



選抜マーカーの作出と新品種育成システムの開発 (第V報) 戻し交配4世代におけるイノシシアレルの効果

新居 雅宏・山口 智美・浅野 順司*

要 約

DNAマーカーアシスト導入4世代目同士の交配によるF1 (BC4F1) についてイノシシアレルの第6および第15染色体の効果を検証した。189頭のBC4F1について第6染色体はSW1353 (16cM), 第15染色体はSW1989(42cM)およびSW1945 (57cM) のマーカー型により形質を集約した。

1) SSC6上のSW1353マーカーの型によりMinolta a*値およびヘマチン含量を集約すると、イノシシ由来のマーカーをホモ型(WB/WB)で持つタイプが最も高く、イノシシ/大ヨークシャー種ヘテロ型(W/WB), 大ヨークシャー種ホモ型(W/W)の順に小さくなり、本領域のイノシシアレルはF2家系QTL解析の結果と同様に肉の赤さとヘマチン含量を高める効果が示された。

2) SSC15上のSW1945マーカー型によりpH, Minolta b*値等の形質について集約するとpH, 保水性等についてWB/WB型が最も高く、次にW/WB型およびW/W型の順になった。逆にMinolta b*値, 全糖含量等の形質はWB/WB型が最も低くなった。

3) SSC15上のSW1989 (42cM) マーカー型により、背脂肪厚, 脂肪融点および脂肪酸組成について集約した。結果, 背脂肪厚, 背脂肪内層の融点, 腹腔内脂肪の飽和脂肪酸組成においてW/W型とW/WB型に差がみられ, WB型の背脂肪が厚く, 融点および飽和脂肪酸割合が高かった ($P<0.05$)。

これらのことより, イノシシと大ヨークシャー種を祖父母としたF2家系においてSSC6およびSSC15に検出されたQTLは戻し交配を進めた家系においてもマーカー型間に形質の差が認められ, QTLの存在を強く指示した。また, 本研究により導入したイノシシ由来染色体は栄養学的および品質面からも優れた効果を豚群に付与し, DNAマーカーアシスト導入法の育種改良への有効性が実証された。

目 的

2006年から国際的なコンソーシアムにより開始されたブタのゲノム解読は2009年11月に全体の98%の解読を終了し, ブタゲノム配列の概要解読完了が宣言され, (http://uswest.ensembl.org/Sus_scrofa/Info/Index) 今後は有用遺伝子の単離と機能の解析, 育種改良の応用へと研究が一層加速することが期待される。DNA情報を活用した育種改良技術は, 生体において遺伝子の効果の推定が困難である肉質, 抗病性等において効果的な改良をもたらすことが予想される。改良手法は大きく群内における改良と改良目的形質を群外より導入する手法に分類される。前者の手法は

マーカーアシスト選抜 (MAS:Marker Assisted Selection), 後者の手法はマーカーアシスト導入 (MAI:Marker Assisted Introgression) と呼ばれている⁶⁾。当研究所では, MAIにより高品質で優れた豚肉の開発を目的とした研究を平成9年度から開始した⁸⁻¹⁴⁾。研究の方法は, まず改良したい豚群と改良する形質を持つ豚群との間に存在する遺伝的差異の原因となる量的形質遺伝子座 (QTL:Quantitative trait loci) の位置とその効果を明らかにし, 目的QTLを群内に導入する。最終的には, 導入形質とQTL領域の染色体構造との関連性について評価し, QTL効果について検証することになる。QTLの検出と導入はいずれも染

*) 現徳島家畜保健衛生所

色体上におけるDNAマーカーと呼ばれる特定のDNA配列により、任意の染色体上における染色体の構造を推定することにより行う。我々の研究の特徴として日本固有種であるニホンイノシシに優れた遺伝資源を求めた。イノシシと大ヨークシャー種交雑家系におけるQTL解析の結果、多くのQTL候補の位置と効果について報告した²⁾³⁾⁷⁾。その中でも特に、第6染色体上部および第15染色体中央部のQTLは、イノシシ由来のものが肉質に対して優れた効果をもたらすものとして検出された。そこで、これら2カ所のイノシシ由来の染色体領域を連続的な大ヨークシャー種への戻し交配により導入した家系の造成を開始した。戻し交配途中世代におけるイノシシ/大ヨークシャー種のヘテロ型 (W/WB) と大ヨークシャー種のホモ型 (W/W) と形質の関連性については報告した¹¹⁻¹⁴⁾。

