

選抜マーカーの作出と新品種育成システムの開発（第IV報） —アワヨークにおける遺伝的多様性の解明—

新居雅宏・柏岡 静・林 武司^{*)}・美川 智^{*)}・森 直樹

要 約

試験 1

椎骨数に関してF2イノブタ家系の各サブファミリーの解析においてF値統計量が大きく異なるSSC7のQTL近傍に位置する3個のマイクロサテライトDNAマーカーを用いて大ヨークシャー種系統造成豚「アワヨーク」のタイピングを行い、この領域における椎骨数に関して半きょうだい解析を行った。椎骨数の測定は、19頭のオス、69頭のメスに由来する896頭について行い、303頭（33.8%）が21個、569頭（63.5%）が22個、24頭（2.7%）が23個であり、平均すると21.7個であった。896頭のうち、12頭のオス由来の786頭について半きょうだい解析が可能であり、9頭において2つのホモログがそれぞれ伝達された産子のグループ間に平均椎骨数の有意な差が認められ、QTLがヘテロ接合型であると示唆された。アレルの効果は平均で0.43個であった。1頭についてはアレルの効果をもとにしたときのZ値が-2より小さく、ホモ接合型であると示唆され、残りの2頭についてはQTLを推定できなかった。SSC7の椎骨数QTLは未だ西洋品種内においても固定されておらず、DNAマーカーアシストセレクションによる産肉性向上を目的とした更なる育種も可能であると考えられる。本試験より複数の全きょうだいサブファミリーからなる実験家系の構築は供試した系統における遺伝子の多様性の検出に有効であることが実証された。

試験 2

試験1の結果を受け、アワヨークにおける肉質に関わる遺伝的多様性を明らかにするために試験1と同様に各サブファミリーのQTL解析を肉質について実施した。その結果、サブファミリー単独の解析においてゲノムワイドレベルで有意となる形質が新たに全糖含量、圧搾肉汁率、I型筋線維割合及びII型筋線維割合の4項目について検出され、それらは第3染色体、第5染色体及び第14染色体の5カ所の領域に位置づけられた。これらのQTLはサブファミリー間でF値統計量が大きく異なることから、アワヨークにおける遺伝的多様性の責任QTLが該当領域に存在することが示唆された。今後、椎骨数と同様にアワヨークにおける肉質に関する形質調査を行うことで、DNAマーカーアシストセレクションによるアワヨークの肉質改良が期待される。またDNAマーカーアシストイントログレーション家系において戻し交配相手となるアワヨークの遺伝子型を考慮可能となることで、より日本イノシシの遺伝的効果を発揮させることが期待される。

目 的

分子レベルの情報を利用した育種選抜の目的の1つは、系統あるいは品種に関係なく個体の選抜が可能となるDNAマーカーを開発することである。ブタのゲノム解析開始当初は量的形質遺伝子座（Quantitative Trait Loci: QTL）の検出に重点をおいた交雑家系が造成された（Anderssonら, 1994）。すなわち、遺伝的に遠く離れている西

洋種とイノシシあるいは中国種を祖父母とした交雑家系を造成することで、F2世代における形質の分離を図り、QTLの検出が試みられた。一方、近年造成された家系の中には西洋種同士の交配による交雑家系、あるいは市販肉豚におけるQTL解析の報告がみられる。これら近縁種を用いたQTL解析は、F2世代における形質の分離が遠縁種を用いた家系よりも小さいことが予測され、QTLの検出にはリスクを伴うが、得られたQTL

*) (独)農業生物資源研究所家畜ゲノム研究チーム

はDNAマーカーアシストセレクション (Marker Assisted Selection: MAS) へと応用しやすい (Malekら, 2001; Evansら, 2003)。逆に遠縁種を用いた家系において検出されたQTLは、MASへの応用は難しいとされてきた。しかし、遠縁種による交雑家系においても、MASを実施したい系統の個体を複数用いた実験家系を構築することで遺伝子の多様性の検出が可能となり、その結果MASへの応用が期待される。我々が造成した遺伝資源実験家系は、1頭の雄の日本イノシシと3頭の雌の大ヨークシャー種系統造成豚「アワヨーク」を祖父母とした3家系のサブファミリーから構築されている。それぞれの頭数は94頭、97頭及び162頭の比較的大きな集団であり、各サブファミリーのQTL解析において信頼される結果が期待される。QTL解析の結果、統計量の異なる領域にアワヨークにおける遺伝的多様性の原因となるQTLの存在が示唆される。そこで本研究では、試験1としてアワヨークにおける形質の測定が比較的容易でサブファミリー間でQTLの結果が大きく異なる領域 (SSC7) を検出した椎骨数

に注目し、アワヨークにおける椎骨数の遺伝的多様性について詳細な検討を行い、MASマーカーの開発を目的とする本研究のアプローチの有効性について検証した。更に試験2では、肉質に関わる形質について各サブファミリーのQTL解析を実施し、アワヨークにおける肉質の改良を目的としたMASマーカー開発の可能性について検討した。

材料および方法

試験1

アワヨークにおける椎骨数の多様性とDNAマーカーの相関解析

1-1) 各サブファミリーの椎骨数に関するQTL解析

徳島イノブタ遺伝資源実験家系はP世代に大ヨークシャー種系統造成豚であるアワヨーク雌3頭に由来するF1を完全きょうだい交配することでF2を生産した (図1)。それぞれのきょうだい交配を行った家系をサブファミリーと呼び、3つのサブファミリーについてそれぞれ独立した椎骨数に関するQTL解析を実施した。

