〔ミニレビュー〕

ウシ・グレリン受容体遺伝子の塩基多型、分子進化および

その塩基多型と産肉形質との関連性

小松正憲^{1*}、藤森祐紀^{2#}、伊藤智仁³、佐藤洋一⁴、埴和靖俊²、
西尾元秀¹、岡村裕昭⁵、佐々木 修¹、高橋秀彰¹、佐藤正寛¹

¹ 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

〒305-0901 つくば市池の台2

² 茨城県畜産センター・肉用牛研究所

³ 家畜改良事業団・家畜改良技術研究所

⁴ 岩手県農業研究センター・畜産研究所

⁵ 独立行政法人農業生物資源研究所

現在、長野県畜産研究所

Nucleotide polymorphisms and molecular evolution of the bovine *growth hormone secretagogue receptor 1a (GHS-R1a)* gene and its genetic association with carcass traits in Japanese Black cattle

Masanori KOMATSU^{1*}, Yuki FUJIMORI^{2#}, Tomohito ITOH³, Yoichi SATO⁴,
Yasutoshi HAGA², Motohide NISHIO¹, Hiroaki OKAMURA⁵, Osamu SASAKI¹,
Hideaki TAKAHASHI¹, Masahiro SATOH¹

¹ National Institute of Livestock and Grassland Science (NILGS), Tsukuba, Japan.

² Ibaraki Prefecture Livestock Research Centre, Hitachi-Ohmiya, Japan.

³ Maebashi Institute of Animal Science, Livestock Improvement Association of Japan, Inc. (LIAJ) Maebashi, Japan.

⁴ Iwate Prefecture Livestock Research Centre, Takizawa, Japan.

⁵ National Institute of Agrobiological Sciences (NIAS), Tsukuba, Japan.

Present address: Nagano Prefecture Livestock Research Centre, Shiojiri, Japan.

要 約

グレリン受容体は主に視床下部・弓状核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。我々は、ウシ・グレリン受容体遺伝子全長（約 6.5 キロ塩基対）の塩基配列をウシ 13 品種で決定し、塩基多型の全容を明らかにした。1,285 頭の黒毛和種後代検定牛集団を用い、本遺伝子の塩基多型と増体形質との関連性を検討したところ、5'UTR マイクロサテライト（(TG)_n）と nt-7（C > A）座位に有意関連性を認めた。この関連性を説明する仮説（“translational hypothesis”）を提案した。

1. はじめに

グレリン受容体（GHS-R）は主に摂食統合調節部位である視床下部・弓状核および下垂体等で発現し、成長ホルモン（GH）分泌促進作用や摂食行動の促進、脂肪蓄積効果等多様なエネルギー代謝調節作用を有する「グレリン」の機能を発揮させる重要な受容体である（Cruz と Smith 2008）。

1-1 グレリンとグレリン受容体同定の経緯

グレリン同定の経緯は「研究物語」として興味深い

（Kojima と Kangawa 2005）。Bowers ら（1980）はオピオイドペプチド（麻酔鎮痛効果等を持つペプチド）の誘導体の一つが、弱い成長ホルモン（GH）分泌促進活性を持つことを発見した。これが GHS（growth hormone secretagogue：成長ホルモン分泌促進因子）の

連絡先：小松 正憲

現所属：（独）農研究機構・畜産草地研究所

〒305-0901 つくば市池の台2

(email: mkomatsu@affrc.go.jp)

最初の発見である。その後、合成に改良が加えられ、1984年には強力な GHS である GHRP-6 が開発された。また、1993 年メルク社により最初の非ペプチド性 GHS である L-692,429、さらに L-163,191 (MK-0677) が開発された。これら低分子化合物 GHS は、経口投与によっても十分な GH 分泌が認められたが、副作用の問題から開発は中止されたものである。GHS の GH 分泌作用機序に関する研究も進み、GHS は成長ホルモン放出ホルモン (GHRH) 受容体とは別の受容体に作用して GH 分泌を促進することが明らかになった。1996 年発現クローニング法により GHS 受容体 (GHS-R: すなわちグレリン受容体) がブタ脳下垂体 mRNA からクローニングされた。GHS-R 受容体は典型的な 7 回膜貫通型 G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であり、下垂体、視床下部などで発現していることが明らかになった (Howard ら 1996)。この時点で、GHS-R は結合するリガンドが不明のオーファンレセプターであり、内因性リガンドの存在が確実となったことから、世界中でこのリガンド探しの熾烈な研究競争が開始された。欧米の複数の研究グループはリガンド探しのターゲットを視床下部等脳に集中し、かつ遺伝子レベルでの検討にこだわった。これに対し、視床下部を含む幅広い臓器でかつ遺伝子レベルのみならず、タンパク質レベルでの検索も行っていたのが日本の“児島・寒川ら”のグループである。彼らは、この GHS-R のリガンドをラットの胃のペプチド抽出物から、世界に先駆け、発見・同定し、グレリン (Ghrelin) と命名した (Kojima ら 1999)。また、彼らは 28 個のアミノ酸からなる機能をもったグレリンの 3 番目のアミノ酸セリンが脂肪酸の n- オクタン酸で修飾され、この修飾がグレリンの機能発現に重要であることも明らかにした。このグレリン同定をめぐる研究競争をみると、多角的な観点からの研究がいかに重要であるか理解できる。Ghrelin には成長 (Grow) と“GH”分泌促進 (release) の意味が込められており、この名前には研究グループ“児島・寒川ら”の情熱が同時に込められている (Kojima ら 1999)。

1-2 グレリン

グレリンのアミノ酸残基数はヒト、マウス、ブタでは 28 残基、ウシ、ヒツジで 27 残基、ニワトリで 26 残基であり、N 末端の活性に必要な部分のアミノ酸配列が非常によく保存されている。グレリンの N 末端から 3 番目のセリン残基は脂肪酸のオクタン酸でアシル化修飾され、この修飾基がグレリンの活性に必要であ

る。このような脂肪酸で修飾された生理活性物質はグレリン以外にない。ウシ、ヒツジのグレリンはヒト・マウス・ブタ型グレリンの 14 番目のグルタミン (Gln) が欠如した「des-Gln14 グレリン」(27 残基型) である。このグレリンはオクタン酸の修飾を受けており、生理活性の種類・強さはヒト・マウス・ブタ型グレリン (28 残基型) と同じである。なお、ラットの胃にも des-Gln14 グレリンが通常タイプのグレリンの約 1/4 程度存在している。グレリンは哺乳類だけでなく脊椎動物全般に存在しており、どの動物種でも胃 (あるいは相当器官) で産生され、活性型は中鎖脂肪酸で修飾されている。中鎖脂肪酸の修飾は脂肪酸付加酵素によって行われる。脂肪酸修飾を受けていないグレリンの分子型、「デスアシルグレリン」は GHS-R (以後グレリン受容体とする) には結合せず、GH 分泌促進作用はない。デスアシルグレリンは胃や血中に多く存在し、ウシでは活性型グレリンの 7 倍程度多く存在する。デスアシルグレリンの特異的な受容体の存在は確定していないが、デスアシルグレリンには視床下部外側野の摂食中枢にあるオレキシンニューロンを活性化して摂食亢進作用があるとの報告がある (Kojima と Kangawa 2005)。

