

# 飛騨牛の改良に貢献するDNAマーカーの探索について

飛騨牛研究部 松橋 珠子

## 1. はじめに

和牛肉では、霜降りと呼ばれる脂肪交雑の多さや細かさが牛肉の価値を決める重要な因子となっている。しかし脂肪交雑が同程度であっても、脂肪の質の違いにより食味には差があることが知られている。オレイン酸は牛脂にもっとも多く含まれている一価の不飽和脂肪酸だが、オレイン酸などの一価不飽和脂肪酸の含有量が高いほど脂肪の融点は低下して口触りがよくなり、また風味のよさが生み出されると言われている。

オレイン酸などの一価不飽和脂肪酸 (MUFA) は、脂肪酸不飽和化酵素である stearoyl-CoA desaturase (SCD) によって飽和脂肪酸から合成される。和牛 *SCD* 遺伝子の DNA 配列上には複数の 1 塩基変異 (SNP) が存在し、このうち特定の一塩基の置換によって生じる多型間では脂肪組織中の脂肪酸組成に差異があることが報告されている。また脂肪酸合成酵素 fatty acid synthase (FASN) は遺伝子上に 2 ヶ所の SNP が存在し、この変異によって生じる多型間でも脂肪組織中の脂肪酸組成に差異があることが明らかになりつつある。

そこで本研究では、岐阜県内で生産された黒毛和種肥育牛を用いて、*SCD* 遺伝子および *FASN* 遺伝子の遺伝子型と枝肉形質や脂肪酸組成との関係を明らかにし、*SCD* 遺伝子および *FASN* 遺伝子の遺伝子型が美味しい牛肉を生産するための種畜選抜 DNA マーカーとして利用できるか検討した。

## 2. 材料及び方法

平成 17 年から平成 20 年にかけて岐阜県内の食肉処理施設で処理された黒毛和種肥育牛について、枝肉成績および第 6-7 肋間部位約 1cm 厚のロース肉を入手し、筋間脂肪と胸最長筋を採取した。

胸最長筋内脂肪の中性脂質における脂肪酸組成は HPLC 法を用い、ラウリン酸 (C12:0)、ミリスチン酸 (C14:0)、ミリストレイン酸 (C14:1)、ペンタデシル酸 (C15:0)、パルミチン酸 (C16:0)、パルミトイル酸 (C16:1)、ステアリン酸 (C18:0)、オレイン酸 (C18:1)、リノール酸 (C18:2)、リノレン酸 (C18:3) の割合を測定した。一価不飽和脂肪酸 (MUFA) 割合は以下の式により算出した。

$$\text{MUFA (\%)} = \text{C14:1 (\%)} + \text{C16:1 (\%)} + \text{C18:1 (\%)} + \text{C18:2 (\%)} + \text{C18:3 (\%)}$$

全 DNA は筋間脂肪から抽出し、SCD と FASN の遺伝子型は PCR-RFLP 法により判定した。

*SCD* 遺伝子のエクソン 5 上に存在する第 878 番目の塩基はチミン (T) とシトシン (C) の置換であり、これに伴ってアミノ酸はバリン (Val, V) からアラニン (Ala, A) に変化する。SCD のアミノ酸配列が Val になる対立遺伝子を V 型、Ala になる対立遺伝子を A 型と呼び、これにより遺伝子型は VV 型、VA 型、AA 型の 3 種類が生じる。第 878 番目の SNP は第 702 番目の SNP と強く連鎖していることが報告されている。このため、より容易に検出ができる第 702 番目の SNP の遺伝子型を同定することで第 878 番目の SNP の遺伝子型を判定した。第 702 番目の SNP の存在する領域を、プライマーセット SCD-F702 および SCD-R702 を用いて増幅し、制限酵素 NcoI で 37°C、一晚処理したのち、3%アガロースで泳動して遺伝子型を決定した。