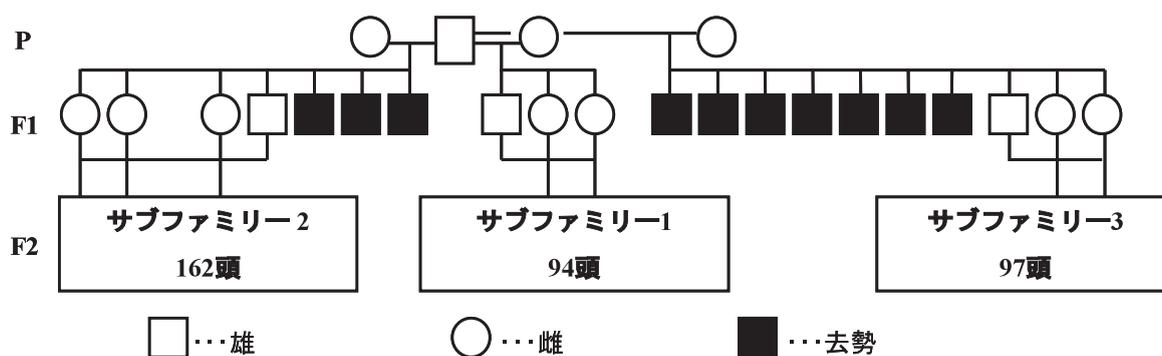


図1-1. 徳島遺伝資源実験家系の構成概要

1-2) アワヨークにおける椎骨数の測定

19頭の雄と65頭の雌より生産された896頭の大ヨークシャー種系統造成豚「アワヨーク」の椎骨数を計測した。計測は出荷後半丸枝肉の状態、出産時の死産及び育成段階における事故死について解剖後、椎骨数を数えた。

1-3) ハプロタイプの解析

19頭の雄と65頭の雌及びそれらを用いて生産された896頭のアワヨークについてマイクロサテライトDNAマーカー (MSマーカー) SW147、SW252及びS0115の遺伝子型を解析し、ハプロタイプを再構成した。

1-4) 統計解析

雄から伝達したハプロタイプにより2つのグループに分けられた産子からなる群について、t-testにより群間の差の有意性を検定することにより半きょうだい解析を行った。差の有意性 ($P < 0.05$) が確認されたとき、雄のQTLの遺伝子型はヘテロ接合 (Q/q) と見なした。さらに、雄がヘテロ接合とみなされなかったとき、Nezerら (2003) の手法に従い、Z-testを実施した。9頭のヘテロ接合の雄における2つのグループの椎骨数の平均値の差は 0.43 ± 0.10 であったことから、Qとqの置換効果は0.43に設定した。Z < -2 の時、雄はホモと判定した。

試験2

イノブタ交雑家系における肉質に関する各サブファミリーにおけるQTL解析

1-1) 実験家系と形質の測定は既報のとおりである (新居ら, 2002)。

1-2) QTL解析は、既報 (新居ら, 2005) のDNAマーカー及び連鎖地図を用い、各サブファミリーのQTL解析を実施した。

結果および考察

試験1

1-1) 各サブファミリーにおける椎骨数に関するQTL解析

椎骨数に関わるQTL解析結果のうち、各サブファミリーの解析においていずれかの家系でゲノムワイズレベルの有意性を示した染色体について

表1-1、及び第7染色体 (*Sus scrofa* chromosome: SSC) のF値グラフを図1-2に示した。SSC1qテロメアに検出された椎骨数に関わるQTLは全形質の中で最も高いF値統計量を示した。サブファミリー毎の解析でも3家系全てに近接する領域に有意なQTLが検出され、本領域のQTLは3家系全てに一貫してイノシシ由来のアリルが負の効果を示した (表1-1)。これらの結果より、SSC1qテロメアにイノシシとアワヨーク間に共通した椎骨数調節に関わる遺伝子の存在が強く示唆された。

SSC4qテロメアには第2家系においてのみ有意性を示すQTLが検出された。本QTLの効果は負の相加効果 (-0.12) を示すものの、優性効果は0.43を示した。第2家系ではF値統計量が9.91であったものが統合解析では6.24に減少した。本QTLの信頼性については今後アワヨークにおけるハプロタイプを再構成した解析が必要となる。

第1家系のSSC7q中部にはSSC1以外では最高となるQTLを検出した。しかしながら、3家系を統合した解析ではゲノムワイズレベルの有意水準を下回った。最大F値統計量を示した近傍のMSマーカー SW252のアリル型を表1-2に示した。各アリル型について分散分析を行った結果、有意な結果 ($P < 0.01$) が得られ、アリル型172に分類された個体の椎骨数が最も多い結果となった。アリル型172は第1家系及び第3家系のP世代がヘテロで保有していたが、F1世代に引き継がれたのは第1家系だけであり、これらの領域にアワヨークにおける椎骨数の多様性に関わる遺伝子の存在が示唆された。

