

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）

戻し交配3世代におけるイノシシアレルの効果

新居 雅宏・谷 文雄*・森 直樹*

要 約

DNAマーカーアシスト導入3世代目同士の交配によるF1についてイノシシアレルの効果を第6, 8および15染色体について検証した。形質の調査頭数は117頭でアレルの判定は8種類のDNAマーカー型により行った。

1) 第6染色体上のSW1353マーカー型によりMinolta a*値およびヘマチン含量(mg/100g)を集約すると、イノシシ由来のマーカーをホモ接合型(WB/WB)で持つ群が最も大きく、イノシシ-大ヨークシャーヘテロ接合型(WB/W), 大ヨークシャーホモ接合型(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) 第8染色体はS0069マーカー型により1日平均増体重(g)(ADG), と体長を集約した。結果、WB/WB, W/WBおよびW/W間に差がみられ、WB型を持つことにより、ADGおよび体長が小さくなつた。

3) 第15染色体には、肉質(pH, Minolta b*値等)および脂肪形質(脂肪融点、脂肪酸組成等)に関わるQTLが検出されていたので、それぞれについて効果を検証した。肉質についてはSW1945マーカー型により形質を集約した。pHについてはW/WとW/WBおよびWB/WB間に差がみられ(P<0.01), F2家系におけるQTL解析結果のとおり、WB型を持つことでpHが高くなった。脂肪はSW964とSW1945の2つのDNAマーカーにより、脂肪融点および脂肪酸組成について集約した。結果、背脂肪外層、背脂肪内層および腹腔内脂肪ともに融点および複数の脂肪酸で差がみられ、イノシシアレルが飽和脂肪酸と脂肪融点を高める効果を示した。

これらのことより、イノシシと大ヨークシャーを祖父母としたF2家系における第6, 8および15染色体に検出された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の存在が実証された。また、第6および15染色体のQTLにおける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が推察され、DNAマーカーアシスト導入法の育種改良への有効性が示唆された。

目的

DNA情報を利用した育種改良技術として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DNA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

る遺伝的効果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分析し、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ことがあげられる。イノ

*現所属 徳島家畜保健衛生所

シシと大ヨークシャー種交雑家系について多くの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-大ヨークシャーのヘテロ接合型と大ヨークシャーのホモ接合型と形質の関連性については報告した¹¹⁾。

本研究では、戻し交配3世代目同士の交配による産子について形質の表型値がQTL領域におけるDNAマーカーの遺伝子型によって分離するかを検討した。

材料および方法

1) 家系の構築と形質の測定

イノシシと大ヨークシャーのF1雄を大ヨークシャー雌への交配を3世代繰り返して生産された繁殖豚を両親（雄5頭および雌12頭）としたF1を生産し、117頭のF1について各種形質の測定とDNAマーカーによる遺伝解析を実施した。

形質の測定は既報⁸⁾に準じた。

2) DNAマーカー型の判定

第6染色体はSW1329およびSW1353、第8染色体はS0069およびSW1085、第15染色体はSW964、KS158、SW1945およびSW2083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。

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接合型、イノシシ-大ヨークシャー-ヘテロ接合型および大ヨークシャー-ホモ接合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間の差を検定した。

結果及び考察

1) 第6染色体

第6染色体上部には、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)が増すといいう性質上、これらは同一のQTLの多面的効果と推察された。本研究では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ホモ接合型(W/W)46頭、大ヨークシャーとイノシシのヘテロ接合型(W/WB)52頭およびイノシシのホモ接合型(WB/WB)19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6.96(W/W)、7.30(W/WB)および7.67(WB/WB)、Minolta a*値(カット1時間後)は8.97(W/W)、9.51(W/WB)および10.16(WB/WB)、およびヘマチン含量(mg/100g)は3.88(W/W)、4.02(W/WB)および4.13(WB/WB)となった。いずれの形質もW/W、W/WB、WB/WBの順に値が高くなり、QTLの推定効果と同じ傾向がみられた。

