

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580406

研究課題名(和文) 品種内発現プロファイリングに基づくゲノム解析によるブタ増体関連マーカーの同定

研究課題名(英文) Identification of pig growth associated-markers using within-breed expression profiling

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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ダイレクトシーケンスによるランドレース種豚増体原因遺伝子の位置的・機能的候補の多型検出および多型タイピング法の確立を行った。さらに、ランドレース種集団を用いた相関解析を行うことで、ミトコンドリアD-Loopハプロタイプ4を規定するD-Loop領域/846 SNPが100kg到達時予測日齢の母系統効果に対して有意な効果を示した。また、相関解析により、核ゲノム上のCOQ3遺伝子のCOQ3/-1623 indel多型が100kg到達時予測日齢の育種値に対して有意な効果を示した。これらの多型はランドレース種系統造成のためのDNA育種技術に有用な分子マーカーとなることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We first performed detection of polymorphisms in positional functional candidates for the genes responsible for growth traits in Landrace pig breed with direct-sequencing and establishment of genotyping method. Based on association study with Landrace pig population, the D-Loop/846 SNP determining specifically mitochondrial D-Loop haplotype 4 showed a significant effect on the maternal lineage effect for the age at 100 kg. Further, the COQ3/-1623 indel polymorphism in the nuclear COQ3 gene was associated with the predicted breeding value for the age at 100 kg. In conclusion, we suggested that the two polymorphisms are useful for effective marker-assisted selection to increase of growth rate in Landrace pig breed.

研究分野：農学

キーワード：家畜ゲノム

1. 研究開始当初の背景

(1) 増体形質に関してより高い遺伝的能力と遺伝的斉一性を有するランドレース種系統を、より早くかつより安価に造成していくことが養豚業界の大きな課題となっている。このような課題の解決には、ランドレース種内の増体形質の遺伝的ばらつきの原因となっている DNA 変異やその近傍の DNA 多型を、増体関連マーカーとして取り入れた 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) 増体形質と相関を示し、ランドレース種系統造成のための DNA 育種技術に有用であると予想される 8 個の増体関連マーカーが同定されている。しかし、これらのマーカーの増体形質に対する効果が極めて小さいことも報告されており、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) プタ増体形質に関連するマーカーの同定研究についても、発現プロファイリングに基づくゲノム解析法が有効であるという着想に至った。しかし、これらの発現プロファイリングは、高い増体能力をもつ品種とその能力が低い品種の間(品種間)で発現量に差をもつ遺伝子を検出するものであった。

(4) ランドレース種内(品種内)での発現プロファイリングを行い、高増体能力の個体群と低能力個体群の間で発現パターンが異なる遺伝子を検出した。さらに、このような遺伝子について、時空間的発現解析、in silico マッピング解析および機能注釈や増体 QTL の染色体位置などのゲノム情報を利用したバイオインフォマティクスの解析を行うことで、ランドレース種内での増体形質の遺伝的ばらつきの原因となる遺伝子の positional functional candidate (ND1、ND4、TTN、EEF1A2、TSG101) を選定した。これらの positional functional candidate における DNA 多型は、ランドレース種系統造成のための DNA 育種技術に有用なマーカーとなると考えられた。

2. 研究の目的

(1) ランドレース種集団の中で、増体能力が極めて高い個体群とそれが極めて低い個体群について、positional functional candidate のシーケンス解析を行い、2 群間でアレル頻度に差がみられる 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) ランドレース種集団について、検出された DNA 多型のタイピングを行い、相関解析により増体形質に対して効果をもつ DNA 多型を選出する。

(4) それぞれの positional functional candidate について、相関を示す DNA 多型のタイピングデータからハプロタイプを推定し、増体形質に対して効果をもつ組み合わせ多型群を選出する。

5) 5 つの positional functional candidate から選出された DNA 多型あるいは DNA 多型群を同時に取り込んだ相関解析を行い、ランドレース種系統造成のための DNA 育種技術に有用なマーカーを同定する。

3. 研究の方法

(1) DNA 多型の検出

データベースの検索により得られた ND1 と ND4 を含むミトコンドリアゲノム配列、TTN ゲノム配列、EEF1A2 ゲノム配列および TSG101 ゲノム配列に基づき、各遺伝子のプロモーター領域 (ND1 と ND4: D-loop 領域の ~1kb、それ以外: それぞれ ~2kb)、転写領域 (ND1: ~1kb、ND4: ~1.4kb、TTN: 非翻訳領域の ~1.6kb、EEF1A2: ~1.5kb、TSG101: ~1kb) をカバーする PCR プライマーを設計する。ランドレース種集団の中から、増体能力が極めて高い個体群 25 頭と、その能力が極めて低い個体群 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。このようなプライマーと鋳型 DNA を用いて 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 つの個体群間でアレル頻度に差がみられるものを検出する。

(2) タイピング法の確立

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) DNA 多型の選出

ランドレース種集団のゲノム 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、増体能力(上記に示す増体形質に関する育種価あるいは細胞質遺伝効果の推定値)に対して有意な効果をもつ DNA 多型を明らかにする。ND1 と ND4 の DNA 多型の相関解析では細胞質遺伝効果の推定値を、TTN、EEF1A2、TSG101 の DNA 多型の相関解析では育種価を増体能力として取り扱う。次に、前者では多型のアレルタイプ、後者では多型の遺伝子型を母数効果として取り入れた統計モデルを採用し、SAS GLM プロシジャにより解析を行う。また、TTN、EEF1A2、TSG101 の DNA 多型の相関解析では、多型の遺伝子型の母数効果に加えて父畜さらには母畜を変量効果とした取り入れ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。

(4) DNA 多型群の選出

TTN、EEF1A2、TSG101 のそれぞれについては、上記でえられた、増体形質と有意な相関を示す DNA 多型のタイピングデータから、Haploview プログラムを利用して、ハプロタイプブロックを推定する。PHASE プログラムあるいは SimWalk2 プログラムを用いることで、ブロック内の DNA 多型群についてのそれぞれの個体でのハプロタイプを推定する。また、ND1 と ND4 を含むミトコンドリアゲノム

上で増体形質と有意な相関を示す DNA 多型のタイピングデータを統合することで、ミトコンドリアゲノム上の DNA 多型群についてのそれぞれの個体でのハプロタイプを決定する。DNA 多型のアレルタイプ・遺伝子型を、このようにしてえられた組み合わせ DNA 多型群についてのハプロタイプに置き換え、上記と同様の相関解析を行い、増体能力(上記に示す増体形質に関する育種価あるいは細胞質遺伝効果の推定値)に対して有意な効果をもつ組み合わせ DNA 多型群を明らかにする。

(5) 有用マーカーの同定

DNA 多型あるいは組み合わせ DNA 多型群について、ND1 と ND4 のそれぞれから 1 つずつ取り出した DNA 多型あるいは ND1 と ND4 を含むミトコンドリアゲノム上の DNA 多型群の 1 つに、他の 3 つの positional functional candidate のそれぞれから 1 つずつ取り出した DNA 多型(群)を加え、これらの DNA 多型(群)を同時に取り込んだ相関解析を行うことで、最適なモデルを得ていく。このような最適モデルでの、positional functional candidate における DNA 多型または組み合わせ DNA 多型群の効果の大きさを比較することで、よりよく増体能力を説明する、効果の大きいものをランドレース種系統造成のための 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

