〔原著論文〕

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

斯琴図雅¹、西牧 孝洋¹、揖斐 隆之²、辻 岳人²、米田 一裕³、大島 一郎⁴、
片平 清美⁴、万年 英之⁵、下桐 猛⁴、印牧 美佐生⁶、国枝 哲夫²

¹ 岡山大学大学院自然科学研究科 〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中 1-1-1

² 岡山大学大学院環境生命科学研究科 〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中 1-1-1

³ 米田遺伝子型研究所 〒569-1017 大阪府高槻市成合北の町 774-2

⁴ 鹿児島大学農学部 〒890-0065 鹿児島県鹿児島市郡元 1-21-24

⁵ 神戸大学大学院農学研究科 〒657-0013 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1-1

⁶ 一般財団法人家畜学研究所 〒441-2433 愛知県北設楽郡設楽町川向字タラノ木 1

Allelic distributions of genes involved in economical traits, hereditary disorder, and coat color in a population of Kuchinoshima cattle

SIQINTUYA¹, Takahiro NISHIMAKI¹, Takayuki IBI², Takehito, TSUJI², Kazuhiro YONEDA³,
Ichiro OSHIMA⁴, Kiyomi KATAHIRA⁴, Hideyuki MANNEN⁵, Takeshi SHIMOGIRI⁴,
Misao KANEMAKI⁶, Tetsuo KUNIEDA²

¹ Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Tsushima-naka, Kita-ku, Okayama 700-8530, Japan

² Graduate School of Environmental and Life Science, Okayama University, Tsushima-naka, Kita-ku, Okayama 700-8530, Japan

³ Yoneda Genotyping Laboratory, Takatsuki, Osaka, 569-1017, Japan

⁴ Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Korimoto, Kagoshima 890-8580, Japan

⁵ Graduate School of Agricultural Science, Kobe University, Rokkodai, Nada-ku, Kobe 657-8501, Japan

⁶ Institute of Animal Science, Kawamuki, Shidara, Aichi 441-2423, Japan

ABSTRACT

Kuchinoshima cattle is a breed of the unique feral cattle originated from grazing Japanese native cattle in Kuchinoshima island of Tokara Islands in Kagoshima prefecture during Meiji and Taisho periods. The distribution and frequencies of alleles of the genes associated with economical traits and hereditary disorders have been reported in populations of Japanese Black cattle that is a major beef cattle breed in Japan and Mishima cattle that is another Japanese native cattle breed in Mishima island, but those of Kuchinoshima cattle have not been reported. Therefore, we investigated the allelic distribution and frequencies of the genes associated with economical traits, hereditary disorders, and coat color to reveal genetic characteristic of Kuchinoshima cattle by comparison of the distributions among Kuchinoshima, Japanese Black, and Mishima cattle. By using 32 DNA samples collected from Kuchinoshima cattle, we genotyped *NCAPG*, *FASN*, *SCD*, and *SREBP-1* genes associated with economical traits including carcass weight and fatty acid composition, *F11* gene responsible for factor XI deficiency, and *MC1R* gene involved in coat color determination by PCR or PCR-RFLP assay and compared these results with those of Japanese Black and Mishima cattle. As a result, we found that while both *G* and *T* alleles of *NCAPG* locus were observed in the population of Japanese black cattle, the locus was fixed to *T* allele in the populations of Kuchinoshima and Mishima cattle, and that while

連絡先：国枝 哲夫 岡山大学大学院環境生命科学研究科
〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中 1-1-1
(tkunieda@okayama-u.ac.jp)
2014 年 6 月 18 日受理

both *TW* and *AR* alleles of *FASN* locus were observed in Japanese black cattle, the locus was fixed to *AR* allele in Kuchinoshima cattle and *TW* allele in Mishima cattle. For the *SCD* and *SREBP-1* loci, both *A* and *V* alleles of *SCD* locus were observed in Japanese Black, Kuchinoshima, and Mishima cattle, and both *S* and *L* alleles *SREBP-1* locus were observed in Japanese Black and Mishima cattle but fixed to *L* allele in Kuchinoshima cattle. Furthermore, while both (+) and (-) alleles of *FII* locus were observed in the population of Japanese black cattle, the locus was fixed to (+) allele in the populations of Kuchinoshima and Mishima cattle. Finally, we observed *E*⁺ and *e* alleles of *MC1R* locus in Kuchinoshima cattle, while *E*^D and *E*⁺ allele but no *e* allele in Japanese Black cattle and only *E*⁺ allele in Mishima cattle were observed. These findings indicate that Kuchinoshima cattle comprises a population of Japanese native cattle possessing unique genetic characteristics different from those of Japanese Black and Mishima cattle, which has been formed under geographically isolated circumstance with relatively small population without influence of foreign breeds.

Key words: Kuchinoshima native cattle, Distribution and frequency of allele, Economical trait, Hereditary disorder

要約

口之島牛は鹿児島県トカラ列島の口之島において、明治から大正期にかけて放牧されていた日本在来牛が野生化した日本で唯一の野生化牛の集団である。これまでに、我が国の主要な肉用牛である黒毛和種や日本在来牛といわれる見島牛等においては経済形質や遺伝性疾患に関する種々の遺伝子の遺伝子頻度と分布は明らかにされているが、口之島牛におけるそれらに関する報告は少ない。そこで、本研究では口之島牛の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分布を調べ、それらを黒毛和種および見島牛の集団と比較することで、口之島牛の集団の遺伝的特徴について検討した。32頭の口之島牛より採取されたDNAサンプルを用い、脂肪酸組成や枝肉形質に関与することが報告されている *NCAPG*、*FASN*、*SCD* および *SREBP-1* 遺伝子、遺伝性疾患の第 XI 因子欠乏症の原因遺伝子である *FII*、毛色に関連する *MC1R* 遺伝子について PCR 法あるいは PCR-RFLP 法により遺伝子型判定を行い、黒毛和種および見島牛の集団の結果と比較した。その結果、*NCAPG* 遺伝子については、黒毛和種では *G* および *T* の両対立遺伝子が検出されたのに対し、口之島牛と見島牛では *T* に固定され、*FASN* 遺伝子については、黒毛和種では *TW* および *AR* の両対立遺伝子が検出されたのに対し、口之島牛では *AR* に、見島牛では *TW* に固定されていた。*SCD* 遺伝子については、黒毛和種、口之島牛、見島牛のいずれでも *A* と *V* の両対立遺伝子が検出され、*SREBP-1* 遺伝子については、黒毛和種および見島牛では *S* および *L* の両対立遺伝子が検出されたのに対し、口之島牛では *L* に固定されていた。*FII* 遺伝子については、黒毛和種では (+) および (-) の両対立遺伝子が検出されたのに対し、口之島牛、見島牛では (+) に固定され、*MC1R* 遺伝子については、黒毛和種では *E*^D および *E*⁺ 対立遺伝子が検出され、口之島牛では *E*⁺ および *e* 対立遺伝子が検出され、見島牛では *E*⁺ 対立遺伝子に固定されていた。これらの結果より、口之島牛は他のウシの集団と地理的に隔離された環境で、小さな集団として維持されてきたこと等の理由により、黒毛和種や見島牛とは異なる遺伝的特徴を持つ集団を形成していると考えられた。

キーワード: 口之島牛、在来牛、遺伝子頻度と分布、経済形質、遺伝性疾患

緒言

和牛は明治以降に日本の在来牛を外国品種と交配して確立された日本の肉用牛であり、特に黒毛和種は我が国の主要な肉用牛として用いられ、現在、和牛の飼育総頭数の 90% 以上を占めている。一方で、外国品種の影響を受けていない日本固有の在来種として特徴を残しているのは、鹿児島県トカラ列島の口之島に生息する口之島牛と山口県見島で飼育されている見島牛だ

けであり、見島牛は国の天然記念物に指定されている (Nagamine ら 2008)。一方、口之島牛は放牧されていた牛が大正期に野生化された日本で唯一の野生化牛の集団であり、見島牛とならんで日本在来牛としての特徴を強く残していると考えられている (林田と野澤 1964; 印牧 2014)。その特徴は、黒毛和種に比べて体格は非常に小さく、後駆がしまり腰骨幅と座骨幅が著しく狭いという体格を有しており、毛色は黒、褐色の

ほか、白斑などの変異を示している（印牧と安藤 2013；印牧 印刷中）。これらの外見的特徴は、日本において古来より飼育されていたウシが持つ遺伝的特徴を残している可能性もあるため、口之島牛は遺伝資源として貴重であると考えられている。同時に、近年遺伝的多様性の減少が危惧されている黒毛和種（Nomura ら 2001；Nishimaki ら 2013）の遺伝的多様性を維持していく上での有用な遺伝資源となる可能性もある。したがって、口之島牛集団の遺伝的特徴を調べることは、和牛の遺伝資源の保護においても重要であると考えられる。

一方、近年では家畜の経済形質や遺伝性疾患に関わる多くの遺伝子が同定され、それらの遺伝子型を指標とした選抜育種も行われている（Hirano ら 2000；Ohba ら 2000；Taniguchi ら 2004；Kunieda, 2005；Kunieda ら 2005；Hoash ら 2007；Abe ら 2009；Setoguchi ら 2009）。それらの中でも黒毛和種の枝肉重量や脂肪酸組成等の経済形質に関わる遺伝子である Non-SMC Condensin I Complex, Subunit G (*NCAPG*)、Fatty Acid Synthase (*FASN*)、Stearoyl-CoA Desaturase (*SCD*) および Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 (*SREBP-1*)、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 (*FII*)、毛色に関する Melanocortin-1 receptor (*MC1R*) 遺伝子では、その遺伝子型の判別法も確立されている。これまでに、黒毛和種および見島牛の集団におけるこれらの経済形質、遺伝性疾患および毛色等に関する遺伝子の対立遺伝子頻度等は報告されているが（Sasazaki ら 2005；米田ら 2010；Matsuhashi ら 2011）、口之島牛の集団におけるこれらの遺伝子の対立遺伝子頻度等の遺伝的特徴は一部を除いてまだ明らかとされていない。そこで、本研究では口之島牛の DNA サンプルを用い、*NCAPG*、*FASN*、*SCD*、*SREBP-1*、*FII* および *MC1R* 遺伝子の遺伝子型を PCR 法および PCR-RFLP 法により判定し、黒毛和種および見島牛の結果と比較することで口之島牛の遺伝的特徴について検討した。

材料および方法

名古屋大学大学院生命農学研究科附属フィールド科学教育研究センター設楽フィールドで飼育されている 19 頭、および鹿児島大学農学部附属農場入来牧場で飼育されている 13 頭の計 32 頭の口之島牛の DNA サンプル、財団法人動物繁殖研究所白老牧場に由来する見島牛種雄牛 11 頭の DNA サンプル、岡山大学農学部附属フィールド科学教育研究センター津高牧場に飼育さ

れている黒毛和種 45 頭の DNA サンプルを用いた。名古屋大学の口之島牛集団は 1990 年に導入された雄 1 頭、雌 3 頭、1993 年に導入された雄 3 頭、雌 3 頭の計雄 4 頭、雌 6 頭の個体に由来する集団であり（印牧と安藤 2013）、鹿児島大学の口之島牛集団は 1995 年から 1997 に導入された雄 4 頭、雌 4 頭および導入年不明の雄 3 頭、雌 1 頭の計雄 7 頭、雌 5 頭に由来している集団である。

NCAPG、*FASN*、*SCD*、*SREBP-1*、*FII* および *MC1R* の各遺伝子について、各集団のウシの血液、各種臓器、毛根、あるいは凍結精液より定法にしたがって抽出されたゲノム DNA を用いた PCR 法により DNA の特定の領域を増幅した。それぞれの PCR 反応に用いたプライマーの配列は Table 1 に示した。PCR の反応液は、20ng のゲノム DNA、0.2 μ M のプライマー、0.2 μ M の dNTP、5 $\times$ PCR buffer、0.5U の Taq ポリメラーゼ（Promega, USA）を含み、全体が 10 μ l となるように滅菌水にて調整した。PCR 反応条件は、加熱変性温度 94 $^{\circ}$ C で 30 秒、Table 1 に示した各プライマーのアニーリング温度で *MC1R* については 60 秒、*NCAPG* については 45 秒、それ以外については 30 秒、伸長温度 *MC1R* については 60 秒、*NCAPG* については 45 秒、それ以外については 30 秒を 1 サイクルとして、*NCAPG*、*MC1R* については 40 回、それ以外については 35 回繰り返す、最後に 72 $^{\circ}$ C で 350 秒の伸長反応を 1 回行った。PCR 反応終了後、*FII* および *SREBP-1* 遺伝子について、増幅された PCR 産物を 3% のアガロースゲルを用いて TBE バッファー中にて 100V で 30 分電気泳動をした後、臭化エチジウム染色の後に紫外線照射により可視化し、増幅断片の長さの違いにより遺伝子型判定を行った。*MC1R*、*SCD*、*NCAPG* および *FASN* 遺伝子について、PCR 増幅産物を Table 1 に示した各遺伝子に対応した特定の制限酵素を用いて消化した後、同様に 3% のアガロースゲルにて電気泳動を行い、制限酵素断片の長さの違いにより遺伝子型の判定を行った。

統計解析には R プログラム (version 2.15.1) を用いた。集団間全体における各遺伝子型頻度の有意性検定は χ^2 検定を行い、その結果が有意である場合は各集団間に対して χ^2 検定をおこなった。各遺伝子の遺伝子型と遺伝子頻度の間のハーディー・ワインベルグ平衡に対する有意性検定には χ^2 検定を用いた。

結果と考察

NCAPG は細胞分裂における染色体の凝集に関わる

Table1. Primer sequences, fragment lengths, annealing temperatures, and restriction enzymes for genotyping.

Gene	Primer sequence(5'-3')	Length	Temp**	Enzyme
<i>NCAPG</i>	ATTAGGAAACGACTACTGG	129bp	51	
	ATTGTATTCTCTTATTATCATC	66, 63bp*		<i>Tsp509I</i>
<i>SCD</i>	GTGTCCTGTTGTTGTGCTTCATCCTGCC	197bp	60	
	AATATTCTCTCGGGGGTTGATGGTCTTG	156, 41bp*		<i>NcoI</i>
<i>FASN</i>	CTCACTGTCTGTCCACAGG	243bp	60	
	GCCTTTGGAGGGCTTCTTAG	149, 94bp*		<i>HhaI</i>
<i>SREBP-1</i>	CCACAACGCCATCGAGAAACGCTAC	348, 432bp	65	
	GGCCTTCCCTGACCACCCAACTTAG			
<i>FII</i>	TCACATCTCAATATGTGCTTCTGC	95, 110bp	60	
	TCTACGATGTCCAGTTCTTCTCC			
<i>MC1R(E⁺, E^D)</i>	TGGTGAGTCTCGTGGAACG	214bp	65	
	TCGATGACATTGTCCAAGTCTGC	149, 65bp*		<i>MspAII</i>
<i>MC1R(E, e)</i>	ATCTGCTGCCTGGCTGTGTCTGACT	219bp	65	
	GGCGTAGAAGATGGAGATGTAGCGG	139, 80bp*		<i>MspI</i>

*Italicized letters indicate lengths of digested fragments.

**Annealing Temperature

タンパク質であり、本遺伝子の第9エクソンにおけるイソロイシンからメチオニンへのアミノ酸置換を引き起こす1,326番目の塩基のTからGへの置換が肉牛の枝肉重量と関連することが報告されている (Eberlein ら 2009; Setoguchi ら 2009)。この変異について制限酵素 *Tsp509I* を用い、PCR-RFLP 法により遺伝子型を調べたところ、黒毛和種では、G/G、G/T、T/T の個体がそれぞれ1、18、26であるのに対し、口之島牛および見島牛では全ての個体がT/Tであり、G/G および G/T の個体は存在しなかった。したがって、黒毛和種、口之島牛、見島牛の集団ではそれぞれ、G 対立遺伝子の頻度は0.222、0、0、T 対立遺伝子の頻度は0.778、1、1であり、本遺伝子の対立遺伝子頻度は黒毛和種と口之島牛、見島牛の集団の間で大きく異なり、口之島牛、見島牛ではTに固定されていることが明らかとなった (Table.2)。

FASN は脂肪酸合成を制御する酵素であり、本遺伝子の第34エクソンにおけるスレオニン (T) からアラニン (A) のアミノ酸置換を引き起こす16,024番目の塩基のAからGへの置換、およびトリプトファン (W)

からアルギニン (R) へのアミノ酸置換を引き起こす16,039番目の塩基のTからCへの置換が、黒毛和種の脂肪における脂肪酸組成に関連していることが報告されている (Abe ら 2009)。この16,024番目の塩基置換について制限酵素 *HhaI* を用いたPCR-RFLP 法により遺伝子型を調べたところ、TW/TW、TW/AR、AR/AR の個体はそれぞれ、黒毛和種で23、19、3、口之島牛で0、0、32、見島牛で、11、0、0であった。したがって、黒毛和種、口之島牛、見島牛の集団ではそれぞれ、TW 対立遺伝子の頻度は0.722、0、1、AR 対立遺伝子の頻度は0.278、1、0であり、本遺伝子の対立遺伝子頻度は黒毛和種と口之島牛、見島牛の集団の間で大きく異なり、口之島牛ではARに、見島牛ではTWに固定されていることが明らかとなった (Table.3)。なお、黒毛和種における対立遺伝子頻度は、これまでの報告と大きな違いはなかった (Matsushashi ら 2011)。

SCD は脂肪細胞で飽和脂肪酸 (SFA) を一価不飽和脂肪酸 (MUFA) に変換する酵素であり、本遺伝子の第5エクソンにおけるバリン (V) からアラニン (A) へ

Table 2. Genotype and allele frequencies of *NCAPG*

Breed	No. of cattle	Genotype frequencies			allele frequencies	
		G/G	G/T	T/T	G	T
Japanese Black ^a	45	1 (0.022)	18 (0.400)	26 (0.578)	0.222	0.778
Kuchinoshima ^b	32	0 (0)	0 (0)	32 (1)	0	1
Mishima ^b	11	0 (0)	0 (0)	11 (1)	0	1

^{a-b} Mean different superscripts letters in the same column with differ significantly (P<0.05).
Desirable allele of *NCAPG* is G type.

Table 3. Genotype and allele frequencies of *FASN*

Breed	No. of cattle	Genotype frequencies			allele frequencies	
		<i>TW/TW</i>	<i>TW/AR</i>	<i>AR/AR</i>	<i>TW</i>	<i>AR</i>
Japanese Black ^a	45	23 (0.511)	19 (0.422)	3 (0.067)	0.722	0.278
Kuchinoshima ^b	32	0 (0)	0 (0)	32 (1)	0	1
Mishima ^c	11	11 (1)	0 (0)	0 (0)	1	0

^{a-c} Mean different superscripts letters in the same column with differ significantly (P<0.05).

Desirable allele of *FASN* is *TW* type.

のアミノ酸置換を引き起こす 878 番目の塩基の T から C の置換が脂肪における脂肪酸組成に関連していることが報告されている (Taniguchi ら 2004)。この変異について制限酵素 *NcoI* を用いて PCR-RFLP 法により調べたところ、黒毛和種における *A/A*、*A/V*、*V/V* の個体は黒毛和種で 25、15、5 であった。名古屋大学の口之島集団ではこれまでに、*A/A*、*A/V*、*V/V* の個体が存在することがすでに報告されているが (印牧と安藤 2013)、今回これらに加えて新たに鹿児島大学の集団の *SCD* の遺伝子型を調べたところ、両者をあわせた口之島牛の集団では *A/A*、*A/V*、*V/V* の個体はそれぞれ 9、16、7 であった。また、これまでに見島牛の集団では *A/A*、*A/V*、*V/V* の個体はそれぞれ 9、2、0 であることが報告されている (米田ら 2010)。したがって、黒毛和種における *SCD* の *A* および *V* 対立遺伝子頻度は 0.722 および 0.278 であるのに対して、口之島牛では 0.531 および 0.469 であり、見島牛では 0.909 および 0.091 であり、本遺伝子の対立遺伝子頻度は黒毛和種と口之島牛、見島牛の集団では大きな違いはないことが明らかとなった (Table.4)。なお、黒毛和種における対立遺伝子頻度は、これまでの報告と大きな違いはなかった (Matsuhashi ら 2011)。

SREBP-1 遺伝子は脂肪酸組成などに関与する転写因子であり、本遺伝子の第 5 イントロンにおける 84bp の欠損の有無により *L* 型および *S* 型が存在し、不飽和脂肪酸の含有量に関連することが報告されている (Hoashi ら 2007)。この変異を PCR 法により調べたところ、黒毛和種における *S/S*、*S/L*、*L/L* の個体はそれぞ

れ黒毛和種で 2、14、29、口之島牛では 0、0、31 であった。また、これまでに見島牛の集団では *S/S*、*S/L*、*L/L* の個体は 2、8、1 であることが報告されている (米田ら 2010)。したがって、黒毛和種における *SREBP-1* の *S* および *L* 対立遺伝子頻度は 0.200 および 0.800 であるのに対して、口之島牛では 0 および 1、見島牛では 0.545 および 0.455 であり (Table.5)、口之島牛の集団では *L* に固定されていた。なお、黒毛和種における対立遺伝子頻度は、これまでの報告に比べて *L* が高い傾向が見られた (Matsuhashi ら 2011)。

血液凝固不全による出血性の遺伝性疾患である第 XI 因子欠乏症はヒトや各種の動物で報告され、ウシでは、黒毛和種、ホルスタイン種に発生が報告されている。黒毛和種の第 XI 因子欠乏症では、その原因は *FII* 遺伝子の第 9 エクソンにおける 15 塩基の挿入であることが明らかとされており (Kunieda ら 2005)、挿入の有 (-) 無 (+) の PCR 法による遺伝子診断法が確立されている。そこで PCR 法により *FII* の遺伝子型を調べたところ、黒毛和種では *+/+*、*+/-*、*-/-* の個体はそれぞれ 34、10、1 であるのに対し、口之島牛では全ての個体が *+/+* であり、*+/-* および *-/-* の個体は存在しなかった。また、これまでに見島牛の集団でも 11 個体全てが *+/+* であり、*+/-* および *-/-* の個体は存在しないことが報告されている (米田ら 2010)。したがって、黒毛和種、口之島牛、見島牛の集団ではそれぞれ、正常 (+) 対立遺伝子の頻度は 0.867、1、1、変異 (-) 対立遺伝子の頻度は 0.133、0、0 であり、口之島牛、見島牛では変異対立遺伝子は存在せず、(+) に固定されていることが明らかとなった

Table 4. Genotype and allele frequencies of *SCD*

Breed	No. of cattle	Genotype frequencies			allele frequencies	
		<i>A/A</i>	<i>A/V</i>	<i>V/V</i>	<i>A</i>	<i>V</i>
Japanese Black ^{ab}	45	25 (0.556)	15 (0.333)	5 (0.111)	0.722	0.278
Kuchinoshima ^{b*}	32	9 (0.281)	16 (0.500)	7 (0.219)	0.531	0.469
Mishima ^{a**}	11	9 (0.818)	2 (0.182)	0 (0)	0.909	0.091

^{a-b} Mean different superscripts letters in the same column with differ significantly (P<0.05).

Desirable allele of *SCD* is *A* type.

*A part of these data have been published in Kanemaki and Ando 2013.

**These data has been published in Yoneda *et al.* (2010).

Table 5. Genotype and allele frequencies of *SREBP-1*

Breed	No. of cattle	Genotype frequencies			allele frequencies	
		<i>S/S</i>	<i>S/L</i>	<i>L/L</i>	<i>S</i>	<i>L</i>
Japanese Black ^a	45	2 (0.044)	14 (0.311)	29 (0.644)	0.200	0.800
Kuchinoshima ^b	31	0 (0)	0 (0)	31 (1)	0	1
Mishima ^{c**}	11	2 (0.182)	8 (0.727)	1 (0.091)	0.545	0.455

^{a-c} Mean different superscripts letters in the same column with differ significantly (P<0.05).

Desirable allele of *SREBP-1* is *S* type.

**These data has been published in Yoneda *et al.* (2010).

Table 6. Genotype and allele frequencies of *F11*

Breed	No. of cattle	Genotype frequencies			allele frequencies	
		<i>+/+</i>	<i>+/-</i>	<i>-/-</i>	<i>+</i>	<i>-</i>
Japanese Black ^a	45	34 (0.756)	10 (0.222)	1 (0.022)	0.867	0.133
Kuchinoshima ^b	32	32 (1)	0 (0)	0 (0)	1	0
Mishima ^{ab**}	11	11 (1)	0 (0)	0 (0)	1	0

^{a-b} Mean different superscripts letters in the same column with differ significantly (P<0.05).

Mutant allele of *F11* is *-* type.

**These data has been published in Yoneda *et al.* (2010).

(Table.6)。なお、今回調べた黒毛和種の集団における (-) 対立遺伝子の頻度は、これまでの報告より低い傾向が見られた (Ohba ら 2008)。

MC1R は哺乳類の毛色に関わる下垂体ホルモンのメラノコルチンに対する受容体であり、本遺伝子のロイシンからプロリンへのアミノ酸置換を引き起こす 298 番目の塩基の T から C の置換が毛色の黒 (E^D) と黒褐色 (E^+) の違いに関わり、また フレームシフト変異を引き起こす 311 番目の塩基の欠失が毛色の黒あるいは黒褐色と褐色 (e) の違いに関わることが報告されている (Klungland ら 1995)。これらの変異を制限酵素 *MspAII* および *MspI* を用いた PCR-RFLP 法により E^D 、 E^+ および e の遺伝子型判定を行ったところ、黒毛和種の集団では E^D/E^D 、 E^D/E^+ 、 E^+/E^+ の個体はそれぞれ 10、19、15 であり、 E^D/e 、 E^+/e および e/e の個体は存在しなかった。また、名古屋大学の口之島集団ではこれまでに、 e と E^D あるいは E^+ 対立遺伝子が存在することが報告されているが (印牧と安藤 2013)、今回、名古屋大学の集団に加えて鹿児島大学の集団も加え、かつ E^D と E^+ を区別することで、口之島牛の集団では

E^D/E^D 、 E^D/E^+ 、 E^D/e は存在せず、 E^+/E^+ 、 E^+/e および e/e の個体はそれぞれ 4、17、10 であることが明らかとなった。また、これまでに見島牛の集団では E^D を持つ個体は存在せず全て E^+/E^+ であることが報告されているが、 e については調べられていなかったが (米田ら 2010)、今回、 e についても調べた結果、 e を持つ個体は存在しないことが確認され、全ての個体は E^+/E^+ であることが明らかとなった。したがって、黒毛和種における *MC1R* の E^D 、 E^+ 、および e 対立遺伝子の頻度は 0.443、0.557、0 であるのに対して、口之島牛では 0、0.403、0.597 であり、見島牛では 0、1、0 であった (Table.7)。口之島牛におけるこれらの *MC1R* の遺伝子型は実際の毛色と一致していた。なお、黒毛和種の集団中には、 e も低頻度で存在することが知られているが、今回調べた黒毛和種の集団には e は検出されなかった。

口之島に実際に野生化状態で生息する口之島牛は、正確な数は不明であるが、現時点でおおよそ 70 頭前後の集団であると推測されており (印牧 印刷中)、歴史的にも 30 頭から 100 頭程度の個体よりなる集団

Table 7. Genotype and allele frequencies of *MC1R*

Breed	No. of cattle	Genotype frequencies						allele frequencies		
		E^D/E^D	E^D/E^+	E^+/E^+	E^D/e	E^+/e	e/e	E^D	E^+	e
Japanese Black ^a	44	10 (0.227)	19 (0.432)	15 (0.341)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.443	0.557	0.000
Kuchinoshima ^{b*}	31	0 (0)	0 (0)	4 (0.129)	0 (0)	17 (0.548)	10 (0.323)	0	0.403	0.597
Mishima ^{c**}	11	0 (0)	0 (0)	11 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0	1	0

^{a-c} Mean different superscripts letters in the same column with differ significantly (P<0.05).

*A part of these data have been published in Kanemaki and Ando (2013).

**A part of these data has been published in Yoneda *et al.* (2010).

を構成していると考えられている（印牧と安藤 2013）。今回の遺伝子型の解析に用いた 32 個体は、名古屋大学の集団が 1990 年代に口之島にて捕獲された雄 4 頭、雌 6 頭の個体に由来し、鹿児島大学の集団がやはり 1990 年代に捕獲された雄 7 頭、雌 5 頭由来している。したがって、数十頭の野生化牛集団のうちの計 22 頭に由来することから、本研究に用いたサンプルは口之島牛に生息する野生化牛の遺伝的特性を反映しているものと考えられる。本研究によるこれらサンプルを用いた遺伝子型の調査の結果、脂肪酸組成や枝肉重量等の経済形質、遺伝性疾患、毛色に関与する遺伝子の口之島牛の集団における対立遺伝子頻度が明らかとなり、それらを黒毛和種および見島牛の集団の対立遺伝子頻度と比較した結果、口之島牛集団の遺伝的特徴と、これらの牛集団の関係について以下のことが示唆された。

今回調べた遺伝子の中で、*NCAPG* の *G* 対立遺伝子、*FII* の (-) 対立遺伝子および *MCIR* の *E^D* 対立遺伝子は黒毛和種の集団中においてある程度の頻度で検出されたのに対し、口之島牛および見島牛の集団では、*NCAPG* では *T* 対立遺伝子、*FII* では (+) 対立遺伝子に固定され、*MCIR* では *E^D* 対立遺伝子は存在しないことが明らかとなった。このことは、*NCAPG* の *G* 対立遺伝子、*FII* の (-) 対立遺伝子および *MCIR* の *E^D* 対立遺伝子はもともと日本の在来牛には存在せず黒毛和種の系統成立の過程で導入され交雑された外来品種との交配に由来している可能性を示唆している。しかし一方で、口之島牛の集団および見島牛の集団はいずれも比較的小さな閉鎖された集団であることから、これらの対立遺伝子は日本の在来牛には存在していたが、口之島牛および見島牛の集団の成立の過程でのボトルネック効果や創始者効果、あるいは長期的に他の集団とは隔離された状態で維持された過程での遺伝的浮動等により特定の対立遺伝子が消失した可能性も否定できない。また、長年にわたる黒毛和種の育種の過程で、枝肉重量が多い方向へ、毛色をより黒い方向へと選抜された結果、もともと日本の在来牛に低い頻度で存在していた *NCAPG* の *G* 対立遺伝子および *MCIR* の *E^D* 対立遺伝子の頻度が増加した可能性も考えられた。

一方 *FASN*、*SCD* および *SREBP-1*、および *MCIR* の *E⁺* および *e* 対立遺伝子については、口之島牛と見島牛の集団においてもそれぞれの対立遺伝子が検出されることから、日本の在来牛にこれらの対立遺伝子はもともと存在していたものと考えられる。したがって、*FASN* の *TW* 対立遺伝子が口之島牛の集団で、*AR* 対立

遺伝子が見島牛の集団で、*SREBP-1* の *S* 対立遺伝子が口之島牛の集団で、および *MCIR* の *e* 対立遺伝子が見島牛の集団で検出されなかったことは、これらの集団の成立の過程でのボトルネック効果や創始者効果あるいは長期的に他の集団とは隔離された状態で維持された過程での遺伝的浮動等により対立遺伝子の片方が消失した可能性が考えられた。

日本の在来牛には古来より黒色とともに褐色の毛色が存在することはこれまでに古文書等に記載されている。*MCIR* の *e* 対立遺伝子は、これまでに黒毛和種を含む多くの品種における褐色の毛色に関与することが報告されているが、今回、口之島牛の褐色の毛色も外国品種と同じく *MCIR* 遺伝子の 311 番目の塩基の欠失を持つ *e* 対立遺伝子に起因することが明らかとなったことから、この *e* 対立遺伝子は家畜としてのウシの歴史の中で、外国品種と日本在来牛が分岐した以前からウシの集団に存在していた古い変異であることが示唆された。