表1-1. 各サブファミリーの椎骨数に関するQTL解析結果

家系	SSC	cM	F値 ¹	相加効果	優性効果	寄与率
第1家系	1	123.9	26.21 **	-0.62	0.19	0.36
第2家系	1	124.9	97.52 **	-0.66	0.07	0.57
第3家系	1	129.2	38.12 **	-0.64	0.43	0.47
統合	1	128.2	140.25 **	-0.65	0.21	0.43
第1家系	4	144.2	2.78	-0.28	0.15	0.06
第2家系	4	147.2	9.91 *	-0.12	0.46	0.12
第3家系	4	128.6	2.47	-0.15	-0.20	0.06
統合	4	147.2	6.24	-0.10	0.24	0.03
第1家系	7	97.5	18.78 **	-0.58	-0.14	0.29
第2家系	7	67.9	2.51	-0.09	-0.19	0.03
第3家系	7	0.0	3.76	-0.21	-0.17	0.08
統合	7	87.5	7.32	-0.23	-0.05	0.04

¹**:.1%ゲノムワイズレベル、*:5%ゲノムワイズレベル

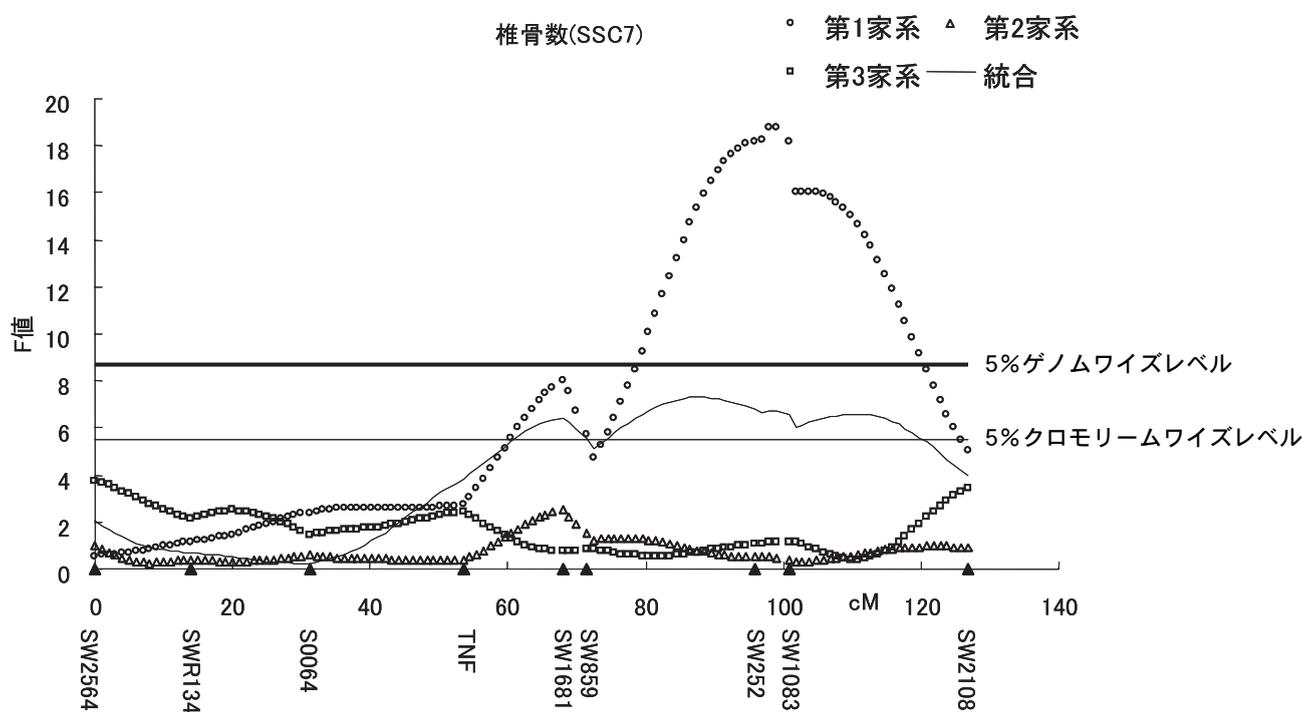


図1-2. サブファミリー毎の椎骨数に関するQTL解析 (SSC7)

表1-2. P及びF1世代におけるSW252のアリル型(SSC7)

イノシシ	P世代		F1世代							
	雌1	雌2	雌1		雌2		雌3		雄	
第1家系	172	186	178	186	172	178			172	178
第2家系	170	186	164	186	164	170	164	186	164	170
第3家系	172	186	164	186	178	186			178	186

1-2) アワヨークの椎骨数に関する半きょうだい解析

19頭のオス、69頭のメスに由来する896頭について椎骨数を計測した結果、303頭 (33.8%) が21個、569頭 (63.5%) が22個、24頭 (2.7%)

が23個であり、平均すると21.7個であった。DNAサンプルについてはQTL領域近傍のMSマーカーSW147、SW252、S0115を用いてタイピングを行い、この領域と椎骨数に関して半きょうだい解析を行った。その結果、12頭のオス由来

