

高能力繁殖和牛の効率的作出技術の体系化（Ⅱ）

北川 師士*¹・新居 康生*²・大石 克己

要 約

本県において黒毛和種素牛の供給は大きく不足しており、高能力な繁殖和牛の選抜と牛群の整備は緊急の課題となっている。そのためには、迅速に繁殖牛の能力を評価するための手法と、高能力と判定された繁殖牛から効率的に産子を得る技術が必要である。前報では、能力指標としての成長ホルモン遺伝子型の利用、ロース芯部位超音波診断画像と枝肉成績の関係、および分娩後80日以内の採卵技術について報告を行った。今回、県内で飼養されている繁殖和牛を対象に、遺伝子型と育種価の関係について更なる解析と1年1産1採卵技術の実証試験を行い、次の結果が得られた。

- (1) 成長ホルモン遺伝子について、遺伝子型AA型、AB型およびAC型はCC型よりも、枝肉重量育種価が大きくなる。AA型とAB型はCC型よりも、ばらの厚さ育種価が大きくなる。
- (2) Leptin遺伝子RFLP 1について、遺伝子型AB型はAA型よりも、枝肉重量育種価、ロース芯面積育種価が大きくなる。
- (3) Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3 遺伝子について、MM型はWW型よりも、枝肉重量育種価が大きくなり、WW型はWM型よりも、歩留育種価、脂肪交雑育種価が高くなる。
- (4) 臍内留置型持続性黄体ホルモン製剤または超早期離乳法を活用することで、分娩後60.3±12.3日で採卵が可能であり、3.3±1.5個の正常卵が回収できた。分娩間隔は351日±9.2日であり、採卵を行いながら1年1産を達成できた。

目 的

徳島で飼養されている繁殖和牛は約1,300頭とここ数年増加傾向にあるが、和牛素牛の多くを県外に依存している状況にあり、能力の高い繁殖和牛の速やかな選抜と、多くの産子を確保する技術が必要とされている。

繁殖雌牛の産肉能力については育種価による評価・選抜がなされているが、評価が判明するまでに時間がかかること、産子の枝肉格付が必ずしも手に入らないこと、地域独自の評価となること等問題点も多い。そこで、前報では繁殖和牛の能力を直接評価する指標として遺伝子診断・超音波診断を対象とし、育種価を補完でき迅速に評価可能な指標として利用可能か、畜産研究所繫養繁殖牛と県内出荷された肥育牛を利用して検討を行った。その結果、成長ホルモン遺伝子型を育種価の一指標として利用できる可能性が示唆された。

今回は、遺伝子診断技術の精度向上および超音波診断の繁殖牛への応用を検討することで、育種価の代替となる能力指標の開発を目指し、高能力繁殖牛から効率的に産子を得る技術として1年1産1採卵技術の実証を行なった。

遺伝子診断については、対象とする遺伝子数を増やし、県内で飼養されている育種価判明繁殖和牛121頭のDNAを用いて、産肉能力と遺伝子型の関係について調査を行なった。

超音波診断については、繁殖和牛の超音波診断画像と脂肪交雑育種価について比較を行なった。

さらに、高能力と判断された牛から多くの産子を得る手法として、分娩後に採卵を行いその後の人工授精で受胎させる1年1産1採卵技術について実証を行った。

材料および方法

1-1. DNAの調整

県内で飼養されている育種価判明黒毛和種繁殖牛121頭の尾根部体毛より毛根部分を採取し、ISOHAIR (NIPPON GENE) を用いてtotal DNAを抽出した。抽出と並行してRNase処理を行い、RNAを除去した。サンプルは分光光度計でDNA濃度を測定し、PCRの鋳型として調整した。

1-2. 遺伝子多型の検出

成長ホルモン (GH: Growth Hormone) 遺伝子 (Chikuniら1997), レプチン (Leptin) 遺伝子 (Liefersら2002), インスリン様成長因子結合蛋白 3 (IGFBP3: Insulin-like growth factor binding protein 3) 遺伝子 (Haegemanら1999),メラノコルチンレセプター 4 (MC4R: melanocortin receptor 4) 遺伝子 (Haegemanら2001) を対象とし、PCR-RFLPにより遺伝子多型を検出した。