*FASN* 遺伝子上のエクソン 34 には 2 つの SNPs が連鎖している。第 16024 番目の塩基がアデニン (A) からグアニン (G)、第 16039 番目の塩基がチミン (T) からシトシン (C) へ置換すると、アミノ酸残基はスレオニン (Thr, T) とトリプトファン (Trp, W) からアラニン (Ala, A) とアルギニン (Arg, R) に変化する。アミノ酸残基が Thr と Trp である対立遺伝子は B 型 (あるいは TW 型)、Ala と Arg である対立遺伝子は L 型 (あるいは AR 型) と呼ばれており、これにより遺伝子型は BB 型、BL 型、LL 型の 3 種類が生じる。そこで目的領域を PCR で増幅した後、

制限酵素 HhaI あるいは NciI を用いて SNPs を検出し、遺伝子型を決定した。

以上のようにして得られたデータを元に、SCD と FASN の遺伝子型と枝肉形質や胸最長筋内脂肪の脂肪酸組成との関連について解析した。

### 3. 結果

#### (1) 遺伝子型頻度

データの解析には、出荷月齢や枝肉重量が大きく外れた数頭を除いた出荷月齢 24 ヶ月以上 34 ヶ月未満、枝肉重量 300kg 以上の個体、計 446 頭(去勢牛 375 頭、雌牛 71 頭)を用いた。去勢牛と雌牛では出荷月齢や体格、脂肪酸組成に比較的大きな相違があったため、SCD 遺伝子と FASN 遺伝子の多型の効果解析は一部を除き去勢牛のみを用いて行った。

表 1 SCD 遺伝子と FASN 遺伝子の遺伝子型頻度と対立遺伝子頻度

遺伝子	遺伝子型	頻度 (去勢 / 雌)	対立遺伝子頻度
SCD	AA	50.7 % (195 頭 / 31 頭)	A 0.716
	VA	41.9 % (156 頭 / 31 頭)	V 0.284
	VV	7.4 % (24 頭 / 9 頭)	
FASN	BB	72.4 % (276 頭 / 47 頭)	B 0.858
	BL	26.7 % (96 頭 / 23 頭)	L 0.142
	LL	0.9 % (3 頭 / 1 頭)	

集団の SCD 遺伝子型頻度は、AA 型 50.7%、VA 型 41.9%、VV 型 7.4%で、対立遺伝子頻度は A 対立遺伝子が 0.716、V 対立遺伝子が 0.284 だった(表 1)。FASN の遺伝子型頻度は、BB 型 72.4%、BL 型 26.7%、LL 型 0.9%で、対立遺伝子頻度は B 対立遺伝子が 0.858、L 対立遺伝子が 0.142 となっていた。対立遺伝子頻度から予測される各遺伝子型頻度はいずれもハーディ・ワインベルグの平衡下にあった。

#### (2) 脂肪酸組成に対する遺伝子型の効果

まず胸最長筋内脂肪の脂肪酸組成に対する SCD 遺伝子型の効果について一元配置の分散分析を行った。有意となった因子については遺伝子型間の最小二乗平均の差の検定を行った。その結果、C14:0、C14:1、C16:0、C18:0、C18:1、そして MUFA の割合について SCD 遺伝子型間で有意な差が認められた(表 2)。飽和脂肪酸である C14:0、C16:0、C18:0 の割合は AA 型が最も低く VV 型が最も高くなっていた。一方、一価不飽和脂肪酸である C14:1、C18:1、MUFA の割合は VV 型<VA 型<AA 型の順に高くなっていた。SCD 遺伝子型が AA 型の集団は、VV 型の集団に比べ C18:1 の割合が平均 2.3%、MUFA の割合は平均 2.8%高くなっていた。

