

## 黒毛和種における低受胎に関連する *FOXP3* 遺伝子の効果検証

賀村幸菜・中島亮太郎・有島太一<sup>\*1</sup>・瀬戸口浩二<sup>\*2</sup>・鬼塚剛

### 要 約

近年、和牛肉の人気が上昇する一方で、和牛の生産現場においては、繁殖雌牛の受胎率向上や分娩間隔短縮等による収益性の向上が求められている。そこで本研究では、黒毛和種の繁殖雌牛における低受胎に関連する *Forkhead box P3 (FOXP3)* 遺伝子の効果検証を実施した。その結果、低受胎牛群（人工授精4回以上実施）と対照牛群（人工授精1～3回で受胎）の両群では、*FOXP3* 遺伝子のプロモーター領域にある関連 SNP の低受胎リスクアレル G をホモで持つ遺伝子型 GG の実測値頻度はそれぞれ 0.08, 0.06 と共に低く、生産現場において淘汰や肥育への選択が行われていることが示唆された。さらに、解析を実施した繁殖雌牛について、遺伝子型 GG は、初産時の受胎に要した人工授精回数が 1.93 回と他の遺伝子型 GA (1.73), AA (1.84) と比べて多かった。

キーワード：黒毛和種, SNP, 低受胎, *FOXP3* 遺伝子

### 緒 言

近年、和牛肉の人気が上昇する一方で、農家戸数や飼養頭数の減少、生産コストの増大等により生産基盤の脆弱化が懸念されている。さらには牛の人工授精 (AI) による受胎率が低下してきている<sup>1)</sup>。受胎には様々な遺伝的要因や免疫機能が関与していると考えられ、受精および着床段階における胚の発育や、母体の免疫機能に関わる遺伝的要因を解明することは、受胎率向上に向けて有用とされている<sup>2)</sup>。当所でも候補種雄牛等の選抜に活用できる繁殖性に関与する DNA マーカーの特定を目指し、受胎に関連する遺伝的要因を探索している。そこで、種雄牛の多様体データベース (エクソームデータ) を用い<sup>3)</sup>、AI でも受精卵移植 (ET) でも不受胎牛 (AI-ET 不受胎牛) のサンプルから繁殖性に関与する DNA マーカーを用いた探索を行った。その結果、関連解析で6か所の量的形質遺伝子座 (QTL: 1～6) が検出され、そのうちの QTL2 は、X 染色体上に存在する免疫機構を司る領域である *Forkhead box P3 (FOXP3)* 遺伝子のエクソン領域上流 2.2Kb 付近の SNP が繁殖成績 (受胎) に関連していることが分かった<sup>1)</sup>。この関連 SNP は、*FOXP3* 遺伝子のプロモーターで、制御性 T 細胞 (自己に対する免疫反応を抑制する役割を持つ細胞) の発生や分化を司る主な遺伝子であり、そのリスクアレル G は mRNA 発現量をアレル A の約 0.68 倍に低下させ (in

vitro における HEK293T 細胞実験)<sup>1)</sup>、エフェクター T 細胞 (病原体等の排除に最適な免疫反応を誘導) の活性化が過剰に誘発されることで、受精後の胚を異物と捕らえ、流産が引き起こされて、低受胎となる可能性がある<sup>3) 7) 8)</sup>。そこで本研究では、この特定された *FOXP3* 遺伝子の関連 SNP について、県内の繁殖雌牛への効果を検証し、さらに新たな関連因子の探索を行った。

### 試験材料および方法

#### 1 試験材料

2000年4月～2020年1月生まれで、県内一般7農場で飼養されている黒毛和種の繁殖雌牛1,428頭 (農場1: 46頭, 農場2: 110頭, 農場3: 36頭, 農場4: 42頭, 農場5: 444頭, 農場6: 365頭, 農場7: 385頭) から血液サンプルの採材と繁殖成績を収集した。そのうち、育成時の AI 回数, 血統, 初産月齢が判明している 951 頭について解析を行った。

#### 2 DNA 抽出

血液サンプルは Easy-DNA™ gDNA Purification Kit (Invitrogen™) を用いて、定法<sup>1)</sup>に従い DNA の抽出を行った。

