

平成 31 年 4 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07984

研究課題名(和文)ブタの増体に影響する暑熱耐性の改良のためのDNA育種用分子マーカーの開発

研究課題名(英文)Development of molecular marker for genetic improvement of heat tolerance influencing pig growth

研究代表者

山田 宜永(Yamada, Takahisa)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：40253207

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ブタ増体における高低暑熱耐性群の間で遺伝子型が異なる3つのFGF21多型を検出した。そのうち、転写開始点から-2466に位置する多型を暑熱耐性に関連する多型候補として選抜した。制限酵素Bcc1を用いたPCR-RFLPによる遺伝子型判別法を確立した。暑熱耐性の分散値を2014年と2016年のサンプル間で比較した結果、3つの基準による暑熱期間のいずれを用いても、分散値は2016年で大きく、暑熱耐性を評価するにあたり2016年のサンプルがより適していることが示された。2016年のサンプルを用いたタイピングおよび相関解析を行ったが、FGF21多型と暑熱耐性の間に関連は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、ブタ増体に影響する暑熱耐性とFGF21多型の間に関連は認められなかった。相関解析におけるサンプル数の問題もあるが、FGF21がブタ暑熱耐性の原因遺伝子ではなく、より上流の遺伝子が原因遺伝子である可能性が示唆された。こうして、本研究の成果は暑熱耐性についての世界初の分子マーカーの開発につながり、暑熱ストレスによる増体量の低下を抑制するためのDNA育種改良技術の確立に貢献できる学術的かつ社会的意義をもつ。

研究成果の概要(英文)：We detected three FGF21 polymorphisms between two pig groups with high and low heat tolerance in terms of growth trait of fattening pig. One of the three polymorphisms, FGF21-2466, located in 2466 bp upstream of transcription start site was selected as candidate for polymorphism associated with heat tolerance. We established genotyping method of PCR-RFLP with restriction enzyme Bcc1 for FGF21-2466. We compared variance of heat tolerance between two samples of pig born in year 2014 and year 2016. As the result, the variance was larger in year 2016 than in year 2014, irrespective of three periods of heat stress set by three types (date, temperature, and THI) of criteria, suggesting that the pig sample of year 2016 was suitable for evaluation of heat tolerance phenotype. We genotyped FGF21-2466 of the pig sample and performed association study, but could not detect association between the FGF21 polymorphism and heat tolerance.

研究分野：動物遺伝学

キーワード：暑熱耐性 ブタ増体 分子マーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

暑熱ストレスによる増体量の低下を抑制することが養豚業界の課題となっている。その課題を解決するために、遺伝子発現プロファイリングに基づく戦略により、ブタ増体に影響する暑熱耐性の改良のための DNA 育種技術に有用となる分子マーカーを開発することにした。これまでの研究で、暑熱飼育環境下において暑熱耐性が極端に異なる選抜群（高暑熱耐性群と低暑熱耐性群）適温飼育環境下の対照群を作成し、暑熱耐性の差がみられ始める早い時点の選抜群および同齢時の対照群の最長筋について、マイクロアレイ法による遺伝子発現プロファイリングを行った。その結果、低暑熱耐性群では、暑熱ストレスによる PPARGC1A キー因子の発現増加がみられ、この発現増加により暑熱耐性が低下すると示唆された。さらに、低暑熱耐性群で見られる FGF21 の暑熱ストレス応答性（暑熱応答性）の発現増加が、PPARGC1A キー因子の暑熱応答性発現増加のトリガーになり、暑熱耐性の低下に影響すると示唆された。こうして、FGF21 を、ブタ暑熱耐性の遺伝的ばらつきの原因遺伝子の候補として同定した。

#### 2. 研究の目的

(1) 3 個体群（高暑熱耐性群、低暑熱耐性群、対照群）について、ブタ暑熱耐性の低下と関連する、FGF21 の暑熱応答性の発現増加を確認する。

(2) FGF21 の暑熱応答性の発現増加と関連するアリルをもつ DNA 多型を検出する。

(3) 検出した DNA 多型のタイピング（遺伝子型判定）法を確立する。

(4) 検出した DNA 多型から、ブタ暑熱耐性の低下と関連するアリルをもつ DNA 多型（群）を検出する。

#### 3. 研究の方法

(1) 三元交雑種の肥育後期雌豚を用いて、暑熱環境下での選抜により、暑熱耐性が極端に高い個体群（高暑熱耐性群）それが極端に低い個体群（低暑熱耐性群）を作成する。また、三元交雑種の肥育後期雌豚を用いて、適温環境下の対照群を作成する。3 個体群の最長筋からトータル RNA を抽出し、リアルタイム PCR により各個体の FGF21 の発現量を解析する。

(2) 高低暑熱耐性群の最長筋から、ゲノム DNA を抽出する。FGF21 のプロモーター領域の約 5 kb、全長遺伝子領域の約 3 kb、3' 隣接領域の約 2 kb を増幅するためのプライマーを用いて、各個体での PCR ダイレクトシーケンスを行う。えられた塩基配列データを用いて、DNA 多型を探索し、これらの DNA 多型の各個体での遺伝子型を判定する。このような DNA 多型のそれぞれについて、遺伝子型と FGF21 の発現量との相関を解析する。