1-3. 統計処理

まず、多型の検出された4つの遺伝子 (GH, Leptin RFLP 1, Leptin RFLP 2, IGFBP3) を独立変数、育種価6形質 (枝肉重量, ロース芯面積, ばらの厚さ, 皮下脂肪の厚さ, 歩留まり, 脂肪交雑) を従属変数として多変量分散分析を行った。多変量分散分析で有意な差が検出された遺伝子を対象に、Sheffeの方法により育種価各形質の多重比較検定を行なった。

2-1. 超音波診断画像の検討

育種価判明黒毛和種繁殖牛127頭の超音波診断画像を用い、ロース芯部位の輝度を画像処理ソフトを利用して計測した。得られたロース芯部位の輝度と脂肪交雑育種価との関係を調査した。

3-1. 1年1産1採卵技術の実証

繫養牛3頭に分娩後約1ヶ月で膈内留置型持続

性黄体ホルモン製剤 (CIDR) を装着し、次法により受精卵の回収を行った。CIDR挿入日を0日として10日目からのFSH (20 A.U.) 漸減投与 (10,6,4 A.U.), PG投与 (12日目) およびAI (14日目) を行い、21日目に子宮洗浄法により受精卵を回収した。採卵後、PGの投与と子宮へのイソジン注入を行い、発情が回帰した時点で人工授精を行なった。

1頭は分娩後28日および56日で発情の発現がみられ、CIDRを用いることなく2回目の発情から10日後に過剰排卵処理を開始して前述と同様に採卵・人工授精を行なった。

結果および考察

1. 遺伝子多型

県内飼養繁殖牛において、GH遺伝子型はAA型が9頭、AB型が20頭、AC型が24頭、BB型が18頭、BC型が33頭、CC型が17頭であった (表1)。また、Leptin遺伝子RFLP 1遺伝子型はAA型が112頭、AB型が9頭、Leptin遺伝子RFLP 2遺伝子型はAA型が112頭、AB型が9頭であり、いずれもBBホモ型はみられなかった (表2, 3)。IGFBP3遺伝子型はWW型が75頭、WM型が40頭、MM型が6頭であった (表4)。MC4R遺伝子には報告されている多型はみられなかった。

河野 (2005) により成長ホルモン遺伝子頻度は各県産牛で異なることが報告されているが、徳島県ではA型: 25.6% (62/242), B型: 36.8% (89/242), C型: 37.6% (91/242) となり、特定の遺伝子型への偏りはみられなかった。本県には県有種雄牛が存在せず、素牛の外部導入や自家育成により多くの系統が混在しているためと思われる。

Leptin遺伝子RFLP 1の遺伝子頻度は、A型: 96.3% (233/242), B型: 3.7% (9/242) となり、非常にB型アリルが少ない結果となった。Holstein-Friesian種613頭を調査した結果でもB型アリルの頻度は少なく、BB型ホモは1頭しかみられなかった (Liefersら2002)。

表1. 繁殖牛GH遺伝子型と育種価 (平均値±標準偏差)

遺伝子型	頭数	枝肉重量(kg)	ロース芯(cm)	ばらの厚さ(cm)	皮下脂肪厚(cm)	歩留	脂肪交雑
AA	9	^A 19.51±11.18	1.31±1.97	^a 0.19±0.20	0.26±0.28	-0.17±0.27	0.27±0.14
AB	20	^a 8.91±17.01	1.98±1.69	^a 0.11±0.23	0.06±0.28	0.22±0.34	0.36±0.21
AC	24	^A 12.38±18.33	1.49±2.28	0.07±0.22	0.17±0.27	-0.02±0.46	0.23±0.24
BB	18	-4.93±19.70	0.29±1.77	-0.06±0.24	-0.08±0.17	0.14±0.40	0.27±0.24
BC	33	-4.65±23.26	0.24±2.20	-0.05±0.22	0.02±0.28	0.04±0.44	0.25±0.24
CC	17	^{Bb} -13.35±24.88	-0.39±2.17	^b -0.16±0.24	0.01±0.26	-0.03±0.31	0.29±0.17

A-B:p<1%, a-b:p<5%

表2. 繁殖牛Leptin遺伝子RFLP 1遺伝子型と育種価 (平均値±標準偏差)

遺伝子型	頭数	枝肉重量(kg)	ロース芯(cm)	ばらの厚さ(cm)	皮下脂肪厚(cm)	歩留	脂肪交雑
AA	112	^a 0.21±22.59	^A 0.62±2.17	0.00±0.25	0.05±0.28	0.05±0.41	0.27±0.22
AB	9	^b 17.57±13.80	^B 2.72±1.18	-0.03±0.18	0.13±0.21	0.03±0.30	0.33±0.24

