

NIBS LETTER 2007 MAY
No. 544

日 生 研 報

2007年(平成19年)5月号 第53巻第3号(通巻544号)

挨拶・巻頭言

細菌培養のための寒天培地開発に
秘められた物語……………山内一也(2)

獣医病理学研修会

第46回 No.912 プタの小脳・橋
……………動物衛生研究所(3)

第46回 No.922 ラットの眼球後部腫瘍
および肺腫瘍
……………三菱化学安全科学研究所(4)

レビュー

肉牛における経済形質の遺伝子診断に向けて
……………佐々木義之(5)



NIBS

財団法人 日本生物科学研究所
NIPPON INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SCIENCE
<http://nibs.lin.go.jp/>

細菌培養のための寒天培地開発に秘められた物語

山内一也

コッホの寒天培地による平板培養は、細菌学のもっとも重要な研究手段のひとつである。私は、日本固有の寒天をコッホがどうして用いるようになったのか、という質問を受けたことがあった。たしかに寒天という名前は、17世紀に隠元禅師が、精進料理の食材として名付けたものと伝えられており、日本で古くから用いられているものである。

私の頭の片隅にしまいこまれたこの疑問について、回答を与えてくれたのは、“Robert Koch” (T. D. Brock 著, ASM Press, 1999) と、“The introduction of agar-agar into bacteriology” (A. P. Hitchens & M. C. Leikind : *Journal of Bacteriology* 37, 485-493, 1939) という論文である。科学の進展には、ガラス玉を集める人、その中から適当なサイズのガラス玉に糸を通して首飾りを作る人という、2つの側面がある。寒天培地開発の物語もまさにそうだった。

細菌の培養に最初に取り組んだのは、パスツールだった。彼は、液体培地で細菌を培養し、培養液が濁ってくると、そのごく少量を別の培地に植えつぎ、それを繰り返すことにより、純培養ができると考えていた。これは、もちろん現在の純培養の概念にはあてはまらない。液体培地による最初の純培養は、消毒法の開発で有名な英国のリスターが1878年に発表したものである。しかし、彼は感染症ではなく、乳酸菌などによる牛乳の腐敗の研究に純培養を用いていた。

固形培地の技術の最初の報告は、1875年にドイツのシュレーターがジャガイモの切り口を利用したものであった。ここでは、着色したコロニーを作るセラチア菌についての研究が主体だった。

1881年コッホは、細菌学のバイブルとなった病原性細菌の研究に関する論文を発表した。ジャガイモの培地では病原細菌は分離できなかったため、彼は病原細菌が増殖できる培地にゼラチンを加えて固めた培地を考案したのである。彼は、この方法が容易で再現性もある画期的なものと考えていた。しかし、ゼラチン培地には2つの欠点があった。ひとつは細菌によってはゼラチンが溶かされること、もうひとつは、ゼラチンは37℃の孵卵器では溶けてしまうことだった。体温が必要な病原細菌にゼラチン培地は利用できなかったのである。

この問題を解決したのは、医師ワルター・ヘッセの夫人だった。彼女はアメリカで生まれ育ったドイツ人で、ドイツに戻ったのちヘッセと結婚していた。夫は1881年から82年にかけてコッホのもとで細菌学を学んだのち、自宅を実験室として空気中の細菌の量の測定実験を行っていた。彼はゼラチン培地を用いていたが、ゼラチンが溶けるために実験は失敗を重ねていた。そこで、実験助手も兼ねていたヘッセ夫人はゼラチンの代わりとして、フルーツゼリーなどを作る時に使う寒天の利用を提案した。フルーツゼリーのレシピはアメリカに居た時に母親から教わったもので、母親はジャワに住んだことのあるオランダ人の友達から教えてもらっていた。寒天の原料であるテングサが豊富なジャワでは、寒天がゼリーの原料やスープの濃縮に利用されていたのである。寒天培地によりヘッセの実験は順調に進んだ。

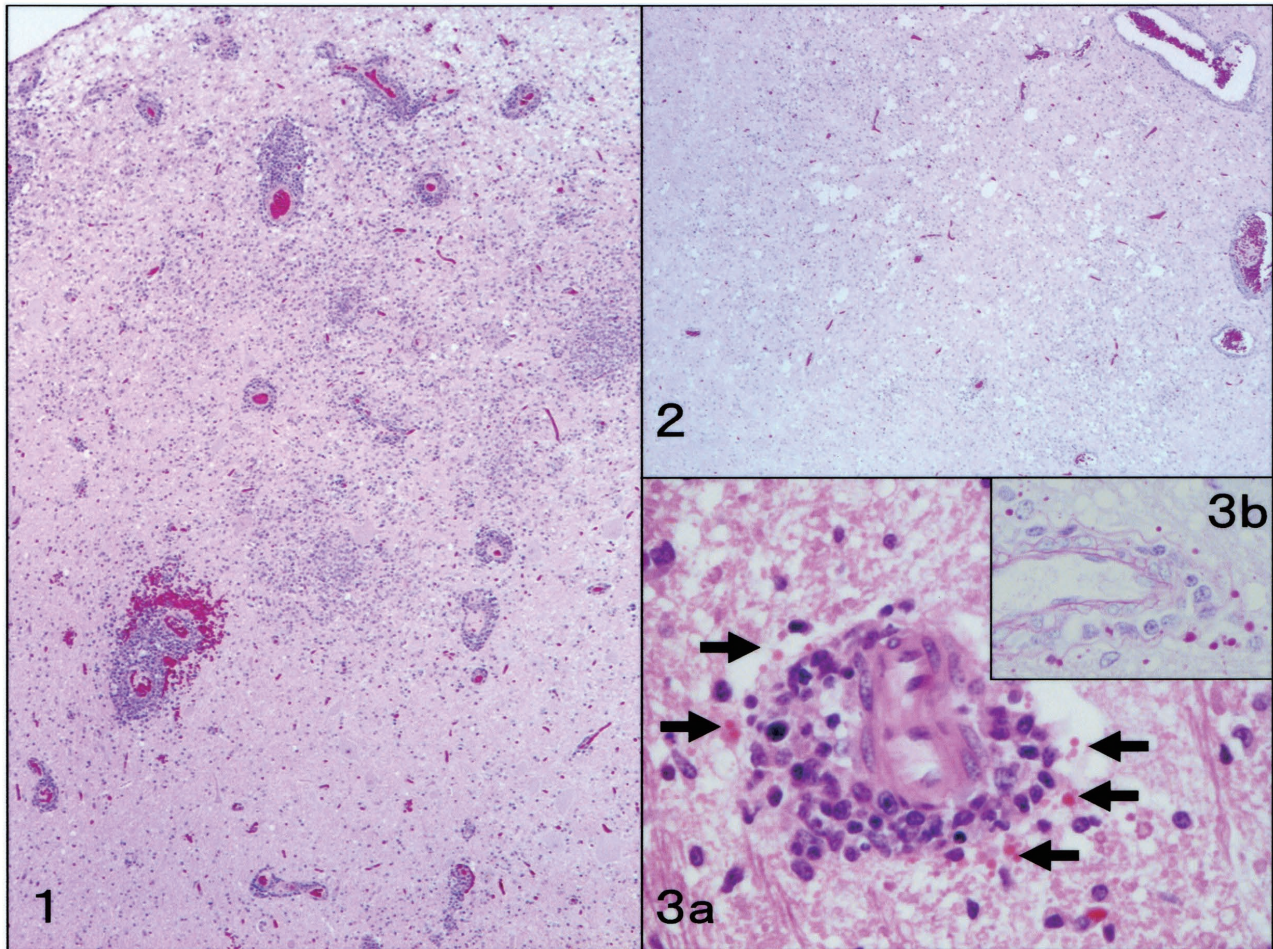
寒天培地については、コッホが1882年に結核菌についての短報の中で彼自身の考案として簡単に述べているだけで、正式の論文は発表されていない。