次に、胸最長筋内脂肪の脂肪酸組成に対する FASN 遺伝子型の効果を調べた(表 2)。一元配置の分散分析の結果、C14:0、C16:0、C16:1、そして C18:1 の脂肪酸割合は FASN 遺伝子型間で有意な差が検出された。C14:0、C16:0、C16:1 といった C16 以下の鎖長の脂肪酸割合は、BB 型よりも BL 型の方が有意に高く、C16 より長鎖の脂肪酸である C18:1 の割合は BB 型のほうが BL 型より有意に高くなっていた。FASN 遺伝子型が BB 型の集団は、BL 型の集団に比べ C18:1 の割合が平均 0.87%高かった。

表 2 SCD 遺伝子と FASN 遺伝子の遺伝子型と超最長筋内脂肪の脂肪酸組成との関係

遺伝子	遺伝子型	脂肪酸割合 (%)						
		C14:0	C14:1	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	MUFA
SCD	AA	2.9±0.5 <sup>c</sup>	1.0±0.3 <sup>a</sup>	26.2±1.9 <sup>b</sup>	4.4±0.7	10.4±1.3 <sup>c</sup>	51.1±2.5 <sup>a</sup>	56.5±2.6 <sup>a</sup>
	VA	3.1±0.5 <sup>b</sup>	0.9±0.3 <sup>b</sup>	26.3±1.9 <sup>b</sup>	4.5±0.8	11.0±1.6 <sup>b</sup>	50.4±2.8 <sup>b</sup>	55.7±2.8 <sup>b</sup>
	VV	3.3±0.4 <sup>a</sup>	0.6±0.2 <sup>c</sup>	27.2±1.9 <sup>a</sup>	4.3±0.6	11.9±1.7 <sup>a</sup>	48.8±2.7 <sup>c</sup>	53.8±3.1 <sup>c</sup>
FASN	BB	3.0±0.5 <sup>b</sup>	0.9±0.3	26.2±1.9 <sup>b</sup>	4.4±0.7 <sup>b</sup>	10.8±1.5	50.9±2.7 <sup>a</sup>	56.2±2.8
	BL	3.2±0.6 <sup>a</sup>	1.0±0.3	26.7±2.0 <sup>a</sup>	4.6±0.8 <sup>a</sup>	10.7±1.7	50.0±2.7 <sup>b</sup>	55.6±2.7

a,b,c 一遺伝子の遺伝子型間では異なる文字間で有意差あり (P<0.05)。

そこで次に脂肪酸組成に対する SCD と FASN の両遺伝子型の効果を調べた (図 1)。二元配置の分散分析の結果、各脂肪酸の割合に対する SCD と FASN の両遺伝子型の効果はほぼ独立で相加的あり、SCD 遺伝子型が AA 型で FASN 遺伝子型が BB 型の集団はそれぞれが VV 型と BL 型の集団に比べ C18:1 割合の場合は平均 4.1%、MUFA 割合は平均 4.7%高くなっていた。

以上の結果から、SCD と FASN の遺伝子型間では胸最長筋内脂肪の脂肪酸組成に差があり、SCD の遺伝子型では A 対立遺伝子を多く持つほど C18:1 割合が高く、FASN の遺伝子型では B 対立遺伝子を多く持つほど C18:1 割合が高くなること、そして C18:1 割合に対する SCD と FASN の両遺伝子の効果はほぼ相加的であることが示された。

### (3) 枝肉形質に対する遺伝子型の効果

枝肉形質に対する SCD と FASN 遺伝子型の効果を解析するため、枝肉重量、ロース芯面積、バラの厚さ、皮下脂肪厚、歩留基準値、BMS No. について、SCD 遺伝子型あるいは FASN 遺伝子型による一元配置の分散分析を行った。その結果、去勢、雌ともにいずれの枝肉形質についても遺伝子型間で差は認められなかった (データ省略)。

### (4) 脂肪酸組成に対する諸要因の影響

遺伝子型の効果に加え、性別、出生年、出荷年、出荷月齢、肥育農家、および一代祖のオレイン酸 (C18:1) 割合に対する影響を明らかにするため相関係数を求めた。

その結果、性別と出荷月齢について C18:1 割合と有意な相関がみとめられた (表 3)。C18:1 割合に対する出生年の相関は  $p > 0.05$  ではあったもの  $p < 0.1$  であり、出生年の違いによって C18:1 割合に差が生じる可能性が認められた。

