



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。



【 310 】

氏 名・(本 籍)	笹崎 晋史	(大阪府)
博士の専攻分野の名称	博士(農学)	
学 位 記 番 号	博い第92号	
学位授与の 要 件	学位規則第5条第1項該当	
学位授与の 日 付	平成17年3月25日	

【 学位論文題目 】

AFLP法によるゲノムスキニングと牛の育種

審 査 委 員

主 査	教 授	辻 壯一
	教 授	向井 文雄
	教 授	岡山 高秀

近年の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。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 法、DNA フィンガープリント法、及び VNTR 分析法などである。近年、新しい DNA 多型解析の方法の一つとして AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 法が注目されている。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り、ゲノム全体を対象として一度に多くの多型を検出できる有力な方法である。申請者は本法をウシに対して適用し、DNA 多型情報に基づいた、新たな育種戦略の構築を目的とした研究を行った。

(第 2 章) AFLP マーカーを用いた肉用牛 5 品種の系統分析

我が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、ヨーロッパの肉用品種であるヘレフォードとリムジン合計 5 肉用品種を供試動物として用い、AFLP 法を適用した。4 種類のプライマーセットを用いたところ、合計 95 本の多型バンドを得た。これらの多型バンドから 2 個体間の類似性を示す band sharing 値を求め、品種間の遺伝的類似性の指標とした。この値から UPGMA 法を用いて系統樹を作成したところ、この系統樹はアジアの家畜牛である黒毛和種、高知の褐毛和種および韓牛のクラスターと、ヨーロッパ牛であるリムジンとヘレフォードのクラスターに大きく分類され、遺伝的背景を反映する結果が得られた。本研究の結果より AFLP 法はウシにおいても品種間の遺伝的類似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ることが示唆された。

(第 3 章) DNA マーカーによるウシ品種鑑定技術の確立

次に、AFLP 法から得られる DNA 情報をもとにした、ウシ品種鑑定のマーカー開発を試みた。ここ数年來、牛肉の不当表示など食肉に関わる社会的問題が生じている。その一つに、黒毛和種の雄牛とホルスタイン種の雌牛を交配した F1 の牛肉が、黒毛和種高級牛肉に偽称販売されている可能性がある。これは、F1 は毛色を見た限りでは黒毛和種と見分けがつきにくく、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、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) の構築が重要である。このことは、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ことである。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ている。ここでは、AFLP 法を黒毛和種とホルスタイン種に識別に適用し、品種鑑別の手段としての可能性を検討した。上記の 2 品種間で著しく頻度の異なるマーカーをいくつか検出し、その塩基置換を同定した。また、加工牛肉を簡便に判定する SNPs マーカーを開発した。1000 種類以上のプライマーの組み合わせにより AFLP 法を行い、6 つの有効なマーカーを検出した。これらのマーカーにおいて、各品種の遺伝子頻度から推定すると、黒毛和種と F1 を識別できる確率は 91.68% であり、その信頼度は 99.34% であった。すなわち、AFLP 法により検出された多型情報を用いて、ウシ品種鑑定のための DNA マーカーが開発された。本研究で開発されたマーカーを用いて、農林水産省は牛肉の偽装表示を防止するため、和牛かどうかを調べる DNA 鑑定を 2004 年 3 月から導入している。

(第 4 章) AFLP マーカーを用いた黒毛和種の選抜

次に、DNA レベルでの産肉能力の評価法の開発に取り組んだ。本研究では、枝肉形質の中でも BMS (脂肪交雑) について注目した。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、BMS の QTL に連鎖した DNA マーカーの検出を試みた。高 BMS 育種価の個体 25 頭と低 BMS 育種価の個体 23 頭を用い、391 組のプライマーで多型解析を行った。その結果、グループ間における偏りを χ^2 検定で評価したところ、16 個の BMS の QTL に連鎖していると考えられるバンドをクローニングした。これらのマーカーを用い、育種価を正しく反映した結果が得られるかについて分析を行った。121 頭の個体において、正準判別法を用い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試みた。その結果、相関係数が 0.70 と高い相関が見られた。以上のことから、16 個のマーカーは BMS に関する遺伝的能力を評価するのに有用であることが示唆された。また、これら 16 個のマーカーのうち、特に強く QTL に影響していると考えられる 8 個のマーカーを選出し、SNPs マーカーの開発を行った。これらの DNA マーカーは、個体の遺伝的能力の推定に利用することが出来、育種価の判明していない個体においても選抜が可能であることが示唆された。