の786頭について解析が可能であり、9頭において2つのホモログ（表1-3においてLeftホモログ、Rightホモログと示した）がそれぞれ伝達された産子のグループ間に平均椎骨数の有意な差が認められ、QTLがヘテロ接合型であることが示唆された。アレルの効果は平均で0.43個であった。1頭についてはアレルの効果をもとにしたときのZ値（Nezerら, 2003）が-2より小さく、ホモ接合型であると示唆され、残りの2頭についてはQTLを推定できなかった。このようにSSC7の椎骨数QTLは未だ大ヨークシャー種内においても固定されておらず、増体を目的としたさらなる育種も可能であると考えられた。このQTLが固定されていない原因としては、椎骨数を増大させるアレルの出現が比較的最近であることが考えられるが、他の理由として、この領域に育種上不利な遺伝子が存在する可能性もある。SSC7の椎骨数QTLから約30 cM離れたところには背脂肪厚のQTLが検出されている（Rohrerら, 1998; deKoningら, 1999; Rohrer, 2000; Bidanelら, 2001）。このQTLはアジア系（梅山豚）アレルにおいて背脂肪厚を

薄くし、また増体をよくするという、一般的なアジア系ブタの表現型とは逆方向の効果を持っている。このアレルが過去に西洋系品種の育種に取り入れられた場合、予期せず椎骨数QTLのアジア系アレルも同時に取り込まれた可能性がある。そのような理由でQTLの固定が進まなかったとも考えられる。一方、SSC1においても近傍に多数のQTLが検出されているがおおむね西洋系品種のアレルは増体をよくするなど、アジア系アレルよりも育種に有利な効果を示している。

現在のところ、3つのMSマーカーを用いることで、アワヨークにおいて椎骨数を対象とした個体選抜が可能となる。アワヨークは系統造成開始時の始祖豚を広く国内外から集めていることから、改良された西洋種において広く利用できるDNAマーカーの開発が今後期待される。また、今回の結果は同一品種あるいは系統内における多様性の原因となるQTLの検索に、完全きょうだい交配による実験家系の構築手法は効果的であることが実証された。

表1-3. アワヨーク種雄豚を用いたSSC7上の椎骨数QTLの半きょうだい解析

種雄豚	平均椎骨数（個体数）		t 検定による QTL ²	有意差 ⁴
	Leftホモログ ¹ が 伝達した産子	Rightホモログ ¹ が 伝達した産子		
P1	21.43 (81)	21.95 (83)	q/Q	**
P2	21.55 (49)	22.08 (51)	q/Q	**
P3	21.49 (55)	21.86 (44)	q/Q	**
P4	21.42 (47)	21.95 (40)	q/Q	**
P5	21.46 (24)	21.91 (33)	q/Q	**
P6	21.18 (11)	21.67 (9)	q/Q	*
P7	21.50 (12)	21.93 (15)	q/Q	**
P8	21.70 (30)	22.00 (20)	q/Q	*
P9	21.68 (25)	21.90 (30)	q/Q	*
P10	21.91 (23)	21.94 (18)	Q/Q or q/q ³	
P11	21.55 (11)	21.67 (24)	nd	
P12	21.68 (25)	21.81 (26)	nd	

¹ 種雄豚のQTLの2つのアレルをLeftホモログ、Rightホモログと表した。

² nd = could not be determined.

³ Z値 < -2 (Nezerら2003) によりホモ接合性を判断した。Qとqの置換効果はヘテロ接合型であると判断されたP1からP9より算出した0.43を用いた。

⁴ *, **はそれぞれP < 0.05、P < 0.01であることを示す。

試験2

各サブファミリー解析においてゲノムワイズレベルで有意な結果を表2-1と図2-1~2-5に示した。各サブファミリーの独立した解析を行うことで2つの形質に関して3つの染色体上の4カ所の領域がゲノムワイズレベルで有意な水準に達し、2つの形質について1つの染色体上の2カ所の領域のF値が上昇する結果となった。以下それぞれの染色体について個別に記述する。

2-1) SSC3

SSC3中部には第2家系および第3家系に全糖含量に関わるゲノムワイズレベルで有意性を示すQTLが検出された(表2-1、図2-1)。これらの結果は、いずれもイノシシ由来のアリルが全糖含量を高める相加効果として算出された。第1家系の同じ領域には、何ら全糖含量に関わるQTLは検出されなかった。また、3家系を統合した解析では、ゲノムワイズレベルの有意水準に達しなかった。第2家系では75cM付近をピークとするQTLを示したのに対し、第3家系では85cM付近と100cM付近をピークとするQTLが示された。SSC3には統合した解析において65cM付近と100cM付近をピークとするMinolta b*値に関わるQTLが検出されており、後方の染色体領域は重なっており同一の遺伝子による多面的効果が示唆された。次に第3家系において最大F値統計量に近接するSW2047のP及びF1世代のアリル型を表2-2に示した。また、F2におけるSW2047のアリル型に基づいて区分した全糖含量及び全糖含量と関連する形質について分散分析を行った(表2-3)。結果、全糖含量はイノシシ由来の172のアリル型を持つ群で全糖含量が多く、アワヨーク由来の176のアリル型はイノシシ由来の170及びアワヨーク由来の172とのヘテロの状態でも高い結果を示した。これらのことより、SW2047のアリル型170は低い全糖含量に関わる遺伝子型と172及び176は高い全糖含量に関わる遺伝子型と連鎖することが示

