

## 2020-02：熊本系褐毛和種の遺伝学のおよび衛生学的解析

松本 大和<sup>1)</sup>、稲永 敏明<sup>1)2)</sup>、佐藤祐介<sup>1)</sup>、櫻村 敦<sup>1)</sup>、今川 和彦<sup>2)</sup>、荒木 朋洋<sup>2)</sup> (分析支援)

1) 農学部動物科学科、2) 総合農学研究所

### (1) 緒言

熊本系褐毛和種（以下、褐毛）は、和牛の一品種であるが、全国で数多く飼養されている黒毛和種（以下、黒毛）と比べると、飼養頭数も少なく、またその大半が熊本県内で飼養されており、同じく和牛の日本短角種や無角和種と並び、地方特定品種とされる。黒毛が、高度な筋肉内の脂肪交雑を特徴とするのに対し、褐毛はそれほどではなく、日本の牛枝肉価格の評価が脂肪交雑を偏重していることから、黒毛に偏った飼養状況となっている。しかし、近年は、赤身肉ブームなどで褐毛の良さを見直す動きもある。これまで褐毛の特長として「放牧適性がある」「暑さに強い」「性格が温順で扱いやすい」などという説が生産現場を中心に囁かれてきたが、実際に科学的な検証はほとんど行われていない。本研究所は、褐毛のルーツである熊本にあることから、このような褐毛のもつ特徴を科学的に解明し、今後の利用方法や育種改良の方向性について、指針を与えるための知見を得ることを目的に、今プロジェクトでは、その前身プロジェクトの頃から様々な解析を行ってきた。

本年度はその最終年度であり、熊本系褐毛和種の特徴について、それぞれの専門分野で科学的な解明を行った結果を以下に記載する。ただし、次のプロジェクトでは、切り口が変わるものの、一部のテーマを除き、後継のテーマが実施されるため、次期プロジェクトを見据えた新たな展開も含まれている。

### (2) 遺伝学的解析

#### 1. *PMEL* p.L18del が熊本系褐毛和種の肉質に与える効果

熊本系褐毛和種は、「あか一枚」とも呼ばれるその品種名が示す通り、全身褐色の被毛が特徴的な品種だが、稀に毛色が淡色化した個体が産まれることがある。この毛色淡色化は品種特性に負の影響を与えるが、県下の畜産農家間では淡色化個体が肉質や肉量に優れると噂されていることもあり、熊本系褐毛和種集団から淡色化個体が淘汰されるには至っていない。我々は先行研究において本品種における毛色淡色化の原因多型を *PMEL* p.L18del に同定しており、この多型が *BMS* 等の肉質関連形質に影響することも明らかにしている。しかしながら、色素細胞特異的な遺伝子であると考えられてきた *PMEL* 遺伝子が肉質に影響

響する具体的な機序は未解明である。そこで、本年度の研究では *PMEL* p.L18del の遺伝子型が異なる通常色個体と淡色化個体を対象に mRNA 発現解析を実施し、*PMEL* p.L18del がどのような生命現象に関与するか検証した。

通常色個体と淡色化個体各一頭を対象とした RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析の結果、*PMEL* p.L18del が Metabolic pathways に影響を与えていることが示唆され、126 個の発現変動遺伝子が同定された。これら発現変動遺伝子には *DGAT2* や *LPIN1* 等、既知の経済形質関連遺伝子も含まれていた。なお、Metabolic pathways は Amino acid metabolism や Lipid metabolism 等複数のシグナル経路が含まれるものであり、単一の経路としては MAPK signaling pathway が最も *PMEL* p.L18del の影響を強く受けていた。

RNA-seq 解析の結果を、通常色個体と淡色化個体各三頭を対象とした real time RT-PCR により検証した。この検証には *DGAT2*、*EGR1*、*EGR2*、*ELOVL3*、*FOS*、*GLUL*、*GPAM*、*SELENBP1*、*SGPL1* の 9 遺伝子を用いた。その結果、*EGR1,2* および *SELENBP1* 以外の遺伝子では RNA-seq と同様に通常色個体に比べて淡色化個体の発現量が低いことが確認された。*ELOVL3* ( $p = 0.0026$ )、*FOS* ( $p = 0.0404$ )、*GLUL* ( $p = 0.0017$ )、*SGPL1* ( $p = 0.0425$ ) の 4 つの遺伝子では、通常色個体に比べ淡色化個体では有意に発現量が低かった。また、*GPAM* ( $p = 0.0625$ ) においても淡色化個体で発現量が低下する傾向が見られた。*SELENBP1* ( $p = 0.0329$ ) においては淡色化個体で発現量の有意な増加が認められた。これら遺伝子の発現変動は淡色化個体における褐色脂肪細胞の活性が低下および白色脂肪細胞の増加を示唆しており、褐毛和種の枝肉に影響を与えている可能性が高い。本研究の結果から *PMEL* と褐色脂肪細胞の関連性が示されたため、今後は *PMEL* が褐色脂肪細胞の分化や増殖において果たす役割を解明する必要がある。

