

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660208

研究課題名(和文) 飼料利用性の全ゲノム評価に関する挑戦的研究

研究課題名(英文) Challenging studies on the whole genome evaluation of feed utilization efficiency

研究代表者

祝前 博明 (IWAISAKI, Hiroaki)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00109042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肉用牛生産では、飼料費は総生産費の大きな割合を占めることから、飼料利用性は重要な経済形質であり、その遺伝的構造の解明は遺伝的改良を図る上で有用である。本研究では、黒毛和種直接検定牛の飼料利用性に関する量的形質を対象に、ゲノムワイド関連解析の結果に対して関連重み行列アプローチを適用し、SNP効果の推定値間の相関に基づいて遺伝子ネットワークを構築することにより、飼料利用性の遺伝的構造に関する生物学的知識を得た。また、この知識を利用して、ゲノミック評価と遺伝分散の推定を行った。

研究成果の概要(英文)：In beef cattle production, since feed costs account for the highest portion of total production cost, feed utilization efficiency is an important composite economic trait, and obtaining the knowledge on its genetic architecture is useful for promoting genetic improvement of beef cattle. In this study, focusing on quantitative traits relevant to feed utilization efficiency in performance-tested young bulls of Japanese Black cattle, an association weight matrix approach was applied to the results of the genome-wide association studies using genotype data of a very large number of single nucleotide polymorphisms. Then, based on the information on correlations among estimated SNP effects, a gene network was estimated, and the biological knowledge on the genetic architecture of feed utilization efficiency was obtained. Using the obtained knowledge, genomic evaluation and estimation of genetic variance was conducted.

研究分野：動物遺伝育種学

キーワード：一塩基多型 関連重み行列 遺伝子ネットワーク ゲノム育種価 ゲノミック予測 遺伝分散 飼料利用効率 和牛

1. 研究開始当初の背景

ウシゲノムにおける低密度 DNA マーカーの利用の時代には、メジャージーンの間接あるいは直接マーカーを想定したマーカーアシスト選抜が検討され、そのための育種価予測法も開発された。その後、2008年に、次世代シーケンサーによって検出された一塩基多型 (SNP) を配置したチップが市販されるに至り、事情が一変した。現在では、多数の SNP の情報から予測されるゲノム育種価に基づいたゲノミック選抜の実現に向け、ウシを含む多くの家畜種で研究が進められている。

ところが、利用できる SNP 数は当初の約 5 万箇所から飛躍的に増加しているにも関わらず、ゲノム育種価の予測の正確度の上昇分は現状ではごくわずかである。したがって、多数の SNP の情報の同時使用による正確度の向上という従来の考え方とは発想を異にした、ゲノム育種価の予測のための新たなアプローチの検討が必要と考えられた。

2. 研究の目的

家畜のゲノム育種における個体の能力予測では、多数の SNP の情報を同時に用いたゲノム育種価予測が検討されているが、予測の正確度の向上が課題とされ、より精密な統計的方法の開発が一つの重要な突破口と考えられている。しかし、利用できる SNP 数が 100 万に迫ろうとしている今日、この種のアプローチには限界があると考えられた。

そこで、本課題では、肉用牛の飼料利用性を対象としてゲノムワイド関連解析 (GWAS) を行い、その結果に対して関連重み行列 (AWM) アプローチを適用して遺伝子ネットワークを推定することにより、飼料利用性の遺伝的構造に関する生物学的知識を得ようとした。また、その生物学的知識に基づいて予測に用いる SNP 数を絞り込むことにより、予測の高い正確度と精度の安定性を備えたゲノム育種価評価法の開発につなげようとした。