A-B:p<1%, a-b:p<5%

表3. 繁殖牛Leptin遺伝子RFLP 2遺伝子型と育種価 (平均値±標準偏差)

遺伝子型	頭数	枝肉重量(kg)	ロース芯(cm)	ばらの厚さ(cm)	皮下脂肪厚(cm)	歩留	脂肪交雑
AA	112	2.65±22.84	0.85±2.20	0.01±0.24	0.07±0.28	0.04±0.40	0.27±0.21
AB	9	-12.82±9.65	-0.15±1.68	-0.06±0.24	-0.07±0.18	0.21±0.44	0.28±0.30

表4. 繁殖牛IGFBP3遺伝子型と育種価 (平均値±標準偏差)

遺伝子型	頭数	枝肉重量(kg)	ロース芯(cm)	ばらの厚さ(cm)	皮下脂肪厚(cm)	歩留	脂肪交雑
WW	75	^a -2.15±22.38	0.85±2.18	0.01±0.26	0.01±0.25	^A 0.15±0.40	^a 0.31±0.23
WM	40	5.39±21.92	0.53±2.14	-0.02±0.21	0.11±0.28	^B -0.11±0.32	^b 0.20±0.18
MM	6	^b 21.26±13.42	1.45±2.64	0.14±0.18	0.26±0.36	-0.22±0.49	0.25±0.28

A-B:p<1%, a-b:p<5%

Leptin遺伝子RFLP 2の遺伝子頻度も、A型：96.3% (233/242)、B型：3.7% (9/242)となり、非常にB型アリルが少なかった。Haegemanら (2000) により報告されている外国種牛10系統の遺伝子型頻度は、A型：51.8%から88.7%、B型：11.3%から48.2%であり、黒毛和種と比較してB型アリルが多い。原因としては、①本来黒毛和種にはB型アリルが存在しなかったが、和牛の改良として外国種が交配された過程で導入された可能性、あるいは、②Leptin遺伝子が産肉能力に関連しており、黒毛和種の改良過程で選抜淘汰がなされてきた可能性が考えられる。また、Leptin遺伝子RFLP 1およびLeptin遺伝子RFLP 2でAB型と診断された各々の9頭は別の個体であり、各々の変異型アリル (B型) は連鎖していなかった。

IGFBP3遺伝子の遺伝子頻度は、W型：78.5%

(190/242)、M型：21.5% (52/242)であった。Haegemanら (1999) により報告されている外国種牛8系統の遺伝子型頻度は、W型：30.0%から80.0%、M型：20.0%から70.0%であり、品種により頻度の幅が異なるものと考えられる。

MC4R遺伝子は、調査した121頭すべてでB型アリルのみが存在した。Haegemanら (2001) の調査でも、A型アリルはRed PiedとRed Holsteinのみで観察されており、特定の品種・系統のみに存在する遺伝子型と思われた。

2. 遺伝子型と育種価の関係

多型の検出されたGH、Leptin RFLP 1、Leptin RFLP 2、IGFBP3遺伝子を対象として、育種価との関係を調査した。育種価6形質相互の相関を考慮するため、各々の遺伝子多型を独立変

数、育種価6形質を従属変数として多変量分散分析を行った(表5)。主効果として、GH遺伝子、IGFBP3遺伝子が5%水準、Leptin遺伝子RFLP 1が1%水準で有意であった。

これら3種類の遺伝子を対象に、Sheffeの方法により育種価各形質の多重比較検定を行なった(表1, 2, 4)。GH遺伝子については、A型アリルを持つ繁殖牛の枝肉重量育種価は、CC型より有意に大きかった。また、AA型、AB型はCC型に比べらの厚さが5%水準で大きかった。黒毛和種におけるGH遺伝子と産肉能力との関係はこれまでも報告されており(片岡ら2000, 安田ら2002, 岡ら2003, 塩田ら2004)、繁殖牛においても育種価能力指標として利用できる可能性が示された。

Leptin遺伝子RFLP 1はイントロンに存在する遺伝子多型であるが、枝肉重量育種価で5%水準、ロース芯面積育種価で1%水準の有意差がみられた。Holstein-Friesian種においてもLeptin遺伝子多型が泌乳量等の経済形質に影響を与えており(Liefersら2002)、遺伝子型の違いにより、発現レベルあるいは修飾レベルでの違いが存在し、細胞中でのレプチン濃度に影響を与える可能性が考えられる。

IGFBP3遺伝子WW型はMM型より枝肉重量育種価が5%水準で小さくなった。また、WW型はWM型と比較して歩留り育種価が1%水準で高く、脂肪交雑育種価が5%水準で高かった。IGFBP3はインスリン様成長因子(IGF)に結合するタンパク質であり、IGFの半減期や受容体への配達に関わることで作用の調節を担っていると考えられている。遺伝子型の違いはIGFBP3活性の変化を

生み出し、IGFの働きに影響を与える可能性がある。

今回の研究では3種類の遺伝子の多型が繁殖牛育種価に影響を与えていることが示唆されたが、量的形質である産肉能力を評価するためにはより多くの遺伝子情報が必要となる。今後、ウシゲノムが解読されることで、経済形質に係わる遺伝子の探索が進むものと思われる。

3. 超音波診断画像からの脂肪交雑育種価推定

前報では、肥育牛の超音波画像ロース芯部位輝度と枝肉BMS No.の間に中程度の相関がみられたため、繁殖牛の脂肪交雑育種価の指標として超音波画像ロース芯部位輝度が利用可能か検討を行った。育種価判明黒毛和種繁殖牛127頭の超音波診断画像からロース芯部位の輝度を計測し、脂肪交雑育種価との関係を調査したが、 $r = 0.1269$ であり相関関係はみられなかった(図1)。

超音波画像取得時のボディコンディションスコアを調査していないため、栄養度の違いが解析に影響を与えた可能性があるが、ロース芯部位の超音波画像を単純に脂肪交雑能力の指標として利用することは困難であると思われる。

3. 1年1産1採卵技術の実証

場内で分娩した繁殖牛のうち、4頭で実証試験を行った。分娩から採卵実施日までの日数(±標準偏差)は 60.3 ± 12.3 日、採卵成績は表6のとおりであった。採卵後の発情回帰日数(±標準偏差)は 8.0 ± 0.0 日(1頭は発情発現見落としのため不明)で、一度の人工授精で3頭が受胎した。分娩間隔(±標準偏差)は $351 \text{日} \pm 9.2 \text{日}$ となり、採卵

表5. 育種価6形質に対する多変量分散分析表

要因	自由度	Wilksの Λ	F値	num DF	den DF	p値
GH	5	0.64491223	1.6458	30	426	0.0188
Leptin RFLP 1	1	0.81873074	3.9114	6	106	0.0014
Leptin RFLP 2	1	0.93168353	1.2954	6	106	0.2656
IGFBP3	2	0.82227784	1.8159	12	212	0.0472

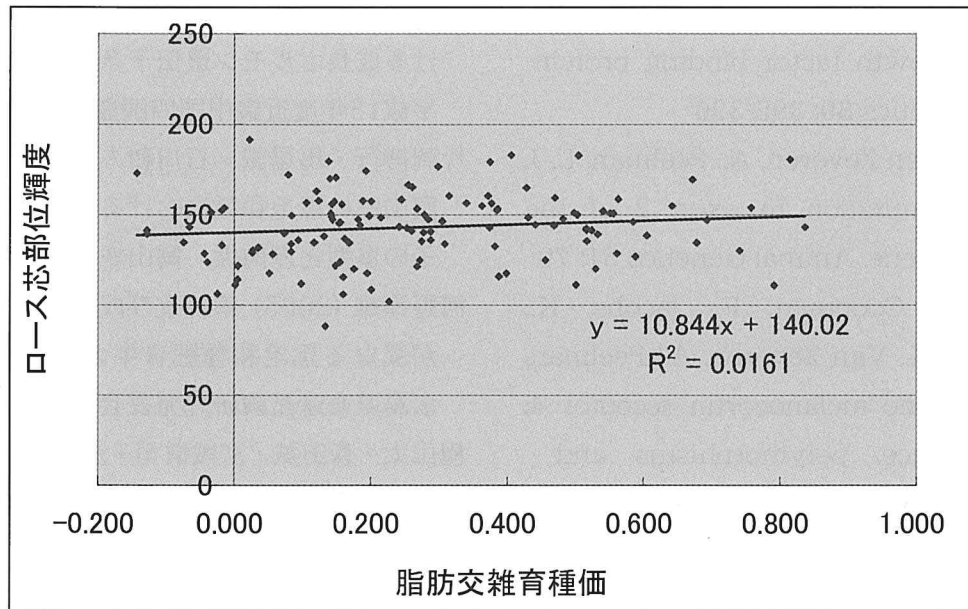


図1. 繁殖牛ロース芯部位輝度と脂肪交雑育種価の関係

表6. 採卵実施日、採卵成績および採卵後の経過

採卵牛	実施日 (分娩 後日数)	過剰排 卵処理	回収 卵数	内 訳				正常卵 率(%)	採卵後 発情回 帰日数	採卵後 受胎ま での日 数	分娩 間隔
				正常卵		未受 精卵	変性 卵				
				Aランク	B, C						
A	51	CIDR	10	5	0	5	0	50	8	8	341
B	52	CIDR	5	4	0	1	0	80	不明	27	359
C	62	CIDR	8	0	2	1	5	25	8	8	353
D	77	自然発情	2	0	2	0	0	100	8	*-	*-
平均	60.3	-	6.3	2.3	1.0	1.8	1.3	52	**8.0	**14.3	**351
標準偏差	12.3	-	3.5	2.6	1.2	2.2	2.5	-	**0	**11.0	**9.2

*D牛は2回の人工授精で受胎せず、その後人工授精を行っていない、**3頭分のデータ

を行いながらも1年1産を達成できた。残りの1頭は二度の人工授精を行ったが受胎せず、場内繋養牛整理のためその後の人工授精を行なわなかった。

有安ら (2003), 極山ら (2005) はCIDRを活用し、それぞれ分娩後52日および62日, 分娩後61日から69日で採卵を行っており, 採卵成績に問題ないことを報告している。また, 今回の実証頭数は4頭と少ないが, 採卵後約10日の発情でも人工授精は可能であることを示唆する結果であり, 1年1産1採卵技術は十分に普及可能な技術であると考えられる。

繁殖農家にとって子牛の販売は重要な収入源で

あり, 多くの産子を生産するためとはいえ, 連続して採卵を行うことは中短期的に損失を被ることになる。この点からも, 1年1産1採卵技術は生産者にとって取り組みやすく, 高能力牛から多くの産子を得るために有効な技術であると思われる。

引用文献

- Chikuni, K., Fukumoto, Y., Tanabe, R., Muroya, S., Ozawa, S. (1997) A simple method for genotyping the bovine growth hormone gene. *Animal Genetics* 28: 230-232
- Haegeman, A., Van Zeveren, A., Peelman, L. J.

- (1999) A new mutation in the bovine insulin-like growth factor binding protein-3. *Animal Genetics* 30: 395-396
- Haegeman, A., Van Zeveren, A., Peelman, L. J. (2000) New mutation in exon 2 of the bovine leptin gene. *Animal Genetics* 31: 79
- Haegeman, A., Coopman, F., Jacobs, K., Mattheeuws, M., Van Zeveren, A., Peelman, L. (2001) Bovine melanocortin receptor 4: cDNA sequence, polymorphisms and mapping. *Animal Genetics* 32: 189-192
- Liefers, S. C., te Pas, M. F., Veerkamp, R. F., van der Lende, T. (2002) Associations between Leptin Gene Polymorphisms and Production, Live Weight, Energy Balance, Feed Intake, and Fertility in Holstein Heifers. *J Dairy Sci.* 85: 1633-1638
- 有安亮代・小田頼政・小田亘・山本康廣・塚本章夫 (2003) 胚移植技術を応用した「1年1産1採胚」技術の確立. *岡山総畜セ研報*14:35-40
- 岡章生・龍田健・岩本英治 黒毛和種肥育牛における成長ホルモン遺伝子多型と産肉性との関連. 平成15年度近畿中国四国農業研究成果情報
- 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
- 河野幸雄 (2005) 系統及び成長ホルモン遺伝子型が異なる黒毛和種肥育牛の成長特性. 第38回 広島県畜産試験研究発表会
- 極山太・森田誠・宮城信司・安村修 (2005) 黒毛和種の効率的な採胚と採胚後の早期受胎技術. *京都畜技セ研報* 2:42-46
- 塩田鉄朗・有安亮代・栗木隆吉・平本圭二 (2004) 黒毛和種における牛成長ホルモン遺伝子多型と産肉特性について. *岡山総畜セ研報*15:54-58
- 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). *岡山総畜セ研報*15:54-58