1-3 グレリン受容体

グレリン受容体遺伝子は二つのエクソンからなり、第 1 エクソンは第 1 から第 5 までの膜貫通領域、第 2 エクソンは第 6 から第 7 までの膜貫通領域をコードしている。また、グレリン受容体遺伝子からは、pre-mRNA が「スプライシングする」または「スプライシングしない」ことにより、1a 型 (GHS-R1a) と 1b 型 (GHS-R1b) の二つの mRNA が生じる。GHS-R1a 型のグレリン受容体は 7 回膜貫通型の GPCR (366 個アミノ酸) としてグレリンと結合し、その生理機能を発揮する。GHS-R1b 型のグレリン受容体は 5 回膜貫通型 (ウシでは 316 個アミノ酸) となり、グレリン結合能はない。しかし、GHS-R1b 型のグレリン受容体は GHS-R1a 型グレリン受容体とヘテロダイマーを形成し、GHS-R1a 型グレリン受容体の発現を調節すると考えられている (Leung P-K ら 2007)。グレリン受容体はロドプシンスーパーファミリーに属し、アミノ酸レベルでモチリン受容体 (52% 同一性) やニューロテンシン受容体 (59% 同一性) などに配列の同一性が認められる。これら受容体の内因性リガンドは消化管運動を制御する等多彩な生理作用発現に関与する。

1-4 グレリン-グレリン受容体の生理作用

グレリン-グレリン受容体には主要な生理作用として (1) 下垂体における GH 分泌促進作用と、(2) 視床下部摂食調節領域に作用して摂食活動を高める作用 (摂食促進作用) の二つがある。

(1) GH 分泌促進作用

下垂体における GH の合成と分泌の調節は多くの要因によって調節されているが、GH 分泌は、基本的には、視床下部-脳下垂体軸における① GHRH と GHRH 受容体、② グレリンとグレリン受容体、③ ソマトスタチンとソマトスタチン受容体の三つのリガンド-リガンド受容体軸によって調節されている。GH の合成と分泌機能に関しては、GHRH/GHRH 受容体は GH 合成が主で GH 分泌が従、グレリン/グレリン受容体は GH 分泌が主で GH 合成が従、ソマトスタチン/ソマトスタチン受容体は GH 分泌の阻止と整理される (Lin-Su と Wajnrach 2002)。胃 (反芻動物では第 4 胃) の X/A-様細胞で合成分泌されたグレリンは、近傍のグレリン受容体を発現している求心性迷走神経を刺激し、GH 分泌を刺激する (Nonogai 2008)。視床下部弓状核グレリンニューロンで産生されたグレリンも GHRH ニューロン上で発現している GHS-R1a に結合して GHRH を放出させ、GHRH は下垂体門脈を経由して脳下垂体前葉の GHRH 受容体を発現した GH 産生分泌細胞を刺激し GH を分泌させる。ウシでは、視床下部の GHS-R1a のほとんどが弓状核でのみ発現し、GHS-R1a を発現する GHRH ニューロンにグレリンが結合することにより、GH 分泌の刺激となる (Leshin ら 1994)。

(2) 摂食促進作用

視床下部弓状核グレリンニューロンは、同じ弓状核で GHS-R1a を発現する neuropeptide Y (NPY) /agouti-related protein (AgRP) ニューロンに投射し、摂食促進ペプチドである NPY と ArRP を分泌させる。さらにこのグレリンニューロンは同様に弓状核で GHS-R1a を発現する proopiomelanocortin (POMC) ニューロンに投射し、摂食抑制ペプチドである α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) などの POMC 関連ペプチドの分泌を抑制して摂食促進作用を推進する (Lin-Su と Wajnrach 2002)。また、弓状核グレリンニューロンは視床下部外側野で GHS-R1a を発現するオレキシンニューロンに投射し、摂食促進ペプチドであるオレキシンの分泌を促進する。さらにラットでは、弓状核の NPY と GHRH 両ニューロンにおける NPY と GHRH 発現上昇は GHS-R1a の発現上昇と関連すると報告されて

いる (Mano-Otagiri ら 2006)。

2. ウシ・グレリン受容体遺伝子の塩基多型、分子進化およびその塩基多型と産肉形質との関連性

2-1 研究開始の経緯

現在までヒトでは、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 (Wang ら 2004; Baessler ら 2005)。また、弓状核特異的 GHS-R1a 発現抑制ラットでは、体重・体長減少と摂食量減少が認められる (Shuto ら 2003)。しかしながら、ウシにおけるグレリン受容体遺伝子とその多型に関する研究は 2009 年に 2 報の研究報告がなされるまで皆無であった (Colinet ら 2009; Zhang ら 2009)。我々は、1997 年から 2003 年まで (独) 農研機構・近畿中国四国農業研究センター・大田研究拠点で行った黒毛和種半きょうだい家系を用いた体重・体型形質の QTL 連鎖解析研究から、これら QTL の一つを染色体第 1 番の約 90 ~ 120 センチモルガン付近にマップし、ヒト-ウシ比較地図からその候補遺伝子としてグレリン受容体遺伝子を推定した (Malau-Aduli ら 2005a; Malau-Aduli ら 2005b)。次に、形質に影響を与えている真の塩基変異 (QTN: Quantitative Trait Nucleotide) はグレリン受容体遺伝子のどこなのかを明らかにしたいと考えた。2003 年当時、ウシ・グレリン受容体遺伝子全長の塩基多様性に関する研究報告は皆無であったため、同時期に進展していたウシ・ドラフトシーケンズデータの蓄積 (2005 年 8 月第 2 版ウシホールゲノムショットガンシーケンズの公表) とヒトゲノムドラフトシーケンズを参考にして、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。本遺伝子の塩基変異の全容を明らかにするため、DNA サンプルとして、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」、和牛品種成立に関与したとされるヨーロッパ系品種、我々のグループがフィリピン大学との共同研究で所有している *Bos indicus* 系牛のフィリピン在来牛とアメリカンブラーマン交雑種を用いた。

2-2 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 ((TG)_n) の多型解析と反復配列の特徴

2-2-1 目的

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効率的に塩基多型を把握する必要がある。第1版のウシドラフトシーケンスを検討すると、未だ塩基配列が確定していない部分があったが、グレリン受容体遺伝子5'UTR領域と推定できる領域内には(TG)_n型のマイクロサテライトが存在していた。しかも興味深いことに、ヒト、マウスやラットの5'UTR領域内には、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)_n)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と考え、まずこのマイクロサテライトの多型解析を行った。解析サンプルは和牛3品種を含む合計12品種356頭のゲノムDNAを用い、シーケンサーによるPCR増幅産物のフラグメント解析を行った。さらに興味深いことに、ウシドラフトシーケンス情報から、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。マイクロサテライトのTG反復配列数に多型があった場合、この1箇所TC配列の部位をマーカーにすれば、TG反復伸長の方向が5'→3'方向か、あるいは3'→5'方向か明らかにできる。そこで、マイクロサテライトのアリル・ホモ型7個体(ホモ型アリル:19, 21, 22, 23, 24, 25, 28)ヘテロ型1個体(10/19)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。

2-2-2 結果

5'UTRマイクロサテライト((TG)_n)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種類が認められた(表1)。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(2塩基反復回数)は、黒毛和種では19, 23, 24の3種類、日本短角種では20, 23, 25, 28の4種類、褐毛和種(熊本系と高知系を合わせる)では21, 22, 23, 24の4種類、見島牛では24, 25の2種類、ホルスタイン・フリージャーン種では19, 21, 22, 24の4種類、ヨーロッパ系牛4品種は19, 21, 22, 23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10, 22の2種類、アメリカン・ブラーマン交雑種では22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た。見島牛の主要アリルであるアリル24は、黒毛和種と褐毛和種では最も頻度が高かった。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のTG反復数18以下のアリルが特徴的に認められた(表1)。

