

機関番号：82112

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20380151

研究課題名 (和文) ウシのストレス感受性および社会的親和性に関連する遺伝子の特定

研究課題名 (英文) Identifying responsible genes involved in stress sensitivity and social affiliation in cattle.

研究代表者

矢用 健一 (YAYOU KENICHI)

独立行政法人農業生物資源研究所 脳神経機能研究ユニット 主任研究員

研究者番号：40343967

研究成果の概要 (和文)：

ウシの脳内でストレス反応の抑制作用を持つオキシトシンに着目し、初生時の末梢血中オキシトシンが行動発達に影響を与えている可能性を示した。また、オキシトシン受容体遺伝子および分泌調節に深く関与する CD38 の遺伝子多型が、ストレス感受性、社会行動特性、泌乳量などに影響を及ぼしている可能性を明らかにした。これらの知見は、ウシの環境順応性を高める (ストレス感受性を下げる・社会的親和性を高める) ための新たな育種選抜指標を選定するための基礎的知見として意義がある。

研究成果の概要 (英文)：

In cattle oxytocin might be involved in the regulation of behavioral and physiological stress responses in the brain. We showed that neonatal oxytocin could be involved in the behavioral development in calves. Moreover, our data suggested that oxytocin receptor gene promoter region polymorphisms and CD38 single nucleotide polymorphism might be influenced stress sensitivity, social affiliation, and milk production in cattle. These findings help to develop new breeding strategy focused on adaptability to their environment in cattle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2009 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2010 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：神経行動学

科研費の分科・細目：分科 畜産学・獣医学／細目 畜産学・草地学

キーワード：ストレス感受性・社会的親和性・行動遺伝子・遺伝子多型解析・オキシトシン受容体遺伝子・オキシトシン・CD38 遺伝子・一塩基多型

1. 研究開始当初の背景

家畜福祉の考え方の基、家畜にかかるストレスを低減する飼養管理技術に関する研究が進展している。ストレスは生産性を低下させるばかりではなく抗病性の低下をま

ねき抗生剤の多用にもつながる。消費者にもストレスフリーの家畜から生産された畜産物に対する関心が広がっており、家畜福祉だけではなく、安心・安全な畜産物を確保していく上でも、家畜のストレス反応を低減する

技術の開発は重要である。一方で、我々の研究からウシのストレス感受性等の環境順応に関わる特性には大きな個体差が存在することが科学的に明らかとなってきた。このことは、現在進行しているストレスを低減する飼養管理技術の開発とは全く別の視点からウシの環境順応性を高める（ストレス感受性を下げる・社会的親和性を高める）新たな育種選抜指標を開発し、ウシのストレス反応を低減できる可能性を示している。

我々はウシのストレス負荷時の行動反応や社会行動には個体差があることを明らかにしている。このような行動特性の個体差の背景には、行動発現に関わる脳内神経伝達物質の制御機構に差があることが予想される。我々はこれまでにウシでは副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンがストレス反応の主たるアクセルとして、オキシトシン (OXT) がブレーキとして働いていることを明らかにした。さらに OXT はストレス反応の調節に関わっているだけでなく、社会行動、特に社会的認識にも関与していることが、齧歯類等で明らかになっている。

行動特性の個体差にはこれら脳内神経伝達物質のニューロンおよび受容体の遺伝子多型が関与していることが明らかになってきている。ヒトでは OXT 受容体遺伝子の 4 つの SNPs と自閉症との関連が報告されている。またハタネズミでは、バソプレッシン 1 型受容体 (V1aR) 遺伝子の 5 末端調節領域にあるマイクロサテライト多型が脳内 V1aR 分布パターンおよび社会行動に関連していることが明らかになっている。しかし、ウシでは産乳量や産肉量などの量的形質に関わる遺伝子多型の研究は盛んに行われているものの、本研究で着目したような行動特性に関与する遺伝子多型の探索は試みられていない。