そこで次に、性別、出生年、出荷月齢、一代祖の各因子の効果を考慮しながら C18:1 割合に対する SCD 遺伝子型の効果を調べた。SCD 遺伝子型とこれらの因子を含む 2 変量の分散分析を行った結果、SCD 遺伝子型の他に性別あるいは出荷月齢を考慮した場合に C18:1 割合に対する 2 因子の効果は有意となった。性別の効果を考慮した場合、SCD 遺伝子型間で最小二乗平均の差の検定を行った結果、SCD 3 遺伝子型間の差はいずれも有意となった。C18:1 割合は雌牛のほ

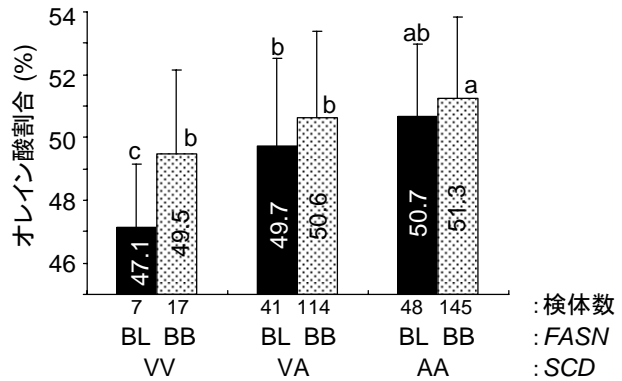


図 1 SCD と FASN の遺伝子型とオレイン酸割合との関係

a,b,c 異なる文字間で有意差あり (P<0.05) .

表 3 オレイン酸割合と各種要因との相関

要因	相関	P値
性別	0.225	<b>0.000</b>
出生年	-0.085	0.073
出荷年	-0.062	0.191
出荷月齢	0.178	<b>0.000</b>
肥育農家	0.006	0.895
一代祖	0.051	0.284
SCD遺伝子型	0.186	<b>0.000</b>
FASN遺伝子型	0.140	<b>0.003</b>

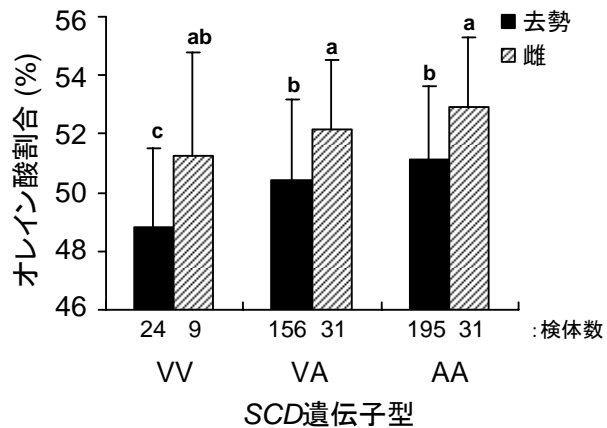


図 2 オレイン酸割合に対する性別と SCD 遺伝子型の効果

a,b,c 異なる文字間で有意差あり (P<0.05)

うが去勢牛より常に高く、かつ AA 型 $\geq$ VA 型 $\geq$ VV 型の順に高くなっていった。(図2)。

一代祖と C18:1 割合との間の相関は有意でなかったが、10 頭以上の検体数がある種雄牛のみを抽出して SCD 遺伝子型と一代祖との 2 変量の分散分析を行った結果、C18:1 割合に対する 2 因子の効果はどちらも有意となった。C18:1 割合は種雄牛間で差がある一方で、多くの種雄牛において C18:1 割合は AA 型のほうが VA 型より高い傾向を示した(図3)。