5'UTRマイクロサテライトのアリルの塩基配列を決定し、極めて興味深い結果を得た(表1脚注)。すなわち、本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[5'-(TG)_{n-9}TC(TG)₈₋₃']、TG反復回数の増加は、3'→5'方向であることが判明した。また、mtDNA型が明確に*Bos indicus*タイプをもつフィリピン在来牛(パタンガス牛)由来のアリル10, 19のマイクロサテライトには、この“TC”配列は存在せず、全てTGの反復のみであった。さらに、mtDNA型が明確に*Bos taurus*タイプをもつアメリカン・ブラーマン交雑種由来アリル19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)_nアリルには、*Bos taurus*系牛タイプと*Bos indicus*系牛タイプの2つのタイプが存在し、*Bos taurus*系牛と*Bos indicus*系牛とでは異なる分子進化を遂げてきたことを伺わせる。

本遺伝子5'フランキング領域内のマイクロサテライト((TG)_n)はmRNAに転写されるのか否かを明らかにするため、ウシ視床下部・弓状核の全RNAを用いた5'-rapid amplification of cDNA ends (RACE)による検討を行った。その結果、5'UTRマイクロサテライト((TG)_n)は非スプライシング型mRNA(1b型;*GHS-R1b*)として転写されることが判明した(図1-(B))。なお、スプライシング型mRNA(1a型;*GHS-R1a*)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(*GHS-R1a*)に翻訳される。また、非スプライシング型の*GHS-R1bmRNA*(1b型)は、5回膜貫通型受容体(*GHS-R1b*)に翻訳される。前述したように、この*GHS-R1b*にはグレリン認識機能はない。さらに、5'フランキング領域内転写因子認識部位を検討したところ1a型mRNAの転写開始部位のすぐ上流に、ApoE_B1配列(SCCCACCTC)とAABS_CS2配列(GTGAAGCAA)が存在していた。ApoEタンパク質はvery low density lipoproteinの主要成分であり、リポタンパク質粒子の主要クラス全ての構成成分である。また、AABSモチーフはC/EBPβの結合部位であり、C/EBPβは熱生産に関わる褐色脂肪細胞の特異的マーカー遺伝子uncoupling protein-1(*UCP-1*)の転写調節因子である。これらの配列はヒトやマウスには存在せずウシ特異的であることから、ウシにおけるグレリン受容体遺伝子の発現調節は、ヒトやマウスなどの単胃動

表1 グレリン受容体遺伝子 (*GHSRIa*) の 5'UTR マイクロサテライト ((TG)_n) のアリル頻度

品 種	ア リ ル														χ^2
	10 ^{§†} , 15,16,18	19 [†]	20	21 [†]	22 [†]	23 [†]	24 [†]	25 [†]	26	27	28 [†]	29	31	33	
黒毛和種	—	0.22 [§]	—	0.01	0.09	0.24	0.37	—	—	—	—	0.04	—	0.04	<i>a</i>
日本短角種	—	0.02	0.20	0.01	0.11	0.22	0.06	0.14	0.03	—	0.20	—	0.01	—	<i>b</i>
褐毛和種 [Ⓔ]	—	0.03	0.08	0.18	0.18	0.16	0.23	—	0.13	—	—	—	—	0.02	<i>c</i>
見島牛	—	—	—	0.01	—	0.14	0.35	0.50	—	—	—	—	—	—	<i>d</i>
ホルスタイン・フリージャン種	—	0.29	0.03	0.13	0.16	0.07	0.16	0.02	0.08	—	—	—	—	0.06	<i>ce</i>
ヨーロッパ系牛4品種 [Ⓕ]	—	0.17	0.02	0.25	0.17	0.18	—	0.05	0.10	0.02	0.05	—	—	—	<i>e</i>
フィリピン在来牛	0.23	0.05	—	0.02	0.57	0.07	—	0.02	0.04	—	—	—	—	—	<i>f</i>
アメリカン・ブラーマン交雑種	0.10	—	—	0.10	0.80	0.10	—	—	0.10	—	—	—	—	—	—

[§]TG反復数; [Ⓔ]熊本系+高知系; [Ⓕ]ジャージー種+スイスブラウン種+ヘレホード種+アバディーン・アングス種

[†]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(χ^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アリル頻度

[†]塩基配列を決定したアリル

各アリルの塩基配列 (塩基反復数) (5'→3')

アリル10, TG(10)	フィリピン在来牛
アリル19, TG(10)TC(1)TG(8)	黒毛和種
アリル19, TG(10)TC(1)TG(8)	黒毛和種、ホルスタイン種
アリル19, TG(19)	フィリピン在来牛
アリル21, TG(12)TC(1)TG(8)	アバディーン・アングス種、
アリル22, TG(13)TC(1)TG(8)	褐毛和種、アメリカン・ブラーマン交雑種
アリル23, TG(14)TC(1)TG(8)	黒毛和種
アリル24, TG(15)TC(1)TG(8)	黒毛和種
アリル25, TG(16)TC(1)TG(8)	見島牛
アリル28, TG(19)TC(1)TG(8)	日本短角種、

物とは異なり、リポタンパク質代謝とより密接に関連していることが推察される。

2-3 ウシ・グレリン受容体遺伝子塩基多型の全容とハプロタイプ構築ならびに系統樹解析

2-3-1 目的と方法

遺伝子全体の塩基多型全体を明らかにするため、マイクロサテライトのTG反復数の異なるアリルを持つサンプルを選抜した。すなわちアリル・ホモ型個体15頭(ホモ型アリル:19, 21, 22, 23, 24, 25, 28)およびヘテロ型11頭(10/19, 19/23, 19/29, 19/33, 20/26, 21/23, 21/33, 22/26, 22/28, 23/24, 23/33)の計26頭のゲノムDNAを用いた。品種の内訳は、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・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・アングス種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。本遺伝子の5'フランキンク領域から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、ブロックPCR増幅を行い、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。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)_n)型を比較しながら、本遺伝子全体にわたるハプロタイプを推定し、さらに、HAPLOVIEWver3.31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MEGA4.0を用いて近隣結合法によりハプロタイプの系統樹を推定した(Tamuraら2007)。

2-3-2 結果

13品種26頭シーケ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(図1-(A), 表2)。主要な塩基多型のアリル頻度の品種間差異について以下に概説する。なお、表3ではアリル頻度はまとめて示している。各品種におけるアリル頻度の詳細は文献(Komatsuら2010)を参照されたい(表3)。

nt-7 (C > A) 座位: 黒毛和種、見島牛ではアリルCの頻度が高く、一方、日本短角種やホルスタイン種などヨーロッパ系牛ではアリルAの頻度が高い。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る。

L24V (nt + 70 (C > G)) 座位: アリルGはスイスブラウン種で比較的高頻度で認められ(アリル頻度:

0.67)、熊本系褐毛和種(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、アリル *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、アバディーナー・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。アリル *G* は今までのところ、スイスブラウン種、熊本系褐毛和種や黒毛和種に局限して存在するユニークなアリルである。

DelR242座位:エキソン1領域の塩基多型DelR242は、翻訳開始点から724~726番目の3塩基AGGが欠失する変異で、グレリン受容体の7回膜貫通型受容体の細胞内第3ドメイン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アリル *DelR242* は、日本短角種には高頻度で認められ(アリル頻度:0.43)、褐毛和種(2系統)、ヨーロッパ系品種4品種(アバディーナー・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)、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・ブラ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アリル *DelR242* は見いだされていない。アリル *DelR242* は多くの品種で認められることから、その由来や正常アリル・ホモ型個体とアリル *DelR242* ・ホモ型個体間で何らかの生理的な差異が認められるのか?非常に興味をもたれる。