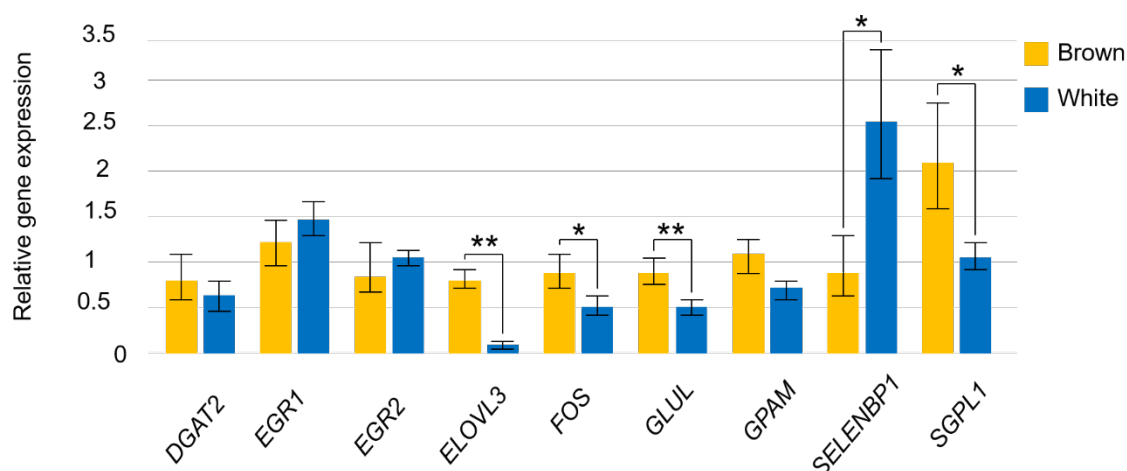


図 1. *PMEL* p.L18del が代謝関連遺伝子群に与える影響

### (3) 衛生学的解析

#### 1. 褐毛和種における地方病性牛伝染性リンパ腫 (EBL) の発症抵抗性に関する解析

地方病性牛伝染性リンパ腫 (EBL) は牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV) 感染が原因で起こる牛の伝染病である。EBL の原因病原体である BLV はレトロウイルスであり、主に血液中の B リンパ球に感染し、宿主細胞のゲノムに「プロウイルス」として組み込まれるが、プロウイルスが組み込まれた感染リンパ球の割合をプロウイルス量と言い、EBL 発症や他の牛へのウイルス伝播のリスクと相関があることが知られている。本研究では、多くが熊本県内で飼養されている和牛の一品種である熊本系褐毛和種 (褐毛和種) において、牛伝染性リンパ腫の発生が非常に稀であることに注目し、褐毛和種の BLV 感染牛で、血中プロウイルス量が低いレベルで保たれるメカニズムを解明することを目的として、研究を実施してきた。

プロジェクトの最終年度となる 2023 年度は、それまでの解析から褐毛和種において、獲得免疫の一つである細胞性免疫の機能が黒毛和種よりも亢進していることが示唆されたため、褐毛和種および黒毛和種の BLV 感染牛および非感染牛における細胞性免疫に関与する遺伝子の発現量を調査した。

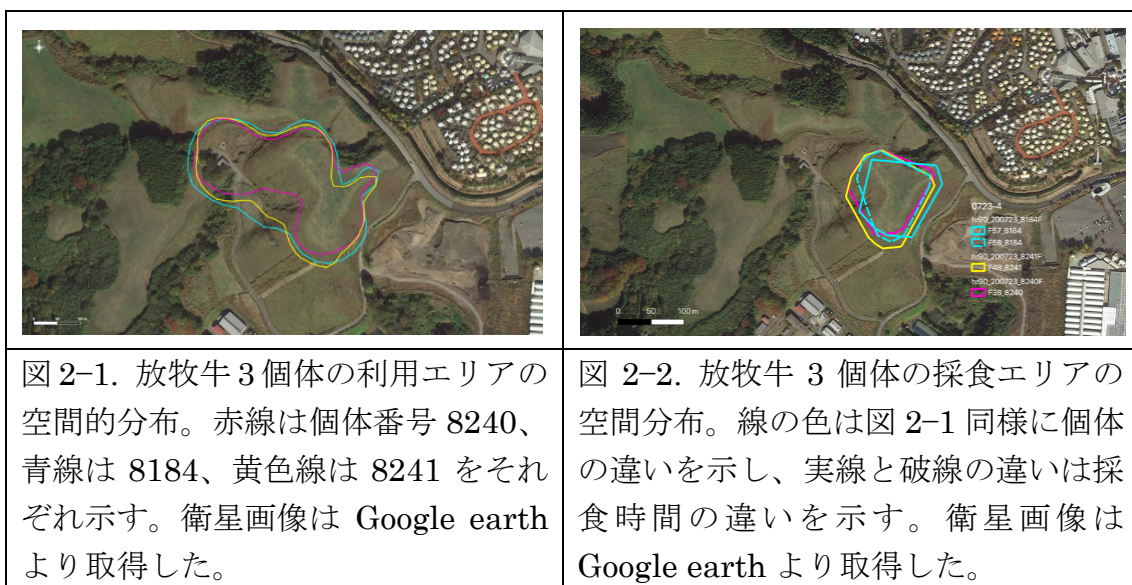
その結果、細胞性免疫の亢進を促すサイトカインである TNF- $\alpha$  および IFN- $\gamma$  の発現量が、褐毛和種で高い傾向が認められた。また、細胞傷害性 T リンパ球が感染細胞などの排除をする際に機能している Granzyme B や Eomesodermin については、品種の要因は有意ではなかったが、褐毛和種では BLV 感染により発現量が増加している傾向が認められた。このことから、褐毛和種は、黒毛和種に比べて、BLV 感染後に細胞性免疫が亢進しやすく、それによりプロウイルス量の上昇が抑制されている可能性が考えられた。

#### 2. 放牧時の褐毛和種牛群の行動特性に関する研究

半自然草地における放牧は、持続的な畜産の実現に向けた方策の 1 つとされる。これは、牛が草本類を自由に採食可能な飼養管理手法であり、牛の成長や植生を管理した定期的な牛の牧区移動が必要となる。放牧管理において、この牧区移動は牛群の状況と植生を観察して経験則に基づいて行われている。群れを形成する動物は一般的に餌資源の効率的な確保と餌資源を巡る競争といったベネフィットとコストのバランスを保っている。このことから放牧時の褐毛和種牛群においては、個体レベルでの食草の選択だけでなく牛群レベルでの餌資源を巡る競争を回避あるいは抑制していると考えられる。つまり、餌資源の減少に伴って、牛群内において餌資源の競争を回避するための応答が生じる可能性がある

る。そのために、①牛群内の個体レベルで利用するエリアや採食エリアの時空間的な配置の調整であったり、②採食リズムの調整による競争の回避もしくは群れとしての行動の同調であったり、③採食時の個体間距離を調整することで、対処していることが考えられた。これらの知見を検討し、現行の ICT 技術を応用した放牧管理技術において新たなパラメータとして加えていくことで、経験則に基づいた牧区移動のタイミングをアラートできるシステムの構築が可能になる。そこで、2023 年度においては、2022 年度まで放牧牛計 4 個体に装着した GPS とヒト用活動量計のデータを用いて解析を行った。

放牧牛が利用するエリア (図 2-1) および採食エリアはいずれも重複していた (図 2-2)。採食リズムについては、いずれの個体も夜明け前に採食を開始し、



日中に採食を、さらに夜間にも採食を行っており、特に夜明け前と日中の採食については個体間で同調していた (図 2-3)。また、採食の周期性からも個体間で同様の周期性を示した (図 2-3)。そして、採食時の個体間距離に着目すると同一牧区において、餌資源が少ない秋 (放牧末期) と餌資源が豊富な夏 (放牧開始) では、秋の方が個体間距離はより長くなり、その震幅も大きく、夏の方が短い個体間距離が維持されていた (図 2-4)。