1934年にヘッセ夫人が亡くなった際、彼女の名前を知る細菌学者はほとんどいなかった。*Journal of Bacteriology* の論文では、寒天培地はフラウ（ドイツ語のミセス）・ヘッセ培地と呼んではどうかと提案している。

(東京大学名誉教授)

ブタの小脳・橋

動物衛生研究所 第46回獣医病理学研修会標本 No. 912



動物：ブタ，雑種，雌，75日齢。

臨床事項：母豚140頭を飼養する一貫経営の農場で、2005年1月以降、腹単位で40日齢の子豚に下痢や発育不良が散発した。3月に当該農場の衰弱した75日齢子豚の病性鑑定を実施した。稟告では神経症状は確認されなかった。

剖検所見：肺では、左前葉前・後部の基部，右中葉・後葉基部付近，右前葉の一部は境界明瞭に暗赤色を呈していた。断面では赤色肝変化がみられた。両肺後葉の断面では斑状の暗赤色部が点在していた。その他の臓器には著変は認められなかった。脳，扁桃および肺からのウイルス分離は陰性だった。扁桃乳剤のPCR検査で豚テシオウイルス（PTV）の特異遺伝子を検出した。豚コレラに対するFAは陰性だった。肺から *Pasteurella multocida* と *Streptococcus suis* が分離された。他の病原細菌の分離は陰性だった。農場内の他の豚からは *E. coli* O149 が分離された。

組織所見：脳幹部から小脳，脊髄にかけて，灰白質を中心に重度の非化膿性髄膜脳脊髄炎が観察された（図1：橋，HE）。非化膿性炎病変に加え，中脳から延髄にかけて，左右対称性の強い軟化巣が認められた（図2：橋，HE）。また，脳幹部の白質を中心に，好酸性，PAS陽性硝子滴が血管周囲性に観察された（図3a：橋，HE；図

3b：橋，PAS）。大脳半球には病変はほとんど認められなかった。小脳，中脳の病変部から抗PTV抗原が免疫組織化学的に検出された。

診断：重度軟化巣と血管周囲性硝子滴を伴った，豚テシオウイルスの関与が疑われた非化膿性髄膜脳脊髄炎
 考察：今回病変部から免疫組織化学的にPTV抗原が検出された。ウイルス分離陰性のため確定診断には至らなかったものの，大脳半球にほとんど病変を形成しないその特徴的な病変分布から，今回の非化膿性炎の病原微生物としてPTVが強く疑われた。今回，非化膿性炎に加え，血管周囲に特徴的な硝子滴が観察された。脳幹部に認められた左右対称性の軟化巣も脳脊髄血管症による一連の病態として報告がある。血管傷害もみられたことから，疫学的背景も加味し，今回の症例では脳脊髄血管症も伴っていたと考えられた。今回，非常に強い病変が形成されていたが，脳脊髄血管症による軟化病変にPTVによる脳脊髄炎病変が加わることによって，病変が増悪されていたのではないかと考えられた。

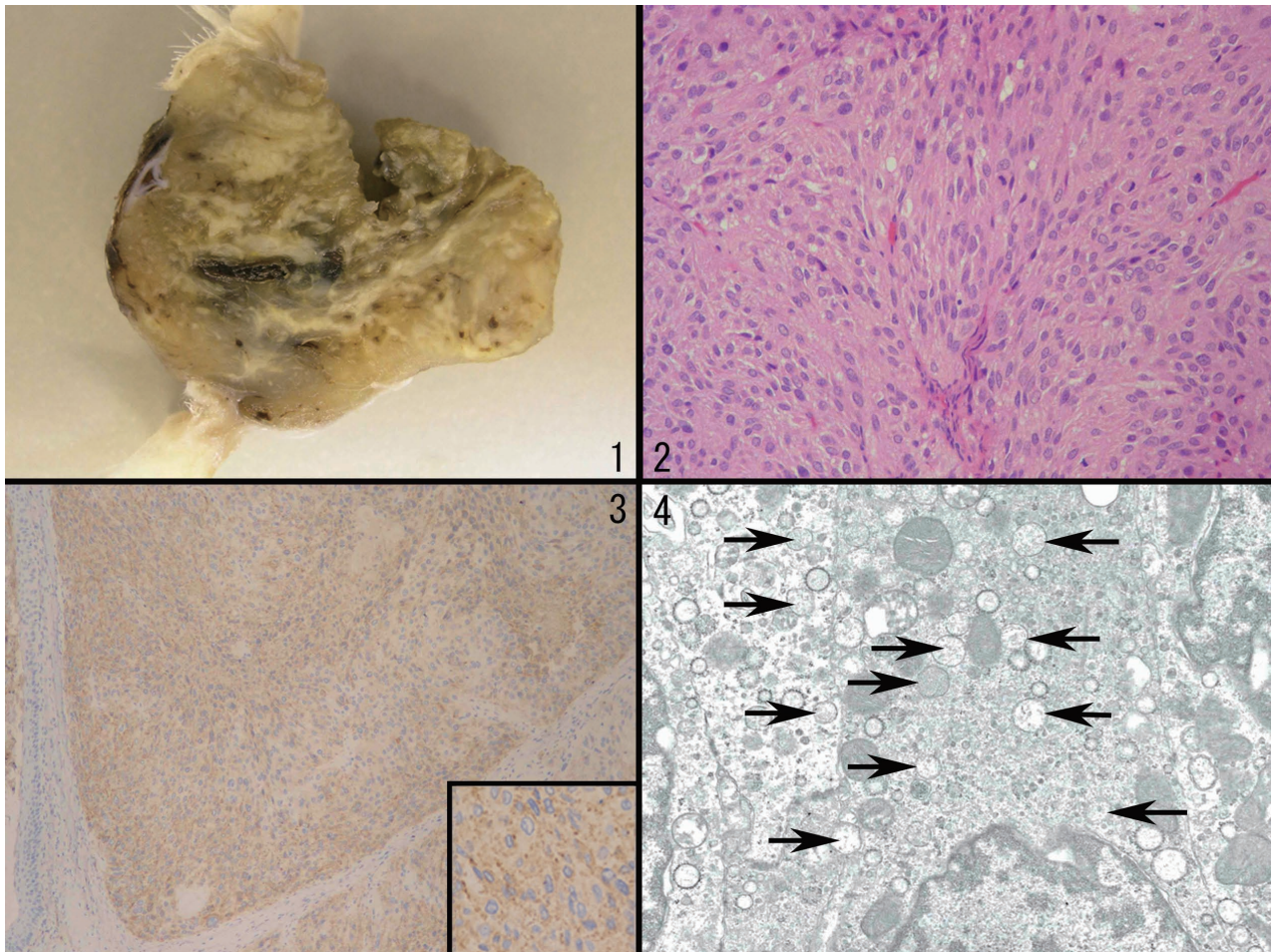
(山田 学)

