

阿波とん豚系統における全ゲノム関連解析(GWAS)による 肉質に関与するゲノムの探索

新居雅宏・飯塚 悟・福岡まどか

要 約

阿波とん豚および阿波とん豚系統作成途中で肉質の簡易分析を実施した個体の中から 192 頭から、常染色体上に座乗する 1 塩基多型 (SNP) 合計 58864 箇所の中からクオリティコントロールをクリアした 36293 個の SNP を抽出し、GWAS を実施した。

結果、第 9 染色体 7.8Mb (ALGA0051004) にドリップろ紙重および肉色 b*, 第 15 染色体 63.5Mb (MARC0041764) に肉色 b*, 第 5 染色体 11.7Mb (H3GA0015582) および第 7 染色体 99.3Mb (MARC0027367) にマーブリングスコアに関する全ゲノムレベルの有意な SNP を検出した。

検出した SNP の多くで、望ましい形質と関連しているアレルの頻度が低いため、SNP 情報を利用した選抜により、阿波とん豚の肉質安定化が期待される。

目 的

猪と豚を交雑した実験家系を用いた量的形質遺伝子座 (Quantitative Trait Loci : QTL) の位置と効果を特定する QTL 解析により猪の持つ特徴的な肉質に関わる遺伝子領域を複数検出した¹⁾²⁾。そのうち第 6 染色体上腕部および第 15 染色体中央部を DNA マーカーによる染色体構造の推定と連続的な戻し交配 (Marker Assisted Introgression : MAI) により取り込んだ新しい系統の開発に取り組んだ。2012 年には導入領域が固定化した個体が生まれ、農家への供給を開始した。2013 年には系統の名前を「阿波とん豚」として、肉の販売を開始した。消費者からは柔らかく美味しいと好評であり、また、分析型パネルによる比較および食味センサーにおいて一般豚に比べ阿波とん豚が高い評価を得ている³⁾。しかしながら、阿波とん豚の中には、ロース部胸最長筋をカット後に肉からしみ出す肉汁 (ドリップ) の多い個体が散見され、

品質の均一性の観点からそれら個体の排除が課題となっている。

阿波とん豚作成の基礎となる猪と豚交雑家系の作成を開始した 1997 年当時、遺伝解析の DNA マーカーとしてはマイクロサテライトマーカーが主流であり、多型のため情報量が多いものの、ゲノム上のマーカー数は限定的であることから、遺伝的背景の異なる品種あるいは系統を交雑した実験家系による QTL の位置と効果の特定、そしてその利用がゲノム解析の主流であった。その後、ゲノム解析の手法が進展するとともに情報の蓄積が図られ、ゲノム上に無数に存在する 1 塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms : SNP) により実験家系の作成を必要とせず、同一品種、系統においてもゲノム解析による DNA マーカーアシスト選抜の実践や、ゲノム育種価による育種改良に応用されている。

本研究では、MAI により造成した阿波とん豚系

統についてドリップ量を中心とした関連形質を対象にゲノムワイド関連解析 (Genome Wide Association Study: GWAS) を実施し、選抜に応用可能な SNP を選出する。

材料および方法

1) 形質の測定

2015年4月～2018年6月に1199頭の阿波とん豚系統を対象に既報⁴⁾による各種形質の測定を実施した(表1)。そのうち、ドリップろ紙重の上位下位それぞれ96頭、計192頭をGWASの対象とした。

2) SNP タイピング

DNA は、フェノール-エタノール沈殿により抽出精製し、フルオロメーター (Qubit, Thermo Fisher Scientific) により DNA 濃度を測定、濃度を調整した。

SNP タイピングには、ブタ全ゲノムに分布する64000カ所以上の遺伝子型を検出する PorcineSNP60 DNA Analysis Kit v2 (Illumina, San Diego, CA, USA) SNP アレイを用い、iScan (Illumina) により遺伝子型を検出した。SNP タイピングデータの生成は、GenomeStudio (Illumina) を用いた。

