

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580347

研究課題名（和文）ウシ PNLIP DNA 多型の検出および和牛脂肪交雑との相関解析

研究課題名（英文）Detection of bovine PNLIP DNA polymorphism and association study of the polymorphism with marbling trait

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

研究成果の概要（和文）：ダイレクトシーケンスによる PNLIP 遺伝子多型の検出および PCR-RFLP による多型タイピング法の確立を行うことで、rs41648172、rs41648176 および rs41648178 SNP が和牛集団の高脂肪交雑能力牛群と低能力牛群間でアリル頻度が異なることを示した。さらに、相関解析、品種間アリル頻度比較解析および既知脂肪交雑マーカーを同時に取り込んだ相関解析により、rs41648172 SNP が脂肪交雑向上を目指した DNA 育種技術に有用なマーカーとなることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We showed that rs41648172, rs41648176 and rs41648178 SNPs have differences in allele frequency distribution between high-marbled and low-marbled cattle groups of Japanese Black breed, by performing detection of PNLIP polymorphism with direct-sequencing and establishment of genotyping method with PCR-RFLP. We further clarified that rs41648172 SNP is useful marker for marker-assisted selection to increase marbling level, using association study for individual SNP effect, analysis of comparison of allele frequency distribution between various cattle breeds, and association study for combined marker effect.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

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：家畜ゲノム

1. 研究開始当初の背景

（1）筋肉組織内に脂肪組織が細かに分布した脂肪交雑は、牛肉の品質を決定する重要な形質であり、和牛生産において、脂肪交雑形成の遺伝的能力を、高い水準で安定的に維持していく、または向上していくことが大きな課題となっている。このような課題の解決には、脂肪交雑の原因変異やその近傍の多型をマーカーとして取り入れた和牛 DNA 育種改良

システムの構築が、多大な貢献をすると考えられている。

（2）これまでの研究で、申請者らは、脂肪交雑形成能力が極めて高い黒毛和種去勢雄牛群と、その能力が極めて低いホルスタイン種去勢雄牛群を用いた、発現プロファイリングに基づくゲノム解析を行うことで、EDG1、MBL1 および TTN という 3 つの遺伝子の DNA 多型が、複数の黒毛和種分集団において脂肪交

雑と相関を示し、和牛 DNA 育種技術に有用なマーカーとなることを明らかにしてきた。しかしながら、これらのマーカーは、和牛脂肪交雑形成の遺伝的能力の～15%を説明するにすぎないことから、さらに多くのマーカーの開発が必要であると考えられた。

(3) 一方、Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットを用いた QTL マッピングによるゲノム解析を行うことで、PNLIP とそのプロモーター領域の VNTR が、筋肉内脂肪量 QTL の原因遺伝子および原因変異の 1 つとして、有力であることを明らかにした。

(4) PNLIP 遺伝子はウシ第 26 番染色体上に存在し、その位置は黒毛和種での脂肪交雑 QTL の存在領域と一致していた。こうして、PNLIP 遺伝子を和牛脂肪交雑の原因遺伝子の positional functional candidate として取り上げることができ、PNLIP における DNA 多型は、和牛 DNA 育種技術に有用なマーカーとなりうると考えられた。

2. 研究の目的

PNLIP 遺伝子を和牛脂肪交雑原因遺伝子の positional functional candidate として取り上げることで、以下の 4 つの課題を遂行する。

(1) 脂肪交雑形成能力が極めて高い黒毛和種種雄牛群とその能力が極めて低い種雄牛群の間における DNA 多型を検出する。

(2) 検出された DNA 多型のタイピング法を確立する。

(3) 黒毛和種の種雄牛および後代肥育牛集団において、脂肪交雑と相関を示す DNA 多型を選定する。

(4) PNLIP DNA 多型と、すでにマーカーとして確立されている EDG1、MBL1、TTN SNPs を同時に考慮することで、和牛 DNA 育種技術に有用な PNLIP マーカーを同定する。