イントロン1マイクロサテライト((GTTT)_n)座位:*Bos taurus* 系牛や*Bos indicus* 系牛および品種を問わず、アリル (GTTT)₅ が優勢であった(アリル頻度:0.82以上)。アリル (GTTT)₆ はスイスブラウン種で比較的高頻度で認められ(アリル頻度: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、アバディーナー・アンガス種、ヘレフォード種、ジャージー種には本アリ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回少ないアリル (GTTT)₄ がフィリピン在来牛にのみ低頻度で認められた(アリル頻度:0.09)。さらに、“GTTT”反復回数が優勢タイプより3回多いアリル (GTTT)₈ 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。おそらく、アリル (GTTT)₄ →アリル (GTTT)₈ へと“GTTT”の反復回数が増加する方向に進化してきたものと推察できる。

これら塩基多型の組み合わせ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。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、*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3'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が確認できた(図1-(A))。このハプロタイプブロック中の塩基の多様性を検討したところ、*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2)。さらに、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と推察できた(グループ1、Hap01~Hap10; グループ2、Hap21~Hap26)(図2)。*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。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。アリル *DelR242* を含むハプロタイプは図2ではHap09とHap10のグループ1にのみ存在する結果であるが、アリル *DelR242* はフィリピン在来牛やヨーロッパ系牛多くの品種で認められる。したがって、アリル *DelR242* を含むハプロタイプは通常型アリル“AGG”とともに、その祖先型ハプロタイプ(Hap43)とともに並行して存在していたと考えるべきだろう。

ここで想像を逞しくしてみよう。マウス・ラットのグレリン受容体はDelR242型である。ウシでのアリル *DelR242* は新しい突然変異型などではなく、むしろ逆に4個アルギニントイプを生み出した極めて古いタイプのアリルなのかもしれない。アリル *DelR242* が種の進化の過程で消失することなく、ウシ集団に幅広く存在するとすれば何か理由があるはずである。「動物種は常に飢餓の危機にさらされ続けている」と考えるなら、グレリン受容体・DelR242型遺伝子は飢餓にあって有利にはたらく遺伝子なのかもしれない。

表2 グレリン受容体遺伝子 (*GHS-R1a*) の塩基多型の全容

部位	多型種類	塩基多型の数			
		インド系牛のみ	ヨーロッパ系牛とインド系牛	ヨーロッパ系牛のみ	小計
5'フランキンゲン領域 + 5'UTR	SNP	9	2	5	16
	1塩基挿入/欠失 ¹	0	0	1	1
エキソン 1	SNP ²	0	0	4	4
	3塩基挿入/欠失 ³	0	0	1	1
イントロン 1	SNP	10	7	6	23
	1塩基挿入/欠失 ⁴	0	1	0	1
	3塩基挿入/欠失 ⁵	1	0	0	1
エキソン 2	SNP	1	0	0	1
3'UTR	SNP	2	1	0	3
合計		23	11	17	51
5'UTR	マイクロサテライト (TG) _n	(5) (10-18)	(8) (19-26)	(3) (27-33)	(17) ⁶ (10-33) ⁷
イントロン 1	マイクロサテライト (GTTT) _n	(1) (4)	(2) (5, 6)	(1) (8)	(4) ⁶ (4,5,6,8) ⁸

¹ nt-1117(A>—), ² L24V(nt70(C>G), nt456(G>A), D191N(nt580(G>A), nt667(C>T), ³ DelR242(nt724-726(AGG>—)), ⁴ nt2323(T>—), ⁵ nt1449-1451(TTT>—), ⁶ アリル数, ⁷ (TG)反復数, ⁸ (GTTT)反復数.

図1 ウシ・グレリン受容体遺伝子の塩基多型の全容と転写産物
○：ヨーロッパ系牛にだけみられる塩基多型；
□：インド系牛にだけみられる塩基多型；
●：両系統牛にみられる塩基多型

図2 ウシ・グレリン受容体遺伝子ハプロタイプの系統樹
数値は bootstrap 値

表3 和牛、ヨーロッパ系牛およびフィリピン在来牛における nt-7 (C>A), L24V, DelR242 とマイクロサテライト ((GTTT)_n) 座位の各アリル頻度

品種	頭数	nt-7(C>A)		L24V (nt+70(C>G))		DelR242 (3-bp deletion)		マイクロサテライト ((GTTT) _n)			
		A	C	C	G	AGG	DelR242	(GTTT) ₄	(GTTT) ₅	(GTTT) ₆	(GTTT) ₇
黒毛和種	93	0.34	0.66	0.995	0.005	1.00	—	—	0.93	0.07	—
日本短角種	77	0.71	0.29	1.00	—	0.57	0.43	—	1.00	—	—
褐毛和種 ⁶⁾	31	0.47	0.53	0.93	0.07	0.79	0.21	—	0.82	0.18	—
見島牛	58	0.04	0.96	1.00	—	1.00	—	—	0.99	—	0.01
ホルスタイン種	34	0.88	0.12	1.00	—	0.91	0.09	—	0.93	0.07	—
ヨーロッパ系牛4品種 ¹⁾	30	0.78	0.22	0.87	0.13	0.77	0.23	—	0.83	0.13	0.03
フィリピン在来牛	28	0.55	0.45	1.00	—	0.98	0.02	0.09	0.86	0.055	—

⁶⁾ 熊本系 + 高知系; ¹⁾ ジャージー種 + スイスブラウン種 + ヘレホード種 + アパディーニ-アンガス種

2-4 黒毛和種におけるグレリン受容体遺伝子の変異と枝肉重量との関連性

2-4-1 目的と方法

グレリン受容体遺伝子の塩基変異が黒毛和種の産肉形質に影響を与えるか否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、本遺伝子内のハプロタイプブロックを参考にし、① 5'UTR に存在するマイクロサテライト ((TG)_n)、② nt-7 (C>A)、③ イントロン 1 に存在するマイクロサテライト ((GTTT)_n) を解析した。統計解析を行った産肉形質は、と殺時体重 (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_1 , X_2 , Z: 関連マトリックス

2-4-2 結果

グレリン受容体遺伝子の塩基多型の中で、マイナーアレル頻度が0.10以上で統計解析が行えるのは、5'UTR マイクロサテライト ((TG)_n) と nt-7 (C > A) の2座位であった。5'UTR マイクロサテライト ((TG)_n) と nt-7 (C > A) の2座位における塩基多型と枝肉重量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)_n) と nt-7 (C > A) 座位に共に統計的にきわめて高い有意差を認め、5'UTR マイクロサテライト ((TG)_n) 座位での有意水準が高かった (各 $P < 0.0007$, $P < 0.002$)。なお、他に有意差を認めた産肉形質は、と殺時体重 (WS)、平均1日増体重 (ADG) 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 ((TG)_n) のアレルの中で、アレル [19-TG] が増体形質に最も大きな好ましい相加的効果を持つと推定された。後代検定の飼養条件下で、アレル [19-TG] は枝肉重量を約 6.5kg 増加させる相加的効果をもつ。また、nt-7 (C > A) 座位では、アレル A が同様に枝肉重量 (CW) 等増体形質に増加の相加的効果を認めた (表4; Komatsu 2011)。

さらに、2座位間のアレルの組み合わせであるハプロタイプを検討し、11種類のハプロタイプを推定した。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)_n) と nt-7 (C > A) のアレルの組み合わせ)、[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種類を認めた。ハプロタイプで統計解析をしてみると、[19-TG] - [A] タイプが最も枝肉重量に大きな効果 (平均値から約 15kg 増加) をもつことがわかった ($P < 1.0E-5$)。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 (平均値から約 12kg 減少) となった (表4)。これらの結果から、5'UTR マイクロサテライト座位のアレル [19-TG] は、黒毛和種集団ではその頻度が0.15程度とまだ低く、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。