(3) 検出した DNA 多型のタイピング法を確立する。つまり、SNP については PCR-SSP 法、indel 多型については PCR-SSLP 法によるタイピング法を採用し、高低暑熱耐性群のゲノム DNA をリアレンスサンプルに用いて、プライマーおよび PCR 条件の設定を行う。

(4) 三元交雑種の肥育後期豚からなる集団を用いて、暑熱下増体量と適温下増体量の差により、各個体の肥育後期の暑熱耐性を算定する。また、各個体の毛根を採取する。採取した毛根からゲノム DNA を抽出し、検出した DNA 多型の各個体でのタイピングを行う。えられた表現型検定データとタイピングデータを用いて、SAS MIXED プロシジャにより相関解析を行う。

#### 4. 研究成果

(1) PPARGC1A の発現を制御する上流遺伝子、AKT2、BMP7、CREB1、CRTC1、CRTC2、CRTC3、FGF21、IRF4、MAPK14、MTOR、NOS2、PPP3CA、PRKAA1、SIRT1、TP53 の 3 個体群における発現パターンをリアルタイム PCR により解析したところ、FGF21 が唯一 3 個体群間で発現変動を示し、低暑熱耐性群では対照群、高暑熱耐性群よりも約 2.5 倍の発現量の増加を示した。このような結果から、FGF21 の暑熱ストレス応答性の発現増加は、ブタ増体暑熱耐性の低下に影響すると予想される、PPARGC1A キー因子の暑熱ストレス応答性発現増加の有効トリガーとされた。こうして、FGF21 が、ブタ暑熱耐性の低下と関連する、暑熱応答性の発現増加を示すことが確認された。

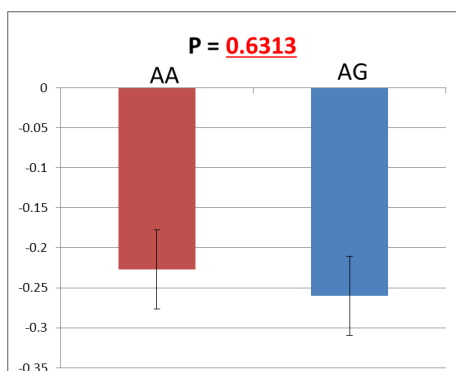
(2) FGF21 のプロモーター領域の約 5 kb、全長遺伝子領域の約 3 kb、3' 隣接領域の約 2 kb において、高低暑熱耐性群の DNA を用いたダイレクトシーケンスによる多型検出を行ったところ、14 個の多型が検出された。そのうち、FGF21 転写開始点より -2608、-2466、+944 の 3 つの多型について、高低暑熱耐性群間で異なった遺伝子型を示した。転写制御領域に存在し、かつ転写開始点に最も近い FGF21-2466 多型が暑熱耐性関連多型として最も有力であると考えられた。以上の結果から FGF21-2466 多型を暑熱応答性の発現増加と関連するアリルをもつ DNA 多型として同定した。

(3) FGF21-21 プライマーを使用した PCR 増幅の後、制限酵素 Bcc1 (BioRad) を使用した処理に

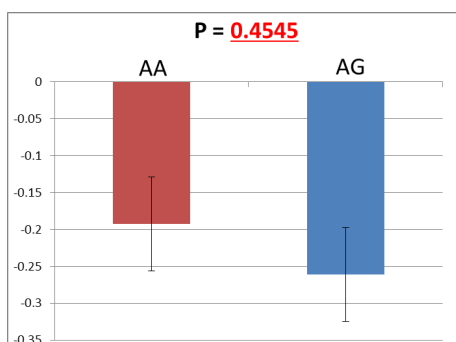
より、リファレンスサンプルにおける FGF21-2466 多型の遺伝子型判別を行えることを確認した。FGF21-21 プライマーを使用した PCR 増幅により -2466 多型を含む 302bp の DNA を増幅した後、Bcc1 による制限酵素処理により、-2466 多型が A である場合は 46bp、144bp、112bp に切断される一方、多型が G の場合 46bp、256bp が検出され、256bp が 144bp、112bp の断片に切断がされないことを示した。この結果を電気泳動により確認を行うことで FGF21-2466 多型の遺伝子型判別を行うことに成功した。以上の結果から PCR-RFLP による FGF21-2466 多型の遺伝子型判別法を確立した。

(4) 2014 年生まれ、2016 年生まれの三元交雑種のブタサンプルを使用し、暑熱耐性を評価する表現型解析を行った。暑熱耐性は(暑熱期間での一日当たりの平均増体量) (適温期間での一日当たりの平均増体量)の式で出される値で評価を行った。暑熱期間を設けるにあたり、日付、気温、THI の 3 つの基準を用いた。年度別で暑熱耐性の分散値を比較した結果、いずれの基準を用いても 2014 年度よりも 2016 年度の値が高いことが示された。この結果から 2016 年度では暑熱耐性の個体間差がより顕著に表れており、暑熱耐性を評価するにあたり 2016 年度のサンプルデータがより適していると考えられた。こうして、FGF21-2466 多型のジェノタイピングおよび暑熱耐性との相関解析は 2016 年度のサンプルを使用することとした。

