

平成 30 年 4 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15025

研究課題名(和文) Indel マーカーの開発による家畜ウシの遺伝子流入の新たな推定法の確立と起源解明

研究課題名(英文) Development of Indel markers and the estimation of gene flow and admixture in cattle

研究代表者

万年 英之 (Mannen, Hideyuki)

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号：20263395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、家畜ウシにおける不可逆性 Indel 多型マーカーによる遺伝子流入の新たな推定法を確立し、家畜ウシ2亜種の家畜化初期における遺伝子流入の可能性と交雑程度を推定する。インド系ウシ3頭を用いた全ゲノムリシーケンスを実施し、50bp以上の Indel 長かつ各常染色体から合計58のマーカーを開発した。これらの Indel のうち、43 Indel で変異が認められた。この変異の分布を詳細に調査したところ、北方系ウシでは比較的変異が固定しているが、インド系ウシでは亜種内で変異を持つ割合が高いことが示され、インド系ウシにおいて家畜化の初期段階で北方系ウシとの遺伝的混在があったことを示唆していた。

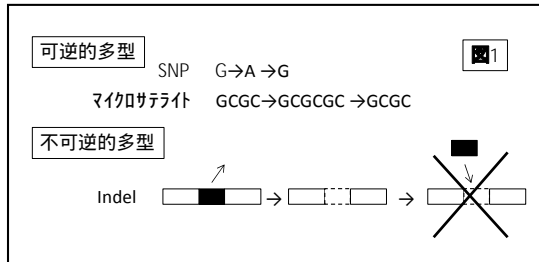
研究成果の概要(英文)：Aims of this study are development of Indel markers and estimation of gene flow and admixture in cattle. After we carried out whole genome resequencing for zebu cattle, we developed 58 Indel markers. We performed population analysis for *Bos taurus* and *Bos indicus* populations using these markers. The results showed that *Bos indicus* have had gene flow and genetic admixture from *Bos taurus* in early domestication period.

研究分野：動物遺伝育種学

キーワード：ウシ Indel 起源 遺伝的流入 遺伝的混在

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、様々な DNA マーカーを用い、アジアにおける北方系ウシの起源や野生原種からの遺伝子流入、インド系ウシの家畜化センター、日本在来牛の由来と起源について、分子遺伝学的証拠を示してきた。常染色体ゲノムの解析は、マイクロサテライトや SNP マーカーが主流であるが、これらマイクロサテライトや SNP マーカーの多型は高度の可逆性を有する (図 1)。



多型の可逆性とは、SNP の場合では G → A → G や、マイクロサテライトでは 10 回反復 → 12 回反復 → 10 回反復のように、対立遺伝子に生じた突然変異が祖先型に戻る場合や、全く異なる分岐系統において同型の対立遺伝子が生じることを意味している。これら可逆性 DNA マーカーを用いた場合、起源や系統・品種間の交雑程度、特に遺伝子流入を推定する際には、間違った結果を導く可能性が少なからず存在することに気が付いた。

家畜ウシは数十万年前に分岐した北方系とインド系の 2 亜種に分類される。我々は長年にわたる家畜ウシの分子系統学的研究から、純粋な北方系ウシではインド系ウシの特異的アレルが観察されないが、純粋なインド系ウシでは北方系ウシ由来と考えられる特異的アレルがしばしば観察されることを見出した。このインド系ウシで観察される北方系特異的アレル、およびインド系ウシの家畜化が北方系ウシよりも 2-3 千年遅いことなどから、インド系ウシの家畜化初期には、北方系ウシの遺伝的流入があったとする仮説を立てた。しかしこの仮説の検証には、これまでに利用できる可逆性を有する遺伝的マーカーの解析からは不可能であった。

2. 研究の目的

これまで、家畜における類縁関係や系統関係の推定には、可逆性を有する DNA マーカーが使われてきた。21 世紀に入り、ヒトを始めとする様々な生物種で全ゲノム塩基配列の決定が進み、膨大な数の一塩基多型 (SNP) が検出され、数万以上の SNP が一度の分析で検出可能な高密度 SNP アレイが開発された。その結果、家畜における DNA 多型を用いた分子系統解析では、解析する SNP の数が多いほど良いとする風潮が生まれ、その弱点についてはほとんど議論されてこなかった。

その一つが DNA 多型の可逆性であり、こ

の可逆性が生み出す進化や分岐過程の矛盾は誤差として片づけられてきた。一般的な系統解析の場合には、この誤差は大きな問題にはならない。しかし、家畜化初期や品種造成時における別系統からの遺伝子流入を評価する場合には、それが別系統からの遺伝流入なのか、可逆性マーカーから生じた誤差なのか判断できなくなる欠点がある。