2. 研究の目的

本研究ではウシのストレス感受性および社会的親和性の個体間/品種間差に関与する脳内神経伝達物質/受容体の遺伝子多型を特定することを目的とし、研究期間内に以下の 4 点を明らかにすることを目指した。

(1) 成長過程を通じたウシのストレス感受性および社会的親和性の個体間差 (ホルスタイン種) と品種間差 (黒毛和種 VS 褐毛和種)

(2) ウシのストレス感受性および社会的親和性の個体間差 (ホルスタイン種) および品種間差 (黒毛和種 VS 褐毛和種) に関連すると考えられる脳内神経伝達物質および受容体をコードする遺伝子多型

(3) 上記で明らかになった行動特性の個体間/品種間差と遺伝子多型との関連を検討し、ウシのストレス感受性および社会的親和性に関連する候補遺伝子多型を複数個同定

(4) 候補遺伝子多型が脳内で遺伝子発現量調節に関わることを確認し、ウシのストレス感受性および社会的親和性に関連する遺伝子多型を特定

3. 研究の方法

(1) **末梢血中 OXT 濃度とストレス感受性との関連**: ホルスタイン種雌牛 9 頭を用い、生後 14 日齢でのオープンフィールドテストおよび驚愕反応テストにおける行動反応および血漿中コルチゾル濃度上昇率を主成分分析し、個体毎の行動形質を算定した。両テスト前後で得た血漿中 OXT 濃度から OXT の基礎濃度 (前) および OXT の上昇率 (後/前 x 100) を求め、個体の行動形質との関連を検討した。

(2) **初生時オキシトシンとストレス感受性/社会行動特性/生産関連形質との関連**: 齧歯類では、初生時に末梢血中に分泌された OXT が中枢に作用し、ストレス感受性に関連する脳の組織形成に関わっていると報告されている。そこで、生後から搾乳までの期間に行った行動調査から得られた行動特性の個体差と、初生時の末梢血中 OXT 濃度との関連を明らかにすることを目的とした。

ホルスタイン雌牛 20 頭の、生後 1 週齢、2 週齢、6 週齢における朝の人工哺乳開始前、開始後 1、2、5 分における血漿中 OXT 濃度を測定し、以下の個体特性との関連を検討した。

ストレス感受性: 新奇環境ストレスとして 14 日齢および 60 日齢にオープンフィールドテストを行い、新奇環境に対する行動反応を主成分分析し、ストレス感受性に関わる行動特性指標を得た。また、初回人工受精 (15 ヶ月齢) および初回搾乳作業時 (24 ヶ月齢) の作業に対する忌避反応として蹴り・脚の踏み替え・脚挙げの回数を記録し、ストレス感受性の指標とした。

社会行動特性: 42 日齢での群編入後、1 および 2 日目における 2 時間の社会行動および 10 ヶ月齢での群編入後 1 日、1 週、1 ヶ月および 5 ヶ月目における 6 時間の社会行動を主成分分析し、各記録日における社会行動特性に関わる行動特性指標を得た。

生産関連形質: 平均日増体量 (生後から離乳 [生後 42 日齢] まで、42 日齢での群編入後 2 週間、10 ヶ月齢での群編入後 2 ヶ月) および初産時 305 日乳量を記録した。

(3) **オキシトシン受容体遺伝子多型とストレス感受性との関連**: 家畜改良センター熊本牧場の褐毛和種 72 頭を用いた。通常とは異なる体重測定方法および連動スタンションと頭絡による保定後の採血に対する行動反応を 5 段階にスコア化した (1: ほぼ無抵抗 ~ 5: 抵抗が非常に大きい)。行動調査を行ったウシの血球成分より DNA を抽出し、OXT 受容体遺伝子のプロモーター領域に存在す

るマイクロサテライトを挟むように設計したプライマーを用いPCRを行った。得られた3種類のマイクロサテライト多型間で行動反応スコアを比較した。

(4) **CD38 遺伝子多型とストレス感受性/社会行動特性/生産関連形質との関連**：(2)で初生時における OXT 濃度測定および行動解析を行った上記 20 頭の血球成分からゲノム DNA を抽出し、CD38 遺伝子の SNP 解析 (PCR 増幅産物をダイレクトシーケンシング) を行い、得られた多型と個体行動特性および血漿中 OXT 濃度との関連を検討した。

4. 研究成果

(1) **末梢血中オキシトシン濃度とストレス感受性との関連**：生後 14 日齢において血漿中 OXT 基礎濃度と新奇環境に対する行動形質のうち「新奇環境に対する探査欲求」の間に有意な負の相関が認められた。一方、新奇環境における OXT の上昇率は「一般的な活動性」と有意な負の相関を示した (表 1)。

表 1 主成分分析によって得られた個体の行動形質と血漿中オキシトシン濃度との関連

	Basal oxytocin concentration (n=9)	%-change in oxytocin concentration (n=9)
1st Principal Component Curiosity	- 0.683*	- 0.383
2nd Principal Component General Activity	- 0.500	- 0.717*
3rd Principal Component Fearfulness	0.583	0.233
4th Principal Component Dependence on Human	0.350	0.433

*: The coefficients are significant ($p < 0.05$).
(Modified from Yayou et al. 2010)

(2) **初生時オキシトシンとストレス感受性/社会行動特性/生産関連形質との関連**：1、2、6 週齢の初生期間では、哺乳開始前の血漿中 OXT 濃度 (基礎濃度) には一貫した大きな個体差が認められた。人工哺乳により血漿中 OXT 基礎濃度はいずれの個体でも上昇したが、一貫した個体差は認められなかったことから、OXT 基礎濃度と個体特性との関連を検討した。

生後 1 および 2 週齢の OXT 基礎濃度が高い個体ほど 14 日齢での新奇環境への探査傾向が有意に小さいことが明らかとなり、初生時の末梢血中 OXT が行動発達に影響を与えている可能性が示唆された。しかし、現場で問題となるような作業への忌避反応と初生時 OXT 基礎濃度の間に相関は認められなかった。

社会行動特性では、6 週齢 OXT 基礎濃度が高い個体ほど 42 日齢での群編入後 1 日目の被敵対逃避傾向 (消極的) および 2 日目の親和傾向が大きい傾向が認められた。また、生後 1, 2 週齢の OXT 基礎濃度が高い個体ほど 10

ヶ月齢での群編入後 1 週目における疎外傾向および 1 ヶ月目における親和傾向 (非受容) が大きく、5 ヶ月目における不干涉/無反応傾向が小さかった (図 1)。

