

阿波とん豚系統における肉質に関する 1 塩基多型の検索

新居 雅宏・武田 真城・福岡 まどか

要 約

阿波とん豚および阿波とん豚系統における肉のドリップ等に関するゲノムワイド関連解析 (GWAS) の結果、検出された 1 塩基多型 (SNP) について、その効果を検証した。すなわち、GWAS に用いた個体とは別の阿波とん豚系統 290 頭を対象に GWAS に用いた約 6 万個の SNP の中から統計量の高い SNP を選択し、TaqMan[®]プローブ法により各 SNP を単独で判定するとともに肉質調査を実施し、SNP と肉質の関連性より SNP の効果を検証した。

第 6 染色体 22.3Mb (ASGA0027821) は、ドリップを中心にディプロタイプ間に差がみられ、また、好ましい SNP を保持する個体が調査豚内で少ないことから、改良効果が期待された。第 9 染色体 7.8Mb (ALGA0051004) は、ドリップ、肉色等に差がみられた。また、第 11 染色体 24.2Mb (ASGA0104912), 62.9Mb (MARC0092227) および第 15 染色体 63.4Mb (MARC0041764) には肉色等に関して SNP の効果が確認された。以上の結果より、GWAS で算出された統計量の高い SNP は単独 SNP の判定でも同じ血縁関係にある豚群では、同様の効果を示し、改良の指標として利用可能である。

目 的

豚は暑熱環境下の飼育において繁殖能力の低下、採食量の低減とそれに伴う発育速度の鈍化がみられる。一方、肉色が淡く、軟質で滲出性のある、いわゆる PSE (Pale Soft Exudative) 肉は高温環境時におけると畜が発症頻度の増加と症状の深刻化を招くことが知られている¹⁾。その一方、肉の色調は普通であるものの、ロース、主に最長筋からしみ出す肉汁 (ドリップ) が多く食味に劣る RSE (Reddish Soft Exudative) 肉の発生頻度が近年、高いことが報告²⁾されており、肉質に特徴を持つブランド豚ではその発生の防止が課題となっている。本県では、平成 25 年度より猪の特定の染色体を豚へと導入した「阿波とん豚」を官民協力して生産拡大に取組み、高級豚肉としてブランド確立を推進している。阿波とん豚は、訓練されたパネルによる食味検査あるいは味センサーによる検査において、一般豚に比べ食味に優れるとの評

価が得られている³⁾。しかしながら、春から夏にかけて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。そこで、遺伝的な改良を検討するため DNA マイクロアレイを用いた阿波とん豚のゲノムワイド関連解析 (Genome Wide Association Study: GWAS) を実施した。その結果、ドリップ等肉質に関する複数の 1 塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms : SNP) を検出した⁴⁾。牛では、育種価と SNP チップの情報を組合せたゲノム育種価による選抜が経済形質の改良に応用され、成果が出ている⁵⁾。しかしながら、SNP チップの解析には、高額な解析コスト (専用機器と個体毎に必要な SNP チップ) と判定された数万個の SNP を効果的に育種改良に利用する技術が必要であり、個体価値の高い牛に比べ、豚での普及は遅れている。

従来、DNA 多型の判定は、制限酵素長多型を利用した PCR-RFLP が一般的であるが判定に時間が

かかるとともに目的とする DNA の周囲の配列によっては制限酵素を設計できない配列も存在している。そのような中、蛍光標識した合成 1 本鎖 DNA と PCR 反応を組合せた TaqMan[®]プローブ法 (Thermo Fisher Scientific) は、専用の反応試薬とリアルタイム PCR 機器を用いることで目的とする SNP を効果的に判定可能である⁶⁾。そこで、肉質検査を実施した阿波とん豚系統について、TaqMan プローブ法による SNP タイピングを実施、形質データを集約し、その差により SNP の効果を検証した。本研究により、先に報告⁴⁾した GWAS の信頼性を評価するとともに、阿波とん豚の更なる肉質の高品質化に向けた改良の基盤を構築する。

材料および方法

1) 形質の測定

2020 年 10 月～2021 年 11 月に 290 頭の阿波とん豚系統を対象に既報³⁾による手法を用いて各種形質を測定した (表 1)。また、新たに業務用の吸着材 (フレッシュマスター[®], ユニ・チャーム) によるドリップ量の指標も活用した (ドリップ 2)。

2) SNP タイピング

先報⁴⁾において検出した 5 カ所の SNP について、TaqMan プローブを合成し、THUNDER BIRD[®] qPCR Mix (TOYOBO Life Science) による PCR 反応をリアルタイム PCR (Step One Plus, Thermo Fisher Scientific) により実施した。TaqMan プローブの配列、位置を表 2 に示した。反応条件は、95℃20 秒、95℃1 秒-60℃20 秒を 40 サイクル、25℃30 秒で行った。

3) 統計処理

ハプロタイプを組合せたディプロタイプの組合せで集約した各種形質間の差を R⁶⁾により検定した。なお、屠畜までの係留時間及び出荷月を要因に加えた線形モデルを利用した。

表 1 測定形質のまとめ

形質	n	平均	S.D.
出荷日数	291	203.03	19.51
出荷体重,kg	290	117.14	8.49
PCS ^{*)} .	291	3.76	0.69
しまり ^{*)} .	291	1.67	1.07
マーブリングスコア ^{*)} .	291	3.41	1.68
ドリップ 1,mg	290	202.51	108.60
ドリップ 2,mg	290	229.68	197.20
L*	290	56.31	3.82
a*	290	8.24	1.76
b*	290	13.31	1.62
700nm	290	41.26	6.41

^{*)}PCS: 豚標準肉色模型より, しまり: 肉のしまりの程度を 5 段階(低いほど, しまりの良い肉), マーブリングスコア: NPPC モデルを基準にいずれも視覚により判定

表 2 使用した SNP

SNP 名	染色体	位置
ASGA0027821	6	22, 300, 833
ALGA0051004	9	7, 823, 790
ASGA0104912	11	24, 175, 652
MARC0092227	11	62, 892, 979
MARC0041764	15	63, 351, 517

結果および考察

1) 第 6 染色体 (ASGA0027821)

ASGA0027821 は、第 6 染色体の 22.3Mb に座位する SNP で A/A 182 頭, A/G 103 頭および G/G 5 頭に分類された。本研究より採用した肉の陳列時に肉汁の吸着剤として使用される市販の素材を用いたドリップ 2 では、A/A, A/G, G/G の順に低くなり、A/A-G/G 間に有意差が認められた ($P<0.01$)。また、分光光度計の 700nm 波長において同様に G を持つことで値が低下し、A/A-A/G 間に有意差が認められた ($P<0.05$)。ドリップ 1, L*, a* および b* も有意差は認められなかったが同様の傾向を示した。

ASGA0027821 は先の研究における Genome Wide Association Study (GWAS) の結果、ろ紙ドリップ法 (本研究におけるドリップ 1) 等について比較的高い統計量を示したことから、本研究における

SNP 判定の対象とした。G/G の頻度は、5/290 (1.7%) と低いため、更に例数を加えた検証が必要であるが、G アリルとドリップ減少の関連性より、G アリルは望ましいアリルであることが示唆された。また、群内における G アリルの頻度が低いことから、改良効果が大きいことも併せて示唆された。

2) 第 9 染色体 (ALGA0051004)

ALGA0051004 は A/A 60 頭、A/G 169 頭および G/G 60 頭に分類された。遺伝子型により肉質を集約した。その結果、ドリップ 1 およびドリップ 2 は G/G-A/G-A/A の順に低く、G/G-A/A 間に有意差がみられた ($P<0.01$, $P<0.05$)。

ALGA0051004 は、第 9 染色体の 7.8Mb に座位しており、Genome Wide Association Study (GWAS) の結果、ALGA0051004 をピークとするドリップ 1 および b* に高い統計量を検出した⁴⁾。本研究の結果は前報⁴⁾と同じ G/G に対して A/A が低い結果となった。更にドリップ 2 においては同様に G/G に対して A/A が低い結果となった ($P<0.01$)。また、L* および 700nm では、G/G が他の組合せに対して低かった ($P<0.01$)。

3) 第 11 染色体 (ASGA0104912, MARC0092227)

ASGA0104912 は、第 11 染色体 24.2Mb に、MARC0092227 は同 62.9Mb に座位する SNP である。ASGA0104912 は G/G 71 頭、G/T 133 頭および T/T 86 頭でドリップ 1 およびドリップ 2 は T/T に比べ G/G が低かった ($P<0.05$)。一方、MARC0092227 は C/C11 頭、C/T112 頭および T/T167 頭でドリップ 1 およびドリップ 2 は C/C が T/T に比べ低かった ($P<0.05$)。

ASGA0104912 は、ドリップ 1 に関してゲノムワイドレベルに近い統計量を示した SNP であり、本研究においてもドリップ量においてアリル間で一定の差がみられた。一方、MARC009287 は GWAS において、と畜時の血中乳酸値に関して全ゲノムワイドレベルのしきい値を超えた SNP であるが、ドリップについてアリル間に差がみられた。GWAS に

使用した形質間には、 $r=0.19$ と低いながら有意な相関関係がみられ、遺伝子の多面的効果のため、本研究において MARC009287 のアリル間に差がみられたことが示唆された。

4) 第 15 染色体 (MARC0041764)

MARC0041764 は、第 15 染色体 63.4Mb に座位し、GWAS の結果、b* についてゲノムワイドレベルの統計量を示した SNP である。

MARC0041764 は、A/A20 頭、A/C168 頭および C/C102 頭に分類された。肉のシマりは A/C が A/A に対して低かった ($P<0.05$)。また、a* および b* は C/C に対し A/A が低かった ($P<0.01$, $P=0.05$)。一方、有意差はないものの A/A が A/C および C/C よりも低い傾向であった。豚の第 15 染色体には、肉のドリップ量に関する重要な遺伝子 (*PRKAG3*: 22.7Mb) が報告⁸⁾されているが、本研究における位置と離れており、別の遺伝子の効果によるものと推察された。

文 献

- 1) 西尾重光. 日豚研試 13(1): 54-64. 1976
- 2) 入江正和. 動物遺伝育種研究(ミニレビュー). 34(2): 33-44. 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・福岡まどか. 徳島畜研報. 21:8-13. 2022
- 5) 造田葵・小川伸一郎・松田洋和・谷口幸雄・渡邊敏夫・杉本喜憲・祝前博明 J. Animal Genetics 50: 31-3. 2022
- 6) EM De la Vega, K.D. Lazaruk, M.D. Rhodes, M.H. Wenz. Mutat. Res. 573:111-135. 2005.
- 7) R Core Team. <https://www.R-project.org/>. 2020.
- 8) Milan, D., J. Jeon, C. Looft, V. Amarger, A. Robic, M. Thelander, G.C. Rogel, L. Andersson. Science. 288:1248-1251. 2000

表 3 SNP の組合せによる表型値の集計(肉質)

SNP 名	SSC	DNA	PCS			シマリ			ドリップ 1			ドリップ 2		
			n	Ave.	Std.	n	Ave.	Std.	n	Ave.	Std.	n	Ave.	Std.
ASGA0027	6	A/A	182	3.66a	0.61	182	1.80	1.09	182	218.32	110.0	182	266.54A	206.0
821		A/G	103	3.89b	0.77	103	1.45	1.01	103	174.94	102.1	103	170.87	167.7
		G/G	5	4.40b	0.82	5	1.70	0.91	5	166.80	67.03	5	88.00B	43.06
ALGA0051	9	A/A	60	3.78	0.65	60	1.62a	1.08	60	190.35a	102.4	60	186.70A	168.1
004		A/G	169	3.81	0.70	169	1.55	0.98	169	193.65	101.8	169	216.17	186.8
		G/G	60	3.60	0.66	60	2.08b	1.20	60	239.27b	125.5	60	311.93B	232.3
ASGA0104	11	G/G	71	3.72	0.72	71	1.44a	1.05	71	182.94a	98.47	71	168.90a	149.8
912		T/G	133	3.67	0.65	133	1.68	1.06	133	201.59	112.3	133	245.35b	213.0
		T/T	86	3.93	0.70	86	1.84b	1.07	86	218.55b	109.0	86	254.93b	198.6
MARC0092	11	C/C	11	3.50	0.50	11	2.00	1.16	11	279.91a	130.6	11	379.64a	125.6
227		T/C	112	3.77	0.67	112	1.83	1.11	112	212.94b	111.5	112	252.20	194.7
		T/T	167	3.76	0.71	167	1.55	1.02	167	189.66b	102.6	167	204.56b	197.8
MARC0041	15	A/A	20	3.78	0.79	20	1.20a	1.06	20	159.35	95.28	20	146.25	151.7
764		A/C	168	3.71	0.65	168	1.72b	1.06	168	203.87	103.6	168	237.62	194.6
		C/C	102	3.83	0.72	102	1.69	1.07	102	207.64	117.7	102	233.05	207.8

A-B:P<0.01, a-b:P<0.05

表 4 SNP の組合せによる表型値の集計(肉色)

SNP 名	SSC	DNA	L*			a*			b*			700nm		
			n	Ave.	Std.	n	Ave.	Std.	Std.	Ave.	Std.	n	Ave.	Std.
ASGA0027	6	A/A	182	56.78	3.90	182	8.36	1.73	182	13.49	1.69	182	42.18a	6.77
821		A/G	102	55.65	3.55	102	8.06	1.82	102	13.05	1.44	102	39.94b	5.45
		G/G	5	53.29	3.31	5	7.57	1.66	5	12.08	1.41	5	35.54	4.88
ALGA0051	9	A/A	60	56.22A	3.70	60	8.21	1.58	60	13.27	1.36	60	40.96A	5.93
004		A/G	168	55.84	3.59	168	8.08	1.82	168	13.10	1.49	168	40.30A	5.60
		G/G	60	57.73B	4.26	60	8.71	1.73	60	13.92	2.04	60	44.26B	8.09
ASGA0104	11	G/G	70	56.59	3.85	70	7.28	1.83	70	12.79A	1.53	70	40.24	6.35
912		T/G	133	56.35	3.85	133	8.28	1.67	133	13.38B	1.50	133	41.37	6.23
		T/T	86	56.05	3.77	86	8.95	1.48	86	13.62B	1.78	86	41.97	6.73
MARC0092	11	C/C	11	58.86a	3.97	11	9.24	1.95	11	14.66a	2.37	11	47.15A	7.82
227		T/C	112	56.18b	3.76	112	8.70	1.60	112	13.54	1.60	112	41.71B	6.06
		T/T	166	56.25b	3.81	166	7.86	1.77	166	13.06b	1.51	166	40.59B	6.37
MARC0041	15	A/A	20	55.98	3.86	20	7.15	2.00	20	12.55a	1.41	20	39.11	5.79
764		A/C	167	56.50	3.78	167	8.18	1.63	167	13.25	1.51	167	41.42	6.19
		C/C	102	56.10	3.89	102	8.54	1.86	102	13.56b	1.78	102	41.46	6.87

A-B:P<0.01, a-b:P<0.05