今回調べた *NCAPG*、*FASN*、*SCD*、*SREBP-1*、*FII* および *MCIR* の計 6 遺伝子については、黒毛和種の集団では全ての遺伝子に異なった 2 つあるいは 3 つの対立遺伝子が検出されたのに対し、口之島牛の集団では、*NCAPG*、*FASN*、*SREBP-1* および *FII* の 4 遺伝子において、見島牛の集団では *NCAPG*、*FASN*、*FII* および *MCIR* の 4 遺伝子において単一の対立遺伝子に固定されていた。これまでに、名古屋大学の口之島牛の集団における遺伝的多様性の調査の結果、調べた 9 システムの血液型のうちの 4 システムにおいて、また 52 のマイクロサテライトマーカーのうち 36 マーカーにおいて多型が確認されたことから、口之島牛は集団が小さく、他の集団から隔離されて閉鎖的に維持されているにも関わらず、遺伝的多様性が高い可能性があることが報告されている（印牧と安藤 2013）。今回の結果は、この報告とは異なり口之島牛の集団の遺伝的多様性は低い可能性を示している。しかし、マイクロサテライトマーカーや血液型が高い多型性を示す中立的な遺伝マーカーであるのと異なり、今回調べた遺伝子は経済形質や、遺伝性疾患、毛色に関わる遺伝子であり、表現型に与える影響も大きく選択、選抜に対して中立的とはいえないことが、これらの結果に影響している可能性も考えられる。一方で、主要組織適合性遺伝子複合体（MHC）*DRB3* 遺伝子座については、口之島牛の集団ではほぼ全ての個体が単一の対立遺伝子に固定されていることが明らかにされており（間ら 私信）、今後、多様なマーカーを調べることで口之島牛の遺伝

的多様性を正確に評価することが必要と考えられた。

謝辞

本研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金、文部科学省特別経費「低炭素社会と食の安全・安心を統合した環境生命学的研究」、および農林水産省「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」の助成を受けて行われた。黒毛和種のサンプリングに協力いただいた岡山大学農学部附属フィールド科学教育研究センター津高牧場の野久保隆技術職員に感謝します。

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.
- 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.
- 林田重幸・野澤謙. 1964. トカラ群島における牛. 日本在来家畜調査団報告, 1:24-30.
- Hirano T, Kobayashi N, Itoh T, Takasugi A, Nakamaru T, Hirotsune S, Sugimoto Y. 2000. Null mutation of *PCLN-1/Claudin-16* results in bovine chronic interstitial nephritis. *Genome Research*, 10: 659-663.
- Hoashi S, Ashida N, Ohsaki H, Utsugi T, Sasazaki S, Taniguchi M, 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.
- 印牧美佐生. 2014. 口之島野生化牛. 動物遺伝育種学研究, 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: 81-93.
- 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 T. 2005. Identification of genes responsible for hereditary diseases in Japanese beef cattle. *Animal Science Journal*, 76: 525-533.
- Kunieda M, Tsuji T, Abbasi AR, Khalaj M, Ikeda M, Miyadera K, Ogawa H, Kunieda T. 2005. An insertion mutation of the bovine *FII* gene is responsible for factor XI deficiency in Japanese Black cattle. *Mammalian Genome*, 16:383-389.
- Matsuhashi T, Maruyama S, Uemoto Y, Kobayashi N, Mannen H, Abe T, Sakaguchi S, Kobayashi E. 2011. Effects of bovine fatty acid synthase, stearoyl-coenzyme A desaturase, sterol regulatory element-binding protein 1, and growth hormone gene polymorphisms on fatty acid composition and carcass traits in Japanese Black cattle. *Animal Science Journal*, 89:12-22.
- 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, 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.
- Nishimura S, Watanabe T, Mizoshita K, Tatsuda K, Fujita T, Watanabe N, Sugimoto Y, Takasuga A. 2012. Genome-wide association study identified three major QTL for carcass weight including the *PLAG1-CHCHD7* QTN for stature in Japanese Black cattle. *BMC Genetics*, 13:40.
- Nomura T, Honda T, Mukai F. 2001. Inbreeding and effective population size of Japanese Black cattle. *Journal of Animal Science*, 79: 366-370.
- Ohba Y, Kitagawa H, Kitoh K, Sasaki Y, Takami M, Shinkai Y, Kunieda T. 2000. A deletion of the *paracellin-1* gene is responsible for renal tubular dysplasia in cattle. *Genomics*, 68: 229-236.
- Ohba Y, Takasu M, Nishii N, Takeda E, Maeda S, Kunieda T, Kitagawa H. 2008. Pedigree analysis of factor XI deficiency in Japanese black cattle. *Journal of*

- Veterinary Medical Science, 70:297-299.
- Ohsaki H, Tanaka A, Hoashi S, Sasazaki S, Oyama K, Taniguchi M, Mukai F, Mennen H. 2009. Effect of SCD and SREBP genotypes on fatty acid composition in adipose tissue of Japanese Black cattle herds. *Animal Science Journal*, 80:225-232.
- 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.
- Taniguchi M, Utsugi T, Oyama K, Mannen H, Kobayashi M, Tanabe Y, Ogino A, Tsuji S. 2004. Genotype of stearyl-CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mammalian Genome*, 14:142-148.
- 米田一裕・渡辺望・国枝哲夫. 2010. 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. *動物遺伝育種学研究*, 38:13-19.