3. 研究の方法

(1) DNA 多型の検出

NCBI Gene データベースの検索により得られた PNLIP ゲノム配列に基づき、プロモーター領域の～4kb、エクソン領域 (エクソン 1～13) の～1.5kb をカバーする PCR プライマーを設計する。プライマーは、PCR 増幅産物が～500bp の長さになるように設計する。血縁関係のない 100 頭の黒毛和種種雄牛のパネルの中から、脂肪交雑形成能力が極めて高い、つまり BMS ナンバーに関する育種価が極めて高い牛群 25 頭と、その能力が極めて低い、つまり当該育種価が極めて低い牛群 25 頭を選抜し、それらのゲノム DNA を PCR 増幅の鋳型に用いる。PCR ダイレクトシーケンスを行い、DNA 多型を探索する。これらの多型の中から、2 つの牛群間でアリル頻度に差がみられるものを検出する。

(2) 検出された DNA 多型のタイピング法の確立

上記で検出された DNA 多型のタイピング法を確立する。SNP については PCR-SSP 法、indel 多型については PCR-SSLP 法を用いたタイピング法を採用し、上記で用いたゲノム DNA をリファレンスサンプルとして、プライマーおよび PCR 条件の設定を行う。

(3) 脂肪交雑と相関を示す DNA 多型の選出
黒毛和種の種雄牛集団および後代肥育牛集団において、以下のように、検出された DNA 多型のタイピングを行い、脂肪交雑との相関解析を行う。

第 1 に、血縁関係のない種雄牛のパネル、100 頭 (黒毛和種) のゲノム DNA を鋳型に用いることで、多型タイピングを行う。さらに、相関解析により、脂肪交雑形成能力 (BMS ナンバーに関する育種価) に対して効果をもつ DNA 多型を明らかにする。相関解析では、多型および父牛をそれぞれ母数効果および変量効果とした統計モデルを採用し、SAS MIXED プロシジャにより解析を行う。

第 2 に、多型がヘテロ型である種雄牛を父とする、父方半きょうだい後代肥育牛の集団 (母はランダムサンプルである) について、同様の解析を行う。さらに、第 3 に、多型がホモ型である種雄牛を父とする、父方半きょうだい後代肥育牛の集団 (母はランダムサンプルである) について、同様の解析を行う。但し、後代肥育牛集団での相関解析では、多型および父牛を母数効果とし、多型と父牛との相互作用を取り上げたモデルを採用する。SAS GLM プロシジャにより解析を行う。

第 1～3 の解析のすべてで有意な効果ももち、第 2、3 の解析で多型と父牛との相互作用が有意でない DNA 多型を明らかにする。

(4) DNA 育種技術に有用なマーカーの同定
上記で明らかにされた DNA 多型について、それらのそれぞれに、EDG1、MBL1 および TTN における 3 つのマーカーを同時に取り込んだ相関解析を行う。3 つのマーカーには、EDG1 の 5' UTR 上の SNP、MBL1 の 3' UTR 上の SNP、および TTN のプロモーター領域上の SNP を用いる。上記の種雄牛集団および後代肥育牛集団 (3 つのマーカーはすでにタイピングされている) を用いて、PNLIP DNA 多型、マーカー、DNA 多型とマーカーの間の相互作用をすべて母数効果として取り入れた統計モデルで相関解析を行い、有意でない効果を除いていくということを繰り返し、最適なモデルを得ていくこととする。このような最適モデルでの、PNLIP における DNA 多型の効果の大きさを比較することで、よりよく脂肪交雑形成能力を説明する、効果の大きいものを和牛 DNA 育種技術に有用なマーカーとして同定する。

