



AFLP法によるゲノムスキニングと牛の育種

笹崎, 晋史

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2005-03-25

(Date of Publication)

2009-04-17

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3284

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003284>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

AFLP 法による
ゲノムスキニングと牛の育種

平成 17 年 1 月

神戸大学大学院自然科学研究科

笹崎 晋史

目次

第1章 序論	1
第2章 AFLP 法による肉用牛 5 品種の系統分析	
第1節 緒言	4
第2節 材料および方法	5
第3節 結果	12
第4節 考察	18
第3章 DNA マーカーを用いた国産牛肉の品種鑑定	
第1節 緒言	21
第2節 材料および方法	33
第3節 結果	41
第4節 考察	59
第4章 DNA マーカーを利用した黒毛和種の選抜	
第1節 緒言	63
第2節 材料および方法	67
第3節 結果	70
第4節 考察	83
第5章 総括	85
謝辞	88
引用文献	89

第1章 序論

分子生物学の発展によって、遺伝子の本体である DNA を分析できるようになり、DNA での情報や遺伝子自体の情報を取り込んだ家畜育種への道が開かれようとしている。

近年、遺伝子工学と呼ばれる新技術の発達に伴って、従来の血液型や多型蛋白質に代わる方法として遺伝物質である DNA そのものの多型を分析する方法が注目されるようになった。それらのうちでも代表的なものが、RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法、DNA フィンガープリント法、及び VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) 分析法などである。

哺乳類の染色体 DNA は、1 倍体あたり約 3×10^9 bp からなり、この DNA 全体をゲノムとよぶ。しかし、このなかで実際に遺伝子として翻訳される領域やそれに関わる領域は全体の 1% 以下であり、ゲノムの大部分はスペーサーやイントロンと呼ばれる非遺伝子領域であると考えられている。これらの領域における突然変異は、生命維持には直接関係しないために、排除されることなく受け継がれ、蓄積される。よってこれらの領域は高度な多型性をもつことになる。また、これらの非遺伝子領域には、単純な塩基配列が多数反復している部分があり、ゲノム全体の 30~40% をも占めている。これらは、反復単位の大きさにより 3 種類に分けられ、300bp 以上のものはサテライト、9~100bp のものはミニサテライト、数塩基のものはマイクロサテライトと呼ばれている。

ミニサテライトでは数十塩基ほどの配列が 10~1000 回も繰り返されている。この反復回数は個体間でかなり異なり、この領域が高い多型を示す原因となっている。1985 年、Jeffreys らはこの反復配列をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、ゲノムに存在する類似した複数のミニサテライト遺伝子座を同時に検出することに成功した。これが DNA フィンガープリント法とよばれるもので、個体識別や親子鑑定に有用とされている。しかしながら、この方法では 20~50 個の遺伝子座を同時に検出してしまうため、各々

のバンドがどの染色体に由来するのか、さらには遺伝子型の判定が不可能であるという欠点をもっている。

この欠点を補うため、各々の反復配列を単離・クローニングし、1 遺伝子座のみを検出する VNTR 法が開発された。VNTR 法は、ある特定の領域（遺伝子座）において、タンデムに並んだ反復配列の回数が個体間で異なっていることを利用した多型検出法である。前述のように、DNA フィンガープリント法では複数の遺伝子座の多型を同時に検出する為に、各々のバンドにおけるホモかヘテロかの区別は困難であるが、VNTR 法では特定の遺伝子座について検出を行うので、ホモかヘテロかの判定は容易である。このことから VNTR 法は、DNA フィンガープリント法にない有利な点を備えている。なかでも、マイクロサテライトにおいては、植物、昆虫、魚類から哺乳類まで大部分の生物のゲノムに共通して観察されている。哺乳類においては、ヒトやマウスをはじめとしてブタ、ウシ、ラットなどについて調べられており、高度な多型性が観察されている。また、哺乳類では、マイクロサテライト遺伝子座は数万から 10 数万個あることが知られており、ミニサテライトと比較しても多くの多型を検出する事が可能である。

以上のような特徴によりマイクロサテライトは、遺伝的マーカーとして優れており、個体識別や親子鑑定、あるいは高等動物における遺伝子地図作成に、近年最も利用されている。しかしながら、マイクロサテライトマーカーは、ヒトやマウスでは多数開発されているものの、家畜においては、いまだ十分とはいえず、遺伝子地図の作成に関しても完成の域には達していない。

そこで新しい多型解析の方法として AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 法が近年注目されるようになった。AFLP 法は 1995 年、オランダの Vos らにより開発された多型分析法である。この方法は、ゲノム DNA を制限酵素で切断した断片に特定のアダプターを付加し、これを増幅のための鋳型 DNA とし、3'末端に任意の塩基を付加したプライマーを用いることにより選択的に増幅することに基づいており、このため以下のような利点をもっている。(1) 必要とするゲノム DNA の量がすくなくすむ。500ng の DNA で

理論的には1万回の電気泳動が可能である。(2) ゲノム DNA の塩基配列に関する情報が必要でない。(3) 操作が簡便で、再現性が高い。(4) 一回の電気泳動で多くの多型を一度に検出できる。(5) プライマーのセットを変えることにより、多数のバンドを検出できる。3つの選択的塩基を用いることにより、同じ鋳型 DNA に対して $4^6=4096$ のプライマーセットが使用できる。この方法は、最初は植物の研究に対して用いられ、連鎖解析や遺伝的類縁関係の推定などに利用されてきた。また、ここ数年では動物に対しても適用されてきており、その価値が認められている。

そこで本研究では、この AFLP 法をウシに適用し、AFLP 法の有用性を検討するとともに、本法を用いた新たな育種法について検討した。

第2章 AFLP法による肉用牛5品種の系統分析

第1節 緒言

AFLP法は1995年にVosら(1995)によって開発された多型分析法である。本法は、DNAを制限酵素で断片化したものに特定のアダプターを付加し、その中から任意の配列を持つものだけを選択的に増幅して多型を検出する。その特徴としては、一度に多くの多型を検出できる、プライマーの種類を変えることにより無数のバンドが得られる、再現性が高く信頼性がある、既知のゲノム情報が必要なく基本的にどんな生物種にも適用できるといった利点がある。これまで本法は主に植物に対して適用され、連鎖解析等における優れたDNAマーカーとしてその有用性が確認されている(Beckerら、1995; Eckら、1995)。家畜ではニワトリやウシに対して適用されているが、その報告例はまだ少ない(Ajmoné-Marsanら、1997; Knorrら、1999; Nijmanら、1999)。

我国固有のウシ肉用品種としては黒毛和種、褐毛和種、日本短角種および無角和種が存在する。これら肉用種はそれぞれ成立過程が異なり、基本的には我国の在来牛を基礎とするものの、韓国の在来牛(韓牛)の影響が強いものやヨーロッパ品種の影響を受けているものなど様々である。そこで本研究では、我国の代表的な肉用品種である黒毛和種と褐毛和種、韓国の肉用品種である韓牛に加え、ヨーロッパ起源の肉用品種であるヘレフォードとリムジンの合計5肉用品種に対してAFLP法を適用し、これら肉用品種の遺伝的構造や品種間の遺伝的類縁関係について調査するとともに、ウシ遺伝学的解析におけるAFLP法の有用性について検討した。

第2節 材料および方法

2-A) 供試動物

肉用牛である黒毛和種、褐毛和種（土佐）、韓牛、ヘレフォード、リムジンの5品種、各6頭を実験に供した。

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、同一種雄牛にまたがらないように選んだ。褐毛和種（土佐）は高知大農の櫻井孝志博士により高知県下で飼育されている繁殖雌牛から、韓牛は韓国嶺南大学の呂政秀博士により収集された韓国在来牛集団のサンプルを譲り受けた。ヘレフォードは新得畜産試験場で飼育されている雌牛、およびリムジンは家畜改良センター十勝牧場で飼育されている雌牛を用いた。これらの供試動物は血統情報から血縁関係が認められないことを確認している。

2-B) ゲノム DNA の精製

ウシゲノム DNA は肝臓組織、リンパ節、血液より抽出し、精製した。

2-B-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 を加えて 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 μ l を加え、37°C 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°C で溶かし、0.1% になるように 8-hydroxyquinoline を加え、TE buffer (10mM Tris-HCl ; pH8.0, 1mM EDTA) で水飽和したもの) を加え 10 分間ゆっくりと混和した。

3,000rpm で 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-hydroxyquinoiine 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 buffer に溶解して 4°Cで保存した。

2-B-2) リンパ節からの DNA 精製

リンパ節 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て 20ml の生理食塩水/EDTA を加えよく混和し、再び 3,000rpm で 10 分間遠心分離した。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。

2-B-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。

2-C) DNA の定量

DNA の定量は 260nm の吸光度測定で行った。O.D.₂₆₀=1.00 は 2 本鎖の DNA が 50 μ g/ml の濃度に相当する。同時に 280nm の吸光度も測定した。O.D.₂₆₀ : O.D.₂₈₀ 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が混入していない純粋な DNA が回収されたとみなした。

2-D) AFLP 法

以下の AFLP 法における操作は、基本的に Vos ら (1995) の方法に従った。方法の概要は図 1 に示した。

2-D-1) 制限酵素による DNA の切断

500ng の DNA を制限酵素 *EcoR* I と *Mse* I を用いて切断した。まず、10 \times 制限酵素 buffer 2.5 μ l、10 \times BSA 1.0 μ l、*Mse* I (4unit/ μ l) 5 μ l、DNA 溶液 20 μ l をよく混和した後、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。その後、超純水 13.25 μ l、10 \times 制限酵素 buffer 1.5 μ l、*EcoR* I (20unit/ μ l) 0.25 μ l を加え、よく混和した後、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。

2-D-2) アダプターの付加

制限酵素処理をした断片に *Mse* I アダプターと *EcoR* I アダプターを付加した。AFLP 法におけるアダプター及びプライマーの配列は表 1 に示した。DNA 溶液 40 μ l に、10 \times ligase buffer 1.0 μ l、1 mM ATP 1.0 μ l、*EcoR* I アダプター 2.5pmol、*Mse* I アダプター 25pmol、T4 DNA ligase (7.5unit/ μ l) 0.2 μ l を含む 10 μ l の溶液を加え、全量を 50 μ 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、-20 $^{\circ}$ C で保存した。

2-D-3) 1st PCR (Pre amplification PCR)

アダプターを付加した鋳型 DNA 5.0 μ l に、10 \times PCR buffer (100mM Tris-HCl, 15mM MgCl, 500mM KCl, pH8.6) 5.0 μ l、dNTP Mixture (2.5mM each) 4.0 μ l、Takara EX-Taq polymerase (5units/ μ l) 0.2 μ l、1 つの塩基を

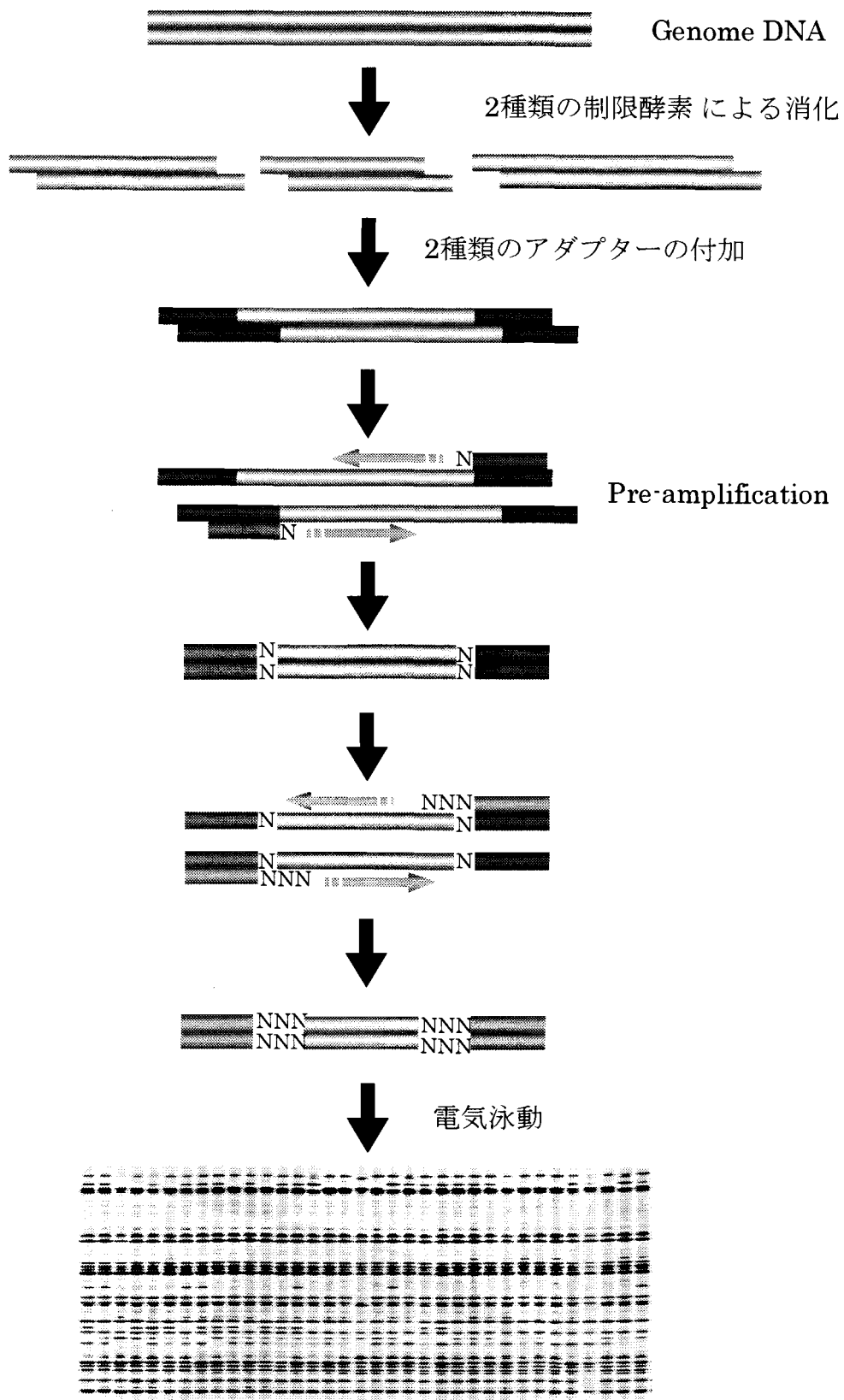


図1 AFLP法の概要図

付加した *EcoR* I と *Mse* I のプライマー (表 1) それぞれ 75ng 加え、超純水で全量を 50 μ l とした。反応はサーマルサイクラーを用い、以下の条件により pre amplification を行った。まず 94°C 30 秒、56°C 1 分、72°C 1 分を 30 サイクル行い、その後 72°C 10 分の伸長反応を行った。PCR 反応後、超純水により 10 倍に希釈した。その後、PCR 産物は -20°C で保存した。

2-D-4) 2nd PCR (Selective amplification PCR)

得られた PCR 産物を、3 つの塩基を付加した *EcoR* I と *Mse* I のプライマー (表 1) により増幅した。*EcoR* I プライマーは蛍光 (IRD800) でラベルしたものをを用いた。今回用いた選択的塩基の種類は表 1 に示す通りである。PCR 産物 5.0 μ l、10 \times PCR buffer(100mM Tris-HCl, 15mM MgCl, 500mM KCl, pH8.6) 2.0 μ l、dNTP Mixture (2.5mM each) 1.6 μ l、Takara EX-Taq polymerase (5units/ μ l) 0.08 μ l、3 つの塩基を付加した *EcoR* I プライマー 5 ng と *Mse* I プライマー 30 ng をそれぞれ加え、超純水で全量を 20 μ l とした。反応はサーマルサイクラーを用い、以下の条件により行った。まず、94°C 30 秒、65°C 30 秒、72°C 1 分を 13 サイクル行い、次に 94°C 30 秒、56°C 30 秒、72°C 1 分を 30 サイクル行い、最後に 72°C 10 分の伸長反応を行った。反応後、Stop/Loading Buffer を 8 μ l 加え、混合した。

2-E) オートシーケンサーによるバンドの検出

オートシーケンサー用のゲル板を作成した。ゲル板は 41cm のもの、スペーサーは 0.2mm のものを用いた。ガラス板は水洗後、蒸留水およびエタノールでよく拭いた。ゲル溶液は、尿素 12.6 g、10 \times TBE3.0ml、sequence solution 3.3ml、これに超純水を少し加えてよく攪拌し、尿素が完全に溶けた後 30ml まで超純水を加えた。この溶液を濾過し、10 分間脱気した。ここに 10%APS 200 μ l、TEMED(N,N,N',N'-テトラメチルジアミン) 20 μ l を加え、ガラス板にゆっくりと流し込み、上部にコームを差し込み、3 時間以上放置してから電気泳動に用いた。

表1 AFLP法に用いたアダプターおよびプライマーの塩基配列

	名称	塩基配列
Adapters	EcoR I adapter	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'
	Mse I adapter	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5'
	Taq I adapter	5'-GACGATGAGTCCTGAC-3' 3'-TACTCAGGACTGGC-5'
Primers	EcoR I primer	5'-GACTGCGTACCAATTCNNN-3'
	Mse I primer	5'-GATGAGTCCTGAGTAANNN-3'
	Taq I primer	5'-GATGAGTCCTGACCGANNN-3'

各プライマーの3'末端におけるNは選択的塩基を表し、A,C,G,Tのうち任意の塩基が入る

Buffer は 0.8×TBE を用い、LI-COR 社 DNA シーケンサー使用し、5 時間以上通電して、バンドを検出した。

2-F) 分析

2-F-1) Band sharing 値の算出

4 種類のプライマーによって検出された 95 本の多型バンドより、5 品種の、品種間及び品種内の Band sharing の値を求めた。Band sharing(BS) 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 に共通のバンド数、Na と Nb は個体 a と b におけるそれぞれのバンド数である。

2-F-2) Genetic distance 値の算出

各品種において 95 本の多型バンドそれぞれの遺伝子頻度を推定した。遺伝子頻度の値は基本的に Hardy-Weinberg の法則に従って算出した。つまり、AFLP のバンドは、2 対立遺伝子(バンドの有無)からなっているものと仮定する。さらに、バンドを示す対立遺伝子の頻度を p、バンドを示さない対立遺伝子頻度を q とする。品種内で得られたバンドの頻度は $p^2 + 2pq$ ($p^2 + 2pq + q^2 = 1$) を示しているものとし、ここから p および q の遺伝子頻度を求めた。次に PHYLIP ソフトウェアプログラムを用い、各対立遺伝子頻度から Gendist により各品種間の genetic distance の値を求めた。

2-F-3) 系統樹の作成

上で求めた genetic distance 値から、UPGMA 法 (Sokal ら、1958) による肉用牛 5 品種の系統樹を MEGA ソフトウェア (Kumar ら、1993) を用いて作成した。

第3節 結果

3-A) ウシにおける有効な AFLP プライマーの選択

初めに、実験に用いるプライマーの選択を行った。制限酵素の組み合わせは、Vos ら(1995)の最初の報告通り、4塩基認識の frequent cutter には *Mse* I を、6塩基認識の rare cutter には *EcoR* I を用いた。選択的塩基については、最も多くの多型を検出することのできる組み合わせを検出するために、7種類の *EcoR* I プライマー (*EcoR* I AAC / AAG / ACA / ACC / ACG / ACT / AGC) を、6品種各1個体を用い、出現する多型バンドの数を調べた。*Mse* I プライマーは全て *Mse* I CAC を用いて行った。各プライマーセットで3~10の多型バンドが検出され、*EcoR* I ACG が最も多くの多型を検出でき、バンドも鮮明であった。よって今回の実験では、このプライマーが有効であると判断し、実験に用いた。

最終的に、4種類の *Mse* I プライマー (*Mse* I CAC / CAG / CGA / CGT) と1種類の *EcoR* I プライマー (*EcoR* I ACG) を用いた。どのプライマーセットにおいても、おおよそ 50bp~500bp の範囲を分析に用いた。AFLP では断片にアダプターの配列が含まれる為、バンドが検出できるのは約 50bp からである。また、500bp 以上のバンドもいくつか検出されるが、バンドが不鮮明になり読み取りにくくなる為分析には用いなかった。

3-B) AFLP 法における品種内多型バンドの数

各品種内における多型バンドの数をプライマーセット毎に表した(表 2)。一つのプライマーあたり約 7.35 本の多型バンドが検出され、4種類のプライマーセットの合計では平均 36.75 本となった。4種類のプライマーセットについて比較してみると、多型バンドの数は、それほど差がないように思われた。これは今回実験に供した個体が 6 頭と少なく、さらにサンプル数を増やして行うことにより、有意な差が観察できると推測される。品種毎に見ると、黒毛和

表2 各品種内における多型バンドの数

Mse I プライマー	黒毛和種	褐毛和種	韓牛	リムジン	ヘレフォード
Mse I CAC	3	8	10	7	8
Mse I CAG	4	9	8	6	6
Mse I CGA	9	6	14	9	10
Mse I CGT	3	5	4	9	9
合計	19	28	36	31	33

EcoR I プライマーは全て EcoR I ACG を用いた

種が 19 本と最も少なく、その他 4 品種の間にはそれほど大きな差は見られなかった。

3-C) 品種間における遺伝的類似性

次に、品種間の分析において、各プライマーセットにより得られた多型バンドの数は *Mse* I CAC 21 本、*Mse* I CAG 26 本、*Mse* I CGA 25 本、*Mse* I CGT 23 本であり、4 種類のプライマーセット合計では 95 本の多型バンドが検出できた。この 95 本の多型バンドより、品種間および品種内の **Band sharing** 値を算出した (表 3)。各品種内の値に注目すると、前述した各品種内における多型バンドの本数を反映する結果となった。最も多型バンドの少なかった黒毛和種では 0.854 と高い値を示した。これは、Nomura ら (2001) が報告しているように、黒毛和種において集団の近交が高まっており、遺伝的な多様性が減少していることを示しているものと思われる。

3-D) 肉用牛 5 品種の系統樹

これら 5 品種の遺伝的類縁関係を調べるため、系統樹を作成した (図 2)。まず、各品種において 95 本の多型バンドそれぞれの遺伝子頻度を求めた。AFLP においては、バンドのホモ、ヘテロの区別は困難であるため、正確な遺伝子頻度は不明である。しかし、それぞれの遺伝子座における集団内の遺伝子頻度は Hardy-Weinberg の法則に従うものとする、遺伝子頻度の推定は可能となる。推定遺伝子頻度を用い、PHYLIP ソフトウェアプログラムを用い、Gendist により各品種間の **genetic distance** の値を求めた。これらの値は示していないが、先ほどの品種間 **Band sharing** 値における関係とほぼ一致した。この距離の推定値を元に、MEGA ソフトウェアを用いて UPGMA 法により肉用牛 5 品種の系統樹を作成した。

これまでの報告通り、日本のウシ 2 品種及び韓牛、すなわちアジア牛のクラスターと、ヨーロッパを起源とするリムジンとヘレフォードのクラスターに大

表3 肉用牛5品種における Band sharing 値

	黒毛和種	褐毛和種	韓牛	リムジン	ヘレフォード
黒毛和種	0.854				
褐毛和種	0.720	0.773			
韓牛	0.776	0.714	0.753		
リムジン	0.674	0.722	0.695	0.782	
ヘレフォード	0.728	0.705	0.659	0.738	0.778

対角、下対角は品種内および品種間の Band sharing 値をそれぞれ表す

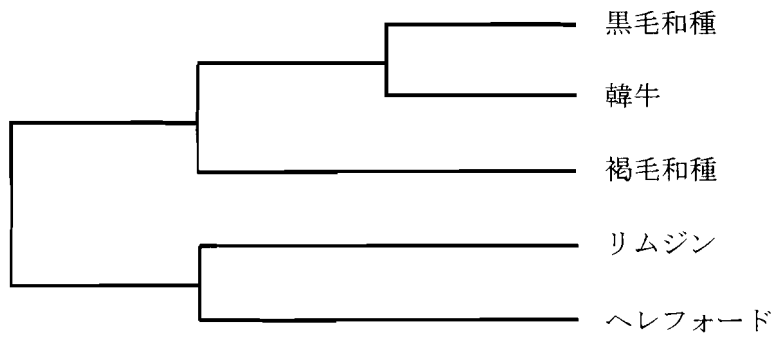


図2 UPGMA法による肉用牛5品種の系統樹

きく分類された。その中でも黒毛和種と韓牛は近い関係を示した。褐毛和種（土佐）は、基本的には黒毛和種と韓牛により造成されたと考えられているが、過去にシンメンタールを交配した経緯があるため、黒毛和種と韓牛のクラスターよりも外側に位置したものと思われる。

第4節 考察

肉用牛5品種に対して AFLP 法を適応し、遺伝学的解析を行うとともに、ウシにおける AFLP 法の有用性について検討した。

AFLP 法の原理について以下に記述した。まず2種類の制限酵素によりゲノム DNA を切断する。制限酵素は、4塩基認識の frequent cutter と6塩基認識の rare cutter が用いられる。2つの制限酵素を用いる利点は以下の通りである。(1) frequent cutter はゲル電気泳動により検出が可能な小さい DNA 断片を作り出す。(2) rare cutter を用いる事により増幅される断片の数を減らす事ができる。(3) PCR 産物の2本鎖のうち1本鎖のみをラベルすることが可能になる。(4) 選択的プライマーにより増幅される断片の数を調節する際に大きな融通性ができる。

制限酵素の種類に関しては、frequent cutter には *Mse I* が有効である事が Vos ら (1995) により示されている。その理由は、多くの真核生物の DNA では、A と T が多く含まれているため、TTAA の配列を認識する *Mse I* は、より多くの断片を作り出す事ができるからである。しかしながら、家畜における最近の報告では、*Taq I* を用いたものもあり、本実験においても更なる検討が必要である。rare cutter においては、どの制限酵素においても大きな差異は見られず、その信頼性とコストの面からも *EcoR I* を用いられるのが一般的である。次に制限酵素で切断した断片に、各々の制限酵素に特異的なアダプターが付加される。このアダプターの配列は、増幅の際にプライマーの結合部位となる。また、このアダプターの配列には、制限酵素の認識部位が含まれておらず、アダプターを付加した断片は制限酵素で切断されない。

ゲノム DNA を2種類の制限酵素 *EcoR I* と *Mse I* で切ると、3種類の断片ができる。すなわち *EcoR I-EcoR I*、*EcoR I-Mse I*、*Mse I-Mse I* である。それぞれの断片の数は *EcoR I* が6塩基認識、*Mse I* が4塩基認識であることから、*Mse I-Mse I* が最も多く、*EcoR I-Mse I*、*EcoR I-EcoR I* の順となる。このう

ち AFLP 法において検出されるのは *EcoR I-Mse I* の断片が大部分であると考えられている。その原理としては、増幅を行う際に、*EcoR I* プライマーを蛍光色素や放射性同位元素で標識したものをを用いるため、*Mse I-Mse I* の断片は検出されないこと、*EcoR I-EcoR I* と *Mse I-Mse I* 断片は、その両端の切断部位が同じであり、反転した構造になっているため stem-loop 構造が形成され、プライマーのアニーリングを阻害する、さらに、*Mse I* プライマーは *EcoR I* プライマーよりアニーリング温度が低く設定されており、タッチダウン PCR により *EcoR I* 断片をより効果的に増幅できるといったことが主なものである。

複雑なゲノムに対する AFLP 法においては、通常 2 段階の増幅が行われる。最初の増幅は pre amplification と呼ばれるもので、3'末端に一つの塩基を付加したプライマーを用いて行われる。次に増幅産物を希釈し、2 段階目の増幅に用いる。PCR に用いるテンプレートの濃度は、DNA フィンガープリント法などでは非常に敏感であるのに対して、AFLP 法では 1000 倍の濃度差においても非常に類似した図が得られることが Vos ら (1995) により報告されている。また、プライマーの配列においては、PCR のためのプライマーにおける一般的原理が Dieffenbach ら (1993) により報告されており、AFLP プライマーにおいても確実に増幅を行うことができるように設計されている。AFLP プライマーにおける重要な特徴は、すべてのプライマーにおいて 5'塩基は G 塩基 から始まっていることである。この G 塩基が double bands を防ぐのに最も有効である。double bands は増幅の際に、余分な塩基が 3'末端に付加することにより起こる現象であり、dNTP の濃度が影響すると言われているが、合成された DNA の 3' 末端が C 塩基のときが最も起こりにくいことが Vos ら(1995) により報告されている。

2 段階目の増幅では 2 つ、あるいは 3 つの塩基を付加したプライマーを用いて行われる。1 段階目に直接、3 つの塩基を付加したプライマーを用いて増幅を行うと、塩基不適合である断片を増幅してしまい back ground の smear を起こしたり、また 2 段階増幅では検出されるバンドが欠けていたりすることがあり、確実に選択的増幅を行う為に 2 段階増幅が必要である。

本研究では、本法を肉用牛 5 品種に対して適用し、その有効性を検討した。4 種類のプライマーセットを用いて AFLP 法を行った結果、95 本の多型バンドを得ることが出来、ウシにおいても簡便に多数の DNA 多型バンドを検出できることが示された。また、こうして得られた多型情報より 5 品種の遺伝的類縁関係を推定したところ、品種成立の遺伝的な背景と一致することが認められた。しかしながら、こういった系統樹の信頼度を上げるには、対象とするサンプル数を増やすことが重要である。また、同様の理由から、プライマーセットの数を増やし、分析に用いる多型の数を増やすことも必要である。これまで述べてきたように、AFLP 法では、プライマーの選択的塩基の部分のみを変えることで、無数の異なった DNA 断片を検出することができる。本研究においても、分析に用いる多型バンドの数を増やすことにより、遺伝的類縁関係の推定に関して、より信頼度の高い考察を行うことができると考えられる。

AFLP 法の有効性と利用法については、第 1 章でも述べたように、AFLP 法が動物に適用されたのは、ここ 2、3 年のことである。しかしながら、これまでの多型分析法に代わる新しい方法として有効なことが認められてきており、様々な形での利用法が考えられる。まず、第 1 に遺伝子地図の作成におけるマーカーとしての利用である。ウシの遺伝子地図の作成において、マイクロサテライト・マーカーの数もいまだ十分とは言えず、遺伝子地図が完成している状況にはない。そこで、AFLP により検出できる多型をマーカーとして利用する事が可能であり、動物ではこれまでニワトリやマウスなどでの報告がある。また、ラット家系を用いて、QTL 解析が行われたという例もある (Osten ら、1996)。我国においては、現在ウシのリファレンスファミリーを構築している状況にあり、ウシ家系が構築されれば、連鎖解析に利用でき、家畜に重要な経済形質の分析も行う事ができるであろう。

以上の結果より、AFLP 法は、家畜においても品種間の遺伝的類縁関係や集団内の遺伝的構成を知るのに簡便で有効な手段であり、また連鎖解析や QTL 解析にも有用な手段を提供することが期待される。

第3章 DNA マーカーを用いた国産牛肉の品種鑑定

第1節 緒言

現在、我国で飼育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、アングス種など外国種である。和牛は明治から昭和初期にかけて、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を交配し、日本の気候、風土に合うように改良が試みられて来た。その後、耕運機の導入など農作業の機械化で役牛としての役割は消失し、肉専用種として改良が加えられ、今日に至っている。和牛4品種の中でも特に黒毛和種の供用頭数は多く、その繁殖雌牛は我国の肉用種繁殖雌牛総頭数において約90%を占めている。この黒毛和種の優れた肉質は市場における評価も高く、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、我国で飼育されている乳用牛は、そのほぼ全てがホルスタイン種で、この他に若干のジャージー種が存在するのみである。ホルスタイン種は世界を代表する乳牛であり、泌乳能力に優れている。この品種は明治時代、国民の体格改善を目指して乳製品の摂取が推奨されたのを機に、その種雄牛が外国から輸入され、在来の雌牛に累進交配されて、乳用牛の増頭が図られ今日に至っている（加茂、1976）。

今日まで、ホルスタイン種の雄子牛は肥育用素牛として出荷されていた。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きた。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大量に出回るようになった。このため、ホルスタイン種の枝肉の需要が激減し、価格の値崩れを起こした。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に

黒毛和種雄牛を交配して作った雑種第一代 (F1) からの牛肉生産が盛んになり、現在では国産牛の 1/3 を占めるに至っている。

ここ数年来食肉に関わる社会的問題が生じるようになってきた。一つは牛肉の安全性の問題である。牛海綿状脳症 (BSE; Bovine Spongiform Encephalopathy) 感染牛が我国でも確認した。現在のところ、BSE 感染牛は乳用牛として飼育されているホルスタイン種のみで、それらは焼却処分されているが、この BSE 感染牛の発生は牛肉の安全性に対する消費者の不安を招き、牛肉の需要が激減した。他の一つは外国産輸入牛肉を国産牛肉と偽称した事例に代表されるような、牛肉などの食品を不当表示して販売するという問題である。偽装販売は輸入牛肉だけでなく、国産牛肉においても存在している形跡がある。すなわち、上述の F1 牛肉が時として黒毛和種高級牛肉に偽称販売される問題である。というのも、F1 は毛色を見た限りでは黒毛和種と見分けが付きにくく、肉質においては黒毛和種に近く、F1 の中でも特に肉質の良いものは黒毛和種とほとんど差がないためである。これらの偽称を防止するため、農林水産省は素牛の誕生から市場までの流れをトレースできるシステム (トレーサビリティ) の構築に努めている。これを構築することにより、食肉の偽装販売を防ぎ、また食肉の品質や安全性を保証する上でも重要な要素になることが期待されている。このトレーサビリティを補完する意味で、黒毛和種と F1 とを正しく鑑別する技術、ひいてはウシ品種を正しく鑑別する技術の確立が望まれるようになってきた。

近年、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可能となった。家畜では『DNA 多型に基づく家畜選抜』を行うことを目的として、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、1994)。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ている。DNA マーカーには主にミトコンドリア DNA (mtDNA) とゲノム DNA を対象としたマーカーが存在する。mtDNA マーカーは mtDNA の D-loop 領域の変異を利用したものである。mtDNA は細胞質遺伝によって雌親を通じて

のみ子孫に受け継がれるため、純粋に母系統を比較することができる。しかしながら、我国では在来牛にホルスタイン種雄牛を累進交配させてきたため、黒毛和種と我国のホルスタイン種とは mtDNA のハプロタイプ構成が類似している (Tsuji ら、2004)。このため mtDNA は黒毛和種、F1、ホルスタイン種に関する品種鑑別のマーカーとしては利用できない。他方、ゲノム DNA を対象とした DNA マーカーには、マイクロサテライトマーカー、RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) マーカー、RFLP マーカーなどがある。しかしながら、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 の塩基配列情報が必要であったりするなどの欠点を持つ。それに対して、AFLP 法は、2 種類の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い、比較的簡単に多数のゲノム情報を得ることの出来る多型解析法として注目されている。そのため近年においては、遺伝的類縁関係 (Moreno ら、2002)、QTL (quantitative trait loci) 解析 (Otsen ら、1996)、連鎖地図作成 (Barendse ら、1994 ; Lee ら、2002)、cDNA を利用した発現遺伝子の解析 (Bracaccia ら、2001) などの幅広い研究に応用されている。ただし AFLP 法は一度にゲノム全体の多型をスクリーニングするため、遺伝子座毎の遺伝子型の判定が不可能である。それを可能にするには AFLP 多型の SNPs (single nucleotide polymorphisms) 化が必要である。SNPs は塩基配列の点突然変異のことであり、ゲノム上に 300 万個以上存在すると推測されている。SNPs マーカーは、ゲノム上の点突然変異を対象とするため、PCR-RFLP 法やハイブリダイズ法などにより遺伝子型の判定が可能である。それをもとに遺伝子頻度を推測し、品種間の遺伝的構造の差異が予測できるようになる。さらに、ここで得られた SNPs マーカーを DNA チップとして用いれば、電気泳動を介さずに迅速な遺伝子型の判定が可能になる。

本研究では、まず AFLP 法を用いて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し、次いでそれを SNPs マーカーに転化した。こうして得られたどちらかの品種特異的 SNPs マーカーを組み合わせることにより F1 個体の識別を試みた。

第2節 材料及び方法

2-A) 供試動物

肉牛である黒毛和種 299 頭と乳牛であるホルスタイン種 100 頭、及びその雑種第一代 (F 1) 96 頭を実験に供した。

黒毛和種は 1992 年、2002 年に開催された第 6 回、第 8 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選んだ肝臓サンプル 259 頭、動物遺伝研究所より譲り受けた黒毛和種 DNA サンプル 40 頭分を用いた。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 7 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、動物遺伝研究所より譲り受けたホルスタイン種 DNA サンプル 49 頭分計 100 頭分を用いた。F 1 は神戸大学附属農場より譲り受けた血液サンプル 20 頭分、北海道の早川牧場より譲り受けた血液サンプル 25 頭分、群馬県の茂木牧場より譲り受けた血液サンプル 25 頭分、長野県より譲り受けた血液サンプル 20 頭分、兵庫県の村田牧場より譲り受けた血液サンプル 6 頭分合計 96 頭分である。これらの組織よりゲノム DNA を抽出した。

RNA 抽出に用いた筋肉組織は、岐阜市食肉衛生検査所より入手した。供試牛は、平均屠殺月齢が約 30 ヶ月の黒毛和種去勢肥育牛 10 個体、平均屠殺月齢が約 19 ヶ月のホルスタイン種去勢肥育牛 10 個体である。屠殺直後に頸部筋肉組織を得た。採取後直ちに液体窒素により瞬時に凍結して、 -80°C で保存した。これらの組織より total RNA (ribosomal RNA, transfer RNA, messenger RNA を含む) を抽出した。

2-B) ゲノム DNA の精製

ウシゲノム DNA は肝臓組織、リンパ節、血液より抽出し、精製した。方法は第 2 章の 2-B) に従った。

2-C) DNA の定量

DNA の定量は 260nm の吸光度の測定で行った。方法は第 2 章の 2-C) に従った。

2-D) RNA の精製

RNA の抽出方法は Chomczynski と Sacchi (1987) の方法に従い、Sepazol RNA I (Nakalai tesque) により行った。

ファルコンチューブ 2059 (BD バイオサイエンス・クロンテック) に 10ml の Sepazol RNA I を測り取り、そこへ液体窒素中で細かく砕いた 0.5g から最高で 1.0g の頸部筋肉組織を加えて十分に転倒混和した。ポリトロン型ホモジェナイザー (IKA) で、十分な長さの RNA が得られるように 10,000rpm、25 秒以内の破碎を行った。核タンパク質複合体を完全に分離するために、室温で 5 分間放置した後、3000g で 5 分間遠心分離した。遠心分離後、沈殿を除き、液層を新しい遠心管に移した。そこへ、2ml のクロロフォルムを加え、キャップをして 15 秒間激しく攪拌した後、3 分間室温で放置した。次に、12000g、4°C で 15 分間遠心分離を行った。水層を新しい遠心管に移し、5ml のイソプロピルアルコール (nakalai tesque) を加えて十分に攪拌した。このチューブを室温で 10 分間放置した後、12000g、4°C で 15 分間遠心分離した。遠心分離後、イソプロピルアルコールを除き、10ml の 75%エタノールを加え、ボルテックスミキサー (IKA) で沈殿物を懸濁して、7500g、4°C で 5 分間遠心分離した。遠心分離後、75%エタノールを除き、沈殿物である総 RNA のペレットを 5 分間乾燥させた。沈殿物の大きさに応じて 100 μ l から最大で 500 μ l の DEPC 処理水に溶解した。この RNA 溶液の一部を取って分光光度計 UV-150-02 (Shimadzu) を用いて、濃度測定を行った。260nm の波長 (OD260) と 280nm の波長 (OD280) での吸光度を測定し、RNA の場合、OD260 が、1.00 のとき 40.0mg/ml として濃度の計算を行った。また、OD280 に対する OD260 の比 (OD260/OD280) が 1.7 以上であること、さらに、1.0%アガロ

ースゲル電気泳動によって 28SrRNA、18SrRNA、5SrRNA が確認できたものを cDNA 合成に用いた。

また、total RNA を長期間保存する場合、1.5ml エッペンドルフ型チューブ (BioBic ; 以下 1.5ml チューブ) に RNA 溶液の 10 分の 1 量の 3M、pH 5.2、酢酸ナトリウムと -20°C の冷凍庫内で冷却した RNA 溶液の 2 倍量の 100%エタノールを加えて転倒混和した後、 10000g 、15 分間遠心分離した。遠心分離後、RNA が沈殿した状態で、 -80°C の冷凍庫内で保存した。

2-E) AFLP 法

AFLP 法における操作は、基本的に、Vos ら (1995) の方法に従って行った。

2-E-1) 制限酵素による DNA の切断

500ng のゲノム DNA を *Taq* I 及び *EcoR* I の組み合わせで切断した。

超純水 $1.0\ \mu\text{l}$ 、 $10\times$ 制限酵素 buffer $2.5\ \mu\text{l}$ 、 $10\times$ BSA $1.0\ \mu\text{l}$ 、*Taq* I ($10\text{unit}/\mu\text{l}$) $0.5\ \mu\text{l}$ 、DNA 溶液 $20\ \mu\text{l}$ をよく混和し、 65°C で 1 時間インキュベートした。その後、超純水 $12.5\ \mu\text{l}$ 、 $10\times$ 制限酵素 buffer $1.5\ \mu\text{l}$ 、*EcoR* I ($10\text{unit}/\mu\text{l}$) $1.0\ \mu\text{l}$ を加えてよく混和し、 37°C で 1 時間インキュベートした。

2-E-2) アダプターの付加

制限酵素で処理した断片に *Taq* I アダプターと *EcoR* I アダプターを付加した。アダプター配列については、第 2 章の表 1 に示した。各アダプターは一本鎖の DNA をアニーリングさせて、二本鎖にすることにより作成した。一本鎖の溶液 $100\ \text{p mol}/\mu\text{l}$ 当量ずつをよく混和し、 65°C のウォーターバスの水槽につけた後、電源を切り、一晩放置して二本鎖にした。

DNA 溶液 $40\ \mu\text{l}$ に、 $10\times$ ligase buffer $1.0\ \mu\text{l}$ 、 1mM ATP $1.0\ \mu\text{l}$ 、*Taq* I アダプター 50pmol 、*EcoR* I アダプター 5.0pmol 、T4 DNA ligase ($7.5\text{unit}/\mu\text{l}$) $0.2\ \mu\text{l}$ を含む $10\ \mu\text{l}$ の溶液を加えて全量を $50\ \mu\text{l}$ とし、 37°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

表 1-1 AFLP 法に用いたプライマーセットの組み合わせ

塗りつぶした箇所は用いた選択的塩基の組み合わせを示す

	EcoRI				EcoRI				EcoRI				EcoRI																						
	A				A				A				A				C				C				C				C						
	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G
Taq I AAA																																			
Taq I AAC																																			
Taq I AAG																																			
Taq I AAT																																			
Taq I ACA																																			
Taq I ACC																																			
Taq I ACG																																			
Taq I ACT																																			
Taq I AGA																																			
Taq I AGC																																			
Taq I AGG																																			
Taq I AGT																																			
Taq I ATA																																			
Taq I ATC																																			
Taq I ATG																																			
Taq I ATT																																			

	EcoRI				EcoRI				EcoRI				EcoRI																						
	A				A				A				A				C				C				C				C						
	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G
Taq I CAA																																			
Taq I CAC																																			
Taq I CAG																																			
Taq I CAT																																			
Taq I CCA																																			
Taq I CCC																																			
Taq I CCG																																			
Taq I CCT																																			
Taq I CGA																																			
Taq I CGC																																			
Taq I CGG																																			
Taq I CGT																																			
Taq I CTA																																			
Taq I CTC																																			
Taq I CTG																																			
Taq I CTT																																			

表 1-2 AFLP 法に用いたプライマーセットの組み合わせ

塗りつぶした箇所は用いた選択的塩基の組み合わせを示す

	EcoR I				EcoR I				EcoR I				EcoR I				EcoR I				EcoR I				EcoR I											
	A				A				A				A				C				C				C				C							
	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T
Taq I GAA																																				
Taq I GAC																																				
Taq I GAG																																				
Taq I GAT																																				
Taq I GCA																																				
Taq I GCC																																				
Taq I GCG																																				
Taq I GCT																																				
Taq I GGA																																				
Taq I GGC																																				
Taq I GGG																																				
Taq I GGT																																				
Taq I GTA																																				
Taq I GTC																																				
Taq I GTG																																				
Taq I GTT																																				

	EcoR I				EcoR I				EcoR I				EcoR I				EcoR I				EcoR I															
	A				A				A				A				C				C				C				C							
	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T
Taq I TAA																																				
Taq I TAC																																				
Taq I TAG																																				
Taq I TAT																																				
Taq I TCA																																				
Taq I TCC																																				
Taq I TCG																																				
Taq I TCT																																				
Taq I TGA																																				
Taq I TGC																																				
Taq I TGG																																				
Taq I TGT																																				
Taq I TTA																																				
Taq I TTC																																				
Taq I TTG																																				
Taq I TTT																																				