参考文献：

1. Yamada, M., et al., *Vet Rec* 155 : 304-306 (2004).
2. Nakamura, K., et al., *Vet Pathol* 19 : 140-149 (1982).

ラットの眼球後部腫瘍および肺腫瘍

三菱化学安全科学研究所 第46回獣医病理学研修会標本 No. 922



動物：ラット，Crj:CD(SD)IGS，雌，67週齢。

臨床事項：本症例は発がん性試験の背景データ集積のため，溶媒を経口投与した群の1例である。42週齢から左眼球の突出が，45週齢から眼球内の混濁が認められた。60週齢には頻呼吸が発現し，67週齢時に死亡した。

剖検所見：腫瘍は左眼窩内から頭蓋底部にかけて強い浸潤性を示しながら増殖していた。眼窩骨や頭蓋前方底部付近の骨組織は破壊され，左眼球は腫瘍内に埋没し不明であった。腫瘍断面は白色から灰白色で，壊死巣が多発し，腫瘍と周囲組織との境界は不明瞭であった(図1)。肺には直径2-5mm大の白色から灰白色の腫瘍が散発していた。その他に削瘦，脾臓と胸腺の萎縮が認められた。

組織所見：紡錘形の腫瘍細胞が束状に増殖する部位(図2)，円形の腫瘍細胞がシート状に増殖する部位，不整形の腫瘍細胞が時折bizarreな核を有し不規則に増殖する部位など腫瘍細胞の形態および増殖態度は多様性に富んでいた。核分裂像も散見された。正常部位との境界は不明瞭であったが，頭蓋腔内に侵入した腫瘍組織の脳実質内への浸潤は認められなかった。腫瘍内には壊死巣が散在していた。免疫染色で腫瘍細胞はAnti-melanoma(clone PNL2)抗体(Dako Japan Inc.)に陽性を示した(図3)。陽性シグナルは細胞質内にドット状に観察された(図3 inset)。電顕観察では細胞間結合構造(デスモ

ゾーム)やInterdigitationは認められず，細胞質内には絮状物を容れる単位膜の空胞構造物が多数観察された(図4矢印)。

診断：アルビノラットの頭部における悪性無色素性黒色腫(髄膜由来を疑う)と肺の転移巣(Malignant amelanotic melanoma in the head [speculated to be derived from meninx] and pulmonary metastatic lesions of an albino rat)

考察：Anti-melanoma(clone PNL2)抗体を用いた免疫染色を行った結果，アルビノラットの非腫瘍性および腫瘍性メラノサイトに高い特異性を示した。すなわち，電顕でメラノソームが確認された無色素性メラノーマに陽性を示し，正常皮膚，眼球のメラニン細胞にも陽性を示した。一方，アルビノラットの他の間葉系腫瘍，神経系腫瘍には陰性であった。よって本症例を無色素性メラノーマと診断した。アルビノラットにおける頭蓋内の無色素性メラノーマの報告は見られない。

(黒滝 哲郎)

参考文献：

1. Mohr, U. p. 33. In : International classification of rodent tumours. Part I: The Rat. 7. Central Nervous System ; Heart ; Eye ; Mesothelium. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France. (1994).
2. Rochaix, P. et al., *Mod Pathol* 16 : 481- 490 (2003).

肉牛における経済形質の遺伝子診断に向けて

佐々木義之 (京都大学名誉教授)

牛肉は離乳後の子牛を素牛として、これに栄養価の高い飼料を給与・肥育することによって生産される。肥育の仕上がった牛を屠殺した後、枝肉を解体し、精肉として利用される。牛乳は牛が出す乳で、卵は鶏が毎日生産し、いずれも生体のまま生産されるのに対して、牛肉は牛を屠殺した後でないと得られない。肉量のみを問題にする場合は成長の度合いで判断することも出来るが、肉牛がどのような質の牛肉をどのくらい生産するのかを、生きたままの状態では知ることができない。

一般に、動物の生産性には遺伝と環境の両方が影響している。遺伝を司っているのは遺伝子であり、環境を構成しているのは飼料、飼養管理、気候などである。前者の遺伝すなわち遺伝子を望ましいものに替えていくことによって生産性を高めていくのが育種である。しかし、それぞれの個体が望ましい遺伝を保有しているかどうかを直接見たり、測定したりすることはできなかった。したがって、個体について得られる生産性の記録から、その個体が保有する遺伝を予測する必要があった。さらに、肉牛の場合はその生産性の記録も生体のまま得ることは難しかった。すなわち、肉牛の改良には二重の難しさがあった。

このようなことから、特に肉牛の場合は簡便かつ正確な選抜基準を得ることが育種家の悲願となっている。そこで、まず簡便に、生体のまま得られる外貌形質が選抜のよりどころとされ、ついで産肉能力検定により得られた記録が用いられるようになり、さらに遺伝的能力としての育種価が推定・利用されるに至っていた。近年は、分子生物学的手法の進展により、生産能力に関連した DNA 変異を検出して、それを選抜に利用するマーカーアシスト選抜が試みられようとしている。さらに、遺伝子自体が望ましいものであるかどうかを直接遺伝子型により判定(遺伝子診断)して、その情報に基づいた育種への扉がいま開かれようとしている。

今回、わが国の肉牛育種において、産肉性に関する選抜基準が過去 40 年間にどのように変遷してき

たか、いまどのような新しい動きがあるのか、さらに経済形質についても遺伝子診断を可能とすることによってどのようなことが期待できるのかなどについて、私見を述べてみたい。

1. 従来 of 改良

家畜の改良は多くの場合外貌審査に端を発している。これはそれぞれの家畜種やそれぞれの地域の家畜について用途に応じた理想体型を定め、その理想体型に個々の家畜がどの程度かなったものであるかを審査するものである。より理想体型に近い個体に高得点を与えることによって改良が図られた。我が国の和牛の場合も同様であったが、和牛に特徴的な点は被毛、皮膚、角の色・質、蹄などを資質と称して、この改良に力点が置かれたことである。そのねらいは日本人の好む肉質への改良の手掛かりとすることであった。しかし、資質が肉質選抜の拠り所として有効であるためには、それらと肉質形質との間の遺伝相関が高くなければならない。この点に関して、(社)全国和牛登録協会が昭和 51 年から 56 年にかけて実施した産肉能力検定間接法の検定息牛の記録を用いて検討した結果、資質形質と肉質形質との間の遺伝相関係数は、高いものでも 0.3 程度と低く、資質形質が肉質選抜のよりどころとなり得ないことが明らかになった。

一方、昭和 43 年から種雄牛産肉能力検定法が実施され、種雄牛の選抜を中心に改良が進められるようになった。その概要は、基幹種雄牛と優良雌牛群とを計画交配して生まれた雄子牛を道府県が買い上げ、増体能力や飼料利用性について能力検定をする直接法(直接検定)と、肉質などの枝肉形質は屠殺しないと測定できないので、直接検定で選ばれた雄牛を一般の雌牛群に試験交配し、生まれた息牛を道府県が買い上げて肥育し、それら肥育牛の枝肉形質記録から、この検定雄牛の能力を評価する後代検定、いわゆる間接法(間接検定)からなっていた。これらはいずれも、検定場において、定められた検定用

飼料を一定期間与え、一定の飼養管理の下で行われる検定場方式であった。

しかし、検定場方式であるために多くの経費、施設、労力を要し、しかも道府県単位で実施されているという制約もあり、その実効をあげることが難しかった。たとえば、ある県で肉質の点で優秀な種雄牛が作出され全国的に名声を博しても、その種雄牛に匹敵するかあるいはそれを凌駕する後継種雄牛を計画的に作出することができなかった。

それらの理由はいろいろ考えられるが、その中で最も基本的かつ重要な点は次の二つであったと筆者は考える。まず、雌牛の産肉性とくに肉質については、生体のままでは測定することができないし、また一度に生産できる子どもの数が少ないので後代検定をすることもできないために、雌牛の産肉性に関する遺伝的能力の評価が難しかったことである。このため、種雄牛候補を作るための計画交配において母牛が血統や外貌では選ばれていたが、産肉性の遺伝的能力評価ができていなかったことである。二つ目は、これら若雄牛の産肉能力検定は、生産現場とは異なる検定場で、一定の飼養条件下に検定され、当該年度内に実施された雄牛間でのみ比較され、選抜されていた。このために、若雄牛とすでに生産現場で高い評価を得ている種雄牛との間、あるいは後者の種雄牛間で、遺伝的能力についての比較ができるシステムになっていなかったことである。

この点に関して筆者らのグループは、肥育農家から枝肉市場に出荷されてくる肥育牛の枝肉形質記録すなわちフィールドデータに着目した。これらの肥育牛は、生産現場で飼育されている繁殖雌牛と種雄牛との間に生まれた子牛が、子牛市場を経て肥育農家にわたり、そこで肥育されたものである。したがって、これらのフィールドデータを利用すれば、それらの父である種雄牛と母である繁殖雌牛の遺伝的能力すなわち育種価の評価ができるのではないかと考えた。これがフィールド方式の育種価評価の考え方である。

まず、鹿児島県、大分県などにおいてフィールドデータの収集に取り組んだ。それら得られた肥育牛の枝肉記録を使って、父牛の遺伝的能力評価ができるかどうかについて検討し、肥育農家、月齢、出荷年次など環境要因の影響を統計的方法によって適切に取り除くと、表1に示すようにフィールドデータに基づく枝肉形質に関する遺伝率が0.3～0.4に推定され、遺伝的能力評価ができることを明らかにし

表1 フィールド記録にもとづく枝肉形質に関する遺伝率推定値

データ ソース	遺 伝 率 ± 標 準 誤 差			
	枝肉重量	枝肉歩留	脂肪交雜	格 付
大中の湖農協	.40 ± .16	—	.30 ± .14	.23 ± .13
遊佐農協	.33 ± .11	.45 ± .13	.37 ± .11	.34 ± .11
大分県	.23 ± .07	.32 ± .09	—	.32 ± .09
鹿児島県	.19 ± .04	.25 ± .05	.36 ± .07	—

(佐々木ら, 1986)

た。ついで、これらの枝肉記録を用いて種雄牛および繁殖雌牛の遺伝的能力すなわち育種価を評価する方法について検討し、肥育農家などの環境要因の影響を適切に取り除いて、正確な育種価を評価する方法としてBLUP法が最適であることを理論的に、またシミュレーションによる検討で明らかにした。

次に、わが国の肉牛集団において、BLUP法（ブラップ法：混合モデル方程式の解として最良線形不偏予測量を得る方法で、個体の遺伝的能力を推定するのに最も優れた方法であるとされている）による育種価評価を行うのに最適な評価モデル、母数効果として取り込む要因、必要な血縁情報等について検討を行った。しかし、我が国においては、和牛の肥育農家の規模が小さく、またそれら肥育牛が出荷される枝肉市場の規模も小さい。さらに、種雄牛の交配頭数も少ない。このような、小規模条件下にも、BLUP法が種雄牛評価法として有効であることをフィールドデータを用いたユニークな方法（肉牛の場合同一の種牛が多年次にわたって複数の後代を生産しているので、長年にわたって収集・蓄積されたフィールド記録を収集年次により前半と後半の二つのデータセットに分け、前半のデータセットを用いてBLUP法による種雄牛評価を行い、評価された種雄牛がそれ以後に生産した後代牛の記録〔後半のデータセットに含まれる〕と比較するという方法）で実証した。

以上のように、フィールドデータに基づいて、生産現場で供用されているすべての種雄牛と繁殖雌牛の育種価評価ができるようになったので、これらの種雄牛および雌牛が育種価に基づいて序列付けされるようになった。そこで、繁殖農家では育種価を判断基準として、能力の低い雌牛の淘汰並びに更新雌牛の選抜を行うようになり、その結果、枝肉形質に関する遺伝的改良が急速に進んだ。大分県および熊本県における遺伝的改良の結果を示したのが図1である。横軸は雌牛の出生年で、出生年ごとにその年

