

選抜マーカーの作出と新品種育成システムの開発 (第Ⅱ報)

新居 雅宏・柏岡 静・林 武司*)・森 直樹

要 約

候補遺伝子解析及び高精度の DNA マーカーアシストイントログレッション (marker-assisted introgression: MAI) を目的として前回の 207 個のマイクロサテライト (MS) DNA マーカーに加え、肉質関連量的形質遺伝子座 (quantitative trait loci: QTL) 推定領域を中心に新たに 17 個の MS マーカー及び当所で開発した 1 マーカーを加えた合計 225 個の DNA マーカーを用い、徳島イノブタ家系 360 頭について独自の連鎖地図を作成した。作成した連鎖地図を用い、新たに測定形質にヘマチン含量、全糖含量及び筋線維相対面積割合の形質を加えた QTL 解析を行った。結果、SSC 6 p 腕テロメア領域の Minolta a* 値の F 値統計量が 13.9 から 20.1 に上昇し、近接領域にヘマチン含量の QTL を位置づけた。新たに SSC14p 腕テロメア～セントロメア領域にイノシシが I 型及び II A 型筋線維の本数、相対面積共に増加させる効果を持つ QTL を位置づけた。SSC15 セントロメア領域の Minolta b* 値の F 値統計量が 9.8 から 12.1 に上昇し、SW936 をピークにしたブロードなピークがよりシャープな形になった。AMP-activated protein kinase gamma subunit (*PRKAG 3*) 遺伝子内に新たに開発したマーカーにより、*PRKAG 3* 遺伝子を SSC15 (65.4cM) に位置づけた。しかし、Minolta b* 値及び pH の QTL のピークから 15cM 程度下方に位置づけられた。また、Milan ら (2000) 及び Ciobanu ら (2001) の報告した *PRKAG 3* 遺伝子内の肉質と関連のある SNP はなかった。

目 的

既報 (新居ら, 2001 ~ 2003) において日本イノシシと大ヨークシャー種系統造成豚「アワヨーク」の交雑家系「徳島イノブタ家系」を用いた QTL 解析及び MAI 途中世代における QTL の効果について報告した。MAI の選抜を行う中で QTL を正確に導入するためには、広い範囲で QTL 領域を含む一連の染色体領域を導入する必要があるが、一方でイノシシの不良遺伝子を多く取り込む危険性も含んでいることから、QTL 領域を可能な限り狭める必要がある。そこで、前回の QTL 解析により検出した肉質関連 QTL 推定領域及び DNA マーカーの疎らな領域に新しく DNA マーカーを追加するとともに、徳島イノブタ家系連鎖地図を作成し、再度 QTL 解析を行うことで QTL 推定領域を狭めることを目指した。また、前回の QTL 解析では第 15 染色体 (*Sus scrofa* chromosome: SSC15) の SW936

をピークとした領域に pH 及び Minolta b* 値の重要な形質をマッピングしたが、SW936 の近くには Milan ら (2000) が報告した筋肉内のグリコーゲン蓄積量を左右する AMP-activated protein kinase gamma subunit (*PRKAG 3*) 遺伝子がマッピングされていることから、徳島イノブタ家系における *PRKAG 3* のマッピングを試みた。更に *PRKAG 3* 遺伝子の点突然変異についても検討したので報告する。

材料及び方法

(1) 形質の測定

実験家系及び肉質形質の測定は既報 (新居ら 2002) のとおりである。新たに冷凍肉よりヘマチン含量及び全糖含量をまた、筋線維画像より筋線維相対面積割合を計測した。ヘマチン含量は Hornsey ら (1956) によるアセトン法、全糖は Seifert ら (1950) のアンスロン硫酸法により測定した。筋

* 独立行政法人農業生物資源研究所家畜ゲノム研究チーム

線維の相対面積割合は1胸最長筋につき90本以上の各型筋線維型の面積を求め、筋線維本数割合を乗じた割合で算出した。また、筋線維本数割合は343頭から352頭へ形質数を追加した。

