

黒毛和種牛 GH 遺伝子多型の生産性への影響

加藤 和雄*

東北大学大学院農学研究科
宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1 〒 981-8555

TEL&FAX022-717-8636, kato@bios.tohoku.ac.jp

Effects of GH single nucleotide polymorphism (GH SNP) on meat production in Japanese Black cattle

Kazuo KATOH

Graduate School of Agriculture, Tohoku University
1-1 Tsutsumidori, Amamiyamachi, Aoba-ku, Sendai, Miyagi

Keyword: Japanese Black cattle, single nucleotide polymorphism, GH Meat production, meat quality

2015 年 11 月 10 日受付, 2016 年 1 月 16 日受理

はじめに

黒毛和種牛は伝統的に 2 系統に分類されると言われてきた。すなわち、体格の大きい「増体系」と体格は小さいが脂質蓄積に優れた「資質系」である。この分類は飼育経験に基づいた分類ではあるものの、“体格の違いと密接に関連した脂質蓄積の違い”を強調しており、成長ホルモン (GH) の関与を強く示唆している。なぜなら、下垂体前葉ホルモンである GH は成長促進効果と脂質蓄積調節効果を併せ持つからである。前者の成長促進効果は GH あるいは栄養素刺激による肝臓での IGF-I の生合成と分泌促進によることは数多くの証拠と報告がある。後者の脂質蓄積調節効果に関しては、主に脂質分解作用であり、in vivo でも vitro の両研究法でも明示されている

(加藤、2006)。

人類は必要とする畜産生産物をより効果的に生産するために、長期にわたって牛の品種改良に努力してきた。当然ながら、これまでの牛の選抜過程は、GH 分泌様式や作用の違いなどの生理学的背景の詳細を知らずに進められてきたにも関わらず、結果的には科学的背景に合致した選抜であった。すなわち、たとえば肉用種牛である黒毛和種牛や短角種牛の GH 分泌は、泌乳能力のより大きい方に選抜されたホルスタイン種より小さく、GHRH 刺激に対する反応性も劣る。逆に、泌乳牛は泌乳時には GH 分泌が顕著に増大し、GH 刺激に対する泌乳促進効果が大きく、脂質分解も活発で、遊離した脂肪酸を泌乳のためのエネルギー源として利用することに長けている (小松、2005)。

一方、黒毛和種牛の牛肉の商品的価値は、筋肉内の脂質蓄積割合にかなり依存している。極論すれば、我が国における牛肉の価値は、GH 以外に、脂質蓄積や脂肪酸合成に関わる主要な 2 つの因子 (Stearoyl-CoA

* 連絡者：加藤 和雄 (かとう かずお)
(東北大学大学院農学研究科)
〒 981-8555 宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1
Tel & Fax 022-717-8636
E-mail: kato@bios.tohoku.ac.jp

desaturase: SCD と Fatty acid synthase: FASN) に依存しているといっても過言ではない (Matsuhashi et al., 2011)。なぜなら、SCD (第6染色体上) はオレイン酸をはじめとする不飽和脂肪酸の生産を、FASN (第19染色体上) は脂肪酸の生合成を、それぞれ調節する酵素だからである。しかし、脂肪代謝に関連する因子には、これらの他に、インスリン、副腎ホルモンおよび甲状腺ホルモンなども深く関与するが詳細な関与機構は不明なままである。また、これらの因子の一塩基多型 (SNP) の重要性や産肉性への関与は、産肉性や脂肪酸組成に関する過去からの膨大なデータを統計的に解析した結果得られた成果であり、それらの解析結果に基づいた選抜や改良の結果、現在の黒毛和種牛が確立されてきたのである。このプロセスは、分子生物学が応用される以前から行われてきたものであり、先人達の優れた先見性には感心させられる。

牛 GH と SNP の特徴

牛の GH 生成をコードする遺伝子は第19染色体上に存在する。GH 分子は、190 もしくは 191 個のアミノ酸残基からなる単純タンパク質である。この分子は4個のヘリックス構造を持ち、4番目のヘリックス構造が受容体との結合性に重要な役割を果たす。Chikuni らの研究 (1997) によって、黒毛和種牛の GH では、大きな影響力を示す SNP が2箇所あることが指摘されている。その箇所は、N 端から 127 番目と 172 番目のアミノ酸であり、それぞれ3番目と4番目のヘリックスに含まれる (図1, Bahrami et al., 2013)。これらの2カ所のアミノ酸置換 (変異) によって、合計3種類の GH 型 (A、B、C 型) に分類される (図2)。A 型および B 型は、127 番目のアミノ酸が Leu か Val (Leu127Val) (172 番目 Thr) であり、ヨーロッパ種で報告されており、127 番目のアミノ酸の SNP が泌乳量に影響するという報告が多い。ちなみに、ホル

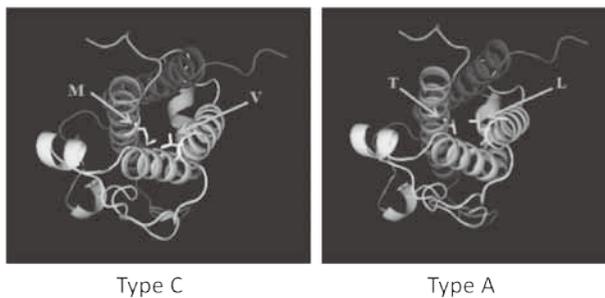


図1. 牛 GH 分子の三次構造 (左: C 型; 右: A 型)。それぞれの図中の左側 (M、T) は 172 番目のアミノ酸、右側 (V や L) は 127 番目のアミノ酸を示し、それぞれ第4および第3ヘリックスの中に存在する。

スタイン種牛では、B 型は僅かであり、大部分 A 型である。黒毛和種牛では、A および B 型以外に、C 型が認められる。C 型 (Leu127 Val; Thr172Met) は A 型とは2箇所のアミノ酸置換を示す。この型は黒毛和種牛に特異的であるとされている。

一方、黒毛和種牛と近縁であることが推測される韓牛ではまだ C 型を確認していないが、黒毛や虎模様の韓牛も存在することから C 型 SNP の存在は否定できない。しかし、韓牛の筋肉内脂肪蓄積程度が黒毛和種牛より低いことから、C 型動物がいたとしても僅かであることは想像できる。また、FASN や SCD の選抜も進んでいない可能性がある。

一方、GH 受容体にも SNP が存在するが、泌乳量に関する影響はあまり明確ではなく、ましてや産肉性への影響に関しては不明である。

本小論では、発表者らが1990年以降研究してきた反芻動物の GH 分泌調節機構に関する成果を基に、「黒毛和種牛の産肉性や脂肪酸組成に GH 遺伝子の SNP が影響する」という仮説を設定し、その仮説の真偽を代謝・内分泌的背景から探索してきた。その成果を紹介する。

実験方法

解析に用いたサンプルは、宮城 (n=851)、山形 (n=183)、広島 (n=175)、沖縄県 (n=391) の黒毛和種牛から得たものであり、動物の血液サンプルや胸最長筋のスミアから DNA や脂肪酸を抽出して解析した。GH の SNP 解析は、千国らの ASM-PCR 法 (Chikuni et al., 1997) や DNA の直接解析法で行った。一方、岐阜、兵庫、岡山、鳥取、島根、広島県のデータは、出版されたデータ (Oka et al., 2002, 2007; Matsuhashi et al., 2011) を用いた。

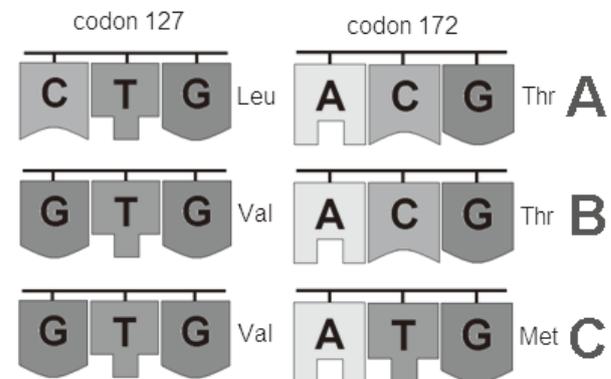


図2. 牛 GH-SNP の分類 (N 端 127 番目と 172 番目のアミノ酸置換)。いずれの型も日本黒毛和種牛で認められるが、C 型はこの品種のみに特異的に認められる。

GHRH (0.4 $\mu\text{g}/\text{kg BW}$) 刺激時の GH 分泌量測定実験は、広島県畜産試験場および沖縄県の協力牧場で実施した。実施月例は 10 ~ 11 ヶ月齢時である。

mRNA の解析に用いたサンプルは、山形県畜産試験場から譲渡して頂いた横隔膜から抽出して供試した。

脂肪細胞は、あらかじめ SNP を解析しておいた沖縄県の協力牧場の雌牛の臀部から皮下脂肪組織を採取し、単離した後、初代培養実験に供試した。

統計の詳細は Ardiyanti et al.(2009a) に記載した。

結果と考察

(1) すべての県で採取した黒毛和種牛の GH の SNP には、A、B および C 型が存在した。A 型の割合が高い県は、宮城、山形、鳥取、岡山、広島、沖縄県であった。B 型の割合が高いのは、岐阜、兵庫県であった。C 型の割合が高いのは、兵庫、岡山、鳥根県であった。したがって、C 型の割合は但馬系の多い関西・中国地方で高いことが示された。

一方、ホルスタイン種牛や短角種牛では C 型の存在を確認しなかった。しかし、例数も少なく、短角種牛でも確認したことがあるとの指摘もある。

一般的に、但馬系の牛は体高が小さく筋肉内脂肪を多く蓄え、肥育期間が長く 40 ヶ月を超えることもあるが、脂肪を多く含む割には、嗜好性が良い。また、最近は多くの県が所有する種雄牛の大部分が対立遺伝子として C 型 SNP を持つ場合が多い。したがって、黒毛和種牛が脂質をより蓄えやすくなったのも、この特異的 SNP によるところが大きいかもしれない。

(2) 去勢雄の 10 ヶ月齢時体重を比較すると、AA 型が BB 型に比較して有意に大きかった (図 3 上)。逆に、BB 型の体重は、他の型に比較して有意に小さかった。しかし、この体重差には、性差が認められた。すなわち、去勢牛では成長速度が大きいので AA と BB 型の間でも十分に有意差が認められたが、雌牛では CC 型のみが他の型の動物より体重が小さかった (Katoh et al., 2008; Ardiyanti et al., 2009b)。屠体重で比較してもこの傾向は変わらないが、肥育期間が長くなるにつれて生体重の差が小さくなる傾向があった。

(3) GHRH 刺激時の GH 分泌量増大は、上記 (2) の体重差と平行していた。すなわち、体高の大きい AA 型の動物では GHRH 刺激時の GH 分泌増加が BB 型の動物より有意に大きかった (図 3 下)。しかし、基礎 GH 濃度を比較するとむしろ CC 型で大きくなる傾向があったが、

明確な差は得られていない。結果は示さないが、ホルスタイン種の基礎 GH 濃度や刺激時の分泌程度は、黒毛和種牛よりも有意に大きかった。

GH の作用と関連性が深い血中 IGF-I 濃度は、GH 分泌程度の大きさに比例していた。しかし、GH 分泌が大きければ生体重が大きいと限らない。すなわち、去勢牛の生体重は GHRH 刺激時の GH 分泌量の大きさに比例して増大したが、過剰な GH 分泌は体重に負の効果を示した (Katoh et al., 2008)。したがって、体重増加には GH 分泌反応が適度である必要性が示された (Ardiyanti et al., 2009b)。

(4) GH の SNP は筋肉内脂肪酸組成にも影響したが、これにも性差が認められた。すなわち、C 型動物の筋肉内オレイン酸割合や不飽和脂肪酸割合は、C 型以外のものより有意に大きかったが、その差は雌で顕著であり、去勢雄では明確な差が認められない場合があった。すなわち、GH の SNP は去勢牛よりも雌の牛肉のおいしさに影響するのかもしれない (Ardiyanti et al., 2009b)。

(5) SCD や FASN にもそれぞれ 2 種類の SNP が存在し、脂肪蓄積に有意な型が存在するが、地域間での差はあまり認められなかった。一方、これらの酵素や脂肪酸の炭

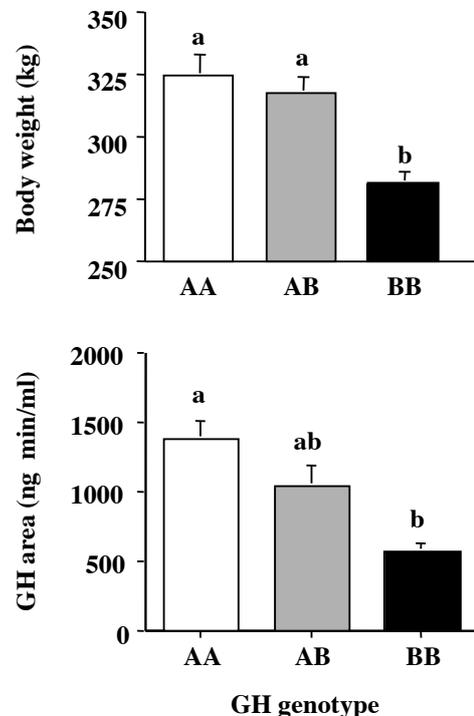


図 3. 10 ヶ月齢時黒毛和種牛(去勢雄)の GH・SNP と体重(上)および GHRH 刺激時の GH 分泌面積(下)との関係。
(上) SNP と体重との関係
(下) SNP と GHRH 刺激による血中 GH 分泌量との関係。
(Katoh et al., 2008)

素数を伸張する酵素 (ELOVL6) の mRNA 発現は、C型で高くなることが示された。また、SCD 遺伝子発現と酵素活性はほぼ平行し、C型動物では SCD の mRNA 発現と同様に酵素活性も高い (Ardiyanti et al., 2012)。これらの結果は、黒毛和種牛の C型遺伝子が筋肉内脂肪蓄積に優位であることと脂肪蓄積関連遺伝子選抜の方向性と一致することを示している。

(6) CC型脂肪細胞の初代培養に成功し、その特徴を検討した。その結果、脂肪蓄積と平行する核内転写因子である PPR- γ の発現は、CC型細胞で大きいものの、GH や イソプロテレノール刺激時の脂肪分解効果が AA型より弱い可能性が示唆された。この結果は、上記(4)や(5)の結果と一致するが、詳細な検討が必要である。

(7) A型とC型のGH分子の三次元構造解析から、C型のアミノ酸変異 (Thr172 Met) はGH受容体との結合部位をGH分子の深部へと移動させることによって、受容体との結合能を変化させる可能性のあることが示唆された (Bahrami et al., 2013)。しかし、この変異が実際に親和性を変化させているかどうかの検討は行われていない。

(8) GH 遺伝子上流のプロモーター部分の SNP も牛肉の生産性に影響することが示された (Sugita et al., 2014)。すなわち、この結果は、プロモーター領域の SNP が GH 生成速度に影響する可能性を示唆しており、GH 分子の質的变化のみならず分泌の量的変化も生産性に影響する可能性があり、複雑な GH 分泌調節 - 作用系の存在が示唆される。

結 論

以上の結果から、黒毛和種牛の GH の SNP (特に C型) が産肉性や筋肉内脂肪酸組成に影響すること、性差が認められること、黒毛の脂肪細胞の反応性の一部も変化している可能性があること、などが示された。

さらに、GH の SNP は少なくとも以下のような2経路で、量的および質的に牛肉生産に影響する可能性のあることが示された。

(1) 黒毛和種牛の GH 遺伝子の2カ所 (127 と 172 番目のアミノ酸をコードする塩基配列) の SNP は3種類 (A、B、C型) の GH 分子を生じさせる。その結果、C型 GH 分子の GH 受容体との結合性低下、GH による SCD 活性抑制効果の低減および FASN (および ELOVL6) 活性抑制効果の低減などの影響から、

C型動物では成長遅延、脂肪蓄積や不飽和脂肪酸割合の促進効果が生じ、優れた筋肉内不飽和脂肪酸蓄積結果となる。

(2) GH プロモーター部分の SNP は、GH 生産と分泌に影響することにより、GH の作用を量的に変化させる。

脂肪酸組成に影響する酵素である SCD や FASN 遺伝子を含めた貢献度は遺伝子レベルで20%程度と報告されている (Yokota et al., 2012)。GH の SNP も、上述のように肉量や脂肪酸組成に影響するが、その程度は SCD や FASN の SNP と同程度であると推察される。しかし、牛肉の旨味は脂肪酸 (の質や量) に依存するばかりではなく、種々の香気やアミノ酸・ペプチドおよび核酸などの旨味成分などが密接に関与する。今後はこの領域での研究の発達が望まれる。

謝 辞

この総説を作成するに当たり、統計解析や種々の知識の給与にご支援を頂いた東北大学大学院農学研究科家畜生産機能開発学講座の鈴木啓一教授に感謝いたします。また、大部分の結果は東北大学大学院農学研究科動物生理科学分野の Astrid Ardiyanti 博士や多くの院生の業績の一部であり、快く使用を許可していただいた盧尚建准教授および分野に深く感謝いたします。

引用文献

- Ardiyanti, A., Abe, F., Kobashikawa, H., Hirayama, T., Sugino, T., Suzuki, K. and Katoh, K. (2009b) Plasma hormone and metabolite concentrations involved in the somatotropic axis of Japanese Black heifers in association with growth hormone gene polymorphism. *Domestic Animal Endocrinology* 37: 243 – 249.
- Ardiyanti, A., Abe, T., Tameoka N., Kobayashi E., Shoji N., Ohtani Y., Suzuki K., Roh S.-G. and Katoh, K. (2012) Effects of growth hormone gene polymorphism on lipogenic genes expression levels in diaphragm tissues of Japanese Black heifers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 25:1055-1062.
- Ardiyanti, A., Oki, Y., Suda, Y., Suzuki, K., Chikuni, K., Obara, Y. and Katoh, K. (2009a) Effects of GH gene polymorphism and sex on carcass traits and fatty acid compositions in Japanese Black cattle. *Animal Science Journal* 80: 62-69.
- Bahrami, A., Ardiyanti, A., Tonosaki, K., Suzuki, K., Tanida,

- N., Hirayama, T., Roh, S.-G., Nishio, T. and Katoh, K. (2013) Haplotype C of *growth hormone (GH)* gene in Japanese Black cattle: Structure of GH protein and a novel method for detection of the gene. *Animal Science Journal* 84: 802-804.
- Chikuni, K., R. Tanabe, S. Muroya, Y. Fukumoto, and S. Ozawa. 1997. A simple method for genotyping the bovine growth hormone gene. *Animal Genetics* 28: 230-232.
- 加藤和雄 (2006)、小原嘉昭編集「ルミノロジーの基礎と応用」、農文協 (東京)
- Katoh, K., Kouno, S., Okazaki, A., Suzuki, K. and Obara Y. (2008) Interaction of GH polymorphism with body weight and endocrine functions in Japanese black calves. *Domestic Animal Endocrinology* 34: 25-30.
- 小松篤司 (2005) ホルスタイン種乳牛における糖代謝関連遺伝子に関する研究。博士論文要旨 (東北大学)
- Matsuhashi, T., Maruyama, S., Uemoto, Y., Kobayashi, N., Mannen, H., Abe, T., Sakaguchi, S., Kobayashi, E. (2011) Effects of bovine fatty acid synthase, stearoyl-coenzyme A desaturase, sterol regulatory element-binding protein 1, and growth hormone gene polymorphisms on fatty acid composition and carcass traits in Japanese Black cattle. *Journal of Animal Science* 89: 12-22.
- Oka, A., F. Iwaki, T. Dohgo, S. Ohtagaki, M. Noda, T. Shiozaki, O. Endoh, and M. Ozaki. 2002. Genetic effects on fatty acid composition of carcass fat of Japanese Black Wagyu steers. *Journal of Animal Science* 80 :1005-1011.
- Oka, A., F. Iwaki, E. Iwamoto, and K. Tatsuda. 2007. Effects of growth rate during the early fattening period on growth, carcass characteristics and circulating hormones in the different growth hormone genotypes of Japanese black steers. *Animal Science Journal* 78: 142-150.
- Sugita, H., Ardiyanti, A., Yokota, S., Yonekura, S., Hirayama, H., Shoji, N., Yamauchi, E., Suzuki, K., Katoh, K. and Roh, S.G. (2014) The effect of single nucleotide polymorphisms in GH gene promoter region on carcass traits and intramuscular fatty acid compositions in Japanese Black cattle. *Livestock Science* 165: 15-21.
- Yokota, S., Sugita, H., Ardiyanti, A., Shoji, N., Nakajima, H., Otomo, Y., Suda, Y., Katoh, K. and Suzuki, K. (2012) Contributions of FASN and SCD gene polymorphisms on fatty acid composition in muscle from Japanese Black cattle. *Animal Genetics* 43: 431-433.