更に前報¹⁵⁾において戻し交配3世代 (BC3) 同士の交配によるBC3F1のDNAマーカー型と形質の相関解析について報告した。

本研究では、最終世代と位置づけた戻し交配4世代 (BC4) 同士の交配による産子 (BC4F1) について形質の表現型がQTL領域におけるDNAマーカー型との関連性について検討することでQTL効果を検証する。

材料および方法

1) 家系の構築と形質の測定

イノシシ由来の2カ所の染色体領域を連続的な大ヨークシャー種への戻し交配により導入して生産されたBC4の雄2頭と雌10頭をのべ31回分娩させ、294頭のBC4F1を生産した (平成18年6月～平成20年5月)。そのうち189頭について各種形質の測定を実施した (平成18年12月～平成20年12月)。形質の測定は既報⁸⁾に準じた。また、新たに5mMヨード酢酸Na, 150mMKCl溶液により2gのミンチ肉をホモジナイズした後のpHを測定した (ホモジナイズpH)。

2) DNAマーカー型の判定

第6染色体はSW1329およびSW1353, 第15染色体はSW964, SW1989, KS158, SW1945, SW2083およびSW2608の合計8個のDNAマーカーについてPCR後の産物をDNAシーケンサーによりPCR産物の大きさを数値化してDNAマーカー近傍における染色体構造を推定した。これらのうち、第6染色体はSW1353, 第15染色体は肉質形質についてSW1945, 脂肪形質についてSW1989により形質を集約した。

3) 統計処理

3種類のDNAマーカー型、すなわちイノシシホモ型, イノシシ-大ヨークシャーヘテロ型および大ヨークシャーホモ型をそれぞれ処理区として分散分析により、マーカー型による各種形質の差を検定した。

結果および考察

1) 第6染色体

イノシシと大ヨークシャー種のF2交雑家系において第6染色体上部 (Sus scrofa Chromosome: SSC) には、イノシシ由来のアレルが正の効果を持つMinolta a*値およびヘマチン含量等に関わるQTLが検出された²⁾。これらのQTLはいずれもマイクロサテライトDNAマーカーSW2406とSW1353間の5センチモルガン (cM) を頂点とした同様の形状を示すグラフとなった。またヘマチンはヘムを化学的に処理したポルフィリン化合物であることから、ヘマチンを多く含有すると赤さ (a*値) が増すという性質上、これらは同一のQTLの多面的効果と推察され、Minolta a*値およびヘマチン含量を中心とする形質がSW2406上におけるマーカー型による分離について検討した。

SW2406のマーカー型は大ヨークシャー種ホモ型 (W/W) 89頭, 大ヨークシャー種とイノシシのヘテロ型 (W/WB) 82頭およびイノシシのホモ型 (WB/WB) 18頭となった。Minolta a*値



(カット直後)をこれらのマーカー型で集約すると7.71 (W/W), 8.29 (W/WB) および8.94 (WB/WB), Minolta a*値 (カット1時間後)は10.08 (W/W), 10.57 (W/WB) および11.22 (WB/WB), およびヘマチン含量 (mg/100g)は3.80 (W/W), 4.09 (W/WB) および4.31 (WB/WB) となった (表1)。いずれの形質もW/W, W/WB, WB/WBの順に値が高くなり, DNAマーカー型間に1%あるいは5%水準の有意差がみられた。F2家系におけるMinolata a*値の相加効果および優性効果は0.52および-0.19, ヘマチン含量の相加効果および優性効果は0.37および-0.15であり, 両形質ともに推定効果に等しく, QTLの存在を強く裏付ける結果となった。

3) 第15染色体

(1) 肉質形質

F2交雑家系におけるQTL解析の結果, SSC15には, 54cMをピークとするゲノムワイドレベルで有意なpHおよびMinolta b*値に関わるQTLが検出された。本試験では, QTLの統計量のピークを示す領域に存在するSW1945マーカー型とpH, Minolta b*値を中心に肉質に関連する形質の分離について検討した。

SW1945のマーカー型はWホモ型56頭 (W/W), W-WBヘテロ型102頭 (W/WB)およびWB-WBホモ型31頭 (WB/WB) に分類された。

ヨード酢酸Na溶液を一定量加え, ホモジナイズ後測定したpHでは, Wホモ型およびW/WBヘテロ型に比べ, WB/WB型が最も高くなり (P<0.01, P<0.05)カット面に直接ニードルを挿入して測定する手法においても同様の傾向がみられた。また, Minolta b*値はW/W型-W/WB型-WB/WB型の順に低くなり, カット1時間後には有意差がみられた (P<0.05)。一方, F2家系におけるQTL解析ではSSC15の84cM付近を頂点とするクロモソームワイドレベルで有意な全糖含量に関するQTLを検出した (F値=7.68,相加効果-0.11,