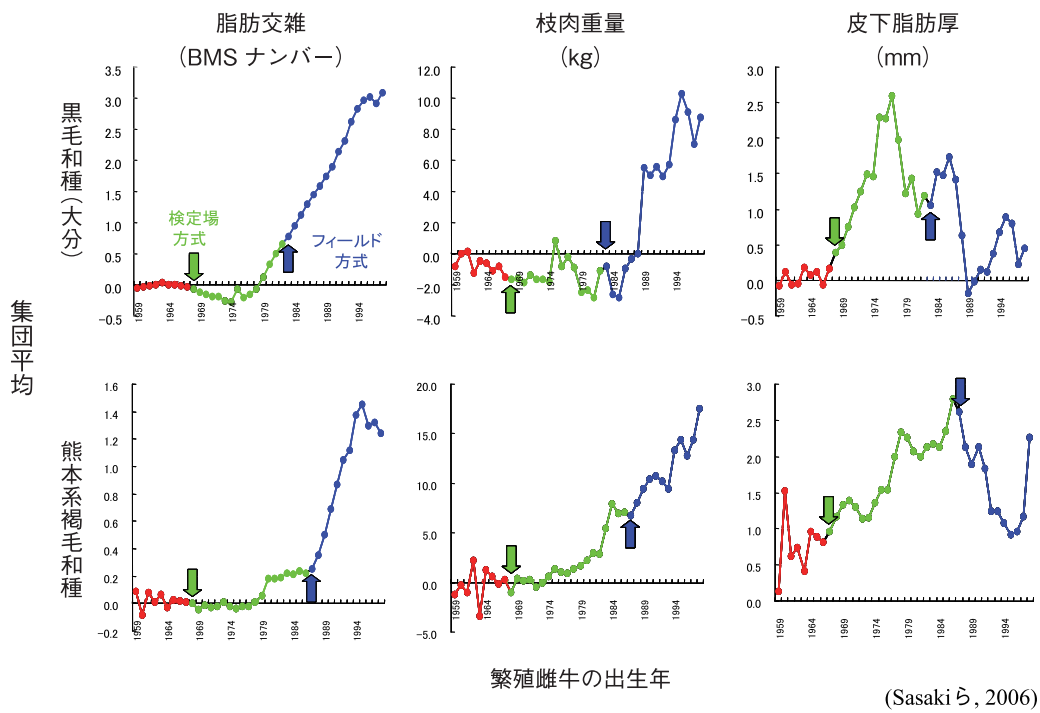


図 1：枝肉形質に関する遺伝的趨勢

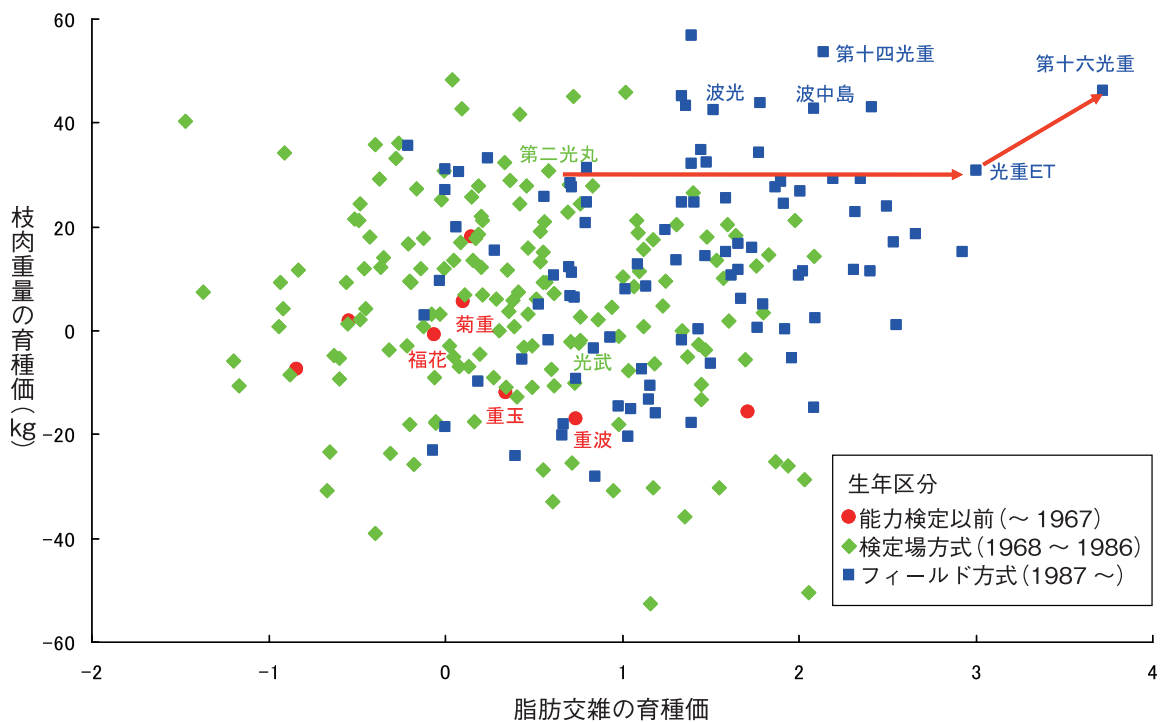


図 2：熊本系褐毛和種雄牛の枝肉重量と脂肪交雑に関する育種価の散布図

に生まれた雌牛の育種価の平均値を縦軸に示した。したがって、このグラフが集団平均の変化傾向すなわち遺伝的趨勢を示している、大分県の黒毛和種集団における脂肪交雑についてみると、検定場方式の産肉能力検定が始まるまでは全く変化はなく、その後少し上昇傾向を示し、フィールド方式が始まってからは急速に改良が進んでいることが分かった。熊

本県の褐毛和種でも同様の結果になっていた。また、枝肉重量についても、皮下脂肪厚についても、同じようにフィールド方式開始後急速に改良が進んでいた。

一方、種雄牛作出体系についてであるが、育種価を利用することによって初めて、遺伝的能力の点で最優秀の種雄牛に、最優秀の雌牛を計画交配するこ

とができるようになった。これによって生まれた種雄牛候補を、既存の種雄牛とも比較しながら選抜することによって、後継種雄牛を選抜する体系を熊本県でも大分県でも全県的な取り組みの中で構築してきた。その結果、いずれの県でも優秀な種雄牛が次々と作出されている。まず、熊本県の結果（図2）であるが、横軸には脂肪交雑に関する育種価を、縦軸には枝肉重量に関する育種価をとり、これまでに生産された種雄牛の育種価をプロットしてある。したがって、右上にいくほど、質量共に優れた種雄牛であることになる。赤丸が能力検定開始以前、緑菱が検定場方式の時代、青四角がフィールド方式開始後を示しているので、段々とより優秀な種雄牛が作出されていることが分かる。とくに、種雄牛「第二光丸」に最初の育種価評価で最優秀であった雌牛を計画交配して、脂肪交雑の点で非常に優れた種雄牛「光重ET」を作出し、さらにその「光重ET」を凌駕する種雄牛「第十六光重」を作出することに成功している。図3は大分県黒毛和種の結果であるが、熊本県の場合と同様にフィールド方式の採用により種雄牛の改良が進んでいるが、とくに脂肪交雑の点で非常に優れたダントツトップの種雄牛「糸福」をはるかに超える種雄牛「寿恵福」の計画的作出に成功している。このように、その時代を代表する最優

秀の種雄牛を凌駕する後継種雄牛を計画的に作出したことは、和牛改良史上画期的な成果であると考えている。

2. 脂肪交雑の責任遺伝子同定

育種価に基づいて、ある雄牛をある雌牛に交配した場合、それらの後代の育種価は両親の育種価の和の1/2と期待される。期待されるという育種学的な意味は、それらの後代が多数得られたとして、それらの育種価の平均値が両親の育種価の和の1/2になるということである。いま、脂肪交雑の育種価が3.2である雄牛と2.8である雌牛とを交配した場合、それらの間に生まれる後代の育種価は $(3.2+2.8) \times 1/2 = 3.0$ と期待される。一方、それら後代の中には、期待値よりずっと高い育種価をもつ個体(A)や逆にずっと低い育種価をもつ個体(C)が生まれる。多くの後代は期待値に近い育種価をもつ個体(B)である。このように、同じ両親から生まれる後代でもそれぞれ異なる育種価を受け継いでいる。この現象は分離と呼ばれ、この現象を利用することによって、最優秀の先代種雄牛を凌駕する後継種雄牛を作出することができる。

しかし、計画交配によって生まれた雄牛が、(A)

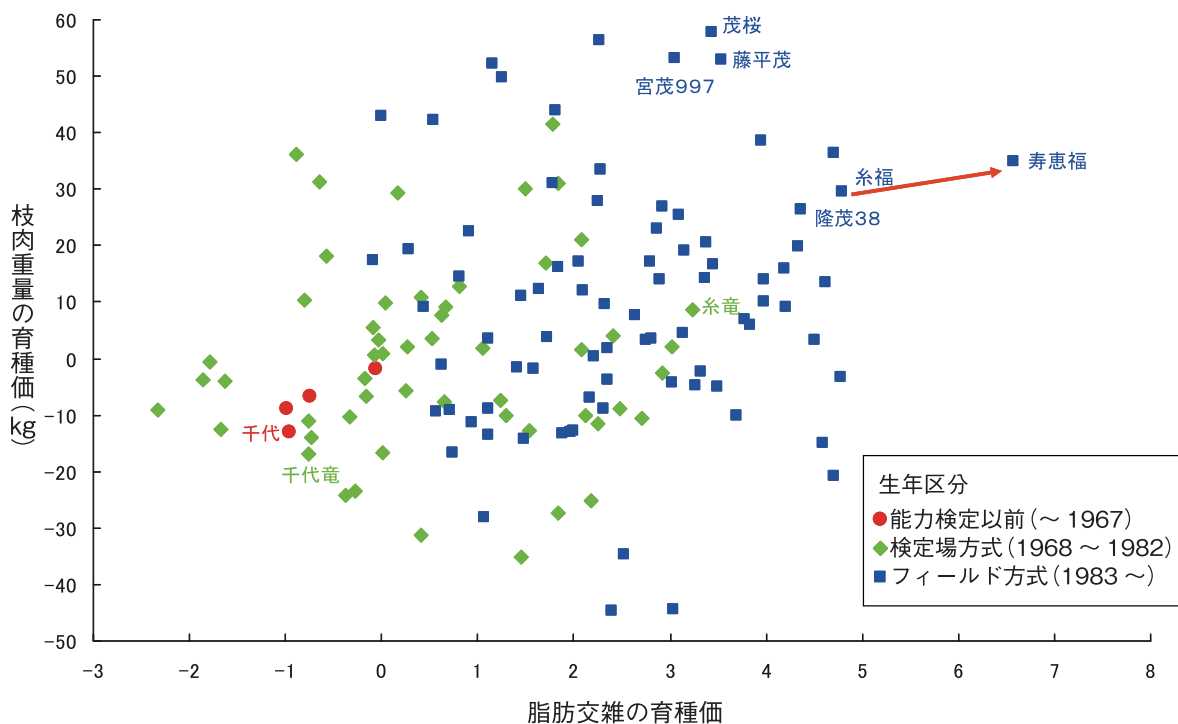


図3：黒毛和種(大分)種雄牛の枝肉重量と脂肪交雑に関する育種価の散布図

であるか、(C)であるか、あるいは(B)であるかは、その雄牛の能力検定をした後でないと分からない。とくに産肉性については後代検定が終わらないと分からないので、その選抜に多くの経費と長い年月を要する。ところが、当該生産形質を支配している遺伝子あるいはそれと強く連鎖している遺伝子マーカーが分かれば、生まれたすぐ、あるいは胚の段階でも、遺伝子型あるいはマーカー型を個々の個体について判定し、選抜することができる。そのメリットは、世代間隔が長く、しかも屠殺しないと生産能力記録が得られない肉牛では特に大きい。

量的形質の発現を支配する量的形質遺伝子座(QTL)の染色体上での位置を推定することをQTLマッピングと呼び、これによって肉牛についてもいろいろな生産形質について多数のQTL領域が検出されている。そこで、それらの領域にある遺伝子マーカーを手掛かりに生産形質の良否を評価し、選抜を行うことができる。このように、遺伝子マーカーを手掛かりに行う選抜をマーカーアシスト選抜(MAS)という。

一言でMASといっても、MASには、QTLの情報をどの程度正確に扱えられるかによって、3つの段階がある。まず、MAS IはQTLが余り近くないマーカーで位置づけられている段階である。これは通常のQTLマッピングの結果を用いる場合である。

この段階では、QTLとマーカーとの関連は当該家系にのみ当てはまり、他の家系のMASに利用するには再度解析を仕直す必要がある。次に、MAS IIはQTLが連鎖不平衡マッピングにより精細に位置づけられた段階であり、マーカー型とQTL型との関連は家系を越えて集団に共通する。したがって、MASへの利用が一層有効なものとなる。最後のMAS IIIはQTLの責任遺伝子が同定された段階であり、究極のMASともいえ、生産能力をQTL遺伝子型により評価する遺伝子診断となる。

著者らは、肉牛の脂肪交雑形成に関与する責任遺伝子を同定することを目的として、脂肪交雑形成能力が極めて高いことが判明している黒毛和種雄牛「糸福号」由来の体細胞クローン牛とその能力が極めて低いホルスタイン種牛の間で、脂肪交雑形成が始まる前後8, 10, 12および14ヶ月齢の時期の最長筋において、mRNAの発現パターンが異なる遺伝子を調べてきた(図4)。ディファレンシャルディスプレイ(DD)法に90種類のプライマーペアを利用することで、ゲル上に検出された2,114個のバンドのうち、74個(このうち3つのバンドについては2つの遺伝子が重なっていた)において、糸福クローン牛とホルスタイン種牛との間の発現パターンが異なっていることを明らかにした。これら77個の遺伝子の塩基配列を決定し、さらにホモロジー検

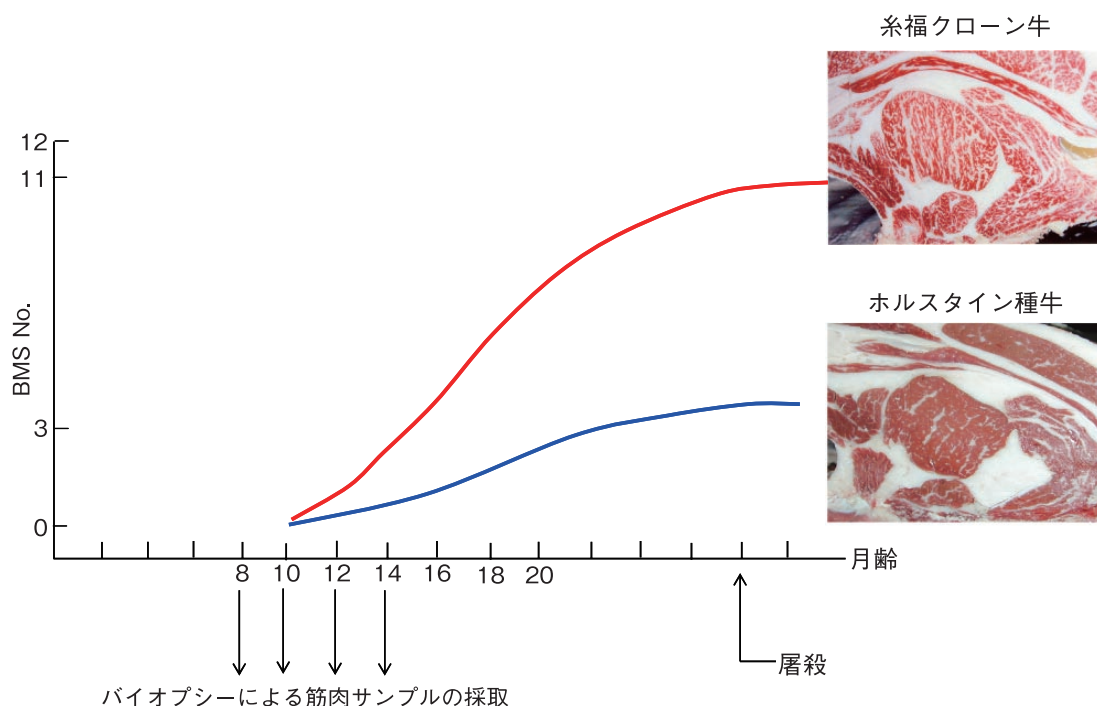


図4: mRNA発現量の差に基づく脂肪交雑責任遺伝子同定の戦略

索を行うことにより、ヒトなどで機能が既知となっている 35 個の遺伝子と未知である 42 個の遺伝子を明らかにした。既知遺伝子についてはリアルタイム PCR により発現パターンを確認するとともに機能面から選択することで、35 個の中から 4 つの遺伝子 (*BTG2*, *EDG1*, *VAPA* [その後の解析で *XM611598* であることが分かった] および *WBP2*) を脂肪交雑責任遺伝子の候補として選んだ。