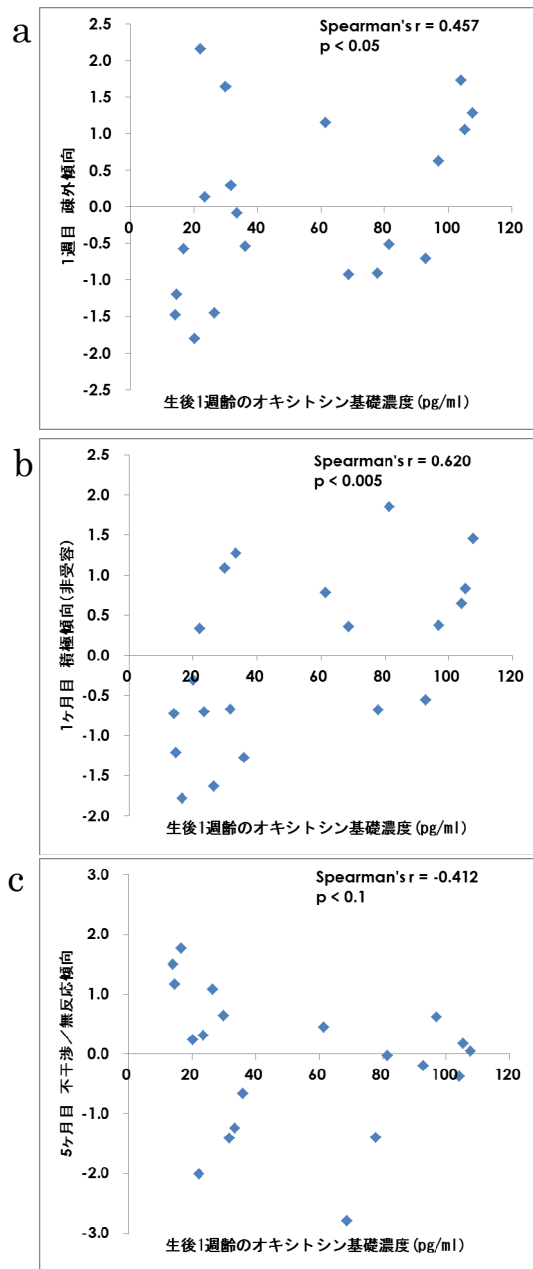


図 1 生後 1 週齢のオキシトシン基礎濃度と 10 ヶ月齢での群編入後 1 週目 (a)、1 ヶ月目 (b)、および 5 ヶ月目 (c) の社会行動特性との関連。生後 1, 2 週齢の OXT 基礎濃度が高い個体ほど群編入後 1 週目における疎外傾向および 1 ヶ月目における親和傾向 (非受容) が有意に大きく、5 ヶ月目における不干涉/無反応傾向が小さい傾向にあった。スピアマン順位相関係数および有意水準は図中に記載。

生産関連形質では、生後 1、2、6 週齢の OXT 基礎濃度が高い個体ほど 42 日齢での群編入後 2 週間の平均日増体量が多かった。一方、生後から離乳 (42 日齢) まで、および 10 ヶ月齢での群編入後 2 ヶ月間の平均日増体量および初産時 305 日乳量と OXT 基礎濃度との間には相関は認められなかった。

以上のことから、初生時の血漿中 OXT 基礎濃度が高い個体ほど、新たな環境変化に対して消極的に反応すること、新たな社会環境に対しても当初は消極的な反応をするものの、時間経過に伴い他個体に対する親和的接触傾向が増加し、他個体への関わりが増える傾向があることなどが明らかとなり、初生時における脳内の OXT が行動発達に影響を与えている可能性が示唆された。しかし、現場で問題となる人からの作業に対する忌避反応や将来的な乳量等の生産形質には OXT だけではなく様々な因子が関与しており、初生時 OXT 基礎濃度だけでは推測し得ないものと考えられた。

(3) オキシトシン受容体遺伝子多型とストレス感受性との関連: 褐毛和種の OXT 受容体 (*OXR*) 遺伝子のプロモーター領域を PCR 法で解析 (n = 72) したところ、その増幅産物から 3 種類の型が確認された。アガロースゲル上で約 460 bp 付近に DNA バンド 1 本が検出される型を S 型、約 500 bp と約 460 bp 付近に 2 本の DNA バンドが検出される型を D 型 (図 1)、約 500 bp、約 460 bp、約 400 bp 付近の 3 本の DNA バンドからなる型を T 型とした (PCR 増幅産物長は DNA サイズマーカーとの比較による推定長)。また、それぞれの出現頻度は S 型が 63.9% (n = 46)、D 型が 31.9% (n = 23)、T 型が 4.2% (n = 3) であった。

S 型 (n = 31) と D 型 (n = 12) の間で、採血テストと体重測定テストのそれぞれの場面 1 から 3、それぞれのテストにおける場面 1 から 3 の気質スコア合計、ならびに全 6 場面の気質スコア総計について比較を行った。その結果、採血テストの場面 1: 拘束準備中 (S 型: 0.052 ± 0.119 , D 型: 0.040 ± 0.097) と体重測定テストの場面 3: 体重計での反応 (S 型: 0.139 ± 0.163 , D 型: 0.133 ± 0.257) を除いて、D 型が S 型より高い値を示す傾向であったが、有意差は認められなかった。

次に、S 型と D 型それぞれで、体重測定テストの場面 1 から 3 の気質スコア合計と月齢との相関を解析した。その結果、D 型において $r = -0.881$ ($P < 0.001$) と強い負の相関が認められた。S 型では $r = -0.519$ ($P < 0.005$) であった。採血テストの場面 1 から 3 の気質スコア合計については、S 型と D 型ともに月齢との相関は認められなかった。また、

採血テストと体重測定テスト全 6 場面の気質スコア総計と月齢との相関は、D 型において $r = -0.818$ ($P < 0.005$) と強い負の相関が認められた。S 型では $r = -0.492$ ($P < 0.005$) であった (図 2)。

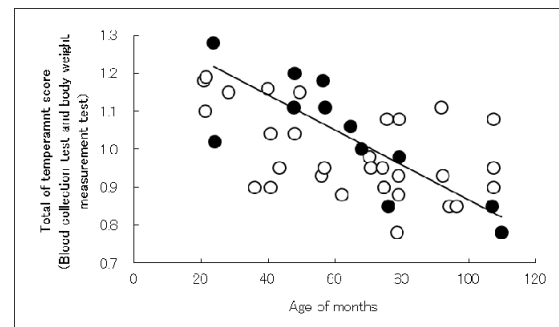


図 2 採血テストと体重測定テスト全 6 場面の気質スコア総計と月齢との関係

オキシトシン受容体遺伝子のプロモーター領域を PCR 法で解析。○: S 型 (n = 31), ●: D 型 (n = 12)。S 型 ($r = -0.492$), D 型 ($r = -0.818$) とともに有意な相関が認められたが D 型でより強い相関であった。

(4) CD38 遺伝子多型とストレス感受性/社会行動特性/生産関連形質との関連: CD38 遺伝子エキソン 2 の前後のイントロン (前 18 塩基 C or T および後 108 塩基の位置 G or T) に SNP を発見した。アレル頻度はそれぞれ C73.7% or T26.3%、G89.5% or T10.5%、前後の組み合わせで CG68.4%、TG21.1%、CT5.3% or TT5.3% であった。統計解析可能な C or T および CG or TG 間で初生時の OXT 基礎濃度、ストレス感受性、社会行動特性および生産関連形質を比較したところ、初生時の OXT 基礎濃度に差は認められなかった。しかし、60 日齢での新奇環境に対する行動反応特性「社会的隔離の解消欲求に伴う活動性の増加傾向」は T 型および TG 型において有意に大きかった ($p < 0.05$)。社会行動特性では 10 ヶ月齢での群編入後 1 ヶ月目の社会行動特性「積極傾向 (非受容)」が T 型および TG 型において大きい傾向が認められた ($p < 0.1$)。さらに、生産形質のうち初産時 305 日乳量が T 型および TG 型において多い傾向が認められた (図 3; $p < 0.1$)。

以上のことから、OXT の分泌制御に関与すると考えられる表面抗原 CD38 遺伝子の第 2 エキソン前後の SNPs は初生時の血漿中 OXT 濃度との関連はないものの、成長後のストレス感受性、社会行動特性、泌乳量などに影響を及ぼしている可能性が示唆された。

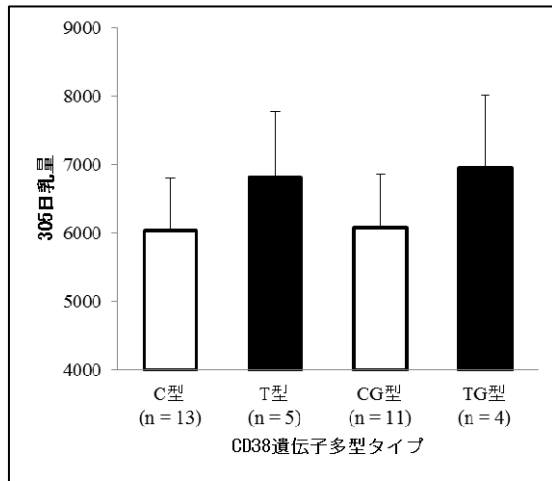


図3 CD38 遺伝子多型間での 305 日乳量の比較

エキソン2前後のイントロンに存在するSNPs (前18塩基 C or T および後108塩基の位置 G or T) およびその組み合わせ間で305日乳量 (平均値+SD) を比較した。305日乳量はC型に比べてT型で、またCG型に比べてTG型で多い傾向が認められた ($p < 0.1$)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

1. Kitagawa S, Abe N, Sutoh M, Kasuya E, Sugita S, Aoyama M, Yayou K (2011) Effect of intracerebroventricular injections of prolactin-releasing peptide on prolactin release and stress-related responses in steers *Animal Science Journal* 82(2):314-319
2. Yayou K, Ito S, Yamamoto N, Kitagawa S, Okamura H (2010) Relationships of stress responses with plasma oxytocin and prolactin in heifer calves. *Physiology & Behavior* 99(3):362-369
3. Yayou K, Kitagawa S, Ito S, Kasuya E, Sutoh M (2009) Effects of intracerebroventricular administration of neuromedin U or neuromedin S in steers *General and Comparative Endocrinology* 163(3):324-328
4. Yayou K, Nakamura M, Ito S (2009) Effects of AVP V1a and CRH receptor antagonist on psychological stress responses to frustrating

condition in sheep *Journal of Veterinary Medical Science* 71(4):431-439

5. Yayou K, Ito S, Kasuya E, Sutoh M, Ohkura S, Okamura H (2008) Intracerebroventricularly administered oxytocin attenuated cortisol secretion, but not behavioral responses, during isolation in Holstein steers *Journal of Veterinary Medical Science* 70(7):665-671

[学会発表] (計21件)

1. Yayou K, Effects of intracerebroventricular administration of oxytocin or prolactin-releasing peptide on feeding behavior in cattle. The 44th Congress of the International Society for Applied Ethology, 13, August, 2010, Uppsala, Sweden
2. 矢用健一, ウシの採食行動へのオキシトシンおよびプロラクチン放出ペプチド脳室内投与の効果 日本畜産学会第112回大会, 2010年3月28日, 東京都千代田区
3. 伊藤秀一, 夏季放牧における褐毛和種と黒毛和種の行動 日本家畜管理学会・応用動物行動学会 2010年度春期研究発表会, 2010年3月29日, 東京都千代田区
4. 矢用健一, ウシ第3脳室へのニューロメジンUおよびS注入の効果 日本畜産学会第111回大会, 2009年9月29日, 沖縄県中頭郡西原町
5. Yayou K, Relationships of acute stress responses with plasma oxytocin in heifer calves. The 43rd Congress of the International Society for Applied Ethology, 6-10, July, 2009, Cairns, Australia
6. 矢用健一, ウシにおける急性ストレス反応と末梢血中オキシトシン濃度との関係 日本畜産学会第110回大会, 2009年3月27日, 神奈川県藤沢市
7. Yayou K, The relationship between prolactin and reactivity to acute stressor in heifer calves. The 42nd International Congress of the International Society for Applied Ethology, 5-9, August, 2008, Dublin, Ireland

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢用 健一 (YAYOU KEN-ICHI)

独立行政法人農業生物資源研究所・脳神
経機能研究ユニット・主任研究員
研究者番号：40343967

(2) 研究分担者

山本 直幸 (YAYAMOTO NAOYUKI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研
究機構近畿中国四国農業研究センタ
ー・畜産草地・鳥獣害研究領域・上席研
究員

研究者番号：20250011

伊藤 秀一 (ITO SHUICHI)

東海大学・農学部応用動物科学科・准教
授

研究者番号：60425577

(3) 連携研究者

なし