

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：21301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07696

研究課題名(和文) 黒毛和種ゲノムDNAメチル化多型と脂肪交雑との関係に関する研究

研究課題名(英文) The research for relationships among genome DNA methylation polymorphism and marbling in Japanese beef cattle

研究代表者

須田 義人 (Yoshihito, Suda)

宮城大学・食産業学群(部)・教授

研究者番号：90404847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：高能力種雄牛の産子計200頭の腎周囲脂肪由来ゲノムDNAを供試した。脂肪組織内のDNAメチル化割合を算出した。また、DNAメチル化割合の結果と枝肉成績との相関解析を行った。その結果、種雄牛Aが子、種雄牛Bが父という親子関係にある高能力種雄牛であり、それらの産子における34種類の遺伝子上流域の高メチル化割合の傾向は類似している傾向にあったが、数種の特徴的な遺伝子上流域が明らかとなった。種雄牛AおよびB間で比較すると、Aの方の産子の枝肉成績が良いことが知られており、CHFRの高メチル化割合との関係性が強いと推察された。

研究成果の概要(英文)：This study's aims are to examine relationships among DNA methylation patterns at the slaughter after fattening and economic carcass traits of JB siblings of two sires. Genomic DNA samples were collected from adipose tissues around the kidneys in each 100 JBs produced from 2 sires (Sire A and B) have parent-child relation, totaling of 200 JBs. Correlation analysis and analysis of variance (ANOVA) are performed by using SAS program, version 9.1. The CG rich regions in the upstream regions of seven genes, APC\_2, CDKN2A\_1, CDKN2A\_2, CDKN2B, GSTP1, MGMT and SFRP1 of 24 genes were very high DNA methylation level, and DMP in the other genes was similar between 2 sires with parent-child relation. Additionally, CDKN2A\_2 and RB1 was specific condition. Correlation between subcutaneous fat thickness and CHFR was 0.73 at 5% significance level in JBs of sire A.

研究分野：動物遺伝育種学

キーワード：黒毛和種 DNA メチル化 多型 脂肪交雑 枝肉成績

## 1 . 研究開始当初の背景

我が国の黒毛和種の脂肪交雑などの肉質特性は、日本食ブームと共に国内外で注目され、世界における優位性を保っている。近年、分子生物学的技術が発達し、ヒトやブタと共にゲノム解析が進んでいることで、脂肪交雑や肉質特性に関わる分子形成メカニズムの解明も近いと考えられてきたが、やはり量的形質である経済形質にはおびただしい数の遺伝子が関与しており、その貢献遺伝子群の特定や形成機構の解明は困難を極めている。近年の QTL 情報や SNP 情報の経済形質(量的形質)への寄与率は低く、約 3.5 万個あるとされる遺伝子群からこれらの情報を用いて量的形質に関わる貢献遺伝子を絞り込むことは現段階では難しい。また、量的形質の多くは、遺伝要因のみならず環境要因の影響も強いことから、SNP 解析などの寄与率を高めるために、分子改良マーカーとして安定的かつ早期に判断できるものとして、“ 遺伝的効果 (塩基配列多型やそれらの相互作用) に加えて環境効果の変化を遺伝子発現に繋ぐ共通分子メカニズム (エピジェネティック作用 ; ゲノム DNA メチル化)” を考慮することが重要である。

## 2 . 研究の目的

黒毛和種の脂肪交雑は、たとえ同一の家系や両親であっても、飼料、農家、期間、他様々な要因で同程度のものにならないことは知られており、環境を反映するエピジェネティック機構との関係についてとても興味深い。先行研究では、ヒトで既知のエピジェネティック作用を受けることが報告されている 25 種の遺伝子 CpG 領域のメチル化パターンを格付毎に比較し、特徴的な領域を見出した。一部の領域では、血液においては高メチル化状態であるのに対し、ロース芯部では低メチル化状態でありと組織間で異なっており、他の領域においてはヒトとは異なり全くメチル化を受けていない領域もあった。そして、一

部の領域のメチル化度と格付との間で有意な相関関係にある領域も見出された。これまでの解析は、一部の領域に限って解析を行い、DNA メチル化パターンの違いが経済形質(枝肉各付けなどの量的形質)を予測するための分子マーカーとなる可能性を探る基礎的なものであった。そこで今回は、in vitro レベルの検証として、まずはウシ脂肪前駆細胞 (BIP) の分化誘導前後のゲノムについて網羅的メチル化チップ解析を行い、顕著に変化したメチル化領域を絞り込み、それらの領域に着目しながら、in vivo で成長過程の血液や枝肉背最長筋由来ゲノムのメチル化パターンの変化を BMS ナンバー毎に比較することを主たる目的とした。

脂肪蓄積、BMS ナンバーや霜降り形成に貢献するメチル化領域とそれをプロモーターとする遺伝子群を特定すること。

遺伝的に固定されているメチル化領域 (ゲノムインプリンティング領域)、飼養環境にて変化するメチル化領域、脂肪細胞へ分化することで変化するメチル化領域を特定し、それらをプロモーターに持つ遺伝子群を明らかにする。

血液由来ゲノム DNA を用いたメチル化状況のモニタリングの可否を明らかにする。

## 3 . 研究の方法

### 実験

材料およびゲノム DNA の抽出 :

親子関係にある基幹種雄牛 2 頭 (A, B) の産子各 100 頭、計 200 頭の枝肉腎周囲脂肪を採取しゲノム DNA を抽出した。

高低メチル化 DNA の濃縮 :

ゲノム DNA を断片化し、EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit (タカラバイオ社) を用いてメチル化 DNA の濃縮を行った。濃縮されたメチル化 DNA を CENTRI-SEP Spin Columns (Princeton Separations 社) を用いて精製した。

ゲノム DNA のメチル化割合の解析 :

EpiScope® Promoter qPCR Array (Human) (タカラバイオ社) および SYBR® Premix Ex Taq™ GC (Perfect Real Time) (タカラバイオ社) を用いた。各サンプルの DNA の相対量を推定するためにリアルタイム PCR 法を用いた。EpiScope Promoter qPCR Array Analysis Tool を用いて高メチル化割合と低メチル化割合をそれぞれ算出した。

統計解析：

統計解析には、SAS (バージョン 9.1) プログラムおよび GLM プロシージャおよび CORR プロシージャを用いて検討した。今回分析に用いた枝肉成績は、出荷月齢が有意であるものについて平均月齢に線形補正し、高メチル化割合 (メチル化度) の格付け間での比較、さらには相関解析を行った。相関解析では 5% 水準で無相関検定を行った。

#### 実験

供試細胞の培養と分化誘導：

黒毛和種筋肉内脂肪前駆細胞の培養と継代を行った。培養安定後、コンフルエントな状態で脂肪細胞へ分化誘導し、さらに濃厚飼料成分抽出物で刺激した。

遺伝子発現解析：

BIP 細胞区、分化誘導区の 2 区で既知の脂質代謝関連遺伝子、FASN, SCD, ASS1 についてリアルタイム PCR により mRNA 発現解析を行った。

ゲノムワイドメチル化解析：

分化誘導後に伴うゲノムワイドなメチル化変化を調査するために、細胞から脂肪専用キット (タカラバイオ社) を用いてゲノム DNA を抽出し、メチル化ビーズアレイ解析 (タカラバイオ社) を行った。

#### 4. 研究成果

##### 実験 について

親子関係にある 2 種雄牛由来のゲノム DNA を供試して、ヒトゲノムでのメチル化促進領域とされる遺伝子上流域 34 領域を選

択し、メチル化度 (メチル化割合) を調査、比較した。また、それらと枝肉成績との相関解析も行った。高能力種雄牛である A および B 産子各 100 頭計 200 頭の腎周囲脂肪由来ゲノム DNA を供試した。ヒトで DNA メチル化の影響を受けることが明らかになっている全 34 種の遺伝子プロモーター領域を対象にタカラバイオ社製キットを用いてメチル化 DNA 抽出濃縮およびリアルタイム PCR 法との組み合わせにより脂肪組織内の DNA メチル化割合を算出した。また、DNA メチル化割合の結果と枝肉成績との相関解析を行った。その結果、種雄牛 A が子、種雄牛 B が父という親子関係にある高能力種雄牛であり、それらの産子における 34 種類の遺伝子上流域の高メチル化割合の傾向は類似している傾向にあったが、数種の特徴的な遺伝子上流域が明らかとなった。特に、CDKN2A\_2 および RB1 はさらなる検討を要する興味深い遺伝子上流域であると考えられた。また、種雄牛 A および B 間で比較すると、A の方の産子の枝肉成績が良いことが知られており、CHFR の高メチル化割合との関係性が強いと推察された。これらの遺伝子に関するさらなる追跡研究および細胞レベルでの In Vitro 研究が重要であると考えられた。

##### 実験 について

牛肉由来ゲノム DNA のメチル化多型と脂肪交雑との相関性について、家系間や格付け間、部位間を中心に調査し、関係性の強いゲノム領域を特定することを主な目的とした。まずは、黒毛和種筋肉内脂肪前駆細胞 (BIP 細胞) を供試しメチル化ビーズアレイ解析 (メチル化チップ解析) によって約 800,000 領域のメチル化領域を検出できた。その 800,000 領域の内、プロモーター領域にある CpG アイランド数は 183,815 領域あることが推定された。牛の遺伝子数が 30,000 から 40,000 とすると単純計算で 1 遺伝子当たり平均 4 から 6 か所のメチル化領域を持ち制御

されていることが概ねで推察された。次に、メチル化差異のある領域を検出するサブトラクション法である MS-RDA 法を用いて、格付間で比較した所、特に ASS1 遺伝子のプロモーター領域にメチル化度に差異があるように特異的に検出できた。その領域について、脂肪組織由来のゲノムに関する格付間で比較した所、メチル化多型が確認された。続いて、ヒトゲノムでメチル化の影響を受けることが明らかにされている 32 領域に関する Promoter qPCR Array 解析を試み、メチル化度と理化学特性等との相関解析を行った結果、肉質や食感に関わる要素と BRCA1, LOX のプロモーター領域のメチル化度との間で、有意な負の相関が認められた。特に、LOX 遺伝子のプロモーター領域のメチル化度は、牛肉由来ゲノム DNA においてメチル化度が高く、このことは生体内でリジン 6 オキシダーゼ発現が抑制される傾向にあることを示しており、リジン代謝が促進され、脂肪蓄積能が高いということが推察された。以上のことから概ね主たる目的を達成でき、黒毛和種において肉質や食感に関わる脂肪交雑と関係性の深いメチル化領域の候補を見出せたと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1) 相澤正樹, 福島小百合, 小林栄治, 麻生久, 鈴木啓一, 須田義人.

黒毛和種における ASS1 遺伝子上流域のメチル化修飾に関する枝肉格付け間比較. 2017 年. 第 122 回日本畜産学会大会, 神戸.

2) Y. Suda, E. Kobayashi, Y. Saito, K. Kato, K. Suzuki.

Correlation between genome DNA methylation of CG rich in upstream region of CHFR gene and economic traits in Japanese Black cattle. 2016.

EAAP Annual Meeting 2016, Belfast, UK.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

須田 義人 (Yoshihito SUDA)

宮城大学・食産業学群(部)・教授

研究者番号: 90404847

##### (2) 研究分担者

小林 栄治 (Eiji KOBAYASHI)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合

研究機構・畜産研究部門ユニット長

研究者番号: 00186727

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )