

機関番号：32658

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580314

研究課題名（和文） ヤギ遺伝子マーカーの開発と応用 - 特に、カシミア毛生産の QTL 解析への応用 -

研究課題名（英文） Development and characterization of genetic markers in goat: Application for QTL analysis of cashmere production used developed-genetic markers.

研究代表者

横濱 道成（YOKOHAMA Michinari）

東京農業大学・生物産業学部・教授

研究者番号：40220561

研究成果の概要（和文）：遺伝学的解析のためのヤギ遺伝子マーカーは他の家畜に比べて開発が遅れている状況にある。そこで本研究はヤギの遺伝解析に有用なマイクロサテライトマーカーの開発を行ない、新規の 260 種のマーカーの作出に成功した。また、本研究においては開発したマーカー利用のモデルケースとしてヤギカシミア毛生産に関連する遺伝子の QTL 解析を行った。その結果、第 5 番染色体にカシミア生産と連鎖するマーカーが検出され、さらにこの領域に毛形成に關与する *IGF1* およびタイプ II ケラチン遺伝子群の存在が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：To date, goat genetic markers have been limited in number compared with those of other livestock. To increase the number of potentially useful goat genetics studies, we isolated microsatellite sequences from the goat genome. A total of 260 new microsatellites were successfully optimised as genetic markers. Next, we performed QTL analysis to identify loci associated with cashmere production used developed genetic markers. The QTL analysis showed that markers on chromosome 5 were suggestive linked to cashmere production. Given its genomic localization and its involvement in the hair production in mammals, the *IGF1* and type II keratin genes were the candidate gene for the goat cashmere production.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：動物資源学、家畜育種学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：育種、遺伝子マーカー、マイクロサテライト、ヤギ、カシミア、QTL

1. 研究開始当初の背景

ヤギは反芻家畜の中でも初期に家畜化が行われた動物種であり、耐寒性、耐暑性など環境適応能力が高く、世界中で広範囲に飼育されている。また、ヤギの乳、肉、毛は畜産物としても利用されており、高地および寒冷地では重要な家畜として位置づけられてい

る。特に、カシミア毛はヤギ特異的な形質であり、中国、モンゴルなどの東アジア諸国においては畜産物としての重要性は極めて高い。しかしながら、これらの地域におけるヤギカシミア毛の生産性を効果的に向上させるための育種は全く行われていないのが現状である。

我々の研究グループはこのような現状を打開するため、ヤギカシミア毛の生産に関与する分子の単離を目的として、遺伝子・蛋白質の比較発現解析を行った。その結果、ヤギカシミア毛が最も高生産される冬季に発現量が変化する複数の分子の存在を明らかにした (Yokohama *et al.* *Anim. Sci. J.* 2004; Seki *et al.* *Anim. Sci. J.* in press)。さらに、詳細な組織学的解析からヤギカシミア毛生産には大きな品種間差異が認められ、我国で開発されたシバヤギや、韓国、モンゴルなどのアジア系在来種はカシミア毛を高発現するのに対して、ヨーロッパ系品種であるザーネン種はカシミア毛の発現がほとんど認められなかった (Seki *et al.* *Anim. Sci. J.* in press)。これらの結果を統合して考えると、カシミア毛生産には複数の分子が関与していること、さらに品種間差異が存在することからカシミア毛発現に関与する分子を同定するためには連鎖解析に基づく遺伝学的解析が有効な手段となると考えられた。

しかしながら、ヤギにおいては遺伝学的解析を進める上で最も重要なツールとなる多型遺伝子マーカーの情報量が極めて少ない現状にあった。ヤギはウシ、ヒツジ、ブタ、ニワトリなどの主要家畜と比べてゲノム解析が最も遅れており、全塩基配列解読はもちろんのこと、詳細な染色体地図、遺伝子地図などの作製は全く行われておらず、ゲノム情報を基盤としたデータベースも存在せず (Womack, *Genome Res.* 2005)、主として系統分類学、集団遺伝学的解析を行うための遺伝子マーカーの報告はあったが、その情報量は極めて少なく、他の家畜の 10 分の 1 以下であった (Maddox *et al.* *Genome Res.* 2004; Ihara *et al.* *Genome Res.* 2004)。従って、ヤギの品種間多型を明確に同定可能な遺伝子マーカーの開発が急務となっていた。