これら 4 つの候補遺伝子について、クローニングおよび塩基配列の決定、並びにデータベースの検索を行うことによりウシゲノム構造を明らかにした。さらに、ゲノム構造に基づき、エキソンおよびプロモーター領域 (約 2kb) をカバーするプライマーの設計を行い、PCR ダイレクトシーケンスによる糸福クローン牛とホルスタイン種牛間のゲノム塩基配列の比較を行ったところ、*EDG1* (5' 非翻訳領域の +166bp と 3' 非翻訳領域の +3,698bp), *XM611598* (プロモーター領域の -1,723bp, 翻訳領域の +524bp, 3' 非翻訳領域の +1,192bp), および *WBP2* (プロモーター領域の -72bp と -1,702bp) に一塩基多型 (SNP) が検出された。

これらのうち *EDG1* において検出された SNP (一

方を *G* 対立遺伝子, 他方を *A* 対立遺伝子とする) については、種雄牛「糸福号」を父に持つ種雄牛 4 頭 (遺伝子型はいずれも *GA* ヘテロ型) の半きょうだい肥育牛 283 頭の脂肪交雑および皮下脂肪厚の育種価について、遺伝子型を母数効果, 種雄牛を変数効果とするモデルで分散分析を行ったところ、脂肪交雑についてのみ危険率 5% 以下で遺伝子型間の変動が有意であった (表 2)。また、脂肪交雑の育種価にもとづき上位 85 頭と下位 85 頭における遺伝子型頻度および遺伝子頻度の独立性検定を行ったところ、後者では 5% 水準で有意性が認められた (表 3)。以上の結果から、*G* 対立遺伝子が脂肪交雑形成に対してプラスの効果をもっていることが示された。

ここで用いた戦略 (図 4) では、脂肪交雑形成にかかわる責任遺伝子の多くに網がかけられていると考えられるので、今後、得られた *EDG1* 以外の候補遺伝子における SNP の検出, 相関解析, さらに 42 個の未知遺伝子についての解析をすすめることによって、第 2, 第 3 の脂肪交雑責任遺伝子を同定することができると考えている。

3. これからの方向

今回同定された *EDG1* 遺伝子だけでなく、いくつかの脂肪交雑責任遺伝子が同定され、それらの遺伝子型判定によって脂肪交雑に関する遺伝的変異のかなりの部分が把握できるようになると、脂肪交雑形成能力の高い個体とそうでない個体を遺伝子診断によって判定することができる。

いま、ある量的形質の発現を支配する多数の責任遺伝子のうち、 Q_1 遺伝子座から Q_5 遺伝子座までの責任遺伝子が、図 5 に模式的に示すように同定されたと考えてみよう。 Q_1 遺伝子座は最も大きい効果をもった QTL で、遺伝子の作用は相加的である。次に大きい効果の Q_2 は Q_3 との間にエピスタシスがある。すなわち、 Q_3 遺伝子座の遺伝子型が Q_3Q_3 あるいは Q_3q_3 の場合にのみ Q_2 遺伝子座は発現する。 Q_3 , Q_4 と段々効果の小さい QTL があり、 Q_3 は部分優性で、 Q_4 は完全優性、さらに Q_5 は超優性など種々の優性効果を示す。その他に、多数のポリジーン ($Q_6 \sim Q_n$) があると考えられるが、これらの遺伝子について個々に同定することは容易でない。

従来の統計遺伝学的育種では確率論的予測が中心になっている。育種価に基づいて後代の能力を予測するという事は、前述したように、すべての後代

表 2 特定種雄牛の半きょうだい肥育牛を用いた最小二乗分散分析による相関解析

変動因	自由度	脂肪交雑		皮下脂肪厚	
		平均平方	P 値	平均平方	P 値
遺伝子型	2	2.62	0.049	17.9	0.30
種雄牛	3	4.27	0.002	813.1	0.0001
誤差	277	0.86		14.8	

遺伝子型ごとの最小二乗平均値

遺伝子型	頭数	脂肪交雑 (BMS No.)	皮下脂肪厚 (mm)
<i>GG</i>	84	2.39 ^a	-0.80 ^a
<i>GA</i>	138	2.30 ^{a,b}	-0.29 ^a
<i>AA</i>	6	2.10 ^b	-1.50 ^a

a, b : 同じ肩文字をもたない同列の平均値間の差が有意 (p<0.05)

表 3 特定種雄牛の半きょうだい肥育牛を用いた独立性検定による相関解析 (脂肪交雑)

遺伝子型頻度					遺伝子頻度			
群	遺伝子型			計	群	対立遺伝子		計
	<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>			<i>G</i>	<i>A</i>	
上位	29	44	12	85	102	68	170	
下位	23	38	24	85	84	86	170	
計	52	82	36	170	186	154	340	
χ^2 検定	: P=0.077				χ^2		: P=0.0499	

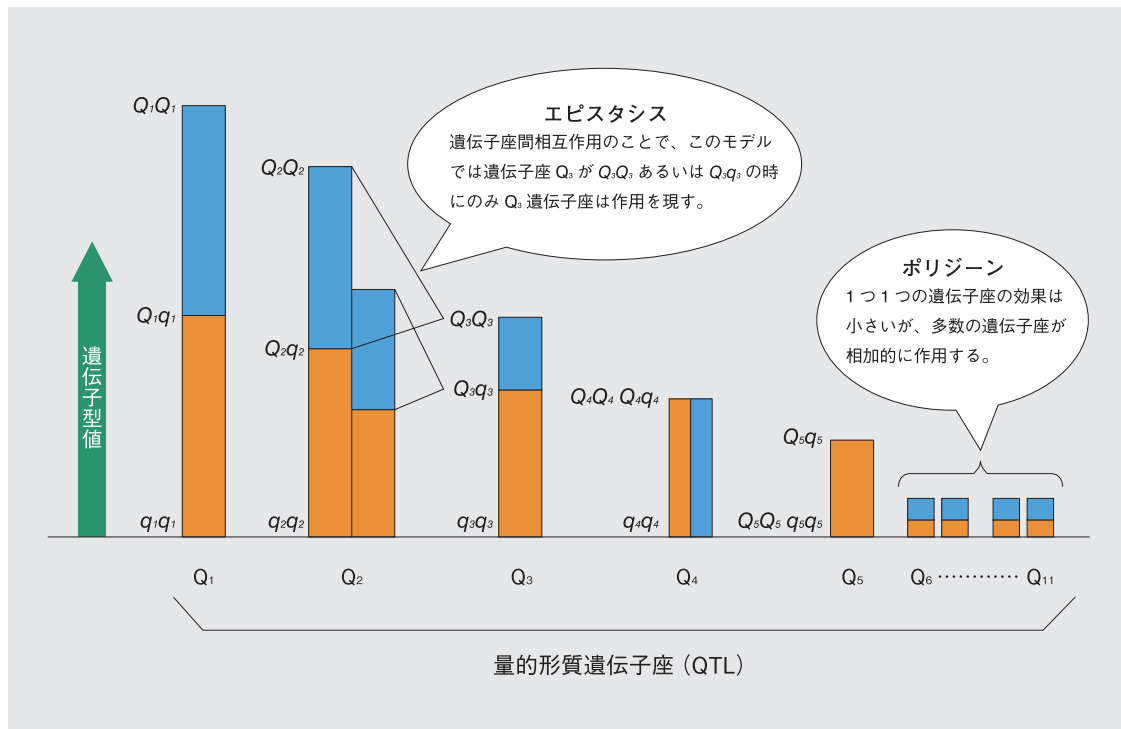


図5 量的形質の発現を支配する遺伝子座とそれらの作用モデル

がそれだけの遺伝的能力をもっているはずであるという期待値を予測している。しかし、実際に個々の後代は異なる遺伝的能力をもっている。今後、遺伝子診断を取り込むことによって、これを決定論的予測に変えることができるのではないかと考えられる。たとえば、図5における Q_1 遺伝子座において、 Q_1q_1 の父と Q_1Q_1 の母との間に生まれた後代について、 Q_1 遺伝子型すなわち Q_1Q_1 、 Q_1q_1 あるいは q_1q_1 を判定することによって、きょうだい間における Q_1 により説明される遺伝的能力の差を知ることができる。

さらに、従来エピスタシスはないものと仮定され、実際の育種では余り顧みられることはなかった。しかし、ある一つの形質を多数の遺伝子座が支配する以上、それらの遺伝子座間に相互作用はあると考えるのが妥当である。いま、図5に示されているように Q_2 の遺伝子座と Q_3 の遺伝子座との間にはエピスタシスが存在する場合、従来の統計遺伝学的育種においては望ましい遺伝子型の個体を正確に選抜することは難しい。ところが、遺伝子診断が可能となれば、遺伝子型 $Q_3q_3Q_2q_2$ の個体と $Q_3q_3Q_2Q_2$ の個体との間で交配し、生まれた後代について遺伝子座 Q_3 については Q_3Q_3 のものを選び、さらに Q_2 遺伝子座について Q_2Q_2 を選ぶことによって、最も遺伝的能力の高い遺伝子型 $Q_2Q_2Q_3Q_3$ の個体を正確に選

抜することができることになる。

そこで、脂肪交雑について遺伝子診断が可能になると、和牛生産にどのように利用できるかについて考えてみよう。まず、最初に考えられるのが肥育への応用である。わが国では脂肪交雑が枝肉価格決定の最重要因子であるために、肥育農家は脂肪交雑のよく入った牛肉の生産を目指して種々の取り組みを進めている。しかし、脂肪交雑に関する遺伝的能力をもっていない素牛にいくら高エネルギー飼料を給与し、長期間肥育しても、十分脂肪交雑を入れることは難しい。そこで、肥育開始前に脂肪交雑に関する遺伝子座の遺伝子型を判定し、それらの能力に合った肥育計画を立てることができれば、効率的な牛肉生産をすすめる上で非常に望ましい。

肥育への利用はすでに同定されている *EDG1* 遺伝子だけについても応用が可能である。この遺伝子の対立遺伝子について両ホモ型間の脂肪交雑に関する BMS ナンバーの差は 0.3 と推定されている (表2)。いま、BMS ナンバーが 1.0 だけ上がると枝肉単価が 100 円上がると仮定すると、*EDG1* 遺伝子について *GG* 型のものを選べば、*AA* 型のものに比べて、枝肉価格で約 13,500 円の増加となる (枝肉重量を 450kg と仮定)。素牛を選ぶだけで、1 頭ごとにこれだけの差が生じることの意義は大きい。ただ問題になるのは、素牛購入の時点で *EDG1* 遺伝子型の

判定ができていないことである。その意味で、今後遺伝子型判定の簡便化、迅速化が求められる。

もう一つの利用が育種改良への応用である。脂肪交雑など屠殺しないと測定できない形質について、生体のまま、しかも生育のごく初期の段階で遺伝的能力を判定できることは肉牛改良関係者の悲願であった。いま、まさにその扉が開かれようとしている。

遺伝子診断が可能となることの育種への第一のメリットは、従来和牛改良の最大のネックとなっていた雌牛の遺伝的能力評価が容易かつ正確になることである。これによって、雌牛側からの選抜が種雄牛候補生産のための雌牛選びだけでなく、更新用雌牛生産にも適用することができるようになる。特に、肉質の点で黒毛和種に及ばないとされている褐毛和種や日本短角種の改良に大きく貢献すると期待される。

さらに、種雄牛選抜についても、計画交配により生まれた産子について、それが前述したAであるか、Bであるか、あるいはCであるかを、生まれたすぐにあるいは胚の段階でも判定でき、能力検定を受ける雄牛を予備的に選抜することが可能となる。これによって、能力検定を行う候補雄牛の頭数を大幅に減少させることができる。

しかし、量的形質に関する遺伝子診断を育種改良に利用することについてはいまひとつ慎重を要する。量的形質は多数の遺伝子座にある遺伝子の支配を受けているので、遺伝子型判定が可能となった遺伝子については望ましい遺伝子型でなくても、同定されていない遺伝子座の遺伝子が非常に望ましいものであるかもしれない。にもかかわらず、同定された一部の遺伝子のみについて選抜を進めると、他の遺伝子座にある望ましい遺伝子を淘汰してしまう危険性がある。そのような意味から、育種への本格的利用には遺伝子診断により遺伝分散のかなりの部分を捉えることができるほど多くの責任遺伝子が同定される必要がある。その場合でも、すべての責任遺伝子を同定することは不可能に近いと考えられるので、

それら同定されていない遺伝子座にある遺伝子の相加的遺伝子効果をBLUP法により評価し、遺伝子診断の結果と総合的に評価するべきであると著者は考える。

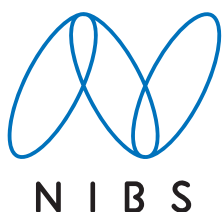
このような遺伝子診断を生産現場で活用していくためには、遺伝子型判定の簡便化と迅速化が求められる。EDG1のSNPは、現時点ではPCR-RFLP法により遺伝子型判定を行っている。検体としては、被毛、血液、皮膚等の生物体の一部を使用することができる。しかし、将来的には、キットなどの開発により遺伝子型判定が生産現場で簡単かつ迅速に行えるようになる必要がある。

この点に関して、採取サンプルからDNA抽出を行うことなく、直接PCRを行う技術の開発が急速に進展している。この技術は主として医学、実験動物などの分野で、血液サンプルを用いた技術として開発されているが、牛への応用も可能であると考えられる。さらに、口腔粘膜、毛根など生体のままでも、かつ簡便に採取できるサンプルに適用できるような研究も必要である。これらの技術を確立していけば、1時間から30分くらいで遺伝子型判定ができるようになると思われる。しかも、PCRおよび電気泳動装置はいまでも20~30万円程度で購入できるので、生産現場での実施の可能性は十分に考えられる。

おわりに

わが国における肉牛の育種に関する技術は、この40年間に急速に発展してきた。それらの実際面への応用に関しては、現在フィールド方式の育種価評価はほぼ全国的に行きわたっているが、生産形質に関する遺伝子診断については、今漸く端緒が開かれたばかりで、トンネル工事で言えば、導坑が完成した段階に相当し、今後の進展に大きい期待がかけられている。

日生研たより 昭和30年9月1日創刊(隔月1回発行)
 (通巻544号) 平成19年4月25日印刷 平成19年5月1日発行(第53巻第3号)
 発行所 財団法人日本生物科学研究所
 〒198-0024 東京都青梅市新町9丁目2221番地の1
 TEL0428(33)1056(企画学術部) FAX0428(31)6166
 発行人 井土俊郎
 編集室 委員/小山智洋(委員長), 中村圭吾, 川原史也
 事務/企画学術部
 印刷所 株式会社 精興社
 (無断転載を禁ず)



—— テーマは「生命の連鎖」——
 生命の「共生・調和」を理念とし、生命体の豊かな明日と、研究の永続性を願う気持ちを心よいリズムに整え、視覚化したものです。カラーは生命の源、水を表す「青」としています。

表紙題字は故中村稔治博士の揮毫