4. 研究成果

(1) DNA 多型の検出および(2) 検出された DNA 多型のタイピング法の確立

PNLIP プロモーター領域の~4kb について、PCR 増幅を行い、PCR ダイレクトシーケンスしたところ、転写開始より上流の 1603bp の位置に C あるいは T、1915bp の位置に A あるいは G、3251bp の位置に A あるいは T という SNP が検出された。これらの多型について、PCR-RFLP 法を用いたタイピング法を確立した。脂肪交雑形成能力が極めて高い、つまり BMS ナンバーに関する育種価が極めて高い牛群 17 頭と、その能力が極めて低い、つまり当該育種価が極めて低い牛群 17 頭において、これらの 3 つの SNP をタイピングした。その結果、1915bp の位置にある SNP において、2 群間でアリル頻度分布に有意に近いレベル (10%水準) で差があるという結果が得られ、G アリルが高能力牛群において低能力群に比べて高い頻度をもっていた。

さらに、SNP データベース検索により得られた 13 個の SNP (rs41648166、rs41648167、rs41648171、rs41648172、rs41648173、rs41648174、rs41648165、rs41648176、rs41648178、rs41648179、rs41648180、rs42104800、rs42104801) のゲノム部位について、PCR 増幅を行い、PCR ダイレクトシーケンスしたところ、イントロン 6 に位置する rs41648171、rs41648172、rs41648173 および rs41648174、エクソン 7 に位置する rs41648176、イントロン 7 に位置する rs41648178 およびイントロン 12 に位置する rs42104801 において多型が検出された。これらの SNP について、PCR-RFLP 法を用いたタイピング法を確立し、高能力牛群 17 頭と低能力牛群 17 頭の SNP タイピングを行った。その結果、すべての SNP において、2 群間でアリル頻度分布に有意な差があるという結果が得られ、rs41648171 C アリル、rs41648172 T アリル、rs41648173 T アリル、rs41648174 C アリル、rs41648176 C アリル、rs41648178 T アリルおよび rs42104801 T アリルが高能力牛群において低能力群に比べて高い頻度をもっていた。

2 つの牛群間でアリル頻度に差がみられた SNP のうち、有意性が高い rs41648172、rs41648176 および rs41648178 という 3 つの SNP について、脂肪交雑との相関解析を行うこととした。

(3) 脂肪交雑と相関を示す DNA 多型の選出血縁関係のない黒毛和種種雄牛集団 (100 頭) のゲノム DNA を鋳型に用いることで、rs41648172、rs41648176 および rs41648178 の SNP タイピングを行った。さらに、それらの種雄牛の脂肪交雑の育種価データを入手し、脂肪交雑育種価に対して SNP 遺伝子型の効果がみられるかについて、SNP 遺伝子型お

よび父牛をそれぞれ母数効果および変量効果とした相関解析を行った。その結果、rs41648176 および rs41648178 については、統計的に有意な遺伝子型効果は検出されなかった。一方、rs41648172 については、有意に近いレベル ($p = 0.054$) で遺伝子型効果があるという結果が得られた。rs41648172 において TT ホモ接合である個体が CC ホモ接合であるものに比べて高い脂肪交雑育種価を有しており、ヘテロ接合である個体の育種価は、2 つのホモ接合体の中間の値を示した。また、いずれの SNP についても、皮下脂肪厚の育種価に対しては、有意な効果は検出されなかった。

次に、rs41648172 において CC ホモ型である種雄牛を父とする、父方半きょうだい後代肥育牛の集団 367 頭 (母はランダムサンプルである) について、SNP 遺伝子型を母数効果とした相関解析を行った。脂肪交雑育種価に対して、統計的に有意な遺伝子型効果が検出された ($p = 0.003$)。一方、皮下脂肪厚育種価に対しては、有意な効果は検出されなかった ($p = 0.185$)。上記の種雄牛集団を用いた相関解析と同様に、rs41648172 において TT ホモ接合である個体が CC ホモ接合であるものに比べて高い脂肪交雑育種価を有しており、ヘテロ接合である個体の育種価は、2 つのホモ接合体の中間の値を示した。

さらに、黒毛和種の種雄牛および肥育牛集団とともに、褐毛和種の種雄牛および肥育牛集団、日本短角種の種雄牛および肥育牛集団、乳牛であるホルスタイン種集団およびブラウンスイス種集団における、rs41648172 SNP の有益 T アリルの頻度分布を調査したところ、脂肪交雑に対しての強い選抜が歴史的に行われてきた黒毛和種に比べて、そのような選抜が行われてこなかったそれ以外の品種では低い有益アリル頻度を示すという結果が得られた。