し、これを PCR のためのテンプレートとした。また、得られた産物は -20°C で保存した。

2-E-3) 1st PCR (Pre-amplification PCR)

アダプターを付加した鋳型 DNA $5.0\ \mu\text{l}$ に、 $10\times$ PCR buffer $5.0\ \mu\text{l}$ 、dNTP Mixture (2.5mM each) $4.0\ \mu\text{l}$ 、TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version (5unit/ μl) $0.2\ \mu\text{l}$ 、1つの塩基を付加させたアダプターに特異的に結合する *Taq* I プライマーと *EcoR* I プライマーをそれぞれ 75ng ずつ加えて全量を $50\ \mu\text{l}$ として反応を行った。反応はサーマルサイクラーを用いた。条件は以下のように設定した。すなわち、 94°C 30 秒、 56°C 1 分、 72°C 1 分を 1 サイクルとして 20 サイクル繰り返した後、 72°C 10 分の伸長反応を行った。また、PCR 後の産物は超純水で 10 倍希釈し、 -20°C で保存した。用いたプライマーの組み合わせは表 1 に示した。

2-E-4) 2nd PCR (Selective-amplification PCR)

Pre-amplification PCR で得られた産物に、3つの塩基を付加させた *Taq* I プライマーと *EcoR* I プライマーを加えて増幅した。PCR 産物 $5.0\ \mu\text{l}$ 、 $10\times$ PCR buffer $2.0\ \mu\text{l}$ 、dNTP Mixture $1.6\ \mu\text{l}$ 、TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version $0.08\ \mu\text{l}$ 、3つの塩基を付加させた *Taq* I プライマー 30ng と *EcoR* I プライマー 5ng をそれぞれ加え、超純水で全量を $20\ \mu\text{l}$ として反応を行った。加えるプライマーは付加されたアダプターの種類に従った。反応はサーマルサイクラーを用いた。条件は以下のように設定した。すなわち、 94°C 30 秒、 65°C 30 秒、 72°C 1 分を 1 サイクルとして 13 サイクル繰り返した。さらに 94°C 30 秒、 65°C 30 秒、 72°C 1 分のサイクルを 23 サイクル繰り返した。その際に、1 サイクルごとに 0.7°C ずつ温度を下げるタッチダウンを行った。そして、反応後は、Stop/Loading buffer (100ml 中に 95% Formamid 95ml, 1 M EDTA 2ml, 超純水 3ml, Xylen Cyanol FF 0.1g, Bromophenol Blue 0.1g) を $8\ \mu\text{l}$ 加え、混合した。

2-F) cDNA-AFLP 法

cDNA-AFLP 法における操作は、基本的に、Bachem ら (1996) の方法に従って行った。方法の詳細については、以下に示す。

2-F-1) mRNA の単離

抽出した total RNA から PolyATtract mRNA Isolation kit (Promega, Madison, WI) を用いて mRNA を単離した。

まず、Steptavidin-Paramagnetic Particles (SA-PMPs) の準備を行う。SA-PMPs 溶液をよく攪拌してから、Magnetic Stand に置き、SA-PMPs をチューブの側壁に集める。注意深く上清を取り除き 300 μ l の 0.5 \times SSC を加えて WASH する。同様に 300 μ l の 0.5 \times SSC で 3 回 WASH を行い、最後に 100 μ l の 0.5 \times SSC を加えておく。

200 μ g の total RNA を 1.5ml エッペンドルフ型チューブ (BioBic ; 以下 1.5ml チューブ) に取り、RNase/DNase free water を加えて 500 μ l にメスアップした。Heating block で、65 $^{\circ}$ C、10 分間インキュベートした後、1.5 μ l の Biotinylated-Oligo(dT) Probe と 13.0 μ l の 20 \times SSC を加えて、室温で 10 分間放置する。次に、用意した SA-PMPs 溶液の入ったチューブに混ぜ合わせ、室温で 10 分間放置する。上記と同様に 300 μ l の 0.1 \times SSC で 3 回 WASH を行い、SuperScript III Rnase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen) の 5 \times 1st strand buffer を RNase/DNase free water で 5 倍希釈し、50 μ l で SSC と同様に WASH を行った。

2-F-2) cDNA 合成

SA-PMPs チューブに、RNase/DNase free water 12.0 μ l、5 \times 1st strand buffer 4.0 μ l、0.1M DTT 1.0 μ l、10mM dNTP mixture 1.0 μ l、RNaseOUT inhibitor 1.0 μ l、SuperScript III Reverse Transcriptase 1.0 μ l を加えて全量を 20.0 μ l にし、サーマルサイクラー (TR-100、TAITEC) で、50 $^{\circ}$ C、60 分間インキュベートした。

次に、氷上で全量 20.0 μ l を 0.5ml チューブに取り、10 \times *E.coli* DNA Polymerase I buffer 16.0 μ l、10mM dNTP mixture 3.0 μ l、Ribonuclease H

(TaKaRa) 1unit、*E.coli* DNA Polymerase I (TaKaRa) 10unit、*E.coli* DNA Ligase (TaKaRa) 2.5unit を加えて、RNase/DNase free water で全量を 160.0 μ l にメスアップし、サーマルサイクラー (PJ2000、TaKaRa) で、16°C、2 時間インキュベートした。

2-F-3) 制限酵素による DNA の切断

合成された cDNA を制限酵素 *Taq* I 及び *EcoR* I の組み合わせで切断した。

cDNA を含む SA-PMPs 溶液をよく攪拌してから、Magnetic Stand に置き、SA-PMPs をチューブの側壁に集める。注意深く上清を取り除き 300 μ l の 2× TANGO buffer を加えて一度 WASH し、40 μ l の 2× TANGO buffer を加えてよく攪拌する。*Taq* I (10unit/ μ l) を 2.0 μ l 加えて、65°C のウォーターバスで 2 時間インキュベートする。ウォーターバスから取り出し、氷上に置き、温度が下がったら、*EcoR* I (10unit/ μ l) を 1.0 μ l 加えて、37°C のウォーターバスで 2 時間インキュベートする。

2-F-4) アダプターの付加

SA-PMPs 溶液をよく攪拌してから、Magnetic Stand に置き、SA-PMPs をチューブの側壁に集める。制限酵素処理により、cDNA 断片は SA-PMPs から分離しているので、注意深く上清を取り、0.5ml チューブに移す。次に、制限酵素で処理した断片に *Taq* I アダプターと *EcoR* I アダプターを付加した。DNA 溶液 40 μ l に、10×ligase buffer 5.0 μ l、*Taq* I アダプター 50pmol、*EcoR* I アダプター 5.0pmol、T4 DNA ligase 5.0unit を含む 10 μ l の溶液を加えて全量を 50 μ l とし、37°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 のためのテンプレートとした。得られた産物は -20°C で保存した。

2-F-5) 1st PCR (Pre-amplification PCR)

1st PCR は選択的塩基を付加しない *EcoR* I および *Taq* I のプライマーを用いて行った。詳細は本章の 2-D-3) に示した通りである。

2-F-6) 2nd PCR (Selective-amplification PCR)

2nd PCRは2つの選択的塩基を付加した *EcoR* I 及び *Taq* I のプライマーを用いて行った。詳細は本章の 2-D-4) に示した通りである。

2-G) バンドの検出

AFLP 法および cDNA-AFLP 法で増幅されたバンドの検出には銀染色法を用いた。銀染色法には SILVER SEQUENCE™ DNA Staining Reagents (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×TBE (1L 中に Tris 108g, Boric Acid 55g, Na₃EDTA·2H₂O 9.3g) 8.4ml、Long Ranger® Gel Solution 8.4ml、これに超純水を加えてよく攪拌し、尿素が完全に溶けた後、超純水を加えて全量を 70ml にした。この溶液を 0.45 μm のフィルターで濾過し、10 分間脱気した。これに 10%APS 350 μl、TEMED 35 μl を加え、ゲル板にゆっくり流し込み、上部にコームを差し込み 2 時間以上放置した。電気泳動は、スラブ型電気泳動装置を用いた。buffer には 0.6×TBE を使用し、1,800V で 2 時間半行った。

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 2L (停止液)、2g AgNO₃・37% Formaldehyde 2L (染色液)、6g NaCO₃ 2L (現像液)を用いた。また現像液は氷上に保存し、使用する直前に 37% Formaldehyde 3ml と Sodium Thiosulfate 400 μl を加えた。

ゲル板をトレイに入れ、停止液 1L を加え、20 分間振とうした。その後、超純水で 3 回洗浄し、染色液にゲル板を浸し、30 分間振とうした。染色が終わったゲル板は、銀が落ちすぎない程度に超純水に軽く浸し、すばやく現像液に浸し、バンドが現れるまで振とうした。その後、適度なところで停止液を加えて反応を止めた後、超純水で再び洗浄し、DNA バンドを観察した。

2-H) AFLP 多型断片の塩基配列決定

AFLP 法により黒毛和種とホルスタイン種の間で検出された、頻度に偏りのある AFLP 多型断片について以下の方法により変異個所を特定した。

2-H-1) AFLP 多型断片の抽出

銀染色法により検出された AFLP 多型断片を超純水でよく拭いたメスを用いてポリアクリルアミドゲルから切り出した。その後、TE buffer 20.0 μ l に浸し、ゲル切片から AFLP 多型断片を浸出させた。その DNA 溶液をテンプレートとして Selective-amplification PCR を行い、40%グリセロール液 (40% グリセロール, 0.25% Bromophenol Blue, 0.25% Xylene Cyanol FF) を加えて 1.5% アガロースゲル (アガロース S 60mg, 1 \times TBE buffer 40ml, エチジウムブロマイド溶液 (10mg/ml in water) 2.0 μ l) で 20 分間電気泳動した。その後 UV 照射下でゲルを切り出し、1.5ml チューブに移し、ゲル回収を行った。アガロースゲルの回収は Ultra Clean™ 15 DNA Purification Kit (MO BIO) を用いた。全ての手順はプロトコールに従った。抽出した DNA は超純水 14 μ l に溶かした。

2-H-2) AFLP 多型断片のサブクローニング

サブクローニングには pGEM-T Easy Vector System II (Promega) を用いた。全ての手順はプロトコールに従った。

まず AFLP 断片を pGEM®-T Easy Vector にライゲーションした。2 \times Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase 2.5 μ l、pGEM®-T Easy Vector (50ng/ μ l) 0.5 μ l、T4 DNA Ligase (3 Weiss units/ μ l) 0.5 μ l、DNA 溶液 1.5 μ l を混和して室温で一時間静置した。

コンピテントセル (JM109) を氷上で溶かし、エッペンに 50 μ l ずつ分注し、DNA 溶液を 2 μ l 加えて氷上で 20 分間静置した。その後 42°C 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 μ l 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 μ l、2M 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 μ l、2M MgSO₄ 10 μ l を加え 37°C で 2 時間振盪培養した。50 μ g/ml アンピシリン (AP) を含む Luria-Bertani's broth (LB-アンピシリン: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 μ l、IPTG (100mM) 100 μ 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。

銀染色で検出された 1 本の AFLP バンドの中に複数の AFLP 断片が含まれている可能性があるため (Meksen ら、2001)、プレートに生育したコロニーから白色のものをランダムに 5 つ選択した。

2-H-3) サブクローニングの確認

選択したコロニーに対して菌体 PCR を行い、コロニーが求めている AFLP 多型断片を含んでいることを確認した。まず選択したコロニーを滅菌した爪楊枝を用いて拾い上げ、保存用のプレートに少し殖菌した後、Proteinase K 溶液 1 μ l と菌体 PCR 溶液 (50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH8.3, 2.5mM MgCl₂, 0.1mg/ml ゼラチン, 0.45% NP40, 0.45% Tween20) を混和した 0.5ml チューブに懸濁した。これを 50°Cで 1 時間インキュベートした。再びよく懸濁した後、約 100°Cで 10 分間ボイルし、直ちに 10 分間氷水につけて急冷した。これをテンプレートとして PCR を行った。ここではテンプレートの濃度が高いことを考慮し、テンプレート 1.0 μ l、超純水 13.2 μ l、10×PCR buffer 2.0 μ l、dNTP Mixture 1.6 μ l、Selective-amplification プライマー 1.0 μ l、Ex Taq™ Hot Start Version 0.2 μ l を加え、全量を 20 μ l とした。反応条件は、Selective-amplification PCR と同様に行った。その後、AFLP サンプルと並べて電気泳動し、目的のサイズと同等の位置を示すクローンを目的のものとした。

2-H-4) プラスミド精製

保存用のプレートに生育したコロニーを加熱滅菌した白金耳で拾い、それぞれを 50 μ g/ml アンピシリンを含む LB 液体培地 3ml に移し、37°Cで一晩前培養した。プラスミドはアルカリ SDS 法により回収した。まず、6,000rpm で 5 分間遠心し、グルコース液 (グルコース 50mM, EDTA 10mM, 25mM Tris-HCl pH8.0) 100 μ l を加えよく混和して 5 分間静置した。そして、アルカリ SDS 液 (0.2N NaOH, 1%SDS) 200 μ l を加え穏やかに混和した後、氷上で 5 分間静置した。その後氷冷した酢酸カリウム溶液 (5M 酢酸カリウム 60ml, 氷酢酸 11.5ml, 超純水 28.5ml) 150 μ l を加えよく懸濁し、5 分間静置した後、

15,000rpm で 5 分間遠心分離し上清を移して、フェノール抽出法で抽出した。まず、フェノール・クロロフォルム・イソアミルアルコール 400 μ l を加えてよく混和した後、15,000rpm で 3 分間遠心した。次に水層を分取しジエチルエーテル 400 μ l 加えてよく混和し 15,000rpm で数秒間遠心した。その後、エーテルを完全に除去し、100%エタノールを当量加えてゆっくりと揺らし室温で 5 分間静置した。15,000rpm で 5 分間遠心分離し、70%エタノールを 400 μ l 加えてゆっくり洗浄した。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。超純水 100 μ l に溶解し、Proteinase K 溶液 1 μ l、RNase A 溶液 (10mg/ml in water) 1 μ l を加え、37°C 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・イソアミルアルコールを加えて懸濁し、15,000rpm 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てよく混和し 15,000rpm で数秒間遠心した。その後、エーテルを完全に除去し、10 分の 1 量の 3M 酢酸ナトリウム溶液と 2.5 倍量の 100%エタノールを加えてゆっくりと揺らし-80°C で 15 分間静置して DNA を析出させた。15,000rpm で 10 分間遠心分離して上清を除去し、70%エタノール 200 μ l を加えてゆっくり洗浄した。完全にエタノールを除去した後、DNA を超純水 50 μ l に溶かした。

2-H-5) シーケンス反応

シーケンス反応には Sequi Therm EXCEL™ II DNA sequencing Kits-LC (EPICENTRE Technologies) を用いた。プライマーには、IRD800 で標識された M13 Forward、M13 Reverse の 2 種類のプライマーを用いた。反応は、シーケンスキットのプロトコールに従った。反応はサーマルサイクラーを用いた。条件は以下のように設定した。すなわち、95°C 5 分後、95°C 30 秒、50°C 15 秒、70°C 1 分を 1 サイクルとして 30 サイクル繰り返した後、70°C 7 分の伸長反応を行った。

2-H-6) オートシーケンサーによる検出

まず、オートシーケンサー用のゲルを作成した。ゲル板は、41 cm のものを用いた。ゲル溶液は、尿素 12.6g、10×TBE 3.0ml、Long Ranger® Gel Solution

3.3ml、これに超純水を加えてよく攪拌し、尿素が完全に溶けた後、超純水を加えて全量を 30ml にした。この溶液を 0.45 μ m のフィルターで濾過し、10 分間脱気した。これに、10%APS 200 μ l、TEMED 20 μ l を加え、ガラス板にゆっくりと流し込み、上部にシャークコームを差し、3 時間以上放置してから電気泳動に用いた。泳動用の buffer は 0.8 \times TBE を使用し、LI-COR 社 DNA シーケンサーを使用し、2,000V で 5 時間以上通電して、バンドを検出した。

2-I) フランキングサイトの塩基配列決定

多型部位は、*EcoR* I、*Taq* I の制限酵素認識部位である可能性がある。その部分を用いて PCR-RFLP ができるようにするために、AFLP 多型断片の両側を含むフランキングサイトの塩基配列を決定した。フランキングサイトをスクリーニングするために、Devic ら (1997) が報告した PCR Walking 法を利用した。

2-I-1) PCR Walking 法による塩基配列の決定

PCR Walking 法は、Universal GenomeWalker™ Kit (BD Biosciences) を利用した。方法については、プロトコールに従った。

本研究では、ライブラリーの作成には、第 6 回全国和牛能力共進会に出品された黒毛和種 1 個体の DNA を利用した。

まず、1.5ml エッペンドルフチューブ 4 本にそれぞれ、ゲノム DNA (0.1 μ g/ μ l) 25 μ l を分注した。次に、各チューブに対して、制限酵素 *Dra* I (10units/ μ l)、*EcoR* V (10units/ μ l)、*Pvu* II (10units/ μ l)、*Stu* I (10units/ μ l) 8 μ l、それに対する制限酵素 buffer 10 μ l、超純水 57 μ l を加え穏やかに混和し 37°C で 20 時間インキュベートした。次に、各チューブにフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール 95 μ l を加え、数秒間ボルテックスで攪拌した。15,000rpm で 5 分間遠心した後、上清を別のエッペンに分取し、当量のジエチルエーテルを加えてよく混和し 15,000rpm で数秒間遠心した。その後、エーテルを完全に除去し、10 分の 1 量の 3M 酢酸ナトリウム溶液、2 倍量の氷冷した 100%エタノール、グリコーゲン 20 μ g を加えて数秒間ボルテックスで攪拌

し 15,000rpm で 10 分間遠心した。その後上清を捨て、氷冷した 80%エタノール 100 μ l で洗浄し 15,000rpm で 10 分間遠心した。完全にエタノールを除去した後、DNA を TE 20 μ l に溶かした。次に 4 種類の各エッペンから制限酵素処理をした DNA 4 μ l をとり、新しい 0.5ml のエッペンドルフチューブに分注した。それぞれに対して Genome-Walker Adaptor (25 μ M) 1.9 μ l、10 \times Ligation Buffer 1.6 μ l、T4 DNA Ligase (6units/ μ l) 0.5 μ l を加えてよく混和し、16 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。70 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートした後、TE 72 μ l を加え、数秒間ボルテックスで攪拌した。アダプターの配列については表 2 に示した。

2-I-2) PCR Walking プライマリー-PCR

アダプターを付加した 4 種類のゲノムライブラリー 1.0 μ l に超純水 37.8 μ l、10 \times Tth PCR Reaction Buffer 5.0 μ l、dNTP 1.0 μ l、Mg(Oac)₂ (25mM) 2.2 μ l、アダプター特異的プライマー 1.0 μ l、AFLP 多型断片特異的プライマー 1.0 μ l、Advantage Genomic Polymerase Mix (50 \times) 1.0 μ l を加え全量 50 μ l として反応を行った。反応条件は 94 $^{\circ}$ C 2 秒、72 $^{\circ}$ C 3 分を 1 サイクルとして 7 サイクル行った。この際、タッチダウンにより 67 $^{\circ}$ C まで伸長反応の温度を下げた。その後、94 $^{\circ}$ C 2 秒、67 $^{\circ}$ C 3 分を 1 サイクルとして 32 サイクル行い、67 $^{\circ}$ C で 4 分維持した。その後、50 倍に希釈した。EcoR I 側のフランキングサイトを伸長するための AFLP 多型断片特異的プライマー、または Taq I 側のフランキングサイトを伸長するための特異的プライマーは OLIGO4.0-s ソフトウェアを用いて設計した。ここで用いたアダプター特異的プライマーの配列は表 2 に示した。

2-I-3) PCR Walking セカンダリー-PCR

プライマリー-PCR 産物 1.0 μ l に超純水 37.8 μ l、10 \times Tth PCR Reaction Buffer 5.0 μ l、dNTP 1.0 μ l、Mg(Oac)₂ (25mM) 2.2 μ l、セカンダリー-PCR のためのアダプター特異的プライマー 1.0 μ l、AFLP 多型断片特異的プライマー 1.0 μ l、Advantage Genomic Polymerase Mix (50 \times) 1.0 μ l を加え全量 50 μ l

表2 PCR Walking におけるアダプターおよびプライマーの塩基配列

	配列
PCR Walking adaptor	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTTCGACGGCCCGGGCTGGT H ₂ N-CCCGACCA-PO ₄ -5'
Adapter primer 1	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC
Adapter primer 2	5'-ACTATAGGGCACGCGTGGT

として反応を行った。反応条件は 94°C 2 秒、72°C 3 分を 1 サイクルとして 5 サイクル行った。この際、タッチダウンにより 67°C まで伸長反応の温度を下げた。その後、94°C 2 秒、67°C 3 分を 1 サイクルとして 20 サイクル行い、67°C で 4 分維持した。上記の条件で伸長反応がうまく行かないものに関しては、step down PCR を行った (Zhang, et al. 2000)。この PCR は PCR Walking 法でダイレクトシーケンスを行うために最適化された増幅法であり、フランキングサイトを効率的に増幅できるものである。この方法に従い、94°C 2 秒、72°C 3 分を 1 サイクルとして 3 サイクル行った。その後、94°C 2 秒、70°C 3 分を 1 サイクルとして 3 サイクル行い、次いで 94°C 2 秒、68°C 3 分を 1 サイクルとして 3 サイクル行った。そして 94°C 2 秒、66°C 20 秒、68°C 3 分を 1 サイクルとして 3 サイクル行い、68°C で 8 分間維持した。また *EcoR* I 側のフランキングサイトを伸長するための AFLP 多型断片特異的プライマー、*Taq* I 側のフランキングサイトを伸長するための特異的プライマーは OLIGO4.0-s ソフトウェアを用いて設計した。ここで用いたアダプター特異的プライマーの配列は表 2、AFLP 多型断片特異的プライマーについては表 3 に示した。

2-I-4) フランキングサイトの塩基配列の特定

上記の結果により得られた PCR 産物について、アガロースゲルからの回収を行い、ベクターに挿入して、シーケンスを行った。方法は、2-1)、2-2)と同様に行った。ただし、サブクローニングの確認は、PCR Walking 法のセカンダリーPCR で用いたプライマーを用いた。