以上、グレリン受容体遺伝子 5'UTR マイクロサテライト ((TG)_n) 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) 等産肉形質に有意な影響を及ぼし、特に5'UTR マイクロサテライト ((TG)_n) 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)_n) 座位の

表4 *GHSRIa* 5'UTR マイクロサテライト、nt-7 (C>A) 遺伝子型およびハプロタイプ型と産肉形質との関連性

遺伝子型/ハプロタイプ型 およびアレル/ハプロタイプ頻度	頭数	と殺時 体重 (kg)	枝肉重量 (kg)	ADG (kg)
(1) 5'UTR マイクロサテライト座位				
19-TG / 19-TG	24	614 ^d	366 ^d	0.96 ^b
19-TG / non-19-TG [†]	323	605 ^a	361 ^a	0.94 ^a
non-19-TG / non-19-TG	935	589 ^c	349 ^c	0.90 ^c
アレル頻度: 19-TG : 0.15 non-19-TG : 0.85	α [‡] SE	10.7 3.2	6.5 2.0	0.022 0.006
(a,c: $P < 0.0001$; b,c: $P < 0.05$; c,d: $P < 0.10$)				
P 値		<0.0004	<0.0007	<0.0002
(2) nt-7(C>A)座位				
AA	174	599 ^a	355 ^a	0.92 ^d
AC	609	598 ^{ac}	355 ^{ac}	0.91 ^{df}
CC	502	586 ^b	348 ^b	0.90 ^e
アレル頻度: A : 0.37 C : 0.63	P 値	<0.001	<0.002	<0.02
(a,c: $P < 0.05$; b,c: $P < 0.005$; d,e: $P < 0.10$; e,f: $P < 0.10$)				
(3) ハプロタイプ型				
		(平均値からの差異)		
19-TG-A / 19-TG-A	24	+21	+15	+0.05
19-TG-A / non19-TG-A	96	+16	+9	+0.03
19-TG-A / non19-TG-C	228	+11	+8	+0.03
non19-TG-A / non19-TG-A	54	-18	-12	-0.03
non19-TG-A / non19-TG-C	381	+1	0	0.00
non19-TG-C / non19-TG-C	502	-7	-4	-0.01
全平均値 (SD)	1285 ^e	593 (57)	352 (37)	0.91 (0.11)
ハプロタイプ頻度:	P 値	<1.0E-5	<1.0E-5	<5.0E-5
[19-TG]-A :0.145; [19-TG]-C: -; [non-19-TG]-A: 0.227; [non-19-TG]-C: 0.628				

[†] non-TG-19: 15-TG, 21-TG, 22-TG, 23-TG, 24-TG, 26-TG, 29-TG, 33-TG

[‡] α : 19-TG と non-19-TG アレルの産肉形質に及ぼす相加的アレル置換効果 (α)

アリル [19-TG] 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、アリル [19-TG] 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。このアリルの相加的効果は、概ね体重を約 2% 程度上昇させる効果である。

2-5 5'UTR マイクロサテライト ((TG)_n) と nt-7 (C > A) 座位と枝肉重量との関連性を説明する “translational hypothesis”

2-5-1 目的と方法

グレリン受容体遺伝子の 5'UTR マイクロサテライト ((TG)_n) と nt-7 (C > A) の両座位は、増体・枝肉重量形質に関わる QTN 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)_n) 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。我々は、黒毛和種等 *Bos taurus* 系牛のグレリン受容体遺伝子の 5' フランキンギ領域から 3'UTR まで観察される 30 種類の塩基多型（一塩基多型、挿入/欠失、マイクロサテライト）の中から考察によって塩基多型を選抜して統計解析を行い、5'UTR マイクロサテライト ((TG)_n) と nt-7 (C > A) の両座位が増体・枝肉形質に関わる QTN 候補領域であるとの結論に達した。塩基変異から形質発現までの基本的考え方は以下である。すなわち、これら QTN 領域の塩基変異が弓状核や下垂体での機能的グレリン受容体分子 (GHS-R1a) の発現量に差異をもたらす。この GHS-R1a 分子の発現量の差異により、視床下部での摂食量増強シグナルや下垂体での成長ホルモン放出シグナル伝達強度に差異が生じ、摂食量と血中成長ホルモン濃度に差異をもたらす、最終的に増体・枝肉重量に遺伝的差異がでてくる。この摂食量や増体・枝肉重量に遺伝的差異を引き起こす QTN が、5'UTR マイクロサテライト ((TG)_n) と nt-7 (C > A) の両座位と考え、以下の 3 つの仮説、“Transcriptional hypothesis”、“Splicing hypothesis”、及び “Translational hypothesis” について検討を行った。

(1) “Transcriptional hypothesis”

初めに、両座位の変異は *GHS-R1a* 遺伝子からの mRNA 転写量に差異を引き起こすと考え “transcriptional hypothesis” を検討した。既に図 1 で示したように *GHS-R1a* 遺伝子からは *1a* 型と *1b* 型の 2 種類の mRNA が転写される (Komatsu ら 2010)。*1a* 型の mRNA は、約 1,000 塩基長の 5'UTR のうち、5' 末端か

ら約 600 塩基下流にある 5'UTR マイクロサテライト ((TG)_n) 部位前後を含む 256 塩基がプライスアウト、さらにイントロン 1 がプライスアウトする mRNA である。一方、*1b* 型の mRNA は、これらの部位をプライスアウトしない非スプライシング型 mRNA である。これらの mRNA からは、それぞれ① 7 回膜貫通型 G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であるグレリンを認識できる機能的受容体 (GHS-R1a)、② 5 回膜貫通型でグレリンを認識できないが GHS-R1a とヘテロダイマーを形成して GHS-R1a の細胞表面での発現量を調節する dominant negative 型の受容体 (GHS-R1b) が翻訳される。両座位の変異が、*GHS-R1a* 遺伝子からの *1a* 型の mRNA 転写量に変異を引き起こすとするなら、同時に *1b* 型の mRNA 転写量にも変異を引き起こし、これら 2 種類の mRNA 発現量間には正の相関があると考えのが妥当である。とするなら、上述した GHS-R1b 受容体の機能を考えると、両座位の変異が、GHS-R1a 分子の発現量に直接差異をもたらすとは考えにくい。

(2) “Splicing hypothesis”

次に、両座位の変異が、*GHS-R1a* 遺伝子から転写された pre-mRNA がスプライシングし、*1a* 型の mRNA の転写量に影響を与える “Splicing hypothesis” を検討した。

まず、選択的スプライシングについて検討した。イントロンに存在するマイクロサテライト ((TG)_n) が、pre-mRNA の隣接エキソンの選択的スプライシングに影響を与えることがヒト遺伝子疾患の症例で報告されている (総説: Faustino と Cooper 2003)。そのイントロン部位内のマイクロサテライトの pre-mRNA での位置は、スプライシングに関与するリボ核タンパク質複合体であるスプライソソームの U2 が認識する分岐点配列 (コンセンサス配列: YNCRAY, A が分岐点) から下流の 3' 末端 AG までの間に存在する (通常 20 ~ 50 塩基)。例えば、ヒト常染色体性劣性遺伝病である嚢胞性線維症 (Cystic fibrosis) のある症例では、塩素チャネルである CFTR (cystic fibrosis trans-membrane conductance regulator) 遺伝子の pre-mRNA のエキソン 9 の skipping が、隣接するイントロン 8 の 3' 末端にあるマイクロサテライト ((TG)_n) の TG 反復数 (n = 9 ~ 13) により影響を受け、TG 反復数が多いと (n = 11 以上) エキソン 9 の skipping の割合が高くなる。すなわち、エキソン 9 が欠失した transcript の比率が、通常スプライシング型 transcript のそれより高まることが報告されている (Cuppens ら 1998)。イントロン内マ

