

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380149

研究課題名(和文)野生マウスの遺伝子プールから発掘したヘテロシスQTLの候補遺伝子解析

研究課題名(英文)Analysis of candidate genes for heterotic QTL discovered from a gene pool of wild mice

研究代表者

石川 明(Ishikawa, Akira)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：20211724

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円、(間接経費) 4,530,000円

研究成果の概要(和文)：ヘテロシスは100年以上前に発見され動植物の育種改良に必要な不可欠な遺伝現象であるが、その責任遺伝子は未だにクローニングされていない。コンジェニックマウスを用いた以前のQTL解析により、野生マウスの遺伝子プールから、体重に関与しヘテロシス効果をもつ新規の量的形質遺伝子座(QTL)を限られた染色体領域内に位置づけた。本研究では、コンジェニックとサブコンジェニックマウス系統を用いて、エクソーム解析、表現型解析および遺伝子発現解析を行った。その結果、今回の研究ではヘテロシス効果は明確ではなかったが、体重QTLを約6 Mbのゲノム領域内に位置づけ、このQTLに関する4つの候補遺伝子を発見できた。

研究成果の概要(英文)：Heterosis was found more than 100 years ago. Since then, it has become a genetic phenomenon essential for animal and plant breeding. However, no causative gene for heterosis has been cloned. I previously discovered a new QTL (quantitative trait locus) for heterosis of body weight from a gene pool of wild mice and I fine-mapped it to a limited chromosomal region by QTL analysis using a congenic mouse strain. In this study, I performed exome analysis, phenotypic analysis and gene-expression analysis using congenic and subcongenic mouse strains developed in previous and present studies. I fine-mapped the body weight QTL to an about 6-Mb genomic region, although its heterotic effect was unfortunately not confirmed in this study. I also revealed that four genes are putative candidate genes for the body weight QTL.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産・獣医学・応用動物科学

キーワード：育種学 遺伝学 マウス QTL ヘテロシス

1. 研究開始当初の背景

- (1) ヘテロシス（雑種強勢）は、100年以上前に発見された遺伝現象である。それ以来、動植物の育種改良において必要不可欠なものとなっている。しかし、ヘテロシスに関わる責任遺伝子は未だにクローニングされていない。
- (2) ヘテロシスの成因には、主として、ゲノムワイド優性説と超優性説が提唱されている。しかし、未だにどちらの説が正しいのか決着がついていない。
- (3) 我々は、今までに、野生マウスの遺伝資源から生後体重とその関連形質に關与する24個の量的形質遺伝子座(QTLs: Quantitative Trait Loci)を13本の染色体上に位置づけた。その中で最も大きな表現型効果をもつ第2染色体のQTL領域約44MbをC57BL/6J近交系に導入したコンジェニック系統を樹立した。
- (4) このコンジェニック系統とC57BL/6J間の交雑F2集団を作出し、QTL解析を行なった結果、生後6と10週齢体重に関してヘテロシス効果を示す超優性QTLを限られた染色体領域に位置づけることに成功した。
- (5) 本研究成果は、ヘテロシスの分子メカニズムの解明に繋がるとともに、新しい有用家畜品種のヘテロシス育種の基盤確立に貢献する。

2. 研究の目的

野生マウスの遺伝子プールから発掘した体重に関わる超優性ヘテロシスQTLの候補遺伝子の同定を試みる。

3. 研究の方法

- (1) 次世代シーケンサーによるコンジェニック領域のシーケンス解析
コンジェニックマウスの腎臓からゲノムDNAを抽出した。Roche NimbleGenのシーケンスキャプチャー法により遺伝子のエクソン領域を濃縮した。次世代シーケンサーRoche GS FLXを用いてシーケンス解析を行った。
- (2) サブコンジェニック系統とC57BL/6J系統間F2交雑群の作製
今までに樹立した3種類に、本研究で樹立した1種類を加えた合計4種類のサブコンジェニック系統をレシピエント系統であるC57BL/6Jにそれぞれ交配し、F1世代を得た。得られたF1同士を交配し、それぞれ約150個体のF2世代を生産した。得られたF2個体の耳介からゲノムDNAを抽出し、PCR法とアガロースゲル電気泳動法によりマイクロサテライトマーカの遺伝子型を決定した。
- (3) 表現型の評価
得られたF2個体の体重を生後1、3、6と10週齢に計測した。10週齢で屠殺し、肝臓、白色脂肪組織重量等の各種臓器重

量と体長を計測した。肝臓、腎臓、白色脂肪組織重量等の主要臓器の一部を採取し、候補遺伝子発現解析のための試料としてフリーザーに保存した。

- (4) バイオインフォマティクスを利用した候補遺伝子の絞り込み
Omic Space ウェブサイト (<http://omicspace.riken.jp>)やその他のデータベースを利用し、サブコンジェニック領域内において体重やその他関連形質に関わる候補遺伝子を検索する。
- (5) 候補遺伝子の mRNA 発現量解析
コンピュータソフト Primer Express 等によりリアルタイム定量PCR用のプライマーとプローブを設計した。肝臓から総RNAを抽出し、RT-PCR法によりcDNAを合成した。リアルタイムPCR解析装置SepOne Plus (Applied Biosystems)を用いてSYBR Green (タカラバイオ) 標識法によりPCR増幅を行った。内部コントロール遺伝子を用いた検量線法により、mRNAの発現量を定量した。

4. 研究成果

- (1) 次世代シーケンサーによるコンジェニック領域のシーケンス解析
コンジェニック領域に存在する153個の遺伝子の全エクソン領域の塩基配列を決定することができた。その配列をデータベース上のC57BL/6Jレファレンス配列(mm9)と比較した結果、以下のように非常に多くの変異を発見することができた。アミノ酸置換を伴わない同義置換を示すSNPは840個、アミノ酸置換を伴う非同義置換SNPは334個、欠失は9個、挿入は10個、アミノ酸のコドンが終止コドンに変わるナンセンス変異は5個であった。
- (2) サブコンジェニック系統とC57BL/6J系統間F2交雑群の作製
4種類のサブコンジェニック系統とC57BL/6J間のF1を生産し、F1同士の交配によりF2世代を131-291個体生産した。
- (3) 表現型の評価
上記(3)のF2個体を用いた表現型解析の結果、6-10週齢体重に関わるQTLが最大で約6Mbの染色体領域内に存在することが明らかとなった。面白いことに、小型の野生マウス由来のQTL対立遺伝子が体重を増加させた。しかし、今回の解析ではヘテロシス効果は明確ではなかった。
- (4) バイオインフォマティクスを利用した候補遺伝子の絞り込み
体重をキーワードとして解析した結果、体重に関わるQTLの候補遺伝子として5つの遺伝子を探索することができた。
- (5) 候補遺伝子の mRNA 発現量解析
上記(4)で発見した5つの遺伝子につい

リアルタイム PCR 解析を行った。その遺伝子発現量を F2 世代の 3 つのディプロタイプ、すなわちサブコンジェニック領域において野生ホモ型、ヘテロ型および C57BL/6J ホモ型を示すマウス間で比較した結果、調査した 5 つの遺伝子の内、4 つの遺伝子について C57BL/6J ホモ型に対して野生ホモ型は 1.60-6.06 倍、ヘテロ型は 1.59-4.88 倍高いことが明らかとなった。

研究計画最終年度前年度の応募を行ったところ、採択されたため、平成 24 年度が本研究課題の最終年度となった。

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 5 件)

Mollah, Md. B. R., Ishikawa, A., Fine mapping of quantitative trait loci affecting organ weights by mouse intersubspecific subcongenic strain analysis, *Anim. Sci. J.*, 査読有、84 巻、2013、296-302

石川 明, 量的形質の遺伝的構造: マウス成長関連形質の QTL 解析から学んだこと、第 17 回動物遺伝育種シンポジウムプロシーディングス、査読無、2011、35-41

Mollah, Md. B. R., Ishikawa, A., Intersubspecific subcongenic mouse strain analysis reveals closely linked QTLs with opposite effects on body weight, *Mamm. Genome*, 査読有、22 巻、2011、282-289

Ishikawa, A., Tanahashi, T., Kodama, H., A proximal genomic region of mouse chromosome 10 contains quantitative trait loci affecting fatness, *Anim. Sci. J.*, 査読有、82 巻、2011、209-214

Mollah, Md. B. R., Ishikawa, A., A wild derived quantitative trait locus on mouse chromosome 2 prevents obesity, *BMC Genetics*, 査読有、11 巻、2010、84

[学会発表](計 10 件)

石川 明, マウス第 2 染色体上の体重・肥満 QTL が存在するコンジェニック領域のエクソーム解析、第 60 回日本実験動物学会総会、2013 年 5 月 15-17 日、つくば国際会議場(つくば市)

石川 明, マウス白色脂肪組織重量 QTL が存在するサブコンジェニック領域の RNA-seq 解析、日本畜産学会第 116 回大会、2013 年 03 月 27-30 日、安田女子大学(広島市)

Ishikawa, A., Okuno, S., Improved mapping of a body weight QTL on mouse chromosome 2 discovered from wild *Mus*

musculus castaneus, The Fourth International Conference of Quantitative Genetics, 2012 年 06 月 17-22 日、Edinburgh International Conference Centre (Edinburgh, UK)

石川 明, 量的形質の遺伝的構造: マウス成長関連形質の QTL 解析から学んだこと、第 17 回動物遺伝育種シンポジウム「動物ゲノム解析と新たな家畜育種戦略」(招待講演)、2011 年 11 月 20 日、広島大学(東広島市)

石川 明, モハンマド バズル ラハマン モラ, 密接に連鎖したマウス体重 QTLs は正反対の遺伝子効果をもつ、日本動物遺伝育種学会第 12 回大会、2011 年 11 月 19 日、広島大学(東広島市)

石川 明, モハンマド バズル ラハマン モラ, マウス白色脂肪組織重量 QTL のファインマッピングと家畜相同染色体領域、日本畜産学会第 114 回大会、2011 年 8 月 27 日、帯広畜産大学(十和田市)

Ishikawa, A., Mollah, Md. B. R., Fine mapping and candidate gene analysis of an obesity quantitative trait locus on mouse chromosome 2, *Mouse Genetics 2011 Conference*, 2011 年 6 月 25 日、Omni Shoreham Hotel (Washington D.C., USA)

モハンマド バズル ラハマン モラ, 石川 明, 野生キャストネウスマウス由来の第 2 染色体上の QTL は肥満抵抗性を示す、第 58 回日本実験動物学会総会、2011 年 5 月 26 日、タワーホール船堀(東京都)

石川 明, コンジェニックマウス系統解析による雑種強勢 QTL のファインマッピング、日本動物遺伝育種学会第 11 回年次大会、2010 年 10 月 6-7 日、(独)家畜改良センター 本所講堂(福島県)

石川 明, マウスの体重を統御するヘテロシス QTL のファインマッピング、日本遺伝学会第 82 回大会、2010 年 9 月 20-22 日、北海道大学高等教育機能開発センター(札幌市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 明 (ISHIKAWA AKIRA)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号：20211724

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

塚田 光 (TSUKADA AKIRA)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・

助教

研究者番号：20343212