2-J) 品種間の変異の特定

PCR Walking のライブラリーを黒毛和種で作成しているため、ホルスタイン種に高頻度で検出される AFLP 多型断片の場合、その配列と PCR Walking 法で得られた配列の比較により変異個所を特定できる可能性がある。しかしながら、黒毛和種で高頻度に検出される断片の場合はその方法では変異個所を特定できない。そのため、以下の方法を採用した。まずフランキングサイトの塩基配列に基づいてプライマーを設計した。プライマーの設計には OLIGO4.0-s

ソフトウェアを用いた。このプライマーを用いて黒毛和種とホルスタイン種で PCR 反応により産物を得た。PCR の条件は 94°C 2 分の後、94°C 30 秒、65°C 30 秒、72°C 1 分を 1 サイクルとして 30 サイクル行った後、72°C 7 分で維持した。得られた産物についてアガロースゲルからの回収を行い、超純水 25 μ l に溶解させた。その DNA 溶液を用いて、2 品種を代表する個体の DNA を用いて、シーケンス反応を行った。シーケンス反応は、SILVER SEQUENCE™ DNA Sequencing Reagents を用いた。反応は、プロトコールに従った。反応はサーマルサイクラーを用いた。条件は以下のように設定した。すなわち、94°C 2 分後、94°C 30 秒、65°C 30 秒、72°C 1 分を 1 サイクルとして 60 サイクル繰り返した後、72°C 7 分の伸長反応を行った。その後、Stop/Loading Buffer を 3 μ l 加え、混合した。バンドの検出には銀染色法を用いた。方法については 1-3-5) と同様に行った。この方法により黒毛和種とホルスタイン種の塩基配列を比較し、品種間での変異を特定した。

2-K) 遺伝子型判別

塩基配列の比較により特定された変異を用いて、黒毛和種 300 頭、ホルスタイン種 100 頭、F1 90 頭の遺伝子型判別を行った。判別方法については、変異の種類に応じて PCR-RFLP、ミスマッチ PCR-RFLP などを行った。PCR の条件は基本的には以下のように設定した。すなわち、94°C 2 分後、94°C 30 秒、65°C 30 秒、72°C 1 分を 1 サイクルとして 30 サイクル繰り返した後、72°C 7 分の伸長反応を行った。また、PCR 産物のサイズに応じて、アガロースゲルやポリアクリルアミドゲルにより検出した。

第3節 結果

AFLP 多型断片を検出しその SNPs マーカーへの転化の可能性を検討した。そのためにまず AFLP 法を用い黒毛和種とホルスタイン種の 2 品種を比較し品種特異的、あるいは品種に偏りのある多型断片を検出し、次いで、多型断片の SNPs 化を試みた。

3-A-1) AFLP 法による品種特異的断片の検出

レアカッターの *EcoR* I、フリークエントカッターの *Taq* I を用いてゲノム DNA を切断して AFLP 法を行った。*EcoR* I プライマー 32 種類と、*Taq* I プライマー 64 種類 (合計 730 種類のプライマーの組み合わせ) で黒毛和種とホルスタイン種の遺伝的多型を調べた。用いた組み合わせの詳細は表 1 に示した。まず、1 次スクリーニングとして各品種それぞれ 10 頭ずつを供試し、AFLP 多型断片を検出した。本研究では、黒毛和種と F1 の鑑別を主目的としているため、ホルスタイン種特異的 AFLP 多型断片を中心に検出を試みた。AFLP 多型断片の選択基準は AFLP 多型断片の出現頻度をホルスタイン種で 70%以上、黒毛和種では 10%以下とした。特にホルスタイン種で検出される多型断片に関しては黒毛和種で全く多型断片が見られない場合に限り、50%しか検出されなくとも鑑別に利用できるものとした。まず 1 次スクリーニングの結果、ホルスタイン種に高頻度に検出された多型断片は 25 本であった。AFLP 法では 1 プライマーセットにつき、平均 140 本の断片が検出された。その AFLP 断片の内、1 次スクリーニングで品種鑑別に利用できると考えられる AFLP 多型断片は、平均 29.2 プライマーセット (AFLP 断片 4088 本) に対して 1 本の割合で検出された。

次に 1 次スクリーニングにより検出された AFLP 多型断片について、供試頭数を 100 頭ずつに増やして 2 次スクリーニングを行った。その結果、10 本の AFLP 多型断片が得られた。これは 1 次スクリーニングで検出された多型断片

の 40%であった。その結果を表 3-1 に示す。マーカー名は BIMA (Breed Identification Marker from AFLP) とした。表示法を 1 番目の BIMA1 の例では、Selective-amplification の際、*EcoR* I のプライマーの配列に ACC の 3 つの選択的塩基を付けたプライマーと、*Taq* I のプライマーの配列に CTG の 3 つの選択的塩基を付けたプライマーを用いたことを意味する。バンドの頻度については、黒毛和種では Selective-amplification で PCR 増幅を行った個体 100 頭のうち、その多型断片を持った個体が存在せず、一方ホルスタイン種では 100 頭の PCR 増幅のうち、この多型断片を持っている個体が 78 頭存在し、黒毛和種との比較で著しい偏りがみられたことを意味している。このことから 1 次スクリーニングで検出頻度に差のあった多型断片のうち約 25%の断片で個体数を増やした 2 次スクリーニングでも偏りのある断片となることが示された。

3-A-2) cDNA-AFLP 法による品種特異的断片の検出

AFLP 法と共に、cDNA-AFLP 法でも同様に品種特異的断片の探索を行った。AFLP 法ではゲノム全体を対象とし、主に非遺伝子領域を検出するのに対して、cDNA-AFLP 法では発現領域のみの多型を検出することができる。すなわち、黒毛和種とホルスタイン種の形質の違いを支配する変異を、ダイレクトに検出することが可能となる。AFLP 法と同様に、*EcoR* I 及び *Taq* I を用いて cDNA を切断して cDNA-AFLP 法を行った。cDNA-AFLP 法では対象となる領域がゲノムに比べて短いため、プライマーには 2 つの塩基を付加したものが用いられる。*EcoR* I プライマー全 16 種類と、*Taq* I プライマー全 16 種類 (合計 256 種類のプライマーの組み合わせ) で黒毛和種とホルスタイン種の遺伝的多型を調べた。100 頭分の組織サンプルを入手することは困難であるため、段階的スクリーニングは行わず、各品種それぞれ 8 頭ずつを供試し、検出した断片は直ちに SNPs 化を行った。cDNA-AFLP では、ホルスタイン種特異的断片の検出を試みるため、多型断片の選択基準は AFLP 多型断片の出現頻度が黒毛和種では 0%のものを選択した。その結果を表 3-2 に示す。黒毛和種での頻度が 0%でホルスタイン種での頻度が 70%以上の断片が 3 つ検出された。

表 3-1 AFLP 法による品種特異的バンド

マーカー	AFLP プライマー		バンドを持つ個体数 (100)	
	EcoR I	Taq I	黒毛和種	ホルスタイン種
BIMA 1	ACC	CTG	0	78
BIMA 2	ACC	TTG	8	75
BIMA 3	ATG	CCA	9	73
BIMA 4	AAT	CAA	11	77
BIMA 5	AAT	CCT	8	84
BIMA 6	AGT	TAC	1	59
BIMA 7	CCC	TGC	0	67
BIMA 8	CGT	TAT	0	50
BIMA 9	CCA	TAT	3	62
BIMA 10	ACG	TTC	0	61

表 3-2 cDNA-AFLP 法による品種特異的バンド

マーカー	AFLP プライマー		バンドを持つ個体数 (8)	
	EcoR I	Taq I	黒毛和種	ホルスタイン種
BIMA 11	AG	CC	0	7
BIMA 12	TG	TC	0	8
BIMA 13	AT	CC	0	6

3-B) AFLP マーカーの SNPs マーカーへの転化 (SNPs 化)

次いで AFLP 法で検出された多型断片について SNPs 化を試みた。AFLP 多型断片の変異個所を特定するため、多型断片のフランキングサイトの塩基配列を決定した。塩基配列の決定には PCR Walking 法を行った。

その結果、AFLP 法で検出したマーカー10本、cDNA-AFLP 法で3本の全てが SNPs 化された。その結果について図 1-1 から 1-3 に示した。表示法は2種類の配列において塩基配列 a は AFLP 法を行った際に、多型断片が検出される配列を示し、塩基配列 b は多型断片が検出されない配列を示す。また SNPs 検出のために作成したプライマー、およびアニーリング温度等についてまとめて表 4 に示した。各 SNPs の変異個所の詳細を、図を参照し説明すると以下のようになる。

BIMA1: ホルスタイン種のみで検出された AFLP 断片の配列であり、内部に3塩基 (CTC) の deletion が検出されたものであった。また、欠失部分に制限酵素 *Nla*IV の認識部位 (GGNNCC) が存在していたため、PCR-RFLP により遺伝子型判定を行った。

BIMA 2: ホルスタイン種に高頻度に検出された AFLP 断片の配列であり、*Eco*R I の制限酵素認識部位において (GAGTTC) から (GAATTC) に点突然変異したものであった。

BIMA 3: ホルスタイン種で高頻度に検出された AFLP 断片の配列であり、9塩基の deletion が検出されたものであった。

BIMA 4: ホルスタイン種で高頻度に検出された AFLP 断片の配列であり、*Taq* I の制限酵素認識部位において (TCCA) から (TCGA) に点突然変異したものであった。

BIMA 5: ホルスタイン種のみで検出された AFLP 断片の配列であり、*Taq* I の制限酵素認識部位において (TCCA) から (TCGA) に点突然変異したものであった。

BIMA 6: ホルスタイン種で高頻度に検出された AFLP 断片の配列であり、*Eco*R I の制限酵素認識部位において (GAAATTC) から (GAATTC) に点突然変

表 4-1 AFLP 法により同定された各マーカーにおける多型検出法

マーカー	Forward primer (5'→3') Reverse primer (5'→3')	アニーリング温度	PCR 産物のサイズ (bp)	変異 検出法*
BIMA 1	GAGTGTAGTTGATTTATTTTATTTGT GAGTACTGACGCAGCACACCTACAGCC	65	177/174	deletion (3bp) PCR-RFLP (制限酵素 NlaIV)
BIMA 2	GTAACAACAAGTACTGAGTGGTGAATTCGGG TCGGATTGCTTACGTGCC'TTCTGGAGAC	65	305	EcoRI site mutation (G→A) ミスマッチ PCR-RFLP (制限酵素 EcoRI)
BIMA 3	CCTTTGTCTTCCACTGCCACCTGTCA CACATCTCTTTAGCACTCTCGTTCTGGT	65	170/179	deletion (9bp) PCR
BIMA 4	TAGGGAAGATAACCACAATAAGTAAAG GTAAAGATAAACATGTAAAGATATAGCACAGCATCGACC	65	249	Taq I site mutation (C→G) ミスマッチ PCR-RFLP (制限酵素 Taq I)
BIMA 5	TGTTACAACGCAAGGCTGGGAAACTG GAGAGTGGAGAGAATAGCGGATGCC'TCGACCTGACTTTC	65	223	Taq I site mutation (C→G) ミスマッチ PCR-RFLP (制限酵素 Taq I)
BIMA 6	CGGGCTGGTCTGAGAAAAGTCAAGTCAC CAGTCAATGAAGAGCCGAGTAGAAGAAC	65	638/639	EcoRI site mutation (A→X) PCR-RFLP (制限酵素 EcoRI)
BIMA 7	TCTTGGTACCTGCTGCTTCCTGTCCTG CGTATCCGTAGTATAGTAGTATGGTG	63	562	Hinf I site mutation (T→C) PCR-RFLP (制限酵素 Hinf I)
BIMA 8	ATTCTATCAACAGCAAAAACCAAGCATT AAATGGCAGGAAGGAAGGCTATAGATGG	62	365	Taq I site mutation (C→T) PCR-RFLP (制限酵素 Taq I)
BIMA 9	CCCAAGGTCTAAGAGCCAGGGTACTGATGC TCTGTAAAGACAAAGTGAATCTCTAAGG	59	366	Taq I site mutation (A→G) PCR-RFLP (制限酵素 Taq I)
BIMA 10	ACCCCGTCCTTCTTCCCATCACAGCC GCAGACAACAGGAAGACCCGTAAGTTTC	65	243	EcoRI site mutation (A→G) PCR-RFLP (制限酵素 EcoRI)

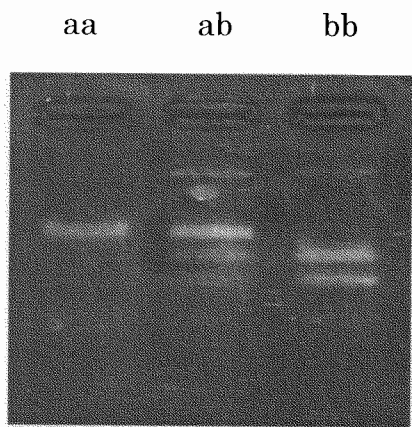
* PCR は全て 30 サイクルで行った。PCR の場合は 5%ポリアクリルアミドゲル、PCR-RFLP の場合は 3%アガロースゲルでそれぞれ適時電気泳動して、検出した。

表 4-2 cDNA-AFLP 法により同定された各マーカーにおける多型検出法

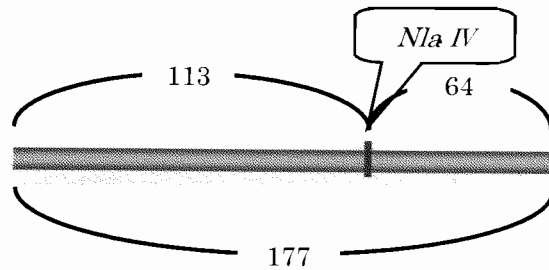
マーカー	Forward primer (5'→3') Reverse primer (5'→3')	アニーリング温度 PCR サイクル数	PCR 産物の サイズ(bp)	変異 検出法*
BIMA 11	CACATGATACAGCAAAAGGAGTTC CCCAATGTTCTGACGTCCTCCGA	65 30	136/133	deletion (3bp) PCR
BIMA 12	ACATTCTACTTCCAAACACCCCAGC CTGCCTGCAATGCAGGAGACCTGGG	65 30	284/276	deletion (8bp) PCR
BIMA 13	CTGAAAGCCTGAGGGGAAAATGG TGAAGGTGAAGCGGTGGGGAGAG	60 30	131	Taq I site mutation (C→T) PCR-RFLP (制限酵素 Taq I)

*PCR の場合は 5%ポリアクリルアミドゲル、PCR-RFLP の場合は 3%アガロースゲルでそれぞれ適時電気泳動して、検出した。

BIMA1



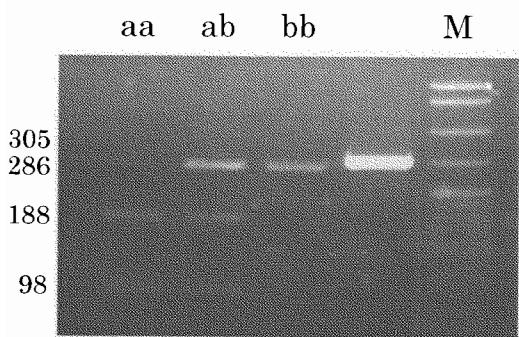
digest type (b) **【GGCTCC】**



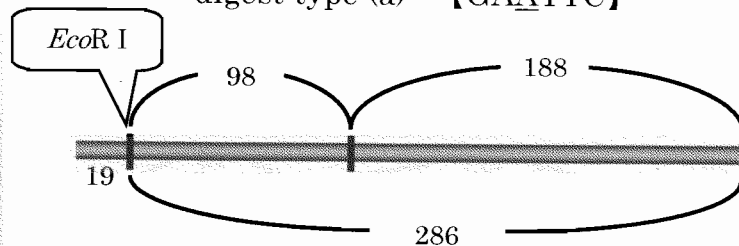
undigest type (a) **【GGC】**

BIMA2

(mutation at *EcoR* I site)



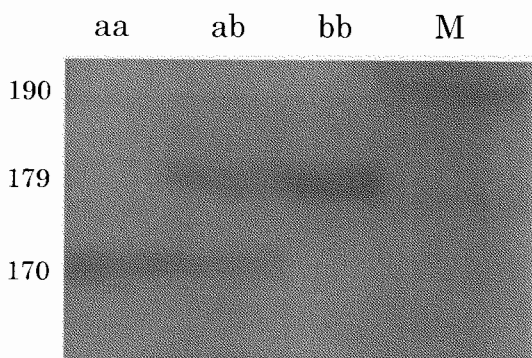
digest type (a) **【GAATTC】**



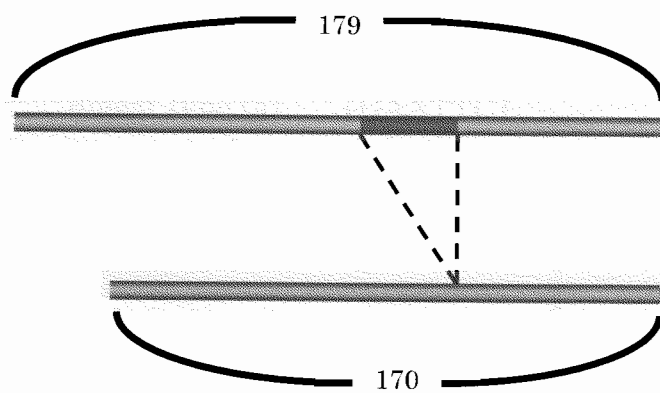
undigest type (b) **【GAGTTC】**

BIMA3

(deletion)



long type (b)

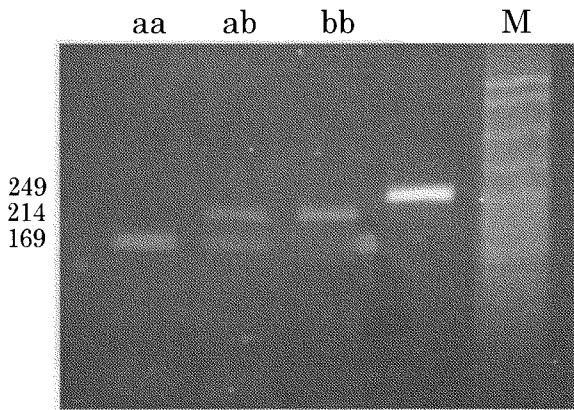


short type (a)

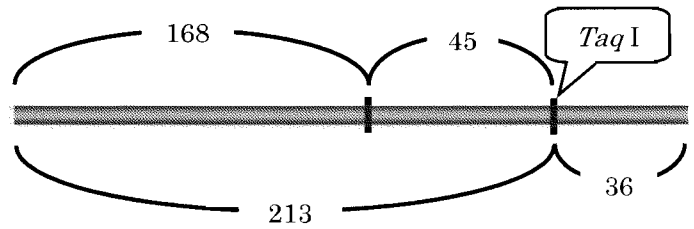
図1-1 SNPs検出結果

BIMA4

(mutation at *Taq* I site)



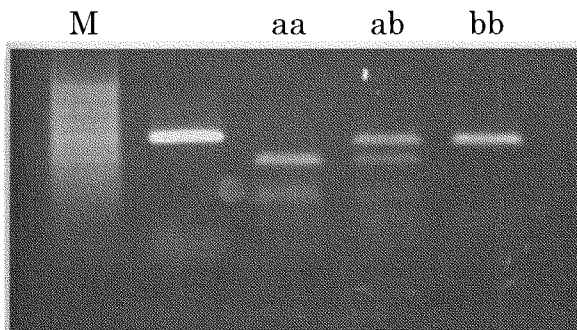
digest type (a) 【TCGA】



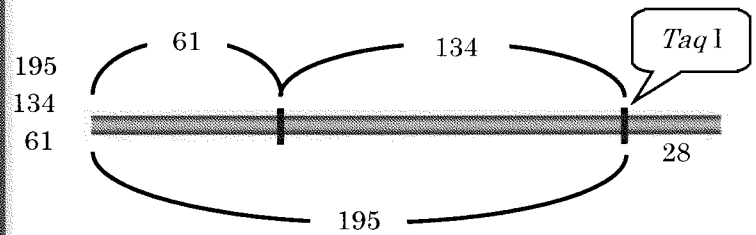
undigest type (b) 【TCCA】

BIMA5

(mutation at *Taq* I site)



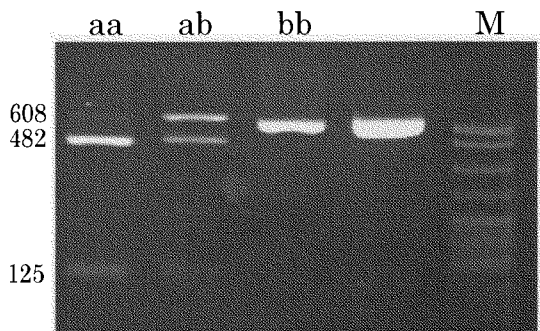
digest type (a) 【TCGA】



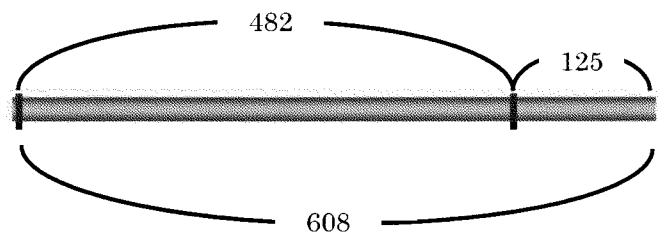
undigest type (b) 【TCCA】

BIMA6

(mutation at *Eco*R I site)



digest type (a) 【GAATTC】



undigest type (b) 【GAAATTC】

図1-2 SNPs検出結果

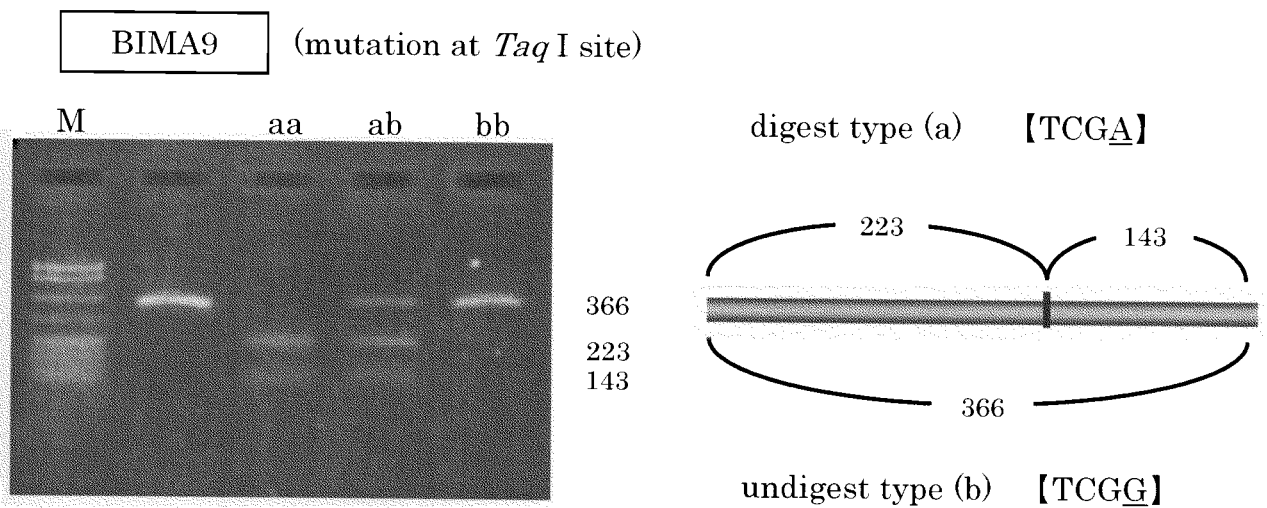
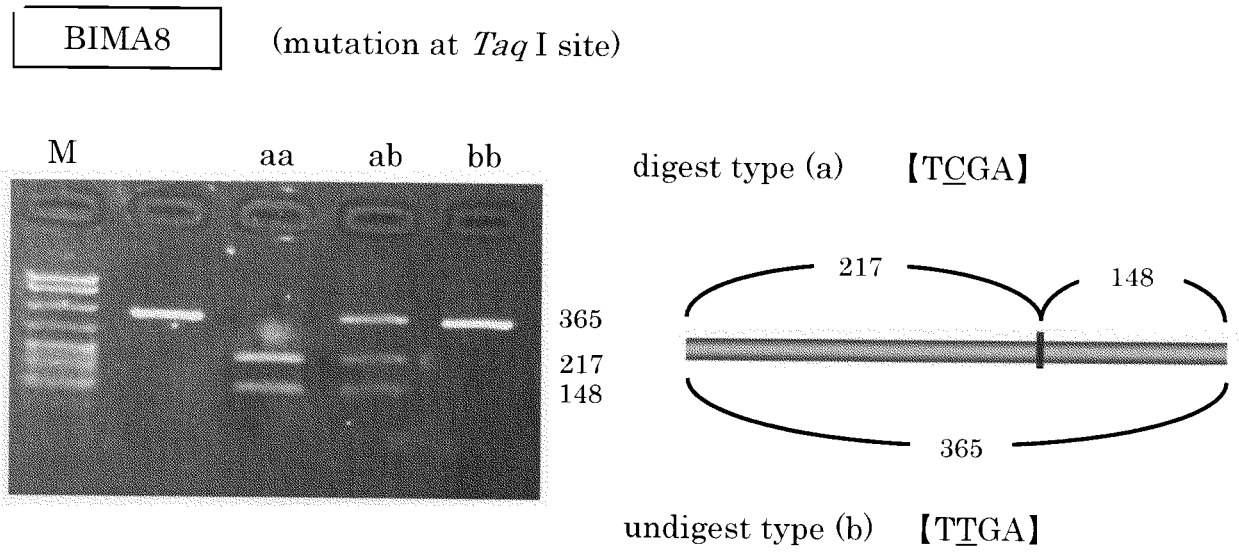
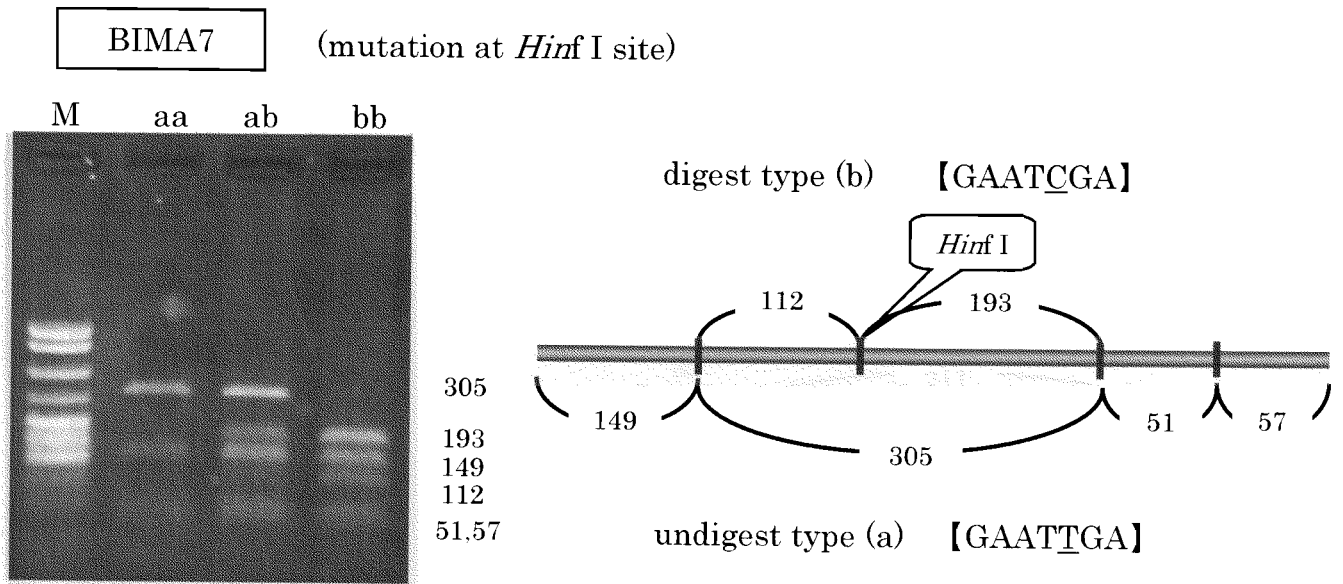


図1-3 SNPs検出結果

BIMA10 (mutation at *EcoR* I site)

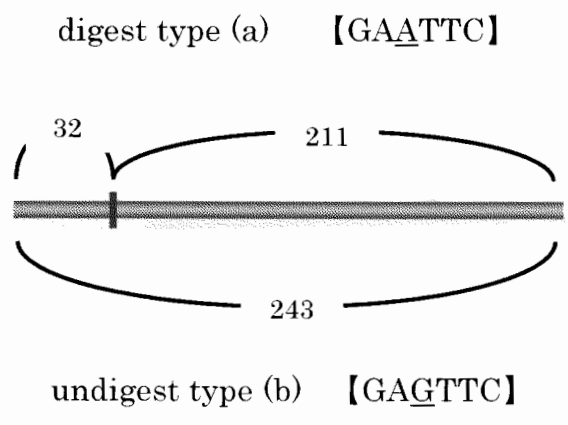
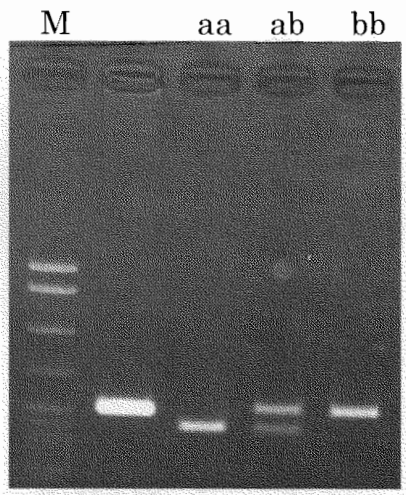


図1-4 SNPs検出結果

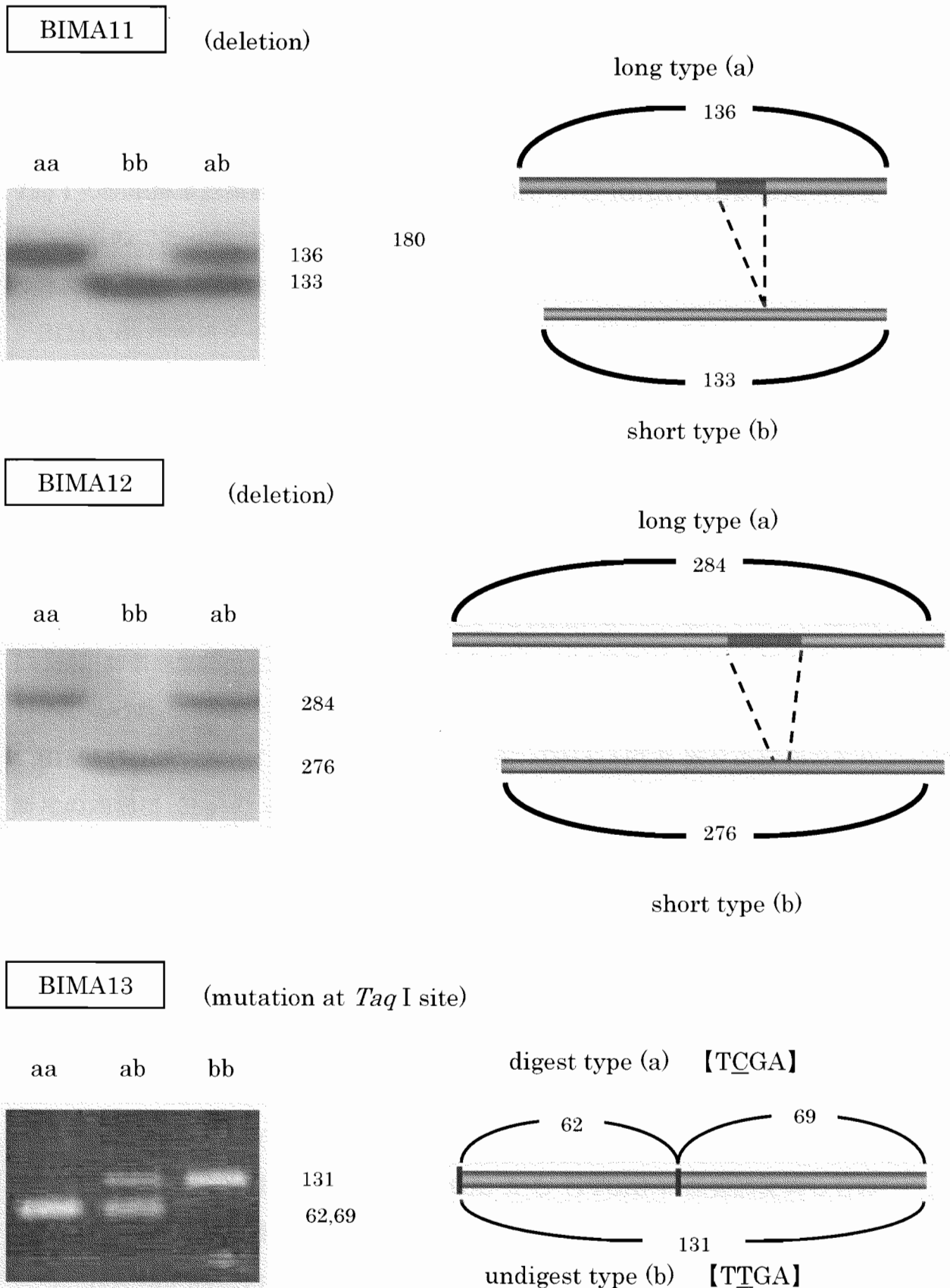


図1-5 SNPs検出結果

異したものであった。

BIMA 7: ホルスタイン種のみで検出された AFLP 断片の配列であり、内部の *Taq* I の制限酵素認識部位において (GAATCGA) から (GAATTGA) に点突然変異したものであった。また、PCR-PFLP において、*Taq* I では検出が困難であったため、制限酵素には *Hinf* I (GANTC) を用いて行った。

BIMA 8: ホルスタイン種のみで検出された AFLP 断片の配列であり、*Taq* I の制限酵素認識部位において (TTGA) から (TCGA) に点突然変異したものであった。

BIMA 9: ホルスタイン種で高頻度に検出された AFLP 断片の配列であり、*Taq* I の制限酵素認識部位において (TCGG) から (TCGA) に点突然変異したものであった。

BIMA 10: ホルスタイン種のみで検出された AFLP 断片の配列であり、*Eco*R I の制限酵素認識部位において (GAGTTC) から (GAATTC) に点突然変異したものであった。

BIMA11: ホルスタイン種のみで検出された cDNA-AFLP 断片の配列であり、断片の内部に 3bp の deletion が検出された。また、この断片の塩基配列を BLAST により相同性検索を行ったところ、microtubule-actin crosslinking factor 1 遺伝子の 3'非翻訳領域の一部と高い相同性を示した。

BIMA12: ホルスタイン種のみで検出された cDNA-AFLP 断片の配列であり、断片の内部に 8bp の deletion が検出された。また、この断片の塩基配列を BLAST により相同性検索を行ったところ、*Bos taurus* における LINE (long interspersed repetitive element) 配列の一部と高い相同性を示した。

BIMA13: ホルスタイン種のみで検出された cDNA-AFLP 断片の配列であり、*Taq* I の制限酵素認識部位において (TCGA) から (TTGA) に点突然変異したものであった。また、この断片の塩基配列を BLAST により相同性検索を行ったところ、*Bos taurus* における EST (expressed sequence tag) 配列の一部と高い相同性を示した。

これらの突然変異個所を特定できた 13 種類の内、制限酵素認識部位の変異

が原因であったものが 9 種類 (*EcoR* I 5 種類、*Taq* I 4 種類)、欠失によるものが 4 種類であった。以上のことから、AFLP 法で検出される多型は制限酵素認識部位だけでなく、欠失などの変異によるものも検出が可能であることが示された。

3-C) SNPs マーカーを用いた遺伝子型判別

各 SNPs マーカーを用いて黒毛和種、ホルスタイン種、F1 での遺伝子頻度、および遺伝子型頻度を判定した。遺伝子型の判定には、表 4 で示したプライマーを利用し、PCR-RFLP、あるいはミスマッチ PCR-RFLP を行った。これは、操作が簡便であり、誤差が生じにくいためである。結果については、表 5 に示した。表示法において対立遺伝子 A は AFLP 法を行った際に多型断片が検出される配列、対立遺伝子 B は多型断片が検出されない配列を示す。また、 p は対立遺伝子 A の遺伝子頻度を示した。AFLP 法を行った黒毛和種、ホルスタイン種各個体における判定結果と RFLP 遺伝子型判別の結果について比較したところ、各マーカーにつき 1 頭程度の不一致は見られたが AFLP 断片の有無の判定と SNPs の遺伝子型はほぼ一致した。よって、各マーカーにおける SNPs マーカーへの転化は正確に行うことができたと判断した。AFLP と RFLP の結果が一致しなかった個体については、RFLP を再度行い、その結果を正しい判定とした。

SNPs マーカーによる遺伝子型判別には黒毛和種約 300 頭、ホルスタイン種 100 頭、F1-96 頭を分析に用いた。cDNA-AFLP 由来の BIMA11-13 については両品種 8 頭ずつしか AFLP を行っていないため、SNPs マーカーでは、まず各 100 頭で分析を行い、有意な遺伝子頻度の差が認められたものについては黒毛和種の頭数を 300 頭に増やして分析を行った。その結果、100 頭での分析において BIMA12 は黒毛和種での頻度が高く、BIMA13 はホルスタイン種での頻度が低かったため、品種鑑定のマーカーとしては貢献できるものではないと判断した。

本研究では、黒毛和種と F1 の鑑別を主目的としているため、ホルスタイン

表5 各マーカーにおける遺伝子頻度

マーカー	黒毛和種				ホルスタイン種				F1			
	AA	AB	BB	<i>p</i>	AA	AB	BB	<i>p</i>	AA	AB	BB	<i>p</i>
BIMA 1	0	1	294	0.0017	37	41	22	0.575	3	34	56	0.215
BIMA 2	0	25	265	0.0431	19	56	25	0.470	2	35	58	0.205
BIMA 3	0	9	91	0.045	14	59	27	0.435	0	41	55	0.214
BIMA 4	0	11	89	0.055	30	47	23	0.525	0	53	39	0.288
BIMA 5	0	26	264	0.0448	40	44	16	0.620	0	52	40	0.283
BIMA 6	0	2	288	0.0034	14	45	41	0.365	0	31	64	0.163
BIMA 7	0	0	292	0.0000	13	54	33	0.400	0	34	60	0.181
BIMA 8	0	0	297	0.0000	5	45	50	0.275	0	26	67	0.140
BIMA 9	0	3	287	0.0052	15	44	41	0.370	0	26	69	0.137
BIMA 10	0	9	282	0.0155	15	46	39	0.380	1	30	63	0.170
BIMA 11	0	1	310	0.0016	31	48	21	0.550	0	40	54	0.213
BIMA 12	0	8	100	0.037	25	62	21	0.519				
BIMA 13	0	1	99	0.005	8	37	55	0.265				

A は AFLP 法を行った際に検出される対立遺伝子、B は検出されない対立遺伝子を示す。また、*p* は対立遺伝子 A の遺伝子頻度を示す。

種に特異的な断片、すなわち黒毛和種での頻度が非常に重要であると考えられる。黒毛和種 300 頭レベルで分析を行った SNPs マーカーのうち、黒毛和種で全く検出されなかった断片は 2 種類 (BIMA7,8)、 遺伝子頻度が 1%未満であったものが 4 種類 (BIMA1,6,9,11)であった。その他はすべて 1%以上であり、最も高いもので 5.5% (BIMA4) であった。また、ホルスタイン種での頻度は最も高いもので 62% (BIMA5)、最も低いもので 27.5% (BIMA8)であった。

また、黒毛和種やホルスタイン種から検出された SNPs マーカーの遺伝子頻度は、F1 においてほぼ半分の値を示した。このことから、各 SNPs マーカーは、黒毛和種とホルスタイン種の集団においてここで示された遺伝子頻度と同等の頻度で分布していることが示唆された。

3-D) SNPs マーカーによる黒毛和種と F1 の鑑別

開発されたマーカーのうち、完全にホルスタイン種に特異的なものは検出されていないため、1 種類のマーカーで完全に鑑別を行うのは不可能である。よって 11 種類のマーカーを用いて、黒毛和種と F1 の品種鑑別における、それぞれのマーカー検出率と誤判別率を計算し、より鑑別能力の高いマーカーの組み合わせを検討した。

黒毛和種およびホルスタイン種における対立遺伝子 A の遺伝子頻度 p より、黒毛和種と F1 の鑑別における、各 SNPs マーカーの検出率と誤判別率の値を算出した (表 6)。鑑定の際に、ホルスタイン種に高頻度で存在する対立遺伝子 A を検出した場合に、F1 であると推定するものとする。検出率 P_i は、判定される個体が F1 である場合に、ホルスタイン由来の断片を検出し、F1 であると推定できる確率を示し、すなわちホルスタイン種における対立遺伝子 A の遺伝子頻度 p の値と等しい。誤判別率 P_m は、判定される個体が黒毛和種である場合に、黒毛和種由来の対立遺伝子 A を検出してしまい、誤って F1 であると推定してしまう確率である。すなわち黒毛和種の対立遺伝子 A の遺伝子頻度を P_b とすると、 $P_m = P_b + P_b \cdot P_b$ となる。

各マーカーにおける誤判別率 P_m の値は、0.00-10.70 であった。鑑定を行う

表6 各マーカーの品種鑑定における検出率と正確度

マーカー	黒毛和種				ホルスタイン種				検出率 Pi (%)	誤判別率 Pm (%)
	AA	AB	BB	<i>p</i>	AA	AB	BB	<i>p</i>		
BIMA 1	0	1	294	0.0017	37	41	22	0.575	57.5	0.34
BIMA 2	0	25	265	0.0431	19	56	25	0.470	47.0	8.43
BIMA 3	0	9	91	0.045	14	59	27	0.435	43.5	8.80
BIMA 4	0	11	89	0.055	30	47	23	0.525	52.5	10.70
BIMA 5	0	26	264	0.0448	40	44	16	0.620	62.0	8.76
BIMA 6	0	2	288	0.0034	14	45	41	0.365	36.5	0.68
BIMA 7	0	0	292	0.0000	13	54	33	0.400	40.0	0.00
BIMA 8	0	0	297	0.0000	5	45	50	0.275	27.5	0.00
BIMA 9	0	3	287	0.0052	15	44	41	0.370	37.0	1.04
BIMA 10	0	9	282	0.0155	15	46	39	0.380	38.0	3.08
BIMA 11	0	1	310	0.0016	31	48	21	0.550	55.0	0.32

A は AFLP 法を行った際に検出される対立遺伝子、B は検出されない対立遺伝子を示す。また、*p* は対立遺伝子 A の遺伝子頻度を示す。

表7 複数のマーカ-における鑑定能の推移

マーカ-数	マーカ-	検出率 Pi (%)	誤判別率 Pm (%)
1	BIMA 7	40.00	0
2	BIMA 7,8	56.50	0
3	BIMA 7,8,11	80.42	0.32
4	BIMA 7,8,11,1	91.68	0.66
5	BIMA 7, 8,11,1,6	94.72	1.34
6	BIMA 7,8,11,1,6,9	96.67	2.36

マーカ-の組み合わせについては、各マーカ-における誤判別率の低いものから順次追加した。

際に誤って判別してしまう確率の許容範囲は 1%程度と設定し、11 個のマーカ－のうち誤判別率が 1%以下である上位 6 個のマーカ－(BIMA9 含む)を用いて鑑定を行うことにした。

表 7 に上位 6 個のマーカ－の組み合わせによる、鑑定能の推移を示した。組み合わせは、誤判別率の低いマーカ－を順次追加し、マーカ－数を 1 から 6 個までを用い、各組み合わせにおける F1 検出率と誤判別率の値を算出した。各組み合わせにおける検出率は、複数のマーカ－のうち、どれか 1 個のマーカ－でも検出されれば F1 と判定される。例をあげると、6 個のマーカ－を用いた場合、検出率 $P_i = 1 - (1 - P_{i7})(1 - P_{i8})(1 - P_{i11})(1 - P_{i1})(1 - P_{i6})(1 - P_{i9})$ となる。誤判別率も同様に、黒毛和種由来の断片が検出される確率を示し、各マーカ－における誤判別率に依存し、 $P_m = 1 - (1 - P_{m7})(1 - P_{m8})(1 - P_{m11})(1 - P_{m1})(1 - P_{m6})(1 - P_{m9})$ の式により算出される。

マーカ－数が 2 個の場合、誤判別率は 0%であるが、検出率は 56.5%と、約半分の F1 しか検出できない。マーカ－数が 3 個の場合でも検出率は 80.42%である、鑑定能不足であると考えられる。マーカ－数が 4 個から 6 個の場合はいずれも検出率が 90%以上で、誤判別率が 3%未満と、どちらの値も鑑定能の高い組み合わせであると考えられる。

