情報を用いた遺伝的能力評価（ゲノム育種値）の利用（富樫 2009）が黒毛和種でも期待されて

いる。そのSNPs情報を利用していくことで、本希少系統を保全するための遺伝的多様性や遺伝資源の状態をより正確に評価することも可能であると考えられた。

謝 辞

本希少系統集団のサンプルや情報を提供して頂いた和牛繁殖農家の柴田正晴氏、平田五美氏、眞壁 暁氏、吉沢眞義氏をはじめ関係者の方々に感謝します。本研究の一部は和牛知的財産権取得活用推進協議会の助成により行われた。

文 献

- Abe T, Saburi J, Hasebe H, Nakagawa T, Misumi S, Nade T, Nakajima H, Shoji N, Kobayashi M, Kobayashi E. 2009. Novel mutations of the FASN gene and their effect on fatty acid composition in Japanese Black beef. *Biochemical Genetics* **47**, 397-411.
- Anderson S, de Bruijn MH, Coulson AR, Eperon IC, Sanger F, Young IG. 1982. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Biology* **156**, 683-717.
- Bryant D, Moulton V. 2004. Neighbor-Net : an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Molecular Biology and Evolution* **21**, 255-265.
- Eberlein A, Takasuga A, Setoguchi K, Pfuhl R, Flisikowski K, Fries R, Klopp N, Furbass R, Weikard R, Kühn C. 2009. Dissection of genetic factors modulating fetal growth in cattle indicates a substantial role of the non-SMC condensin I complex, subunit G (NCAPG) gene. *Genetics* **183**, 951-964.
- El Mousadik A, Petit RJ. 1996. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics* **92**, 832-839.
- Goudet J. 2002. FSTAT : A program to estimate and test gene diversities and fixation indices (Version 2.9.3.2). Lausanne University, Lausanne, Switzerland ; [cited 13 June 2011]. Available from URL : <http://www2.unil.ch/izea/software/fstat.html>
- Hoashi S, Ashida N, Ohsaki H, Utsugi T, Sasazaki S, Taniguchi T, Oyama K, Mukai F, Mannen H. 2007. Genotype of bovine Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 (SREBP-1) is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mammalian Genome* **18**, 880-886.
- Huson DH, Bryant D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution* **23**, 254-267.
- 井上 良. 2003. 岡山和牛復活への道. pp. 70-177. 岡山県阿哲郡神郷町, 岡山.
- 印牧美佐生. 2014. 口之島野生化牛. 動物遺伝育種研究 **42**, 39-47.
- 印牧美佐生, 安藤 洋. 2013. 名古屋大学で維持・育成された口之島野生化牛集団の特性. 在来家畜研究会報告 **26**, 79-97.
- Klungland H, Våge DI, Gomez-Raya L, Adalsteinsson S, Lien S. 1995. The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mammalian Genome* **6**, 636-639.
- Kunieda M, Tsuji T, Abbasi AR, Khalaj M, Ikeda M, Miyadera K, Ogawa H, Kunieda T. 2005. An insertion mutation of the bovine F11 gene is responsible for factor XI deficiency in Japanese black cattle. *Mammalian Genome* **16**, 383-389.
- Kunieda T. 2005. Identification of genes responsible for hereditary diseases in Japanese beef cattle. *Animal Science Journal* **76**, 525-534.
- Loftus RT, MacHugh DE, Bradley DG, Sharp PM, Cunningham P. 1994. Evidence for two independent domestications of cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 2757-2761.
- Mannen H, Kohno M, Nagata Y, Tsuji S, Bradley DG, Yeo JS, Nyamsamba D, Zagdsuren Y, Yokohama M, Nomura K, Amano T. 2004. Independent mitochondrial origin and historical genetic differentiation in North Eastern Asian cattle. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **32**, 539-544.
- Mannen H, Tsuji S, Loftus RT, Bradley DG. 1998. Mitochondrial DNA variation and evolution of Japanese black cattle (*Bos taurus*). *Genetics* **150**, 1169-1175.
- Nagamine Y, Nirasawa K, Takahashi H, Sasaki O, Ishii K, Minezawa M, Oda S, Visscher PM, Furukawa T. 2008. 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.
- Nishimaki T, Ibi T, Siqintuya , Kobayashi N, Matsuhashi T, Akiyama T, Yoshida E, Imai K, Matsui M, Uemura K, Eto H, Watanabe N, Fujita T, Saito Y, Komatsu T, Hoshiba H, Mannen H, Sasazaki S, Kunieda T. 2015. Allelic frequencies and association with carcass traits of six genes in local subpopulations of Japanese Black cattle. *Animal Science Journal*. 2015, doi : 10. 1111/asj. 12453
- Nishimaki T, Ibi T, Tanabe Y, Miyazaki Y, Kobayashi N, Matsuhashi T, Akiyama T, Yoshida E, Imai K, Matsui M, Uemura K, Watanabe N, Fujita T, Saito Y, Komatsu T, Yamada T, Mannen H, Sasazaki S, Kunieda T. 2013. The assessment of genetic diversity within and among the eight subpopulations of Japanese Black cattle using 52 microsatellite markers. *Animal Science Journal* **84**, 585-591.
- Nomura T, Honda T, Mukai F. 2001. Inbreeding and effective population size of Japanese Black cattle. *Journal of Animal Science* **79**, 366-370.
- 岡山県畜産史編集委員会. 1980. 岡山県畜産史, pp. 391-726. (社)岡山県畜産会, 岡山.
- Park SDE. 2001. Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection. [Ph. D. thesis] University of Dublin, Dublin, Ireland.
- Petit RJ, El Mousadik A, Pons O. 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* **12**, 844-855.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly PJ. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.

- Reynolds J, Weir BS, Cockerham CC. 1983. Estimation of the coancestry coefficient : Basis for a short-term genetic distance. *Genetics* **105**, 767-769.
- Sasazaki S, Usui M, Mannen H, Hiura C, Tsuji S. 2005. Allele frequencies of the extension locus encoding the melanocortin-1 receptor in Japanese and Korean cattle. *Animal Science Journal* **76**, 129-132.
- Setoguchi K, Furuta M, Hirano T, Nagao T, Watanabe T, Sugimoto Y, Takasuga A. 2009. Cross-breed comparisons identified a critical 591 kb region for bovine carcass weight QTL (CW-2) on chromosome 6 and the Ile-442-Met substitution in NCAPG as a positional candidate. *BMC Genetics* **10**, 43.
- 斯琴函雅, 西牧孝洋, 摺斐隆之, 辻 岳人, 米田一裕, 大島一郎, 片平清美, 万年英之, 下桐 猛, 印牧美佐生, 国枝哲夫. 2014. 口之島牛集団における経済形質, 遺伝性疾患および毛色に関連する遺伝子の対立遺伝子頻度とその分布. *動物遺伝育種研究* **42**, 11-19.
- Taberlet P, Valentini A, Rezaei HR, Naderi S, Pompanon F, Negrini R, Ajmone-Marsan P. 2008. Are cattle, sheep, and goats endangered species? *Molecular Ecology* **17**, 275-284.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 2725-2729.
- Taniguchi M, Utsugi T, Oyama K, Mannen H, Kobayashi M, Tanabe Y, Ogino A, Tsuji S. 2004. Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mammalian Genome* **15**, 142-148.
- 富樫研治. 2009. ゲノム選抜法. *動物遺伝育種研究* **37**, 21-28.
- 米田一裕. 2008. 岡山県黒毛和種希少系統の保存について. *動物遺伝育種研究* **36**, 23-28.
- 米田一裕, 只野 亮, 都築政起. 2010a. マイクロサテライトマーカーを用いた岡山県の黒毛和種希少系統における遺伝的特徴の解析. *動物遺伝育種研究* **38**, 5-11.
- 米田一裕, 渡辺 望, 国枝哲夫. 2010b. 見島牛における遺伝性疾患, 毛色, 経済形質に関わる遺伝子座の対立遺伝子の分布. *動物遺伝育種研究* **38**, 13-19.
- Weir BS, Cockerham CC. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.

Genetic characterization of a rare line of Japanese Black cattle in Okayama prefecture

Kazuhiro YONEDA¹, Yu OKUDA², Siqintuya³, Takahiro NISHIMAKI³, Hirokazu MATSUMOTO²,
Yoshiyuki MIYAZAKI⁴, Takayuki IBI², Takehito TSUJI² and Tetsuo KUNIEDA²

¹ Yoneda Genotyping laboratory Ltd, Takatsuki 569-1017, Japan

² Graduate School of Environmental and Life Science, Okayama University, Okayama 700-8530, Japan

³ Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Okayama 700-8530, Japan

⁴ Maebashi Institute of Animal Science, Livestock Improvement Association of Japan, Inc.,
Maebashi 371-0121, Japan

Corresponding : Kazuhiro YONEDA (fax : +81 (0) 72-687-0699, e-mail : dradenoy@ybb.ne.jp)

The effective population size of Japanese Black cattle has been significantly reduced and maintaining the genetic diversity of the population is important for breeding of Japanese Black cattle. For the conservation of genetic diversity, use of different lines of the breed with unique genetic characteristics for breeding, instead of intensive use of sires of few particular lines as common in current breeding of Japanese Black cattle, will be effective to prevent the genetic homogenization of the population. In the present study, we performed genetic characterization a population of a rare line of Japanese Black cattle, which has been originated from ancestral "Tsuru-ushi" in Okayama prefecture. By using microsatellite markers, allelic richness, and average observed and expected heterozygosity are 3.48, 0.514, and 0.511, respectively, and these values were lower than those of most of the Japanese Black cattle local subpopulations compared. The result of the clustering analyses indicated that the animals of the rare line formed a single group with a cluster that was clearly distinguished from the other populations. Sequence analysis of mitochondrial D-loop region revealed that only two haplotypes were observed in the population and 80% of the animals in the population possess a single haplotype. However, the other haplotype was a novel unique haplotype that has not been reported in cattle. Genotyping of six genes associated with important traits revealed that *SREBP1* and *NCAPG* loci were fixed for a single allele in the population and more than 90% of animals possess an allele of *MC1R* locus. These findings indicated that while genetic diversity of the population of the rare line is lower than those of the Japanese Black cattle local subpopulations, this population has unique genetic characteristics that were distinguished from the other populations and, therefore, the rare line is important for maintaining genetic diversity of Japanese Black cattle.

Nihon Chikusan Gakkaiho 87 (1), 1-10, 2016

Key words : genetic diversity, Japanese Black cattle, microsatellite marker, mitochondria DNA.