これらの結果より、rs41648172 SNP は脂肪交雑向上を目指した DNA 育種技術に有用なマーカーとなりうると考えられた。

(4) DNA 育種技術に有用なマーカーの同定
上記で明らかにされた rs41648172 SNP に、EDG1、MBL1 および TTN における 3 つの脂肪交雑マーカーを同時に取り込み、rs41648172 SNP、マーカー、rs41648172 SNP とマーカーの間の相互作用をすべて母数効果とした相関解析を行ったところ、EDG1 と MBL1 のマーカー間のエピスタシス効果、EDG1 および TTN のマーカーの主効果に加えて、有意な rs41648172 SNP の主効果が検出された。こうして、rs41648172 SNP は EDG1、MBL1 および TTN における 3 つの脂肪交雑マーカーとは独立した機構により脂肪交雑に関与しており、脂肪交雑向上を目指した DNA 育種技術に有用なマーカーであることが示された。

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18件)

- ① Association of single nucleotide polymorphism in pancreatic lipase gene with growth-related traits in Japanese Black beef cattle. H. Tanomura, Y. Muramatsu, T. Yamamoto, T. Ohta, H. Kose, T. Yamada. J. Anim. Vet. Adv., 査読有 in press
- ② Distribution of allele frequency at PNLIP rs41648172 between Japanese Black and four other cattle breeds with differing historical selection for marbling. H. Tanomura, Y. Muramatsu, T. Yamamoto, T. Ohta, H. Kose, T. Yamada. J. Anim. Vet. Adv., 査読有 in press
- ③ Distribution of allele frequencies at TTN g.231054C>T, RPL27A g.3109537C>T and AKIRIN2 c.*188G>A between Japanese Black and four other cattle breeds with differing historical selection for marbling. N. Watanabe, Y. Satoh, T. Fujita, T. Ohta, H. Kose, Y. Muramatsu, T. Yamamoto, T. Yamada. BMC Res. Notes, 査読有, 4:10 (2011)
- ④ Quantitative trait gene responsible for intramuscular fat content in the rat. H. Tanomura, T. Yamamoto, Y. Muramatsu, T. Ohta, T. Yamada. J. Anim. Vet. Adv., 査読有, 10:841-846 (2011)
- ⑤ Difference in PNLIP allele frequency distribution between high-marbled and low-marbled cattle. H. Tanomura, Y. Muramatsu, T. Yamamoto, T. Ohta, H. Kose, T. Yamada. J. Anim. Vet. Adv., 査読有, 10:1714-1718 (2011)
- ⑥ The pancreatic lipase gene is associated with marbling in Japanese Black beef cattle. H. Tanomura, T. Yamamoto, Y. Muramatsu, T. Ohta, H. Kose, T. Yamada. J. Anim. Vet. Adv., 査読有, 10:1719-1723 (2011)
- ⑦ Possible association of single nucleotide polymorphism in titin gene with growth-related trait in Japanese Black beef cattle. T. Yamada, S. Sasaki, S. Sukegawa, Y. Takahagi, M. Morita, H. Murakami, F. Morimatsu, T. Fujita. J. Anim. Vet. Adv., 査読有, 10:2603-2606 (2011)
- ⑧ Replicated association of the single nucleotide polymorphism in EDG1 with marbling in three general populations of Japanese Black beef cattle. S. Sukegawa, T. Miyake, Y. Takahagi, H. Murakami, F. Morimatsu, T. Yamada, Y. Sasaki. BMC Res. Notes, 査読有, 3:66 (2010)