氏名	笹崎 晋史		
論文 題目	AFLP 法を利用した新たなウシ育種戦略の構築		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	辻 莊一
	副査	教授	向井 文雄
	副査	教授	岡山 高秀
	副査		
			印
			印
要 旨			
<p>概要</p> <p>近年の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。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 法、DNA フィンガープリント法、及び VNTR 分析法などである。近年、新しい DNA 多型解析の方法の一つとして AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 法が注目されている。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り、ゲノム全体を対象として一度に多くの多型を検出できる有力な方法である。申請者は本法をウシに対して適用し、DNA 多型情報に基づいた、新たな育種戦略の構築を目的とした研究を行った。</p> <p>(第 2 章) AFLP マーカーを用いた肉用牛 5 品種の系統分析</p> <p>我が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 肉用品種を供試動物として用い、AFLP 法を適用した。4 種類のプライマーセットを用いたところ、合計 95 本の多型バンドを得た。これらの多型バンドから 2 個体間の類似性を示す band sharing 値を求め、品種間の遺伝的類似性の指標とした。この値から UPGMA 法を用いて系統樹を作成したところ、この系統樹はアジアの家畜牛である黒毛和種、高知の褐毛和種および韓牛のクラスターと、ヨーロッパ牛であるリムジンとヘレフォードのクラスターに大きく分類され、遺伝的背景を反映する結果が得られた。本研究の結果より AFLP 法はウシ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ることが示された。</p> <p>(第 3 章) DNA マーカーによるウシ品種鑑定技術の確立</p> <p>次に、AFLP 法から得られる DNA 情報をもとにした、ウシ品種鑑定のマーカー開発を試みた。ここ数年来、牛肉の不当表示など食肉に関わる社会的問題が生じている。その一つに、黒毛和種の雄牛とホルスタイン種の雌牛を交配した F1 の牛肉が、黒毛和種高級牛肉に偽称され販売されている問題がある。これは、F1 は毛色を見た限りでは黒毛和種と見分けがつきにくく、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、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</p>			

氏名 笹崎 晋史

ティ)の構築が重要である。このことは、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ことである。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ている。ここでは、AFLP 法を黒毛和種とホルスタイン種に識別に適用し、品種鑑別の手段としての可能性を検討した。上記の 2 品種間で著しく頻度の異なるマーカーをいくつか検出し、その塩基置換を同定した。また、加工牛肉を簡便に判定する SNPs マーカーを開発した。1000 種類以上のプライマーの組み合わせにより AFLP 法を行い、6 つの有効なマーカーを検出した。これらのマーカーにおいて、各品種の遺伝子頻度から推定すると、黒毛和種と F1 を識別できる確率は 91.68% であり、その信頼度は 99.34% であった。すなわち、AFLP 法により検出された多型情報を用いて、ウシ品種鑑定のための DNA マーカーが開発された。本研究で開発されたマーカーを用いて、農林水産省は牛肉の偽装表示を防止するため、和牛かどうかを調べる DNA 鑑定を 2004 年 3 月から導入している。

(第 4 章) AFLP マーカーを用いた黒毛和種の選抜

次に、DNA レベルでの産肉能力の評価法の開発に取り組んだ。本研究では、枝肉形質の中でも BMS (脂肪交雑) について注目した。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、BMS の QTL に連鎖した DNA マーカーの検出を試みた。高 BMS 育種価の個体 25 頭と低 BMS 育種価の個体 23 頭を用い、391 組のプライマーで多型解析を行った。その結果、グループ間における偏りを χ^2 検定で評価したところ、16 個の BMS の QTL に連鎖していると考えられるバンドをクローニングした。これらのマーカーを用い、育種価を正しく反映した結果が得られるかについて分析を行った。121 頭の個体において、正準判別法を用い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試みた。その結果、相関係数が 0.70 と高い相関が見られた。以上のことから、16 個のマーカーは BMS に関する遺伝的能力を評価するのに有用であることが示唆された。また、これら 16 個のマーカーのうち、特に強く QTL に影響していると考えられる 8 個のマーカーを選出し、SNPs マーカーの開発を行った。これらの DNA マーカーは、個体の遺伝的能力の推定に利用することが出来、育種価の判明していない個体においても選抜が可能であることが示唆された。

以上、本研究は目的に合致する SNPs を AFLP 法により見出す方法を活用して、幾つかの課題に取り組み顕著な成果をあげた。1) 先ず、この方法によってウシ品種の類縁関係を明らかにできることを示した。2) 次いで、黒毛和種とホルスタイン種およびその雑種の DNA 分析による識別を可能にした。その結果、牛肉の偽証問題解決の手段を提供し、社会的に大きな反響を得た。3) さらに、この方法を用いて、優秀な繁殖牛が選抜できることを示し、これまでのマーカーアシスト選抜に代わる新たな牛の育種選抜の可能性を提示した。ここで示された幾つかの成果はこの分野の発展の礎となる貴重な知見をまとめたもので、学位論文として価値ある集積と認める。よって、学位申請者の笹崎晋史は、博士 (農学) の学位を得る資格があると認める。