イクロサテライト ((TG)_n) が選択的スプライシングとその比率に影響を与える現象は、全て pre-mRNA がスプライシングされて生じる複数の選択的スプライシングバリエーション間に限られる。また、マイクロサテライト ((TG)_n) により skipping など特異的な選択的スプライシングの影響を受けるエキソンは、マイクロサテライトが存在するイントロンの 5' 側または 3' 側に隣接する 1 個のエキソンで、かつ、5'UTR 以外のエキソンに限られる。

一方、我々が注目するウシ *GHS-R1a* 遺伝子は 2 個のエキソンからなり、スプライシング型 transcript は 1 種類しかなく (1a 型)、選択的スプライシングバリエーションは存在しない。また、5'UTR マイクロサテライト ((TG)_n) の 3' 末端の位置は、分岐点 A から 5' 側上流へ 46 塩基離れている。さらに、同 5' 末端の位置はイントロンの 5' 末端 (GT) から下流へ 113 塩基離れている。このように 5'UTR マイクロサテライト ((TG)_n) の位置を考えると、本マイクロサテライト ((TG)_n) とその TG 反復数がスプライシングに影響を与えるとは考えにくい。また、5'UTR マイクロサテライトが、5'UTR イントロンとイントロン 1 の両方のスプライスアウトに影響を与えるとは更に考えにくい。

以上、スプライシングのメカニズムを考えると、5'UTR マイクロサテライト ((TG)_n) がグレリン受容体の発現に影響を与える仮説として “Splicing hypothesis” は考えにくい。

(3) “Translational hypothesis”

次に、両座位の変異は、*GHS-R1a* 遺伝子からの各 mRNA 転写量は同じでも、各 mRNA からの翻訳量に差異を引き起こすと考える “translational hypothesis” を検討した。なお、mRNA からの翻訳効率、最近のヒト PPAR γ mRNA の 7 種類の選択的スプライシングバリエーションの翻訳効率の比較研究を参考にした (McClelland ら 2009) (5'UTR に存在する 5 個のエキソンの選択的スプライシングに起因するバリエーションの研究。3'UTR 側にはエキソン 1～6 まで存在し、どの選択的スプライシングバリエーションの mRNA にも全て転写される)。すなわち、① mRNA の 2 次構造の安定性が低いほど (自由エネルギー (ΔG) の値が小さいほど)、② 翻訳開始点付近のコンセンサス Kozac 配列 (例: ACCAUGC) 中の塩基対形成数が少ないほど、③ 5'UTR 中の翻訳開始コドン (AUG) の数が少ないほど、④ 5'UTR の長さが短いほど、翻訳効率は高い。したがって、我々の “translational hypothesis” の検討に際は、

各ハプロタイプの mRNA の 2 次構造がもつ自由エネルギー (ΔG) が最小となるように折り畳み最適 mRNA 2 次構造を推定し、その構造と翻訳量に影響を与える Kozac 配列 (AGCAUGU; AUG は翻訳開始コドン) 部位における塩基対形成数を求めた。最適 mRNA 2 次構造の推定には、ウィーン大学グループが開発した RNA fold web server である “Vienna RNA secondary structure server” (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>; RNA fold web server) を用いた (Hofacker 2003)。最適 mRNA 2 次構造を推定したハプロタイプは、ハプロタイプ頻度が 0.04 以上の 6 ハプロタイプである (① [19-TG] - [A], Hap07; ② [22-TG] - [A], Hap02; ③ [29-TG] - [A], Hap08; ④ [23-TG] - [C], Hap03; ⑤ [24-TG] - [C], Hap04; ⑥ [33-TG] - [C], Hap25)。また、*GHS-R1a* mRNA の全体構造として、5'RACE 解析から、5'UTR は最も転写頻度の高い 1-2 型とし、3'UTR は A, B, C の三つのタイプのうち最長の A タイプの 3'UTR をもつとした (表 5)。また、poly (A) 付加シグナル (AAUAAA) と一般的なポリ A 長を 250 個とした。nt-7 (C > A) 座位のタイプは、A タイプ: Hap02, 07, Hap08; C タイプ: Hap03, Hap04, Hap25 であった。*GHS-R1b* mRNA の全体構造は、5'UTR は最長の主要タイプである 2-1 型とし、3'UTR は三つのタイプのうち最も転写頻度が高く、かつ最短長の C 型とした。これらの全体構造を選んだ理由は、① *GHS-R1a* mRNA は機能をもつグレリン受容体をコードする mRNA として最も安定した翻訳ができると期待できる。② *GHS-R1b* mRNA はスプライシングが起これなくてもよいので 5'UTR 部分および全体の mRNA は長くなり、翻訳効率は *GHS-R1a* mRNA より低くなると予想できる。③ *GHS-R1b* mRNA からの速やかな翻訳による速やかな *GHS-R1b* 分子の合成が行われるためには、転写頻度が高いことが *GHS-R1b* mRNA 翻訳には必要と考えたからである。なお、解析の Fold algorithms は、 “minimum free energy (ΔG) and partition function” とし、オプションは “no GU pairs at the end of helices and no isolated base pairs” とした。

図3 *Ib* 型 mRNA および *Ia* 型 mRNA の 2 次構造と翻訳開始付近の配列およびタイプ
(A) *Ia* 型 mRNA 全体の 2 次構造と翻訳開始点付近の配列
* 黒太字矢印は mRNA の 5' 末端；波線矢印は Kozak 配列
(B) *Ib* 型 mRNA の 5'UTR マイクロサテライト領域の 2 次構造とタイプ
* 波線矢印はマイクロサテライト部分
(C) *Ib* 型 mRNA 全体の 2 次構造と翻訳開始点付近の配列とタイプ
* 黒太字矢印は mRNA の 5' 末端；波線矢印は Kozak 配列

2-5-2 結果

推定した最適 mRNA の 2 次構造を図 3 - (A, B, C) に示した。*GHS-R1a* 折り畳み最適 mRNA 2 次構造は、全体構造および翻訳開始点付近の構造ともに、A タイプ (Hap02, 07, Hap08), C タイプ (Hap03, Hap04, Hap25) で非常に類似していた (図 3 - (A))。また、Kozak 配列中、塩基対結合数は、タイプおよびハプロタイプによらず “2” で同じであった (図 3 - (A)；波線矢印の CA)。また、これら 2 次構造の自由エネルギー (ΔG) もタイプおよびハプロタイプによらずほぼ同じ値であった (表 5)。なお、この mRNA 全体構