(2) DNA マーカーの多型解析

既報(新居ら2002)に加えUSDA-MARC (<http://www.marc.usda.gov/genome/genome.html>) マップより SSC 6 及び SSC15 を中心に17個のDNAマーカーを選択した。更にSSC15の(*PRKAG 3*:AF214520)のイントロン配列に親世代でシトシン(Cytosine:c)の繰り返しの異なる配列を検出し、新たなDNAマーカーとして使用した[PRKAGI forward 5'-AGGAGCACACCTGCTACGAT-3', reverse 5'-AGTTGCAGAGCTGGGATGAC-3']。

(3) 連鎖地図の作製

225個のDNAマーカーを用い、CRI-MAP (Green et al., 1990)により連鎖地図を作製した。

(4) QTL 解析

Haley et al. (1994)の方法を用いて、最小2乗法にもとづくインターバルマッピングを行なった。

(5) *PRKAG 3* の第1及び第3エキソン解析

PRKAG 3 遺伝子の第1エキソン及び第3エキソンを増幅するように2セットのプライマーペアを設計し、イノシシ及び3頭の親世代アワヨークについてPCRにより目的領域を増幅した[エキソン1 forward 5' ATGAGCTCCTAGAGCAAGGAG 3', reverse 5' GGCTGCATGATGTTATGTGCCT 3']エキソン2 forward 5' GGAGCAAATGTGCAGACAAG 3' reverse 5' CCCACGAAGCTCTGCTTCTT 3']。PCR増幅産物をExoSap-IT(アマシャム)で余分なdNTP, プライマー等を除去し、Big Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(アプライドバイシステムズ)によるサイクルシーケンシング反応を行った[96°C(10秒)-50°C(5秒)-60°C(4分):25サイクル]。反応液をSephadex™ G-50(アマシャム)により精製し、ABI-377オートシーケンサーによりDNA塩基配列を決定した。

結果及び考察

雄雌平均の連鎖地図の長さは2177.3センチモルガン(Centi-morgan:cM)でDNAマーカーの平均距離は9.7cMであった。また、PRKAGIはSSC15, SW2083とSW936の間(65.4cM)に位置づけられた(図1c)。

以前の解析によりMinolta a^* 値について高いF値を示したSSC 6 p腕テロメア領域に新たに4個のDNAマーカーを追加し、肉質形質のQTL解析を行った。その結果、Minolta a^* 値について18.7cMにF値20.1(P<0.001)の高いQTLを検出した(表1, 図1a)。更に、ヘマチン含量についてもSSC6:20.9cMにF値15.4(P<0.005)の有意なQTLを検出した(表1, 図1a)。これらのQTLはいずれも寄与率9%でイノシシ allele が正の相加効果を示した。ヘマチン含量は筋肉中のヘム色素量を示し、赤色度を決定する要因である。今回、Minolta a^* 値(赤色度)とヘマチン含量に同様の効果を持つQTLが近接した領域に位置づけられたことは、これらのQTLはヘマチンの蓄積あるいは合成に関わる遺伝子の他面効果であることが推察された。Minolta a^* 値は、と殺時の環境、保水性、Minolta L^* 及び b^* 値等の影響を受け、候補遺伝子の推定が困難であるが、ヘマチンのQTLを検出することで候補遺伝子の機能面からの絞り込みが可能となった。

SSC14p腕テロメア~セントロメアにかけ、ゲノムワイズで有意な筋線維本数割合及び筋線維相対面積割合のQTLを新たに検出した(表1, 図1b)。これらのQTLはI型及びII A型のいわゆる赤筋をイノシシ allele が増やす効果を持ち、逆にII B型(白筋)を減らす効果として計算された(表1)。ほ乳類において、カルシウネリン(calcineurin)シグナル経路は、骨格筋筋線維のタイプ型を制御する決定的な役割を担うことが報告されている(Parsonら, 2003)が、Transcriptional factors of the nuclear factor of activated T cells (NFAT) ファミ

リーは calcineurin を主要な標的として機能し、slow and fast myosin heavy chain の発現量を調節する (McCullagh et al., 2004)。PPP 3 CC (protein phosphatase 3 catalytic subunit γ isoform, calcineurin A gamma) はヒトの第 8 染色体, PPP 3 CB (protein phosphatase 3 catalytic subunit β isoform, calcineurin A beta) はヒトの第 10 染色体 q21 に、そして NFAM 1 (NFAT activation molecule 1) はヒトの第 22 染色体 q13 に位置づけられている。これらの遺伝子は calcineurin あるいは NFAT の発現量を調整しており、且つ、ヒト-ブタコンパラティブマップにより、ブタの第 14 染色体の QTL