第4節 考察

AFLP 法により、2 種類の制限酵素でゲノム DNA を切断した。制限酵素には、4 塩基認識のフリークエントカッターと 6 塩基認識のレアカッターが用いられる。制限酵素の種類に関して、以前よりフリークエントカッターには *Mse* I が有効であることが Vos ら (1995) により示されている。というのも真核生物の DNA は AT 含量が多いため、TTAA の配列を認識する *Mse* I は、より多くの断片を作り出すことができるためである。それと同様に、家畜における最近の研究では、*Taq* I を用いたものも報告されている (Ajimoe-Marsan ら、1997 ; Knorr ら、1999) 。理由は、哺乳類の DNA に数多く存在する CpG アイランドも検出できるためである。他方、レアカッターに関してはいずれの制限酵素を用いても大きな差はみられないため、一般的には信頼性の高さとコストの面から *EcoR* I が用いられている (Ovilo ら、2000) 。

以上のことを考慮して本研究では、レアカッターには *EcoR* I、フリークエントカッターには *Taq* I を用いた。そしてそれらのプライマーを用いて合計で種類のプライマーの組み合わせで黒毛和種とホルスタイン種の遺伝的多型の検出を試みた。その結果、1 次スクリーニングにより個体間、および品種間で差異がみられた AFLP 断片は約 1 万本あり、1 プライマーセットあたり平均 14 本の割合で検出された。その内、ホルスタイン種に高頻度に検出された多型断片は 25 本であった。このことから、*EcoR* I と *Taq* I のプライマーセットでは、平均 25.2 プライマーセット (検出される AFLP 断片は 4088 本) に対してホルスタイン種に高頻度に検出される AFLP 多型断片が 1 本得られることが示唆された。他方、AFLP 法を用いたイタリアのホルスタイン種とブラウン種における遺伝的距離の研究では、*EcoR* I と *Taq* I のプライマーセットにおいて、合計 16 セット (検出された AFLP 断片は 1042 本) から 248 本の多型断片が得られている (Ajmone-Marsan, et al. 1997、2002) 。すなわち、1 プライマーセットあたり平均 15.5 本の多型断片が検出されている。以上のことを比較すると、黒

毛和種と我国のホルスタイン種の間での遺伝的距離は近いと考えられる。我国では、明治の一時期に黒毛和種は在来牛にヨーロッパ牛の品種を交配させ、品種改良した経緯があり、他方、ホルスタイン種も在来牛にホルスタイン種を累進交配したものである。また年代的にも、ヨーロッパ牛の導入が明治～昭和初期と近年に行われたという歴史的な背景が、黒毛和種とホルスタイン種の遺伝的類似性に反映されていると考えられる。このことは、Mannen ら (1998) が報告した黒毛和種の mtDNA における D-loop の変異の結果、および Tsuji ら (2004) が報告した mtDNA を対象とした我国のホルスタイン種における遺伝的構成の結果からも裏付けられる。

2 次スクリーニングの結果、6 種類の検出頻度に偏りのある AFLP 多型断片が得られた。これは 1 次スクリーニングの 24% の数に相当することから、1 次スクリーニングで得られる多型断片の約 4 分の 1 が 2 次スクリーニングでも検出頻度に偏りのある多型として検出されることが示唆された。

また本研究では、ゲノム DNA を用いた AFLP 法に加え、cDNA でも同様に AFLP 法を行い、品種特異的断片の検出を試みた。結果 256 プライマーセットを用いて、ホルスタインに高頻度で存在する 3 つの断片をクローニングすることができた。これらのうち既知の遺伝子と高い相同性を示したのは 1 つのみであり、その変異も 3' 非翻訳領域に存在していたため、品種間の形質の違いに影響するものではないと考えられる。

次に AFLP 法で検出された多型断片について SNPs 化を試みた。本研究では AFLP 法を用いて DNA マーカーの検出を行い、これらの DNA マーカーの有用性について確認した。これまで述べてきたように、AFLP 法は簡便に多くの DNA 多型を検出する方法として非常に有効である。しかしながら、遺伝子型判定 (Genotyping) を行う際には、(1) 精製度の高いゲノム DNA が必要である、(2) 遺伝子座に関してホモとヘテロの区別ができない、(3) PCR-RFLP 法などと比較して、操作が煩雑である、などの欠点を持つ。そこで AFLP マーカーの多型の原因を検出し、SNPs マーカーに転化することで、PCR 法及び PCR-RFLP 法などで遺伝子型判定が行うことが出来、これらの欠

点を補うことが出来ると考えられる。

変異個所は制限酵素認識部位の可能性が高いと考えられる。その部位を利用して PCR-RFLP が出来るようにするために AFLP 断片のフランキングサイトの塩基配列を決定することが必要である。塩基配列の特定には PCR Walking 法を行った。PCR Walking 法は Negi ら (2000) により、植物から得られた AFLP 多型断片のフランキングサイトの同定に利用できることが報告されている。これはアダプター特異的プライマーと AFLP 多型断片の特異的プライマーで nested PCR を行う方法である。それにより *EcoR* I、あるいは *Taq* I における制限酵素認識部位とそのフランキングサイトを含む PCR 産物を得ることが出来る。今回、AFLP 多型断片 13 種類全てについてそのフランキングサイトの塩基配列を特定できたことから、PCR Walking 法は SNPs 化の手段に有効であることが示された。

これら 13 種類の AFLP 多型断片について変異個所の特定を試みた。その結果、全ての多型断片の変異個所を特定出来た。変異個所を特定できた 13 種類に関して、制限酵素認識部位の変異が原因であったものは 9 種類、欠失によるものは 4 種類であった。また、今回は検出されていないが、3 つの選択的塩基の部位に多型がある場合もある。以上のことから AFLP 法で検出される多型の原因は複数存在することが示唆された。

次にこの SNPs マーカーを利用して黒毛和種約 300 頭とホルスタイン種 100 頭、および F1 96 頭について遺伝子型頻度、および遺伝子頻度を調べた。黒毛和種やホルスタイン種から検出された SNPs マーカーの遺伝子頻度は、F1 においてほぼ中間の値を示した。このことから、各 SNPs マーカーは、黒毛和種とホルスタイン種の集団においてここで示された遺伝子頻度と同等の頻度で分布していることが示唆された。今回開発された多くの SNPs マーカーにおいて、遺伝子頻度が 0.5 より低いことが示されたことから、AFLP 法で検出された多型断片が 7 割以上であっても遺伝子型がヘテロの個体が多く、F1 に伝わる可能性が低くなると考えられる。そのためマーカーとしての精度も低くなると考えられる。

また開発された SNPs マーカーを用いて、黒毛和種と F1 との品種鑑定の可能性を検討した。全 13 個のマーカーのうち、信頼度の高い上位 6 個のマーカーを用いて、F1 の検出率と、黒毛和種であるにもかかわらず F1 であると判定してしまう誤判別率の値を算出したところ、6 個全てのマーカーを用いた場合、97.64%の信頼度で 96.67%の F1 を検出できることが示唆された。これらの DNA マーカーは偽装販売されていると考えられる牛肉から、F1 であるものを検出するのに有効なマーカーであると考えられ、偽装販売の抑止として貢献できるものであると期待できる。

他方、最近の研究で AFLP マーカーを利用した純粋種と交雑種の判別を行っている報告がある (Alves ら、2002)。これはイベリアブタとデュロックとの雑種第一代とイベリアブタを判別するというものである。ここでは 13 種類の AFLP プライマーセットを用いてデュロック種に特異的な 9 つのマーカーを検出している。これらのマーカーを用いることにより 96.79%の F1 を判別できることが示されている。すなわち、家畜品種の鑑別において AFLP 法は非常に有効な手段であり、その効率は識別する品種間の遺伝的距離に依存することが示唆される。

以上のことから、本研究により開発された SNPs マーカーにおいて、黒毛和種と F1 の品種鑑別が可能であることが示された。今後、本研究で確立された方法を、現在日本国内で問題となっている、BSE 問題に端を発し、社会問題化した外国産牛肉と国内産牛肉との鑑定にも利用できるものであると期待できる。

第4章 DNA マーカーを利用した黒毛和種の選抜

第1節 緒言

第2、3章において、AFLP法を用いてウシ品種間におけるDNA多型の探索を行った。これまで述べてきたように、AFLP法は簡便に多数のDNA多型を検出することが出来る。本章では、本法を用いてウシ品種内での多型バンドの検出を試み、有用性を検討すると共に、新たな育種戦略の構築という目的で、経済形質に関わると思われる多型を同定することにより、選抜の指標となり得るDNAマーカーの開発を試みた。

重要な形質と関連したDNAマーカーの開発に関しては、ここ十数年の間に急速に進歩してきている。まず、ヒトにおいて、遺伝性疾患における遺伝子解析が試みられるようになり、マーカーとしてRFLP、VNTR、マイクロサテライトマーカーの順で汎用される遺伝子上のマーカーが変化してきた(Hingら、1993)。現在もっとも期待される解析手法はゲノム上に多数存在する1塩基多型(SNPs)マーカーを使って網羅的に多因子性疾患の感受性遺伝子を探索する方法である。SNPsは各個人の遺伝的背景をまさに個別化するのに最適であると考えられ、特定の形質(Phenotype)と比較するアソシエーションスタディ(相関解析)により、多因子性疾患に対する感受性などの「体質」が同定できると期待されている(Sentinelliら、2002)。さらに、ヒト全ゲノム配列情報に関するドラフトの公表によって、100万を超えるSNPs情報と、10万を超えるマイクロサテライトが利用可能となりつつある。未だSNP情報のみから疾患関連遺伝子を同定した例は報告されておらず、現実には他の遺伝子マーカーと組み合わせて利用されている。すなわち、まずVNTRあるいはマイクロサテライトマーカーを指標に疾患関連遺伝子の存在部位を絞り込み、最終的にそのマーカー付近のSNPと疾患との連鎖不平衡を検討するという方法が取られる(Linら、1998)。これは、マイクロサテライトマーカーが約数百kb

にわたって連鎖が認められるのに対し、SNP マーカーでは数 kb しか連鎖不平衡が保たれないといわれているためである。この方法により、いくつかの重要な関連遺伝子が同定されるならば、これらの疾患の病態解明と病型別の予防・治療方針、また新規治療法の開発が可能になると期待される。こうした背景の下、ヒトでは、多くの SNPs マーカーを連鎖解析により染色体地図上に位置づけられ、疾患などに関する候補遺伝子群の相関解析が進められている (Lander ら、1994)。ウシなどの家畜においては、ヒトと比較すると、まだ全ゲノム配列のドラフトも公表されておらず、DNA マーカーの数も十分に利用できる状況には無い。しかしながら、塩基配列の情報なしに多くの DNA 多型を検出することが出来るという AFLP 法の利点を生かし、多数のマーカーを得ることにより、アソシエーションスタディによる形質に関連した候補遺伝子群の同定が可能だと考えられる。

黒毛和種はその肉質の良さから市場でも高く評価され、現在では繁殖雌牛頭数の約 95%以上を占める我が国固有の肉専用種である (福島、1972 ; 並河、1972)。多くの外国種は脂肪交雑と皮下脂肪厚の間の遺伝相関が正であるが、黒毛和種の場合は 0 か小さいながらも負となっていることから、世界の牛品種の中で脂肪交雑すなわち霜降り肉を作る遺伝的能力が優れ、かつ余分な皮下脂肪の少ない特徴を持つ品種として世界的に認知されている (Mukai ら、1996)。しかし、1991 年 4 月からの我が国の牛肉市場の自由化に伴い、外国からの牛肉の輸入量の増加のみならず、近い将来海外では黒毛和種の遺伝資源を活用した雑種が生産する牛肉の逆輸入の可能性のあることから、いっそうの肉質の改良と斉一化が緊急の課題となっている。

全国和牛登録協会では、枝肉格付規格が従来の一元評価から質と量の二元評価に改正された 1988 年から産肉調査報告事業と枝肉市場における格付け結果を活用した枝肉形質の遺伝的評価法の検討を始め、1991 年度からアニマルモデル BLUP (Best Linear Unbiased Prediction ; Henderson、1973) 法による枝肉形質の育種価評価事業を各生産県単位で開始した (向井ら、1994)。育種価評価事業が開始された 1991 年度には全国で 8 県が参加しただけにすぎず、

分析に供される枝肉記録数も少なかったため、新たに記録が追加されるたびに相加的遺伝分散や、予測育種価までも大きく変化するという問題点もみられた。しかし、枝肉記録が産地の肥育地帯からまんべんなく収集されるに及び、種雄牛の後代のデータが多く蓄積され、種雄牛の予測育種価の正確さは増し、生産現場での理解も得られるようになってきた。これに加え、人工授精法の普及に従って特定のエリート種雄牛に限られた交配が顕著に行われるようになり、肉質の改良と斉一化が進むようになってきた（大山、1997）。

しかしながら、順風満帆にみえる育種価評価による黒毛和種の改良にも解決しなければならない問題が依然存在している。育種価は農家の効果などの環境効果を除いて推定される個体の遺伝的能力値であり、枝肉形質の遺伝率が高いことからある程度の正確さを有している。しかし、父親と母親が共通する全兄弟の個体の育種価は自信の記録が無い限り等しくなる等、その分析能は記録数に依存し、早期の個体評価に課題がある。また、育種価評価による種雄牛の選抜を行うと、特定の家系に属する種雄牛のみが選抜されることになり、他の種雄牛が持つ貴重な遺伝子が失われる危険性がある。すなわち、短い目で見れば改良効果が大きくなるが、改良速度はいずれ低下していくことが予想され、長い目で見れば遺伝的多様性を維持するために、多様な遺伝子が保有されるような選抜を行うことが好ましいと考えられる。

このような育種価評価における問題点を補うべく、本研究では DNA レベルでの黒毛和種における枝肉形質の遺伝的能力の評価法を開発し、その有効性を検証した。繁殖牛毎に DNA 型で枝肉形質の遺伝的能力を評価できれば、より厳密な遺伝的能力の早期の評価ができ、特定の種雄牛に偏る交配を避け、能力の高い種牛を選抜することが可能となる。本研究ではヒトと同様に、アソシエーションスタディを行い、黒毛和種の経済形質に関する遺伝子群と連鎖する DNA マーカーの特定を行った。ここでは、AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 法を用いたセレクトィブ・ジェノタイピング (Lander ら、1989 ; Ayoub ら、2002) を行い、肉質に関連した遺伝子座連鎖マーカーを検出しようと試みた。ここで言うセレクトィブ・ジェノタイピングは、目的

とする形質に関して最も高い能力を示す個体と最も低い能力を示す個体の DNA を比較することで形質に関連した遺伝子座近傍の DNA マーカーの検出を可能にする解析法である。AFLP 法は 1995 年に Vos らによって開発されたフィンガープリント法であり、標的サンプルの塩基配列の情報なしで全ゲノムの DNA 多型を包括的に調べることができ、多型性が高いこと、かつ再現性が高いこと、制限酵素の組み合わせで検出できる多型数を増やすことが出来るなどの特徴がある。すなわち、この方法はアソシエーションスタディに必要な、多くの多型情報を得るのに適していると考えられる。

本研究では、黒毛和種において他品種に見られない特徴のある「さし」、すなわち脂肪交雑評点 (BMS, Beef Marbling Standard) を対象形質とした。

「さし」とは筋肉内に脂肪が沈着している状態で、BMS は「さし」の入り具合の指標とされる。和牛の脂肪は融点が低く、口の中でよく溶けて官能的にも優れておりおいしいとされていることから、この評価値が高いものはより肉質が良いとされ、黒毛和種の枝肉形質の中でも特に重要な経済形質となっている。また BMS は遺伝率が高いことから、BMS に関する後代の能力を比較的予測し易く、予測育種価の評価は正確度が高いと考えられる。そのため、BMS 予測育種価の高い個体と低い個体間での塩基配列の違いが、AFLP バンドパターンに反映されれば、そのバンド群が BMS の QTL (Quantitative Trait Loci) に連鎖した DNA マーカー群と考えられる。

本研究では、このような QTL に連鎖していると考えられる AFLP マーカーを探索し、多型の原因となっている SNPs を同定することで、黒毛和種の BMS に対する選抜に有効な DNA マーカーの開発を行うことを目的とした。

第 2 節 材料及び方法

2-A) 供試動物

A 県で供用中の黒毛和種繁殖雌牛約 4000 頭の中から、高 BMS 育種価牛 25 頭、低 BMS 育種価牛 23 頭を含む計 169 頭を実験に供与した。

2-B) ゲノム DNA の精製

ウシゲノム DNA は肝臓組織、リンパ節、血液より抽出し、精製した。方法は第 2 章の 2-B) に従った。

2-C) DNA の定量

DNA の定量は 260nm の吸光度の測定で行った。方法は第 2 章の 2-C) に従った。

2-D) AFLP 法

AFLP 法における操作は、制限酵素に *Mse* I を用いたものは第 2 章の 2-D)、*Taq* I を用いたものは第 3 章の 2-D) に、AFLP バンドの検出は、第 3 章の 2-F) に従って行った。また、AFLP マーカーの SNPs マーカーへの転化については第 3 章の 2-G) から 2-J) に示した通りである。

2-E) データ分析

2-E-1) χ^2 検定による高低グループ間におけるマーカー頻度の有意差検定

AFLP 法により得られた多型バンドの頻度が高 BMS 育種価のグループと低 BMS 育種価のグループにおいて有意差がみられるかどうかを判断した。AFLP バンドを保有する遺伝子型と保有しない遺伝子型のデータに対して、各マーカーの各遺伝子型に対する分離比を計算するために χ^2 検定を行った。

この χ^2 値に対して自由度 1 と設定し、P 値を算出した。P 値が 0.01 より小さいものが高 BMS 育種価のグループと低 BMS 育種価のグループ間で差がみられるとみなした。

2-E-2) 正準判別法を用いた集団の分類

個体本来の性質により事前にグループ分けがされている個体のデータを用いて、グループを最も適切に分類するようにそれぞれの多型情報に重み付けをする式を正準判別関数と呼ぶ。高 BMS 育種価のグループと低 BMS 育種価のグループにおいて頻度差が大きく見られた AFLP バンドについて正準判別関数を導出し、分類能を評価した。正準判別関数は以下のように算出される。

$X_{n \times p}$: マーカーの行列 (n は個体数)

$G_{n \times g}$: グループの指標行列 (p はマーカー数)

$M_{g \times p}$: グループの平均行列 (g はグループ数)

$$W = \frac{(X - GM)'(X - GM)}{n - g}$$

$$B = \frac{(GM - 1\bar{X})'(GM - 1\bar{X})}{g - 1}$$

比率 $\frac{a'Ba}{a'Wa}$ を最大化

⇒ 固有方程式 $(B - \lambda W)a = 0$ ただし $\|a\| = 1$

⇒ 正準判別関数 $Score = Xa$: a は固有ベクトル

以上のように算出された正準判別関数を用いて、全ての個体の総合遺伝子型値を算出し、BMS の予測育種価との相関を調べた。総合遺伝子型値はバンドを持つ場合にはそのバンドに関するスコアが加算され、バンドを持たない場合は正準判別関数が加算されないというようにして算出される。

2-E-3) ランダムに採取した個体群における正準判別関数の算出

本分析では、第 1 節に用いた高低グループ計 48 頭を加えて 169 頭分の AFLP データがある。これらの個体のうち、予測育種価の上位から 20 頭、下位から 20 頭、中間を 20 頭選んだ。まず、上位、中間、下位のグループを分類するための正準判別関数を求め、これを LD (Linear Discriminant) 1 とする。その係数値を基に LD1 での各個体の総合遺伝子型値を算出した。さらに、詳細にグループ分けを行うために第 2 の正準判別関数を求め、これを LD2 とする。その係数値を基に LD2 での各個体の総合遺伝子型値を算出した。これらの 2 つの総合遺伝子型値をもとに 2 次元のグラフ上に各グループの個体をプロットした。

2-E-4) 正準判別関数による各個体のグループ分け

3)で算出した正準判別関数をもとに全 169 頭の LD1 と LD2 による総合遺伝子型値を求め、これらの個体が上位、中間、下位のどのグループに分類されるかを明らかにした。同時に、各個体の BMS の予測育種価と LD1 の総合遺伝子型値の相関を見た。

第3節 結果

本研究では黒毛和種のセレクトティブ・ジェノタイピングに AFLP 法を適用し、BMS に連鎖した DNA マーカーの検出を行った。さらに検出したマーカーが BMS の予測育種価の予測に利用できるか否かを調べた。

3-A) AFLP 法による黒毛和種の量的形質に関する遺伝子座近傍のマーカーの同定

本研究においては、*EcoR* I プライマー11種類と *Mse* I プライマー16種類を用いて 156組、*EcoR* I プライマー14種類と *Taq* I プライマー32種類を用いて 235組、合計 391組のプライマーを用いて BMS 育種価の高いグループと低いグループの間の遺伝的変異を調べた。

まず、各グループそれぞれ 8頭ずつを電気泳動し、AFLP バンドを検出した。高 BMS 育種価のグループと低 BMS 育種価のグループ間で多型が見られたバンド全てについてそれぞれの個体で 0 および 1 のスコアを与えたものを AFLP データとした。本研究では約 150bp 以上のバンドを評価対象とした。*EcoR* I / *Mse* I では 1種類のプライマーセットで平均して約 90本の AFLP バンドを検出し、5.5本の多型バンドが検出された。*EcoR* I / *Taq* I では 1種類のプライマーセットで平均して約 70本の AFLP バンドを検出し、5.3本の多型バンドが検出された。このようにして見つかったグループ間の多型バンドのうちで、形質に連鎖している多型バンドの頻度差を、5割以上として考えると、このような多型バンドは全プライマーセット 391組から 227本得られた。そのうち *EcoR* I / *Mse* I で見られた多型バンドが 141本で、出現頻度は 1.7プライマーセットにつき 1本の割合、*EcoR* I / *Taq* I で見られた多型バンドは 86本で、出現頻度は 1.8プライマーセットにつき 1本の割合であった。このことから *EcoR* I / *Mse* I よりも *EcoR* I / *Taq* I の方が効率よく偏りの大きい多型バンドを検出できたことが示された。また、泳動図も *EcoR* I / *Mse* I よりも *EcoR* I / *Taq* I の

方がバンドの数が少なく、多型を判別しやすいことから、ウシの AFLP 法を行う際に用いる frequent cutter には *Mse* I より *Taq* I が適していることが示唆された。

さらに、これら 227 本の多型バンドについて分析個体を増やし、高 BMS 育種価の個体 25 頭と低 BMS 育種価の個体 23 頭で比較を行った。これらの偏りの大きさについては χ^2 検定による P 値より判断し、より小さい P の値を示すものを偏りが大きいと判断した。本研究では BMS に強く連鎖しているものとして、P 値が 0.003 以下の 16 個の AFLP バンドを選んだ。これらを表 1 に示す。1 番目の多型バンドでは、Selective-amplification に *EcoR* I のプライマーの配列に ACT の選択的塩基を付けたプライマーと、*Taq* I のプライマーの配列に CGT の選択的塩基を付けたプライマーを用いたことを示している。バンドの頻度については、高 BMS 育種価の個体 25 頭中 22 頭、すなわち 88% の頻度でバンドを持っていることを示し、低 BMS 育種価の個体では 23 頭中 6 頭、すなわち 26% の頻度でバンドをもっていることを示している。この結果をもとに頻度差を自由度 1 で産出した χ^2 検定の P 値が 0.000014 である。

3-B) AFLP マーカーによる個体評価

得られた 16 個の AFLP マーカーを用いて、BMS における個体評価法について検討した。これらのマーカーは距離に関わらず QTL に連鎖したマーカーであると考えられる。しかしながら、QTL には効果の大小があり、また AFLP バンドの QTL との連鎖の程度も異なることが予測され、全ての AFLP バンドを一様の重み付けすることで BMS における遺伝的能力の評価を行うことは難しいと考えられる。そこで本研究ではさらに、見つかった AFLP バンド毎に適切な重み付けを行い、これらの効果について検討を加えた。まず、16 個の AFLP バンドについて、正準判別法を行い、高低グループ間を識別できるように、各マーカーについて、それぞれの重み付け値である正準判別関数を算出した。正の値は、この AFLP バンドを持っていれば BMS 値がプラスに動くと予測されるもので、負の値は、このバンドを持っていれば BMS 値がマイナスに

表 1 χ^2 検定により選出した AFLP マーカー

AFLP マーカー	AFLP プライマーセット		高 BMS 育種価 25 頭 (%)	低 BMS 育種価 23 頭 (%)	頻度の差 (%)	P 値
AF 74	E-ACT	T-CGT	22 (88%)	6 (26%)	62	0.000014
AF 36	E-ATC	T-CGC	22 (88%)	7 (30%)	58	0.000046
AF 7	E-ATC	T-ACT	13 (52%)	0 (0%)	52	0.000051
AF 169	E-AAG	T-CTA	13 (52%)	0 (0%)	52	0.000051
AF 188	E-CGC	M-AGG	13 (52%)	0 (0%)	52	0.000051
AF 8	E-ATC	T-AGA	17 (68%)	3 (13%)	55	0.000114
AF 156	E-AAG	T-CAA	12 (48%)	0 (0%)	48	0.000125
AF 18	E-ACG	T-ACA	12 (48%)	22 (96%)	48	0.000285
AF 67	E-ACT	T-CAT	12 (48%)	1 (4%)	44	0.000674
AF 99	E-AGG	T-CGT	12 (48%)	1 (4%)	44	0.000674
AF 149	E-AAT	T-CCT	3 (12%)	13 (57%)	45	0.001080
AF 134	E-AAT	T-CAA	12 (48%)	21 (91%)	43	0.001222
AF 21	E-ACG	T-AGC	11 (44%)	1 (4%)	40	0.001527
AF 120	E-AGA	T-CAA	11 (44%)	1 (4%)	40	0.001527
AF 110	E-AGC	T-CTG	6 (24%)	16 (70%)	46	0.001550
AF 184	E-CGC	M-AAG	12 (48%)	2 (8%)	40	0.002763

*AFLP プライマーセットにおいて、Eは EcoRI プライマー、Tは Taq I プライマー、Mは Mse I プライマーをそれぞれ示している。

動くと予測されるものである。全てのマーカーにおける正準判別関数の和が、その個体における総合遺伝子型価となる。すなわち、総合遺伝子型価とは DNA 多型情報から推定された遺伝的能力値のことである。

続いて、集団内からランダムに抽出した 121 頭についても同様に 16 マーカーを用いて AFLP 分析を行い、この正準判別関数と 16 個の AFLP バンドの有無で各個体の BMS に関する能力を予測し、合計 169 頭について総合遺伝子型価を算出した。これらの値と、BMS 予測育種価との相関をみることで、個体評価が正確に行えるかどうかを検証した。結果、図 1 のような分布を示し、相関係数 $r = 0.70$ と高い値を示した。したがって、本研究により同定された 16 個の AFLP マーカーの情報をもとに、個体の総合遺伝子型価を算出することで、BMS における個体評価が有効に行えることが示唆された。

3-C) AFLP マーカーの選抜

16 個のマーカーから導いた総合遺伝子型価による BMS に関する個体評価が可能であることを示した。しかしながら、実際に DNA マーカーによる個体評価を行う際には、コストならびに時間的な効率の面から、より少数のマーカーを用いる方が好ましい。そこで、16 個のマーカーから選抜して、より少数のマーカーで同等の評価が行えるかを検証した。

正準判別分析において各マーカーの重要度の指標として 16 個の AFLP マーカーの F 値を算出したところ、F 値が 2 以上のマーカーは AF74・AF7・AF188・AF156・AF18・AF8・AF120・AF110 の 8 マーカーであった（表 2）。すなわち、これらの 8 マーカーは総合遺伝子型価による個体評価を行った 16AFLP マーカーのなかで貢献度の高いマーカーであると考えられる。そこで、この 8 マーカーのみの情報による個体評価が有効であるかどうかを検証した。

まず、8 マーカーのタイピング情報から再度、高グループ 25 頭と低グループ 23 頭を識別できるような正準判別関数を算出し（表 2）、それをもとに各個体

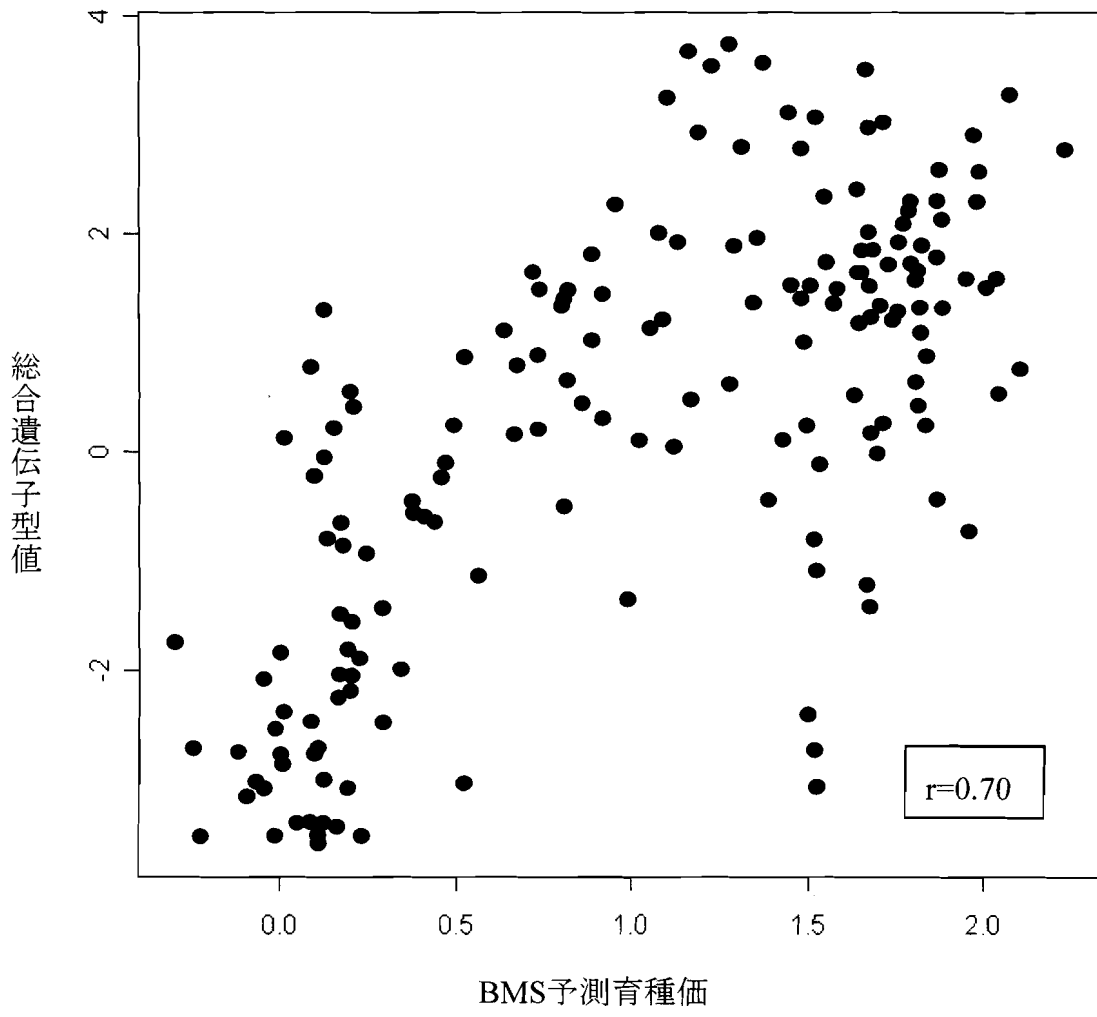


図1 16AFLPマーカーを用いた総合遺伝子型値とBMS予測育種価との相関

表2 正準判別分析により選出した8マーカー

マーカー	プライマーセット	高 BMS 育種価 (25 頭)	低 BMS 育種価 (23 頭)	正準判別関数
AF74	E-ACT / T-CGT	22	6	0.9943459
AF7	E-ATC / T-ACT	13	0	1.709502
AF188	E-CGC / M-AGG	13	0	0.7810611
AF156	E-AAG / T-CAA	12	0	0.8301725
AF18	E-ACG / T-ACA	12	22	-1.575019
AF120	E-AGA / T-CAA	11	1	0.8985219
AF110	E-AGC / T-CTG	6	16	-0.676016
AF8	E-ATC / T-AGA	17	3	0.1478168

の総合遺伝子型価を算出した。その結果、高グループの 1 頭の総合遺伝子型価が負の値をとってしまい、低グループの個体と誤判別してしまったが、それ以外の個体では正確に高グループの個体と低グループの個体を識別することができた。そこで、続いて残り 121 頭全頭について、この正準判別関数を用いて総合遺伝子型価を算出なおし、得られた総合遺伝子型価と BMS 育種価との相関を調べた。その結果が図 2 で、相関係数は 0.675 であり、16 マーカーによる分類と比較しても同等の評価をすることができることが示された。

3-D) AFLP マーカーの SNPs マーカーへの転化

第 3 章でも述べたように、AFLP 法により同定された多型は、簡便に遺伝子型判定を行うために、その変異を特定し、SNPs マーカーへと転化することが重要である。ここでは 3-C) で選出された 8 個の AFLP マーカーについて、SNPs 化を行った。また SNPs 検出のために作成したプライマー、およびアニーリング温度等については表 3 にまとめた。各 SNPs の変異個所の詳細を以下、図 3 を参照しながら概説する。

AF74: BMS 育種価の高いグループで高頻度に検出された AFLP 断片で 441 塩基からなる配列であり、このマーカーの多型の原因は 3 塩基の insertion であった。

AF7: BMS 育種価の高いグループで高頻度に検出された AFLP 断片で 159 塩基からなる配列であり、このマーカーの多型の原因は *Taq* I の制限酵素認識部位において (TCGA) から (TTGA) に点突然変異したものであった。

AF188: BMS 育種価の高いグループで高頻度に検出された AFLP 断片で 127 塩基からなる配列であり、このマーカーの多型の原因は 8 塩基の insertion であった。

AF156: BMS 育種価の高いグループで高頻度に検出された AFLP 断片で 201 塩基からなる配列であり、このマーカーの多型の原因は 8 塩基の deletion であった。また、この配列は相同検索の結果、97 塩基から 201 塩基がヒトの TTN 遺伝子(全 294540 塩基)の 97871 塩基から 97975 塩基までと 90%の相同

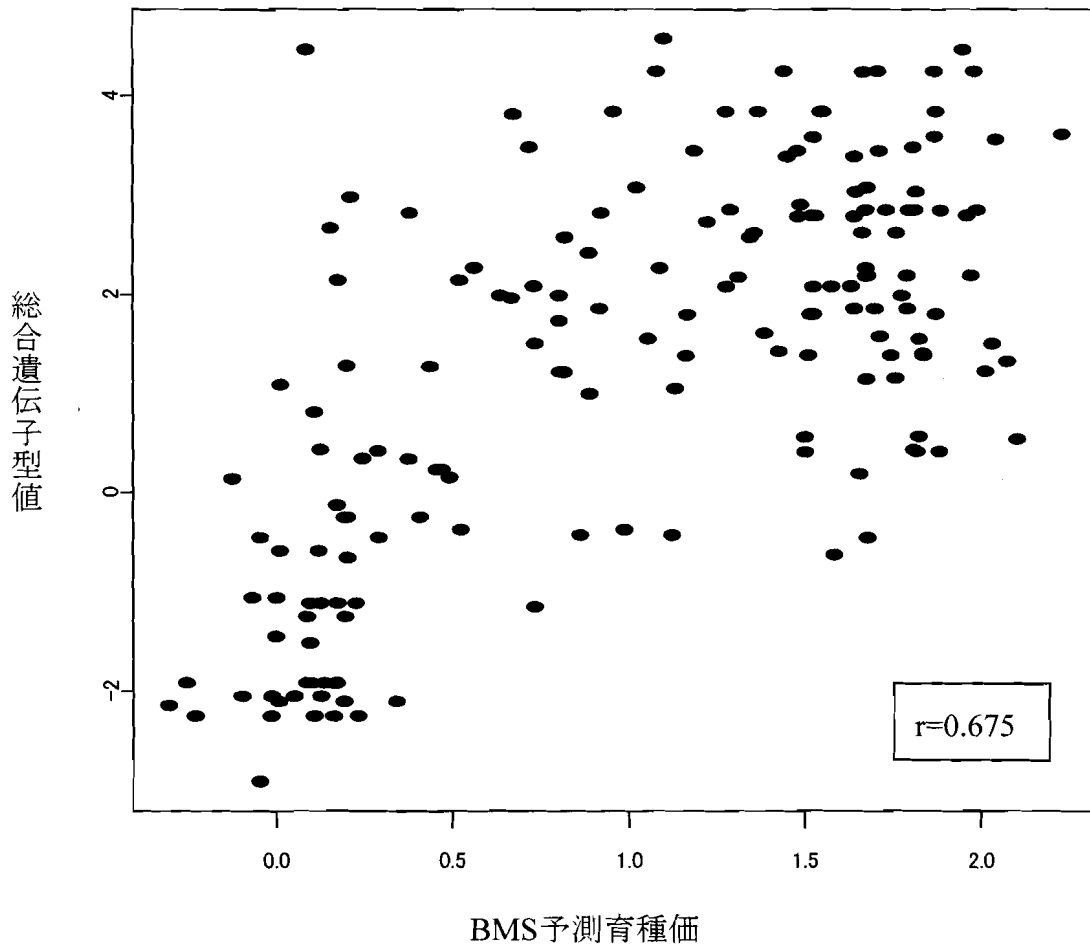


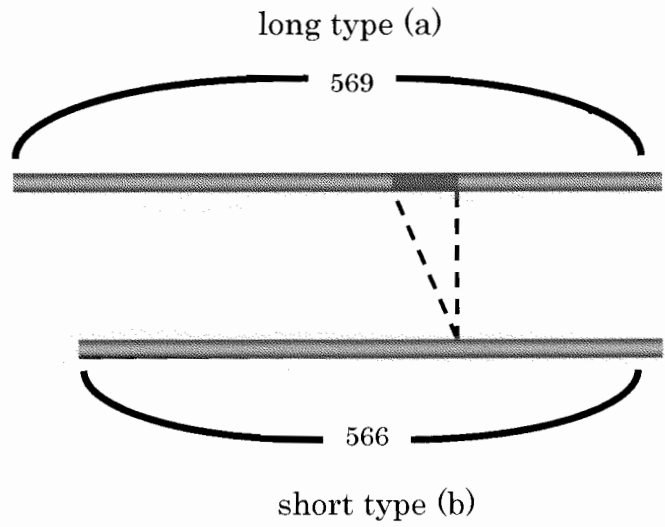
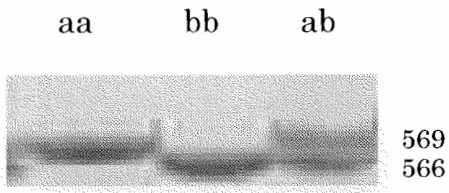
図2 8AFLPマーカーを用いた総合遺伝子型価とBMS予測育種価との相関

表3 各マーカーにおける多型検出法

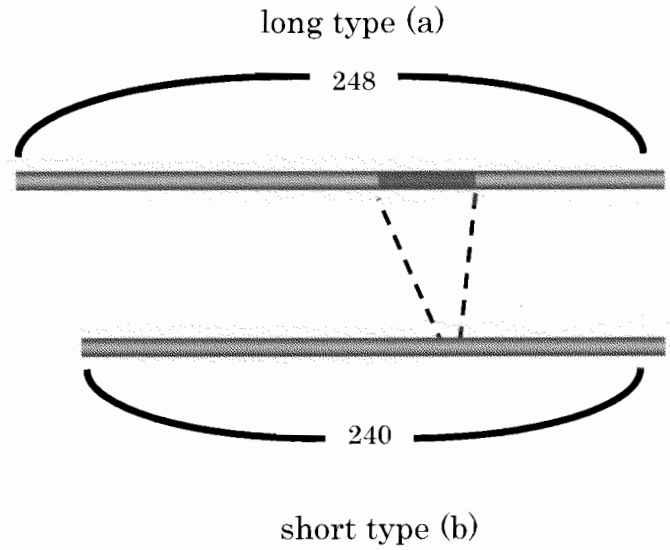
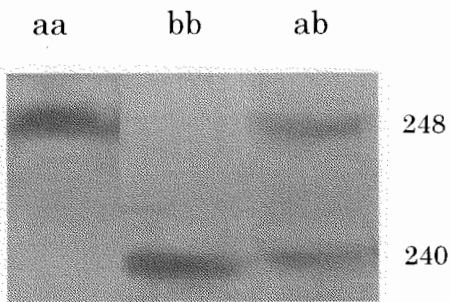
マーカー	Forward primer (5'→3') Reverse primer (5'→3')	アニーリング温度	PCR産物の サイズ(bp)	変異 検出法*
AF74	TTTTATAGAGTGTGTTGGATTCATGG TCCTCCCCACAGTAGATATAATGG	65	566/569	deletion (3bp) PCR
AF7	TTGTCTAGTTATCTGTTGCTAAGACGG ATTTGTGACTTCCTGGACCTATATGGC	60	611	Taq I site mutation (C→T) PCR-RFLP (制限酵素 Taq I)
AF188	GGACATGGGGTATCGTTTTTTGGTGGC AAGGAAACTGGGTAGAGAATACAAAGG	67	240/248	insertion (8bp) PCR
AF156	TAATAAAGTGAACATCAATGACAGTGG ATTTTCATCATCTCGTAGAAGTACCCC	57	307/315	deletion (8bp) PCR
AF18	CCTGTGGGTATGGAAGTGAGAGAATGG CAGGCAGTAGTCCATAGGGTCAGAGTC	65	499/503	deletion (4bp) PCR
AF120	AATGCTGTTCCCTATGTCCACACAAGCC CAATCTTTGGGGACGGAGTTAGAAGCC	63	254	Taq I site mutation (G→C) ミスマッチ PCR-RFLP (制限酵素 Taq I)
AF110	TATTTTCTTCACTGTTGACTAGGAGGC AACATCTGGATTGCTGACATTGTAAGG	60	859	AFLP 3slc site mutation (G→C) PCR-RFLP (制限酵素 Hinf I)
AF8	GAGGAAAGGAAGTCTTGAGGTATGGG GAATTTACTGATGGCTTGGATCTGGGG	63	377	Taq I site mutation (C→T) PCR-RFLP (制限酵素 Taq I)

* PCRは全て30サイクルで行った。PCRの場合は5%ポリアクリルアミドゲル、PCR-RFLPの場合は2%アガロースゲルでそれぞれ適時電気泳動して、検出した。

AF74 (deletion)



AF7 (deletion)



AF188 (mutation at *Taq*I site)

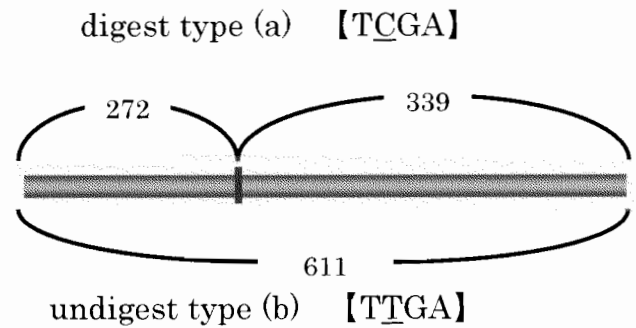
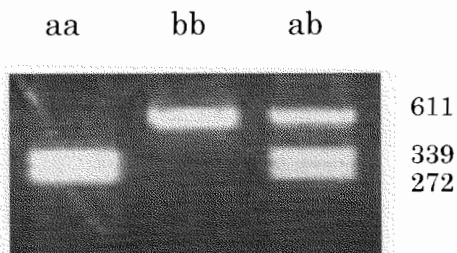
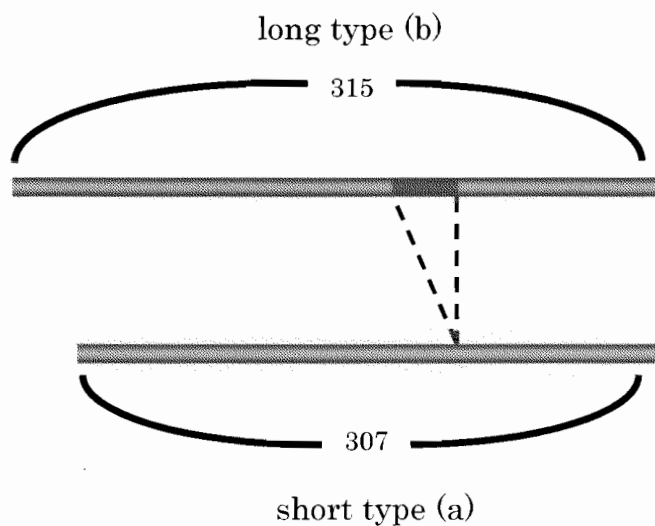
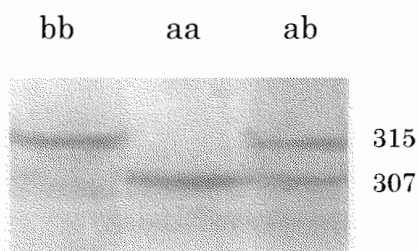
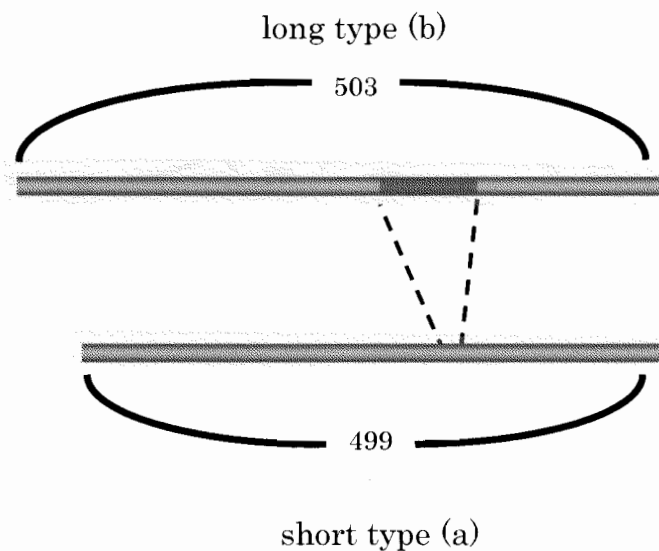
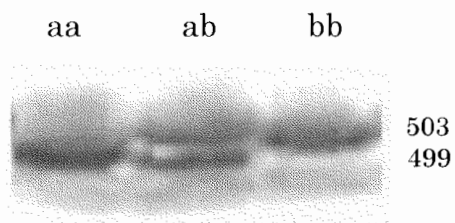


図3-1 SNPs検出結果

AF156 (deletion)



AF18 (deletion)



AF120 (mutation at *Taq* I site)

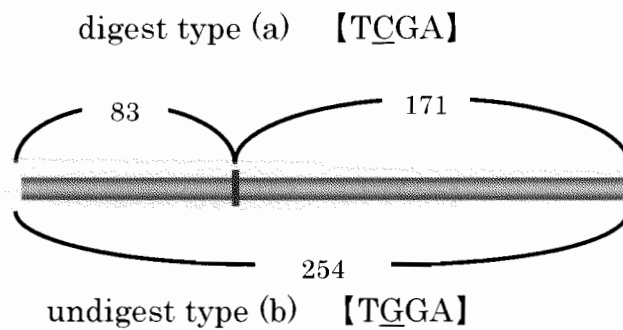
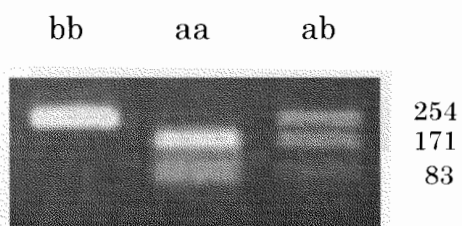
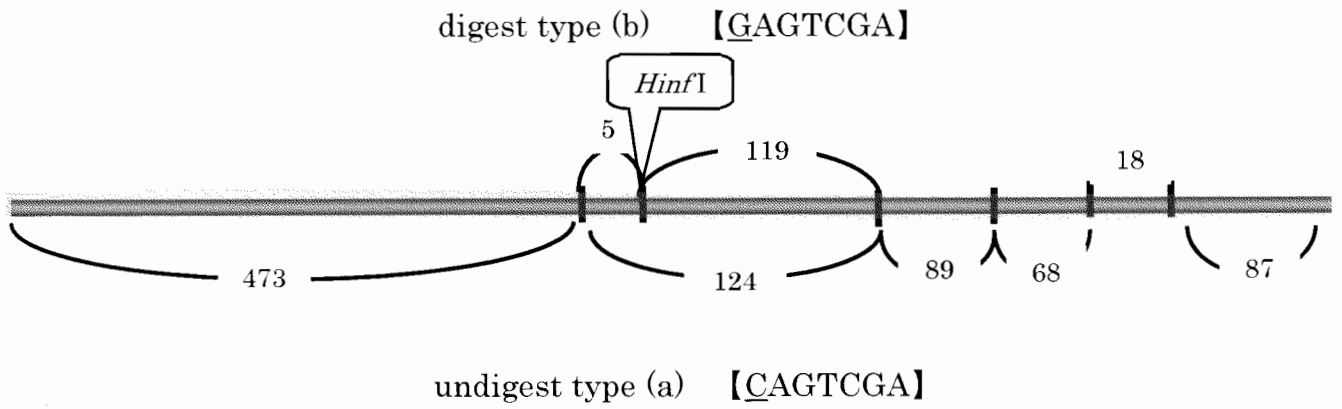
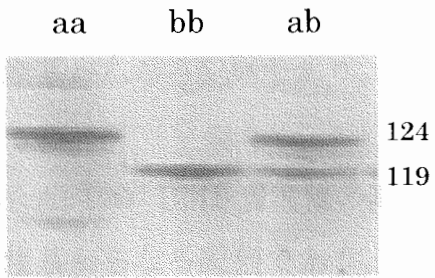


図3-2 SNPs検出結果

AF110 (deletion)



AF8 (mutation at *Taq* I site)

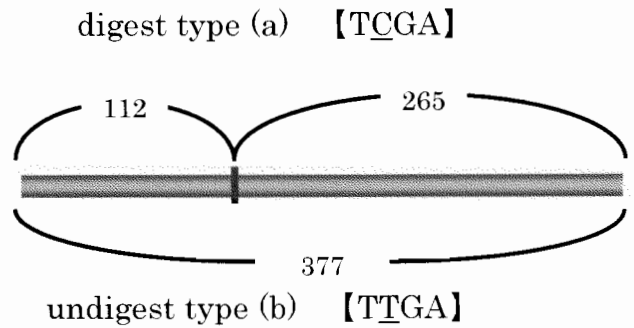
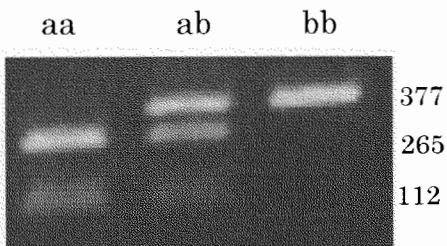


図3-3 SNPs検出結果

性を示し、ウシの TTN 遺伝子の一部であることが示唆された。

AF18: BMS 育種価の低いグループで高頻度に検出された AFLP 断片で 325 塩基からなる配列であり、このマーカーの多型の原因は 4 塩基の deletion であった。

AF120: BMS 育種価の高いグループで高頻度に検出された AFLP 断片で 328 塩基からなる配列であり、このマーカーの多型の原因は、断片内の配列において(TGGA)から *Taq* I の制限酵素認識配列の(TCGA)に点突然変異した部位が存在した。

AF110: BMS 育種価の低いグループで高頻度に検出された AFLP 断片で 409 塩基からなる配列であり、このマーカーの多型の原因は、*Taq* I 側の 3 セレクティブの配列において(CTG)から(CTC)へ点突然変異していることであった。この配列は相同検索の結果、既知の遺伝子との相同性はなかったが、62 塩基から 379 塩基までがウシ SINE(short interspersed nuclear element)配列(全 560 塩基)と 93%の相同性があったため、この断片は SINE 配列をもつことが示された。また、遺伝子型判定においては、変異個所が制限酵素 *Hinf* I (GANTC) の認識部位をであったため、*Hinf* I を用いて PCR-RFLP を行った。

AF8 は BMS 育種価の高いグループで高頻度に検出された AFLP 断片で 132 塩基からなる配列であり、このマーカーの多型の原因は *Taq* I の制限酵素認識部位において (TCGA) から (TTGA) への点突然変異したものであった。

第4節 考察

ウシ経済形質の多くは QTL と呼ばれる複数の遺伝子座に支配されていると考えられている。本研究では、枝肉形質の中でも黒毛和種において特に経済的価値の高い BMS に注目し、QTL に連鎖している DNA マーカーの同定を試みた。本研究では AFLP 法を用いて黒毛和種の高 BMS 育種価グループと低 BMS 育種価グループのバンドパターンの比較を行い、セレクトティブ・ジェノタイピングにより DNA マーカーを選抜するという方法をとった。QTL に関する研究において、従来は家系を用いた QTL マッピングという方法で染色体上の領域を限定し、遺伝子を同定するという方法が取られてきた (Taylor, 1998)。しかし、ウシ家系の利用が困難である状況では、セレクトティブ・ジェノタイピングによりマイクロサテライトなどの QTL に連鎖した DNA マーカーを同定する方法も報告されている (Ayoub ら, 2002)。Ayoub ら (2002) によると、セレクトティブ・ジェノタイピングにより QTL に連鎖したマーカーの検出は慣習的な QTL マッピングと比べ、3 割以下の労力で QTL の検出を行うことができる」と述べられている。また、AFLP マーカーを利用したセレクトティブ・ジェノタイピングも、ブタにおいて同様の報告がある (Wimmers ら, 2002)。

本研究の結果、QTL に連鎖していると考えられる 16 個の AFLP バンドを検出し、正準判別法を用いて各マーカーに重み付けすることで、予測育種価を正確に反映した分類を行うことが出来た。また、実際に個体の遺伝的能力の評価を行う際の効率を考え、そのうち貢献度の高いと考えられる 8 個のマーカーを選定し、遺伝子型判定をより迅速に行うため SNPs マーカーへの転化を行った。これらのマーカーは、これまでの統計遺伝学的手法を用いた育種価評価による選抜を補完する意味で重要な、DNA マーカーによる選抜 (MAS, Marker-assisted selection) の可能性を示している。

MAS は従来の選抜法ではカバーし難い面においてその有用性を示す。本研究で云えば、血統情報の利用できない個体、育種価の判明していない個体につ

いて DNA 総合遺伝子型値より育種価を推定することが可能であり、育種価では記録を持たない場合、同等の評価が与えられる全きょうだいでも個別の能力評価が可能となる。また、従来の種雄牛の代表的検定法である、後代検定による種雄牛の遺伝的能力の評価と比較しても、費用や時間の短縮の面でも有効に利用できると考えられる。さらに、枝肉形質以外にも例えば性に限定して発現する泌乳形質に MAS を当てはめると、表現型値は雌でしか測定されないが、DNA マーカーでは性に限定せずに情報を得ることができ、選抜の効率を高めることができる。本研究のように経済形質と関連するアソシエーションスタディを行い、MAS を行うことは育種価評価のような明確な選抜法が採用されていない家畜などで特に有効であると考えられる。このように、MAS の利点は多く考えられ、今後の家畜育種でその効果を発揮することが期待される。

第5章 総括

分子生物学を基礎としたゲノム科学の発展により、ヒトの医療ばかりでなく、家畜の生産性の向上においても新たな道が切り開かれるものと期待される。ヒトでは全ゲノム塩基配列が決定されるなど、その基盤が整備され、医療現場での応用への出口が見え始めている。これに対して、家畜では、基盤整備が遅れ、ヒトで使える手法を家畜に直ちに利用することは出来ない。しかしながら数あるゲノム分析の手法の中には、ゲノム配列などの基礎的情報を必ずしも必要としない方法もある。本研究では、そのうちの代表的な方法である、AFLP法を用いゲノムワイドに得られる点突然変異 (SNPs) 情報を駆使して、牛の育種戦略に貢献する DNA 情報を得ようと試みた。

AFLP 法は 1995 年、オランダの Vos らにより開発された多型検出法である。この方法は、DNA を制限酵素で切断した断片に特定のアダプターを付加し、これら多くの鋳型 DNA から、3'末端に任意の塩基を付加したプライマーを用いることにより、選択的な DNA 断片を増幅するものである。このため以下のような利点をもっている。(1) 必要とするゲノム DNA の量が少なくすむ。500ng の DNA で理論的には 1 万回の電気泳動が可能である。(2) ゲノム DNA の塩基配列に関する情報が必要でない。(3) 操作が簡便で、再現性が高い。(4) 一回の電気泳動で多くの多型を一度に検出できる。(5) プライマーのセットを変えることにより、ほぼ無限のバンドを検出できる。3 つの選択的塩基を用いることにより、同じ鋳型 DNA に対して $4^6=4096$ のプライマーセットが使用できる。この方法は、最初は植物の研究に対して用いられ、連鎖解析や遺伝的類縁関係の推定などに利用されてきた。また、ここ数年では動物に対しても適用されてきており、その価値が認められている。

本研究では、この AFLP 法をウシに適用し、膨大な DNA 多型情報を得ることで、遺伝子の多型情報を取り込んだ新たな家畜育種法の構築を試みた。

まず第 2 章では、国内外の肉用牛 5 品種において AFLP 法を適用し、品種間における遺伝的類縁関係の推定を行うことで、本法の有用性を確認した。ここでは 4 種類のプライマーセットを用い、95 本の多型バンドを検出できた。すなわち一つのプライマーセットあたり約 24 遺伝子座における DNA 遺伝情報を得ることが出来た。また、その情報を基にして推定された品種間の類縁関係は歴史的な品種成立背景とほぼ一致した。すなわち本法から得られる多型情報はウシにおいてもその遺伝的類縁関係を検討するための簡便で有効な方法であることが確認された。

そこで第 3 章では、プライマーセットの種類を変えることにより、ゲノム中の膨大な遺伝子座をスクリーニングできるという利点を生かし、現在国内の食肉市場において問題になっている偽装販売の問題に取り組んだ。ウシ品種間で特異的な DNA 断片を検索することで、DNA マーカーによる品種鑑定技術の開発を試みた。本研究では 1000 種類以上のプライマーセットを用いて、およそ 10 万遺伝子座にもものぼるゲノム領域をスクリーニングし、ホルスタイン種に特異的変異の検出を試みた。その結果、品種間に完全に特異的である変異は同定できなかったが、頻度に著しく差のある多型を数種類同定することに成功し、それらを組み合わせて用いることで、高い精度で鑑定できる DNA マーカーを開発することができた。

次に第 4 章では、我国固有の肉用牛である黒毛和種における育種価評価における選抜の問題に取り組んだ。分子生物学の発展によって、家畜においても DNA マーカーを用いて特定形質の遺伝的能力の優れた個体を選抜する MAS が行われるようになってきた。本研究においても、黒毛和種において特に重要とされる脂肪交雑に焦点を充て、AFLP 法を用いて QTL に連鎖していると考えられるマーカーの同定を試みた。結果、約 400 種類のプライマーセットを用いて、およそ 3 万 6 千遺伝子座におよぶゲノム領域をスクリーニングし、16 個のマーカーを得た。これらのマーカーにより脂肪交雑における個体の遺伝的能力の推定を行ったところ、予測育種価と高い相関を示した。予測育種価は BMS

真の育種価と非常に高い相関があることから、これらの DNA マーカーでの個体評価が可能であると考えられる。

以上のように、家畜育種において貢献できると期待できる DNA 情報を得ることが出来、AFLP 法は非常に有効な手段であることが示された。2004 年 10 月、ウシ全ゲノム配列の解読終了が報告された。今後、塩基配列の情報が利用できるようになれば、本研究によって同定された DNA マーカーにおいても、染色体上での位置や、連鎖している QTL の詳細について明らかになると考えられる。

謝 辞

本研究課題を与えられ、御指導を賜った神戸大学農学部教授、辻 莊一博士に深甚なる感謝の意を表す。また、本論文の審査を頂いた、神戸大学農学部教授、向井 文雄博士および岡山高秀教授、実験方法の確立、統計学的解析にあたって、御助言を賜った、神戸大学農学部助教授、万年 英之博士、同助手、大山 憲二博士、同自然科学研究科助手、庄條 昌之博士に謹んで感謝の意を表す。

最後に、本研究の遂行にあたり、多大なる激励および協力を頂いた、神戸大学農学部応用遺伝学講座の大学院生ならびに専攻生各位に感謝致します。

参考文献

- Ajmone-Marsan P., Negrini R., Milanese E., Bozzi R., Nijiman I.J., Buntjer J.B., Valentini A. & Lenstra J.A. (2002) Genetic distances within and across cattle breeds as indicated by biallelic AFLP marker. *Animal Genetics* 33, 280-6.
- Ajmone-Marsan P., Valentini A., Cassandro M., vecchiotti-Antaldi G., Bertoni G. & Kuiper M. (1997) AFLP markers for DNA fingerprinting in cattle. *Animal Genetics* 28, 418-26.
- Alves E., Castellanos C., Ovilo C., Silio L. & Rodriguez C. (2001) Differentiation of the raw material of the Iberian pig meat industry based on the use of amplified fragment length polymorphism. *Meat Science* 61, 157-62.
- Ayoub M. & Mather D.E. (2002). Effectiveness of selective genotyping for detection of quantitative trait loci: an analysis of grain and malt quality traits in three barley populations. *Genome* 45, 1116-24.
- Bachem C.W., van der Hoeven R.S., de Bruijn S.M., Vreugdenhil D., Zabeau M. & Visser R.G. (1996) Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant Journal* 9(5), 745-53.
- Barendse W., Armitage S.M., Kossarek L.M., Shalom A., Kirkpatrick B.W., Ryan A.M., Clayton D., Li L., Neiberghs H.L., Zhang N., Grosse W.M., Weiss J., Creighton P., McCarthy F., Ron M., Teale A.J., Fries R., McGraw R.A. Moore S.S., Georges M., Soller M., Womack J.E. & Hetzel D.J.S. (1994) A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genetics* 136, 619-39.
- Barcaccia G., Varotto S., Meneghetti S., Albertini E., Porceddu A., Parrini P. & Lucchim M. (2001) Analysis of gene expression during flowering in apomeiotic mutants of *Medicago* spp.: cloning of ESTs and candidate genes for 2n eggs. *Sex Plant Reproduction* 14, 233-8.
- Becker J., Vos P., Kuiper M., Salamini F. & Heun M. (1995) Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Molecular and General Genetics* 249, 65-73.
- Chomczynski P. & Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by

- acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 162, 156-9.
- Eck H.J., Voort J.R. & Draaistra J. (1995) The inheritance and chromosomal location of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Molecular Breeding* 1, 397-410.
- Devic M., Albert S., Delseny M. & Roscoe J.T. (1997) Efficient PCR walking on plant genomic DNA. *Plant Physiology and Biochemistry* 35(4), 331-9.
- 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, 60-9.
- Henderson C.R. (1973) Sire evaluation and genetic trends. 'Proceeding of the animal breeding and genetics symposium in honor of Dr. Jay L. Lush.' pp10-41. ASAS and ADSA, Illinois.
- Hing A.V., Helms C. & Donis-Keller H. (1993). VNTR and microsatellite polymorphisms within the subtelomeric region of 7q. *American Journal of Human Genetics* 53, 509-17.
- 加茂 儀一 (1976) 食肉・乳酪編. 日本畜産史, 80-3, 344-6.
- Knorr C., Cheng H.H. & Dodgson J.B. (1999) Application of AFLP markers to genome mapping in poultry. *Animal Genetics* 30, 28-35.
- Kumar S., Tamura K. & Nei M. (1993) MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version 1.01. The Pennsylvania State University, University Park.
- Lander E.S. & Botstein D. (1989) Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121, 185-99.
- Lander E.S. & Schork N.J. (1994). Genetic dissection of complex traits. *Science* 30, 2037-48.
- Lee E.J., Yoshizawa K., Mannen H., Kikuchi H., Mizutani M. & Tsuji S. (2002) Localization of the muscular dystrophy AM locus using a chicken linkage map constructed with the Kobe University resource family. *Animal Genetics* 33, 42-8.
- Lin L., Jin L., Lin X., Voros A., Underhill P. & Mignot E. (1998) Microsatellite single nucleotide polymorphisms in the HLA-DQ region. *Tissue Antigens* 52, 9-18
- 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.
- Moreno Y., Ferrus A. M., Vanoostende A., Hernandez Montes M.R. & Hernandez J. (2002) Comparison of 23S polymerase chain reaction-

restriction fragment length polymorphism techniques as typing systems for thermophilic campylobacters. *FEMS Microbiology Letters* 211, 97-103.

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, 254-64.

向井 文雄 (1994). 黒毛和種の産肉形質の選抜法ならびに遺伝的評価に関する研究. 日本畜産学会報 65, 890-905.

並河 澄 (1972). 産肉生理学から見た但馬牛の特色. 兵庫の和牛, 29-46.

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, 265-73.

Nomura T., Honda T. & Mukai F. (2001). Inbreeding and effective population size of Japanese Black cattle. *Journal of Animal Science* 79, 366-70.

Osten M., den Bieman M. & Kuiper M.T.R. (1996) Use of AFLP markers for gene mapping and QTL detection in the rat. *Genomics* 37, 289-94

Ovilo C., Cervera M.T., Castellanos C. & Martinez-Zapater J.M. (2000) Characterisation of Iberian pig genotypes using AFLP markers. *Animal Genetics* 31, 117-22.

大山憲二 (1997). 育種価評価に基づく黒毛和種集団の遺伝的改良に関する研究. 神戸大学大学院博士学位論文.

Sentinelli F., Romeo S., Arca M., Filippi E., Leonetti F., Banchieri M., Di Mario U. & Baroni M.G. (2002). Human resistin gene, obesity, and type 2 diabetes: mutation analysis and population study. *Diabetes* 51, 860-2.

Sokal R.R. & Michener C.D. (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. University of Kansas Science Bill. 28, 1409-38.

Taylor J.F, Coutinho L.L., Herring K.L., Gallagher D.S. Jr., Brenneman R.A., Burney N., Sanders J.O., Turner J.W., Smith S.B., Miller R.K., Savell J.W. & Davis S.K. (1998) Candidate gene analysis of GH1 for effects on growth and carcass composition of cattle. *Animal genetics* 29, 194-201.

Tsuji S., Mannen H., Mukai F., Shojo M., Oyama K., Kojima T., Kano C.,

- Kinoshita Y. & Yamaguchi E. (2004) Trace of native cattle in Japanese Holstein assessed by mitochondrial DNA sequence polymorphism. *Journal of Dairy Science* 87, 3071-5.
- Vos P., Hogers R. & Bleeker M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research* 21, 4407-14.
- Wimmers K., Murani E., Ponsuksili S., Yerle M. & Schellander K. (2002) Detection of quantitative trait loci for carcass traits in the pig by using AFLP. *Mammalian Genome* 13, 206-10.