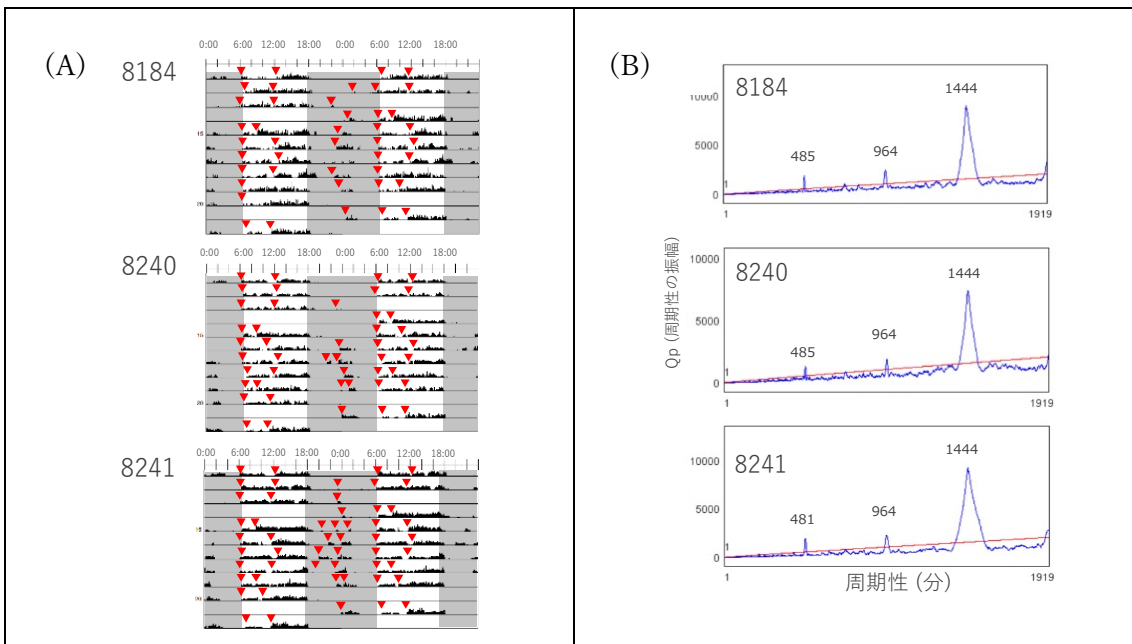


図 2-3. 放牧牛の採食時の活動量を示したアクトグラムと周期性解析。(A)各個体の活動量をダブルプロット法でそれぞれ示し、網掛け部分が夜間、白抜き部分が日中を示す。赤三角はそれぞれの採食の開始時間を示す。(B)  $\chi^2$  ピリオドグラム解析による周期性の解析を各個体で示し、それぞれのピークに周期性がみられる。

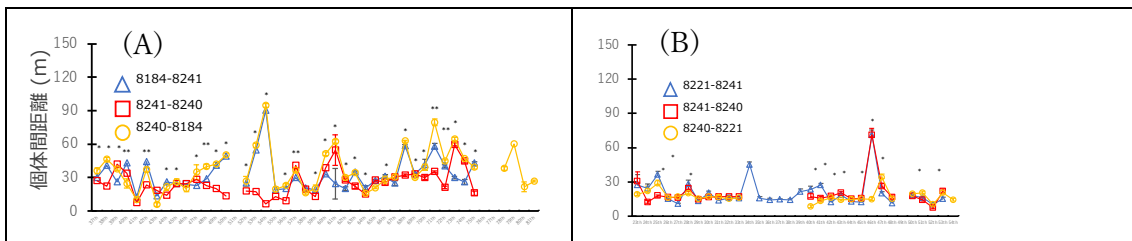


図 2-4. 放牧牛の採食バウトあたりの個体間距離の推移。いずれも半自然草地の同一牧区において(A) は放牧末期の秋に得られたもので、(B) は放牧開始時の初夏に得られたものである。

これらのことから、牛群内の個体レベルで利用するエリアや採食エリアの時間的な配置の調整はなされずに、牛群として放牧されているからこそ利用するエリアは牧区の形状によって制限されており、採食エリアの重複を避けることもないことが明らかになった。また、採食リズムが同調していることから採食時間をずらすことなく群れとして同調した行動をとることが示唆された。さらに、夜明け前と日中の採食リズムが同調していることから、互いに採食のタイミングを視覚的に調整していることが示唆され、採食エリアが重複することに表れているとも考えられた。そして、この限られた牧区および採食エリアの中で餌

資源が多い場合は、個体間距離が近く安定する一方で、餌資源が少ない場合は個体間距離を広く保ちながら近づいたり離れたりを繰り返していると考えられた。これにより、個体間距離をパラメータに加えていくことで遠隔地から餌資源の減少を予測できることが示唆された。今後は、植生調査による餌資源の増減との関係を検討していくことで、個体間距離の変動が餌資源増減の指標になりうるかを裏付けていく必要がある。

#### (4) 熊本系褐毛和種の肉質と美味しさに関する研究

食肉は生食されることが少なく、加熱調理されてから喫食される。加熱調理は、食肉の「味」「匂い」「食感」などを変化させ美味しくするが、嗜好性との関係について具体的な知見は少ない。特に、あか牛などの赤身肉はレアな状態で食されることが多いが、その嗜好性を決定する要因は明確ではない。本研究では、あか牛の美味しさ、特に、加熱調理と食肉嗜好性の関係を明らかにするため、マウスを用いた行動試験を実施した。異なる焼き加減で調理した牛モモ肉（ローストビーフとタタキ）を用いた選択嗜好試験の結果、マウスは加熱時間が短いタタキに対し極めて強い嗜好性を示した。液状化した牛モモ肉（ローストビーフとタタキ）を用いた二瓶選択嗜好試験の結果、マウスは食感がない液状のタタキに対し極めて強い嗜好性を示した。以上から、マウスは、加熱時間が短い食肉を好むことが示唆された。特に、食感や外観に依存しない嗜好性が見られたことから、加熱によって増減する食肉の魅力に関わる因子が存在すると仮説を立てた。しかし、味覚センサーによる分析では、ローストビーフとタタキの間で酸味、苦味、旨味、コクに大きな差は認められなかった。今後、この嗜好性が味か匂いのいずれに起因するかを明らかにする必要がある。

#### (5) 総括

熊本系褐毛和種について、さまざまな角度からの研究を行い、主に産肉能力、食肉としての特性、衛生学的な特性、そして行動学的な特徴について、さまざまな知見を得ることができた。今後は、「動物の健康」「人の健康」「環境の健康」の向上という、より時間的にも空間的にも広がりのある新たなテーマにおいて、この熊本系褐毛和種の科学的な特性がどのように活用できるのか、より応用的な研究への発展も行っていくことで、本品種の未来だけでなく、地域や人々の暮らしにも貢献したいと考えている。

#### (6) 業績

研究成果

【学術論文】

1. Matsumoto H, Kimura S, Saito R, Takeichi M, Kashimura A, Inenaga T. (2023) Causative alleles for chondrodysplastic dwarfism, factor XI deficiency, and factor XIII deficiency in the Kumamoto sub-breed of Japanese Brown cattle. *Animal Science Journal*. 94(1): e13882.
2. Inenaga T, Fukuoka K, Sumida M, Aiba S, Nishikaku K, Matsuno Y, Kobayashi T, Imakawa K. (2023) Low proviral load in the Kumamoto strain of Japanese Brown cattle infected with the bovine leukemia virus. *BMC Veterinary Research*. 19(1): 185.
3. Hossain MB, Kobayashi T, Makimoto S, Matsuo M, Nishikaku K, Tan BJY, Rahman A, Rajib SA, Sugata K, Ohnuki N, Saito M, Inenaga T, Imakawa K, Satou Y. (2023) Clone dynamics and its application for the diagnosis of Enzootic Bovine Leukosis. *Journal of Virology*. 97(1): e0154222.

#### 【招待講演】

1. 檜村 敦, 宇宙からウシの生活を探る, 農業とテクノロジーとの融合 アグリテック講演会, 2023.

#### 【学会発表】

1. Inenaga T, Matsumoto H, Sato Y, Kashimura A, Araki T, Imakawa K. Studies on the characteristics of Kumamoto strain of Japanese Brown cattle. The 19th Asian Agricultural Symposium, 2023.
2. Higashida, S., Sugiura, S., Sato, Y., and Sato, Y. Why is raw egg on rice so delicious? The effect of cooking on egg preference in mice. The 19th Asian Agricultural Symposium, 2023.
3. Qingping, Q., Sato, Y., and Sato, Y. Exploration of novel myokines and analysis of their expression. The 19th Asian Agricultural Symposium, 2023.
4. 山下泰斗, 橋本峻, 大山泰生, 稲永敏明, 檜村敦, 松本大和. *PMEL p.L18del* は代謝関連遺伝子群の発現変動を起こし肉質等級に影響する. 日本動物遺伝育種学会第24回大会, 2023.
5. 檜村 敦, 飯田彩華, 野月みのり, 久保和弘, 服部法文, 神鷹孝至, 大庭康彦, 今井早希, 稲永敏明, 松本大和, 服部育男, 岡本智伸. 阿蘇地域の放牧地における放牧牛の採食エリアと地形の関係. 第16回日本暖地畜産学会宮崎大会, 2023.