領域に相当することから有力な候補遺伝子と予測され、今後、詳細な解析を進めたい。

SSC15 には PRKAG1 も含めて 6 個の DNA マーカーを追加した。結果、ゲノムワイズで有意な Minolta b* 及び pH の QTL を SSC15 のセントロメアに検出した (表 1, 図 c)。前回の解析に比べ F 値統計量は Minolta b* 値 + 2.3 及び pH - 0.3 であった。また、QTL の位置を示すピークが前回は SW936 であったのに対し、今回は SW936 より上方 15cM 程度に位置づけられた。これらの QTL はイノシシ allele が pH を上昇させ、Minolta b* を下げる効果を示し、寄与率はそれぞれ 5 % 及び 6 % で

表 1 QTL 解析結果 (ゲノムワイズ 5 % 以上)

形質	有意水準 ^{a)}		SSC	cM	F 値 ^{b)}	相加効果 ^{c)}	優性効果 ^{c)}	寄与率 (%)
	5 %	1 %						
I 型筋線維本数 (%)	8.7	10.6	1	97.4	10.3 ⁺	-0.88	-0.24	0.06
			14	37.7	10.6 ⁺	0.84	-0.56	0.06
			X	94.1	9.4 ⁺	-0.80	- ^{d)}	0.05
I 型筋線維相対面積 (%)	8.6	10.1	X	93.1	10.8 ⁺⁺	-0.60	-	0.06
II A 型筋線維本数 (%)	8.6	10.4	2	59.1	10.7 ⁺⁺	0.91	0.99	0.05
			2	105.7	11.4 ⁺⁺	0.98	0.67	0.06
			14	5.0	8.9 ⁺	1.08	-0.15	0.04
II A 型筋線維相対面積 (%)	8.8	11.0	2	61.1	9.3 ⁺	0.59	0.58	0.05
			6	17.7	12.4 ⁺⁺	0.77	-0.43	0.07
II B 型筋線維本数 (%)	8.9	11.0	2	103.5	10.4 ⁺	-1.50	-0.69	0.06
			14	2.0	12.4 ⁺	-1.72	0.60	0.07
			14	34.0	11.7 ⁺⁺	-1.72	0.74	0.06
II B 型筋線維相対面積 (%)	8.7	10.9	6	14.5	12.6 ⁺	-1.19	0.38	0.07
			14	4.0	12.0 ⁺	-1.26	0.18	0.07
			14	32.0	11.1 ⁺⁺	-1.20	0.43	0.06
Minolta a* 値	8.7	10.9	4	149.8	12.5 ⁺	-0.28	-0.40	0.06
			6	18.7	20.1 ⁺⁺	0.52	-0.17	0.09
Minolta b* 値	8.6	10.7	3	68.4	9.9 ⁺	0.31	0.23	0.05
			3	101.6	9.8 ⁺	0.32	0.07	0.05
			15	52.4	12.1 ⁺⁺	-0.36	-0.10	0.06
ヘマチン含量 (mg/100g)	8.6	10.7	6	20.9	15.4 ⁺⁺	0.37	-0.15	0.09
pH	8.9	10.5	15	49.6	10.3 ⁺	0.06	0.03	0.05
筋肉内粗脂肪含量 (%)	8.6	10.1	15	41.6	9.2 ⁺	-0.30	-0.08	0.04
			15	57.1	9.8 ⁺	-0.29	-0.01	0.05

a) ゲノムワイズ 1 % 及び 5 % のしきい値は 5000 回のパームテーションテストにより決定した

b) ++, += 1 %, 5%ゲノムワイズの有意水準

c, d) アワヨークと比べたイノシシの効果。“-” means “not done”