3. 研究の方法

(1) 分析には、平成 14 年度から 25 年度における黒毛和種産肉能力検定直接法の調査牛 3,392 頭のうち、974 頭の飼料利用性に関する量的形質の記録およびこれらの個体の SNP 型の記録を用いた。取り上げた量的形質は、粗飼料摂取量、濃厚飼料摂取量、TDN 摂取量、余剰粗飼料摂取量、余剰濃厚飼料摂取量、余剰 TDN 摂取量および 1 日当たり平均増体量 (DG) の 7 形質である。SNP 型の記録に関しては、Illumina BovineSNP50 BeadChip による約 51,000 箇所の SNP の遺伝子型情報についてクオリティ・チェックを行い、最終的に個体あたり 37,732 箇所のデータを用いた。

(2) まず、混合モデル法による GWAS を行った。混合線形モデルには、主効果として検定開始年度、検定開始月および検定場の効果を、共変量として個体の栄養度、検定開始時日齢

および近交度を取り上げたほか、さらに個体の育種価、対象とした SNP のアリルの置換効果および残差を取り上げた。計算には Qxpack5.05 を用いた。

(3) 次に、GWAS で得られた結果に対して AWM アプローチを適用し、SNP 効果の推定値間の相関に基づいて遺伝子ネットワークの推定を行った。すなわち、ここでは、GWAS の結果において 3 形質以上で有意 ($P < 0.05$) であった SNP を選択し、その SNP から 5 kb 以内の遺伝子を 1 SNP1 遺伝子となるように選択した。次いで、選択された遺伝子間に PCIT アルゴリズムを適用し、有意な相互作用からネットワークを推定した。また、AWM に含まれた遺伝子に対しても DAVID を用いて遺伝子機能解析を行い、遺伝子の機能に基づいたサブネットワークを推定した。

(4) さらに、ネットワークに関連した複数の SNP セットを作成し、ゲノミック評価を行うとともに、それらの SNP セットによって説明される遺伝分散をベイズ法により推定した。ここでは、11 の SNP セットを作成した。すなわち、AWM に用いられた SNP のセットに加えて、AWM に含まれる遺伝子に対して行った DAVID による GO ターム解析で有意であった Biological Process、Cellular Component、Molecular Function および KEGG Pathway の全カテゴリーに属する各遺伝子群、サブネットワークの構築に用いた glycoprotein metabolic process、ion transport、biological adhesion、Axon guidance および MAPK signaling pathway の 5 つの GO タームとパスウェイに属する各遺伝子群ならびに Brain で発現する遺伝子群のそれぞれについて、近傍 SNP (5 kb 以内) から構成される SNP セットを作成した。さらに 37,732 箇所の全 SNP のうち、各カテゴリーに属さない SNP から構成される SNP セットも作成した。

分析における混合線形モデルには、前述の主効果および共変量に加えて、対象 SNP セットの効果、残りの SNP に関連した“ポリジーン効果”および残差を取り上げた。

4. 研究成果

(1) GWAS の結果、粗飼料摂取量、濃厚飼料摂取量、TDN 摂取量、余剰粗飼料摂取量、余剰濃厚飼料摂取量、余剰 TDN 摂取量および DG において $P < 0.0001$ で有意であった SNP は、それぞれ 10、6、7、7、12、8 および 35 であり、2 番、3 番、5 番、6 番、8 番、10 番、11 番、12 番、13 番、14 番、16 番、17 番、18 番、21 番、22 番、23 番、24 番、28 番および 29 番染色体上に存在していた。特に 3 番および 6 番染色体上に多く認められ、6 番染色体上の領域はこれまでに飼料摂取量や DG との関連が報告されている領域と一致していた。有意性 ($P < 0.05$) が認められた SNP 数は、粗飼料摂取量から DG の順にそれぞれ 2,247、2,712、2,659、2,226、2,578、2,214 および 3,195 であった。各形質において有意 ($P <$

0.05)であったSNPの近傍遺伝子に対して行った遺伝子機能解析で有意($P < 0.001$)であったGOタームおよびパスウェイには、代謝、イオン輸送、チャンネル活性およびイオン結合に関わるものが多く含まれていた。

(2) GWASにより3形質以上と有意性($P < 0.05$)が認められたSNPから5 kb以内の遺伝子を選択したところ、644遺伝子からなるAWMが得られた。この644遺伝子に対して遺伝子機能解析を行ったところ、個々の形質を対象としたGWASで有意であった遺伝子に対して行った解析の場合と同様に、代謝やイオン輸送、チャンネル活性、イオン結合に関わるタームが多く認められた。また、ここではMAPK signaling pathwayに有意性が認められた。このパスウェイは、家畜において、飼料利用性に関わるカロリー制限との関連が示唆されているパスウェイである。さらに、各組織で発現する遺伝子のうち、脳で発現する遺伝子が644遺伝子と有意に関連することが示された。脳の視床下部は、神経ペプチドを通じて摂食行動を制御することが知られており、ウシにおいても余剰飼料摂取量との関連が報告されている。

(3) AWMの要素である644遺伝子に対応する標準化SNP効果の推定値を用いてPCITアルゴリズムによる解析を実施したところ、23,230の有意な相関が認められた。これらの有意な相関を遺伝子間の相互作用としたネットワークをCytoscapeにより描画したものが図1である。これら644遺伝子に対するDAVIDを用いた遺伝子機能解析の結果、代謝やイオン輸送、チャンネル活性、イオン結合に関わるタームが多く認められた。このネットワーク全体に対してCytoscapeのプラグインであるCentiScapeを用いてトポロジー分析を行ったところ、ある遺伝子が他の幾つの遺伝子と繋がっているかを示す平均次数は72.1、ネットワークのコンパクトさを表す平均距離は2.38であり、このネットワークは結合性の高いネットワークであることが示された。

(4) さらに、全体のネットワークから遺伝子機能に注目したサブネットワークの構築を試みた。その際、AWMに含まれた644遺伝子の中で転写因子の働きをもつ13の遺伝子に着目した。これら13の転写因子のうち、最も冗長度が小さく、相互作用数が最多となるような3つの転写因子の組合せを探索した結果、STAT6、LMX1AおよびZSCAN5Bが選択された。この3つの転写因子に対応するSNPの各形質に対する標準化効果の推定を行ったところ、STAT6およびLMX1Aは余剰飼料摂取量に対して正の効果をもつ傾向にあり、DGに対しては負の効果を示す一方、ZSCAN5Bは余剰飼料摂取量に対しては負の、DGに対しては正の効果を示した。STAT6は発達や恒常性に関わるJak-STAT signaling pathwayに含まれる遺伝子で、レプチンシグナリングに関わり、体重調節に関連していることが報告されて

いる。またLMX1Aは $P < 0.0001$ で余剰濃厚飼料摂取量との関連が検出されており、LMX1A変異ラットは脳の異常な発達を示すことが報告されている。

(5) これまでに飼料利用性との関連が報告されているGOタームを中心に、冗長な複数のタームを上位のタームにまとめ、サブネットワークを構築するために、glycoprotein metabolic process、ion transport、biological adhesion、Axon guidanceおよびMAPK signaling pathwayの5つのGOタームおよびパスウェイを選択した。さらにBrainのタームに属する遺伝子も加え、3つの転写因子STAT6、LMX1AおよびZSCAN5Bとの相互作用をもつ各GOターム、パスウェイに含まれる遺伝子から、サブネットワークを構築した(図2)。このサブネットワークは82遺伝子間の349の相互作用から構成された。サブネットワークに含まれる遺伝子のうち、ABCC4およびMAP2K6は、ウシにおける遺伝子発現解析において余剰飼料摂取量との関連が報告され、KCNIP4は、ウシやニワトリでのGWASにおいて体重との関連が報告されている。NTRK2は、マウスにおいて飼料摂取量の制御に関わることが示されている遺伝子である。NRXN3、PRKCAおよびROBO1は、ヒトにおけるGWASでBMIとの関連が報告されており、ACVR1Cはヒトの脂肪組織における発現が肥満と関連することが示されている。また、PRNPはヒツジにおいて発育との関連が示されている遺伝子である。3つの転写因子と他の遺伝子との相互作用に注目すると、STAT6はion transportおよびbiological adhesionに含まれる遺伝子と多くの相互作用を示した。細胞および組織間の複雑なシグナリングは、哺乳類において発育に不可欠であることが知られている。LMX1AはAxon guidanceに含まれる遺伝子と多くの相互作用を示し、LMX1Aが神経回路形成に関わっていることがあらためて示唆された。ZSCAN5Bは、STAT6の場合と同じく、ion transportおよびbiological adhesionに含まれる遺伝子を中心に13の相互作用を示した。

(6) すべてのSNPを用いて推定された遺伝分散の表型分散に占める割合は、血統情報を利用して推定された従前の遺伝率推定値に比べて、余剰TDN摂取量では0.1程度高い値が、(余剰)粗飼料摂取量では0.1以上低い値が推定された。その他の4形質についての推定値は、概ね同程度であった。残差分散の推定値は、AWMから得られたSNPセットを用いた場合には相対的に小さな値を示し、それ以外のケースではほぼ同程度の値であった。また、全SNPを2つのSNPセットに分割して推定した場合の2つの遺伝分散推定値の和は、全SNPを用いて一度に推定した遺伝分散値の103~215%となり、AWMのSNPセットを用いたときに最大であった。また、GOタームに基づいて構築したSNPセットによって説明された遺伝分散の割合は、そのSNPセットに含まれるSNP

数から期待される割合よりも高い値であった。

本研究における結果は、AWM の SNP のみを用いた場合には遺伝分散が過大推定される可能性を示唆した先行研究とも一致していたが、ここでの遺伝分散の推定値の妥当性については、さらに詳細な検討を要するものと考えられた。

ゲノム育種価予測やゲノミック選抜において、対象形質についての事前の生物学的な知識を有効に利用するうえで、理論面や方法面を含めた今後のさらなる検討が必要である。



図 1. Cytoscape を用いて描かれた AWM の 644 遺伝子のネットワーク。丸は遺伝子を示し、次数(相関する遺伝子数)に従って濃い赤(次数が高い)から白(次数が低い)へのグラデーションとなっている。

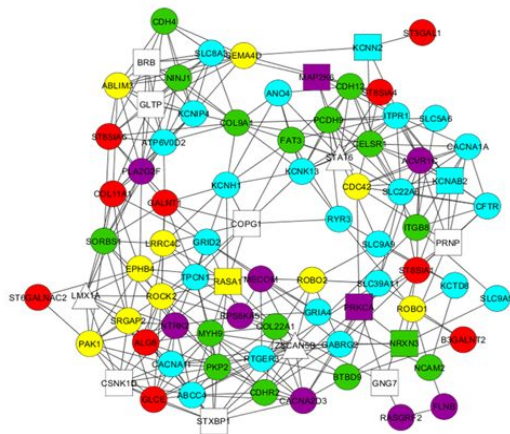


図 2. 3 つの転写因子を中心として遺伝子機能に注目したサブネットワーク。○：転写因子、○：脳で発現する遺伝子。図形の色：赤は glycoprotein metabolic process、青は ion transport、緑は biological adhesion、黄色は Axon guidance、紫は MAPK signaling pathway にそれぞれ含まれる遺伝子を示す。

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)

[学会発表] (計 2 件)

遠藤 聡子、松田 洋和、谷口 幸雄、勝田 智博、渡邊 敏夫、杉本 喜憲、祝前 博明、黒毛和種直接検定牛を対象とした飼料利用性に関する遺伝子ネットワーク推定の試み、日本畜産学会、2015 年 3 月 29 日、宇都宮大学

岡田 大瑚、遠藤 聡子、松田 洋和、小川 伸一郎、谷口 幸雄、勝田 智博、渡邊 敏夫、杉本 喜憲、祝前 博明、SNP 共関連および RNA 共発現の情報を利用した遺伝子ネットワークの推定、日本畜産学会、2016 年 3 月 28 日、日本獣医生命科学大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

祝前 博明 (IWASAKI, Hiroaki)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：00109042