

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580409

研究課題名(和文) 遺伝子発現量を基盤とした黒毛和種の不飽和脂肪酸に関する遺伝子の探索

研究課題名(英文) Search for the genes associated with unsaturated fatty acid of Japanese Black cattle based on gene expression

研究代表者

大山 憲二(Oyama, Kenji)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70322203

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)：本研究は、黒毛和種の脂肪中の一価不飽和脂肪酸(MUFA)割合に影響を与える遺伝子を特定し、遺伝的改良に寄与することを目的として実施した。肥育牛のサンプルから遺伝子発現量とMUFA割合を測定したところ、5つの遺伝子で0.39から0.56の正の相関を得た。そのうち、SPP1、FABP4およびFADS2の3つの遺伝子を対象として、転写開始領域の遺伝的変異を探索したところ、4つの一塩基多型を検出することができた。FADS2の多型は皮下脂肪の厚さ、推定歩留およびミリスチン酸、FABP4の多型は枝肉重量、脂肪交雑およびリノール酸に有意な効果を与えていることが明らかとなり、選抜指標としての利用が期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to find the candidate genes, which presumably affect mono-unsaturated fatty acid (MUFA) in intramuscular fat of Japanese Black cattle, and to contribute to the development of selection markers. Positive correlations ranging from 0.39 to 0.56 were obtained between MUFA measured by gas chromatography and gene expression of FABP4, FGF1, MMP14, SCD and SPP1 evaluated by real-time PCR. As the result of polymorphic search by sequence analysis in promoter regions of SPP1, FABP4 and FADS2, four single nucleotide polymorphisms (SNPs) were detected. Among them, the SNP in FADS2 was assumed to affect subcutaneous fat thickness, yield estimate and myristic acid whereas the SNP in FABP4 affected carcass weight, beef marbling and linoleic acid. Although none of the SNPs was considered to influence MUFA content, some of them were expected to be used as selection markers for some economic traits in Japanese Black cattle.

研究分野：家畜育種学

キーワード：黒毛和種 一価不飽和脂肪酸 遺伝子発現量 プロモーター領域 一塩基多型

1. 研究開始当初の背景

日本国内では、牛肉や豚肉、鶏肉といった肉類から、牛乳や鶏卵といったものまで、数多くの畜産物を生産している。これらの畜産物は、海外で造成された家畜品種を日本に導入し、それらを日本国内で飼育することで生産されている。つまり、素材となる遺伝資源は諸外国に依存した生産体系であるといえる。

しかし、多くの畜産物の中でも牛肉だけは例外であり、和牛という日本在来牛をもとに改良された日本固有の肉用種を用いてかなりの国内生産が行われている。その和牛のおよそ 98% を占める黒毛和種は、180 万頭あまりが日本全国で飼養されている。和牛のなかの他の品種と異なり、このように黒毛和種が日本全国に広く普及したのは、脂肪交雑と呼ばれる筋肉内脂肪の「量」が他品種と比較して優れていたためであり、これが 1991 年の牛肉輸入自由化後も日本国内での牛肉生産が維持されている理由でもある。

日本の牛肉市場では脂肪交雑は最も重要な経済形質であり、関係者は過去数十年の間に世界的にも類をみないほど確固とした改良体制を築き上げ、脂肪交雑には他品種の追随を許さないほど十分な改良が加えられた。しかし近年は健康志向と風味の向上という視点から、脂肪酸組成をはじめとした脂肪の「質」を高め、黒毛和種に新たな価値を付与する取り組みに生産者の期待が高まっている。

2. 研究の目的

脂肪の「質」に関しては、牛脂肪中の脂肪酸組成の関与が種々報告され、とくにオレイン酸割合の増加が牛肉の風味を良くすると考えられている。オレイン酸は脂肪の融点に関与し、いわゆる悪玉 (LDL) コレステロールを低下させるヒトの健康にも良い脂肪酸であることから、その含量を制御するシステムの解明が効果的な改良体制の構築には必須である。

オレイン酸を含む脂肪酸組成のような形質は量的形質の特徴を有し、程度の差はあれ遺伝要因と環境要因の双方が表現型に関与していると考えられる。近年の統計遺伝学的検討から、脂肪酸組成には遺伝要因の寄与が非常に大きく、存在する遺伝的変異を活用した改良の可能性を示唆しているが、実際に脂肪酸組成を支配している遺伝子やそのマーカーはほとんど明らかとなっていない。