2) 第8染色体

今回の研究に用いた繁殖豚も含めイノシシアレルの残存状況を調べるために全染色体を網羅するようにDNAマーカーを配置して染色体構造について調べた。その結果、第8染色体には偶然的にイノシシアレルが多く保存されていた。第8染色体にはF2家系を用いたQTL解析の結果、発育性および産肉性に関わるイノシシアレルが負の効果を示すQTLが検出されており(10cM,F値15.95,相加効果-28g,寄与率8%),生産性への悪影響が

危惧された。そこで、SSC8上2つのDNAマークー S0069 (51cM), SW1085 (68cM) によりイノシシアレルの頻度について調査し、S0069マークーにおけるマークー型と形質の分離について検討した。

S0069のマークー型はW/W (58頭), W/WB (50頭) およびWB/WB (9頭) となり、イノシシアレルが多く浸透していた。形質についてみるとADG (離乳時から出荷時まで), と体長, 背腰長等にマークー型によって差が認められ、イノシシアレルを持つことでADG, と体長ともに小さくなかった。F2家系で検出されたQTLのピークとS0069では40cM程度離れているにも関わらず、明確な差として検出されたことから、繁殖豚の多くはイノシシアレルの負の効果を持つ遺伝子を持っていることが強く示唆され、豚群からの排除が必要である。一方で40cM付近には毛色に関わるQTLが存在しており、個体の特徴を明確にするための毛色の固定とイノシシ由来不良遺伝子の排除もDNAマークーを活用することで可能と推察された。

3) 第15染色体

(1) 肉質形質

第15染色には、54cMをピークとするゲノムワイスレベルで有意なpHおよびMinolta b*値に関わるQTLが検出された。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近づく⁵⁾。その結果、肉中に水分を保持する力が小さくなり、肉の保水力が低下し¹⁾、結果、肉表面の光の乱反射により黄色度の指標となるMinolta b*値が高くなる⁴⁾。これらのことからpHとMinolta b*値のQTLは同一のQTLの多面的効果と推察された。本研究では、QTLの統計量のピークを示す領域に存在するSW1945マークー型とpH, Minolta b*値および保水性に関連する形質の分離について検討した。

SW1945のマークー型は24頭 (W/W), 66頭

(W/WB) および27頭 (WB/WB) に集約された。pHは、W/W型とW/WB型およびWB/WB型に差が見られ、WB型を持つ群が高い結果となった。一方、Minolta b*値はW/WB型が最も低くなり、W/W型が高くなつたが有意差はみられなかつた。また、先述のとおり、pHは保水性と高い相関関係にあることから、保水性あるいは肉色等の形質について同様の手法によりマークー型による比較を行つた。

加圧保水性、遠心保水性とともにW/WB群が高い傾向が示された。視覚により判定したPCS (Pork Color Standard) および肉の「しまり」度では、ともにW/WB群が最も良好な値となり、しまりについてはW/W-W/WB間に有意差が見られた (P<0.05)。また、Minolta L*値についても同様にW/W-W/WB間に有意差が見られた (P<0.05)。QTL解析においては有意なレベルに達しなかつたPCS、しまりおよびMinolta L*値についても差がみられ、保水性についてもイノシシアレルの効果が示唆された。これらのことより、SW1945付近に検出されたpHに関わるQTLは、イノシシアレルをヘテロで持つときに最も効果が高くなる結果となり、イノシシアレルを持つことで肉質の改善効果が期待された。しかしながら、W/WB-WB/WB型間に差がみられなかつたことについて今後の検討課題である。

(2) 脂肪形質

F2家系におけるQTL解析の結果、SSC15の36～57 cMにゲノムワイスレベルで有意性を示す背脂肪外層C16:0, C18:1, 総量飽和脂肪酸 (TSA) および融点のQTLが検出された³⁾¹³⁾ (図1)。これらのQTLは一貫してイノシシ由来のアレルがC16:0およびC18:0等の飽和脂肪酸を増加させ、C18:1等の不飽和脂肪酸を減少させる効果として検出された。また、飽和脂肪酸組成の変遷に伴い、結果として融点のQTLが同じ領域に位置づけられたことが推察された。これらの領域に検出されたQTLは、36cMと54cM付近を最大統計量とす