唆された。Milanら(2000)は、ハンプシャー種特有の加熱後のクッキングロスが異常に高い不良肉質の原因遺伝子をAMP-activated protein kinase gamma subunit (*PRKAG3*)の点突然変異として明らかにした。点突然変異により正常肉の~70%程度筋肉中のグリコーゲンレベルが高くなり、結果、屠殺後のグリコーゲンの分解により生じる過剰な乳酸によりpHが極端に下がることで保水性、クッキングロスが低下することが明らかにされた。本試験における肉中の糖成分はグルコースも含めた全糖の計測を行ったが、グリコーゲンレベルと相関関係にあることが考えられ、肉質に強い影響を与える遺伝子の存在も示唆され、今後アワヨークにおける詳細な解析を実施したい。

2-2) SSC5

SSC5の上部にはI型筋線維割合に関わるQTL、中部には圧搾肉汁率に関わる有意なQTLが検出された。上部のI型筋線維割合では第3家系で有意なレベルに達し、第1家系でもsuggestiveレベルに達していたが第2家系ではQTLを検出しなかった。これらの領域のQTLはイノシシ由来のアリルがI型筋線維割合を増加させる効果として算出された。

SSC5中部では第2家系のみ圧搾肉汁率に関わる有意なQTLを検出した。本QTLにおけるイノシシ由来のアリルの効果は相加効果-0.27、優性効果は1.35であった。

2-3) SSC14

SSC14の40cM付近にはサブファミリーを統合した解析においてI型筋線維割合及びIIB型筋線維割合に関わる有意なQTLを報告した(新居ら, 2004)。本試験において第2家系単独のI型筋線維割合に関わるF値統計量は14.16、IIB型筋線維割合は14.13で統合家系において近接するQTLのF値統計量(I型筋線維割合=10.35、IIB型筋線維割合=8.95)を大きく上回っていた。更に、60cM付近にもF値=14.09、F値=15.12の有意なQTLを検出した。これらのQTLの効果はいずれもイノ

シシ由来のアリルがI型筋線維割合を増加させ、逆にIIB型筋線維を減少させる効果として算出された。既報（新居ら,2004）においてSSC14に筋線維型の調節に關与する遺伝子をいくつか候補遺伝子として記述した。すなわち、PPP3CC（protein phosphatase 3 catalytic subunit γ

isoform, calcineurin A gamma)、PPP3CB（protein phosphatase 3 catalytic subunit β isoform, calcineurin A beta)、NFAM1（NFAT activation molecule 1）等であるが、今後これらの遺伝子のアワヨークにおける多型性について検討したい。

表2-1 サブファミリー毎の肉質に關わるQTL解析結果

	家系	SSC	cM	F値	相加効果	優性効果	寄与率
全糖含量	第1家系	3	149.5	2.91	-0.03	-0.17	0.06
全糖含量	第2家系	3	75.4	11.00 **	0.12	-0.10	0.13
全糖含量	第3家系	3	83.8	12.58 **	0.17	-0.08	0.22
全糖含量	第3家系	3	96.4	12.20 **	0.18	-0.06	0.21
全糖含量	総合	3	106.6	8.79	0.11	-0.02	0.05
圧搾肉汁率	第1家系	5	82.5	1.38	0.20	-0.66	0.03
圧搾肉汁率	第2家系	5	42.1	9.13 *	-0.27	1.35	0.12
圧搾肉汁率	第3家系	5	57.6	2.16	-0.93	0.33	0.05
圧搾肉汁率	総合	5	43.1	4.36	0.16	0.59	0.02
I型筋線維割合	第1家系	5	15.8	6.76	1.12	1.49	0.13
I型筋線維割合	第2家系	5	34.6	1.70	-0.14	-0.94	0.02
I型筋線維割合	第3家系	5	13.8	8.84 *	1.29	0.30	0.16
I型筋線維割合	総合	5	10.8	8.42	0.75	0.47	0.05
I型筋線維割合	第1家系	14	75	1.96	0.02	0.40	0.04
I型筋線維割合	第2家系	14	42.7	14.16 **	1.63	-0.52	0.15
I型筋線維割合	第2家系	14	61.8	14.09 **	1.65	-0.57	0.15
I型筋線維割合	第3家系	14	36	5.31	0.53	-1.30	0.11
I型筋線維割合	総合	14	38.7	10.35 *	0.84	-0.55	0.06
IIB型筋線維割合	第1家系	14	90	1.97	1.53	-0.03	0.04
IIB型筋線維割合	第2家系	14	42.7	14.13 **	-2.61	0.34	0.15
IIB型筋線維割合	第2家系	14	60.8	15.12 **	-2.68	0.28	0.16
IIB型筋線維割合	第3家系	14	33	3.01	-1.49	1.31	0.06
IIB型筋線維割合	総合	14	36	8.95 *	-1.61	0.68	0.05

表2-2. P及びF1世代におけるSW2047のアリル型（SSC3）

イノシシ	P世代		F1世代							
	172	172	雌1		雌2		雌3		雄	
第1家系	170	176	170	172	170	172			172	176
第2家系	170	170	170	172	170	172	170	172	170	172
第3家系	170	170	170	172	170	172			170	172

表2-3. SW2047のアリル型と形質の相関関係

アリル型 形質	170170 [†] (n=67)	170172 [†] (n=142)	170176 [†] (n=26)	172172 [†] (n=97)	172176 [†] (n=21)
全糖含量	0.47 ^{A*}	0.65 ^{BC}	0.87 ^{Be}	0.79 ^{BD}	0.80 ^{Adf}
pH	5.72 ^A	5.61	5.55 ^B	5.60 ^B	5.59 ^B
加圧保水性	75.65 ^{Ac}	75.25 ^e	73.12 ^d	74.66 ^g	72.04 ^{Bh}
Minolta b*値	-0.05 ^{Ac}	0.43 ^{de}	0.52 ^B	0.77 ^{Bf}	0.80 ^B

[†] 170170=170+170, 170172=170+172, 170176=170+176, 172172=172+172, 172176=172+176

[‡] A-B, C-D=P<0.01, a-b, c-d, e-f=P<0.05

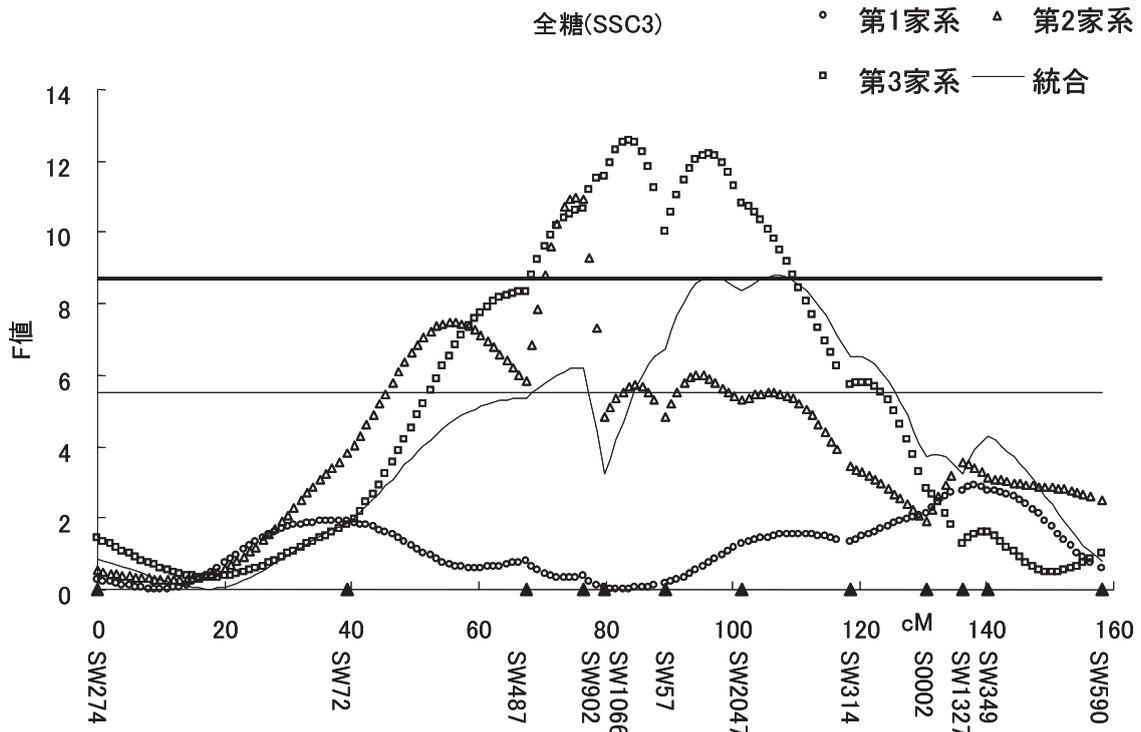


図2-1. 各サブファミリー毎の全糖含量に関するQTL解析 (SSC3)

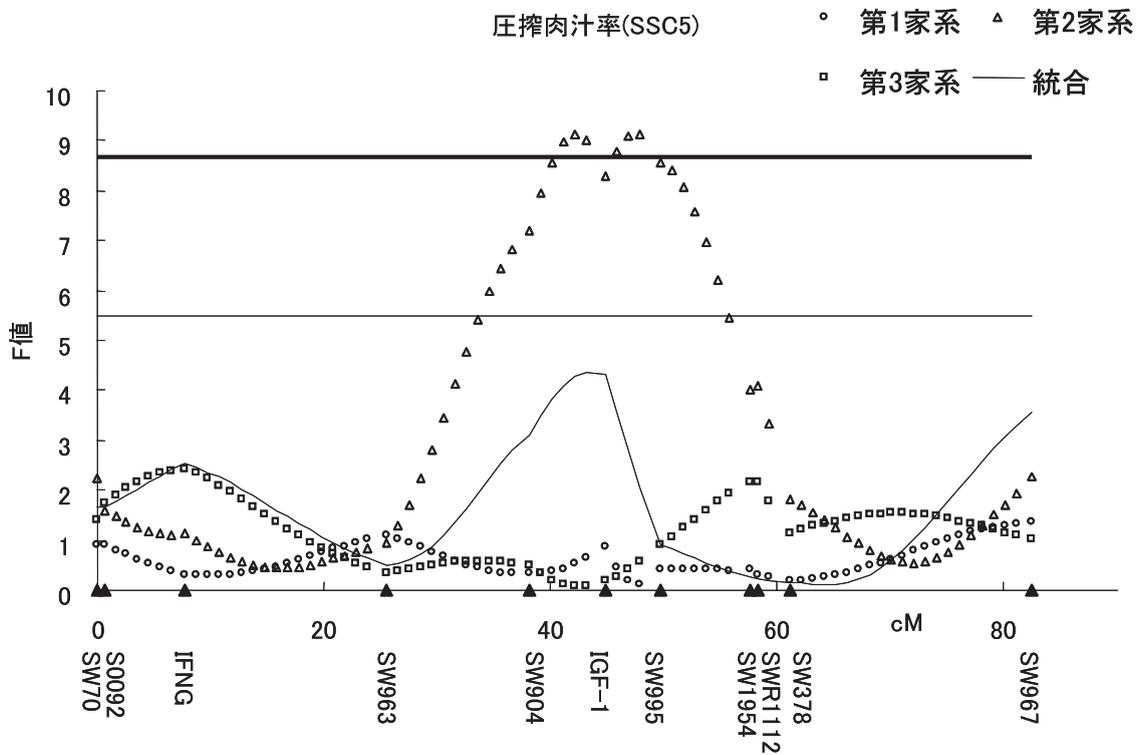


図2-2. 各サブファミリーの圧搾肉汁率に関するQTL解析 (SSC5)

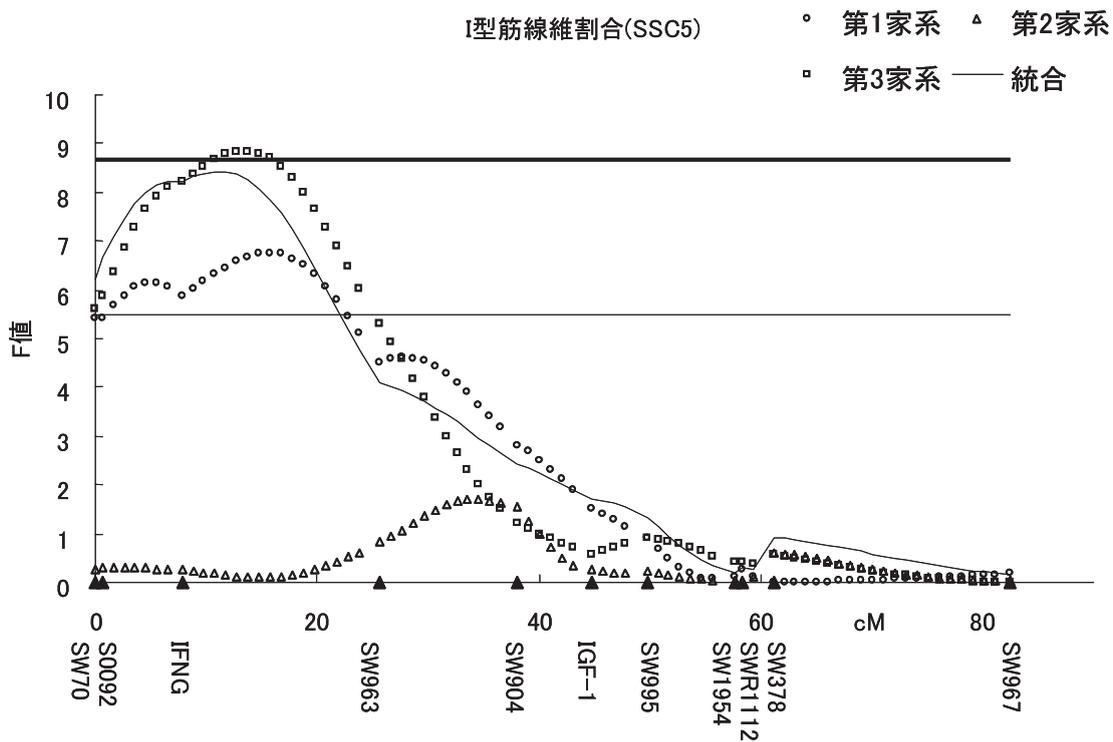


図2-3. 各サブファミリーのI型筋線維割合に関するQTL解析 (SSC5)