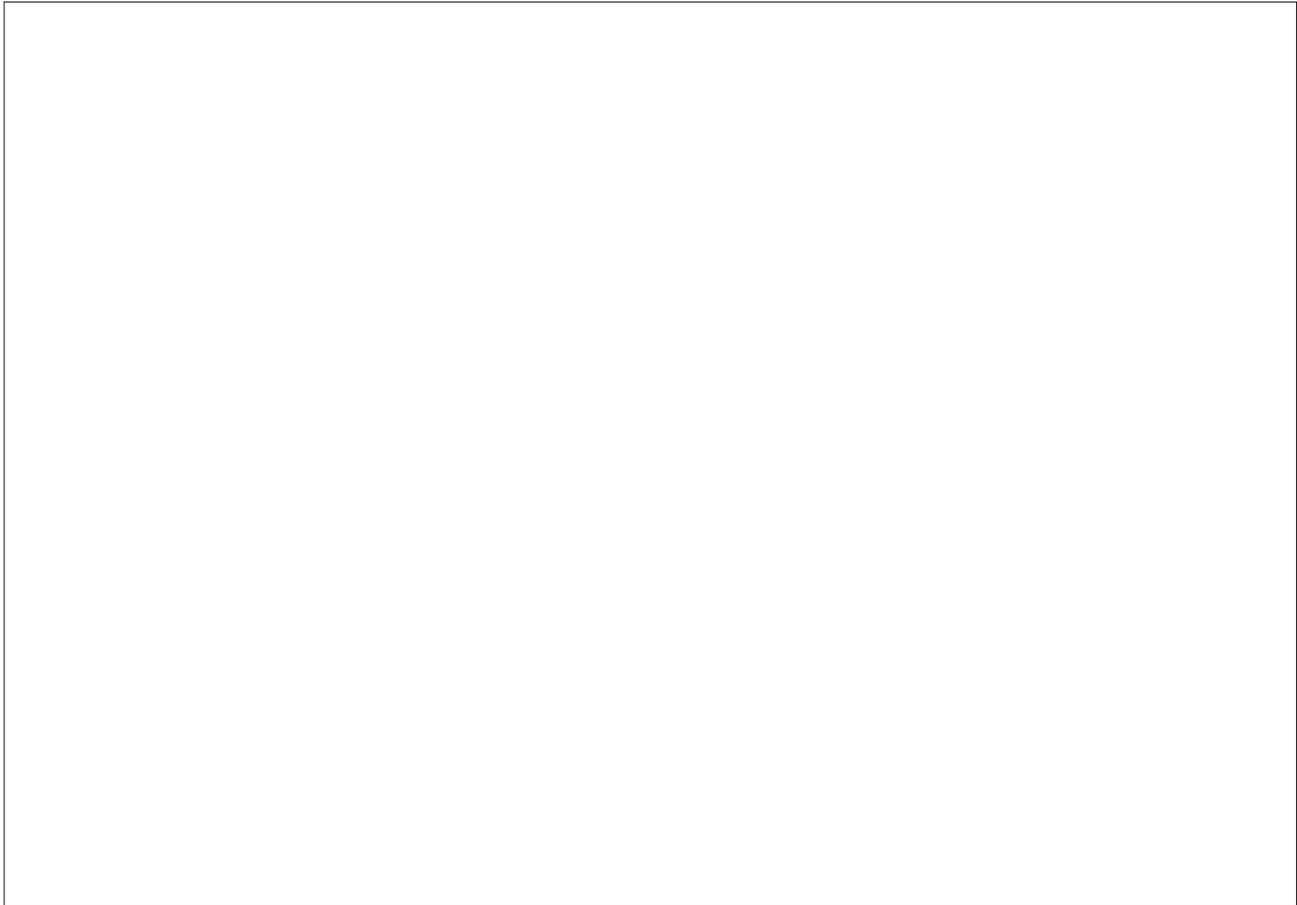


図1 主な QTL 解析結果 (▲は MSDNA マーカー、△は PRKAG1 マーカーの相対位置を示す)

あった。今回、新たに QTL 解析を行った全糖は上述の 2 形質の QTL よりやや後方に染色体レベルで有意な QTL を検出した [87.6cM, F 値=7.5, 相加効果 - 0.12]。その QTL はイノシシ allele が負の相加効果を持ち、寄与率は 5% であった。

本家系作成に用いた日本イノシシとアワヨークについて PRKAG 3 遺伝子の第 1 及び第 3 エキシソンの塩基配列を決定した。しかし、いくつかの SNP (single nucleotide polymorphism) を検出したものの、いずれもアミノ酸置換を伴わないサイレントな多型であり、また、イノシシ特有の塩基配列はなかった (図 2)。Milan ら (2000) はハンプシャー種に特有な調理後のクッキングロスの著しく低い個体の遺伝子 RN を PRKAG 3 の点突然変異として決定した。1849 番目のグアニン (guanine:G) がアデニン (adenine:A) [R200Q] になることで、アルギニンがグルタミンにアミノ酸置換を伴う変異を生じ、グリコーゲンの蓄積を正常より 70% 増加

	19	89	98 ^{a)}	154 ^{b)}	1829	1830	1845 ^{c)}	1849 ^{d)}
AF214520 ^{e)}	G	A	C	G	C	C	G	G
日本イノシシ	·	G	·	·	C/T	C/T	·	·
アワヨーク 1	G/A	G/A	·	A	C/T	C/T	·	·
アワヨーク 2	·	G	·	G/A	T	T	·	·
アワヨーク 3	·	G/A	·	·	C/T	C/T	·	·
			C = Thr	G = Gly A = Ser			G = Val	G = Arg

図2 PRKAG 3 の遺伝子の第 1 及び第 2 エキシソンにおける SNP

- a) T30N
- b) G52S
- c) I199V の SNP (Ciobanu ら, 2001)
- d) R200Q の SNP (Milan ら, 2000)
- e) GenBank Accession No.

させることにより引き起こされることを明らかにした。逆に DFD 肉は低グリコーゲン濃度により pH が下がらず異常肉となる (Wulf ら, 2002) が、その肉は保水性が高くジューシーであることから、軽度の DFD となるレベルのグリコーゲン蓄積に関する遺伝子を持つ個体は優れた肉質となること

が期待できる。考察を裏付けるように Ciobanu ら (2001) は *PRKAG 3* 遺伝子内の Milan らとは別の肉質と関連のある SNP [T30N, G52S, I199V] について報告した。既報 (新居ら, 2002) において同様の効果を持つ QTL を *PRKAG 3* の遺伝子座に近い SW936 に検出したことから, *PRKAG 3* を QTL の原因候補遺伝子としてエキソンの塩基配列を決定したが, 表現型と相関のある SNP を検出できなかった。*PRKAG 3* は全長 5888 塩基に 11 個のエキソンと 10 個のイントロンを持つ遺伝子で, 今回は Milan ら (2000) 及び Ciobanu ら (2001) が SNP を報告した第 1 及び第 3 エキシソンのみ塩基配列を決定したが, アワヨーク内に SNP もあり, 本遺伝子は, グリコーゲン蓄積に関与する肉質に重要な影響を与える遺伝子であることから, 全エキソンについて塩基配列を決定する必要がある。

参考文献

- Ciobanu, D. et.al. 2001. Evidence for new alleles in the Protein Kinase Adenosine Monophosphate-Activated 3-subunit gene associated with Low glycogen content in pig skeletal muscle and improved meat quality. *Genetics*. 159: 1151-1162
- Goldspink, G. 1996. Muscle growth and muscle function: a molecular biological perspective. *Res. Vet. Sci*. 60:193-204.
- Green, P., K. Falls, and S. Crooks. 1990. Documentation for CRIMAP, Version 2. 4. Washington Univ. School of Medicine, St. Louis, MO.
- Haley, CS. 1994. Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. *Genetics* 136:1195-1207
- Hornsey, H.C. 1956. The colour of cooked cured pork. 1. Estimation of the nitric oxide-haem pigments. *J. Sci. Food Agric*. 7:534-541.
- McCullagh, K. A. et. al. 2004. NFAT is nerve activity sensor in skeletal muscle and controls activity-dependent myosin switching. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:10590-10595.
- Milan, D. et. al. 2000. A mutation in *PRKAG3* associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science* 288:1248-1251.
- Parsons, S. A. et. al. 2003. Altered skeletal muscle phenotypes in calcineurin A α and A β gene-targeted mice. *Mol. Cell. Biol*. 23:4331-4343.
- Seifert, S. et al. 1950. The estimation of glycogen with the anthrone reagent. *Arch. Biochem*. 25:191.
- Wulf, D. M. et. al. 2002. Relationships among glycolytic potential, dark cutting (dark, firm, and dry) beef, and cooked beef palatability. *J. Anim. Sci*. 80:1895-903.
- 新居ら, 1999 徳島肉試研報 27, 29-42
- 新居ら, 2001 徳島畜研報 1, 48-53
- 新居ら, 2002 徳島畜研報 2, 38-48