造は Foot-like のため “F タイプ” と名付けた。したがって、各ハプロタイプ間に *GHS-R1a* mRNA の翻訳効率に差異はないと推定できた。一方、*GHS-R1b* 最適 mRNA 2 次構造は、全体構造はハプロタイプによらず類似しており、これら 2 次構造の自由エネルギー (ΔG) もタイプとハプロタイプによらずほぼ同じ値であった (表 5)。しかし、マイクロサテライト配列部位で、[19-TG] 型と [non-19-TG] 型間で mRNA 2 次構造に差異が認められた (図 3 - (B))。すなわち、[19-TG] 型ではストレートタイプ (Straight；S タイプと命名) であり、[non-19-TG] 型では、曲がり節様タイプ (Bending knot；B タイプと命名) であった。S タイプの mRNA 2 次構造は、曲がり節様構造の B タイプの mRNA のそれより柔軟性に乏しく、翻訳関わる因子群の相互作用が劣る “翻訳過程において negative dominant 効果” をもつと推定した。したがって、*GHS-R1b* mRNA の翻訳効率は、[non-19-TG] 型 > [19-TG] 型と推定した (表 6)。また、nt-7 (C > A) A タイプと C タイプ間でも翻訳開始点付近の構造が異なり、Kozak 配列中水素結合塩基数は、A タイプでは “5”、C タイプでは “2” となり差異が認められた (図 3 - (C))。したがって、*GHS-R1b* mRNA の翻訳効率は、C タイプ > A タイプと推定した (表 6)。なお、翻訳開始点付近の構造は、A タイプでは V 形状様 (V configuration-like；V タイプと命名)、C タイプではトライアングル様 (Triangle-like；T タイプと命名) であった。また、ハプロタイプ B-V 型は、翻訳装置において [non-19-TG] 部分と [nt-7 (C > A)] の部分とが効率的に相互作用をし、相対翻訳効率が他の三つのタイプより高くなると推定した。これら推定した *GHS-R1b* mRNA の翻訳効率を各ハプロタイプでまとめれば、翻訳効率の高いものから、[non-19-TG] - A > [non-19-TG] - C > [19-TG] - C > [19-TG] - A と推定できる (表 6)。*GHS-R1b* の機能は、*GHS-R1a* とヘテロダイマーを形成して *GHS-R1a* の細胞表面での発現量を調節する dominant negative 効果である。したがって、グレリン認識機能を持つ *GHS-R1a* 分子の発現量は、*GHS-R1b* mRNA の翻訳効率の逆順、すなわち、[19-TG] - A > [19-TG] - C > [non-19-TG] - C > [non-19-TG] - A と推定できる。これらの順位と統計解析から推定したハプロタイプの体重、枝肉重量、ADG 等産肉形質に及ぼす効果の順位は一致した (表 4)。以上の結果から、我々は、5'UTR マイクロサテライト ((TG)_n) と nt-7 (C > A) 座位のハプロタイプと枝肉重量との関連性を説明する仮説として、“translational hypothesis” を提案した (Komatsu ら 2011)。

上述したように、我々は、この 5'UTR マイクロサテライト ((TG)_n) と nt-7 (C > A) 座位が、産肉形質の QTN そのものであると考えている。この仮説は今後、in vitro の系で分子生物学的に検証する必要があるが、検証する in vitro 実験系の構築には細心の注意を払う必要がある。GHS-R1a と GHS-R1b を区別するモノクローナル抗体の準備は必須となろう。GHS-R1a 型と GHS-R1b 型の mRNA に対応する配列をタンデムに配列し、かつ同じ効率で転写される発現ベクターの構築での発現実験など GHS-R1b の dominant negative 効果を余さずに再現できる実験系が必要である。

2-6 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

2-6-1 目的と方法

著者らが開発したプログラム (BeefIncome) (小松ら 2009) 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。推定方法を簡単に述べると、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 ((TG)_n) 座位のアリル [19-TG] 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

表5 GHS-R 1a と GHS-R1b mRNA のハプロタイプごとの 2 次構造の特徴と Kozak 配列中の水素結合塩基数

mRNA の スプライ シングの 有無	mRNA 型 [§]	ハプロタイプ 番号	mRNA の 5'UTR 型	mRNA の 3'UTR 型	poly(A) ⁺ 付加シグ ナル数	5'UTR 中の 翻訳開始 コドン (AUG) 数	mRNA の 長さ (塩基)	5'UTR の 長さ (塩基)	5'UTR の 2 次構造の タイプ	2 次構造中 Kozak 配列 中の水素 結合塩基 数 [‡]	最小 自由 エネルギー (ΔG) (kcal / mol)
1a (スプライ シング型)	A	Hap02, 07, 08	1-2 型 (高転写 型)	A 型 (最長 3'UTR)	1	5	2,585	742	F	2	-861
	C	Hap03, 04, 25			1	5	2,585	742	F	2	-867
1b (非スプラ イシング 型)	[19-TG] - A [⊗]	Hap07			0	2	4,269	755	S - V	5	-1,261
	[22-TG] - A	Hap02			0	2	4,269	761	B - V	5	-1,262
	[29-TG] - A	Hap08			0	2	4,289	775	B - V	5	-1,259
	[23-TG] - C	Hap03	2-1 型 (最長型)	C 型 (最短長/ 高転写 頻度)	0	2	4,277	763	B - T	2	-1,271
	[24-TG] - C	Hap04			0	2	4,279	765	B - T	2	-1,267
	[33-TG] - C	Hap25			0	2	4,300	783	B - T	2	-1,271

[§] 1a : nt-7(C>A) のタイプ; 1b : [5'UTR マイクロサテライト] - [nt-7(C>A)] ハプロタイプ

^{||}The 3'UTR poly(A)⁺ 付加シグナル, AATAAA; poly(A)⁺ の長さ, 250 塩基。

[‡]Kozak 配列のコンセンサス配列 "ACCAUGG" (AUG : 翻訳開始コドン)。ウシの Kozak 配列相当部分の配列 "AGCAUGT"。

[⊗]太字は主要ハプロタイプ

表6 GHSR1a と GHSR1b mRNA の 2 次構造に基づく [5'UTR マイクロサテライト] - [nt-7 (C>A)] ハプロタイプと機能的グレリン受容体レベルの関連性を説明する "translational hypothesis"

5'UTR マイクロサテライト と nt-7(C>A) のタイプ	1a mRNA の 2 次構造型	1a mRNA の 翻訳効率	1a 受容体 のタンパク質 レベル (発現量)	1b mRNA の 2 次構造型	1b mRNA の 翻訳効率	1b 受容体 のタンパク質 レベル (発現量)	機能的グレ リン受容体 レベル [‡]
(1) 5'UTR マイクロサテライト							
19-TG	F	(+++++)	(+++++)	S	(+)	(+)	————
non-19-TG	F	(+++++)	(+++++)	B	(+++)	(+++)	————
(2) nt-7(C>A)							
C	F	(+++++)	(+++++)	T	(+++)	(+++)	————
A	F	(+++++)	(+++++)	V	(++)	(++)	————
(3) 1b mRNA のハプロタイプ							
[19-TG] - C	F	+++++	+++++	S - T	++	++	+++
[19-TG] - A	F	+++++	+++++	S - V	+	+	++++
[non-19-TG] - C	F	+++++	+++++	B - T	+++	+++	++
[non-19-TG] - A [⊗]	F	+++++	+++++	B - V	++++	++++	+

^{||}+ 相対的翻訳効率; 効率レベル: +++++ > ++++ > +++ > ++ > +; () : 各座位のみが異なる場合の推定翻訳効率

[‡]機能的グレリン受容体レベル = [1a タンパク質レベル] - [1b タンパク質レベル]。

[⊗]翻訳装置において [non-19-TG] 部分と nt-7(C>A) 部分 (B-V 型) とは相互作用をし、相対翻訳効率が他の 3 タイプより高くなると推定。

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アリル [19-TG] がホモ型の種雄牛精液に変更する際の費用)と想定した。コントロール集団として、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・ワインバー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。

2-6-2 結果

シミュレートの結果、アリル [19-TG] の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アリル [19-TG]・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料金が 5 千円であっても、利用 3 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。この結果から、グレリン受容体遺伝子 5'UTR マイクロサテライト ((TG)_n) 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た。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 5'UTR マイクロサテライトと nt-7 (C > A) 遺伝子型情報を解析し、[19-TG] - [A] ハプロタイプ・ホモ型あるいはヘテロ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よう。今後の他の遺伝子マーカーと合わせて農家レベルでの経営へのグレリン受容体遺伝子型の利用が待たれる。

2-7 ウシに 5'UTR マイクロサテライト ((TG)_n) が存在する理由と優良アリル ([19-TG]) の由来

5'UTR マイクロサテライト ((TG)_n) 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。ウシ、ヒトおよびマウスともに 5'UTR には mRNA が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)_n) 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。その結果、ヒトやマウスでは 5'UTR マイクロサテライト ((TG)_n) 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。マウスでは 5'UTR マイクロサテライト ((TG)_n) 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)_n) 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)_n) 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著者らは考えている。

黒毛和種における 5'UTR マイクロサテライト ((TG)_n) 座位の優良なアリル、アリル [19-TG] の由来はどこから由来したのだろうか? アリル [19-TG] は和牛のルーツ見島牛には本アリルは認められず、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しか認められず、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・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、アリル [19-TG] 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。

3. まとめ

グレリン受容体は主に視床下部・弓状核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

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)_n) 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アリル *DelR242* の頻度は 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、黒毛和種等と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)_n)、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)_n) 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)_n) は、*Bos taurus* 系牛内で、2 つのハプロタイプ系統を区別できる 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)_n) と nt-7 (C > A) 座位が有意に増体形質と関連することが判明した。また、両座位のうち、5'UTR マイクロサテライト ((TG)_n) 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、と殺時体重 (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)_n) 座位のアリルの中で、アリル [19-TG] (TG 反復 19 回) が枝肉重量を増加させる好ましい相対的効果を持つ。我々は、5'UTR マイクロサテライト ((TG)_n) と nt-7 (C > A) 座位のハプロタイプと枝肉重量との関連性を説明する仮説として、“translational hypothesis”を提案する。さらに、この 5'UTR マイクロサテライト ((TG)_n) と一塩基多型 nt-7 (C > A) 座位が QTN そのものであると考える。

黒毛和種集団における 5'UTR マイクロサテライト ((TG)_n) 座位のアリル [19-TG] の頻度は 0.15 ~ 0.20 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。黒毛和種繁殖肥育一貫経営農家がアリル [19-TG]・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 3 年目から 1 頭あたり 1 万円の収益上昇を期待できる。

謝辞

本研究は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所交付金研究 (課題番号: 212-j-01-001) および独立行政法人農業生物資源研究所・農業生物資源ジーンバンク事業 (動物遺伝資源部門) 委託研究 (A. 新規特性) (平成 19 年度 ~ 21 年度) により行われた。また、畜産草地研究所と (1) (社) 家畜改良事業団・家畜改良技術研究所、(2) 茨城県畜産センター・肉用牛研究所、(3) 岩手県農業研究センター・畜産研究所の各研究機関との交流共同研究として行われた。他に多くの関係者の協力のもとで行われた。ここに厚く感謝申し上げる。

引用文献

- 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. 2005. Genetic linkage and association of the growth hormone secretagogue receptor (ghrelin receptor) gene in human obesity. *Diabetes*, 54: 259-267.
- Bowers CY, Momany F, Reynolds GA, Chang D, Hong A, Chang K. 1980. Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically release growth hormone in vitro. *Endocrinology*, 106: 663-667.
- Colinet FB, Vanderick S, Charlotiaux B, Eggan A, Gengler N, Renaville B, Brasseur R, Portetelle D, Renaville R. 2009. Genetic location of the bovine growth hormone secretagogue receptor (GHS-R) gene and investigation of genetic polymorphism. *Animal Biotechnology*, 20: 28-33.
- Cruz CR, Smith RG. The growth hormone secretagogue receptor. 2008. *Vitamins and Hormones*, 77: 47-88.
- Cuppens H, Lin W, Jaspers M, Costes B, Teng H, Vankeerberghen A, Jorissen M, Droogmans G, Reynaert I, Goossens M, Nilius B, Cassiman J-J. 1998.

- Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes: the polymorphic (TG) m locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation. *Journal of Clinical Investigation*, 101: 487-496.
- Faustino NA, Cooper TA. 2003. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes and Development*, 17: 419-437.
- Hofacker IL. 2003. Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Reserch*, 31: 3427-3431.
- Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Parese PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, Van der Ploeg LH. 1996. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*, 273: 974-977.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402:656-660.
- Kojima M, Kangawa K. 2005. Ghrelin: Structure and function. *Physiological Review*, 85:495-522.
- 小松正憲、西尾元秀、佐藤正寛、千田雅之、広岡博之. 2009. 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.
- 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. 2010. Nucleotide polymorphisms and the 5'-UTR transcriptional analysis of the bovine growth hormone secretagogue receptor 1a (GHS-R1a) gene. *Animal Science Journal*, 81: 530-550.
- Komatsu M, Itoh T, Fujimori Y, Satoh M, Myazaki Y, Takahashi H, Shimizu K, Malau-Aduli AEO, Morita M. 2011. Genetic association of GHS-R1a 5'UTR-microsatellite and nt-7 (C>A) loci on growth and carcass traits in Japanese Black cattle. *Animal Science Journal*, 82: 396-405.
- Leshin LS, Barb CR, Kiser TE, Rampacek GR, Kraeling RR. 1994. Growth hormone-releasing hormone and somatostatin neurons within the porcine and bovine hypothalamus. *Neuroendocrinology*, 59: 251-264.
- Leung P-K, Chow KBS, Lau P-N, Chu K-M, Chan C-B, Cheng CHK, Wise H. 2007. The truncated ghrelin receptor polypeptide GHS-R1b acts as a dominant-negative mutant of the ghrelin receptor. *Cellular Signalling*, 19: 1011-1022.
- Lin-Su K, Wajnrajch MP. 2002. Growth hormone releasing hormone (GHRH) and the GHRH receptor. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 3: 313-323.
- Malau-Aduli AEO, Niibayashi T, Kojima T, Oshima K, Mizoguchi Y, Komatsu M. 2005a. 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.
- Malau-Aduli AEO, Niibayashi T, Kojima T, Oshima K, Mizoguchi Y, Komatsu M. 2005b. Mapping the quantitative trait loci (QTL) for body shape and conformation measurements on BTA1 in Japanese Black cattle. *Animal Science Journal*, 76: 19-27.
- Mano-Otagiri A, Nemoto T, Sekino A, Yamauchi N, Shuto Y, Sugihara H, Oikawa S, Shibasaki T. 2006. Growth hormone-releasing hormone (GHRH) neurons in the arcuate nucleus (Arc) of the hypothalamus are decreased in rats whose expression of ghrelin receptor is attenuated: Evidence that ghrelin receptor is involved in the up-regulation of GHRH expression in the Arc. *Endocrinology*, 147: 4093-4103.
- McClelland S, Shrivastava R, Medh JD. 2009. Regulation of translational efficiency by disparate 5'-UTRs of PPAR γ splice variants, PPAR Research Article ID 193413, p.8. (doi:10.1155/2009/193413)
- Nonogai K. 2008. Ghrelin and feedback systems. *Vitamins and Hormones*, 77: 149-170.
- Shuto Y, Shibasaki T, Otagiri A, Kuriyama H, Ohata H, Tamura H, Kamegai J, Sugihara H, Oikawa S, Wakabayashi I. 2002. Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity *Journal of Clinical Investigation*, 109: 1429-1436.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, MEGA Software Version 4.0 *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.
- 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. 2004. 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.

Zhang B, Chen H, Guo Y, Zhang L, Zhao M, Lan X, Zhang C, Pan C, Hu S, Wang J, Lei C. 2009. Associations of polymorphism within the GHS-R gene with growth traits in Nanyang cattle. *Molecular Biological Reports*, 36 : 2259-2263.