優性効果-0.01)。本研究においてもW/W型-W/WB型-WB/WB型の順に低くなり, 両ホモ型に有意差がみられた (P<0.05)。

加圧保水性, 遠心保水性, 加熱加塩遠心保水性ともにW/W型-W/WB型-WB/WB型の順に高くなり, 遠心保水性では有意差がみられた (P<0.05)。

ともに視覚により判定したPCS (Pork Color Standard) および肉の「シマリ」では, WB/WB型が最も赤く濃い色を呈し, シマリの良い肉と評価された (P<0.01, P<0.05)。一方, 肉の硬さの指標となる専断力価では, WB/WB型が最も高く物理的に硬い肉となった (P<0.05)。その他, 伸展率, 圧搾肉汁率はWB/WB型が高く, 次にW/WB型, W/W型の順に高く, 逆に加熱損失率は低い傾向となった。

DNAマーカー型と肉質の関連性は, イノシリアルルを持つとpH, 保水性, PCS等が高くなり, 逆にMinolta b*値, 全糖含量等が低くなった。

肉の保水力の主たる部分を担うアクチンとミオシンの結合体であるアクトミオシンはpH5付近が等電点に相当し, タンパク質分子同士の距離が最も近づく⁵⁾。従ってpHは5から遠ざかる, すなわち食肉の場合高くなる程, 保水力が大きくなる¹⁾。肉の保水力が高くなった結果, 肉内面への光の透過量が高まり青色度の指標となるMinolta b*値が低くなる⁴⁾。これらのことからF2交雑家系で検出されたpHとMinolta b*値のQTLは同一遺伝子の多面的効果と推察された。本試験ではF2家系において検出されなかったpHおよびMinolta b*値以外の形質である保水性に関してイノシリアルルを持つことで高くシマリの良い肉となることが示唆された。

食肉のpHは, 乳酸の生成量に左右され, 乳酸は屠畜後もしばらく機能を失わない解糖系代謝回路により生じる。そのため, 乳酸量に関わる屠畜時のグリコーゲン量, 解糖系酵素の活性に関わる要因がpHを左右すると推察される。グリコーゲンの蓄積量に関してMilan¹⁶⁾は, グリコーゲン蓄積



量を70%増加させるPRKAG3遺伝子のSNPを報告¹⁶⁾したが、本研究に用いたイノシシと大ヨークシャー種には、イノシシ特有のSNPは検出されなかった¹²⁾。本試験では、WB型を持つ豚群でpHが高い、すなわち乳酸量および全糖量（主に、グリコーゲン、グルコース）およびその分解産物が少なかったことから、イノシシアレルが大ヨークシャー種アレルに比べ、と殺時のグリコーゲンレベルが低い効果を持つことが示唆された。

(2) 脂肪形質

F2家系におけるQTL解析の結果、SSC15の36～57 cMにゲノムワイズレベルで有意性を示す背脂肪の脂肪酸組成および融点に関わるQTLが検出された³⁾¹³⁾。そこで、42cM付近に位置するSW1989を用いてそのマーカー型と脂肪形質との関連性について解析した。SW1989のマーカー型はW/W型58頭、W-WB型108頭およびWB/WB型23頭に分類された。

脂肪の品質に関して肩脂肪厚がWB/WB型で最も厚く ($P<0.05$)、腹腔内脂肪の飽和脂肪酸がWB/WB型が最も高くなった ($P<0.01$, $P<0.05$)。

BC3F1におけるマーカー型と脂肪酸組成の関連性においては多くの形質で差がみられ¹⁵⁾、WB型が飽和脂肪酸を高め、結果として脂肪融点を高める一貫した傾向がみられたが、BC4F1におけるイノシシ由来アレルの効果は小さかった。

イノシシ大ヨークシャー間に存在したQTLの原因遺伝子を特定するために、これら組換え個体を親とした豚群を造成し、QTLの分離により領域を狭める研究に着手しており、今後の研究においてQTLの位置および効果が明らかにされることが期待される。

文 献

- 1) Hamm, R., Advance in food research. 10: 355. 1960.
- 2) Nii, M., T.Hayashi, S.Mikawa, F. Tani, A. Niki, N.Mori and T. Awata, J. Anim. Sci.

- 83:308-315. 2005
- 3) Nii, M., T.Hayashi, F.Tani, A.Niki, N.Mori, T.Awata and S. Mikawa, Animal Genetics. 37. 342-347. 2006
- 4) 泉本勝利. 畜産システム研究会報. 5. 73-87.1991.
- 5) 沖谷明紘. 肉の科学. 朝倉書店. 1997
- 6) 佐々木義之 動物ゲノム解析と新たな家畜育種戦略. 動物遺伝育種シンポジウム組織委員会. 1995
- 7) 新居雅宏・林武司・美川智. 動物遺伝育種研究. 34(2): 23-31. 2006
- 8) 新居雅宏・谷史雄・仁木明人. 徳島県肉畜試験報 27. 29-42. 1999
- 9) 新居雅宏・谷史雄・仁木明人. 徳島畜研報. 1. 48-53. 2001
- 10) 新居雅宏・谷史雄・森直樹. 徳島畜研報. 2. 38-48. 2002
- 11) 新居雅宏・谷史雄・森直樹. 徳島畜研報. 3. 67-. 2003
- 12) 新居雅宏. 柏岡静. 森直樹 徳島畜研報 4. 27-31. 2004
- 13) 新居雅宏. 柏岡静. 森直樹 徳島畜研報 5. 18-34. 2005
- 14) 新居雅宏. 柏岡静. 森直樹 徳島畜研報 6. 28-37. 2006
- 15) 新居雅宏. 谷 史雄. 森直樹 徳島畜研報 8. 19-24. 2010
- 16) Milan, D., J. Jeon, C. Looft, V. Amarger, A. Robic, M. Thelander, G.C. Rogel, S. Paul, N. Iannuccelli, L. Rask, H. Ronne, K. Lundstrom, N. Reinsch, J. Gellin, E. Kalm, P. Le Roy, P. Chardon, and L. Andersson.Science 288(5469). 1248-1251. 2000



表1. SW1353マーカー型による形質の分離(SSC6:16cM)

形質	W/W*(n=89)		W/WB*(n=82)		WB/WB*(n=18)		F2家系におけるQTL解析結果				
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	cM	F値	相加効果	優性効果	寄与率
ヘマチン含量(mg/100g)	3.80 ^A	0.54	4.09 ^A	0.53	4.31 ^B	0.57	20.8	15.4	0.37	-0.15	0.09
PCS ^{\$)}	4.29	0.81	4.40	0.80	4.36	0.66	15.7	3.85	0.09	-0.20	0.02
遠心保水性	67.58 ^a	4.35	66.8	4.77	64.77 ^b	5.38	16.7	6.29	-1.02	-1.02	0.03
Minolta L*値	49.70 ^a	3.75	49.14 ^A	3.95	52.24 ^{Bb}	4.55	13.5	4.58	-0.15	0.82	0.02
Minolta a*値	7.71 ^{Aa}	1.20	8.29 ^b	1.64	8.94 ^B	1.91	18.7	21.8	0.52	-0.19	0.09
Minolta b*値	2.43 ^A	0.96	2.54 ^a	1.10	3.19 ^{Bb}	1.02	13.5	5.58	0.15	0.60	0.03
Minolta L*値(1時間後)	49.29	4.22	48.65 ^a	4.37	51.14 ^b	4.39					
Minolta a*値(1時間後)	10.08 ^a	1.61	10.57	1.92	11.22 ^b	1.82					
Minolta b*値(1時間後)	7.02 ^a	1.44	7.21	1.60	7.93 ^b	1.55					

*) マーカー型: W/W=大ヨークシャー種/大ヨークシャー種. W/WB=大ヨークシャー種/イノシシ. WB/WB=イノシシ/イノシシ

+) A-B:p<0.01, a-b:p<0.05

\$) PCS:豚肉標準模型

表2. SW1945マーカー型による形質の分離(SSC15:59cM)

形質	W/W			W/WB			WB/WB			F2家系におけるQTL解析結果				
	n	平均	標準偏差	n	平均	標準偏差	n	平均	標準偏差	cM	F値	相加効果	優性効果	寄与率
pH	39	5.60	0.23	76	5.65	0.23	26	5.67	0.22	53.8	10.57	0.06	0.03	0.05
ホモジナイズpH	27	5.56 ^{a+}	0.07	39	5.56 ^A	0.06	11	5.62 ^{Bb}	0.08					
全糖含量 (g/100g)	45	0.96 ^a	0.42	80	0.89	0.44	24	0.70 ^b	0.32	84.0	7.68	-0.11	-0.01	0.04
加圧保水性 (%)	56	76.44	5.15	102	77.26	4.77	31	77.68	4.22					
遠心保水性 (%)	56	66.20 ^a	5.48	102	66.85 ^a	4.31	31	68.76 ^b	3.94					
伸展率 (%)	56	25.19	3.21	102	25.4	3.16	31	25.89	2.98					
水分 (%)	56	74.47	0.76	102	74.63	0.74	31	74.63	0.89	59.1	7.61	0.27	0.05	0.04
加熱損失 (%)	56	27.72	3.21	102	27.19	2.99	31	26.88	2.77					
圧搾肉汁率 (%)	56	42.61	1.87	102	43.40	2.16	31	43.60	2.35					
剪断力価 (kg)	56	3.99 ^a	0.99	102	4.28	1.13	31	4.64 ^b	1.63					
ヘマチン含量(mg/100g)	56	3.92	0.58	102	4.02	0.58	31	3.92	0.50	45.3	3.88	0.2	-0.06	0.02
PCS	56	4.09 ^{Aa}	0.85	102	4.44 ^B	0.75	31	4.50 ^b	0.74	49.4	5.26	0.17	0.1	0.03
シマリ ^{*)}	56	1.65 ^A	1.07	102	1.40 ^a	0.94	31	1.02 ^{Bb}	0.51					
Minolta L*値	56	50.34	4.14	102	49.49	4.04	31	49.23	3.48	45.6	10.1	-0.84	-0.03	0.05
Minolta a*値	56	8.17	1.70	102	8.08	1.57	31	7.91	0.99	28.1	3.87	0.15	-0.34	0.02
Minolta b*値	56	2.80	1.26	102	2.47	0.94	31	2.35	0.87	53.8	13.06	-0.38	-0.09	0.06
Minolta L*値(1時間後)	56	50.01	5.12	102	48.99	4.18	31	48.46	3.09					
Minolta a*値(1時間後)	56	10.51	2.11	102	10.41	1.66	31	10.17	1.67					
Minolta b*値(1時間後)	56	7.50 ^a	1.88	102	7.13	1.36	31	6.81 ^b	1.33					

*) 肉のシマリを視覚により判定 (数値が低いほどシマリの良い優れた肉)

+) A-B;p<0.01, a-b;p<0.05



表3. SW1989マーカー型による形質の分離(SSC15:42cM)

形質	W/W(n=58)		W/WB(n=108)		WB/WB(n=23)		F2家系におけるQTL解析結果					
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	cM	F値	相加効果	優性効果	寄与率	
肩脂肪 (cm)	3.73 ^{a+}	0.51	3.87 ^a	0.52	3.89 ^b	0.44						
背脂肪 (cm)	2.01	0.38	2.00	0.38	1.92	0.45						
腰脂肪 (cm)	3.07	0.50	3.05	0.47	2.81	0.39						
融点(外層)	34.32	4.60	34.59	4.38	33.56	4.66	57.7	8.74	0.84	-0.44	0.04	
融点(内層)	38.62 ^a	4.28	39.97 ^b	3.57	39.49	4.05	59.1	7.26	0.65	0.19	0.03	
融点(腹腔内)	44.84	2.75	45.62	2.08	45.60	3.19						
C16:0(外層)	25.09	1.28	25.23	1.05	25.32	1.20	35.9	15.41	0.50	-0.05	0.07	
C18:0(外層)	13.04	2.17	13.14	1.99	13.05	2.42						
C18:1(外層)	43.74	2.19	43.65	1.87	43.76	1.73	57.0	10.14	-0.56	-0.21	0.04	
C18:2(外層)	12.07	1.85	11.85	1.7	11.69	1.42						
総飽和脂肪酸(外層)	39.37	2.87	39.70	2.56	39.72	2.91	57.0	14.93	0.72	0.22	0.05	
C16:0(内層)	26.04	1.31	26.21	1.15	26.38	1.50						
C18:0(内層)	16.54	2.00	16.83	2.04	17.10	2.53	45.5	5.74	0.35	0.02	0.03	
C18:1(内層)	41.93	1.89	41.68	2.08	41.40	1.81						
C18:2(内層)	10.17	2.07	9.95	1.70	9.74	1.62						
総飽和脂肪酸(内層)	43.75	2.65	44.27	2.64	44.74	3.02	43.6	7.17	0.45	0.52	0.03	
C16:0(腹腔内)	28.02	1.28	28.21	1.03	28.26	1.49						
C18:0(腹腔内)	20.62 ^a	1.94	21.37 ^b	2.19	21.58	1.86						
C18:1(腹腔内)	37.73	2.16	37.17	2.09	36.90	1.37						
C18:2(腹腔内)	8.83	2.21	8.54	1.70	8.53	1.79						
総飽和脂肪酸(腹腔内)	49.88 ^{Aa}	2.39	50.91 ^B	2.46	51.20 ^b	2.24						

+) A-B:p<0.01, a-b;p<0.05