る2つのQTLの存在が示唆された。そこで、2つのQTLのピークに近接するSW964(36cM)とSW1945(59cM)のマーカー型と脂肪形質の関連性についてそれぞれ検討した。F2における解析では背脂肪外層のみゲノムワイズレベルに達したが、BC3世代F1では2カ所のDNAマーカー上の背脂肪外層および腹腔内脂肪について融点および主要な脂肪酸組成割合についてマーカー型間に差がみられた。ともにイノシシアレルを持つことで飽和脂肪酸割合が高まり、相反して不飽和脂肪酸割合が減少する傾向がみられ、脂肪酸の変遷に起因して融点も高まることが推察された。各マーカーを個別にみると多くの脂肪形質についてSW964ではW/WBとWB/WB間の差は小さいのに対し、SW1945では、W/W、W/WBおよびWB/WB間で差が大きかった。本領域に存在するQTLが1個、あるいはそれ以上存在するかについては新しい系統における脂肪の均一性に影響を与えることから詳細な検討が必要である。また多くの同様のQTLが世界的にも報告されており、学術的にも興味深い。今回の研究では、DNAマーカー SW964とSW1945の2つのDNAマーカー間で組換えの生じた個体は44頭存在していた。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ことを計画している。

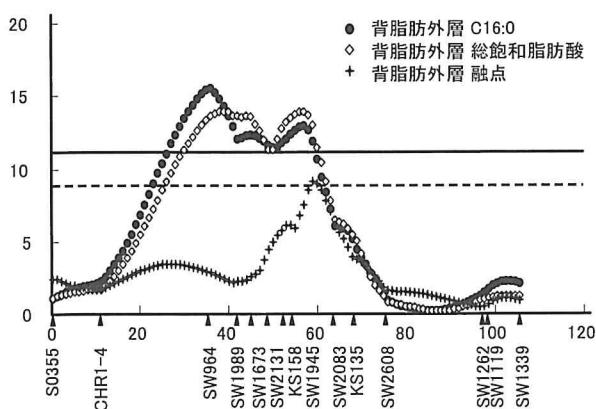


図1. F2交雑家系におけるQTL解析結果(SSC15)

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.
- 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(ミニレビュー)
- 8) 新居雅宏・谷史雄・仁木明人. 徳島県肉畜試験報 27. 29-42. 1999 (手法)
- 9) 新居雅宏・谷史雄・仁木明人. 徳島畜研報. 1. 48-53. 2001 (QTL解析初期)
- 10) 新居雅宏・谷史雄・森直樹. 徳島畜研報. 2. 38-48. 2002 (QTL解析)
- 11) 新居雅宏・谷史雄・森直樹. 徳島畜研報. 3. 67-. 2003 (MAI BC1W&2W)
- 12) 新居雅宏. 柏岡静. 森直樹 徳島畜研報 4. 27-31. 2004 (詳細なQTL解析)
- 13) 新居雅宏. 柏岡静. 森直樹 徳島畜研報 5. 18-34. 2005(脂肪)
- 14) 新居雅宏. 柏岡静. 森直樹 徳島畜研報 6. 28-37. 2006(多様性)

表1. SW1353マーカー型による形質の分離(SSC6:16cM)

形質	W/W*(n=46)		W/WB*(n=52)		WB/WB*(n=19)		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	3.88	0.54	4.02	0.54	4.13	0.80	20.8	15.4	0.37	-0.15	0.09
PCS ^{\$}	4.55	0.97	4.54	1.00	4.74	0.98	15.7	3.85	0.09	-0.20	0.02
遠心保水性	68.32	4.58	68.06	5.01	66.48	4.12	16.7	6.29	-1.02	-1.02	0.03
Minolta L*値	46.45	4.56	45.83	5.46	47.26	4.80	13.5	4.58	-0.15	0.82	0.02
Minolta a*値	6.96	1.24	7.30	1.46	7.67	1.41	18.7	21.8	0.52	-0.19	0.09
Minolta b*値	1.56	1.19	1.74	1.36	2.09	1.15	13.5	5.58	0.15	0.60	0.03
Minolta L*値(1時間後)	46.75	4.85	46.84	5.15	47.86	4.84					
Minolta a*値(1時間後)	8.97 ^a	1.70	9.51	1.92	10.16 ^b	2.17					
Minolta b*値(1時間後)	5.30	1.85	5.88	2.06	6.42	2.10					

*) マーカー型 : W/W=大ヨークシャー / 大ヨークシャー。 W/WB=大ヨークシャー / 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. S0069マーカー型による形質の分離(SSC8:36cM)

形質	W/W(n=58)		W/WB(n=50)		WB/WB(n=9)		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
DG	616.4 ^{Aa}	51.4	591.3 ^b	64.4	523.8 ^b	49.7	10	15.95	-28.13	18.78	0.08
と体長	99.9 ^A	3.67	95.8 ^B	2.81	94.1 ^B	4.00	8	16.99	-2.26	1.89	0.09
背腰長 I	84.2 ^A	3.60	80.3 ^A	2.57	78.6 ^B	3.40	11	11.59	-1.48	1.22	0.07
背腰長 II	74.0 ^A	3.29	70.2 ^B	2.61	68.9 ^B	3.45					
背脂肪肩	3.87	0.56	4.06	0.73	3.99	0.59	10	8.31	-0.21	0.19	0.04
背脂肪 (背)	1.99	0.42	2.16	0.55	2.21	0.43					
背脂肪 (腰)	2.96	0.51	3.12	0.77	3.1	0.55	8	6.64	-0.1	0.26	0.03
背脂肪 (ランジル)	1.89 ^A	0.47	2.36 ^B	0.76	2.69 ^B	0.52					
ロース芯面積	22.22	3.81	22.28	3.07	21.73	2.98	11	4.319	-0.55	-0.22	0.02

表3. SW1945マーカー型による形質の分離(SSC15:59cM)

形質	W/W(n=23)		W/WB(n=68)		WB/WB(n=26)		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
pH	5.66 ^{An}	0.12	5.84 ^B	0.30	5.81 ^B	0.24	53.8	10.57	0.06	0.03	0.05
加圧保水性	77.54	4.94	79.27	5.87	77.90	5.23					
遠心保水性	66.88	4.71	68.53	4.58	67.04	4.69					
伸展率	23.56	2.87	25.11	4.17	24.40	3.10					
水分	74.47 ^A	0.70	75.17 ^{Bb}	0.82	74.72 ^a	0.70	59.1	7.61	0.27	0.05	0.04
加熱損失	25.83	2.89	25.07	4.30	26.62	3.20					
圧搾肉汁率	44.42	1.41	45.35 ^A	2.36	43.67 ^B	1.81					
PCS	4.26	0.92	4.69	1.00	4.56	0.95	49.4	5.26	0.17	0.10	0.03
しまり*	1.48 ^a	0.58	1.02 ^b	0.91	1.23	1.02					
Minolta L*値	48.43 ^a	3.87	45.54 ^b	5.18	46.47	4.82	45.6	10.1	-0.84	-0.03	0.05
Minolta a*値	7.12	1.22	7.16	1.49	7.58	1.14	28.1	3.87	0.15	-0.34	0.02
Minolta b*値	2.17	1.01	1.56	1.32	1.83	1.20	53.8	13.06	-0.38	-0.09	0.06
Minolta L*値(1時間後)	48.65	3.92	46.42	5.01	47.07	5.19					
Minolta a*値(1時間後)	9.46	1.61	9.20	1.96	10.01	1.90					
Minolta b*値(1時間後)	6.33	1.47	5.41	1.98	6.21	2.25					

*) しまり : 数値が低いほど肉のしまりが良い

表4. SW964マーカー型による形質の分離(SSC15:36cM)

形質	W/W(n=23)		W/WB(n=76)		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
融点(外層)	33.51 ^a	4.43	35.62 ^b	4.25	35.13	3.33	57.7	8.74	0.84	-0.44	0.036
融点(内層)	36.02 ^{AA}	5.11	39.40 ^B	3.74	38.68 ^b	4.28	59.1	7.26	0.65	0.19	0.03
融点(腹腔内)	43.06 ^{AA}	4.34	45.31 ^B	2.68	45.25 ^b	1.99					
C16:0(外層)	24.60 ^a	1.19	25.30 ^b	1.18	24.86	0.97	35.9	15.41	0.5	-0.05	0.07
C18:0(外層)	11.86	2.98	13.00	2.21	13.19	2.20					
C18:1(外層)	44.99	2.96	43.88	2.95	44.12	3.03	57	10.14	-0.56	-0.21	0.04
C18:2(外層)	12.56	1.51	11.94	1.69	12.18	1.90					
総飽和脂肪酸(外層)	37.81 ^a	3.63	39.79 ^b	3.03	39.46	2.89	57	14.93	0.72	0.22	0.05
C16:0(内層)	25.07 ^A	1.49	26.20 ^B	1.23	25.88	0.99					
C18:0(内層)	14.68 ^a	4.24	16.67 ^b	2.94	16.65	2.47	45.5	5.74	0.35	0.02	0.03
C18:1(内層)	42.97	3.23	41.41	3.30	41.72	3.10					
C18:2(内層)	11.85 ^A	1.66	10.56 ^B	1.71	10.79	1.92					
総飽和脂肪酸(内層)	41.01 ^{AA}	4.89	44.26 ^B	3.9	43.88 ^b	3.17	43.6	7.17	0.45	0.52	0.03
C16:0(腹腔内)	27.34 ^a	1.37	28.04 ^b	1.18	28.16 ^b	1.09					
C18:0(腹腔内)	18.76 ^a	5.24	20.89 ^b	2.99	21.45 ^b	3.05					
C18:1(腹腔内)	37.29	2.42	36.66	3.37	35.84	3.88					
C18:2(腹腔内)	11.61	3.00	9.78	1.68	10.07	1.96					
総飽和脂肪酸(腹腔内)	47.53 ^A	5.54	50.42 ^B	3.48	51.11 ^B	3.75					

表5. SW1945マーカー型による形質の分離(SSC15:59cM)

形質	W/W(n=23)		W/WB(n=68)		WB/WB(n=26)		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
融点(外層)	33.09 ^a	4.32	34.99 ^a	4.13	37.30 ^{Bb}	3.36	57.7	8.74	0.84	-0.44	0.036
融点(内層)	36.86 ^A	3.98	38.49	4.46	40.47 ^B	3.52	59.1	7.26	0.65	0.19	0.03
融点(腹腔内)	43.96 ^a	3.58	44.79	3.17	45.91 ^b	2.02					
C16:0(外層)	24.41 ^A	0.81	25.19 ^B	1.22	25.50 ^B	1.11	35.9	15.41	0.5	-0.05	0.07
C18:0(外層)	12.19 ^a	2.34	12.60 ^a	2.46	13.92 ^b	1.93					
C18:1(外層)	45.34 ^A	2.76	44.34 ^A	3.03	45.52 ^B	2.36	57	10.14	-0.56	-0.21	0.04
C18:2(外層)	12.35	1.57	11.94	1.76	12.22	1.67					
総飽和脂肪酸(外層)	37.99 ^A	2.75	39.26 ^a	3.29	40.89 ^{Bb}	2.69	57	14.93	0.72	0.22	0.05
C16:0(内層)	25.07 ^A	1.01	26.01 ^B	1.36	26.57 ^B	1.02					
C18:0(内層)	15.41	3.23	15.92	3.22	18.07	2.58	45.5	5.74	0.35	0.02	0.03
C18:1(内層)	42.77 ^A	2.97	42.09 ^A	3.36	39.96 ^B	2.75					
C18:2(内層)	11.62 ^a	1.58	10.72 ^b	1.88	10.41 ^b	1.56					
総飽和脂肪酸(内層)	41.75 ^A	3.49	43.32 ^A	4.27	46.01 ^B	3.27	43.6	7.17	0.45	0.52	0.03
C16:0(腹腔内)	27.70 ^a	1.05	27.81 ^a	1.29	28.45 ^b	1.10					
C18:0(腹腔内)	19.93 ^a	3.72	20.15 ^a	3.79	22.27 ^b	2.31					
C18:1(腹腔内)	37.01	2.23	37.15 ^A	3.68	35.09 ^B	2.68					
C18:2(腹腔内)	10.60	2.39	10.18	2.21	9.68	1.49					
総飽和脂肪酸(腹腔内)	49.07 ^A	3.61	49.45 ^A	4.42	52.21 ^B	2.7					