出生年については、平成 14 年から平成 16 年生まれまでを比較すると、有意ではないものの平成 14 年生まれ集団の C18:1 割合が最も高く、年を追って徐々に低下する傾向が見られた(データ省略)。また SCD 遺伝子型を考慮した場合の出生年の効果も有意ではなかった。出生年によって C18:1 割合にばらつきが生じた原因は明らかでないが、供与されている飼料の成分が年度によって差がある可能性や、気温などの天候の影響が考えられた。

SCD がいずれの遺伝子型の場合でも、C18:1 割合は出荷月齢と相関して高くなる傾向が認められた(図4)。一方、出荷月齢を考慮した場合も C18:1 割合は SCD 遺伝子型が AA 型の集団で最も高く、VA 型、VV 型の集団の順に低くなる傾向を示した。

これより、性別、出荷月齢、種雄牛は C18:1 割合に影響を与える可能性のある因子である一方、これらの要因を考慮しても SCD 遺伝子型は C18:1 割合に対して効果があることが示唆された。

#### 4. まとめ

以上のように和牛では、胸最長筋内脂肪の脂肪酸組成は SCD 遺伝子型や FASN 遺伝子型によって異なり、C18:1 割合は SCD 遺伝子の対立遺伝子 A や FASN 遺伝子の対立遺伝子 B の数に従って高くなることが示唆された。また、性別や種雄牛、出荷月齢は C18:1 割合に影響を与える因子だが、C18:1 割合に対する SCD 遺伝子型の効果は、性別や種雄牛、出荷月齢を考慮した場合にも存在することが示された。一方、枝肉形質は SCD 遺伝子と FASN 遺伝子の遺伝子型間で差が認められなかったことから、SCD の遺伝子型と FASN の遺伝子型は胸最長筋内脂肪中の C18:1 割合を改良する際の DNA マーカーとして有効であることが示唆された。

脂肪酸の合成には、SCD や FASN 以外にも複数の鎖長延長酵素、アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) , ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (DGAT) 、などの多くの酵素が関与する。また、SCD 遺伝子の転写因子である SREBP-1 のように、これらの酵素の遺伝子発現を制御している因子や、成長ホルモンのように刺激因子として関与する因子も存在する。今後、胸最長筋内脂肪の脂肪酸組成を考慮して分子遺伝育種を目指す際には、これらの因子の効果や因子間の相互作用についても留意する必要がある。

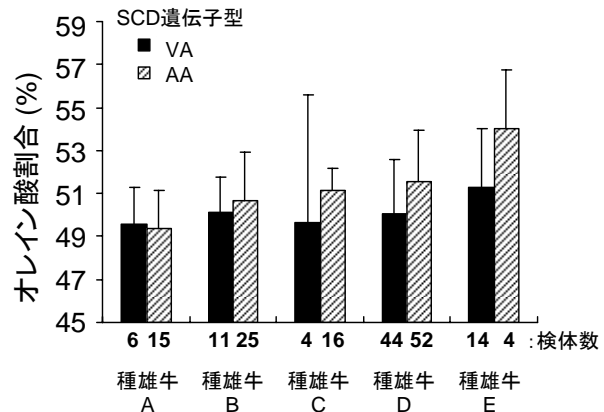


図3 オレイン酸割合に対する種雄牛と SCD 遺伝子型の効果

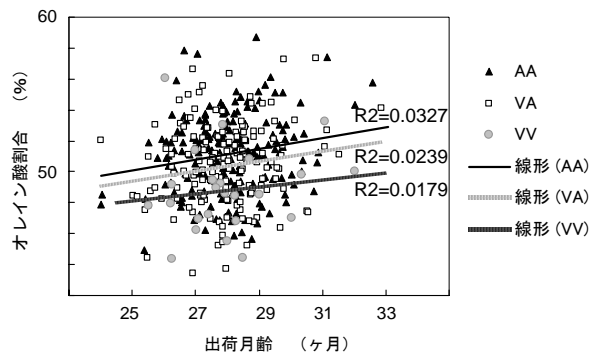


図4 オレイン酸割合に対する出荷月齢と SCD 遺伝子型の効果