

## 乳用牛における $\kappa$ -カゼインと BLAD 遺伝子型 同時検出法の開発とそれらの出現遺伝子頻度

山本 直幸・佐々木 修・富樫 研治

農林水産省北海道農業試験場

札幌市豊平区羊ヶ丘1番地 062-8555

### Simultaneous detection of $\kappa$ -Casein types and BLAD gene in the dairy cattle herds.

Naoyuki YAMAMOTO, Osamu SASAKI and Kenji TOGASHI

Hokkaido National Agricultural Experiment Station

1 Hitsujigaoka, Toyohira, Sapporo 062-8555

キーワード：乳用牛,  $\kappa$ -カゼイン, ウシ白血球粘着不全症, PCR-RFLP

Key words: Dairy cattle,  $\kappa$ -Casein, BLAD, PCR-RFLP

#### 要 約

乳用牛の泌乳特性に関連する有益な遺伝的形質を評価し、また個体ごとの有害遺伝子等に関する遺伝的特性を早期に把握することは、乳生産性を高める上で重要である。そこで、 $\kappa$ -CN と BLAD (CD 18) 両遺伝子座のそれぞれの遺伝子型を同時に検出するための PCR-RFLP 法を考案し、それぞれの型について遺伝子頻度の調査を行った。 $\kappa$ -CN では牛群間で遺伝子型頻度にながりの差が認められたが B 型の頻度は少なかった。BLAD では、6 牛群中 4 牛群でキャリアー個体が確認され、そのうち 2 牛群では 8% 以上の頻度で存在した。これらの集団では、キャリアーの精液が種付けされれば生まれてくる子牛は BLAD を発病する危険性が高いことを明らかにした。乳タンパク質のみならず疾病も考慮に入れた適正な交配計画を策定し実施する上で、本法は有用と思われた。

#### 緒 言

乳用牛の高泌乳化、高品質乳化へ向けた改良を進めるためには、個体ごとの泌乳特性に関連する遺伝子型や、乳生産性に影響を及ぼすような遺伝性疾患に関連する遺伝子型を早期に効率よく把握することが必要である。酪農家の多くは乳用種雄牛評価成績（家畜改良事業団発行）等の資料で公表されている能力データを参考として交配計画を策定、実施している。また、乳製品への加工特性の面で乳タンパク質への量的、質的な改良への関心が高まってきている。しかし、個々の

乳タンパク質の量や遺伝子型を把握したうえで交配計画を策定して乳生産を行うことは現状では困難である。

現在、乳タンパク質の一種である  $\kappa$ -カゼイン ( $\kappa$ -CN) は牛乳品質の重要な成分でチーズなどの加工特性に関連していることが知られている (RUSO and MARIANI, 1978; SCHAAR *et al.*, 1985)。また、BLAD (Bovine leukocyte adhesion deficiency: ウシ白血球粘着不全症, KEHRLI *et al.*, 1990) は白血球の機能が阻害されることにより病原体に対する抵抗力が著しく低下し、感染症による個体損失につながる常染色体性の劣性遺伝病である。この疾患は白血球の細胞接着受容体 CD 18 (Cluster of Differentiation: 分化抗原) の遺伝子の点突然変異を原因とすることが明らかにされている。近年、国内種雄牛については BLAD キャリアーであるか否かの公表が行われており、変異型 CD 18 遺伝子の排除も進められているが、酪農家の雌牛では対策はとられていない。

乳タンパク質のみならず疾病も考慮に入れた適正な交配計画の策定、実施を可能とするためには、 $\kappa$ -CN と CD 18 (BLAD) の両遺伝子型を短時間でかつ簡易に検出することが必要である。そこで、これらの形質の遺伝子型を同時に検出できる PCR-RFLP (Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism) 法の条件について検討を行った。本法を用い酪農家等において飼養されている牛群の  $\kappa$ -CN の遺伝子型と BLAD キャリアー個体の頻度について調査した。

## 材料と方法

### 1. 供試牛

石狩東乳牛検定組合加入の酪農家5軒(Y, F, W, K, T)の牛群(合計500頭)と農林水産省北海道農業試験場(HNAES)の牛群(99頭)のホルスタイン種を実験に用いた。