表1 測定形質のまとめ

形質	n	Ave.	Std.
出荷日数	846	208.07	25.33
出荷体重,kg	833	116.84	10.3
3W-出荷時 ADG, g	836	620.33	79.18
背脂肪, cm	1196	2.97	0.71
ドリップろ紙重, mg	1174	209.08	105.58
PCS ^{a)}	1182	4.17	0.74
マーキングスコア ^{b)}	1191	3.02	1.01
ロース断面積, cm ²	1184	23.58	3.71
乳酸値, mmol/L	754	13.06	5.72
L*	1101	55.34	4.22
a*	1101	9.51	2.66
b*	1101	14.05	2.01
700nm	1101	41.95	6.86

*)PCS:豚標準肉色模型より視覚で判定,, マーキングスコア:NPPC モデルを基準に視覚により判定

表2 GWAS に用いた形質のまとめ

形質	n	Ave.	Std.
ドリップろ紙重, mg	192	222.2	150.12
PCS	191	4.15	0.91
マーキングスコア	191	3.06	1.24
L*	180	55.1	5.4
a*	180	9.79	2.87
b*	180	14.11	2.41
700nm	180	42.33	9.32
乳酸値, mmol/L	129	13.21	6.38

3) 統計解析

本研究では、常染色体上に座乗する SNP, 合計58864箇所を対象とした。この SNP について、マイナーアレルの頻度が5%以下、コールレートが90%以下およびハーディ・ワインバーグ平衡からの逸脱の p 値が0.01以下としたクオリティコントロールを実施し、それぞれ、17524, 2320 および2727箇所の SNP を削除した。以下の解析には、合計36293箇所の SNP を利用した。

ゲノムワイド関連解析には、混合線型モデルを利用した。

$$y = Xb + x_i \beta_i + Za + e$$

ここで、b は、母数効果のベクトルを、a は、個体のゲノム類似度に説明される効果のベクトルを、e は、残差を示す。また、β_i は、i 番目の座の SNP の効果を示す。ゲノム類似度 (G) には、

$$G = \frac{\sum_{i=1}^{36293} (x_i - 1_n \bar{x}_i)(x_i - 1_n \bar{x}_i)'}{36293}$$

を利用した。多重比較にはボンフェローの補正を利用し、p 値が0.05を下回る SNP を有意水準とした。

結果および考察

主な GWAS の結果を表3に各 SNP のアレルの頻度および効果を表4に示した。

1) ドリップろ紙重

ドリップろ紙重の GWAS 結果を図1に示した。第9染色体7.8Mb付近全ゲノムワイドレベルのしきい値を超える SNP (ALGA0051004) を検出した。近隣でハプロタイプブロックの関係にある SNP はな

表3 主な GWAS の結果

形質	Chr	SNP	ps	p_value	
Drip+	9	ALGA0051004	7,823,790	7.8255E-07	*
Drip	15	MARC0043278	81,056,324	9.8325E-06	
Drip	16	ALGA0088786	5,777,058	8.5703E-06	
b*	9	ALGA0051004	7,823,790	3.7633E-08	*
b*	15	MARC0041764	63,351,517	2.5938E-07	*
乳酸値	11	MARC0092227	62,892,979	4.9529E-07	*
MarbrSc.+	5	H3GA0015582	11,650,862	1.531E-07	*
MarbrSc.	7	MARC0027367	99,269,726	1.0137E-08	*

*) 全ゲノムレベルで有意な SNP, +) Drip: ドリップろ紙重, MarbrSc.: マーキングスコア

表4 SNP の効果

形質	Chr	SNP	allele	n	Ave.	Se
Drip	9	ALGA0051004	AA	14	141.50	35.72
			AG	65	136.14	15.98
			GG	109	283.84	12.83
Drip	15	MARC0043278	AA	84	277.63	15.15
			AG	85	199.06	16.23
			GG	21	95.81	18.36
Drip	16	ALGA0088786	AA	52	299.31	18.00
			AG	95	226.01	15.30
			GG	41	129.76	19.27
乳酸値	11	MARC0092227	AA	41	10.42	0.96
			AG	58	15.61	0.88
			GG	29	17.23	1.19
b*	9	ALGA0051004	AA	14	12.43	0.36
			AG	65	12.74	0.26
			GG	98	15.25	0.21
b*	15	MARC0041764	AA	25	12.07	0.32
			AC	80	13.45	0.22
			CC	73	15.51	0.27
MabrSco	5	H3GA0015582	AA	4	5.69	1.59
			AG	22	3.75	0.52
			GG	165	2.90	0.06
MabrSco	7	MARC0027367	AA	1	10.00	-
			AG	19	3.87	0.49
			GG	171	2.93	0.07

かったが, ASGA0102944, H3GA0052420 などと比較的高い統計量を示した。ALGA0051004のSNPはAとGからなり, A/A(141.50)およびA/G(136.14)に対し, G/G(283.84)のドリップろ紙重が高い結果となった。それぞれのSNPの頻度は, A/A 7.5%(14/188), A/G 34.6%(65/188)およびG/G 57.9%(109/188)であり, Aアレルの頻度がGアレルに対し, 少なかった。そこで, ALGA0051004をマーカ

ーとして選抜時にAアレルを種畜として選抜することで, ドリップろ紙重が低い, すなわちドリップを軽減する改良効果が期待された。その一方, A/Aの標準誤差は大きいため, 更なる選抜に効果的なSNPの探索が必要である。第9染色体の7Mb付近には肉質に関するQTLあるいはSNPの報告はない。その一方, Sscrofall.1⁵⁾によると, ALGA0051004はRho guanine nucleotide exchange factor 17 (*ARHGEF17*) 遺伝子内のSNPである。*ARHGEF17*の機能として人ではアクチン骨格制御を介して細胞の運動性, 極性, 増殖に関与している⁶⁾が, 豚における機能に関する報告はない。今後, *ARHGEF17*を含め周辺遺伝子の情報からドリップろ紙重をより明確に分離するDNA配列の特定を目指す。

第15染色体にはゲノムワイドレベルに達しないものの81Mb付近に複数のSNPを検出した。最も統計量の高いMARC0043278のアレルはA/A 277.63mgに対しGアレルを持つことで軽くなる傾向を示しG/Gでは, 95.81mgであった。該当領域は日本猪と大ヨークシャーのF2 inter cross家系においてpH, 肉色b*のQTLを検出し, その後のDNAマーカーアシスト導入による阿波とん豚造成の基盤となる領域である。連続的な戻し交配により, 目的QTLの絞込みを試みるも, QTLの分離が困難であり, 現在も広いゲノム領域を導入している。他方, 第15染色体には肉のドリップロスと関連の深い加熱損失率に関与する*PRKAG3* (AMP-Activated Protein Kinase Subunit Gamma-3) が120.8Mbにマッピングされ⁷⁾, また, *PRKAG3*より上流60Mb付近に肉のpHに関するSNPの報告がある⁸⁾。肉のpHは保水性すなわちドリップ量と高い相関関係にあることから, 本研究のSNPの可能性も示唆されたが, 本研究で検出されたSNPは, MARC0043278(81Mb), INRA00050035 (110Mb)を頂点としており, *PRKAG3*およびVerardo⁸⁾らの報告と位

置が離れている。第 15 染色体には猪由来負の成長に関する QTL がマッピング⁹⁾されており、猪由来の成長関連遺伝子の排除による阿波とん豚の生産性改良のためにも詳細な遺伝解析が必要である。

第 16 染色体 5.8Mb 付近に統計量の高い SNP (ALGA0088786) を検出した ($P=8.57034E-06$)。ALGA0088786 は、*RETREG1* (reticulophagy regulator 1) の遺伝子内に存在しており、遺伝子の機能と形質の関連性について注目されるが、これまでのところ *RETREG1* と筋肉内粗脂肪量との関連性が報告¹⁰⁾されているにすぎない。

2) b*

第 9 染色体 7.8Mb 付近全ゲノムワイドレベルのしきい値を超える SNP (ALGA0051004) を検出した。本 SNP はドリップろ紙重と同じ SNP であり G/G が他の A/A および A/G に比べ高かった。ドリップろ紙重と b* の相関係数は $r=0.72$ ($P<0.001$) と高く、同じ遺伝子の多面的効果であることが示唆された。

第 15 染色体 63.4Mb 付近には MARC0041764 など有意な SNP が近接した領域に複数検出された。MARC0041764 における A アリルが C アリルに対し、相加的に b* を低下させる効果を示した。SNP の頻度は A/A 14.1% (25/178), A/C 44.9% (80/178) および C/C 41.0% (73/178) と A がマイナーアリルであることから、豚群内で効果的に b* を下げることが示唆された。

3) 血中乳酸値

第 11 染色体 62.9Mb 付近全ゲノムワイドレベルのしきい値を超えると畜時血中乳酸値に関する SNP (MARC0092227) を検出した。MARC0092227 のアリル頻度は、A/A 32.0% (41/128), A/G 45.3% (58/128) および G/G 22.7% (29/128) 該当領域には Glypican6 をコードする *GPC6* がマッピングされている。Glypican は細胞の成長と分裂の制御に関与しており、*GPC6* は、増殖因子、プロテアーゼおよび抗プロテアーゼに対する細胞表面共受容器として機

能しており、豚では骨格の発達¹¹⁾、脂肪の蓄積¹²⁾との関連性が報告されている。本研究において検出された血中乳酸値と Glypican の関連性は不明であるが、血中乳酸値とドリップろ紙重については、緩やかな正の相関 ($r=0.31$, $n=128$ 頭) があるため、A アリルを持つ個体を選抜することが望ましい。

4) マーブリングスコア

マーブリングスコアについては、第 5 染色体の 11.6Mb (H3GA0015582) および第 7 染色体 99.3Mb (MARC0027367) の 2 カ所にゲノムワイドで有意な SNP を検出した。H3GA0015582 におけるアリルによるマーブリングスコアの平均値は、A/A 5.69, A/G 3.75 および G/G 2.90 で A アリルを持つことでマーブリングスコアが高くなった (表 4)。また、豚群における A アリルの頻度が低いため、H3GA0015582 を使用することでマーブリングスコアを高める効果が期待された。

同様に MARC0027367 は、A/A, A/G および G/G の順でマーブリングスコアが高かった。また、A アリルの頻度は低いため、マーブリングスコアの短期的な改良が見込まれる。

マーブリングスコアは、胸最長筋内に含まれる粗脂肪量を NPPC モデル¹³⁾を基準として視覚により判断した数値であり、値が大きいほど、筋肉内粗脂肪含量が大きい。第 5 染色体および第 7 染色体ともに、筋肉内粗脂肪含量に関して複数の報告¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾があるが、いずれも本研究の結果と位置が離れていた。

今回の研究で検出した複数の SNP は、阿波とん豚系統でのみ検出された SNP であった。そこで、該当 SNP をピンポイントで判定可能であるリアルタイム PCR と専用の試薬を用いた TaqMan SNP 判定法を用いて種畜の選抜に応用していく。

謝 辞

本研究において DNA タイピングおよび GWAS を

実行いただいた農研機構畜産研究部門谷口雅章上級研究員，荒川愛作主任研究員に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Nii, M., T. Hayashi, S. Mikawa, F. Tani, A. Niki, N. Mori and T. Awata, *J. Anim. Sci.* 83:308-315. 2005
- 2) Nii, M., T. Hayashi, F. Tani, A. Niki, N. Mori, T. Awata and S. Mikawa, *Animal Genetics.* 37:342-347. 2006
- 3) 新居雅宏・松長辰司・金丸 芳・飯塚 悟. 徳島畜研報. 16:19-26. 2017
- 4) 新居雅宏・飯塚 悟・杓谷洋一・才力慎也. 徳島畜研報. 18:31-36. 2019
- 5) Warr, A., A. L. Archibald. *Gigascience.* 9(6): g1aa051. 2020
- 6) Cook, D. R., K. L. Rossman, C. J. Der. *Oncogene* 33:4021-4035. 2014
- 7) 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. L. Roy, P. Chardon, L. Andersson. 288:1248-1251. 2000
- 8) Verardo, L. L., M-L. S-Aimonen, T. Serenius, V. Hietakangas, P. Uimari. *BMC Genetics.* 18:13. 2017
- 9) 新居雅宏・谷 史雄・森 直樹. 徳島畜研報. 2:38-48. 2002
- 10) Zhang1, P., L. Qinggang, W. Yijing, Y. Zhang, B. Zhang1, H. Zhang. *Scientific Reports.* 12:2844. 2022
- 11) Capurro, M., T. Izumikawa, P. Suarez, Cydzik, W. T. Kaneiwa, *J. Cell. Bio.* 216(9):2911-2926. 2017
- 12) Ding, R., M. Yang, J. Quan, L. Shaoyun, Z. Zhuang, J. Yang. *Front. Genet.* 28. 2019
- 13) National Pork Producers Council, NPPC marbling standards. Des Moines, USA. 1990
- 14) Sato, S. Y. Uemoto, T. Kikuchi, S. Egawa, K. Kohira, T. Saito, H. Sakuma, S. Miyashita, et al. *BMC Genet.* 17. 2016
- 15) Meadus, W. J., D. Pascale, M. Juarez, J. C. Roberts, J. L. Zantinge, *Agriculture* 8:122. 2018
- 16) Zhang, Z., Z. Zhang, F. O. Oyelami, H. Sun, Z. Xu, Y. Pan *Anim Genet.* 52:108-111. 2021

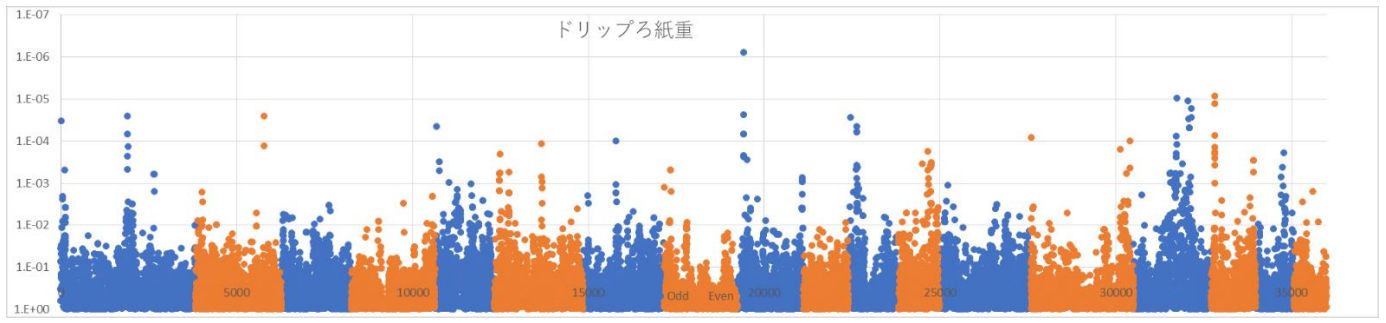


図1 ドリップろ紙重に関する GWAS 結果のマンハッタンプロット