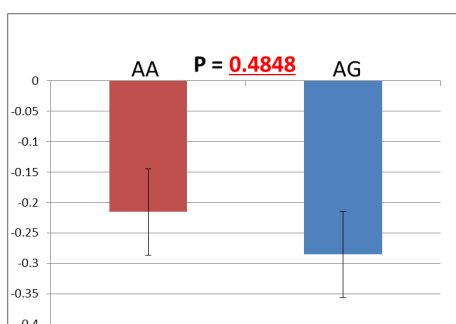
FGF21-2466 多型のジェノタイピングの後、暑熱耐性との相関解析を行ったところ、日付、温度、THI いずれの基準でも有意差は認められず、FGF21-2466 多型の遺伝子型と暑熱耐性の表現型間に有意な相関は認められなかった。このことから、FGF21-2466 多型は暑熱耐性に関連する多型と同定することはできなかった。考えられる原因としてサンプル数の不足が考えられた。今回使用したサンプル内では、GG の遺伝子型を示す個体が得られなかった。GG 型を示す個体を含め、より個体数を増やすことで有意差を確認することができる可能性が考えられた。また、FGF21 より上流に位置する遺伝子が暑熱耐性に関連する可能性も考えられた。



日付に基づく暑熱耐性と FGF21-2466 多型との相関



温度に基づく暑熱耐性と FGF21-2466 多型との相関



THI に基づく暑熱耐性と FGF21-2466 多型との相関

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計4件)

- H. TSUJI, Y. TANIGUCHI, S. ISHIZUKA, H. MATSUDA, T. YAMADA, K. NAITO, H. IWASAKI, Structure and polymorphisms of the major histocompatibility complex in the Oriental stork, *Ciconia boyciana*, *Scientific Reports*, 査読有, 7, 42864, 2017  
DOI:10.1038/srep42864
- T. OHTA, Y. TORINIWA, N. RYUMON, N. INABA, T. HIRAO, S. YAMANAKA, T. MAENO, W. SAKAKIBARA, M. SUMIKAWA, K. CHIBA, A. NAKAMURA, K. MIYAJIMA, F. FATCHIYAH, T. YAMADA, Maternal high-fat diet promotes onset of diabetes in rat offspring, *Animal Science Journal*, 88, 149-155, 2017  
DOI:10.1111/asj.12606
- Q. SIQIN, T. NISHIUMI, T. YAMADA, S. WANG, W. LIU, R. WU, G. BORJIGIN, Relationships among muscle fiber type composition, fiber diameter and MRF gene expression in different skeletal muscles of naturally grazing Wuzhumuqin sheep during postnatal development, *Animal Science Journal*, 88, 2033-2043, 2017  
DOI:10.1111/asj.12848
- Y. KOMATSU, S. SUKEGAWA, M. YAMASHITA, N. KATSUDA, B. TONG, T. OHTA, H. KOSE, T. YAMADA, Identification of genes showing differential expression profile associated with growth rate in skeletal muscle tissue of Landrace weanling pig, *Journal of Genetics*, 95(2), 341-347, 2016  
<https://www.ias.ac.in/article/fulltext/jgen/095/02/0341-0347>

### 〔学会発表〕(計6件)

- 九富 斉、依田澄香、中野杏子、山田宜永、高田良三、藤井 崇、山崎 信、井上寛暁、祝前博明、ブタ増体量に及ぼす暑熱耐性と FGF21 の相関解析、第 56 回北信越畜産学会新潟県分会、2018
- 斎藤亮太、九富 斉、依田澄香、加藤博幸、山田宜永、ブタにおける TTN の遺伝子発現量と増体形質との関連性、第 56 回北信越畜産学会新潟県分会、2018
- 依田澄香、勝田尚樹、池乗乃智、加藤博幸、祝前博明、山田宜永、ブタにおける ND1、ND4 および COQ3 の遺伝子発現量と増体形質との関連性、第 55 回北信越畜産学会新潟県分会、2017
- 九富斉、勝田尚樹、助川 慎、山田宜永、高田良三、藤井 崇、山崎 信、井上寛暁、ブタ増体に及ぼす暑熱耐性に関連した暑熱応答性分子パスウェイの探索 - マイクロアレイおよび RNA-seq に基づく解析 -、第 55 回北信越畜産学会新潟県分会、2017
- 勝田尚樹、助川 慎、山田宜永、高田良三、藤井 崇、山崎 信、井上寛暁、ブタ増体に及ぼす暑熱耐性に関連した暑熱応答性変化をもつ分子パスウェイの探索、日本畜産学会第 121 回大会、2016
- 九富斉、勝田尚樹、助川 慎、山田宜永、高田良三、藤井 崇、山崎 信、井上寛暁、ブタ増体に及ぼす暑熱耐性に関連した暑熱応答性分子パスウェイの探索、第 65 回北信越畜産学会大会、2016

### 〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。