### 2. 採血とDNA抽出

血液サンプルは頸静脈あるいは尾静脈より抗凝固剤(ヘパリンナトリウム)入り真空採血管(VT-100 H, TERUMO)で採取した。全血を遠心分離して血漿成分を取り除いた後、血球成分を生理食塩水/EDTA溶液(0.16 M NaCl, 1mM EDTA)で2度洗浄した。DNA抽出には市販のDNA回収キット(TAKARA, Code No.9801)を用いた。

採血にあたっては、「農業研究・教育のための家畜の取り扱いと使用法に関する指針」(1995)に従った。

### 3. PCR-RFLP法

Bio Database CD-ROM(ソフトウェア開発株式会社)からGenBank(National Center for Biotechnology Information, NCBI)に登録されている $\kappa$ -CN(Locus: BTU84251, Accession: U84251),及びCD18(Locus: BOVCD18A, Accession: M81223)の塩基配列データを読み込み、遺伝情報処理ソフトウエ

ア-GENETYX-MAC(ソフトウェア開発株式会社)を使ってプライマーセットを設計した。2組のプライマーを1本のPCR反応液(総量10 $\mu$ l)に加えて同時に両塩基配列を増幅(GeneAmp PCR System 9600, PERKIN ELMER)した。

RFLPを検出するためにPCR産物の制限酵素切断部位を上記ソフトウェアで検索し、 $\kappa$ -CNにはPst Iを、CD18にはHae IIIを使用した。PCR産物2 $\mu$ lに2種の制限酵素(TAKARA)を各10 unit同時に添加して総量10 $\mu$ lで37 $^{\circ}$ C, 60分以上消化を行った。PCR-RFLP法の条件等は表1に示した。

### 4. 電気泳動法

制限酵素で消化の終わったDNAは、7%ポリアクリルアミドミニゲル, 1 $\times$ TBEバッファー(20 $\times$ TBE: 1M Tris, 20mM Na<sub>3</sub>EDTA, 0.97M Boric Acid)で定電圧100 V, 80分間電気泳動を行った(表1)。エチジウムブロマイド液で染色後、紫外線照射下でポラロイド写真撮影を行い、 $\kappa$ -CNとCD18の遺伝子型を同時に検出した。

## 結 果

PCR-RFLP法による最適な検出条件を表1に示した。同時増幅, 同時消化を行うことで検出に要する時間の短縮と手順の簡易化が可能となり, 図1で示すように $\kappa$ -CNの遺伝子型A/A(152bp)とB/B(183bp)

表1  $\kappa$ -CNとCD18(BLAD)の遺伝子型同時検出のための諸条件

プライマー	$\kappa$ -CN	: F-AAATCCCTACCATCAATACC : R-CTTCTTTgATgTCTCCTTA g			
	CD18	: F-TCAACgTgACCTTCCg g A g g : R-CCCAgCTTCTTgACgTTgAC			
PCR 溶液	DNA	: 100 ng~			
	プライマー	: 各 5 pmol			
	dNTPs	: 200 $\mu$ M			
	Taq	: 1 unit (AmpliTaq Gold, PERKIN ELMER)			
	MgCl <sub>2</sub>	: 1.5 mM			
	総反応液量	: 10 $\mu$ l			
プログラム	95 $^{\circ}$ C-10分	×	1サイクル		
	94 $^{\circ}$ C-15秒	}	×		
	54 $^{\circ}$ C-30秒			}	×
	72 $^{\circ}$ C-15秒				
	72 $^{\circ}$ C-10分	×	1サイクル		
制限酵素	$\kappa$ -CN	: Pst I - 10 unit			
	CD18	: Hae III - 10 unit			
電気泳動	ゲル・濃度	: ポリアクリルアミドミニゲル・7%			
	電圧・時間	: 100V・80分間			

はそれぞれ 1 本のバンドで、A/B は 2 本のバンド (183bp, 152bp) で遺伝子型判定が可能であった。CD 18 の正常型 (85bp) は 1 本のバンドで、ヘテロ型 (キャリアー) は 2 本のバンド (85bp, 66bp) で判定が可能であった。その結果、 $\kappa$ -CN の遺伝子型 A/A, A/B, B/B と BLAD の正常型、キャリアー型が同一ゲル上で明確に検出することができた。調査した 6 牛群の DNA サンプルからは CD 18 異常ホモ型 (発症) は検出されなかったが、これは異常ホモ型の個体が存在しなかったためである。異常ホモ型では 66 bp のバンド 1 本が検出される。

PCR 産物を制限酵素で消化することにより、 $\kappa$ -CN では 21 bp, CD 18 では 21 bp と 19 bp の DNA 断片が

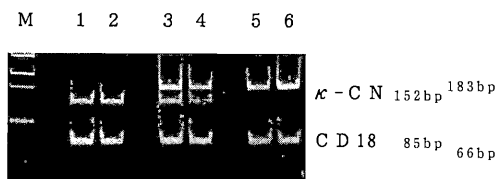


図 1  $\kappa$ -CN と CD 18 (BLAD) の電気泳動図

- M : DNA サイズマーカー ( $\phi$  X 174/Hae III)  
 1 :  $\kappa$ -CN = A/A, BLAD = 正常型  
 2 :  $\kappa$ -CN = A/A, BLAD = ヘテロ型 (キャリアー)  
 3 :  $\kappa$ -CN = A/B, BLAD = 正常型  
 4 :  $\kappa$ -CN = A/B, BLAD = ヘテロ型 (キャリアー)  
 5 :  $\kappa$ -CN = B/B, BLAD = 正常型  
 6 :  $\kappa$ -CN = B/B, BLAD = ヘテロ型 (キャリアー)

同時に検出されるが、これらの短いバンドは遺伝子型を判定するには特に考慮する必要はない。

各牛群の  $\kappa$ -CN の遺伝子型頻度を表 2 に示した。A/A 型は W 牛群で 45.16% ともっとも低く、Y 牛群で 76.36% ともっとも高かった。A/B 型の頻度は Y 牛群の 20.00% から W 牛群の 51.61% までであった。チーズ生産に適していると報告されている遺伝子型 B/B は F 牛群で 0% であったほかは 0.58% (K 牛群) から 3.64% (Y 牛群) と低かった。遺伝子頻度で見ると、A は W 牛群の 70.97% から Y 牛群の 86.36% までであり、B では Y 牛群の 13.64% から W 牛群の 29.03% であった。W 牛群で B 遺伝子の頻度が他の牛群より高かった。

BLAD キャリアーの割合を表 3 に示した。F 牛群が 8.93%, T 牛群が 8.39% と高い保有率を示し、Y 牛群 (5.45%) と K 牛群 (5.20%) でも比較的高い割合であった。W 牛群、及び HNAES 牛群ではキャリアー個体は確認されなかった。

### 考 察

複数の遺伝子を PCR 法により 1 本のチューブ内で同時に増幅するには、遺伝子数と同じ数のプライマーセットが必要となるが、プライマー数が増すにつれ反応条件の許容範囲は狭くなる。即ち、同じ量の PCR 産物を得るにはプライマーごとのアニーリング温度や至適マグネシウム濃度等の反応条件をどれだけ共通化できるかが重要となる。本法では遺伝子型判定を確実にするために、PCR 産物長、PCR 産物内の制限酵素切断

表 2 各牛群における  $\kappa$ -CN の遺伝子型頻度と遺伝子頻度

牛 群	供試数	遺伝子型頻度 (%)			遺伝子頻度 (%)	
		A/A	A/B	B/B	A	B
Y	55	76.36	20.00	3.64	86.36	13.64
F	56	64.29	35.71	0	82.14	17.86
W	62	45.16	51.61	3.23	70.97	29.03
K	173	67.05	32.37	0.58	83.24	16.76
T	144	72.22	25.69	2.08	85.07	14.93
HNAES	99	56.70	41.24	2.06	77.32	22.68

表 3 各牛群における BLAD のキャリアー頻度と遺伝子頻度

牛 群	供試数	キャリアー		遺伝子頻度 (%)
		頭数	頻度 (%)	
Y	55	3	5.45	2.73
F	56	5	8.93	4.46
W	62	0	0	0
K	173	11	5.20	2.60
T	143	12	8.39	4.20
HNAES	99	0	0	0

部位の位置を考慮し DNA バンドの近接や重複が起こらないようプライマーの設計を行った(図1)。そのために個々の至適アニーリング温度は  $\kappa$ -CN が 50°C, CD 18 が 59°C と異なっている。しかし、検討の結果、54°C の時、同時増幅を行えることが確認された。また、RFLP を検出するために用いた制限酵素反応液の至適 NaCl 濃度は、Pst I ( $\kappa$ -CN) が 100 mM, Hae III (CD 18) が 60 mM であるが、本法ではいずれも 100 mM で消化を行った。このことによる Hae III の活性への影響はなかった。これにより、 $\kappa$ -CN と CD 18 の遺伝子型を同時に判定することが可能となり、検出までに要する時間や試薬、操作手順の大幅な軽減が可能となった。

乳タンパク質のカゼインファミリーには、 $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  (EIGEL *et al.*, 1984) があり、 $\kappa$ -CN の対立遺伝子には A と B の 2 種類が確認されている。ホルスタイン種では B/B 型の割合が 5% 程度と少ないのに対してジャージー種では約 60% 以上と品種間差が大きい (ASCHAFFENBURG, 1968; MEDRANO and AGUILAR-CORDOVA, 1990)。調査した 6 牛群では 0% から 3.64% であり、報告値よりかなり低い値であった(表2)。 $\kappa$ -CN・B/B 型の牛乳は A/A 型よりも乳脂肪分量、全乳固形分量が高いという報告がある (ALEANDRI *et al.*, 1990)。また、 $\kappa$ -CN の遺伝子型と乳タンパク質率との関連性があるとの報告もある (NG-KWAI-HANG *et al.*, 1984; SMITH and SIMPSON, 1986; MARZIALI and NG-KWAI-HANG, 1986; GIBSON, 1990; 平山及び横濱, 1997)。今回用いた牛群では  $\kappa$ -CN の遺伝子型と乳脂肪分量、全乳固形分量、乳タンパク質率との関連性については認められなかった。加工特性という点から見ると、 $\kappa$ -CN・B/B 型の乳は加熱や凍結に対して比較的安定性があり、レンネティング時間が短く、カードが固くシネレス性が良い。このために、約 5~10% 程度のチーズ製造の歩留まりが高いことが報告されている (RUSSO and MARIANI, 1978; MARZIALI and NG-KWAI-HANG, 1986; GROSCLAUDE, 1988)。

$\kappa$ -CN の遺伝子頻度について、横濱及び平山(1996)が道東地域のホルスタイン種 3 牛群の 167 頭を調査したところ、 $\kappa$ -CN・B は平均 13.8% であったと報告している。今回調査した W 牛群の B 遺伝子頻度は 29.03% であり 6 牛群中もっとも高い値であった。HNAES 牛群も 22.68% であり、これらは A/B 型頻度が高いことに因る(表2)。

本報告で調査した牛群では、カゼインをはじめとして各乳タンパク質の遺伝子型を考慮した選抜は行われてはいない。乳タンパク質が今後重要性を増してることが考えられ、さらに他の乳タンパク質遺伝子についても生産性との関連性が明らかになれば、それらの遺伝子も含めて容易に判定することが必要となる。これらの形質の評価が簡単に行えるようになれば、個々

の酪農家の様々な要望に対応した牛群の交配計画の策定へ組み入れることも可能になると思われる。

BLAD はウシ白血球膜表面タンパクの CD 18 をコードしている遺伝子の点突然変異による塩基置換によって生じる遺伝病である (SHUSTER *et al.*, 1992)。また、この疾患の遺伝子は種雄牛オズボンデールアイバンホー (Osborndale Ivanhoe: 1952 生, YOUNG *et al.*, 1988) がキャリアであったことから、その子孫へ伝達されてきている。F 牛群で確認されたキャリア一頭 5 頭(表3)の血統登録書による家系調査を行ったところ、BLAD キャリアーとして公表されている同じ祖父、父を共通に持っていた。この場合、キャリアであることを認知しつつあえて交配に用いている。この例と共通の祖父、父をもつ個体は他に 4 頭いたが、これらは正常型であった。T 牛群でも同じようにキャリアの精液であることを認知して交配に使用しているもの他に、今回の解析によってキャリアである事実が確認されたことにより、使用した精液がキャリアであったことが判明した例もあった。雌の CD 18 遺伝子型が不明である場合、BLAD キャリアーを代々牛群内に引き継いでいく可能性がある。

本調査は一部地域の少数牛群について行ったが、8% 以上という非常に高い割合でキャリアが存在し、かつキャリアが生産され続けているという現状が明らかになった。種雄牛の側からは BLAD キャリアーの排除が行われているが、雌側からの排除を目的とした遺伝的検査は実施されていない。酪農家が購入できる精液の中にはキャリアであることが公表されているものが含まれている。これらの精液のうち、能力の高いキャリア一頭の精液は今後も使用されると思われる。雌側からも積極的に BLAD キャリアーの排除を行う必要がある。

本報告において、 $\kappa$ -CN と CD 18 の遺伝子型を同時に検出し判定することが可能となったことから、これを一般牛群において活用すれば、チーズ生産に関連する優良遺伝子である  $\kappa$ -CN の B 型の選抜と免疫異常を引き起こす遺伝病 BLAD の排除による生産性の向上が期待される。

## 謝 辞

本試験を行うにあたり、牛群調査及び血液サンプルの採取を御快諾いただいた千歳市酪農家の方々、採血に御協力いただいた北海道農業試験場企画連絡室業務第3科、ならびに畜産部の諸氏に感謝の意を表します。

## 文 献

ALEANDRI, R., L. G. BUTTAZZONI and J. C. SCHNEIDER (1990) The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability. *J. Dairy Sci.*, **73**: 241-255.

- ASCHAFFENBURG, R. (1968) Genetic variation of milk proteins. *J. Dairy Res.*, **35**: 447-460.
- EIGEL, W. N., J. E. BUTLER, C. A. ERNSTROM, H. M. FARREL Jr., V. R. HARWALKAR, R. JENNESS and R. Mcl. WHITNEY (1984) Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth Revision. *J. Dairy Sci.*, **67**: 1599-1631.
- GIBSON, J. P. (1990) Is there profit in a protein gene. *Holstein Journal*, **12**: 29.
- GROSCLAUDE, F. (1988) Le polymorphisme genetique des principales lacto-proteines bovines. *INRA Prod. Anim.*, **1**: 5-17.
- KEHRLI, M. E. Jr., F. C. SCHMALSTIEG, D. C. ANDERSON, M. J. VAN der MAATEN, B. J. HUGHES, M.R. ACKERMANN, C. L. WILHELMSSEN, G. B. BROWN, M. G. STEVENS and C. A. WHETSTONE (1990) Molecular definition of the bovine granulocytopeny syndrome: identification of deficiency of the MAC-1 (CD11b/CD18) glycoprotein. *Am. J. Vet. Res.*, **51**: 1826-1836.
- MARZIALI, A. S. and K. F. NG-KWAI-HANG (1986) Effects of milk composition and polymorphism on cheese composition. *J. Dairy Sci.*, **69**: 2533-2542.
- MEDRANO, J. F. and E. AGUILAR-CORDOVA (1990) Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. *Biotech.*, **8**: 144-147.
- NG-KWAI-HANG, K. F., J. F. HAYES, J. E. MOXLEY and H. G. MONARDES (1984) Association of genetic variants of casein and milk serum proteins with milk, fat, and protein production by dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, **67**: 835-840.
- RUSSO, V and P. MARIANI (1978) Polimorfismo delle proteine del latte e relazioni tra varianti genetiche e caratteristiche di interesse zootecnico tecnologico e caseario. *Revista di Zootecnia e Veterinaria*, **5**: 1-31.
- SCHAAR, J., B. HANSSON and H. E. PETERSSON (1985) Effects of genetic variants of  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin on cheesemaking. *J. Dairy Sci.*, **52**: 429-437.
- SHUSTER, D. E., M. E. KEHRLI, M. R. ACKERMANN and R. O. GILBERT (1992) Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 9225-9229.
- SMITH, C. and S. P. SIMPSON (1986) The use of genetic polymorphisms in livestock improvement. *J. Anim. Breedg. Genet.*, **103**: 205-217.
- YOUNG, C. W., R. R. BONCZEK and D. G. JOHNSON (1988) Inbreeding of and relationship among registered holsteins. *J. Dairy Sci.*, **71**: 1659-1666.
- 平山博樹・横濱道成 (1997) ウシ乳蛋白質の免疫化学的定量. *北畜会報*, **39**: 11-14.
- 横濱道成・平山博樹 (1996) 尿素加等電点電気泳動法による牛乳蛋白質多型の検出. *北畜会報*, **38**: 19-22.
- 北海道農業試験場畜産部訳 (1995) 農業研究・教育のための家畜の取り扱いと使用方法に関する指針. 第1版. 22-35, 44-48. 社団法人畜産技術協会. 東京.