HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	PCR-RFLP法による北海道和種馬のExtension遺伝子座の遺伝子型判定
Author(s)	上田, 純治; 荻野, 敦; 高橋, 米太; 中城, 敏明; 富岡, 輝男; 平, 克郎; 秦, 寛; 清水, 弘
Citation	北海道大学農学部牧場研究報告, 18, 1-7
Issue Date	2001-03-31
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/48962
Type	bulletin (article)
File Information	18_1-7.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北大牧場研究報告　18：1～7（2001）

PCR-RFLP法による北海道和種馬のExtension遺伝子座の遺伝子型判定

上田　純治・荻野　　敦・高橋　米太*・中城　敏明*・富岡　輝男*・平　　克郎*・秦　　寛*・清水　　弘

北海道大学大学院農学研究科、札幌市 060-8589　　*同農学部附属牧場、静内町 056-0141

要　　旨

上田純治・荻野　敦・高橋米太*・中城敏明*・富岡輝男*・平　克郎*・秦　寛*・清水　弘（1999）PCR-RFLP法による北海道和種馬の Extension 遺伝子座の遺伝子型判定，北大農学部牧場研究報告18：

ウマの基本毛色は鹿毛、青毛、栗毛であり、これらは Agouti とExtension の２つの遺伝子座よって遺伝支配されている。最近、*extension* 遺伝子はメラニン細胞刺激ホルモンリセプター(MC1R)をコードしていることが明らかにされ、その遺伝的変異を PCR-RFLP 法によって調べることで、Extension 遺伝子座の遺伝子型（*EE*、*Ee*、*ee*）の判定が可能とされている。しかし、品種によっては異なる結果も報告されている。そこで、北海道和種馬について、基本毛色と、河原毛、月毛、佐目毛のそれぞれの個体のMC1Rの遺伝的変異をPCR-RFLP法より調べ、Extension 遺伝子座の遺伝子型を推定することが可能かどうかについて検討した。PCR-RFLP法で得られた結果は、全ての栗毛と月毛のウマは *ee* のホモ、それ以外の毛色のウマは *EE* か *Ee* の遺伝子型とする従来の結果と一致した。このことから、北海道和種馬においても、このPCR-RFLP法によってExtension 遺伝子座の遺伝子型を判定することが可能であり、親ウマの遺伝子型から栗毛や月毛の子馬の産まれる割合をより正確に予測できるものと考えられた。

キーワード：北海道和種馬、毛色、栗毛、Extension 遺伝子座、PCR-RFLP

序

ウマの毛色には種々の表現型が存在し、それらは多数の遺伝子座の遺伝子によって支配されているが、各々の毛色の発現機構やその遺伝様式については、まだ明らかにされていないものが多い[4,13]。栗毛の遺伝様式については、青毛や鹿毛の表現型に対して劣性形質であることが昔から知られている[6]。ウマの栗毛はマウスやその他のほ乳類に見られる色を淡くするExtension 遺伝子座の劣性対立遺伝子（*e*）により発現される形質とよく似た遺伝様相をすることから、同じ形質ではないかとされ[2]、また、ウマとマウスの比較遺伝子地図による研究からも相同な遺伝子ではないかとされている[1]。マウスのExtension 遺伝子座の遺伝子はメラニン細胞刺激ホルモン（MSH)のレセプター（MC1R）をコードしていることをRobbinsら[12]

が明らかにしたことに基づき、Marklundら[10]も、ウマの栗毛とこのMC1Rをコードする遺伝子の塩基配列の変異との関係を調べている。彼らは、ウマの栗毛は*MC1R*遺伝子の83番目のアミノ酸、セリンをコードするの塩基配列TCCがフェニルアラニンのTTC に突然変異し、ホモ接合体のとき発現すると報告している。しかし、アラブ種を用いた研究において、同部位の変異と栗毛とは必ずしも関連していないという報告もある[8]。マウスのExtension 遺伝子座には複数の箇所に遺伝的変異が報告されているので、ウマの場合にも同一遺伝子座の異なった箇所に複数の変異部位が存在することが考えられる。そこで、本研究では、Marklundら[10]が報告した変異部位と栗毛との関係が、北海道和種馬にも当てはまるがどうかをPCR-RFLP法により検討した。また、家系の明らかな親ウマと子ウマの遺伝子型を調べ、遺伝様相についても分析し、実際に産まれてくる子ウマの毛色の予測に応用が可能かどうかについても考察した。

材料並びに方法

供試動物

北海道大学農学部附属牧場の北海道和種馬群の中から、２父家系の血統の明らかな107頭を実験に供試した。各毛色の分布は、青毛16頭、鹿毛34頭、栗毛36頭、河原毛13頭、月毛７頭、佐目毛1頭であった。

白血球の分離とＤＮＡの抽出

頚静脈からヘパリン処理注射筒にて約10mlの血液を採血し、EDTA添加試験管に移し氷冷した。これに40mlの$T_{10}E_{10}$[10mM Tris-HC 1 (pH7.5), 10mM EDTA 2 Na]を加え、穏やかに10分間混合し赤血球を溶血させた。遠心後(4℃,2000×g,10分)、40mlの$T_{10}E_{1}$[10mM Tris-HC 1 (pH7.5), 1 mM EDTA 2 Na]にて白血球を２回洗浄し、白血球のペレットを得た。

白血球ペレットに1mlのTE[10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA 2 Na]を加えよく浮遊後、Lysed Buffer [4MUrea、0.2MNaCl, 0.1MTris-HCl (pH8.0), 10mMED-TA 2 Na, ２％SDS]20mlと Proteinase K(10mg/ml)を100μl 加え、50℃で一晩振盪しタンパク質を分解した。次に、等量のPCI(フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール=25:24:1)を加えDNAの抽出操作を３回繰り返し精製した後、エタノール沈殿法により回収した。回収DNAは減圧乾燥後、５～10mlのTEに溶解し、使用まで４℃で保存した。

PCR-RFLP法による遺伝子型の判定

Marklundら[10]が Extension 遺伝子座としてクローニングした*MC1R*遺伝子の塩基配列を基に、*Taq*I認識配列の遺伝的変異を挟む様に、一対のプライマー、MCR1F（5′-GATGGG

CTCTTCCTCAGCCT)、 MCR1R(5'-ATGTAGCGGTCTACGGCAATG) を設計し、PCRによってDNAを増幅した。PCR反応液の組成はテンプレートDNA(50-100μg/ml) 1 μl、10×Tag Universal Buffer 1μl、dNTP Mixture (各2.5mM) 0.8μl、各-プライマー (20pmol/μl) をそれぞれ0.5μl、Taq DNA Polymerase (5 units/μl)0.05μlに滅菌蒸留水を加え全量10μlにした。PCR反応は93℃ 3分 (1 サイクル)、93℃30秒、65℃ 1 分、72℃1分 (35サイクル)、72℃10分 (1 サイクル) で行った。反応終了後、増幅産物5μlに10×Reaction Bufferを2.5μl、*Taq*I制限酵素 (10U/μl) 0.1μl、BSA (20mg/ml) 0.05μlに滅菌蒸留水を加えて全量25μlとし、65℃一晩 (20時間以上) 反応させた。反応液10μlを3%のアガロースゲルで電気泳動後、増幅産物の切断の有無から遺伝子型の判定を行った。

結　　果

PCR - RFLPと遺伝子型

北海道和種馬の107頭について、ゲノミックDNAをテンプレートにし、Marklundらが報告したメラニン細胞刺激ホルモン (MSH) のレセプター (MC1R) をコードする遺伝子の遺伝的変異を含む塩基配列部位をPCR法によって増幅した。増幅産物を制限酵素*Taq*Iで処理し、アガロースゲル電気泳動により制限酵素処理増幅産物を分析した結果、Figure 1 に示すような 3つのタイプ (TaqI$^-$/TaqI$^-$、TaqI$^-$/TaqI$^+$、TaqI$^+$/TaqI$^+$) の電気泳動像を得た。期待されたように308bpの増幅産物と183 bp、125bpの2つの制限酵素切断断片のバンドが出現し、308bp 1 本のバンドを持つ個体 (TaqI$^-$/TaqI$^-$)、308bp、183bp、125bpの 3 本のバンドを持

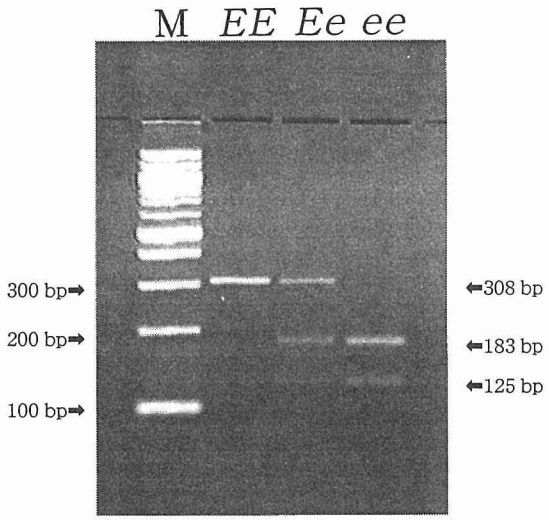

Figure 1. PCR - RFLP analysis of extension locus in Hokkaido native horses.
M:100bpDNA ladder marker, EE:dominant homozygote(Taq I$^-$/Taq I$^-$)
Ee:heterozygote(Taq I$^-$/Taq I$^+$), ee:recessive homozygote(Taq I$^+$/Taq I$^+$)

つ個体（*Taq*I⁻/*Taq*I⁺）、183bp、125bpの２本のバンドを持つ個体（*Taq* I⁺/*Taq* I⁺）の３イプの表現型に分類できた。泳動像から183bp、125bpのバンドは308bpのバンドが制限酵素Taq。で切断されて出現したものであると思われた。Table 1にウマの毛色とPCR-RFLP型から判定したExtension 遺伝子座の遺伝子型との関係を示した。栗毛と月毛の個体は全て *ee* であり、その他の毛色の個体は *EE* か *Ee* の遺伝子型であった。これらの結果は、Marklundら[10]の報告と同様、Extension 遺伝子座の*EE*、*Ee*、*ee*の遺伝子型とMC1Rのそれぞれの*Taq*I⁻/*Taq*I⁻、*Taq*I⁻/*Taq*I⁺、*Taq*I⁺/*Taq* I⁺の遺伝子型とは対応していることを明にするものであった。

遺伝子型と毛色の遺伝

Table 2 に２頭の種牡馬とその交配から産まれた子ウマのExtension 遺伝子座の遺伝子型

Table 1. The relationship between coat color and genotype of extension locus.

Extension \ Color	Black	Bay	Chestnut	Buckskin	Palomino	Cremello	Total
EE	2	8	0	0	0	0	10
Ee	14	26	0	13	0	1	54
ee	0	0	36	0	7	0	43
Total	16	34	36	13	7	1	107

Table 2. Segregation of progeny genotypes produced by the various matings.

Male genotypes (horse name)	Female genotypes	No. of matings	No. of Progeny *EE**	*Ee**	*ee***
Ee (Arashiyama)	*EE*	2	2	2	
	Ee	7		7	2
	ee	8		6	6
ee (Katsunami)	*EE*	12		13	
	Ee	15		9	14
	ee	11			13

*Black, Bay, Buckskin, Cremello　　**Chestnut, Palomino

を示した。この家系分析の結果から、子ウマの対立遺伝子はどちらかの親ウマに存在しており、*E*と*e*遺伝子は一対の対立遺伝子としての遺伝関係にあるという仮説には矛盾がなかった。このことから、北海道和種馬においても、栗毛はExtension 遺伝子座上の劣性対立遺伝子(*e*)がホモの状態で発現することが確かめられた。また、外見上からは栗毛や月毛以外の毛色の親ウマの遺伝子型を判定することは不可能なので、栗毛の子ウマの生まれる確率を推定することはできない。しかし、PCR - RFLP法によって親ウマの遺伝子型が *EE* か *Ee* かであるかを判定できるようになるため、栗毛の子ウマの産まれる確率を正確に推定することが可能になると思われる。

考　　察

哺乳動物の毛や表皮の色素であるメラニンは、表皮基底層及び毛根に存在する神経冠細胞由来のメラニン細胞のメラノソームにおいて、アミノ酸のチロシンからチロシナーゼによって生合成される。合成されたメラニン色素は細胞の樹状突起を通じて周辺の細胞に移行し沈着することで、肉眼的に色として確認されるようになる。種々の毛色の色調はこのメラニン色素の質と量によっている。即ち、チロシンからメラニンの合成に与るチロシナーゼ活性が強い時、チロシンはユーメラニン（黒色色素）に合成され、活性が弱い時、フェオメラニン（赤/黄色色素）に生合成される。その結果、毛色の違いが生じる[7]。チロシナーゼの活性は、脳下垂体中葉から分泌されるメラニン細胞刺激ホルモン(MSH)とその拮抗物質および細胞表面のホルモンレセプター(MC1R)により調節されている[3, 9]。MC1Rとその拮抗物質は、マウスにおける研究から、それぞれ Extension 遺伝子座とAgouti 遺伝子座の遺伝子によってコードされていることが判明している[3, 9]。

ウマの栗毛もこのExtension 遺伝子座の遺伝子によってコードされるMC1Rのアミノ酸の1塩基置換により生じた劣性対立遺伝子（*e*）をホモに持つことで、レセプターの機能が変化し、チロシナーゼの活性が低下することによって黄色のフェオメラニンが合成されるためとされている[10]。劣性対立遺伝子（*e*）の遺伝的変異はその塩基配列が*Taq* I 認識部位になることから、PCR - RFLP法による検出が可能である。しかし、アラブ種ではこのPCR - RFLP法で調べられる変異部位は栗毛との間連性で例外も認められたとの報告もされている。そこで、本研究では北海道和種馬を用いて、このPCR - RFLP法の有効性について検討した。本研究の結果は、栗毛か月毛の毛色のウマは全て*Taq*I認識部位をホモに持つ個体であった。Kriegesmannら[8]の調べたアラブ種のウマでは、同遺伝子の異なる部位の塩基配列に変異が存在しているのかも知れない。

ウマの基本毛色は、他の遺伝子座の遺伝子との相互作用により、外見上、本来の基本毛色とは異なった毛色となる場合がある。北海道和種馬にはこのような基本毛色の発現が隠蔽された河原毛や月毛のウマが多頭数存在する。PCR - RFLP法を用いるとExtension 遺伝子座の遺

伝子型からだけで栗毛の形質を判定できるため、月毛の個体は、栗毛の基本毛色に月毛の遺伝子をヘテロに持つことによって生じていることが確かめられた。さらに佐目毛（アルビノ様）の個体は基本毛色は鹿毛の個体であり、月毛の遺伝子をホモに持つとにより発現することも確かめられた。また、栗毛の馬は親の遺伝子型が不明な場合、全ての組み合わせの交配から産まれる可能性があるが[4, 12]、非栗毛のウマのExtension 遺伝子座の遺伝子がヘテロかホモかをDNAレベルで明らかにすることで、産まれてくる子馬の毛色の予測が可能になることも示された（Table 2）。このことは、登録や親子鑑定の際に役に立つ情報となりうると思われる。たとえば、青毛や鹿毛、河原毛のウマは、Extension 遺伝子座が優性の*EE*のホモか、*Ee*のヘテロである。外見では区別がつかないが、本研究の方法によって区別することが可能である。*EE*のホモの青毛や鹿毛、河原毛の個体からは、栗毛の子馬が産まれることはない。*Ee*のもの同士の交配が行われるときだけ、栗毛の子馬が産まれる可能性がある。

本研究でのPCR - RFLP法に用いるサンプルDNAは採血によって血液中の白血球から得たが、PCR法は毛根のようなサンプルをテンプレートにしても目的の塩基配列を増幅することが可能になっている[14, 15]。さらに、Agouti 遺伝子座の遺伝子型の判定も可能になれば、産まれてくる子馬の基本毛色の予想が一層可能になるものと考えられる。特に、血統登録の際に、これらの遺伝子型が調べられ登録簿に記載されれば、登録上の誤りの防止と飼養者が望む基本毛色の子馬を得るために役に立つ情報となりうると思われる。

引　用　文　献

1）Adalsteinsson, S., Inheritance of the palomino color in Icelandic horses. J.Hered., 65 : 15-20, 1974.

2）Adalsteinsson,S. and K.Sandberg, A linkage group composed of three coat colorgenes and three serum protein loci in horses. J.Hered., 73 : 91-94, 1982.

3）Blanchard,S.G., C.O.Harris, O.R.R.Ittoop, J.S.Nichols, D.J.Parks, A.T.Truesdaleand W.O.Wilkison, Agouti antagonism of melanocortin binding and action in the $B_{16}F_{10}$murine melanoma cell line. Biochemistry, 34 : 10406-10411, 1995.

4）Bowling,A.T., Horse genetics. CAB international, Cambridge, UK, 1996.

5）Chhajlani,V. and J.E.S.Wikberg, Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA. FEBS Lett., 309 : 417-420, 1992.

6）Hurst, C.C., On the inheritance of coat colour in horses. Proc.Roy.Soc., 77 : 388-394, 1906.

7）Jackson,I.J., Colour - coded switches. Nature, 362 : 587-588, 1993.

8）Kriegesmann,B., S.Jansen, S.M.Bishop and B.Brenig, The equine MSH - R TaqI RFLP is not informative for hair color in Arabian horses. Anim. Genet., 27 : 64, 1996.

9）Lu,D., D.Willard, I.R.Patel, S.Kadwell, L.Overton, T.Kost, M.Luther, W.Chen, R.P.Woychik, W.O.Wilkison and R.D.Cone, Agouti protein is an antagonist of the melanocyte - stimulating - hormone receptor. Nature, 371 : 799-802, 1994.

10）Marklund,L., M.Johansson, K. Sandberg and L. Andersson, A missense mutation in the gene for melanocyte - stimulation hormone receptor(MC1R) is associated with the chestnut coat color in horses. Mammalian Genome, 7 : 895-899, 1996.

11）Mountjoy,K.G., L.S.Robbins, M.T.Mortrud and R.D.Cone, The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. Science, 257 : 1248-1251, 1992.

12）Robbins,L.S., J.H.Nadeau, K.R.Johnson, M.A.Kelly, L.R.Rehfuss, E.Baack, K.G.Mountjoy and R.D.Cone, Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function.

Cell. 72 : 827-834, 1993.
13) Sponenberg,D.P., Equine color genetics. Iowa state University Press, Ames, Iowa, USA, 1996.
14) Bowling,A.T., M.L.Stott and L.Bickel, Silent blood chimaerism in a mare confirmed by DNA marker analysis of hair bulbs. Anim. Genet. 24 : 323 - 324, 1993
15) Wilson,M.R., D.Polanskey, J.Butler, J.A. DiZinno, J. Replogle and B. Budowle, Extraction, PCR amplification and sequencung of mitochondrial DNA from human hair shafts. Biotechniques, 18 : 662 - 669, 1995.

PCR - RFLP analysis of Extension locus in Hokkaido native horses

Junji UEDA • Atsushi OGINO • Yoneta TAKAHASHI* • Toshiaki NAKAJO* • Teruo TOMIOKA* • Katsuro TAIRA* • Hiroshi HATA* and Hiroshi SHIMIZU

Graduate school of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060 - 8589, Japan
**Livestock Farm, Faculty of Agriculture, Hokkaido University Shizunai, 056 - 0141, Japan*

The bay, chestnut, and black colors of horses were genetically controlled by the Agouti and Extension loci. The Extension locus encodes the melanocyte - stimulating hormone receptor gene, the major candidate gene for chestnut coat color in horses. Recently, PCR - RFLP analysis using genomic DNA was able to determine the genotypes of Extension locus in European breeds of horses . However, it has also been reported that this method could not determine their genotypes in Arabian horses.

So, we are trying to examine the DNA types of Extension locus in various coat color of Hokkaido Native horses. The results show that the whole of chestnut and palomino horses have ressesive ee genotype , and all of other color horses have *EE* or *Ee* genotypes. From the data of various type of mating for Extension locus we confirm to be able to estimate the birth ratio of chestnut or palomino foals.