2. 研究の目的

本申請はヤギのゲノム解析用多型マーカーを確立するため、(1) ヤギゲノム DNA からマイクロサテライト領域を含む断片を単離後、マーカー化し、(2) 日本ザーネン x シバヤギ間の戻し交配分離個体および韓国在来ヤギ家系を用いた遺伝子マーカーの染色体上へのマッピング、さらに作製したマーカーを用いたモデルケースとして (3) カシミア毛生産と連鎖する遺伝子マーカーの同定を試みるものである。特に、遺伝子マーカーとしては 1,000 種以上のマイクロサテライトマーカーの単離を目標とし、それらのマーカーを各染色体上に平均 20 cM 間隔に設置することを目指す。さらに、これらを利用し、カシミア毛生産をターゲットとした Quantitative trait loci (QTL) 解析を行い、カシミア毛生産と連鎖する遺伝子座を同定

し、候補遺伝子の絞り込みを行うことも目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヤギゲノム DNA からマイクロサテライト領域の単離とマーカーの作製

ヤギゲノム DNA からマイクロサテライト領域の単離は Glenn & Schable (*Methods Enzymol.* 2005) の方法に従って行い、韓国在来種から抽出した DNA を *AluI*, *DraI*, *EcoRV*, *HaeIII*, *SspI*, *RsaI* および *ScaI* で切断後、SuperSNX リンカーをライゲーションし、(TG)₁₂ および (AG)₁₂ ビオチン化プローブとハイブリダイズした。プローブとハイブリダイズした DNA はマグネットビーズに吸着することにより回収後、リンカーをプライマーとして PCR で増幅した。増幅した DNA 断片はサブクローニング後、塩基配列を決定し、マイクロサテライト領域の両端にプライマーを設定することによりマーカー化した。作製したマーカーは家畜山羊 6 品種 (日本ザーネン、シバヤギ、韓国在来種、モンゴル在来種、インドネシア在来種およびバングラデッシュ在来種) 2 種の野生種 (ベゾアおよびマーコール)、ウシ (ホルスタイン) およびヒツジ (サフォーク) から抽出した DNA を鋳型として PCR を行い、4% アガロースゲル電気泳動により PCR 増幅および多型の有無を調査した。また、得られたマーカーのうち、111 種のマーカーを選抜し、蛍光修飾後、DNA シークエンサーを用いてフラグメント解析を行った。

(2) 新規マイクロサテライトマーカーの染色体マッピング

ヤギ品種間交雑家系の作製

ヤギ品種間交雑家系は日本ザーネンの雌 6 頭にシバヤギの雄 1 頭を交配して得られた 10 頭の F₁ 個体に日本ザーネン 11 頭を戻し交配することにより 35 頭の戻し交配分離個体 (N₂) を作製した。作製した全個体はカシミア毛の生産量を外部観察および採取した毛を実体顕微鏡下で観察することによりカシミア毛生産量を測定した。また、表現型判定後の各個体の血液から DNA を抽出した。

マッピング

本研究において作製したマーカーの染色体上の位置を同定するため、各マーカーのユニーク配列を用いて *in Silico* 解析を行い、染色体の位置を推定した。また、Vaiman *et al.* (*Genetics* 1995) が作成したヤギ連鎖地図からザーネンおよびシバヤギ間の多型マーカーである 81 種を選抜し、ヤギ品種間交雑家系の親系統、F₁ および N₂ 個体から抽出した DNA の遺伝子型を判定することによりこれらのマーカーをランドマークとした。さらに本研究で作製したマーカーを用いて同様の遺伝子型判定を行い、ランドマークとしたマ-

カーの遺伝子型との連鎖解析を行った。

(3) カシミア毛生産関連遺伝子の QTL 解析

ヤギ品種間交雑家系に属する個体の表現型と遺伝子型との QTL 解析は QTL express を用いて行なった。また、同時に Linkage プログラムを用いた単点解析も行った。

4. 研究成果

(1) ヤギゲノム DNA からのマイクロサテライト領域の単離とマーカーの作製

ヤギマイクロサテライトマーカーの作製

我々は本研究において研究の当初目標を下回ったが、ヤギゲノムから 540 種のマイクロサテライト DNA 断片を単離することができた。また、単離した DNA 断片のユニーク配列を Blast 検索によりホモロジー解析を行った結果、311 種の配列はヤギ、ウシおよびヒツジにおいて報告されているマイクロサテライトマーカーとは異なる新規のものであった。そこでこれらの DNA 断片にプライマーを設計し、PCR 増幅を試みた結果、260 種のマーカーにおいて PCR 増幅が確認された。また、作製したマーカーに含まれる反復配列は 2 種が 2 種の反復配列が分断されているもの、15 種が異なる反復配列が混合しているもの、他の 243 種は 2~7 塩基の単純反復配列であり、その 72% は CA/TG 反復配列であった。これら作成したマーカーのすべての情報は現在投稿中の我々の論文の雑誌 Web ページからダウンロードできる可能性が高く、世界のヤギ研究者において有用な情報源となると我々は考えている。

多型解析

作製したマーカーの遺伝学的解析への有用性を調査するため、家畜山羊 6 品種、野生種 2 種、ウシおよびヒツジの DNA を鋳型として PCR を行い、4% アガロース電気泳動により PCR 増幅および多型の有無を判定した。その結果、すべてのマーカーにおいて家畜山羊および野生種において PCR 増幅が確認されたが、ウシおよびヒツジにおいてそれぞれ 63 および 14 種のマーカーで PCR 増幅が確認できなかった。また、アガロースゲル電気泳動においては 144 種において家畜山羊および野生種において多型が検出された。

次に、作製したマーカーからアガロースゲル電気泳動により単一バンドを示した 111 種のマーカーを選抜し、蛍光修飾後、フラグメント解析によってフラグメントサイズを決定し、各マーカーの対立遺伝子の数を算出した。その結果、すべてのマーカーで合計 638 の対立遺伝子、マーカー平均で 5.75 の対立遺伝子が検出された。また、本研究においては同一集団ないから選抜した親子関係のない 2 頭の韓国在来種、異なる集団から選抜した 2 頭の日本ザーネンを多型解析に用いた。

2 頭の韓国在来種間においては 60 種のマーカーが多型を示し、183 種の対立遺伝子が検出され、一方、2 頭の日本ザーネン間においては 96 種のマーカーが多型を示し、183 種の対立遺伝子が検出された。この結果から作製したマーカーは連鎖解析のみならず、集団構造の解析にも有用になるものと考えられた。加えて、図 1 に示すように作製したマーカーにおいて得られた対立遺伝子の数は集団、品種、種とその遺伝的距離と関連した増減が認められ、この結果から作製したマーカーは系統遺伝学的解析にも有用であるものと考えられた。

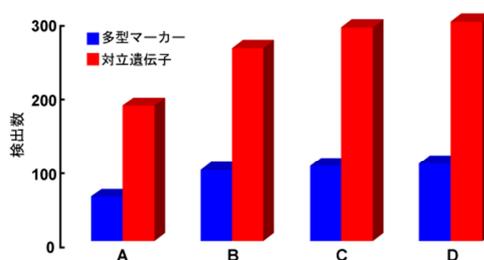


図 1. ヤギ集団内 (A)、集団間 (B)、品種間 (C) および家畜-野生種間 (D) において検出された多型マーカー数と検出アレル数の比較

(2) 新規マイクロサテライトマーカーの染色体マッピング

作製したマーカーの配列の Blast 解析を行い、さらにヤギ-ヒツジ-ウシ-マウス-ヒトの比較染色体地図およびシンテニーを利用して染色体の位置を推定した。その結果、作製したマーカーの 169 種の染色体上の位置を推定することができた。また、シバヤギおよび日本ザーネン間の品種間交雑家系を用いて連鎖解析によりこれらのマーカーの位置を推定した結果、約半数のマーカーで *in Silico* 解析による結果が証明でき、この連鎖地図はヤギの経済形質のマッピングを含むヤギゲノム解析に有用なものとなると判断でき、現在より詳細な地図作成を進めている。

(3) カシミア毛生産関連遺伝子の QTL 解析

ヤギカシミア毛生産量には品種間差異が存在し、本研究で用いたシバヤギはカシミア高生産品種、日本ザーネンはカシミア低生産品種であることが明らかとなっている (Seki *et al. Anim. Sci. J.* in press)。本研究において作製した F_1 および N_2 個体の表現型を観察した結果、11 頭の F_1 個体はカシミア高生産であり、35 頭の N_2 個体は、20 頭がカシミア高生産、15 頭がカシミア低生産であった。この結果からヤギのカシミア毛生産は優性遺伝し、少なくとも 1 つの修飾効果をもつ遺伝子が存在することが示唆された。

そこで本研究に用いた親系統のシバヤギおよび日本ザーネン間を明確に判定可能な 110 種のマーカーでタイピングした遺伝子型

と表現型データを用いて QTL express を用いて、QTL 解析を行った。その結果、ヤギ第 5、16 および 27 番染色体にヤギのカシミア毛生産に關与する Suggestive linkage を超える QTL を検出され、特に第 5 番染色体に検出した QTL は統計学的に有意な値を大きく超え LOD スコア 6.43 の値を示した。また、この結果は図 2 に示した単点解析の結果とも一致していた。従って、今後はこの領域に存在するマーカーを指標とした育種が展開できる可能性も考えられた。