以上のような背景から、本研究は黒毛和種の脂肪酸組成の効率的な改良の一助とするために、オレイン酸を代表とする一価不飽和脂肪酸 (MUFA) に影響を与えている遺伝子の探索を行うものであるが、すでに完了している遺伝子発現量の網羅的解析結果を基盤として対象とする遺伝子を選定し、選抜マーカーとしての利用までを視野に入れて実施するものである。

3. 研究の方法

(1) これまでの研究で兵庫県、岐阜県、愛知県、京都府、福島県および宮崎県で飼育されていた 131 頭の黒毛和種肥育牛から腰最長筋の生体組織を採取し、このうち MUFA の高い群と低い群に属するそれぞれ 6 頭について、24,128 個におよぶ転写産物のマイクロアレイ発現解析 (アフィメトリクス GeneChip Bovine Genome Array) が実施済みであった。

マイクロアレイでは多くの遺伝子を同時に網羅的に解析することができ、遺伝子探索の一次スクリーニングとして有効であるが、近年はより精度の高い手法によってその結果を検証することも行われている。

そこで本研究では、これらの発現量の精度を検証すべく、いくつかの遺伝子の発現量をリアルタイム PCR により再測定し、マイクロアレイによる発現量データとの整合性を検討した。検証を行った遺伝子は FGF1、MMP14 および SPP1 の 3 つである。

リアルタイム PCR による遺伝子発現解析には、LightCycler® Nano システムおよび LightCycler® Nano Software 1.0 を使用し、FastStart Essential DNA Green Master を用いたインターカレーター法により行った。

それぞれの遺伝子の発現量は内部標準遺伝子に対する相対定量により測定し、内部標準遺伝子はハウスキーピング遺伝子として知られる GAPDH、ACTB および RPLP0 の 3 つの遺伝子を検討した。

(2) 10 ヶ月齢から 2 ヶ月おきに生体組織を出荷まで採取した別の黒毛和種肥育牛 4 頭を用い、マイクロアレイにおいて群間で高い発現差のあった遺伝子について、リアルタイム PCR での発現量と MUFA についても同様の傾向が得られるかの確認を行った。

脂肪酸組成は、メチル化された脂肪サンプルに対し、30 m × 0.25 mm の TC-FFAP キャピラリーカラムを装備したガスクロマトグラフ GC-4000 で検出および分析した。測定した脂肪酸は、C14:0、C14:1、C16:0、C16:1、C18:0、C18:1、C18:2 の 7 種であり、各脂肪酸が全脂肪酸中に占める割合を算出した。さらに

$$\text{SFA} = \text{C14:0} + \text{C16:0} + \text{C18:0}$$

$$\text{MUFA} = \text{C14:1} + \text{C16:1} + \text{C18:1}$$

とした。遺伝子発現量の測定方法は (1) と同様である。

(3) 群間で発現に差が認められた遺伝子に対し、一塩基多型の探索を行った。本研究では遺伝子発現量を基盤とした検討を行っていることから、多型の探索はプロモーター領域を対象として実施し、多型探索用個体の塩基配列をキャピラリーシーケンサー ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer によって決定し、得られた塩基配列を探索用個体間で比較した。解析には Griffith University の Chromas 1.45、アライメントの作成には DNASIS® Pro を用いた。

検出された多型の効果を調査するため、検証用として準備した黒毛和種肥育牛に対し PCR-RFLP による遺伝子型判定を行い、経済形質との関連性を最小自乗分散分析および Tukey-Kramer の HSD 検定により解析した。

4. 研究成果

(1) マイクロアレイと同一のサンプルを用いてリアルタイム PCR による発現解析を行い、マイクロアレイの結果とリアルタイム PCR の結果の整合性を確認した。内部標準遺伝子として検討した 3 つのハウスキーピング遺伝子のなかでは、発現量は RPLP0 が最も安定していた。したがって、検証の対象とした遺伝子の発現量は、RPLP0 に対する相対的な発現量として測定した。

対象とした遺伝子のうち、SPP1 はマイクロアレイによる発現解析において高 MUFA 群と低 MUFA 群との間に 5.58 倍の発現差が見られた遺伝子であり、個体によって発現量のばらつきが大きかったものである。マイクロアレイで SPP1 が高く発現していた個体は、リアルタイム PCR による発現解析でも高く発現していたため、マイクロアレイの結果とリアルタイム PCR の結果の間に相関係数 0.87 という有意な相関が認められた。

しかし、FGF1 および MMP14 については、マイクロアレイによる発現解析において高 MUFA 群と低 MUFA 群の発現差がそれぞれ 2.52 倍および 1.47 倍で、SPP1 と比較すると発現差が小さかった。そのことも関与し、リアルタイム PCR による発現解析においても個体によって発現量に大きな差は見られなかった。マイクロアレイの結果とリアルタイム PCR の結果の間の相関係数は FGF1 で 0.39 ($P = 0.07$) および MMP14 で 0.35 ($P = 0.10$) と大きくはなかった。

今回の検証では、とくに個体によって発現量が大きく異なる遺伝子については、マイクロアレイの結果とリアルタイム PCR の結果に整合性が認められ、マイクロアレイの結果に一定の信頼が置けると判断できた。一方、個体による発現差が小さい遺伝子に関しては、発現解析における誤差の影響が大きく、マイクロアレイの結果とリアルタイム PCR の結果の相関はそれほど大きくなかった。しかし全体として、得られた相関は中程度から高い正であり、マイクロアレイとリアルタイム PCR の整合性を否定するものではなかった。

(2) 黒毛和種 4 頭を用いたリアルタイム PCR による発現量と MUFA 割合の関係を調査したところ、FABP4 (図 1)、FGF1、SPP1 (図 2)、MMP14 (図 3) および SCD の 5 つの遺伝子で 0.39、0.56、0.40、0.41 および 0.47 およびの中程度の正の相関係数が得られた。

これらの遺伝子は、MUFA に影響を与える候補遺伝子としてより詳細な検討が必要であると考えられた。とくに MMP14 および SPP1 は、月齢と発現量には相関が認められず、候

補遺伝子としてより重要である。ただし、発現量と MUFA の間の相関は、上記のように非常に高いものとは言えず、ひとつの遺伝子が単独で MUFA 割合の決定因子として働く可能性は低く、脂肪酸組成に対して複数の遺伝子が相互に作用していることも示唆された。

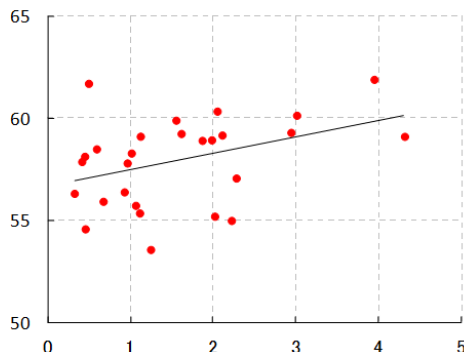


図 1. FABP4 遺伝子発現量 (横軸) と MUFA (縦軸) の関連性

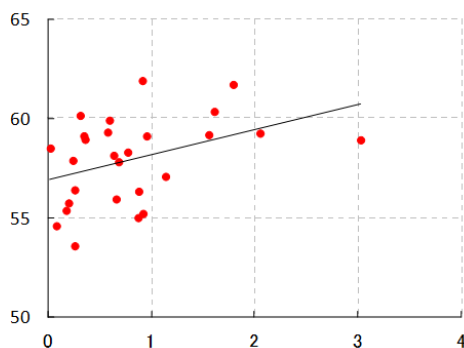


図 2. SPP1 遺伝子発現量 (横軸) と MUFA (縦軸) の関連性

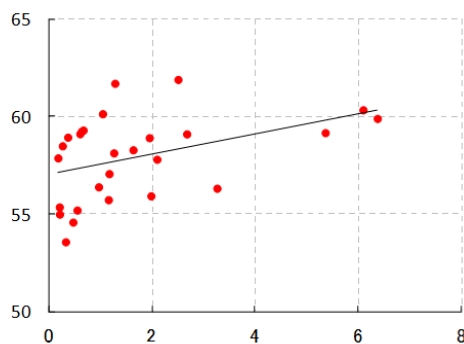


図 3. MMP14 遺伝子発現量 (横軸) と MUFA (縦軸) の関連性

(3) 一塩基多型の探索とその効果の推定は、候補としての重要性、多型探索の容易さなどを考慮して、SPP1、FADS2 および FABP4 の 3

つの遺伝子に対して行った。以下にそれぞれの遺伝子で得られた結果を示す。

SPP1 遺伝子

SPP1 は、MUFA の高低群間で有意な発現差を示した遺伝子で、多型の探索には黒毛和種およびホルスタイン種それぞれ8頭を用いた。本遺伝子のプロモーター領域の多型探索を行ったところ、3490A/G および 3492A/G の2つの塩基多型を検出することができた。これらの多型は、すでに先行研究で報告のある多型であるが、それらが特定の形質に影響を与えているとの報告はない。

検証用集団としては、平成14年度以降に現場後代検定合同調査会に出品されていた黒毛和種肥育調査牛（検定集団）446頭を用いた。検定集団に対する遺伝子型判定の結果、3490A/G ではA/A型を持つ個体は存在せず、Aタイプの遺伝子頻度は、3490A/G で0.10、3492A/G で0.72となっていた。

集団解析を実施したところ、MUFAを含む脂肪酸組成関連9形質および枝肉6形質のいずれにおいても3490A/Gは有意な効果は検出できなかった（表1）。一方の3492A/Gは、胸最長筋面積で $P=0.068$ 、歩留基準値で $P=0.061$ の有意傾向であったが、脂肪酸組成には有意な効果を示さなかった。

表1. 検証集団の経済形質における SPP1 遺伝子多型の効果の危険率

形質	3490A/G	3492A/G
枝肉重量	0.373	0.241
胸最長筋面積	0.288	0.068
ばらの厚さ	0.212	0.676
皮下脂肪の厚さ	0.969	0.226
歩留基準値	0.377	0.061
脂肪交雑	0.499	0.607
C14:0	0.494	0.222
C14:1	0.267	0.764
C16:0	0.429	0.804
C16:1	0.450	0.164
C18:0	0.737	0.747
C18:1	0.727	0.165
C18:2	0.300	0.335
SFA	0.828	0.506
MUFA	0.979	0.303

分散分析で有意傾向であった3492A/Gにおける胸最長筋面積（ cm^2 ）の最小自乗平均値はG/G型が 58.4 ± 1.6 、G/A型が 56.5 ± 0.6 、A/A型が 55.1 ± 0.6 で、Gタイプが筋肉を大きくする傾向が認められた。さらに算出に胸最長筋面積が関与する歩留基準値（%）はG/G型で 74.3 ± 0.3 、G/A型で 73.7 ± 0.1 、A/A型で 73.6 ± 0.1 となっていた。

SPP1 遺伝子に関して今回はプロモーター領域をかなり限定して多型を探索した。探索が実施されていない領域に経済形質に効果のある多型が存在する可能性は否定できず、今後はより範囲を拡大し、広い領域での多型

探索と、集団解析が求められる。

FADS2 遺伝子

本遺伝子の多型の探索には黒毛和種およびホルスタイン種それぞれ4頭を用いた。その結果、g.-823G>Aに多型が検出できた。

検証用集団には、SPP1での検証に用いた検定集団に加え、宮崎県の黒毛和種肥育牛（宮崎集団）556頭を用いた。これら集団に対する遺伝子型判定の結果、Aタイプの遺伝子頻度は宮崎集団で0.35、検定集団で0.10と推定された。

経済形質を対象とした分散分析に際し、検定集団のA/A遺伝子型は頭数が少なかったため水準から除外した。結果、検定集団では皮下脂肪の厚さ（ $P<0.01$ ）および歩留基準値（ $P<0.05$ ）にg.-823G>Aの効果が認められたが、脂肪酸組成には有意な効果を示さなかった（表2）。一方の宮崎集団では、脂肪酸組成のうちミリスチン酸（C14:0）に有意な効果（ $P<0.05$ ）が認められた。

表2. 検証集団の経済形質における FADS2 遺伝子多型の効果の危険率

形質	検定集団	宮崎集団
枝肉重量	ns	ns
胸最長筋面積	ns	ns
ばらの厚さ	ns	ns
皮下脂肪の厚さ	0.0014	ns
歩留基準値	0.0145	ns
脂肪交雑	ns	ns
C14:0	ns	0.0263
C14:1	ns	ns
C16:0	ns	ns
C16:1	ns	ns
C18:0	ns	ns
C18:1	ns	ns
C18:2	ns	ns
SFA	ns	ns
MUFA	ns	ns

ns：有意性なし、*： $P<0.05$ 、**： $P<0.01$

分散分析で有意な効果が認められた形質に対し、最小自乗平均値の有意差検定を実施したところ、検定集団の皮下脂肪（cm）はG/A型（ $3.20^a \pm 0.10$ ）がG/G型（ $2.82^b \pm 0.04$ ）に対して有意に厚く、その結果、皮下脂肪の影響を大きく受ける歩留基準値（%）もG/A型（ $73.24^b \pm 0.20$ ）がG/G型（ $73.79^a \pm 0.08$ ）と比較して低かった。宮崎集団のC14:0においては、G/G型（ $2.60^a \pm 0.06$ ）がG/A型（ $2.46^b \pm 0.06$ ）に比較して有意に高かったが、ホモ型であるA/A型（ $2.40^{ab} \pm 0.09$ ）がG/G型とG/A型の中間に位置するなど、相加的な作用を示していなかった。

FABP4 遺伝子

多型探索に用いた供試牛および検証用集団は、FADS2 遺伝子と同一である。多型探索の結果、g.-295A>G および g.-287A>G の2つ

の多型が近位プロモーター領域に検出できた。これらの多型は哺乳類でよく保存された領域にあり、転写因子の結合部位に影響を与えていると推定され FADS2 の遺伝子発現に関与すると考えられた。ただし検証用集団の 20 頭の黒毛和種の多型を確認したところ、これらは完全連鎖していることが明らかとなり、検証用集団における型判定は g. -295A>G のみを対象とした。

検証用集団において、G タイプの遺伝子頻度は宮崎集団で 0.47、検定集団で 0.39 と推定された。

検定集団の経済形質に対する分散分析では、枝肉重量、脂肪交雑およびリノール酸 (C18:2) が有意 ($P < 0.05$) であった。一方の宮崎集団では有意な形質は認められなかった (表 3)。

表 3. 検証集団の経済形質における FABP4 遺伝子多型の効果の危険率

形質	検定集団	宮崎集団
枝肉重量	0.0192	ns
胸最長筋面積	ns	ns
ばらの厚さ	ns	ns
皮下脂肪の厚さ	ns	ns
歩留基準値	ns	ns
脂肪交雑	0.0364	ns
C14:0	ns	ns
C14:1	ns	ns
C16:0	ns	ns
C16:1	ns	ns
C18:0	ns	ns
C18:1	ns	ns
C18:2	0.0427	ns
SFA	ns	ns
MUFA	ns	ns

ns : 有意性なし、* : $P < 0.05$ 、** : $P < 0.01$

検定集団における枝肉重量 (kg) の最小自乗平均値では、A/G 型 ($447.5^a \pm 3.3$) が G/G 型 ($431.0^b \pm 5.9$) より有意に重く、A/A 型 ($437.2^{ab} \pm 3.9$) は両型の間であった。C18:2 (%) は、G/G 型 ($2.47^a \pm 0.09$) は A/G 型 ($2.23^b \pm 0.05$) と比較して有意に高く、A/A 型 ($2.26^{ab} \pm 0.06$) が中間に位置した。

今回検出された遺伝子多型は、例えば FABP4 の g. -295A>G が枝肉重量や C18:2 の選抜マーカーとして活用できる可能性はあるが、最小自乗平均値では A/A 型が中間になるなど、遺伝子の効果が相加的でなく、注意が必要である。また本研究で最終的な目的としている MUFA にはいずれの遺伝子多型も効果を示さず、脂肪の質の遺伝的改良には、より広い領域の探索や、さらなる候補遺伝子の検討が必要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Matsumoto H, Nogi T, Tabuchi I, Oyama K, Mannen H, Sasazaki S. The SNPs in the promoter regions of the bovine FADS2 and FABP4 genes are associated with beef quality traits. *Livestock Science*. 査読有. 163. 2014. pp. 34-40.

[学会発表] (計 1 件)

松本大和、大山憲二、万年英之、笹崎晋史、ウシ FABP4 遺伝子のプロモーター領域に対する多型探索、日本動物遺伝育種学会、2012.10.6、東北大学 (宮城県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大山 憲二 (OYAMA, Kenji)
神戸大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号 : 70322203

(2) 研究分担者

万年 英之 (MANNEN, Hideyuki)
神戸大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号 : 20263395

笹崎 晋史 (SASAZAKI, Shinji)
神戸大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号 : 50457115

本多 健 (HONDA, Takeshi)
神戸大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号 : 10432551