ランドレース種内での増体形質に対する位置的・機能的候補遺伝子として同定された核ゲノム上の TTN、EEF1A2、TSG101 およびミトコンドリアゲノム上の ND1、ND4 のダイレクトシーケンス解析を行った。また、ミトコンドリアゲノム上に存在し、転写を制御するコントロール領域である D-Loop 領域のダイレクトシーケンス解析も行った。ダイレクトシーケンス解析で得られた結果を用いて 5 つの位置的・機能的候補遺伝子および D-Loop 領域の多型の検出を行った。さらに、ミトコンドリアゲノム上の ND1、ND4 および D-Loop 領域では検出した多型の中からアレルの分布パターンが異なる多型を選出し、PCR-RFLP 法およびミスマッチ PCR-RFLP 法を用いてタイピング法の確立を行った。

ランドレース種集団から抽出したゲノム DNA を用い、確立したタイピング法によって遺伝子型、多型アレルおよびハプロタイプの判定を行った。さらに、ランドレース集団における増体形質(100kg 到達時予測日齢)についての育種価および母系統の効果に対する遺伝子型、多型アレルおよびハプロタイプの効果について相関解析を実施した。相関解析の結果、増体形質に対して TTN、EEF1A2 および TSG101 のそれぞれ 1 個、4 個および 1 個の多型の遺伝子型、ND1 および ND4 のそれぞれ 20 個および 16 個の多型のアレルの効果に有意な差は認められなかった。しかし、D-Loop 領域における 31 個の多型のうち、D-Loop 領

域/288、575、846 の 3 ヶ所の多型の P 値がそれぞれ 0.0387 を示し、5%水準で多型アレルの効果に有意な差が認められた。3 つの多型における当ランドレース種集団の母系 12 系統の 100kg 到達時予測日齢母系統効果の最小二乗平均値をみたところ、D-Loop 領域/288 では G アレルが、575 では A アレルが、846 では G アレルがそれぞれ A アレル、G アレルおよび A アレルに比べて ($-1.590 \times 10^{-7} \pm 1.560 \times 10^{-7}$)、 $7.500 \times 10^{-7} \pm 3.489 \times 10^{-7}$ と顕著に高い母系統効果を示していた。

ミトコンドリアハプロタイプの判定を行った結果、D-Loop 領域における 31 個の多型で構成されるミトコンドリアハプロタイプは 5 種類であることを明らかにした。これらのハプロタイプと 100kg 到達時予測日齢母系統の効果との相関解析の結果、P 値は 0.4254 と高い数値を示し、5%水準でハプロタイプの効果に有意な差は認められなかった。ハプロタイプごとの母系統数および 100kg 到達時予測日齢母系統の効果の最小二乗平均値と標準誤差の検討の結果、ハプロタイプ 4 が顕著に高い 100kg 到達時予測日齢母系統の効果を示していた。そこで、ハプロタイプ 4 とその他のハプロタイプにグループ分けし、100kg 到達時予測日齢母系統の効果との相関解析を行ったところ、P 値は 0.0387 を示し、5%水準でハプロタイプの効果に有意な差が認められた。そこで、ハプロタイプ 4 およびその他のハプロタイプからなるグループの 100kg 到達時予測日齢母系統の効果の最小二乗平均値をみたところ、ハプロタイプ 4 が際立って高い 100kg 到達時予測日齢母系統の効果を示していた。

D-Loop 領域/288、575 および 846 の 3 つの多型は判定された 5 つのハプロタイプの内のハプロタイプ 4 を特異的に規定していた。この結果より、相関解析で有意な差が認められたハプロタイプ 4 を規定する D-Loop 領域/288 SNP の G アレル、575 の A アレル、846 の G アレルが 100kg 到達時予測日齢に対してマイナスの効果をもっていることが分かり、これら 3 つの多型がランドレース種における有用な増体関連マーカーの候補となる可能性が示唆された。とりわけ、D-Loop 領域/846 の SNP はヒトの D-Loop 領域で転写の制御に重要な役割を果たしていると報告されている 150bp の領域と最も近傍の位置に存在していた。この結果から、D-Loop 領域/846 の SNP がランドレース種において、転写に関わり遺伝子の発現量を調節することで増体形質(100kg 到達時予測日齢)に影響を与えている可能性が高いと考えられ、増体関連マーカーの最有力候補となりうる可能性が示唆された。

5 つのミトコンドリアハプロタイプの遺伝的類縁関係の比較および検討を行うために D-Loop 領域のハプロタイプを用いて、ハプロタイプネットワーク解析および系統樹解析を行った。その結果、ハプロタイプ 4 および 5 から構成されるクラスターは、その他のハ

プロタイプ (1, 2 および 3) から構成されるクラスターと遺伝的に遠縁の関係であることが明らかになった。ハプロタイプ 4 および 5 から構成されるクラスターとその他のハプロタイプ (1, 2 および 3) から構成されるクラスターはそれぞれ、クラスター内でハプロタイプが分岐するより以前に分岐したと考えられた。ハプロタイプ 4 を規定する増体形質 (100kg 到達時予測日齢) に対してマイナスの効果を示す原因変異であると考えられる D-Loop 領域/846 SNP の G アリルはハプロタイプ 4 と 5 が分岐した時点で生じた新規な変異である可能性が示唆された。

核ゲノム遺伝子上における増体関連マーカーを同定するために、さらなる発現プロファイリングを行い、ATP5C1、HADHA、COQ3、MYH7、ATB5B、MYH1 の 6 つの遺伝子を増体形質遺伝子の位置的機能的候補として同定した。

PCR ダイレクトシーケンスによって多型の検出を行った結果、ATP5B では 3 個、HADHA、COQ3、MYH7 ではそれぞれ 1 個、MYH1 では 11 個の有望多型がそれぞれ検出された。さらに、これらの多型についてタイピング法 (PCR-RFLP 法、ミスマッチ PCR-RFLP 法および allele-specific PCR 法) の確立を行った。ランドレース種集団において相関解析を行った結果、ATP5B、MYH7、および MYH1 の多型の遺伝子型については 100kg 到達時予測日齢育種価との有意な相関は認められなかった。一方、COQ3/-1623 については P 値が 0.0468 を示し、5%水準で遺伝子型の効果に有意な差が認められた。また、この多型における 100kg 到達時予測日齢育種価の最小二乗平均値と標準誤差は in/in 遺伝子型が 1.050 ± 0.356 で、in/del 遺伝子型が -0.862 ± 0.8817 であり、AT の挿入がある個体は AT がディレクションしている個体よりも 100kg 到達時予測日齢育種価が有意に高かった。del/del 型の個体は今回の解析では存在しなかった。こうして、COQ3/-1623 の del アリルが 100kg 到達時予測日齢に対してプラスの効果をもっていることが分かり、この多型がランドレース種における有用な増体関連マーカーの候補となる可能性が示唆された。

上記で明らかにされた D-Loop 領域/846 SNP と COQ3/-1623 indel 多型を同時に取り込み、それぞれの多型の主効果と多型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、多型間のエピスタシス効果は有意に検出されなかったが、D-Loop 領域/846 SNP と COQ3/-1623 indel 多型の両方において、有意な主効果が検出された。こうして、これらの 2 つの多型は独立した機構により増体形質に関与しており、ランドレース種系統造成のための DNA 育種技術に有用な分子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 20 件)

Genetic dissection of marbling trait through integration of mapping and expression profiling. T. YAMADA. Animal Science Journal, 査読有 85: 349-355 (2014)

Multiple marker effects of single nucleotide polymorphisms in three genes, AKIRIN2, EDG1 and RPL27A, for marbling development in Japanese Black cattle. S. SUKEGAWA, T. MIYAKE, T. IBI, Y. TAKAHAGI, H. MURAKAMI, F. MORIMATSU and T. YAMADA. Animal Science Journal, 査読有 85: 193-197 (2014)

The G allele at the g.70014208A>G in the MYBPC1 gene associated with high marbling in Japanese Black cattle is at a low frequency in breeds not selected for marbling. B. TONG, S. SASAKI, Y. MURAMATSU, T. OHTA, H. KOSE, T. FUJITA and T. YAMADA. Journal of Genetics, 査読有 93: 231-233 (2014)

Association of a single-nucleotide polymorphism in myosin-binding protein C, slow-type (MYBPC1) gene with marbling in Japanese Black beef cattle. B. TONG, S. SASAKI, Y. MURAMATSU, T. OHTA, H. KOSE, H. YAMASHIRO, T. FUJITA and T. YAMADA. Animal Genetics, 査読有 45: 611-612 (2014)

Association of single nucleotide polymorphism in IRS1 gene with growth-related trait in Japanese Black beef cattle. Y. WU, B. TONG, K. WU, S. SASAKI, Y. MURAMATSU, T. OHTA, H. KOSE, T. YAMADA, D. ZHANG and G. NI. Journal of Animal and Veterinary Advances, 査読有 13: 37-40 (2014)

Possible association of single nucleotide polymorphism in the myosin heavy chain 1 gene with growth-related trait in Japanese Black beef cattle. B. TONG, K. WU, S. SASAKI, Y. MURAMATSU, T. OHTA, H. KOSE and T. YAMADA. Journal of Animal and Veterinary Advances, 査読有 13: 41-44 (2014)

Replicated association of the single nucleotide polymorphism in PNLIP with marbling in Niigata population of Japanese Black beef cattle. H. TANOMURA, Y. MURAMATSU, T. YAMAMOTO, T. OHTA, H. KOSE and T. YAMADA. Open Journal of Animal Sciences, 査読有 3: 89-92 (2013)

間接検定調査牛における脂肪交雑関連遺伝子の一塩基多型の効果の検討。佐々木整輝, 伊藤智仁, 荻野敦, 清水一広, 森田光夫, 山田宜永. 北信越畜産学会報, 査読有 106: 49-55 (2013)

No replicated association of the c.-312A>G in EDG1 with marbling in Niigata population of Japanese Black beef cattle. B. TONG, N. FUKE, Y. HIMIZU, H. KATOU, M. HATANNO, T. OHTA,

H. KOSE and T. YAMADA. Open Journal of Animal Sciences, 査読有 3: 269-272 (2013)

Polymorphisms in promoter regions of MYH1 and IRS1 genes showing marbling-associated expression changes. B. TONG, S. SASAKI, Y. MURAMATSU, T. OHTA, H. KOSE, H. YAMASHIRO and T. YAMADA. Journal of Animal and Veterinary Advances, 査読有 11: 4441-4445 (2012)

Useful g.70014208G>A SNP marker in MYBPC1 gene showing marbling-associated expression changes. B. TONG, S. SASAKI, Y. MURAMATSU, T. OHTA, H. KOSE, H. YAMASHIRO and T. YAMADA. Journal of Animal and Veterinary Advances, 査読有 11: 4446-4450 (2012)

Possible effects of single nucleotide polymorphism in CDC10, IRS1 and MFN2 genes on growth-related traits in Japanese Black beef cattle. B. TONG, K. WU, S. SASAKI, Y. MURAMATSU, T. OHTA, H. KOSE, H. YAMASHIRO, Y. ZHANG and T. YAMADA. Journal of Animal and Veterinary Advances, 査読有 11: 4536-4539 (2012)

Preliminary association study of single nucleotide polymorphism in MYH1 and TRDN genes for growth-related traits in Japanese Black beef cattle. K. WU, B. TONG, S. SASAKI, Y. MURAMATSU, T. OHTA, H. KOSE, H. YAMASHIRO, T. YAMADA and Y. ZHANG. Journal of Animal and Veterinary Advances, 査読有 11: 4540-4543 (2012)

Genetic dissection of complex genetic factor involved in NIDDM of OLETF rat. T. YAMADA, H. KOSE, T. OHTA and K. MATSUMOTO. Experimental Diabetes Research, 査読有 2012: 582546 (2012)

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 and T. YAMADA. Journal of Animal and Veterinary Advances, 査読有 11: 1346-1349 (2012)

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 and T. YAMADA. Journal of Animal and Veterinary Advances, 査読有 11: 1350-1352 (2012)

Polymorphism in promoter region of CDC10 gene showing marbling-associated expression changes. B. TONG, Y. MURAMATSU, T. YAMAMOTO, H. TANOMURA, T. OHTA, H. KOSE, T. SUGIYAMA and T. YAMADA. Journal of Animal and Veterinary Advances, 査読有 11: 1930-1933 (2012)

Useful marker around TRDN gene showing

marbling-associated expression changes. B. TONG, Y. MURAMATSU, T. YAMAMOTO, H. TANOMURA, T. OHTA, H. KOSE, T. SUGIYAMA and T. YAMADA. Journal of Animal and Veterinary Advances, 査読有 11: 2792-2795 (2012)

Preliminary association study of SNPs in MFN2 gene showing marbling-associated expression changes. B. TONG, Y. MURAMATSU, T. YAMAMOTO, H. TANOMURA, T. OHTA, H. KOSE, T. SUGIYAMA and T. YAMADA. Journal of Animal and Veterinary Advances, 査読有 11: 2796-2800 (2012)

Single diabetic QTL derived from OLETF rat is a sufficient agent for severe diabetic phenotype in combination with leptin-signaling deficiency. H. KOSE, T. YAMADA and K. MATSUMOTO. Experimental Diabetes Research, 査読有 2012: 858121 (2012)

〔学会発表〕(計8件)

山下舞, 助川慎, 小松優太, 勝田尚樹, 山田宜永, 藤村達也, 森松文毅. ランドレース種における増体原因遺伝子の位置的機能的候補のウエスタンプロット解析および多型解析. 日本畜産学会第119回大会. 平成27年3月29日 宇都宮市

山下舞, 小松優太, 助川慎, 藤村達也, 森松文毅, 山田宜永. ランドレース種における増体原因遺伝子候補の多型と増体形質との相関解析およびその多型を用いた分子系統解析. 第52回北信越畜産学会新潟県分会. 平成26年3月19日 新潟市

山下舞, 助川慎, 藤村達也, 森松文毅, 山田宜永. ランドレース種における系統造成を目的とした増体関連マーカーの開発. 第63回北信越畜産学会大会. 平成26年11月21日 福井市

小松優太, 助川慎, 三宅武, 高萩陽一, 森松文毅, 山田宜永. ランドレース種における増体原因遺伝子候補の多型と増体形質との相関解析. 第51回北信越畜産学会新潟県分会. 平成25年3月19日 新潟市

山下舞, 助川慎, 高萩陽一, 森松文毅, 山田宜永. ランドレース種における増体関連発現パターンをもつ遺伝子の同定および増体原因遺伝子の位置的機能的候補の同定. 第51回北信越畜産学会新潟県分会. 平成25年3月19日 新潟市

助川慎, 山下舞, 藤村達也, 森松文毅, 山田宜永. 豚ランドレース種の増体原因遺伝子に関する遺伝子プロファイリングと位置的機能的候補の選定. 日本畜産学会第117回大会. 平成25年9月10日 新潟市

小松優太, 山下舞, 助川慎, 三宅武, 高萩陽一, 森松文毅, 山田宜永. ランドレース種における増体原因遺伝子候補の多型と増体形質との相関解析. 第62回北信越畜産学会大会. 平成25年11月15日 金沢市

小松優太, 助川慎, 三宅武, 高萩陽一, 森松文毅, 山田宜永. ランドレース種における増体原因遺伝子の位置的機能的候補の選定および多型検出. 日本畜産学会第 115 回大会. 平成 24 年 3 月 28 日 名古屋市

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: