

(財)日本食肉消費総合  
センター委託

農畜産業振興事業団  
指定助成対象事業

# 食肉品種鑑定技術の確立事業 実施報告書

(平成10年度～平成13年度)

平成14年3月

社団法人畜産技術協会

# まえがき

近年消費者は食品の安全性や品質には敏感になっている。これに応じて販売側も販売する食品の安全性や品質に関わる種々の情報を提供している。生鮮野菜であれば、産地、農薬使用の有無等が重要な情報であり、コメでは産地、品種などが品質に関わる重要な情報となる。

食肉の場合は、とくに牛肉では、産地（国産か外国産か）、国産であれば由来する品種などが重要な情報となる。国産牛肉が由来する品種としては、和牛（大部分が黒毛和種）、ホルスタイン種及びこれらの間の交雑種（F1）の3品種にほぼ限定される。品種は牛肉の品質を示す重要な情報とされている。

消費者に牛肉の品種情報を正確に提供することは、牛肉品質についての重要な情報を提供することになり、消費者の牛肉消費行動にも大きな影響を与えるものといえる。そして、正確な品種情報の裏付けとなるのは科学的な牛肉品種鑑定の技術である。

私どもの協会は（財）日本食肉消費総合センターからの委託を受けて、平成10年度から3年計画で牛肉品種鑑定手法の開発事業をスタートさせた。その後さらに1年間事業を延長し、4年間の事業として行われた。業務を担当した附属動物遺伝研究所では、現時点における最も有効な手段はDNAの差異に基づくものしかないであろうとの立場から種々の実験を繰り返してきた。

和牛の改良史や我が国の酪農発達史をひもとけば、和牛といいホルスタイン種といっても祖先では遺伝的重複があることは明らかであり、事業開始の当初からある程度の困難さを指摘する声があった。しかし、4年間の関係者の努力の結果、牛肉の品種判別をかなりの精度で行いうる成果を得るに至っている。本冊子はこの4年間の事業報告書である。

この間、農林水産省畜産局食肉鶏卵課（その後生産局畜産部食肉鶏卵課）の関係官、（財）日本食肉消費総合センターの各位、本事業にかかる中央推進委員会並びに技術専門委員会の諸先生方には多くのご助言を頂いた。また、神戸大学農学部の辻壮一教授並びにスタッフには共同研究者として多くのご支援をいただいた。ここに記して深く感謝の意を表します。

平成14年3月31日

社団法人 畜産技術協会

会長 白 根 亨

# 目 次

第1章 はじめに .....	1
第2章 DNA配列情報に基づく食肉品種鑑定について.....	2
第3章 ミトコンドリアDNAのD-ループ配列の多型について.....	4
第4章 毛色関連遺伝子の遺伝子型多型について.....	23
第5章 RAPD-PCRで見いだされる一塩基多型 (SNP) について.....	26
第6章 AFLP法を用いた黒毛和種とホルスタイン種及びその雑種第一代 (F1) の鑑別.....	34
第7章 考察とまとめ.....	48

## 第1章 はじめに

近年消費者は食品の安全性や品質に関わる情報には極めて敏感になっている。これに応じて生産者、流通業者は必要な情報を消費者に提供すべく努力している。

食肉の場合は、薬物等の残留がないこと、衛生的な取り扱いがされていることなど安全性に関わる事項は生産、流通の過程で満たされるべき要件であって、商品として店頭に並ぶときにはすでに安全性は確保されていると見なすことが出来る。

品質に関わる要因には、産地（国産か外国産か）、国産であれば由来する品種等がある。特に牛肉では品質に関わるこれらの要因は重視される。国産牛肉の由来する品種としては、黒毛和種、ホルスタイン種及びこれらの間の交雑種

（F1）がほとんどを占め、その他に褐毛和種、日本短角種、ヘレフォード種などに由来する牛肉もある。牛肉の品質表示の要素として品種表示が重視されればされるほど、その表示は正確でなければならない。品種表示の正確さを裏付けるものは科学的な品種鑑定の技術である。

本プロジェクトでは、国産牛肉のほとんどを占める黒毛和種、ホルスタイン種及びこれらの間の交雑種（F1）由来の牛肉を判別する技術を開発することを目的としている。このために現在考えられる最善の手法としてはDNAの塩基配列の品種間の差を調べることであった。

本報告書は牛肉の品種鑑定技術の開発を目的に平成10年から4年間行った事業の成果をとりまとめたものである。

## 第2章 DNA配列情報に基づく食肉品種鑑定について

黒毛和種とホルスタイン種は共にヨーロッパ牛（*Bos taurus*）として位置づけられる。ウシは約5000年前に中東で家畜され、その後、ユーラシア大陸の各地に広がっていった。ヨーロッパに広がった系統の内、産業革命頃になって、ホルスタイン種は乳用種として改良が進み、産業革命頃で200年前と推定される。黒毛和種は、ユーラシア大陸から様々な経路で伝播してきたウシが我が国の在来牛としての歴史を経、近年、改良が加えられて品種として確立された。このような集団が、我が国の全国和牛登録協会によって黒毛和種として登録されている。このように遺伝的背景を異にする品種間の判別には、遺伝の実体であるDNAの品種間における塩基配列の違い（DNA多型：その個所をDNAマーカーともいう）を利用するのが最も妥当な方法である。品種鑑定に有用な可能性のあるDNA多型を次の表1にまとめている。

表1に上げた5種類のDNA多型の内、マイクロサテライトとY染色体特異的DNA多型はそれぞれ次のような理由で品種鑑定の対象としなかった。

### マイクロサテライト

- 1) CAやATのような2塩基の繰り返し配列である。
- 2) 多数開発されているが、マーカー毎のアリルが多過ぎる。
- 3) 品種特異的なマーカー開発のための良い手法がない。

### Y染色体特異的DNA多型

- 1) 父系遺伝する。
- 2) ウシでは未開発であり、F1の父親は黒毛和種なので、F1と黒毛和種の識別に無意味と考えられる。

本事業ではDNA情報に基づく品種鑑定技術を確立するため、次のような3種のDNA多型に着目して検討を加えた。

これら3種のDNA多型を対象に調べ、黒毛和種とホルスタイン種を区別しうるDNA配列を見出すことを目的とした。黒毛和種が品種として成立してから未だ60年程度しか経過しておらず、同じヨーロッパ牛（*Bos taurus*）に属するホルスタイン種との遺伝的な距離は近いと予想される。したがって、黒毛和種とホルスタイン種を区別する可能性のあるDNA配列をできるだけ多く集め、鑑定技術の確立を図る必要がある。上記の3種について実施した結果について以下報告する。

DNA 多型の種類	長 所	短 所
マイクロサテライト	多数開発済み。	多型性が高すぎる。品種特異的なものの開発のための良い手法がない。
ミトコンドリア DNA、D-ループ	母系遺伝	約 1 kb の配列比較が必要。血統記録の裏付けが必要。
Y 染色体特異的 DNA 多型	父系遺伝	ウシでは未開発。F1 の父親は黒毛和種なので、F1 と黒毛和種の識別に無意味。
表現型の違いの原因となりうる遺伝子（毛色遺伝子）の変異	黒毛和種とホルスタイン種の毛色に違いがあるので明瞭。	少数の毛色遺伝子しか知られていない。大部分は未知の遺伝子。
一塩基多型（SNP）	ランダムに開発できる RAPD-PCR 法や AFLP 法が確立されている。	かなりの仕事量が必要。

表1. 品種鑑定に有用な可能性のあるDNA多型

①ミトコンドリアDNAのD-ループ配列における多型 ②毛色関連遺伝子における遺伝子型多型③RAPD-PCRで見出される一塩基多型（Single Nucleotide Polymorphism, SNP）

## 第3章 ミトコンドリアDNAのD-ループ配列の多型について

### 3-1. ミトコンドリアDNAの塩基配列

ミトコンドリアDNAは、エネルギー製造関連遺伝子やたんぱく質合成に必要な遺伝子を含み、哺乳動物の間でよく似た配列をもっている。環状のDNAで、16kb(1万6千塩基対)の大きさをしている。ミトコンドリアDNAの塩基配列の大部分はよく保存されており、多型は少ないが、環状に繋がっているD-ループ(Displacement loop)といわれる約1kb(千塩基対)の部分には多くの多型が観察されている。このD-ループにおける多型が品種鑑定に利用できる可能性がある。

しかし、ミトコンドリアD-ループの多型は高いため、約1kbの塩基配列を読まねばならず、かつ黒毛和種に存在しうるすべての塩基配列パターンを把握しておかねばならないため、作業量が膨大になる。また、過去の一時期、改良のため欧米種の雄のみならず雌も導入した経緯があり、この雌から始まる母系に属する個体のミトコンドリアDNA多型と同じ多型を示す集団が欧米種にも存在する可能性がある。また、明治時代に欧米からホルスタイン種を乳牛として移入した際、在来牛の雌に繰り返し交配して乳用牛に変えたホルスタイン種系を作出している。このような集団は遺伝的にはほとんどホルスタイン種であるが、ミトコンドリアDNAは黒毛和種と同じと考えられる。

### 3-2. ミトコンドリアDNAの遺伝様式の特徴

核DNAにおいては精子や卵子の配偶子形成に伴う減数分裂時に組換えを起こすという複雑な遺伝情報の伝わり方をする。一方、細胞質に存在するミトコンドリアの有する遺伝情報は常に母親からそのまま子に伝わるという特徴がある(図1)。

すなわち、ある母親を共通祖先とする個体の有するミトコンドリアDNAの配列はす

べて共通である。したがって、血統登録されている黒毛和種繁殖雌牛の血統記録から母系を遡って到達できる基本的祖先数を求めれば、その数が黒毛和種に存在するミトコンドリアDNAすべてを網羅したものとなる。この祖先数を求めるには、登録制度の始まった50年前からの正確な血統情報が必要であるが、母系を辿ることは困難である。全国和牛登録協会の協力により、母系を基本とする血統記録のデータベースの整備が必要である。それは黒毛和種雌牛の母牛基本本原登録番号を知ることでの母系に属するかがサーチできるシステムである(図2)。

### 3-3. ミトコンドリアDNAのD-ループの塩基配列の読み方

- 1) 家畜の血液、食肉等を材料にDNAを調製し、ミトコンドリアDNAの調査対象部分をPCRという手法で増幅する。図3には、報告されているホルスタイン種のミトコンドリアD-ループ部分の塩基配列を示している。以下、この塩基配列を基準とした。
- 2) DNA配列を読むためには、DNAシーケンサーを用いるサンガー法に基づく通常の方法と、最近開発されつつあるDNAチップ法がある。作業量およびコストの点からDNAチップ法を用いた。

### 3-4. DNAチップを用いた黒毛和種ミトコンドリアDNA多型解析

DNAチップとは、多数(数千、数万)のDNA(cDNAやオリゴDNA)を、スライドガラス等の基板の上に整列させ、固定化した物で、遺伝子発現解析用のスクリーニングツールとして、近年非常に注目を集めている。また、オリゴDNAを固定化したDNAチップは、Reverse Dot Blotting法と同様の原理で、遺伝子の変異や多型を同時

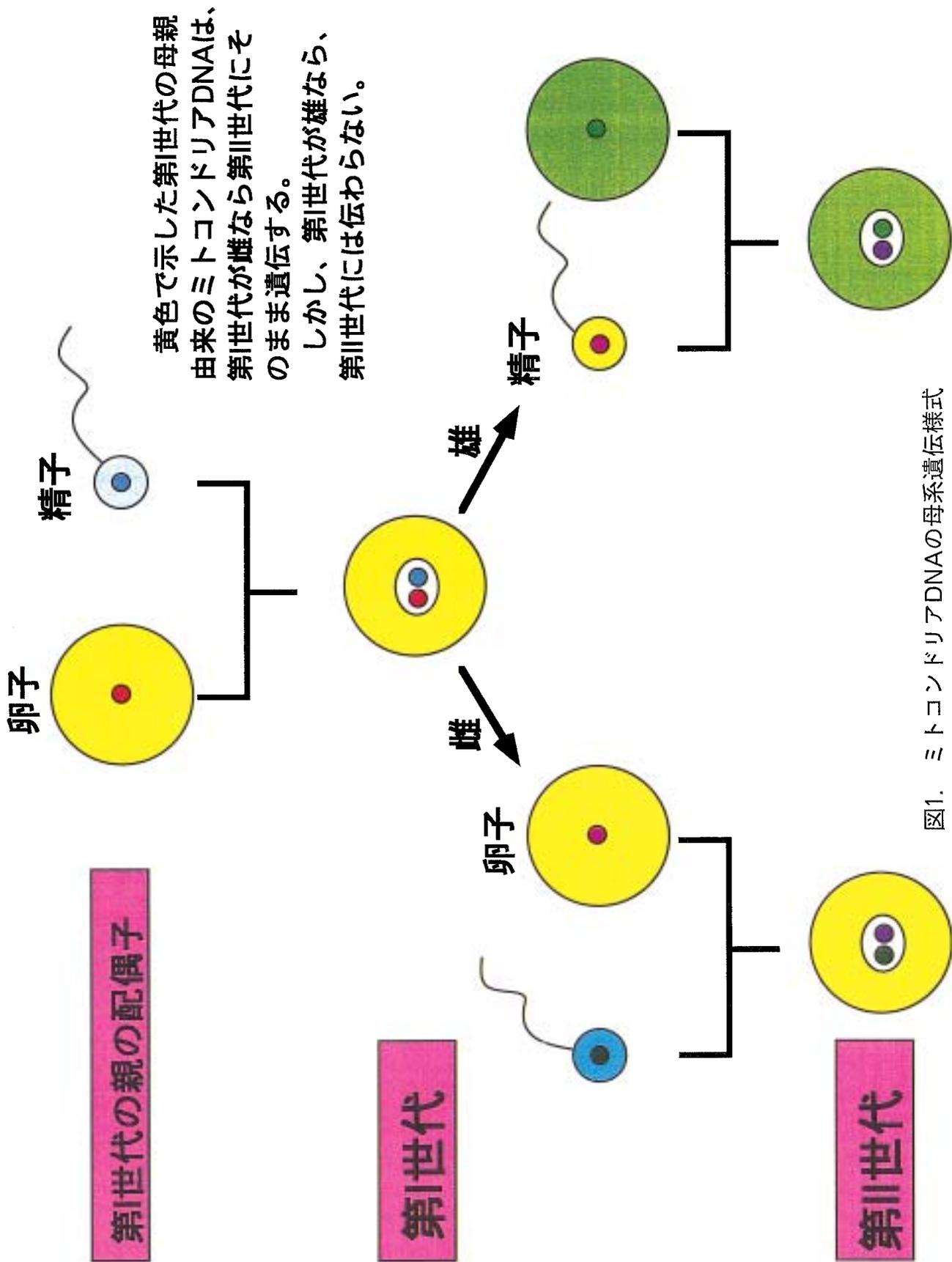


図1. ミトコンドリアDNAの母系遺伝様式

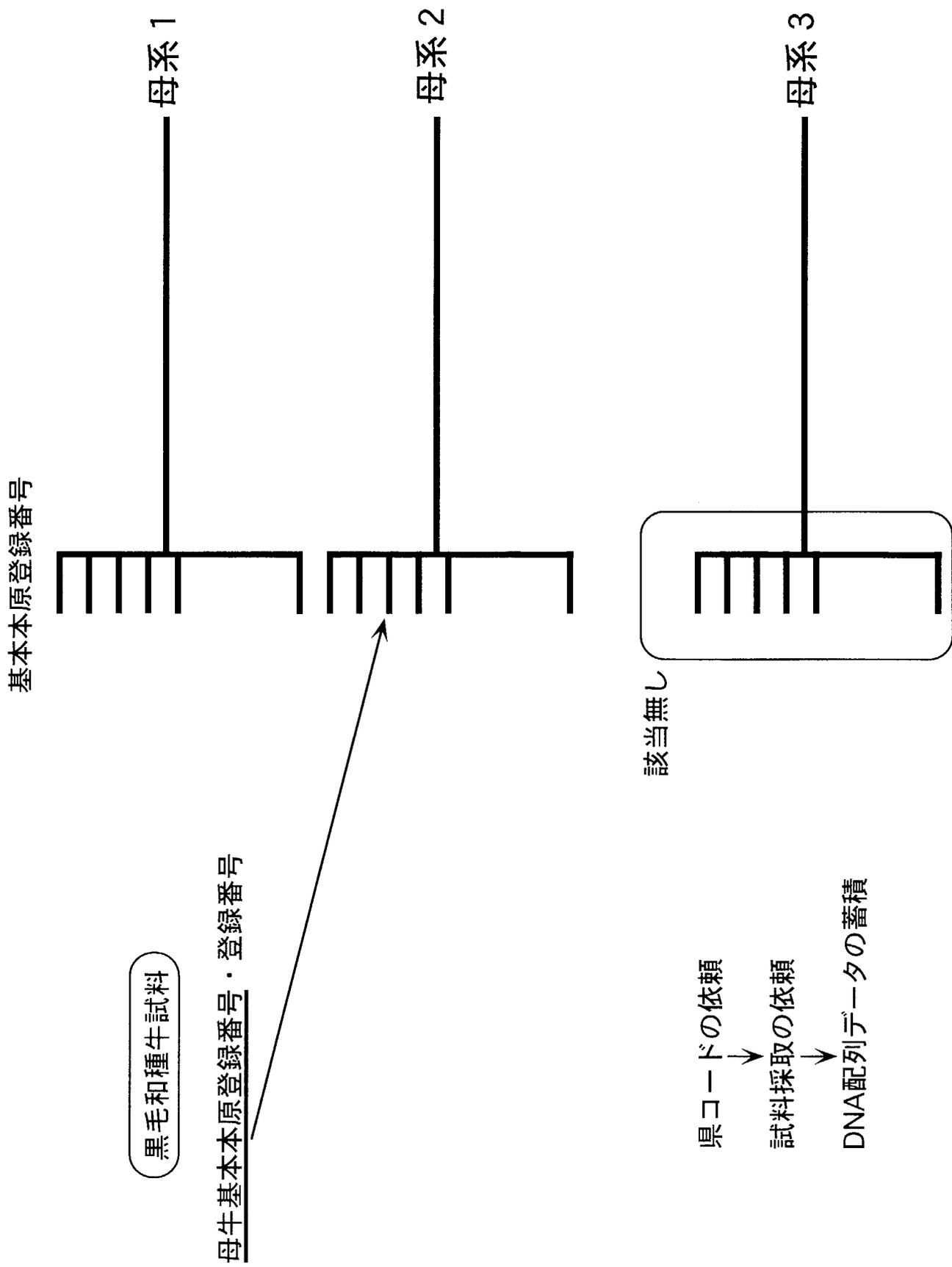


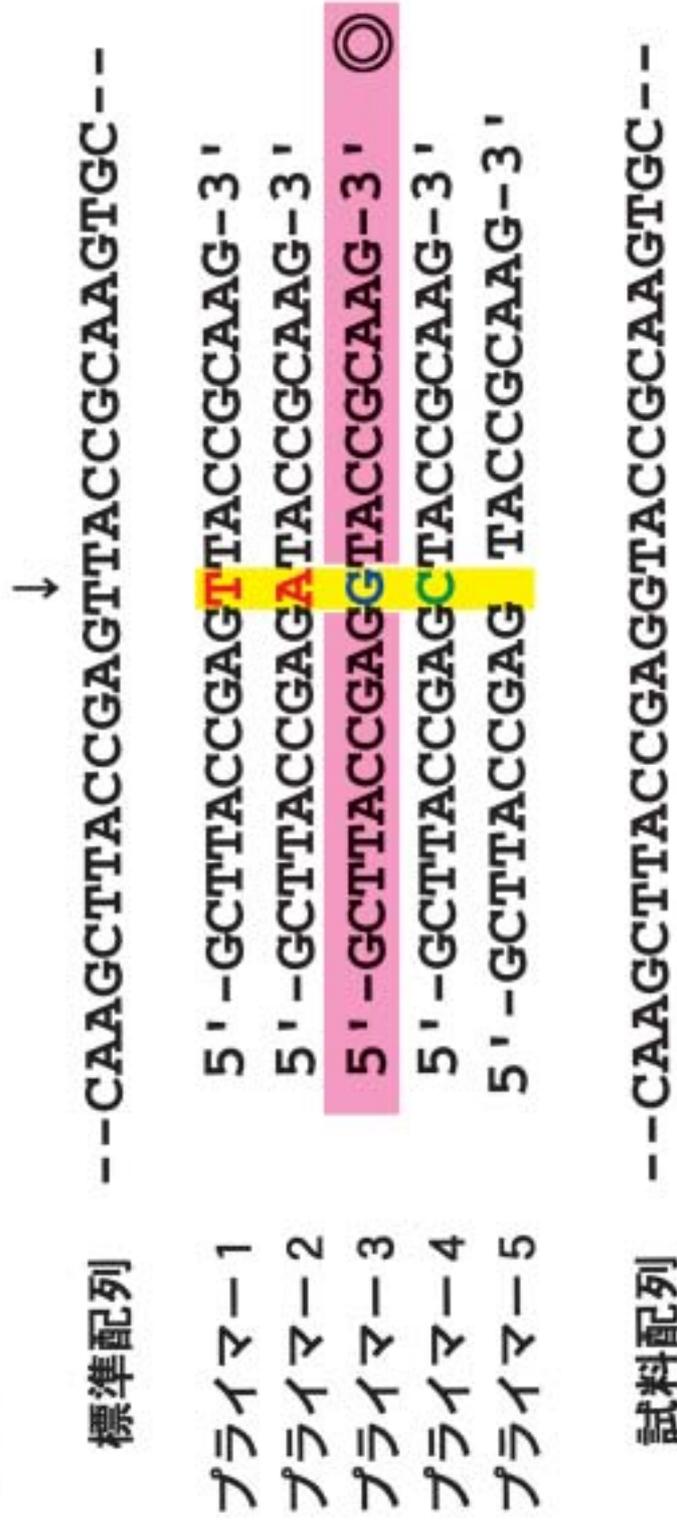
図2. 黒毛和種母系サーチシステム

作業量およびコストの点から DNA チップ法を用いた。

```
15781 actattcctt gaacactatt aatatagttc cataaataca aagagcctta tcagtattaa
15841 atttatcaaa aatcccaata actcaacaca gaatttgac cctaaccaaa tattacaaac
15901 accactagct aacataaac gcccatacac agaccacaga atgaattacc tacgcaaggg
15961 gtaatgtaca taacattaat gtaataaaga cataaatatgt atatagtaca ttaaattata
16021 tgccccatgc atataagcaa gtacatgacc tctatagcag tacataatac atataattat
16081 tgactgtaca tagtacatta tgtcaaatc attcttgata gtatatctat tatatatcc
16141 ttaccattag atcacgagct taattaccat gccgcgtgaa accagcaacc cgctaggcag
16201 ggatccctct tctcgtccg gcccataaa ccgtgggggt cgctatccaa tgaattttac
16261 caggcatctg gttctttctt cagggccatc tcatctaaaa cggtcattc tttctctta
16321 aataagacat ctcgatgg
    1 actaatggct aatcagccca tgctcacaca taactgtgct gtcatacatt tggatatttt
    61 ttattttggg ggatgcttg actcagctat ggccgtcaaa ggccctgacc cggagcatct
   121 attgtagctg gacttaactg catcttgagc accagcataa tgataagcat ggacattaca
   181 gtcaatggtc acaggacata aattatatta tatatcccc cttcataaaa atttccccct
   241 taaatatcta ccaccacttt taacagactt ttccttagat acttatttaa atttttcagc
   301 ctttcaatac tcaatttagc actccaaaca aagtcaatat ataaacgcag gcccccccc
   361 cccgttgatg tagcttaacc caaagcaagg cactgaaaat gcctagatga gtctcccaac
```

図 3. ウシのミトコンドリア D-ループ配列 (引用文献: Anderson, S., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Eperon, I. C., Sanger, F. & Young, I. G. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. (1982) *Journal of Molecular Biology*, 156, 683-717.)。D-ループは、黒で示す 15,792 位より 363 位までであり、その両側の塩基配列は赤で示した。16,338 位と 1 位は環状構造のため隣接している。

# DNAチップ法の原理



標準配列に従って5種のオリゴDNA（プライマー）を合成するが、5'から10番目の塩基を換えた4種と欠失した1種の5種をガラス板上にスポットし、PCRで増幅した試料（蛍光標識）を反応させる。試料と配列が同じプライマーに蛍光が認められるので、その部位の塩基はGと判明する。

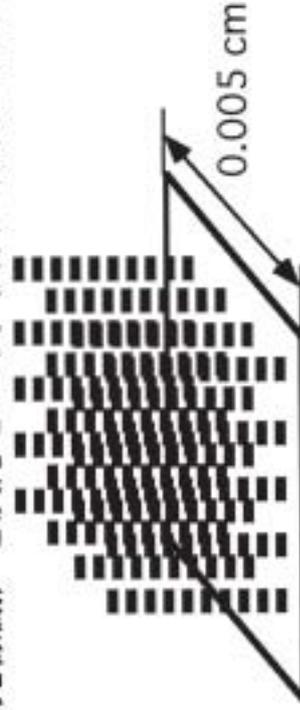


図4. DNAチップ法の原理。標準配列Tの部位に変異があるかどうか調べるため、そのガラス板の部位をT、A、G、C、欠損（黄色で囲んだ箇所）としたそれぞれプライマー-1、-2、-3、-4、-5を調製し、ハイブリする。もし、プライマー-3が最も強く反応すればその部位の塩基はGと判明する。

に多くの遺伝子に関して解析する事ができ、さらには、SBH (Sequencing by hybridization)と呼ばれるハイブリダイゼーションによって目的とするDNAの配列決定を行う技術も、DNAチップにより現実的な物となった。本研究において、DNAチップを用いたSBH手法を用いて、黒毛和種牛ミトコンドリアDNA D-ループの多型解析を行った。

## I. 作業行程

作業行程としては、以下の工程よりなる。

### ①オリゴDNAのデザイン

黒毛和種牛ミトコンドリアDNA D-ループの遺伝子配列情報より、各塩基につき5種類の5'末端アミノ修飾オリゴDNAをデザインし、合成機により合成する。

### ②DNAチップの作製

各オリゴDNAを、水にて0.1~1.0mMに溶解し、グルタルアルデヒドコーティングスライドガラスにスポットティングし、固定化処理とブロッキング処理を施し、DNAチップを作製する。

### ③サンプルDNAの蛍光標識

黒毛和種牛全血よりDNAを抽出精製し、ミトコンドリアDNA D-ループ領域をPCR増幅したDNAフラグメントを蛍光物質Cy3で標識する。

### ④プローブの作製

ウシの全血 100  $\mu$ lより、ロボットを用いてDNAを抽出する。抽出DNAを鋳型とし、Primer FとPrimer Rを用いて、ウシミトコンドリアDループを含む1210bpの断片をTaKaRa Ex Taq (code:RR001A)でPCRで増幅する。PCR生成物の精製はMicrocon-100を用いて行う。

Primer F: 5' (CCCAAAGCTgAAgT  
TCTATTTAAA) 3'

Primer R: 5' (ggCTTAAgTCCTTCC  
gACCCTggT) 3'

次に1210 bpPCR生成物1  $\mu$ gを鋳型として、ランダムプライマーを用いてBcaBEST DNA polymerase

(TaKaRa code: 2710A)でDNA合成の際に、Cy 3-dUTP (蛍光標識試薬)を取込ませて標識する。EDTAにて反応を止め、その後 Microcon-30を用いて余剰のCy 3-dUTPと random primerを除去し、エタノール沈殿する。全量を15  $\mu$ lの4 x SSC/0.2 %SDSに溶解し、プローブとする。

### ⑤ハイブリダイゼーションおよび洗浄

③で調整した蛍光標識サンプルを、②で調整したDNAチップ上で、ハイブリダイゼーションおよび洗浄を行う。

#### [ハイブリ]

ウシミトコンドリア用のDNAチップ上に15  $\mu$ lのプローブを滴下し、24mmx 45 mmのカバーガラスでカバーして、さらに蒸発を防ぐためにカバーガラスの上からシールをはり、飽和湿気中で2時間ハイブリを行った。

#### [洗浄]

ハイブリ後、シールとカバーガラスをはずし、2 x SSC/0.2% SDS (5分間) ついで0.2 x SSC (5分間) 洗浄する。洗浄後、遠心乾燥を行いスキャンし、蛍光の光具合でDNAの塩基配列を決定する。

### ⑥スキャンングおよびデータ解析

ハイブリダイゼーション、洗浄済みのDNAチップをスキャンングし、得られるデータを解析する。

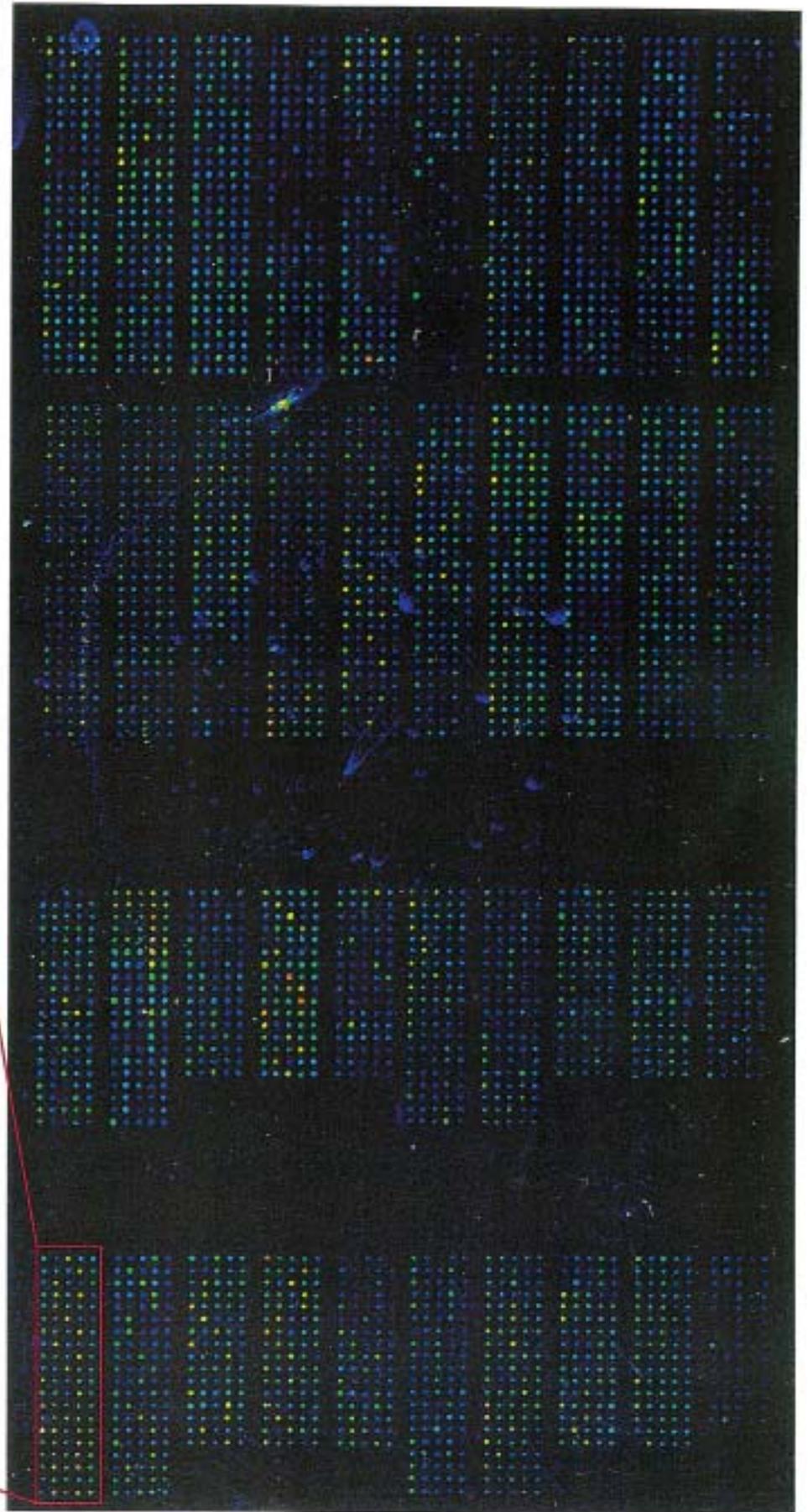
図5にDNAチップの一例を示した。581位から600位までの塩基配列決定のためそれぞれ5種類のプライマーをスライドガラス上に固定させ、蛍光標識プローブをハイブリさせた。581位ではCが、582位ではTが最も強く反応した。

# TMAC(TetraMethylAmmonium Chloride) 洗淨12hr

Laser Power=100%,PMT Gain=80% ,Probe=COWmt2-004Cy3 ラベル,template 2 $\mu$ gをRPラベル

COWmt2-004 PCR products 2 $\mu$ g  
↓ RP ラベル(Cy3)  
↓ ゲル濾過  
↓ エタ沈  
↓ Nuclease 処理  
↓ フェノ/クロ処理  
↓ エタ沈  
↓ 30  $\mu$ Lハイブリ buff. に溶解  
↓ 熱変性  
  
ハイブリ(37 $^{\circ}$ C,2hr)  
↓ 5 $\times$ SSC,4 $^{\circ}$ C,30min $\times$ 2  
↓ 3M TMAC 洗淨液,55 $^{\circ}$ C,12hr  
↓ 2 $\times$ SSC,RT,5min  
↓ 0.2 $\times$ SSC,RT,5min  
↓ Dry(1,000 rpm,5min)  
Scan

	A	G	C	T	D
581C					
582T					
583G					
584T					
585G					
586C					
587T					
588G					
589T					
590C					
591A					
592T					
593A					
594C					
595A					
596T					
597T					
598T					
599G					
600G					



## II. 詳細技術

### ①オリゴDNAのデザインに関して。

黒毛和種牛ミトコンドリアDNA配列のD-ループ全910bpは、GC含量38%であり、ATリッチなクラスターが多く存在し、さらにGCリッチな領域も部分的に存在する。そのため、オリゴDNAのデザインは、Tm値がそろうように、25 baseを基本に、11 baseから30 baseまで長さを種々変更してデザインした。また、変異を入れる部分は通常オリゴの中央であるが、TATATなど繁茂に存在する配列や、4個以上のタンデムに出てくる配列を解析するためのオリゴDNAの場合は、その配列が中央よりも5 base以内で外側に来るようにした。

### ②スポットするオリゴDNAの濃度に関して。

1mMで十分な感度が得られた。

### ③サンプルの蛍光標識に関して。

良い結果を得るためには標識サンプルは200?300base程度にする必要があるため、非蛍光標識PCRプライマーを用いてPCRを行いターゲット配列を増幅し、イソプロパノール沈殿した後、ランダムプライマーを用いてBca DNA PolymeraseによるCy 3- dUTPの取り込み標識を行った。Mung Bean Nuclease処理による更なる断片化を行い、フェノールクロロホルム処理、エタノール沈殿を行い、蛍光標識プローブとして次工程のハイブリダイゼーションを行った。超音波破碎による断片化は、ハイブリダイゼーション後のバックグラウンドが高くなる傾向が見られたので不採用にした。

### ⑤ハイブリダイゼーション、洗浄に関して。

特異性を上げるため、ある程度低い温度(37°C)でハイブリダイゼーションした後、洗浄温度をコントロールして特異的にハイブリダイゼーションし

たフラグメントのみを検出した。

### ⑥スキニングおよびデータ解析に関して。

スキニングは感度を変えて複数のデータを取り、解析を行ったが、コンピューターによる定量値は、サチレーションさえしていなければ、解析可能であるので、複数のデータを取る必要はない。各スポットの蛍光シグナルは、解析ソフトウェア「ImaGene」を用いて行った。さらに定量値は、表計算ソフト「Excel」を用いて最もシグナル値の高いシグナルを読む事で塩基配列の判定を行った。

## 3-5. 黒毛和種で見出されるミトコンドリアDNA多型のパターンの収集

全国的な規模で多種多様な遺伝的背景を持つ黒毛和種のDNAサンプルを収集し、DNAシーケンサーやDNAチップの手法を用いてミトコンドリアDNAのD-ループの塩基配列を調べた。

3-5-1. 配列を調べた黒毛和種の頭数は、1,524頭であった。

3-5-2. 黒毛和種で見られた変異は、101カ所であった。比較的頻度の高い変異箇所は、16024位-88.2%; 16093位-70.2%; 16302位-65.8%; 169位-66.5%であった。

3-5-3. 黒毛和種で見られたD-ループ配列には69パターンであった。比較的頻度の高い変異箇所である4変異を同時に持つ個体(黒毛和種配列パターン、#32)は、61.2%であった。

### 3-6. ブラインド試験とそのまとめ

3-5-3.のミトコンドリアDNA多型のパターンについて、全国的に収集した黒毛和種およびホルスタイン種に見られるDNA多型のパターンと照合した。黒毛和種102頭（内92頭に登録番号あり）およびホルスタイン種102頭（内10頭に登録番号あり）を用いたブラインド試験を行い、ミトコンドリアDNA多型を調べた。

黒毛和種の102頭の内82頭のミトコンドリアDNA多型のパターンは、表3に記載されたパターンと一致した（80.4%）。一方、ホルスタイン種では102頭の内36頭で一致し、35.3%であった。黒毛和種で最も多く見られた配列パターン#32は、ホルスタイン種102頭の内8頭（約8%）に認められた。もし、配列パターン#32がホルスタイン種で認められなければ、F1は配列パターン#32を持たないはずである。これらの配列パターン#32を有するホルスタイン種は種系由来かもしれない。

表3の結果をまとめると、ミトコンドリアDNA多型による検査手法では35.3%のF1（黒毛和種xホルスタイン種）は黒毛和種と間違えて鑑定され、正解率64.7%となる。





















## 第4章 毛色関連遺伝子の遺伝子型多型について

黒毛和種とホルスタイン種の外貌的な差は毛色に見られる。この表現型は親から子へと遺伝する形質なので、毛色に関わる特定の遺伝子の配列に品種特異的な違いが存在すると予想できる。マウスにおいて毛色に関わる遺伝子は60種類もあると予想されているが、同定されている毛色遺伝子は数種類に過ぎない。したがって、黒毛和種とホルスタイン種の外貌的な差に関わっている遺伝子についてはわかっていない可能性がある。

黒毛和種とホルスタイン種の間F1では毛色は黒であることから、ホルスタイン種における黒斑模様の形質 (spotting) は劣性であると考えられる。F1とホルスタイン種間のバッククロス家系を作成すれば、spottingの遺伝子座のマッピングができるが、経費および時間的な問題がある。当面、マウス等で明らかになっているspottingを中心とする4種類の遺伝子、MC1R、c-Kit、Steel、Agoutiについて、黒毛和種とホルスタイン種の間での塩基配列の差異を調べることとした。4種類の遺伝子、MC1R、c-Kit、Steel、Agoutiについて、ホルスタイン種14頭、黒毛和種194頭について遺伝子型を見た。

### 4-1. メラノコチンレセプター1型、MC1R (black/red)

ウシでは、ノルウェイ種とアイスランド種を用いたMC1R遺伝子解析の報告がある (Klungland, H., Vage, D. I., Gomez-Raya, L., Adalsteinsson, S. & Lien, S. (1995) The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coatcolor determination. *Mammalian*

*Genome*, 6, 636-639.)。この報告によると、MC1Rによる毛色はED (黒色)、E+A+ (褐色)、E+a (黒色)、e (赤色) に分類される。そこで、上記文献より次のようなプライマーを合成した。

E5: CAAGAACCGCAACCTGCACT

E6: GCCTGGTGGCCAGGACA

これらのプライマーを用いて、ウシ各個体のゲノムDNAより、EDとE+を区別するLue/Pro-99位を含むアミノ酸配列をコードする領域の138 bpをPCRで増幅させ、E5プライマーを用いて塩基配列を決定した。その結果を表4に示す。MC1Rの遺伝子型でホルスタイン種に多く見られるのはEDであり、84.6% (EDの遺伝子頻度： $1 + 11 \times 2 / 13 \times 2 = 88.5\%$ ) であるが、黒毛和種でも53.2% (EDの遺伝子頻度： $99 + 39 \times 2 / 187 \times 2 = 47.3\%$ ) 見られた。この結果を元に、ホルスタイン種と黒毛和種の間F1でのEDの個体の割合を推測すると41.9% (EDの遺伝子頻度：67.9%) となる。したがって、MC1R遺伝子の遺伝子型は品種鑑定には使えない。

### 4-2. c-Kit (white spotting)

c-Kit遺伝子のcDNA塩基配列はKubotaraにより明らかにされ (Kubota, T., Hikono, H., Sasaki, E. & Sakurai, M. (1994) Sequence of a bovine c-kit prot-oncogene cDNA. *Gene*, 141, 305-306.)、また、その遺伝子座は、ヘレフォード種交雑家系を用

塩基配列	99位アミノ酸残基	遺伝子型	ホルスタイン種	黒毛和種	F1, %
T	Leu (CTG)	E <sup>+</sup>	1 (7.7%)	48 (25.8%)	6.1
T/C	Leu/Pro	E <sup>+</sup> /E <sup>D</sup>	1 (7.7%)	99 (53.2%)	52.0
C	Pro (CCG)	E <sup>D</sup>	11(84.6%)	39 (21.0%)	41.9

表4. ウシMC1R 遺伝子の遺伝子型

いてBTA6にマップされている (Grosz, M. D. & MacNeil, M. D. (1999) The "spotted" locus maps to bovine chromosome 6 in a Hereford-Cross population. J. Hered. , 90, 233-236.)。そこでc-Kit 遺伝子のcDNA塩基配列を参考に、ホルスタイン種と黒毛和種1頭ずつについてタンパク質をコードしている領域を含む3 kb cDNAの塩基配列を決定して比較した。その結果、品種間で違いの認められるアミノ酸残基はなかったが、表5に示すような3箇所の一塩基多型 (SNP) を見出した。これらの一塩基多型 (SNP) について検討した。

表6に59Thr (ACC)/Thr (ACT) の一塩基多型 (SNP) について検討した結果をまとめた。黒毛和種ではTアリの頻度が高く (75.7%)、ホルスタイン種では低かった (14.4%)。両者のF1における個体での変異の型は、Cは20.8%、C/Tは68.3%、Tは10.9%と予想される。すなわち、ホルスタイン種と黒毛和種で、アリの頻度に違い

が見られたもののF1の鑑定へ有用とは考えられない。

表7に258Thr (ACG)/Met (ATG) の一塩基多型 (SNP) について検討した結果をまとめた。アリの頻度が黒毛和種でもホルスタイン種でも高いので、両者のF1における個体での変異の型でもCは76.4%と推定される。このアミノ酸変異はF1の鑑定には有用でなく、毛色とは無関係と考えられる。

#### 4-3. Steel: SCF, c-Kit ligand (white spotting)

マウスにおいて白斑 (white spotting) に影響することが明らかにされている。また、ウシでは、ベルジャン・ブルー種とショートホーン種において、雌の繁殖障害であるWhite Heifer Diseaseの原因遺伝子座roanがマップされていた (Charlier, C., Denys, B., Belanche, J. I., Coppierters, W., Grobet, L., Mni, M., Womack, J., Hanset, R. & Georges, M. (1996) Microsatellite

変異部位	ホルスタイン種	黒毛和種
59Thr (ACC)/Thr (ACT)	C	T
161Thr (ACA)/Thr (ACG)	A	A/G
258Thr (ACG)/Met (ATG)	C	C/T

表5. ウシc-Kit 遺伝子における一塩基多型 (SNP)

変異の型	ホルスタイン種	黒毛和種	F1
C	11 (78.5%)	8 (4.4%)	20.8%
C/T	2 (14.3%)	73 (39.9%)	68.3%
T	1 (7.2%)	102 (55.7%)	10.9%

表6. 59Thr(ACC)/Thr(ACT)

変異の型	アミノ酸残基の変異	ホルスタイン種	黒毛和種	F1
C	Thr	12 (100%)	109 (58.3%)	76.4%
C/T	Thr/Met	0 (0%)	69 (36.9%)	23.6%
T	Met	0 (0%)	9 (4.8%)	0%

表7. 258Thr(ACG)/Met(ATG)

mapping of the bovine roan locus: a major determinant of White Heifer Disease. *Mammalian Genome*, 7, 138-142.) が、1999年にSteel遺伝子 (MGFともいう) に原因となるミスセンス変異が発見された (Seitz, J. J., Schmutz, S. M., Thue, T. D. & Buchanan, F. C. (1999) A missense mutation in the bovine MGF gene is associated with the roan phenotype in Belgian Blue and Short horn cattle. *Mammalian Genome*, 10, 710-712.)。

Seitzらの報告を参考にして、ホルスタイン種と黒毛和種1頭ずつでSteel遺伝子のアミノ酸をコードしている領域を含む900bpのcDNAの塩基配列を決定し比較したが、アミノ酸の変異やSNPは見いだせなかった。

#### 4-4. Agouti (black/brown)

マウスにおいて肥満とともに毛色 (黄色) に影響する遺伝子として知られている。ウシのAgouti遺伝子配列はGenBankに登録されていた (B. taurus mRNA for agouti protein. GenBank Accession No. X99692, B. taurus DNA for agouti gene. GenBank Accession No. X99691) ので、その情報に基づいてホルスタイン種2頭、黒毛和種1頭でアミノ酸をコードしている領域 400bp部分のcDNAの塩基配列について調べた。ホルスタイン種ではPCR増幅されなかったが、黒毛和種のAgouti遺伝子の塩基配列を決定した。ウシAgouti遺伝子は3つのエクソンからなるので、それぞれのエクソンを含む領域をPCR増幅させ、ホルスタイン種2頭と黒毛和種2頭のDNAについて塩基配列を比較した結果、イントロン中にSNPが1個所見出された。この配列番号

