

令和 6 年 4 月 26 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06351

研究課題名（和文）ウシ脂肪交雑形成に関連する遺伝子発現変動の原因変異の同定

研究課題名（英文）Identification of causal mutation for gene expression change associated with bovine marbling

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） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：ウシ脂肪交雑原因変異の有力候補多型であるEDG1多型およびTTN多型は、それぞれEDG1およびTTNのmRNAレベル、タンパク質レベルと相関関係にあるが、それぞれの遺伝子の転写活性に影響しないことを明らかにした。こうして、EDG1多型、TTN多型はそれぞれの遺伝子の発現変動の原因変異ではなく、ウシ脂肪交雑原因変異として認められないと考えられ、これらの多型と連鎖不平衡にある近傍のDNA多型が、真の発現変動および脂肪交雑形成能力の原因変異になると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EDG1の発現増加、TTNの発現減少は、それぞれ、筋肉内血管形成、筋線維損傷を引き起こすことにより、脂肪交雑形成を誘導すると示唆されている。EDG1多型、TTN多型はそれぞれの遺伝子の発現変動さらには脂肪交雑形成能力と相関がみられ、EDG1多型、TTN多型と連鎖不平衡にある近傍のDNA多型が、真の発現変動および脂肪交雑形成能力の原因変異になると考えられるが、EDG1多型、TTN多型は、脂肪交雑形成能力の向上を目指したDNA育種技術のための分子マーカーとして有用であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study showed that EDG1 and TTN polymorphisms, possible candidates for causal mutations of bovine marbling, respectively, are associated with mRNA level and protein level of EDG1 gene and those of TTN gene. On the other hand, this study demonstrated no effect of these polymorphisms (EDG1 and TTN polymorphisms) on EDG1 and TTN gene transcription. Thus, we suggested that these polymorphisms (EDG1 and TTN polymorphisms) are not regarded as causal mutations of gene expression change of EDG1 and TTN genes, and then of bovine marbling. DNA polymorphisms, which are in linkage disequilibrium with EDG1 and TTN polymorphisms, may be true polymorphisms for causal mutations of bovine marbling.

研究分野：動物遺伝学

キーワード：脂肪交雑 遺伝子発現 原因変異

## 1. 研究開始当初の背景

肉用種牛において、脂肪交雑形成のレベルを人為的に制御する牛肉生産システムを確立することが大きな課題となっている。ウシ脂肪交雑形成レベルには遺伝要因つまり脂肪交雑形成能力が関与し、発揮される脂肪交雑形成能力の大きさには飼養等の環境要因が影響する。このことから、脂肪交雑形成能力を判定するための遺伝子診断技術、その能力に応じて、発揮される能力の大きさを調節するための飼養管理技術を開発・利用することにより、脂肪交雑形成レベルを制御する牛肉生産システムを確立することができると考えられている。遺伝子診断技術は、脂肪交雑形成に影響する原因遺伝子変異の知見に基づき開発される。また、脂肪交雑原因変異を端緒として解明される、脂肪交雑形成に影響する分子パスウェイの知見に基づき、飼養管理技術が開発される。このような理由から、ウシ脂肪交雑原因変異を特定する必要がある。

ウシ脂肪交雑原因変異の特定のために、発現プロファイリングに基づく戦略を適用してきた。これまでに、脂肪交雑形成能力が極端に異なる去勢雄牛群(高脂肪交雑形成群と低脂肪交雑形成群)の最長筋を用いて、発現プロファイリングを行うことにより、EDG1 遺伝子の発現増加、TTN 遺伝子の発現減少が、高脂肪交雑形成と関連することを明らかにした。また EDG1 の発現増加、TTN の発現減少は、それぞれ、脂肪交雑形成を誘導することになる筋肉内血管形成、筋線維損傷を引き起こす。これらのことから、EDG1 の発現増加、TTN の発現減少は、高脂肪交雑形成に影響すると示唆された。

引き続き、EDG1、TTN について DNA 多型を探索し、黒毛和種牛集団において脂肪交雑形成能力との相関を解析した。その結果、EDG1、TTN のプロモーター領域に位置する DNA 多型 (EDG1 多型、TTN 多型) が、高脂肪交雑形成と関連する対立遺伝子 (高脂肪交雑アリル) をもつことを明らかにした。また、様々なウシ品種を用いたアリル頻度分布解析により、これらの多型の高脂肪交雑アリルが、脂肪交雑形成能力を高くする選抜を受けた黒毛和種においてより高い頻度を示すことを明らかにした。さらに、このような多型の高脂肪交雑アリルが、遺伝的にかけ離れた様々な肉用種牛集団においても、高脂肪交雑形成と関連することを明らかにした。これらのことから、EDG1 多型、TTN 多型の高脂肪交雑アリルは、高脂肪交雑形成に影響すると示唆された。このような研究成果に基づき、高低脂肪交雑形成群を用いて、EDG1 多型、TTN 多型とそれぞれの遺伝子の発現レベルとの相関を予備的に解析した。その結果、EDG1 多型、TTN 多型の高脂肪交雑アリルが、それぞれ EDG1 の発現増加、TTN の発現減少と関連すると示唆された。さらに、EDG1 多型、TTN 多型が、データベース検索によりえられた、それぞれの遺伝子の転写制御モチーフ配列に位置し、それぞれの高脂肪交雑アリルが、転写を誘導、抑制させるヌクレオチドに相当することを明らかにした。これらのことから、EDG1 多型、TTN 多型の高脂肪交雑アリルは、それぞれ EDG1 の発現増加、TTN の発現減少に影響すると示唆された。申請者のこれまでの研究成果を踏まえ、EDG1 多型、TTN 多型を、それぞれの遺伝子の発現を変動させることによりウシ脂肪交雑形成に影響する原因変異の有力候補として同定した。

## 2. 研究の目的

遺伝子 (EDG1、TTN) の発現を変動させることによりウシ脂肪交雑形成に影響する原因変異の有力候補多型 (EDG1 多型、TTN 多型) を、ウシ脂肪交雑原因変異として特定する有力な証拠を得るために、これらの有力候補多型の機能性、mRNA レベルおよびタンパク質レベルでの発現変動との関連、転写活性および核タンパク質との結合性に対する影響を解析することで、有力候補多型をそれぞれの遺伝子の発現変動の原因変異として同定する。

## 3. 研究の方法

(1) 屠殺時の黒毛和種去勢雄牛の尾根部仙尾骨筋を、EDG1 多型、TTN 多型の機能解析のためのサンプルとして採取する。採取したサンプルを用いて、EDG1 多型、TTN 多型のタイピング (遺伝子型判定) を行うことで、EDG1 多型、TTN 多型のそれぞれについて、3 つの遺伝子型群のサンプル、高脂肪交雑形成と関連する対立遺伝子である高脂肪交雑アリル (EDG1 多型では T アリル、TTN 多型では T アリル) のホモ型群 (高脂肪交雑アリルホモ型群)、低脂肪交雑アリル (EDG1 多型では G アリル、TTN 多型では C アリル) のホモ型群 (低脂肪交雑アリルホモ型群)、両アリルのヘテロ型群を選抜する。

(2) 選抜したサンプルを用いて、EDG1、TTN のそれぞれの mRNA レベルを解析する。えられた mRNA レベルの定量データとタイピングデータを用いて、EDG1 多型、TTN 多型とそれぞれの遺伝子の mRNA レベルとの相関を解析し、EDG1 多型の T アリル、TTN 多型の T アリルが、それぞれ EDG1 の mRNA レベルでの発現増加、TTN の mRNA レベルでの発現減少と関連することを明らかにする。

(3) 選抜したサンプルを用いて、EDG1、TTN のそれぞれのタンパク質レベルを解析する。えられたタンパク質レベルの定量データとタイピングデータを用いて、EDG1 多型、TTN 多型とそれぞ

れの遺伝子のタンパク質レベルとの相関を解析し、EDG1 多型の T アリル、TTN 多型の T アリルが、それぞれ EDG1 のタンパク質レベルでの発現増加、TTN のタンパク質レベルでの発現減少と関連することを明らかにする。

(4) 高脂肪交雑アリルホモ型群および低脂肪交雑アリルホモ型群のゲノム DNA を用いて、EDG1 多型、TTN 多型のそれぞれを含むプロモーター領域のゲノム断片を PCR 増幅し、レポーターベクターに挿入することにより、レポータープラスミドを作製する。レポータープラスミドのトランスフェクション、レポーターアッセイを行うことにより、EDG1 多型、TTN 多型のそれぞれのプロモーター領域の転写活性を解析する。このような解析により、EDG1 多型の T アリル、TTN 多型の C アリルに対応するプロモーター領域が、それぞれ EDG1 多型の G アリル、TTN 多型の T アリルに対応するものより高い転写活性を示し、EDG1 多型、TTN 多型が、それぞれの遺伝子の転写活性に影響することを明らかにする。

(5) EDG1 多型、TTN 多型のそれぞれについて、高脂肪交雑アリルホモ型群および低脂肪交雑アリルホモ型群から核抽出液を調製する。さらに、EDG1 多型、TTN 多型のそれぞれについて、2 つのアリルに対応する標識二本鎖オリゴヌクレオチドを作製する。このような標識二本鎖オリゴヌクレオチドと核抽出液を用いたゲルシフト解析により、EDG1 多型、TTN 多型のそれぞれのゲノム DNA 領域(二本鎖オリゴヌクレオチド)と結合する核タンパク質のレベルを解析する。このような解析により、EDG1 多型、TTN 多型のそれぞれについて、2 つのアリルに対応する DNA 領域の比較で結合核タンパク質レベルに差がみられ、高脂肪交雑アリルホモ型群と低脂肪交雑アリルホモ型群の核抽出液の比較では、結合核タンパク質レベルに差がみられないことを明らかにする。つまり、EDG1 多型、TTN 多型が、それぞれの遺伝子の核タンパク質との結合性に影響することを明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) 新潟市食肉センターの協力のもと、血縁関係がない同齢の黒毛和種去勢雄牛の尾部仙尾骨筋を、EDG1 多型、TTN 多型の機能解析のためのサンプルとして採取した。採取したサンプルのゲノム DNA を用いて、PCR-RFLP 法による EDG1 多型、TTN 多型のタイピング(遺伝子型判定)を行うことで、EDG1 多型については、3 つの遺伝子型群のサンプル、高脂肪交雑形成と関連する対立遺伝子である高脂肪交雑アリル(T アリル)のホモ型群(高脂肪交雑アリルホモ型群)、低脂肪交雑アリル(G アリル)のホモ型群(低脂肪交雑アリルホモ型群)、両アリルのヘテロ型群をそれぞれ 12 サンプル以上選抜した。また、TTN 多型については、3 つの遺伝子型群のサンプル、高脂肪交雑アリル(T アリル)のホモ型群である高脂肪交雑アリルホモ型群、低脂肪交雑アリル(C アリル)のホモ型群である低脂肪交雑アリルホモ型群、両アリルのヘテロ型群をそれぞれ 15 サンプル以上選抜した。

(2) 選抜したサンプルのトータル RNA を用いて、リアルタイム PCR により EDG1、TTN のそれぞれの mRNA レベルを解析した。えられた mRNA レベルの定量データとタイピングデータを用いた、EDG1 多型と EDG1 の mRNA レベルとの相関解析により、EDG1 多型については、T アリルが EDG1 mRNA レベルの発現増加と関連することを明らかにした。また、TTN 多型については、T アリルが TTN mRNA レベルの発現減少と関連することを明らかにした。

(3) 選抜したサンプルのライセートを用いて、ウェスタンブロットングにより EDG1、TTN のそれぞれのタンパク質レベルを解析した。えられたタンパク質レベルの定量データとタイピングデータを用いた、EDG1 多型と EDG1 のタンパク質レベルとの相関解析により、EDG1 多型については、T アリルが EDG1 タンパク質レベルでの発現増加と関連することを明らかにした。また、TTN 多型については、T アリルが TTN タンパク質レベルでの発現減少と関連することを明らかにした。

(4) EDG1 多型、TTN 多型のそれぞれの高脂肪交雑アリルホモ型群および低脂肪交雑アリルホモ型群のゲノム DNA を用いて、EDG1 多型、TTN 多型のそれぞれについて 2 つのアリルに対応するプロモーター領域のゲノム断片を PCR 増幅した。えられた PCR 産物を、pGL4.10[luc2]レポーターベクターに挿入することにより、レポータープラスミドを作製した。シーケンスによる塩基配列の確認後、EDG1 多型についてはレポータープラスミドをウシ大動脈内皮細胞へ、TTN 多型については C2C12 樹立細胞系へトランスフェクションし、レポーターアッセイを行うことで、EDG1 多型、TTN 多型のそれぞれのプロモーター領域の転写活性を解析した。このような解析を行った結果、EDG1 多型の T アリルに対応するプロモーター領域と G アリルに対応するものとの間で転写活性に差は認められなかった。また、TTN 多型の C アリルに対応するプロモーター領域と T アリルに対応するものとの間においても転写活性に差は認められなかった。以上より、EDG1 多型、TTN 多型は、それぞれの遺伝子の転写活性に影響しないことを明らかにした。

(5) 本研究の上述の結果より、EDG1 多型および TTN 多型は、それぞれ EDG1 および TTN の mRNA レベル、タンパク質レベルと相関関係にあり、高脂肪交雑アリルである EDG1 多型の T アリル、TTN 多型の T アリルが、それぞれ EDG1 の発現増加、TTN の発現減少と関連することが明らかになった。その一方、EDG1 多型、TTN 多型が転写活性に影響するか否かを調べたところ、それら 2 つの多型の両方において、高脂肪交雑アリルに対応するプロモーター領域と低脂肪交雑アリルに対応するプロモーター領域との間で転写活性に差が認められず、EDG1 多型、TTN 多型は、それぞれの遺伝子の転写活性に影響しないことが明らかになった。こうして、EDG1 多型、TTN 多型は

それぞれの遺伝子の発現変動の原因変異ではなく、ウシ脂肪交雑原因変異として認められないと考えられた。EDG1 の発現増加、TTN の発現減少は、それぞれ、筋肉内血管形成、筋線維損傷を引き起こすことにより、脂肪交雑形成を誘導すると示唆されている。EDG1 多型、TTN 多型はそれぞれの遺伝子の発現変動さらには脂肪交雑形成能力との相関がみられることから、EDG1 多型、TTN 多型と連鎖不平衡にある近傍の DNA 多型が、真の発現変動および脂肪交雑形成能力の原因変異になると考えられた。しかしながら、EDG1 多型、TTN 多型は、脂肪交雑形成能力の向上を目指した DNA 育種技術のための分子マーカーとして有用であると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Z. CHENG, X. LI, S. BAO, T. YAMADA, G. CAO, J. LIU, A. CHEN, B. TONG	4. 巻 13
2. 論文標題 Effects of the CDC10 (Septin7) gene on the proliferation and differentiation of bovine intramuscular preadipocyte and 3T3-L1 cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Animals	6. 最初と最後の頁 609
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 X. GUO, T. LI, D. LU, T. YAMADA, X. LI, S. BAO, J. LIU, G. BORJIGIN, M. CANG, B. TONG	4. 巻 13
2. 論文標題 Effects of the expressions and variants of the CAST gene on the fatty acid composition of the longissimus thoracis muscle of Grazing Sonid Sheep.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Animals	6. 最初と最後の頁 195
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Y.Y. CAO, G. CHENG, Z.X. CHENG, C. BAO, T. YAMADA, G.F. CAO, S.Q. BAO, N.M. SCHREURS, L.S. ZAN, B. TONG	4. 巻 192
2. 論文標題 Association of variants in FABP4, FASN, SCD, SREBP1 and TCAP genes with intramuscular fat, carcass traits and body size in Chinese Qinchuan cattle.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Meat Science	6. 最初と最後の頁 108882
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 R. MASUKO, S. SUKEGAWA, T. OHTA, T. YAMADA, M. YAMAZAKI, H. INOUE, T. FUJII, S. OKAMOTO, H. IWASAKI	4. 巻 50
2. 論文標題 Identification of PPARGC1A-regulated oxidative phosphorylation pathway showing heat stress-responsive activation associated with low heat stress tolerance for growth rate in skeletal muscle tissue of finishing pig.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Animal Genetics	6. 最初と最後の頁 47-52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 R. MASUKO, S. SUKAGAWA, T. OHTA, T. YAMADA, M. YAMAZAKI, H. INOUE, T. FUJII, S. OKAMOTO, H. IWAISAKI	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification of PPARC1A-regulated oxidative phosphorylation pathway showing heat stress-responsive activation associated with low heat stress tolerance for growth rate in skeletal muscle tissue of finishing pig	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Animal Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 H. FUJIMOTO, K. MATSUMOTO, M. KOSEKI, H. YAMASHIRO, T. YAMADA, R. TAKADA	4. 巻 91
2. 論文標題 Effects of rice feeding and carnitine addition on growth performance and mRNA expression of protein metabolism-related genes in broiler grower chicks	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Y. LI, G. CHENG, T. YAMADA, J. LIU, L. ZAN, B. TONG	4. 巻 10
2. 論文標題 Effect of expressions and SNPs of candidate genes on intramuscular fat content in Qinchuan cattle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Animals	6. 最初と最後の頁 1370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 石井森昭・山田宜永・祝前博明
2. 発表標題 血統およびSNP型情報の同時利用による量的形質の遺伝性の評価 黒毛和種直接検定成績による検討
3. 学会等名 北信越畜産学会第71回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 増子 諒・山田宜永・藤井 崇・高田良三
2. 発表標題 ブタ増体量に及ぼす暑熱耐性と関連する候補遺伝子PPARAの多型解析
3. 学会等名 日本動物遺伝育種学会第23回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 蟹澤翔太・山田宜永・谷口幸雄・横井伯英・勝田智博・祝前博明
2. 発表標題 黒毛和種直検牛の飼料利用性形質に関する血統情報およびSNP型情報を用いた分散の推定
3. 学会等名 日本畜産学会第128回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井森昭・蟹澤翔太・山田宜永・谷口幸雄・横井伯英・祝前博明
2. 発表標題 黒毛和種直検牛の発育・体型形質に関する血統およびSNP型の情報を用いた遺伝率の推定
3. 学会等名 日本動物遺伝育種学会第22回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井森昭・蟹澤翔太・山田宜永・杉山稔恵・谷口幸雄・横井伯英・金子良則・祝前博明
2. 発表標題 トキ国内飼育下個体群における群成長、平均近交度および有効集団サイズの経時的変化
3. 学会等名 日本動物遺伝育種学会第21回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蟹澤翔太・山田宜永・谷口幸雄・横井伯英・勝田智博・祝前博明
2. 発表標題 黒毛和種直検牛の発育形質に関する血統情報およびSNP型情報を用いた遺伝分散の推定
3. 学会等名 日本動物遺伝育種学会第21回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蟹澤翔太・山田宜永・谷口幸雄・勝田智博・祝前博明
2. 発表標題 黒毛和種における飼料利用性のゲノム育種価予測式についての基礎的な一検討
3. 学会等名 日本畜産学会第125大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 祝前博明・九富 斉・蟹澤翔太・山田宜永・谷口幸雄・杉山稔恵・金子良則
2. 発表標題 トキ国内飼育下個体群の遺伝的多様性の近年における推移
3. 学会等名 日本畜産学会第125大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------