- ⑨ The T allele at the g.1471620G>T in the EDG1 gene associated with high marbling in Japanese Black cattle is at a low frequency in breeds not selected for marbling. N. Watanabe, T. Yamada, S. Yoshioka, M. Itoh, Y. Satoh, M. Furuta, S. Komatsu, Y. Sumio, T. Fujita, Y. Sasaki. Anim. Sci. J., 査読有, 81:142-144 (2010)
- ⑩ Association study on marbling trait in Japanese Black beef cattle, based on extrapolation from rat study. Y. Muramatsu, T. Yamada. Res. Adv. Anim. Sci., 査読無, 1:1-8 (2010)
- ⑪ 佐賀県黒毛和種牛における Akirin2 遺伝子の1塩基置換と枝肉形質との関連性. 林田瑠美子, 前田友香, 片渕直人, 大坪利豪, 山田宜永, 佐々木義之, 和田康彦. 日暖畜報, 査読有, 53:51-56 (2010)
- ⑫ Association of a single nucleotide polymorphism in ribosomal protein L27a gene with marbling in Japanese Black beef cattle. T. Yamada, S. Sasaki, S. Sukegawa, T. Miyake, T. Fujita, H. Kose, M. Morita, Y. Takahagi, H. Murakami, F. Morimatsu, Y. Sasaki. Anim. Sci. J., 査読有, 80:631-635 (2009)
- ⑬ Association of a single nucleotide polymorphism in akirin2 gene with marbling in Japanese Black beef cattle. S. Sasaki, T. Yamada, S. Sukegawa, T. Miyake, T. Fujita, M. Morita, T. Ohta, Y. Takahagi, H. Murakami, F. Morimatsu, Y. Sasaki. BMC Res. Notes, 査読有, 2:131 (2009)
- ⑭ Association of a single nucleotide polymorphism in titin gene with marbling in Japanese Black beef cattle. T. Yamada, S. Sasaki, S. Sukegawa, S. Yoshioka, Y. Takahagi, M. Morita, H. Murakami, F. Morimatsu, T. Fujita, T. Miyake, Y. Sasaki. BMC Res. Notes, 査読有, 2:78 (2009)
- ⑮ Association of single nucleotide polymorphisms in the endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1 gene with marbling in Japanese Black beef cattle. T. Yamada, M. Itoh, S. Nishimura, Y. Taniguchi, T. Miyake, S. Sasaki, S. Yoshioka, T. Fujita, K. Shiga, M. Morita, Y. Sasaki. Anim. Genet., 査読有, 40:209-216 (2009)
- ⑯ Novel SNP in 5' flanking region of EDG1 associated with marbling in Japanese Black beef cattle. T. Yamada, S. Sasaki, S. Sukegawa, T. Miyake, T. Fujita, H. Kose, M. Morita, Y. Takahagi, H. Murakami, F. Morimatsu, Y. Sasaki. Anim. Sci. J., 査読有, 80:486-489 (2009)
- ⑰ The G allele at the c.-312A>G in the EDG1 gene associated with high marbling in Japanese Black cattle is at a low frequency in breeds not selected for marbling. N. Watanabe, S. Yoshioka, M. Itoh, Y. Satoh, M. Furuta, S. Komatsu, Y. Sumio, T. Fujita, T. Yamada, Y. Sasaki. Anim. Genet., 査読有, 40:579 (2009)
- ⑱ 佐賀県黒毛和種牛における EDG1 遺伝子の1塩基置換と枝肉形質との関連性. 和田康彦, 林田瑠美子, 磯兼妙子, 片渕直人, 大坪利豪, 山田宜永, 佐々木義之. 日暖畜報, 査読有, 52:37-41 (2009)

〔学会発表〕(計2件)

- ① 福家成美, 日水唯衣, 山田宜永, 波田野雅人, 小林英和, 加藤博幸. 新潟県黒毛和種集団における脂肪交雑関連 EDG1 多型のアリル頻度分布. 第50回北信越畜産学会新潟県分会. 平成24年3月16日 新潟市
- ② 田之村秀樹, 山本卓司, 村松陽治, 山田宜永. OLETF ラットを用いた筋肉内脂肪蓄積に関わる遺伝子の探索: ポジショナルキャンディデートの探索. 第60回北信越畜産学会大会. 平成23年11月11日 長野市

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: