

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292159

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雑種強勢QTLの最有力候補遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of the strongest 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) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：雑種強勢は100年以上前に発見され家畜の育種改良に必須の遺伝現象であるが、その責任遺伝子は未だにクローニングされていない。野生マウスを用いた以前のQTL研究により、体重に関与し超優性を示す雑種強勢QTLを限られたゲノム領域内に位置づけた。本研究では、サブコンジェニックマウス系統を用いた表現型解析、エクソーム解析とトランスクリプトーム解析により、体重、体長と白色脂肪組織重量に関わるQTLsを2.1-8.0 Mbのゲノム領域内に位置づけることに成功した。これらのQTLsに関する雑種強勢効果は明確ではなかったが、mRNA発現量の異なる候補遺伝子を数個発見することができた。

研究成果の概要(英文)：Heterosis, found more than 100 years ago, is a genetic phenomenon essential for animal breeding. However, no causal gene for heterosis has been cloned in animals. Our previous QTL studies using wild mice revealed a small genomic region containing a overdominant QTL for heterosis of body weight. In this study, by an integration approach of phenotypic analysis, exome analysis, and transcriptome analysis using subcongenic mouse strains, I fine-mapped three QTLs for body weight, body length and white fat pad weight to 2.1- to 8.0-Mb genomic regions. Although none of the three QTLs exhibited heterotic effect, several differentially expressed genes were revealed as candidate genes for the body weight and fat weight QTLs.

研究分野：動物遺伝育種学

キーワード：育種学 QTL マウス 雑種強勢

1. 研究開始当初の背景

- (1) 雑種強勢は、100 年以上前に発見されて以来、家畜の育種改良において必須の遺伝現象となっている。しかし、雑種強勢に關与する責任遺伝子は未だに同定されていない。
- (2) 雑種強勢の成因には、主として、ゲノムワイド優性説と超優性説の二つが提唱されている。しかし、未だにどちらの説が有力なのか決着がついていない。
- (3) 我々は、これまでに、マウスを家畜のモデルとして、野生マウスの遺伝子プールから生後の体重と成長に關わる 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ち、野生マウスに由来する第 2 染色体上の QTL のゲノム領域約 44 Mb を C57BL/6Jcl 近交系(以降 B6 と略す)に導入したコンジェニック系統 B6.Cg-Pbwg1 を樹立した。
- (4) B6.Cg-Pbwg1 と B6 との間で交雑 F2 集団を作出し、QTL 解析を行なった結果、生後 6 週齢と 10 週齢体重に關して雑種強勢を示す超優性 QTL を第 2 染色体上の約 21 Mb のゲノム領域内に位置づけることに成功した。
- (5) B6.Cg-Pbwg1 より短いゲノム領域をもつサブコンジェニック系統と B6 との間で交雑 F2 集団を作出し、予備的な表現型解析を行なった結果、個体数が少ないものの、体重、尾長や白色脂肪組織重量に關わる雑種強勢 QTL が約 17 Mb のサブコンジェニック領域内にある可能性が示唆された。
- (6) 次世代シーケンサーによるエクソーム解析の結果、この 17 Mb のゲノム領域内に存在する遺伝子のエクソンには、多くのアミノ酸置換を伴う非同義置換が存在することを明らかにした。
- (7) この 17 Mb 領域をさらに断片化した 6 種類のサブコンジェニック系統を樹立し、一部のサブコンジェニック系統を用いて B6 との F2 交雑群を作出して表現型解析を行った結果、体重に關与する QTL が 5.9 Mb のゲノム領域内にあることが推定できた。

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および体重関連形質に關わる雑種強勢 QTL の最有力候補遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

- (1) サブコンジェニック系統と B6 系統間の F2 交雑群の作製
今までに樹立した 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 B6 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 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。また、マイクロサテライトマーカが存在しないゲノム領域では、エクソーム解析のシーケンス情報に基づいて PCR-RFLP マーカを開発し、その遺伝子型を決定した。

- (2) F2 個体の表現型の解析

得られた F2 個体の体重を生後 1, 3, 6, 10 と 14 週齢に計測した。14 週齢で屠殺し、肝臓、白色脂肪組織重量等の各種臓器重量、尾長と体長を計測した。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、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。

- (3) バイオインフォマティクス解析

これまでに行ったエクソーム解析の結果、約 17 Mb のサブコンジェニック領域内には多くの非同義置換があることを明らかにした。そこで、フリーコンピュータソフト SIFT と PolyPhen-2 を用いて、タンパク質高次構造やアミノ酸配列の進化的保存性等を考慮に入れて非同義置換のリスク効果を評価し、リスクの高いと推定される遺伝子を抽出した。また、フリーコンピュータソフト Endeavour を用いて、17 Mb 領域内に存在する遺伝子の中で、体重や脂質代謝等と関連のある遺伝子を抽出した。

- (4) mRNA-sequencing (mRNA-seq) 解析

17 Mb ゲノム領域について、野生マウスに由来する領域が C/C ホモ型、B6 由来の領域が B6/B6 ホモ型、および両領域が B6/C ヘテロ型であるディプロタイプをもつ F2 個体を選抜した。これらの個体の肝臓から総 RNA を抽出し、RT-PCR 法により cDNA を合成した。次世代シーケンサー Illumina HiSeq2000 を用いて mRNA-seq 解析を行い、3 つのディプロタイプ間で遺伝子発現量の差異を網羅的に調査した。mRNA-seq 解析の成否にはノウハウがあるので、外部委託した。

- (5) リアルタイム PCR 解析

フリー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 を用いて SYBR Green 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て、肝臓では検量線法により、脂肪組織では CT 法により各遺伝子の mRNA 発現量を定量した。

4. 研究成果

- (1) サブコンジェニック系統と B6 系統間の

F2 交雑群の作製

4 種類のサブコンジュニック系統をそれぞれ B6 と交配して F2 世代を生産し、得られたそれぞれの F2 個体のマイクロサテライトと PCR-RFLP マーカーの遺伝子型を決定した。その結果、組換え個体を除いた各交配群における 3 種類のディプロタイプをもつ F2 個体数は最終的に 93 個体から 236 個体となった。

(2) F2 個体の表現型の解析

上記(1)で得られた F2 個体を用いた表現型解析の結果、体重と体重増加量に関わる *Pbwg1.12* QTL が 3.8 Mb の、全長に関与する *Pbwg1.13* が 8.0 Mb のゲノム領域内に存在することを明らかにした。面白いことに、両 QTLs とともに小型の野生マウス由来の対立遺伝子が体重並びに体長を増加させた。一方、腹腔内白色脂肪組織重量に関与する *Pbwg1.15* は 2.1 Mb のゲノム領域内に存在し、野生マウス由来の対立遺伝子が脂肪組織重量を減少させた。しかし、今回の解析では、いずれの QTLs についても雑種強勢効果は確認できなかった。

(3) バイオインフォマティクス解析

マウスのレファレンス配列 (RefSeq mm9) にしたがうと、体重に関わる *Pbwg1.12* が存在する 3.8 Mb のゲノム領域内には 11 個の遺伝子が存在した。Endeavour により、*Gcg* と *Grb14* が *Pbwg1.12* のトップ 2 の候補遺伝子として選定された。エクソーム解析により、これらの候補遺伝子内には 1-2 個の非同義置換が発見されたが、SIFT と PolyPhen-2 を用いた解析により、これらの非同義置換はいずれもタンパク質の高次構造等の異常に関わらないことが示唆された。

同様に、白色脂肪組織重量に関わる *Pbwg1.15* が存在する 2.1 Mb 領域内には 12 個の遺伝子が存在した。Endeavour により、*Ly75* と *Itgb6* が *Pbwg1.15* のトップ 2 の候補遺伝子として選定された。*Ly75* は 9 個の非同義置換をもつが、SIFT と PolyPhen-2 を用いた解析により、これらの非同義置換はいずれもタンパク質の高次構造等の異常に関わらないことが示唆された。一方、*Itgb6* は 3 個の非同義置換をもつ。PolyPhen-2 ではいずれの非同義置換もタンパク質の高次構造等の異常に関与しないことが示唆された。しかし、SIFT では、1 つの非同義置換 (302 番目の Ser から Ala へのアミノ産置換) が有害であることが示唆された。

(4) mRNA-seq 解析

各ディプロタイプのマウス 1 個体から肝臓と白色脂肪組織を採取し、総 RNA を抽出して次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を行った結果、B6/B6 ディ

プロタイプに対して 2 倍以上または 0.5 倍以下の遺伝子発現量の差異が見られたものは、肝臓で 8 個、白色脂肪組織で 10 個、そのうち両組織に共通するものは 2 個あった。これらの遺伝子には、上述した 4 つの遺伝子のうち、*Gcg* を除いた 3 つの候補遺伝子が含まれていた。

(5) リアルタイム PCR 解析

上記(4)で発見した合計 16 個の遺伝子について、F2 世代の各ディプロタイプ 5 個体ずつを用いて、リアルタイム PCR 解析を行った。その結果、発現量の差異が確認できた遺伝子の数は、肝臓で 4 個、白色脂肪組織で 3 個であった。その内、1 個は両組織に共通していた。

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 27 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 3 件)

Ishikawa, A., and Okuno, S., Fine mapping and candidate gene search of quantitative trait loci for growth and obesity using mouse intersubspecific subcongenic intercrosses and exome sequencing, PLoS ONE, 査読有、9 巻、2014、e113233

Ishikawa, A., Wild mice as bountiful resources of novel genetic variants for quantitative traits, Current Genomics, 査読有、14 巻、2013、225-229
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

[学会発表](計 9 件)

石川 明、ノックアウトマウスを用いた量的形質遺伝子(QTG)の同定法、名古屋大学動物実験支援センター第 1 回セミナー、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集、招待講演、2015 年 9 月 29 日、名古屋大学動物実験支援センター(名古屋)

石川 明、因果推論テストによるマウス白色脂肪組織重量 QTL の候補遺伝子の絞り込み、日本畜産学会第 121 回大会、2016 年 3 月 27-30 日、日本獣医生命科学大学(東京都武蔵野市)

石川 明、トランスクリプトーム解析によるマウス成長関連形質 QTL の候補遺伝子の探索、第 62 回日本実験動物学会総会、2015 年 5 月 28-30 日、京都テルサ(京

都市)

石川 明、マウス成長関連形質 QTL の候補遺伝子の探索：白色脂肪組織におけるトランスクリプトーム解析、日本畜産学会第 119 回大会、2015 年 3 月 27-30 日、宇都宮大学（宇都宮市）

Ishikawa, A., Using Next-generation sequencing to identify candidate genes for QTLs affecting body weight and fat weight in the mouse, The 10th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 2014 年 8 月 17-22 日、West Bayshore Conference Center (Vancouver)

石川 明、マウス成長関連形質 QTL の候補遺伝子の探索：RT-qPCR 解析による肝臓 RNA-seq 解析結果の確認、日本畜産学会第 118 回大会、2014 年 3 月 27-29 日、つくば国際会議場（つくば市）

石川 明、ポスト QTL 解析時代における QTG 研究の一例、第 7 回 JAB (Japanese Avian Bioresource Project Research Center) 特別セミナー、招待講演、2014 年 1 月 21 日、広島大学（東広島市）

石川 明、マウス成長関連形質 QTL が存在するコンジェニック領域のエクソーム解析、日本畜産学会第 117 回大会、2013 年 9 月 9-10 日、新潟大学（新潟市）

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）

〔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

なし