4806位のSNPについて調べた。

表8に配列番号4806位のSNPについて調べた結果をまとめた。アレルAの頻度は、ホルスタイン種で65.4% (7x2+3/13x2)であり、黒毛和種では78.8% (47x2+10/65x2)と両品種間に差はなかった。両者のF1における個体での変異の型でもAは51.5%と推定される。品種鑑定には使えない。

#### 4-5. 毛色関連遺伝子の解析のまとめ

マウス等で明らかになっているspottingを中心とする4種類の遺伝子、MC1R、c-Kit、Steel、Agoutiについて、黒毛和種とホルスタイン種の間での塩基配列の差異を調べたが、見出された一塩基多型 (SNP) がホルスタイン種や黒毛和種と両者間のF1を識別できるかどうかをアレル頻度をもとに推定した。その結果、品種鑑定に有用なものは見出すことができなかった。両品種の明らかな外貌の違いを支配する遺伝子座はまだ見つかっていないと思われる。マウスにおいては毛色に関係する遺伝子は60種類以上あると推定されている。品種鑑定に有用な遺伝子座を見出すためには、黒毛和種とホルスタイン種の間でF1を、ホルスタイン種と交配させたバッククロス家系を作成し、毛色に関しての連鎖解析を実施するのがベストであると考えられる。

変異の型	ホルスタイン種	黒毛和種	F1
A	7 (63.6%)	47 (72.3%)	51.5%
A/T	3 (27.3%)	10 (15.4%)	41.2%
T	1 (9.1%)	8 (12.3%)	7.3%

表8. Agouti遺伝子の配列番号4806位のSNP

## 第5章 RAPD-PCRで見出される一塩基多型 (SNP) について

1990年にJ. G. K. Williamsら(Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. DNAPolymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. (1990) *Nucleic Acids Research*, 18, 6531-6535.)によってRAPD (random amplified polymorphic DNA; ランダムにPCR増幅させた多型性DNA) -PCR法が、J. Welsh & M. McClelland(Welsh, J. & McClelland, M. Fingerprinting genomes using PCRwith arbitrary primers. (1990) *NucleicAcids Research*, 18, 7213-7218.)によってAP (arbitrarily primed; ゲノムの任意の箇所を増幅させる) -PCR法が発表された。これらの2つの手法はともに原理的には同じで、DNAの配列とは無関係の1種類のプライマーを用い、PCRのアニーリング温度を低く設定することによって、特異性を低くしたPCRを行い、ゲノム中の多数の箇所を増幅させるものである。

具体的には、RAPDは10mer程度の短いプライマー (通常のPCRでは20merくらい) を用い、アニーリング温度40°C(通常のPCRでは55-60°C)でPCRを行い、アガロース電気泳動により、得られたPCR生成物を調べる (図6 a、6 b)。

### RAPD-PCRの条件

94°C 5 min

94°C 1 min slope 1 min 14 sec

42°C 1 min slope 49 sec

72°C 3 min slope 43 sec

40 cycles

72°C 5 min

10°C 99.99

図6 bの左側のパネルに示すように、K1プライ

マーで増幅するPCR生成物は10種類以上認められる。それらのPCR生成物中、矢印で示す生成物は黒毛和種5頭すべてに見られるが、ホルスタイン種7頭には見られない。すなわち、K1プライマーで増幅した矢印の生成物は黒毛和種特異的である可能性がある。一方、図6 bの右側のパネルに示すように、H1プライマーで増幅するPCR生成物も10種類以上認められる。それらのPCR生成物中、矢印で示す生成物はホルスタイン種7頭すべてに見られるが、黒毛和種5頭には見られない。すなわち、H1プライマーで増幅した矢印の生成物はホルスタイン種特異的である可能性がある。このような実験を繰り返して、黒毛和種とホルスタイン種にそれぞれ特異的な増幅をするPCRプライマーを見出す。PCR増幅するかどうかはプライマーの結合するDNA領域の配列の違いによるので、最終的には配列の違いを見出す。この配列の違いを一塩基多型 (SNP) といい、SNPを検出するアレル特異的PCR検査法を確立する。

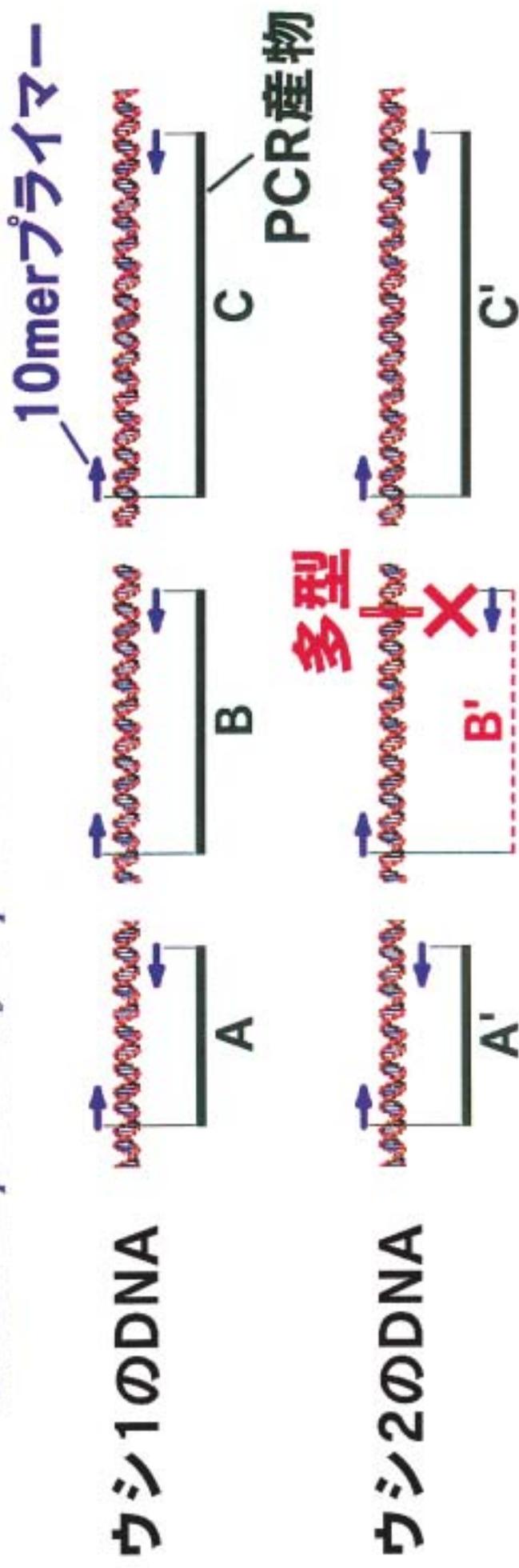
RAPD-PCR法は特異性の弱いPCRを行うので、微妙な実験条件に左右されやすく、実験の再現性に問題がある。RAPD-PCR法は、SNP化する候補部位を検出するためのスクリーニング法として優れているので、第一次および第二次スクリーニングにおいて用い、候補部位が絞られてくれば、特異的な手法に変えなければならない。

また、品種鑑定における有用性を推定するために同一品種内のアレル頻度を決定しなければならないが、RAPD-PCR法では該当するアレルがホモかヘテロかの区別が付かない。その個体のアレルがホモであっても、ヘテロであっても、同様なPCR生成物のバンドとして検出されるという問題がある。

すなわち、塩基配列の多型を同定し、その多型を区別できるアレル特異的PCR条件を決定して、該当するアレルが0個、1個、あるいは2個存在するのかを明確にする。その決定された条件で多数のサンプルを試験して、該当する部

# RAPD-PCR

*Random Amplified Polymorphic DNA PCR*



PCRがかからない

ウシ1 ウシ2



アガロース電気泳動

パターンが違う

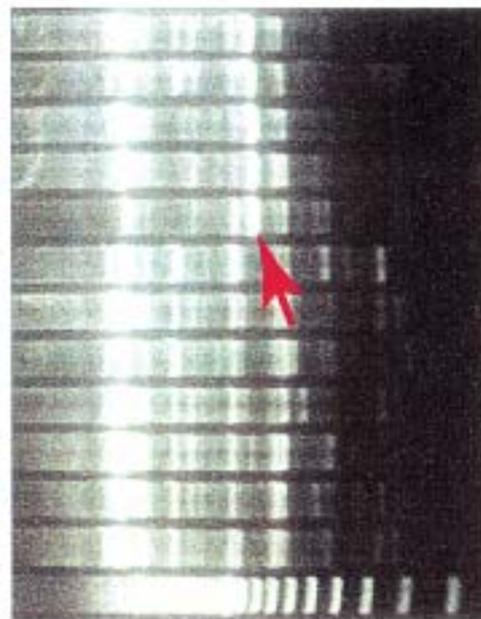
品種が違う

# RAPD-PCR法による黒毛和牛とホルスタインの鑑別

血液細胞由来DNAをテンプレートとしたスタンダード

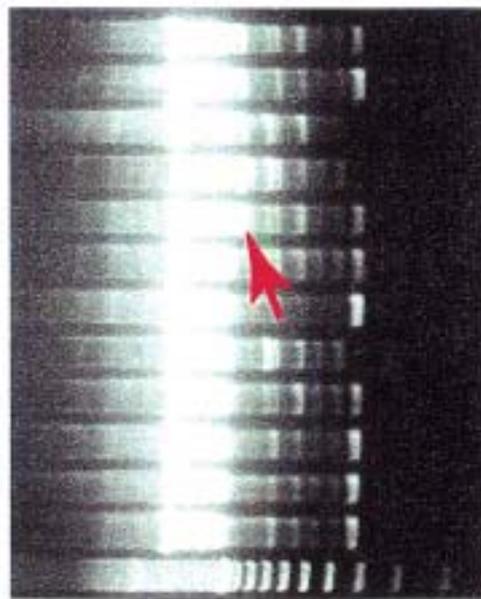
K-1プライマー

ホルスタイン 黒毛和牛



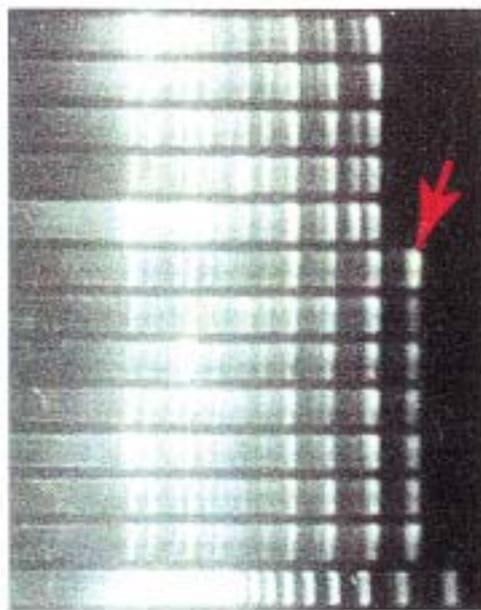
K-2プライマー

ホルスタイン 黒毛和牛



H-1プライマー

ホルスタイン 黒毛和牛



位のSNPが品種鑑定にどの程度有用なのかを正確に判断する。以下、実際にSNP化し、設定したアレル特異的PCRの結果について述べる。

## 5-1. RAPD-PCRを用いたSNP候補部位のスクリーニング

ホルスタイン種と黒毛和種、さらにはF1と黒毛和種を区別するためのマーカーを得るためRAPD-PCRの手法を用いて、SNP候補部位のスクリーニングを行った。

### 5-1-1. 一次スクリーニング

計1,140本のRAPD-PCR用プライマーについて、黒毛和種8頭、ホルスタイン種8頭で一次スクリーニングを行った。その内、黒毛和種とホルスタイン種の間で異なるPCR生成物の見られる25本を選択した。

### 5-1-2. 二次スクリーニング

一次スクリーニングで選択した25本のプライマーについて、検査する個体数を黒毛和種は109頭、ホルスタイン種は107頭に増やして二次スクリーニングを行った。その結果、表9に示すように14本のプライマーを得ることができた。内訳は、黒毛和種特異的8本、ホルスタイン種特異的6本であった。

## 5-2. SNPの開発

品種特異的なPCR生成物を与えるのが、ゲノム上のどのような塩基配列の違い(SNP)によるのかを決定し、ホルスタイン種または黒毛和種の集団内でのアレル分布を比較するために、以下の手順をふんだ。

- (1) 特異的バンドのクローニング。
- (2) その塩基配列をもとにBACクローンをPCRスクリーニング。
- (3) BACクローン上の、RAPDプライマー結合領域を含む領域の塩基配列の決定。
- (4) ゲノムより、RAPDプライマー結合領域を含む領域をPCR増幅し、特異的

バンドを与えるアレルと与えないアレルの塩基配列の差異を決定。

- (5) ホルスタイン種集団(107頭)と黒毛和種集団(109頭)におけるアレル頻度およびアレル分布を調査。

## 5-3. SNP開発の現状

RAPD-PCR法による二次スクリーニングの結果、14種のプライマーを得たが、それぞれについて3-2.で述べた方法でホルスタイン種と黒毛和種の間で多型を示す部位のSNP化を行った。これら14座位についてのSNP開発の現状は表9に示した。

14座位中8座位についてアレル間の塩基配列の差異を決定し、SNP化することに成功した。SNP化できていない残り6座位は次のような段階にある：

クローニングの段階、	1座位
BACスクリーニングの段階、	2座位
SNPを検出する段階、	1座位
中断(目的のBACが得られていない)	2座位

SNP化した8座位を次に示す：

ホルスタイン種特異的座位(4座位)：
AX14, AD15, R13, AB11
黒毛和種特異的座位(4座位)：
AD1, K1, K2, AM9

## 5-4. アレル特異的PCR

SNP化された8座位について、それぞれアレル特異的PCRのためのプライマーを作成した。ホルスタイン種集団(107頭)と黒毛和種集団(109頭)を用いてアレル特異的PCRを行い、それぞれの集団内でのアレル分布を調べた(表10)。

ホルスタイン種：
AX14, AD15, R13, AB11
黒毛和種：AD1, K1, K2, AM9

表10において、ホルスタイン種特異的なSNPは白色で示し、黒毛和種特異的なSNPは

Primer name (特異性)	RAPD結果						クロー ニング	BACスク リーニング	アリル間の塩基配列の差異 (RAPD-/+)	アリル特異的PCR によるアリル分布 の解析
	ホルスタイン (107頭)			黒毛和種 (109頭)						
	+	-	ND	+	-	ND				
T-16 (黒毛+)	2 (1.9%)	105 (98.1%)	-	47 (43.1%)	62 (56.9%)	-	O.K.	未		
AD1(黒毛+)	4 (3.8%)	102 (95.3%)	1 (0.9%)	40 (36.7%)	61 (56.0%)	8 (7.3%)	O.K.	O.K.	-T-/-G-	O.K.
K2(黒毛+)	3(2.8%)	101(94.4%)	3(2.8%)	51(46.8%)	45(41.3%)	13(11.9%)	O.K.	O.K.	-T-/-C-	O.K.
K1(黒毛+)	5 (4.7%)	98 (91.6%)	4(3.7%)	82 (75.2%)	16 (14.7%)	11(10.1%)	O.K.	O.K.	-T-G-/-C-A-	O.K.
Q-2 (黒毛+)	10 (9.3%)	97 (90.7%)	-	55 (50.5%)	50 (45.9%)	4 (3.7%)	O.K.	中断		
AH-15 (黒毛+)	10 (9.3%)	96 (89.7%)	1 (0.9%)	61 (56.0%)	48 (44.0%)	-	O.K.	O.K.	未	
AM9 (黒毛+)	16 (15.0%)	90 (84.1%)	1 (0.9%)	86 (78.9%)	23 (21.1%)	-	O.K.	O.K.	-G-/-A-	未
AG10 (黒毛+)	26 (24.3%)	78 (72.9%)	3 (2.8%)	87 (79.8%)	17 (15.6%)	5 (4.6%)	未			
AX14 (ホルス+)	38 (35.5%)	63 (58.9%)	6 (5.6%)	5 (4.6%)	103 (94.5%)	1 (0.9%)	O.K.	O.K.	-T-/-C-	O.K.
AB-1 (ホルス+)	43 (40.2%)	64 (59.8%)	-	7 (6.4%)	102 (93.6%)	-	O.K.	中断		
AD15 (ホルス+)	42 (39.3%)	61 (57.0%)	4 (3.7%)	3 (2.8%)	101 (92.7%)	5 (4.6%)	O.K.	O.K.	-A-/-TGCCCCGTG-	O.K.
R13 (ホルス+)	44 (41.1%)	63 (58.9%)	-	19 (17.4%)	90 (82.6%)	-	O.K.	O.K.	-△-/-TGT-	O.K.
AB-11 (ホルス+)	97 (90.7%)	10 (9.3%)	-	26 (23.9%)	83 (76.1%)	-	O.K.	O.K.	-G-/-C-	O.K.
X1 (ホルス+)	58 (54.1%)	46 (43.0%)	3 (2.8%)	28 (25.7%)	81 (74.3%)	-	O.K.	未		

表9. RAPD-PCRによる検索結果と塩基配列の差異の決定

青色で示した。また、RAPD-PCRで増幅しなかったアレルを黄色で示した。

## 5-5. SNPを用いた品種鑑定の試算

表10より求めたアレル頻度から、品種鑑定での有用性を推定した結果を表11にまとめている。

ホルスタイン種特異的アレルであっても、そのアレルを保有していないホルスタイン種の個体がマイナーな割合で存在する。その逆に、黒毛和種特異的アレルであっても、そのアレルを保有していない黒毛和種の個体がマイナーな割合で存在する。したがって、複数の座位の中でホルスタイン種特異的アレルを1種類でも持つ個体をホルスタイン種あるいはF1とし、複数の座位の中で黒毛和種特異的アレルを1種類でも持つ個体を黒毛和種とした。どのホルスタイン種特異的アレルも保有していない個体を黒毛和種とし、どの黒毛和種特異的アレルも保有していない個体をホルスタイン種とした。すなわち、ホルスタイン種特異的アレルおよび黒毛和種特異的アレルの両方を保有する個体をF1とした。

**試算1：**ホルスタイン種特異的な3座位であるAX14, AD15, AB11と黒毛和種特異的な3座位であるK1, K2, AM9の計6座位を用いることにより、F1集団(75%)、黒毛和種集団(79%)、ホルスタイン種集団(78%)が分離できると思われる(表11上)。

**試算2：**AM9をAD1に置き換えることによって、F1および黒毛和種の判別率はほとんど変わらないものの、ホルスタイン種集団の分離を92%にあげることができた(表11中)。

**試算3：**黒毛和種特異的であるAD1, K1, K2, AM9およびホルスタイン種特異的であ

るAX14, AD15, R13, AB11の計8座位を用いることにより、F1集団(85%)、黒毛和種集団(74%)、ホルスタイン種集団(75%)が分離できると思われる(表11下)。

## 5-6. 今後の課題

引き続き、RAPDの残り4座位のSNPの決定を行い、より判別率の高い座位の組み合わせを選ぶ。また、AFLPの手法で神戸大によって開発された座位のSNP化を協力して行い、優れた座位を活用する。品種鑑定の確率を上げるには、ホルスタイン種特異性の高い座位と黒毛和種特異性の高い座位の両方が必要である。開発されるSNP数を増やすことも重要である。

今後は、実際に黒毛和種とホルスタイン種間のF1のサンプルを入手し、黒毛和種とホルスタイン種の混在する条件でブラインド試験を実施して、鑑定能力を確認することも必要になる。

(注) ビー・エム・エル社との共同研究成果「手の品種鑑別法」として特許共同出願。

K-1 アレルタイプ	ホルスタイン		黒毛和種	
	頭数	%	頭数	%
AA	102	95.3	18	16.5
AC	5	4.7	61	56.0
CC	0	0.0	30	27.5
判定不可	0	0.0	0	0.0
TOTAL	107	100.0	109	100.0

AD15 アレルタイプ	ホルスタイン		黒毛和種	
	頭数	%	頭数	%
II	1	0.9	0	0
ID	40	37.4	1	0.9
DD	60	56.1	93	85.3
判定不可	6	5.6	15	13.8
TOTAL	107	100.0	109	100.0

K-2 アレルタイプ	ホルスタイン		黒毛和種	
	頭数	%	頭数	%
DD	104	97.2	51	46.8
DE	3	2.8	50	45.9
EE	0	0.0	8	7.3
判定不可	0	0.0	0	0.0
TOTAL	107	100.0	109	100.0

AB11 アレルタイプ	ホルスタイン		黒毛和種	
	頭数	%	頭数	%
GG	16	15.0	95	87.2
CG	30	28.0	12	11.0
CC	61	57.0	2	1.8
判定不可	0	0.0	0	0.0
TOTAL	107	100.0	109	100.0

AX14 アレルタイプ	ホルスタイン		黒毛和種	
	頭数	%	頭数	%
TT	70	65.4	94	86.2
TC	18	16.8	1	0.9
CC	2	1.9	0	0.0
判定不可	17	15.9	14	12.8
TOTAL	107	100.0	109	100.0

R13 アレルタイプ	ホルスタイン		黒毛和種	
	頭数	%	頭数	%
II	5	4.7	1	0.9
ID	32	29.9	10	9.2
DD	65	60.7	83	76.1
判定不可	5	4.7	15	13.8
TOTAL	107	100.0	109	100.0

AD1 アレルタイプ	ホルスタイン		黒毛和種	
	頭数	%	頭数	%
GG	0	0.0	34	31.2
TG	1	0.9	36	33.0
TT	106	99.1	37	33.9
判定不可	0	0.0	2	1.8
TOTAL	107	100.0	109	100.0

AM9 アレルタイプ	ホルスタイン		黒毛和種	
	頭数	%	頭数	%
WW	1	0.9	30	27.5
WH	17	15.9	56	51.4
HH	89	83.2	17	15.6
判定不可	0	0.0	6	5.5
TOTAL	107	100.0	109	100.0

RAPD-PCRで(-)

表10. アレル特異的PCRによるアレル分布の解析

		黒毛特異的マーカー(K1, K2, AM9)	
		いずれかが(+)	すべて(-)
ホルスタイン特異的マーカー (AX14, AB11, AD15)	いずれかが(+)	ホルの22頭 (20.6%) F1 (75%) 黒毛の20頭 (18.3%)	ホルの83頭 (77.6%) F1 (12%)
	すべて(-)	ホルの2頭 (1.9%) F1 (13%) 黒毛の86頭 (78.9%)	黒毛の3頭 (2.8%)

		黒毛特異的マーカー(K1, K2, AD1)	
		いずれかが(+)	すべて(-)
ホルスタイン特異的マーカー (AX14, AB11, AD15)	いずれかが(+)	ホルの9頭 (8.4%) F1 (72%) 黒毛の15頭 (13.8%)	ホルの98頭 (91.6%) F1 (15%)
	すべて(-)	ホルの0頭 (0%) F1 (13%) 黒毛の90頭 (82.6%)	黒毛の4頭 (3.7%)

		黒毛特異的マーカー(K1, K2, AM9, AD1)	
		いずれかが(+)	すべて(-)
ホルスタイン特異的マーカー (AX14, AB11, AD15, R13)	いずれかが(+)	ホルの26頭 (24.3%) F1 (85%) 黒毛の26頭 (23.9%)	ホルの80頭 (74.8%) F1 (6.4%)
	すべて(-)	ホルの1頭 (0.93%) F1 (8.6%) 黒毛の81頭 (74.3%)	黒毛の2頭 (1.8%)

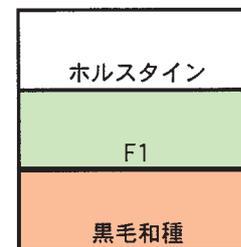


表11. SNPを用いた品種鑑定の試算

## 第6章 AFLP法を用いた黒毛和種とホルスタイン種およびその雑種第一代 (F1) の鑑別

(共同研究) 笹崎晋史・有光誠司・井藤健介・万年英之・辻 荘一  
(神戸大学農学部応用動物遺伝学講座)

### 6-1. 序論

現在、わが国で飼養されている肉用牛は、黒毛和種、褐色和種、無角和種、日本短角種の和牛4品種と、若干のヘレフォード種、アンガス種など外国種である。和牛は、明治～昭和初期にかけて、当初は体格の改善を目的として、デボン種、ブラウンスイス種、シンメンタール種、ショートホーン種などの品種と交配し、日本の気候、風土に合うように改良された。その後、耕運機の導入などの機械化による牛の役割の転換によって、肉専用種としての改良が加えられ、今日に至っている。和牛4品種の中でも、黒毛和種は、その肉質の良さから市場でも高く評価され、高級牛肉の主な供給源となっている。また国際的にも、その肉質の良さは高い評価を得ている(福島, 1972; 並河, 1972)。他方、ホルスタイン種は世界を代表する乳牛で、泌乳能力に優れ、わが国では乳用種のほぼ全てがこの品種で占められている。この品種も明治時代において、国民の体格改善を目指して乳製品の摂取が推進されたのを機に、その種雄牛が外国から輸入され、在来牛の雌牛に累進交配されて、乳用牛の増頭がはかられた経緯がある(加茂, 1976; 日本ホルスタイン登録協会, 1967)。近年、ホルスタイン種の雄子牛は、肥育用素牛として出荷され、肥育後に食肉として販売されている。この品種の生産する牛肉は、肉質の点では黒毛和種に劣るが、その枝肉は安価で、大衆肉として好まれて来た。ところが牛肉の輸入自由化に伴い、ホルスタイン種牛肉と競合する外国産の安価な牛肉が市場に出回るようになったため、ホルスタイン種の枝肉の需要が激減した。そこで、外国産の安価な牛肉に対抗するた

め、国内では、ホルスタイン種雌牛と黒毛和種雄牛を交配して作ったF1からの牛肉生産が盛んになってきた。このF1の肉質は黒毛和種とホルスタイン種の間で、毛色を見た限りでは黒毛和種と見分けが付きにくく、時として、黒毛和種高級和牛肉と偽って販売されていることがあって、問題となっている。F1牛肉を黒毛和種牛肉と表示し、販売することは不当表示にあたり、これらを正しく区別し、そのソースを表示することは、販売する側の責任である。

近年になって遺伝子工学が飛躍的に発展し、DNA分析に基づく遺伝学的な分析が加えられるようになった。家畜では『DNA多型に基づく家畜選抜』を行う一環として、DNA多型マーカーの開発が行われるようになってきた(万年, 1998)。DNA多型は遺伝標識として有用で、それをマーカーとして、家畜では血統登録、個体識別、親子判定、病原遺伝子のキャリア個体の除去などに利用されるようになった。そして、さらには、QTL (Quantitative Trait Loci) と呼ばれる成長、肉質、乳量などの経済形質に関わる遺伝子座に連鎖するマーカーを用いて家畜選抜を行う、いわゆるMAS選抜 (Marker Assisted Selection) のためのマーカーの開発も進められている。DNAマーカーには、マイクロサテライトマーカー、ミニサテライトマーカー、RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) マーカー、RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism) マーカーなどがあるが、中には、再現性が低かったり、全ゲノム情報を反映していなかったり、DNAの塩基配列情報を必要としたりするなどの欠点を持つものがある。その中で、最近注目されるようになったのが

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 法である (Vos *et al.*, 1995)。この方法は、制限酵素を用いた多型解析法であり、上で述べた欠点を補っている。そのため、AFLP法は比較的簡単に多くのゲノム情報を得る多型解析法として注目されている。

本研究では、黒毛和種とホルスタイン種の品種間での塩基配列の違いを検出するためにAFLP法を用いた。品種間での塩基配列の違いが、制限酵素断片パターンの違いとして検出できれば、そのバンドがDNAマーカーとして両品種の識別に利用できると考えられる。さらに、そうして得られた両品種に特異的なバンドを両方持つ個体が見つければ、その個体がF1であると判断できる。よって本研究では、AFLP法を用いた黒毛和種とホルスタイン種およびそのF1を識別可能にする品種特異的なDNAバンドの検索を試みた。さらに、こうして検出されたDNAバンドを用いて品種鑑別を簡便に行うために、AFLP法で得られた多型の原因となっている塩基配列の特定を行った。

## 6-2. 材料および方法

### 6-2-1. 供試動物

肉牛である黒毛和種と乳牛であるホルスタイン種およびそのF1の3品種、各100-200頭を実験に供した。これらのサンプルの詳細を次に示す。黒毛和種は1992年に開催された第6回全国和牛能力共進会出品牛のうち、同一県、同一種雄牛に偏らないように100頭を選んだ。ホルスタイン種は、岐阜県境川市の屠場より譲り受けた肝臓組織サンプル40頭分、伊藤ハム鳴尾浜工場より譲り受けたリンパ節のサンプル9頭分、東条町の酪農家の鷹尾氏より譲り受けた血液サンプル4頭分、および高知県下のホルスタイン種雄牛の精液サンプル7頭分を用いた。また、畜産技術協会付属動物遺伝研究所より、黒毛和種およびホルスタイン種のゲノムDNA各120個体分を譲り受けた。F1は、北海道士別市早川牧場から25頭、群馬県茂木牧場から25頭、兵庫県飾磨郡村田牧場か

ら25頭、をそれぞれ採取した。

### 6-2-2. 実験操作法

#### 1) ゲノムDNAの精製

ウシゲノムDNAは、肝臓組織、リンパ節、血液、あるいは精液より抽出、精製した。

#### 1)ー1 肝臓組織からのDNA精製

組織からのゲノムDNAは、以下のように抽出した。組織約1.0gを、ホモジナイザーを用いて、ホモジナイズし、TNE溶液 (10mM Tris-HCl pH7.5, 0.1M NaCl, 1mM EDTA) 20mlを加えながら、ガーゼを用いて濾過し、3,000rpmで10分間遠心分離した。その後、上清を除き、TNE溶液を15ml加え、良く混和して、再び3,000rpmで10分間遠心分離し、上清を除いた。そして、生理食塩水/EDTA (0.16M NaCl, 1mM EDTA) 1mlに良く混和し、ザルコシル溶液 (0.5% N-lauroylsarcosine sodium salt, 10mM Tris-HCl pH8.0, 10mM EDTA) 15ml加えて、DNAを切断しないようにゆっくりと振とうして、DNAを溶出させた。そして、Proteinase K溶液 (10mg/ml in water) 200 $\mu$ lを加え、37℃で一晩インキュベートした。当量のTE-フェノール (フェノールを60℃で溶かし、TE (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA) で水飽和し、0.1%になるように8-hydroxyquinolineを加えたもの) を加え、10分間ゆっくりと混和した。3,000rpm 10分間遠心分離し、水層とフェノール層の間にできる蛋白質を取らないように、水層を分取した。この水層にフェノール・クロロフォルム・イソアミルアルコール (25:24:1, 0.05%の8-hydroxyquinolineを含む) を加え、10分間遠心分離し、水層を分取した。この水層に当量のクロロフォルム・イソアミルアルコール (24:1) を加え、10分間混和した後、3,000rpmで5分間遠心分離した。次に、水層を分取し、当量のジエチルエーテルを加え、白色になった水層が透明になるまでやや強めに振とうした後、3,000rpmで数秒間遠心分離し、エーテルを通風除去した。そして、10分の1量の3M酢酸ナトリウム溶液 (酢酸でpH5.2

に調整)を加え、冷却した100%エタノールを2倍量混合し、DNAを沈殿させた。そして、そのDNAは70%エタノールで洗浄し、室温で乾燥させた後、2mlのTEに溶解して、4℃で保存した。

#### 1)–2 リンパ節からのDNA精製

リンパ節約0.5gをテフロン・ペッスルとステンレスメッシュを用いて、生理食塩水/EDTA中ですり潰し、ガーゼで濾過した後、3,000rpmで10分間遠心分離した。その後、上清を除去し、20mlの生理食塩水/EDTAの加えよく混和し、再び3,000rpmで10分間遠心分離した。そして、上清を除き、約1mlの生理食塩水/EDTAによく混和し、20mlのザルコシル溶液を加えて、DNAを溶出させた。その後の操作は、肝臓組織からのDNAの精製と同様に行った。

#### 1)–3 全血からのDNA精製

約10mlの全血を3,000rpmで10分間遠心分離し、パスツールピペットを用いて白血球層を分取した。40mlの0.2%NaCl溶液を加えてよく混和して血球を溶血させ、3,000rpmで10分間遠心分離し、上清を除いた。その後、0.5mlの0.16M NaCl, 1mM EDTA溶液を加えてよく懸濁した後、20mlのザルコシル溶液を加え、DNAを切断しないようにゆっくりと振とうし、DNAを溶出させた。その後の操作は、肝臓組織からのDNAの精製と同様に行った。

#### 1)–4 精子からのDNA精製

精液ストローから取り出した精液を生理食塩水(0.16M NaCl in water)によく混和し、3,000rpm 10分間遠心分離し精子を沈殿させた。この操作を数回繰り返し、精子を洗浄した。その後、0.5mlの生理食塩水/EDTA(0.16M NaCl, 1mM EDTA)によく混和し、30mlのグアニジン溶液(4M guanidine thiocyanate, 25mM sodium acetate, 0.84%  $\beta$ -mercaptoethanol)を加え、50℃で2時間インキュベートし、DNAを溶出させた。そして、37℃で一晩インキュベートした後、0.6倍量のイソプロパノールを加え、DNAを析出させた。70%エタノールで析出したDNAが半透

明になるまで数回洗浄し、通風によりエタノールを除いて約20mlのTEに溶解させた。100分の1量のProteinase K溶液を加え、37℃で一晩インキュベートした。その後の操作は、肝臓組織からのDNAの精製と同様に行った。

#### 2) DNAの定量

DNAの定量は260nmの吸光度の測定で行った。OD260=1.00は、2本鎖のDNAが $50\mu\text{g/ml}$ の濃度に相当する。また、同時に280nmの吸光度も測定し、OD260/OD280比が $1.8\pm 0.1$ であれば、蛋白質、界面活性剤、フェノールなどの不純物のない、純度の高いDNAを回収できたとみなした。

#### 3) AFLP法

AFLP法における操作は、基本的には、Vos *et al.* (1995)の方法に従って行い、方法の詳細については、以下に示す。

##### 3)–1 制限酵素によるDNAの切断

制限酵素はfrequent cutterとしてMse IとTaq Iの2種類、rare cutterとしてEcoR Iを用い、Mse I/EcoR IとTaq I/EcoR Iの2通りの組み合わせで500ngのDNAを切断した。

##### Mse I/EcoR Iによる切断

10×制限酵素 buffer  $2.5\mu\text{l}$ 、10×BSA  $1.0\mu\text{l}$ 、Mse I ( $4\text{unit}/\mu\text{l}$ )  $1.25\mu\text{l}$ 、超純水 $0.25\mu\text{l}$ 、DNA溶液 $20\mu\text{l}$ をよく混和し、37℃で1時間インキュベートした。その後、超純水 $12\mu\text{l}$ 、10×制限酵素 buffer  $2.5\mu\text{l}$ 、EcoR I ( $10\text{unit}/\mu\text{l}$ )  $0.5\mu\text{l}$ を加えてよく混和し、37℃で1時間インキュベートした。

##### Taq I/EcoR Iによる切断

10×制限酵素 buffer  $2.0\mu\text{l}$ 、Taq I ( $10\text{unit}/\mu\text{l}$ )  $1.0\mu\text{l}$ 、DNA溶液 $17\mu\text{l}$ をよく混和し、65℃で1時間インキュベートした。その後、超純水 $17\mu\text{l}$ 、10×制限酵素 buffer  $2.0\mu\text{l}$ 、EcoR I ( $10\text{unit}/\mu\text{l}$ )  $1.0\mu\text{l}$ を加えてよく混和し、37℃で1時間インキュベートした。

##### 3)–2 アダプターの付加

制限酵素で処理した断片にMse IまたはTaq Iアダプター、EcoR Iアダプターを付加した。アダプター配列については表1に

示した。DNA溶液40 $\mu$ lに、10 $\times$ ligase buffer 1.0 $\mu$ l、1mM ATP 1.0 $\mu$ l、Mse I またはTaq I アダプター (25pmol/ $\mu$ l) 2.0 $\mu$ lとEcoR I アダプター (2.5pmol/ $\mu$ l) 2.0 $\mu$ l、T4 DNA ligase (5unit/ $\mu$ l) 0.2 $\mu$ l、超純水3.8 $\mu$ l計10 $\mu$ lの溶液を加えて全量を50 $\mu$ lとし、37 $^{\circ}$ Cで3時間インキュベートした。その後、10mM Tris-HCl/0.1mM EDTA (pH8.0) で10倍に希釈し、これをPCRのための鋳型DNAとした。また得られた産物は-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

### 3)–3 PCR 反応

#### (1st PCR : Pre-selective amplification)

アダプターを付加した鋳型DNA 5.0 $\mu$ lに10 $\times$ PCR buffer (100mM Tris-HCl pH8.3、15mM MgCl<sub>2</sub>、500mM KCl) 5.0 $\mu$ l、dNTP Mixture (2.5mM each) 4.0 $\mu$ l、Takara EX-Taq Polymerase (5unit/ $\mu$ l) 0.2 $\mu$ l、1つの塩基を付加させたMse I またはTaq I プライマー、EcoR I プライマーをそれぞれ75ng加え、超純水で全量を50 $\mu$ lとして反応を行った。反応はサーマルサイクラーを用い、反応条件は94 $^{\circ}$ C 30秒、56 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 1分を1サイクルとして30サイクルを繰り返した後、72 $^{\circ}$ C 10分の伸長反応を行うよう設定した。またPCR後の産物は超純水で10倍希釈し、-20 $^{\circ}$ Cで保存した。1st PCRに用いたプライマーの配列は表1に示した。

### 3)–4 PCR反応

#### (2nd PCR : Selective amplification)

1st PCRで得られた産物5.0 $\mu$ lに、10 $\times$ PCR buffer 2.0 $\mu$ l、dNTP Mixture 1.6 $\mu$ l、Takara EX-Taq Polymerase (5unit/ $\mu$ l) 0.08 $\mu$ l、3つの塩基を付加させたMse I またはTaq I プライマー30ng、EcoR I プライマー5ngをそれぞれ加え、超純水で全量を20 $\mu$ lとして反応を行った。反応はサーマルサイクラーを用い、反応条件は94 $^{\circ}$ C 30秒、65 $^{\circ}$ C 30秒、72 $^{\circ}$ C 1分を1サイクルとして13サイクル繰り返した後、さらに94 $^{\circ}$ C 30秒、56 $^{\circ}$ C 30秒、72 $^{\circ}$ C 1分のサイクルを23サイクル繰り返すよう設定した。反応後はStop/Loading Bufferを8 $\mu$ l加え混合した。2nd PCRに用い

たプライマーの配列は表1に示した。

### 3)–5 バンドの検出

バンドの検出は銀染色法で行い、銀染色法はSILVER SEQUENCETM DNA Sequencing System (Promega)を用いた。方法はプロトコールに従った。

ゲル溶液の作成は尿素35g 10 $\times$ TBE 7.5ml、Super Reading Sequence Solution 7.5ml、これに超純水を加えてよく攪拌、尿素を完全に溶かした後、超純水を再び加え全量を70mlにした。この溶液を0.45 $\mu$ mのフィルターで濾過し、10分間脱気した。これに10% APS (Ammonium Peroxodisulfate) 350 $\mu$ l、TEMED (N,N,N',N'-テトラメチルジアミン) 35 $\mu$ lを加え、ゲル板にゆっくり流し込み、上部にコーンを差し込んで2時間以上静置した。電気泳動はスラブ型電気泳動装置を用いた。バッファーには0.6 $\times$ TBEを使用し1800Vで、Mse I /EcoR I PCR産物は2時間半、Taq I /EcoR I PCR産物は2時間電気泳動を行った。

電気泳動後ゲル板をはがし染色した。染色には10%酢酸溶液1L (停止液)、2g AgNO<sub>3</sub> 2L (染色液)、60g NaCO<sub>3</sub> 2L (現像液)を用いた。現像液は氷上に保存し冷やしてから用いた。染色液には使用前に37%Formaldehyde 3mlを加え、現像液には37% Formaldehyde 3mlとSodium thiosulfate 400 $\mu$ lを使用する直前に加えた。

ゲル板をトレイに入れ停止液1Lを加え25分間振とうした。ゲル板を超純水で3回洗浄してから染色液に浸し30分間振とうした。染色が終わったゲル板は、超純水に数秒間浸して余分な銀を落とした後、現像液に浸しバンドが現れるまで振とうした。バンドがはっきり確認できるようになったところで停止液を加え反応を止めた。現像が終わったゲル板は超純水で洗浄しDNAバンドを観察した。またその泳動像についてはスキャナーで取り込み泳動像の記録とした。

表1. AFLP法におけるアダプターとプライマーの塩基配列

区分	名称	配列
adapter	Mse I。	5'-GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT
	Taq I。	5'-GACGATGAGTCCTGAC TACTCAGGACTGGC-5'
	EcoR I。	5'-CTCGTAGACTGCGTACC CATCTGACGCATGGTTAA-5'
Pre-selective Primer	Mse I。	5'-GATGAGTCCTGAGTAA N'
	Taq I。	5'-GATGAGTCCTGACCGA N''
	EcoR I。	5'-GACTGCGTACCAATTC N'''
Selective Primer	Mse I。	5'-GATGAGTCCTGAGTAA N' NN
	Taq I。	5'-GATGAGTCCTGACCGA N'' NN
	EcoR I。	5'-GACTGCGTACCAATTC N''' NN

N'N''N'''NにはA,C,G,Tの任意の塩基が入り、組み合わせは4×4×4=64通りとなる。

### 6-2-3. データ分析

#### 1) Band Sharing値の算出

AFLP法により検出された多型バンドより、各個体間のBand Sharing値を求めた。Band Sharing値は2個体間における共通バンドの割合であり、次の式で表される。

$$BS=2Nab/(Na+Nb)$$

ここでNabは個体aと個体bに共通のバンドの数、NaとNbは個体aと個体bにおけるそれぞれのバンド数を示す。

#### 2) 系統樹の作成

求めたBand Sharing値をもとに、UPGMA法により、黒毛和種、ホルスタイン種、F1の系統樹を作成した。

### 6-2-4. 変異個所の特定

#### 1) バンドの回収

銀染色法により検出されたAFLP多型バンドをゲルから切り出し、TE buffer 20.0 μlに浸し、ゲル切片から浸出させた。そのDNA溶液をテンプレートとして2nd PCRを行い、サンプル処理液(グリセロール 40%, ブロモフェノールブルー[BPB] 0.25%, キシレンシアノール[XC] 0.25%)を加えて

1.5% アガロースゲルで20分間泳動した。

ゲル回収はUltraClean™ DNA Purification Kit (MO BIO) を用いた。方法はプロトコルに従い、超純水14 μlに溶かした。

#### 2) バンドのライゲーション

DNA溶液5 μl、サンプル処理液を加えて1.5%アガロースゲルで電気泳動し、AFLP断片のサイズを確認した。AFLP断片をpGEM®-T Easy Vectorにライゲーションした。ライゲーションにはpGEM®-T Easy Vector Systems II (Promega) を用いた。2× Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase 2.5 μl、pGEM®-T or pGEM®-T Easy Vector (50ng) 0.5g、T4 DNA Ligase (3 Weiss units/μl) 0.5 μl、DNA溶液1.5 μlを混和して室温で一時間静置した。

#### 3) バンドのトランスフォーメーション

コンピテントセル (JM109) を氷上で溶かし、エッペンに50 μlずつ分注し、DNA溶液を2 μl加えて氷上で20分間静置した。その後42℃で45秒間ヒートショックを行い、氷上で2分間静置した。950 μlのSOC培地 (SOB培地 (Trypton 6g、Yeast Extract 1.5g、NaCl 0.175g、KCl 0.056gを蒸留水に溶かし、

オートクレーブで滅菌した) 990  $\mu$ l、2 M グルコース(グルコース180gを蒸留水500mlに溶かしフィルター滅菌した) 10  $\mu$ l) を加え37°Cで1.5時間振盪培養した。50  $\mu$ g/ml ampicillin (AP) を含むLuria-Bertani' s broth (LB-ampicillin;1% trypton、0.5% yeast extract、1% NaCl、pH7.2) アガープレートにX-GAL ジメチルホルムアミド溶液(X-GAL50mg、ジメチルホルムアミド1ml) 20  $\mu$ l、IPTG (100mM) 100  $\mu$ lを塗り広げた。その上に培養したDNA溶液をプレート全体に塗り広げ、37°Cで一晩培養した。

#### 4) プラスミド精製

LB-ampicillinアガープレートから白色のコロニー1つを加熱滅菌した白金耳でこすり取り、3mlのLB-ampicillin培地に植菌して、一晩振盪培養した。6000rpmで5分間遠心分離して上清を捨て、グルコース-リゾチム溶液(グルコース液1mlに対し、リゾチム10mgを溶解させたもの) 100  $\mu$ lに懸濁し、室温で5分間放置した。アルカリ溶液(1mlあたり; 1N NaOH 200  $\mu$ l、10% SDS 100  $\mu$ l、H<sub>2</sub>O 700  $\mu$ l) 200  $\mu$ lを加えてスパテラで攪拌し氷上で5分間放置した。冷却した酢酸カリウム溶液(1mlあたり; 5M 酢酸カリウム 600ml、氷酢酸 115ml、H<sub>2</sub>O 285ml)150  $\mu$ lを加えてよく混合して氷上に5分間置いた。15000rpmで5分間遠心分離して上清を別のエッペンに移してフェノール・クロロフォルムを400  $\mu$ l加えて、よく混合した。15000 rpmで3分間遠心分離して、上清を別のエッペンに移し、エーテルを加えた。数秒間遠心分離して、エーテルを完全に除去した。100%エタノールを加えてゆっくりと揺らし、室温で5分間放置した。15000rpmで5分間遠心分離をして、100%エタノールを除去し、70%エタノールを500  $\mu$ l加えてゆっくり混ぜた。数秒間遠心分離をして、完全に70%エタノールを除去してDNAを沈殿させた。100  $\mu$ lの超純水にDNAを溶解し、ProteinaseK溶液1  $\mu$ l、RNaseA溶液1  $\mu$ lを加え、ウォーターバスで2時間インキュベートした。当量のフェノール・クロロフォル

ムを加えて懸濁し、15000rpmで5分間遠心分離して、上清を別のエッペンに移し、エーテルを加えた。数秒間遠心分離して、エーテルを完全に除去した。酢酸ナトリウム溶液を10分の1量、2.5倍量の100%エタノールを加えてゆっくり混ぜて、15分間以上マイナス80°Cで放置してDNAを析出させた。15000rpmで10分間遠心分離をして、上清を除去し、70%エタノールを加えてゆっくり混ぜた。15000rpmで5分間遠心分離して70%エタノールを除去し、こよりを使って70%エタノールを完全に除去した。超純水50  $\mu$ lにDNAを溶解させてマイナス20°Cに保存した。

#### 5) シーケンス反応

シーケンス反応にはSequiTherm EXCEL™ II Long-Read™ DNA Sequencing Kit-LC (Epicentre Technologies)の試薬とM13蛍光プライマーを使用した。方法はプロトコールに従った。シーケンス反応は94°Cで4分間熱変性した後、94°C30秒、50°C15秒、72°C1分を30サイクル行い、72°Cで7分間の伸長反応を行った。

#### 6) シーケンス解析

シーケンス用のゲルは50%尿素を含む12%ポリアクリルアミドゲルを使用し、オートシーケンサーを利用した。方法はAFLP多型バンドの検出と同様に行った。

#### 7) プライマーの設計

塩基配列はMacDNASIS Pro ver.1.0で入力し、プライマーを設計した。プライマーの設計には、OLIGO 4.0-Sを使用した。

#### 8) BACクローンのクローニング

動物遺伝研究所にプライマーを送り、BACライブラリーからのスクリーニングとシーケンス解析を委託した。

#### 9) シーケンス反応

動物遺伝研究所からの塩基配列情報をもとに、OLIGO 4.0-SでAFLP多型バンドのランキングサイトにプライマーを設計した。そのプライマーとSILVER SEQUENCETM DNA sequencing reagents (Promega) を用い、塩基配列の決定を行った。方法はプロトコ

ールに従った。シーケンス反応はAFLP法でバンドの有無が分かっている黒毛和種とホルスタイン種で行った。反応は94℃で4分間熱変性した後、94℃30秒、65℃30秒、72℃1分を60サイクル行い、72℃で7分間の伸長反応を行った。

#### 10) シーケンス解析

シーケンスラダーの検出は銀染色法で行った。方法はAFLP多型バンドの検出と同様に行った。

#### 11) PCR-RFLP反応

特定した変異個所を認識する制限酵素を選択した。それにあわせてOLIGO 4.0-Sでプライマーを設計してPCRを行った。反応は94℃で4分間熱変性した後、94℃30秒、65℃30秒、72℃1分を30サイクル行い、72℃で7分間の伸長反応を行った。PCR産物に対し、制限酵素とそのbufferを加え、適当な温度で一晩インキュベートした。

#### 12) PCR-RFLP解析

解析にはRFLP産物のサイズにより3%アガロースゲルと12%ポリアクリルアミドゲルを使い分けた。

### 6-3. 結果および考察

#### 1) AFLPマーカースの開発と品種鑑定

本研究において、EcoR I プライマー15種類とMse I プライマー64種類またはTaq I プライマー64種類の組み合わせの中から約900種類のプライマーセットを用いて、黒毛和種とホルスタイン種の遺伝的差異を調べた。用いた2ndプライマーは表1に示した。まず、各品種それぞれ10頭ずつを電気泳動し、AFLPバンド・パターンを比較した。1種類のプライマーセットで平均して約90本のAFLPバンドが検出される。そのうち、品種間で比較すると平均8本の多型バンドがあった。

品種間に存在する多型バンドのうちで、品種鑑別に利用できると思われる偏りのある多型バンドを特定した。選定基準は、片方の品種で7割以上、もう一方の品種では2割以下とした。このような多型バンドは900プライマーセットの分析で、約100本検出された。すなわち出現頻度は9プライマーセットにつき1本の割合であった。

10頭ずつの比較で頻度に偏りのあったものに関しては、次いで、30頭ずつで、比較した。その結果、30頭ずつの比較でもなお頻度に差のあったものは28本であった。

こうして得られた28本のAFLPバンドについて黒毛和種46頭、ホルスタイン種48頭、F150頭を対象にAFLP分析を行い、系統樹を作成し、それらの品種の区別が可能か否かを調べた。本研究の最終的な目的である黒毛和種とF1の区分にはホルスタイン種に偏ったバンドが有効である。そこで、最終的に表2に示した21本の多型バンド(その内訳は、黒毛和種に偏った多型バンド7本、ホルスタイン種に偏った多型バンド14本である)を用いて、系統樹を作成した。21本のうちMse I プライマーにおいて検出された多型は7本、Taq I プライマーにおいて検出された多型は14本である。図1に示すように、赤色はホルスタイン種、緑色はF1、青色は黒毛和種である。この図から明らかのように、系統樹は大きくホルスタイン種、F1、黒毛和種の3つのクラスターに分かれた。すなわち21本のAFLP断片より、これら3グループの鑑別は基本的に可能であることが示唆された。しかしながら、1,2,3の矢印で示している3頭のF1はホルスタイン種のクラスターに含まれ、4の矢印で示した1頭の黒毛和種はF1のクラスターに含まれた。これらの個体の更なる識別は、マーカースの数を増やすか、品種に偏りのある断片を更に開発することにより可能である。

表 2. 品種鑑定に用いたAFLP多型マーカー

	JB(46)	HOL (48)	F1(50)
EcoRI/Mse I -1	45	3	49
EcoRI/Mse I -2	28	3	28
EcoRI/Mse I -3	30	0	21
EcoRI/Mse I -4	22	0	12
EcoRI/Mse I -5	38	5	29
EcoRI/Mse I -6	0	25	15
EcoRI/Mse I -7	0	23	13
EcoRI/Taq I -1	31	4	30
EcoRI/Taq I -2	44	10	47
EcoRI/Taq I -3	7	36	50
EcoRI/Taq I -4	9	32	36
EcoRI/Taq I -5	0	37	28
EcoRI/Taq I -6	11	35	37
EcoRI/Taq I -7	11	34	44
EcoRI/Taq I -8	11	39	35
EcoRI/Taq I -9	0	18	11
EcoRI/Taq I -10	14	36	31
EcoRI/Taq I -11	0	38	24
EcoRI/Taq I -12	7	48	50
EcoRI/Taq I -13	11	37	28
EcoRI/Taq I -14	14	45	43

( ) 内は供試頭数、数字はバンドを持つ頭数

青は黒毛和種に、ピンクはホルスタイン種に偏った多型バンド

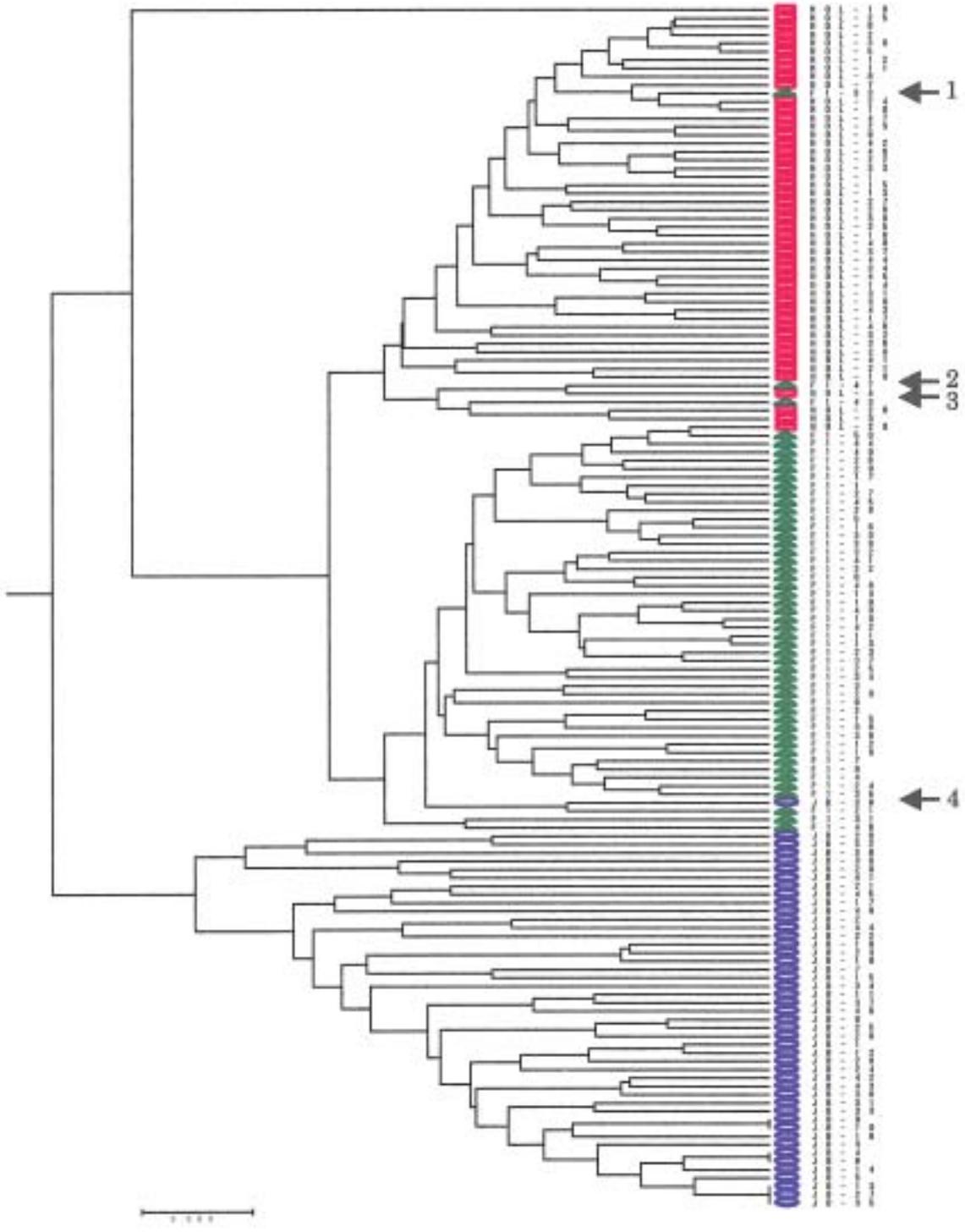


図1、21AFLPマーカを用いたデンドログラム  
 赤：ホルスタイン種、緑：F1、青：黒毛和種

## 2) AFLP候補バンドのSNPs化

以上のように21本ほどの品種特異的なAFLP断片を用いれば、黒毛和種、F1およびホルスタイン種の鑑別は概ね可能であることが示された。しかしながらAFLP法では手間がかかることと、サンプルとして状態の良いDNAが必要であるため、これらの断片の多型の原因となっている塩基配列を特定し、PCR-RFLPなどですばやく簡便に鑑定が行えるようにSNP化(SNPs; Single Nucleotide Polymorphisms)する必要がある。

そこで、最初に検出した14種類のAFLP断片についてSNPs化を試みた。その結果を表3に示す。14種類のAFLP断片の内、SNPs化出来たものはブルーで示した6種類で、残りについてはSNP化できなかった。その理由は、1) AFLP断片が小さすぎるためクローニングできない、2) 多型の原因がSINEやLINEなどの配列を含むためスクリーニングできない、3) 多型が検出されなかった、などである。No13を除く、SNPs化された5種類について、黒毛和種、ホルスタイン種、F1それぞれ100~200頭ほどについてPCR-RFLP法によりその遺伝子型判定を行い、AFLP法における結果と比較した(表4)。その結果、各品種におけるAFLP法とSNPsの遺伝子型と遺伝子頻度はほぼ一致しており、AFLP法で検出された多型の原因となっている配列が特定できたことを示している。また、F1における遺伝子頻度は、黒毛和種とホルスタイン種のおよそ中間の値を示した。

以上の結果から、AFLP断片の約3分の1はSNPs化できると予想される。以上の結果より、60本ほどの品種に頻度の偏りのあるAFLP断片を検出すれば、20個所のSNPs化を行うことが出来、PCR-RFLPやマイクロアレー法により、簡便に黒毛和種、ホルスタイン種、F1の品種鑑定が行えると期待される。

仮に、F1を判定される黒毛和種が存在するとしても、黒毛和種の個体では、血統登録(子牛登記の形で)が備わっており、両親、もしくは片親(雄牛)のマイクロサテライト

遺伝子型が登録されているはずなので、当該牛と登録簿の牛の父親が同じであれば、親子の真偽は容易に判定できる。従って、AFLP法により品種に特有の塩基配列を発見し、その個所をSNPsとして特定し、PCR-RFLP法、マイクロアレー法などで、判定することで、食肉の由来する品種をおおまかに区分することが可能なことが示された。

表3. AFLP多型バンドのSNPs化

多型バンド名	AFLP 多型頻度 (%)		進行状況	配列	多型の原因(解析中止の理由)
	黒毛和種	ホルスタイン			
bSNP1	83.3	0.0	BH sequence 終了	spacer	多型無し
bSNP2	94.8	4.0	多型解析終了	spacer	restriction site の mutation
bSNP3	3.3	96.4	BAC Screening 中	LINE	
bSNP4	81.8	7.0	BH sequence 終了	spacer	多型無し
bSNP5	56.4	0.0	多型解析終了	spacer	3 selective site の mutation
bSNP6	85.2	12.5	解析中止	SINE	Screening が不可能
bSNP7	50.9	0.0	多型解析終了	microsatellite	restriction site の mutation
bSNP8	0.0	56.1	BH sequence 終了	SINE	3 selective site の mutation
bSNP9	83.1	3.6	多型解析終了	SINE	14bp の deletion
bSNP10	94.7	10.5	解析中止	spacer	Sub cloning が不可能
bSNP11	0.0	60.0	多型解析終了	spacer	restriction site の mutation
bSNP12	0.0	46.7	BH sequence 終了	SINE	restriction site の mutation
bSNP13	0.0	100.0	多型解析終了	LINE	insertion と deletion の組み合わせ
bSNP14	60.0	3.3	解析中止	spacer	Sequence が不可能

ブルーで示したものはSNPs化出来た AFLP 多型バンド

表4. AFLP法により得られた多型バンドの頻度および多型解析での頻度

バンド名	Primerの種類		AFLPでの多型の頻度						SNPs多型解析での頻度						遺伝子頻度				
	<i>EcoR</i> I	<i>Mse</i> I	黒毛和種(JB)			ホルスタイン種 (Hol)			JB			Hol			JB	Hol	F1		
			有	無	頻度 (%)	有	無	頻度 (%)	AA	AB	BB	頻度 (%)	AA	AB	BB	頻度 (%)	p	p	p
bSNP1	ACG	CAC	25	5	83.3	0	30	0.0											
bSNP2	AAC	TAT	55	3	94.8	2	50	4.0	66	29	5	95.0	2	2	96	4.0	0.805	0.030	0.474
bSNP3	AGT	CCC	2	57	3.3	54	2	96.4											
bSNP4	ATG	CGC-1	45	10	81.8	4	53	7.0											
bSNP5	ACT	CAA	31	14	56.4	0	57	0.0	19	58	97	55.2	0	1	168	0.6	0.276	0.006	0.247
bSNP6	ATC	GTT	46	9	85.2	7	49	12.5											
bSNP7	ATG	CGC-2	28	17	50.9	0	57	0.0	2	35	63	47.0	0	0	100	0.0	0.195	0.000	0.126
bSNP8	ATG	CGC-3	0	55	0.0	32	25	56.1											
bSNP9	ATG	TTG	49	10	83.1	2	54	3.6	77	62	39	78.1	7	29	114	24.0	0.607	0.143	0.489
bSNP10	ACT	CAG	54	3	94.7	6	51	10.5											
bSNP11	AAC	TAC-1	0	30	0.0	18	12	60.0	0	1	181	0.6	11	61	97	42.6	0.005	0.246	0.112
bSNP12	AAC	TAC-2	0	30	0.0	14	30	46.7											
bSNP13	ACT	CCC	0	20	0.0	20	0	100.0	12*		39	23.5	56*		1	98.2	0.126	0.868	
bSNP14	ATG	CGC-4	18	12	60.0	1	29	3.3											

\*SNPs化を行ったが、反復配列のため単一遺伝子座の増幅ができなかったもの。結果として、ホモ・ヘテロの区分が困難である。

## 6-4. 要 約

黒毛和種はわが国を代表する肉用牛であり、その肉質の良さから、高価な値段で取引されている。一方、ホルスタイン種は世界を代表する乳用牛であるが、ホルスタイン種の雄は、食肉用として安価で手に入る大衆国産牛として取引されている。しかし、牛肉の輸入自由化に伴い安い輸入牛肉が入ってくるようになり、国内ではこれに対抗すべく、黒毛和種とホルスタイン種でのF1、F1の生産に力を入れるようになった。しかし、このF1が、高級和牛肉と偽って販売される事が問題となっており、本研究では、黒毛和種とF1の品種鑑別法を確立するため、AFLP法を用いて黒毛和種とホルスタイン種の品種特異的なバンドの検出を目指した。このAFLPは1995年にVosらによって報告された多型解析法であり、再現性の高さなどから、植物の多型解析によく用いられる。黒毛和種10頭、ホルスタイン種10頭を用い、約900種類のプライマーセットで多型解析を行った結果、品種に偏りのある100本ほどの多型バンドが得られた。しかし、分析頭数を増やすと品種特異的なバンドの頻度が減少し、各品種30頭ずつの解析では、品種特異的なバンドは28本にまで減少した。これは、黒毛和種とホルスタイン種のどちらの品種も、近年に入ってから外国産品種と在来牛とを交配した経緯があるため、両品種を識別できるような遺伝的な多様性が小さいからであると考えられる。次に、多型バンド21本を用い、UPGMA法による系統樹を作成した。その結果、黒毛和種、F1、ホルスタイン種を概ね区分することができた。

また品種鑑別をPCR-RFLPなどにより簡便に行うため、AFLPバンドのSNPs化を行った。最初に検出した14のAFLP断片のうち、5つについてSNPs化が出来、PCR-RFLPを行ったところ、その遺伝子頻度はAFLP法の結果と一致した。以上の結果より、60本ほどの品種に偏りのあるAFLP断片を検出し、SNPs化を行えば、すばやく簡便に黒毛

和種、F1、ホルスタイン種の鑑別が行えることが示唆された。

## 参 考 文 献

- Ajmone M.P., Valentini A., Cassandro M., Vecchiotti A.G., Bertoni G. & Kuiper M. (1997). AFLP markers for DNA fingerprinting in cattle. *Animal Genetics* 28; 418-426.
- Dieffenbach C.W., Lowe T.M.J., Dveksler G.S. (1997). General concepts for PCR primer design. *PCR methods application* 3; s30-s37.
- Fukuda T., Kido A., Kajino K., Tsutsumi M., Miyauchi Y., Tsujiuchi T., Konishi Y., Hino O (1999). Cloning of differentially expressed genes in highly and low metastatic rat osteosarcomas by a modified cDNA-AFLP method. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 261; 35-40.
- 福島豊一 (1972). 但馬牛はどのようにして作成されたか. 兵庫の和牛 (兵庫県農林部); 60-69.
- 加茂儀一 (1976). 日本畜産史 食肉・乳酪篇; 80-83, 344-346.
- Knorr C., Cheng H.H., Dodgson J.B. (1999). Application of AFLP markers to genome mapping in poultry. *Animal Genetics* 30; 28-35.
- Lumsden J.M., Lord E.A., Cato S.A., Richardson T.E., Van Stijin T.C., Broom M.F., Patel K., Montgomery G.W. (1999). The application of AFLP fingerprinting to construct a YAC contig containing ADH2 and MTP on sheep chromosome 6. *Cytogenetics and Cell Genetics* 84; 225-229.
- 万年英之 (1994). DNAフィンガープリント法の家畜育種への応用. 神戸大学大学院博士学位論文.
- 万年英之 (1998). ミトコンドリアDNAを用いた黒毛和種の遺伝構造分析. 平成9年度食肉に関する助成研究調査成果報告書 16; 145-148.
- 万年英之 (2000). ミトコンドリアDNAを用いた我国の黒毛和種とホルスタイン種に対する比較遺伝構造分析. 平成11年度食肉に関する助成研究調査成果報告書 18; 48-51.

- Mukai F., Tsuji S., Fukazawa K., Ohtagaki S.,  
Nambu Y. (1989). History and population  
structure of a closed strain of Japanese. *Journal  
of Animal Breeding and Genetics* 106; 254-264.
- 並河澄 (1972). 産肉生理学から見た但馬牛の特  
色. 兵庫の和牛 (兵庫県農林部); 29-46.
- 日本ホルスタイン登録協会 (1967). 日本の乳牛.  
ホルスタイン史; 124-127, 161-162.
- Nijman I.J., Bradley D.G., Hanotte O., Osten M.,  
Lenstra J.A. (1999). Satellite DNA  
polymorphisms and AFLP correlate with *Bos  
indicus-taurus* hybridization. *Animal Genetics*  
30; 265-273.
- Osten M., Den Bieman M., Kuiper M.T.R., Pravenec  
M., Kren V., Kurtz T.W., Jacob H.J., Lankhorst  
A.E., Van Zutphen B.F.M. (1996). Use of AFLP  
markers for gene mapping and QTL detection in  
the rat. *Genomics* 37; 289-294.
- Ovilo C., Cervera M.T., Castellanos C., Martinez  
Z.J.M. (2000). Characterisation of Iberian pig  
genotypes using AFLP markers. *Animal  
Genetics* 31; 117-122.
- 笹崎晋史 (2000) AFLP法による肉用牛6品種の遺  
伝学的解析. 神戸大学卒業論文.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van De  
Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman  
J., Kuiper M., Zeban M. (1995). AFLP: a new  
technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid  
Reserch* 21; 4407-4414.

## 第7章 考察とまとめ

周知の通り、黒毛和種の成立過程では、明治年間に欧米から種畜を導入しこれを在来牛に交雑することによって改良を行った歴史がある。導入された品種としては、ショートホーン種、デボン種、ブラウンスイス種、シンメンタール種、エアシャー種、ホルスタイン種などがある。大正期に入り、外国種の影響の強いものは、骨が太く歩留まりが劣る、肉質が劣る等の理由で好まれなくなり、無角和種の造成に用いられたアバディーンアンガス種や日本短角種の改良に用いられたショートホーン種を除いては、和牛の改良を目的とした外国種の交雑はこの後行われていない。一方、外国種の利用によって和牛は、在来のものに比べて体格が大きく胴伸びがよくなったとされている。外国種の導入をやめて100年近く経っている現在の黒毛和種に明治年間に導入された外国種由来の遺伝子の影響がどの程度あるかは不明であるが、大きな影響を残していることは間違いないことであろう。

乳牛についても、明治年間にはエアシャー種、ショートホーン種、ホルスタイン種などが乳用牛として導入されている。これらと在来牛との交雑種も生産されており、さらに累進交雑されて乳用牛として利用されたものも多いとみられる。また、我が国の敗戦後の一時期、酪農振興を急ぐ余り、黒毛和種にホルスタイン種を累進交雑して乳牛としての利用を推進した歴史がある。このいわゆる新乳牛は不評・短命に終わっているが、これらの末裔が現在ホルスタイン種として活躍している可能性も大いにあり得よう。

つまり、黒毛和種といいホルスタイン種と言っても、過去に遡れば遺伝的に重複する部分があり得ると言うことである。我が国の牛の平均世代間隔を6～7年とすれば（ホルスタイン種では最近はもっと短くなっているとされるが）、大正に入って、外国種との交雑を止めてから現在までに15世代程度しか経っていないことになる。このことは、これまで述べてきた研究結果を読む際に念頭に置かなければならない。

### 1) ミトコンドリアDNAのDループの配列の多型による方法

精子のミトコンドリアは受精が成立した段階で卵子の中で破壊されてしまうとされ、精子を介しての親から子へのミトコンドリアの伝達は無いとされている。従って親から子へのミトコンドリアの伝達は専ら卵子を介して行われる。染色体に見られる組み換えも起こさないで、突然変異を生じない限り、子のミトコンドリアのDNA型は母親と同じものである。明治年間に在来牛を役肉用牛として改良する目的で外国種との交雑を行った際にも、雄牛が外国種で、雌牛が在来牛であるケースがほとんどであったはずである。一方、現在のホルスタイン種に明治期の交雑種の末裔、あるいはいわゆる新乳牛の末裔がいるとしても、その比率は低いと考えられる。これらのことはミトコンドリアのDNA型の違いを品種鑑別的手段として利用しようと考えた一つの理由であった。その結果は第2章で述べたとおりであり、ミトコンドリアDNAの中でも変異の多い部分とされるDループのミトコンドリアDNA型の違いを品種鑑別的手段として用いることは困難との結論である。

考えられる理由の一つは、我が国の在来牛は中央アジアを経て朝鮮半島経由で我が国に到達したものとされており、ヨーロッパの牛とも共通のミトコンドリアDNA型を持った牛が我が国の在来牛に存在していた可能性があることである。考えられる理由の二つ目は、明治期に導入された外国種には雌牛も含まれており、この外国種を母とした交雑種の末裔が黒毛和種の中で現在も活躍していると言うことであり、考えられる理由の三番目は、明治期の交雑種乳牛や新乳牛の末裔が現在でもホルスタイン種として活躍していると言うことである。

### 2) 毛色関連遺伝子の遺伝子型多型による方法

肉眼的には黒毛和種とホルスタイン種の被毛には差異がある。黒毛和種の黒はやや褐色がかっており、ホルスタイン種の黒は漆黒である。また、白斑についても、現在の黒毛和種では見かけなくなっているが、ホルスタイン種は黒白斑である。このような毛色や斑紋に関わる遺伝子の多型によって品種の鑑別が出来ないか調べ

たのが第4章に述べた結果である。

毛色に関わることが知られているメラノコルチン1レセプター(MC1R)遺伝子及びagouti遺伝子(いずれもメラニン合成に参与し、黒色の程度に影響する)、白斑に関わることが知られているc-kit遺伝子及びsteel遺伝子(MGF遺伝子とも言う)の遺伝子型(アリール)を調べた結果では、品種によりアリール頻度が異なるものが見られたが、いずれも品種鑑別には有効なほどの偏りとはいえない。毛色に関わる上述の遺伝子の解析からは品種鑑別に有効な情報は得られなかった。

### 3) RAPD法及び AFLP法により開発した DNA断片の多型による方法

以上のように特定の部分のDNA、あるいは特定形質に関わる遺伝子では品種鑑別に有効な情報は得られなかったので、次に試みたのがゲノムDNAの断片で、品種鑑別に有効なほどに品種による偏りが見られるDNA断片をランダムに探索することであった。2種類の方法を試みた。一つはランダム増幅DNA多型(RAPD)法であり、もう一つは増幅断片長多型(AFLP)法である。RAPD法は、ランダムな配列のプライマーによってPCR増幅されたDNA断片を調べる方法であり、AFLP法は制限酵素でDNAを断片化し、その末端に共通の短い塩基配列(アダプター)を連結し、この配列を用いてPCR増幅した断片の多型を調べる方法である。ゲノムDNAをやみくもに断片化して調べる点では考え方に大差ない。この結果は第5章及び第6章に述べられている。

いずれの方法で得られたDNA断片であっても、ある品種で出現率100%、別の品種で出現率0%の多型を示すものは見つかっていない。このことは、ゲノムDNA上のある一つの部分の塩基配列の違いに基づいて、ほぼ100%の確率で品種鑑別を行いうる程に塩基配列が品種によって異なる多型を示す部分は見つけられなかったと言うことである。黒毛和種が外国種に対して閉鎖集団となってから15世代程度しか経過していないと考えられること、及び、DNAマーカー(マイクロサテライトマーカー)の多型性を調べると黒毛和種でもホルスタイン種でも

60%を越えるマーカーでヘテロ性を維持していることを合わせ考えると、この結果は当然ともいえる。(ちなみに、アンガス種やヘレフォード種の純粋種ではヘテロのマーカーは50%以下とされている。また、自殖であるイネではF1世代から数えて4-5世代でヘテロのマーカーは0に近くなるであろう。)

一つの(ある一箇所の)DNA断片では品種鑑別を正確に行い得ないとなれば、次に検討すべきは品種によって出現率に大きな相違が認められる多型を示すDNA断片の情報をいくつか組み合わせるとどうなるかである。RAPD法の場合もAFLP法の場合もこの点について検討を行っている。

AFLP法の場合、約900本の断片の中から品種による偏りが大きい多型バンド21本を用いて、黒毛和種46頭、ホルスタイン種48頭、これらの品種間のF1 50頭を対象にクラスター分析による系統樹を作成すると、F1の3頭がホルスタイン種に分類されたことおよび黒毛和種の1頭がF1に分類されたことを除けば、3品種は正確に分類できた。つまり、21本のAFLP断片によって品種鑑別はかなりの精度で可能なことがわかった。

今後さらに多くのAFLP断片を検索し、品種による偏りのある多型を示す断片を開発することによって、鑑別の精度をさらに向上させることは可能であろう。

なお、AFLP法には、手間がかかること、状態のよいDNA試料が必要であること、等の短所もある。そのため、品種によって偏りのある多型を有し、品種鑑別に使えるAFLP断片については、これらの断片が多型を示す原因である塩基配列の違いを特定して(SNP s化して)、簡便に鑑定できるようにしておくことが望ましい。本研究の実績では、AFLP断片の約3分の1はSNP s化が可能であった。品種鑑別が実用的に有効であるためには何箇所をSNP s化する必要があるかは、それぞれのSNP sが品種によってどの程度出現頻度に偏りがあるかに依存するので現状では明確にしがたい。上述のAFLP断片21本による品種分類の結果からすれば、20箇所程度はSNP s化する必要があるかも知れない。今後の課題としたい。