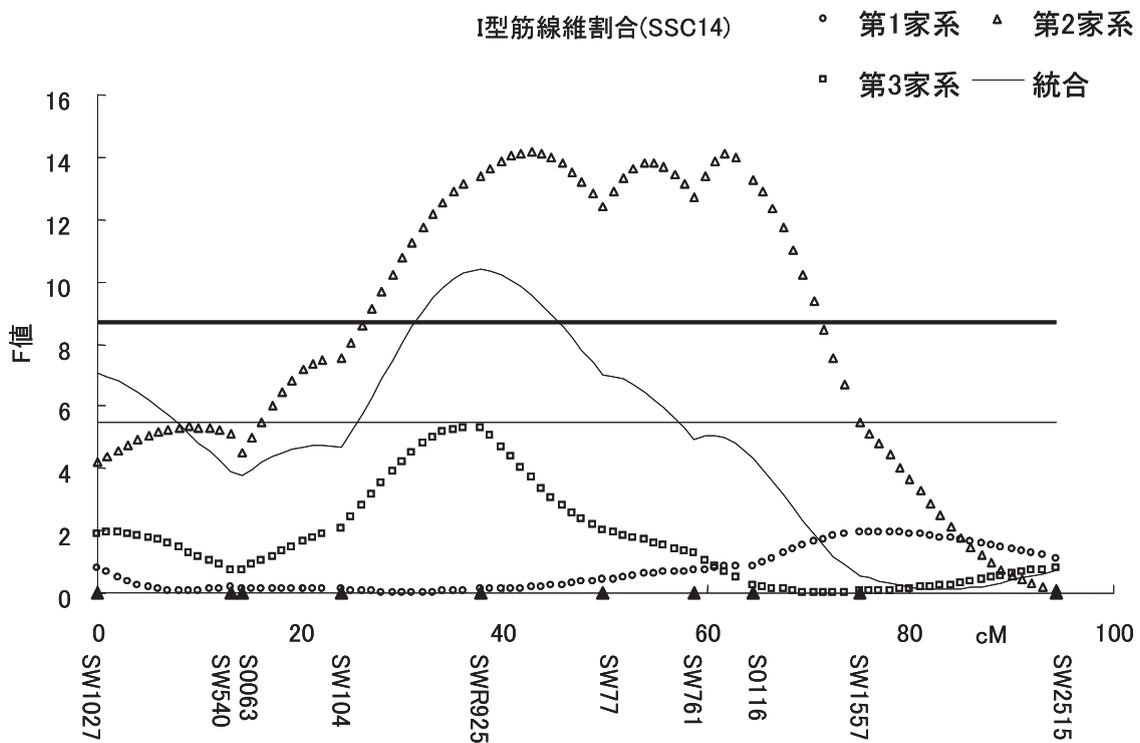


図2-4. サブファミリー毎のI型筋線維割合に関わるQTL解析 (SSC14)

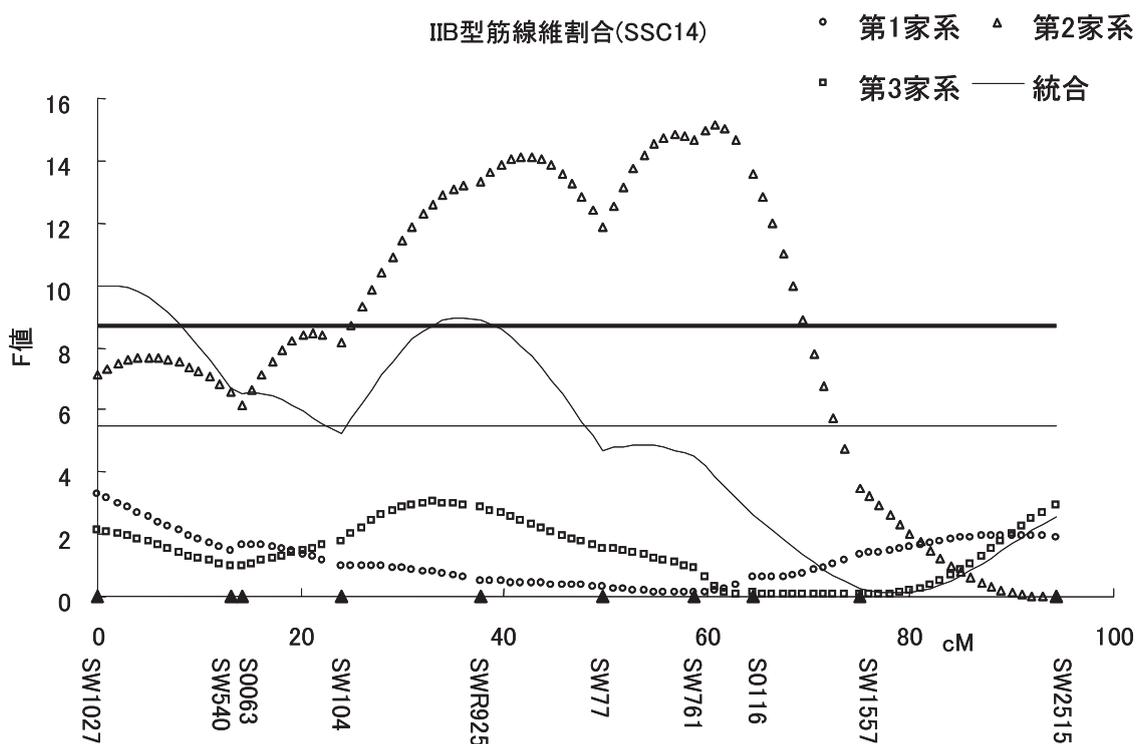


図2-5. サブファミリー毎のIIB型筋線維割合に関わるQTL解析 (SSC14)

引用文献

Andersson, L.ら (1994) Science 263(5154): 1771-1774.
 Bidanel, J. P.ら (2001) Genet Sel Evol 33(3): 289-309.
 de Koning, D.J.ら (1999) Genetics, 152: 1679-1690.
 Evans, G.ら (2003) Genetics 164(2): 621-627.
 Malek, M.ら (2001) Mamm Genome 12(8): 637-645.

Milan, D.ら (2000) Science 288(5469): 1248-1251.
 Nezer, C.ら (2003) Genetics 165: 277-285
 Rohrer, G. A.ら (1998) J Anim Sci 76(9): 2255-2262.
 Rohrer, G. A.ら (2000) J Anim Sci 78(10): 2547-2553.
 新居雅宏ら (2002) 徳島畜研報 2: 38-48
 新居雅宏ら (2004) 徳島畜研報 4: 27-31
 新居雅宏ら (2005) 徳島畜研報 5: 18-34