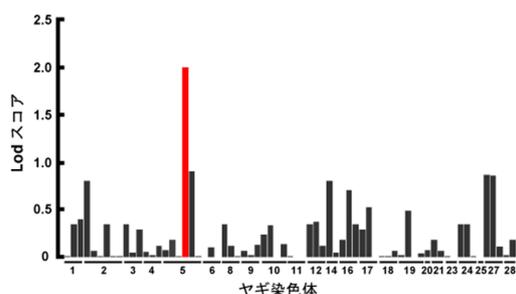


図 2. カシミア毛生産量と連鎖する遺伝子マーカーのスクランニング

また、比較染色体地図を利用し、この領域に存在する毛形成関連遺伝子の探索を行なった結果、被毛形成に重要な役割をもつタイプ II ケラチンクラスターおよびヘヤーサイクルのコントロール機能が報告されている insulin-like growth factor-1 (*IGF1*) が存在していた。そこでザーネンおよびシバヤギ間でこれらの遺伝子の翻訳領域の塩基配列を決定・比較した結果、*IGF1* においては両者間での多型は検出されなかったが、タイプ II ケラチンクラスターに含まれる *krt71* において 2 箇所、*krt72* において 2 箇所、*krt75* において 8 箇所、*krt81* において 1 箇所、*krt82* において 2 箇所および *krt85* において 1 箇所のミスセンス変異が検出され、現時点においてこれらの多型がカシミア毛生産に關与する可能性が示唆され、今後、他のヤギ品種との多型比較および遺伝子発現解析によりこれらの多型とカシミア生産との関連を調査していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Takahashi, H., Nyamsamba, D., Mandakh, B., Zagdsuren, Y., Amano, T., Nomura, K., Yokohama, M., Ito, S., Minezawa, M.: Genetic structure of Mongolian goat populations using mtDNA satellite loci. *Asian Australas. J. Anim. Sci.*, 査読有, 21, 947-953, 2008.
Yokohama, M., Kanno M., Nomura, K.,

Amano, T., Altangerel, G., Dambiinyam, N. and Yo, Z.: Weight loss during winter and cashmere yields in three breeds of Mongolian native goat. *J. Agric. Sci.*, 査読有, 54, 163-167, 2009.

Seki, Y., Yokohama, M., Wada, K., Fujita, M., Kotani, M., Nagura, Y., Kanno, M., Nomura, K., Amano, T. and Kikkawa, Y.: Expression analysis of the type I keratin protein keratin 33A in goat coat hair. *Anim. Sci. J.*, 査読有, in press

[学会発表](計 6 件)

関 優太: 遺伝解析に基づくヤギカシミア毛形成に關与する遺伝子群の探索. BMB2008, 2008 年 12 月 12 日, 神戸ポートアイランド(神戸)

関 優太: 毛生産に基づくヤギ育種のためのカシミア毛伸長能の品種間比較. 日本畜産学会第 110 回大会 2009 年 3 月 27 日, 日本大学(藤沢)

菅野雅子: ヤギ品種によるカシミアの長さ・太さの差異. 日本畜産学会第 110 回大会, 2009 年 3 月 28 日, 日本大学(藤沢)

関 優太: 遺伝解析に基づくヤギカシミア毛生産に關与する QTL の検出. 日本遺伝学会第 81 回大会, 2009 年 9 月 17 日, 信州大学(松本)

Seki, Y.: Genetic mapping of QTLs for cashmere hair production in Shiba goat. 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 10 日, パシフィコ横浜(横浜)

関 優太: ゲノム解析に基づくヤギ品種間交配家系における QTL の同定. 日本遺伝学会第 82 回大会, 2010 年 9 月 22 日, 北海道大学(札幌)

[その他]

ホームページ等

<http://nodai.cc-town.net/laboratory/single.php?id=115>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横濱 道成 (YOKOHAMA Michinari)
東京農業大学・生物産業学部・教授
研究者番号: 40220561

(2) 研究分担者

無

(3) 連携研究者

吉川 欣亮 (KIKKAWA Yoshiaki)
東京農業大学・生物産業学部・准教授
研究者番号: 2020787

(4) 研究協力者

関 優太 (SEKI Yuta)
東京農業大学大学院・生物産業学研究科・博士後期課程