#### 3 遺伝子型判別

*FOXP3* 遺伝子型は、型判定用プライマーセット (5'-TCAGATGCAGACCCCGATAC-3', 5'-CTGAGTCAGGGCAGCATAGA-3') を用いて、PCR 反応にて対象 SNP を含む DNA 断片を増幅させ、Applied Biosystems 3500

(連絡先) 肉用牛改良研究所新技術開発研究室

\* 1 鹿児島県庁農政部畜産課

\* 2 畜産試験場中小家畜部

Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて、PCR 産物のダイレクトシーケンスを行い、遺伝子型 AA, GA, GG を決定した。

#### 4 遺伝子型別の効果検証および統計解析

決定した遺伝子型に従い、野外7農場951頭について、育成時のAI回数を比較した。またAIを4回以上行った繁殖雌牛を低受胎牛群（不受胎もしくはAI4回以上後に受胎した牛）とし、対照牛群（正常、1～3回のAIで受胎）とリスクアレルGの頻度の比較検討を行った。

統計解析について、期待値頻度は次式のとおり算出した。pはアレル型A、qはアレル型Gの頻度である。

$$f(AA) = p^2$$

$$f(GA) = 2pq$$

$$f(GG) = q^2$$

期待値は次式のとおり算出した。Nは各群の累計である。

$$E(AA) = p^2N$$

$$E(AG) = 2pqN$$

$$E(GG) = q^2N$$

実測値と期待値について、カイ二乗検定を用いてハーディ・ワインベルグ平衡 (HWE) 適合検定を行った。HWEに適合しない時、本研究では特定の対立遺伝子が不利となっていると考えた。

#### 5 その他の繁殖関連SNPの探索

種雄牛の多様体データベース (エクソームデータ) を用いて既に検出されている6か所のQTLのうち、QTL1とQTL3～6における関連SNPについてゲノムワイド関連解析を実施した。

### 結 果

#### 1 野外7農場951頭における頻度調査

野外7農場951頭を解析した結果、遺伝子型GGの実測値頻度は0.06、GAは0.43、AAは0.51であった。これにより、カイ二乗検定を行うと、 $P = 0.008$ であり、期待値との間において、HWEに適合していなかった (表1-1, 1-2)。

表1-1 野外7農場 (951頭) における頻度調査

遺伝子型	実測値 (頭)	期待値 (頭)	実測値 頻度	期待値 頻度
AA	483	499.2	0.51	0.53
GA	412	379.6	0.43	0.40
GG	56	72.2	0.06	0.08
計	951	951		

表1-2 表1-1におけるアレル頻度

アレル型	n	アレル頻度
A	1,378	0.72
G	524	0.28

#### 2 低受胎牛群と対照牛群に区別した場合の頻度調査

野外7農場951頭をAI4回以上の低受胎牛群と1～3回で受胎した対照牛群に分類し、*FOXP3* 遺伝子に関連する頻度調査を実施した結果、低受胎牛群の106頭では遺伝子型GGの実測値頻度は0.08、GAは0.34、AAは0.58であった。遺伝子型GGの実測値は期待値より高かく、カイ二乗検定を行うと、 $P = 0.278$ となり、期待値との間において、HWEに適合していた (表2-1, 2-2)。一方、対照牛群845頭では遺伝子型GGの実測値頻度は0.06、GAは0.44、AAは0.50であった。これにより、カイ二乗検定を行うと、 $P = 0.002$ となり、期待値との間において、HWEに適合していなかった (表3-1, 3-2)。

表2-1 低受胎牛群 (106頭) における頻度調査

遺伝子型	実測値 (頭)	期待値 (頭)	実測値 頻度	期待値 頻度
AA	61	58.9	0.58	0.56
GA	36	40.2	0.34	0.38
GG	9	6.9	0.08	0.06
計	106	106		

表2-2 表2-1におけるアレル頻度

アレル型	n	アレル頻度
A	158	0.75
G	54	0.25

表3-1 対照牛群 (845頭) における頻度調査

遺伝子型	実測値 (頭)	期待値 (頭)	実測値 頻度	期待値 頻度
AA	422	440.4	0.50	0.52
GA	376	339.3	0.44	0.40
GG	47	65.4	0.06	0.08
計	845	845		

表3-2 表3-1におけるアレル頻度

アレル型	n	アレル頻度
A	1,220	0.72
G	470	0.28

### 3 遺伝子型別の効果

野外7農場951頭の遺伝子型別における育成時の平均AI回数については、遺伝子型GGが1.93回、GAは1.73回、AAは1.84回でリスクアレルGをホモでもつ遺伝子型GGが最も多かった(図1)。

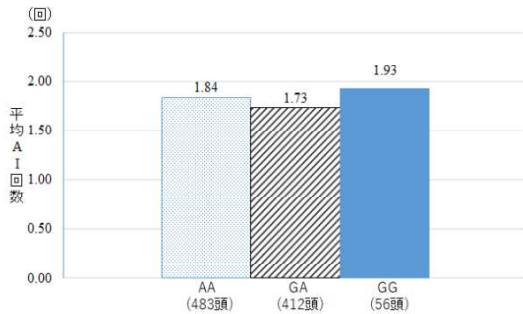


図1 各遺伝子型別の育成時の平均AI回数

### 4 新たな関連SNPの探索

QTL1については、受胎に影響する可能性がある *Teneurin transmembrane protein1 (TENMI)* 遺伝子が存在していた。この *TENMI* 遺伝子の全エクソンのうちエクソン1とエクソン5の上流の2か所において関連SNPがあることが認められた。

QTL3～6については、エクソームデータにおいて有害な変異等は検出されなかった。

### 考 察

本研究において対照牛群では、実測値と期待値との間において、HWEに適合していなかった。低受胎牛群では、遺伝子型GGは期待値より実測値が多かったが、実測値と期待値との間においては、HWEに適合していた。特定地域の黒毛和種におけるリスクアレル頻度は、低受胎を引き起こす牛群で、正常分娩歴のある牛群と比較して高いことが報告されている<sup>1)</sup>。さらに繁殖用雌馬における *FOXP3* 遺伝子の発現量については、受胎馬群と不受胎馬群を比較した場合、不受胎馬群では低値を示し、不受胎との関連があると報告されている<sup>7)</sup>。

これらのことから、野外7農場全頭、低受胎牛群および対照牛群を通してリスクアレルGの頻度が0.25～0.28、遺伝子型GGの実測値頻度が0.06～0.08であり、さらに、HWEに適合していない場合には、自然選択があるとされているため、生産現場では遺伝子型GG個体に対しては、低受胎のために早期淘汰や肥育への選択が既に行われていることが示唆された。また、低受胎牛のサンプルを十分に確保出来なかったことが、低受胎牛群でHWEに適合していなかったことを示せなかった要因

の1つとして考えられた。従って、今後も育成雌牛を中心とした低受胎牛のサンプルおよび授精記録等のデータの収集・解析を行う必要がある。

一般農場では、遺伝子型GG個体が6～8%程度しか存在しないが、低受胎牛となる割合が高いこと、育成時の平均AI回数が多いこと等から、有島ら<sup>1)</sup>の報告同様に、遺伝子型GGと低受胎は関連があることが示唆された。低受胎に関連するこれまでの報告では、低受胎牛群では正常受胎牛群に比べ、遺伝子の発現数が多く、様々な遺伝子が過剰に発現し、あらゆる機能を活性化させている可能性があり、これらが低受胎の一因となる可能性が報告されている<sup>8)</sup>。また、*FOXP3* 遺伝子以外にも胚発生に影響する *Tumor protein P53 (TP53)* 遺伝子<sup>9)</sup> や胚死滅を引き起こす遺伝子 *Cell division cycle45 (CDC45)*<sup>10)</sup> が特定されている。従って、本研究における *FOXP3* 遺伝子についても、遺伝子型AAやGAでも低受胎牛が散見される一方で、遺伝子型GG個体でも受胎している牛が存在することから、受胎に関わる複数の要因の1つであると言える。そのため、必ずしも遺伝子型GGを保有する繁殖雌牛の淘汰・肥育への選択を積極的に行う必要は無く、種雄牛造成において、リスクアレルGを保有しない選抜を行うことで、*FOXP3* 遺伝子の影響のリスクを低減させることができると考えられるため、今後の種雄牛造成への活用することができる。

また、その他の関連SNPの探索については、QTL1において確認したSNPおよびQTL3～6については、受胎との関連を今後、調査する必要がある。

最後に、受胎は飼養環境、精子、卵子、受精卵、母体など様々な要因が考えられるため、繁殖能力の遺伝的要因の解明は容易ではない。しかし生産現場にとって、飼養雌牛が受胎しないことは、経済的ダメージが大きいことから、受胎や分娩間隔といった繁殖形質の向上に関するDNA研究は重要なテーマであると考えられる。そのため、今後もサンプルおよび繁殖成績の収集を継続し、新たな関連因子の探索・特定を行っていく必要があり、種雄牛造成への活用を検討し、子牛の生産性向上の促進をはかることで、生産現場の安定した経営に貢献したい。

### 謝 辞

本稿を終了するにあたり各試験に多大なご協力を頂いた畜産技術協会、琉球大学、東京大学、全国和牛登録協会鹿児島支部並びに県内肉用牛農家の皆様に深謝いたします。

## 引用文献

- 1) Arishima.T, S.Sasaki, T.Isobe, Y.Ikebata, S.Shimbara, S.Ikeda, K.Kawashima, Y.Suzuki, M.Watanabe, S.Sugano, K.Mizoshita and Y.Sugimoto. 2017. Maternal variant in the upstream of *FOXP3* gene on the X chromosome is associated with recurrent infertility in Japanese Black cattle. *BMC Genetics* 18:103.
- 2) 橋爪一善 2015. ウシの着床・受胎機構：基礎研究からの投射, 日獣会誌 68:367-378.
- 3) Hori.S, T.Nomura and S.Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor *Foxp3*. *Science*299(5609):1057-61.
- 4) 木村康二・松山秀一 2015. 胚・母体側からのウシ低受胎要因解明, 日本胚移植研究会 37(1):27-31
- 5) 公益社団法人全国競馬・畜産振興会 2021. 畜産技術の課題と展望～30周年を迎えたJRA畜産振興事業～:4-12
- 6) 前田洋介 2012. 繁殖雌馬のプロゲステロンと妊娠免疫に関する研究, KAKEN, 2012年度実績報告書
- 7) Rowe JH, Ertelt JM, Xin L and Way SS. 2012. Pregnancy imprints regulatory memory that sustains energy to fetal antigen. *Nature*.490(7418):102-106.
- 8) Sakaguchi.S, M.Miyara, Costantino CM and Hafler DA. 2010. *FOXP3*+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 10(7):490-500.
- 9) Sasaki.S, T.Watanabe, T.Ibi, K.Hasegawa, Y.Sakamoto, S.oriwaki, K.Kurogi, A.Ogino, T.Yasumori, H.Wakaguri, E.Muraki, Y.Miki, Y. Yoshida, Y.Inoue, I.Tabuchi, K.Iwao, T.Arishima, K.Kawashima, M.Watanabe, S.Sugano, Y.Sugimoto and Y.Suzuki 2021. Identification of deleterious recessive haplotypes and candidate deleterious recessive mutations in Japanese Black cattle. *Scientific Reports*11(1):6687
- 10) 湯澤知子・福井えみ子・松本浩道・川田智弘・川野辺章夫・新楽和孝・越知正憲・吉澤緑 2001. Tumor protein p53 遺伝子分析された長期不受胎高齢ウシの体外受精成績, 日本哺乳動物卵子学会誌 28(1):75-78
- 11) 全国和牛登録協会 2016. 育種価評価の現状, 「和牛」 277:8-30

The Effect of *FOXP3* Gene Related to Repeat-breeder in Japanese Black Cattle

Yukina Yoshimura, Ryoutaro Nakashima, Taichi Arishima, Kouji Setoguchi and Takeshi Onitsuka

## Summary

In recent years, while the popularity of beef has been increasing, there is a need to increase profitability at the income of the farmer by improving the conception rate of breeding cows and shortening the calving interval. Therefore, in this study, we examined the effect of *Forkhead box P3* (*FOXP3*) gene related to repeat-breeder in Japanese Black Cattle. As a result, in both the repeat-breeding cow group (Artificial Insemination(AI) 4 times or more) and the control group (conception with AI 1 ~ 3 times), the actual measured frequency of genotype GG with infertility risk-allele G of associated SNP in the promoter region of *FOXP3* gene was as low as 0.08 and 0.06, respectively. This result suggest that selection for culling and fattening is carried out at the farm. Furthermore, the number of AI times for heifers with genotype GG at primiparity was required 1.93, which was higher than that of other genotypes GA(1.73) and AA(1.84).

Keywords : *FOXP3* gene, Japanese Black Cattle, Repeat-breeder, SNP