この問題に対し我々は、このような遺伝子流入を評価するには不可逆性多型に基づく解析が必須であると考えた。そのような不可逆性多型としては、比較的大きな (20bp ~ 数千 bp) 挿入・欠失 (Indel) による多型が最適であると考え着いた (図 1)。このような Indel 多型は、偶然に起こる可逆性変異の可能性がほとんどないため、家畜の系統や品種の遺伝子流入、交雑程度を推定するために最も適している (図 2)。

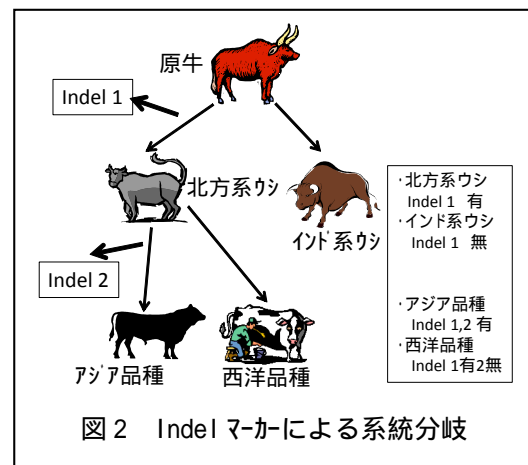


図 2 Indel マーカーによる系統分岐

加えて本研究課題は、Indel 多型マーカーの開発にとどまらず、ウシの家畜化における新たな仮説を検証する期待から始まっている。それは、数十万年前に分岐した北方系ウシとインド系ウシ 2 亜種の家畜化初期における遺伝子流入の可能性の検証である。この仮説も、我々がユーラシア大陸全域の家畜ウシに対する分析結果から得たものであり、インド系ウシで北方系ウシの特異的アレルが度々観察されることに起点を発している。

本課題の Indel マーカーは、このようなウシの系統間の交雑程度や遺伝子流入の推定に適していると考え、ウシの 2 亜種間の家畜化初期の混雑があったのかについて推定を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 供試動物

本研究では *Bos taurus* に属する、ブラックアンガス、ヘレフォード、日本ホルスタイン、韓牛、黒毛和種、モンゴル在来牛、カザフスタン在来牛、また、*Bos indicus* に属する、ラオス在来牛、カンボジア在来牛、ブータン在来牛、バングラデシュ在来牛を供試動物として用いた。内訳としてそれぞれの品種・在来牛において各 30 頭、ヘレフォード

のみ 27 頭の計 327 頭のゲノム DNA サンプルを供試した。ホルスタインは鳥取県、岩手県、北海道より各 10 頭のゲノム DNA を用いた。黒毛和種は和牛データベース構築のために用いる全国の種雄牛の精液サンプルを用いた。モンゴル、カザフスタン、ラオス、カンボジア、ブータンおよびバングラデシュの在来牛は現地よりゲノム DNA を得た。カンボジア在来牛は山岳地帯で飼育されている 15 頭、平野地帯で飼育されている 15 頭のゲノム DNA を用いた。バングラデシュ在来牛は、ハリアナ品種から 15 頭、それ以外の個体から 15 頭のゲノム DNA を用いた。

(2) データベースおよびリシーケンスデータからの Indel 多型の抽出

NCBI dbSNP より *Bos taurus* (UMD 3.1) のゲノム情報をもとに、29 常染色体からおおよそ均等な間隔で 100 箇所 of Indel 多型を検出した。このとき、どの常染色体領域でも多数検出できる大きさの 20-40bp の Indel 多型に限定し、これらの多型を含むようにプライマーを設計した。設計した 100 箇所のプライマー情報を表 1 に示す。そして 100 箇所の Indel 多型のうち、各常染色体 (29 箇所) からランダムに 1 つずつの Indel 多型を選択し (表 1、* 印)、PCR 増幅させ、アガロースゲル電気泳動でバンドを確認した。このとき鮮明なバンドが見える Indel 多型を優先的に選択し、最も鮮明に見えた 8 箇所の Indel 多型を本研究で用いる Indel マーカーとした。

(3) 遺伝的解析

遺伝子型判定の結果より、各集団のマーカー毎にアレル頻度を計算し、ARLEQUIN3.5.2.2 を用いて、遺伝的多様性指標の一つでもあるヘテロ接合度の実測値 (H_o) および期待値 (H_e) を出力し、ハーディ・ワインベルグ平衡 (HWE) 検定を行った。さらに同ソフトにより、遺伝的多様性の程度を示す Average gene diversity over loci を算出した。

PhyIip-3.695 を用いて、アレル頻度をもとに Nei (1972) の遺伝距離を算出した。そしてこの遺伝距離から MEGA7.0.14 (Tamura ら、2007) によって非加重結合法で分子系統樹を構築した。さらに、Web アプリケーションツールの easy PCA によって遺伝子型判定結果から、主成分分析 (PCA) を行った。

STRUCTURE2.3.3 を用いて、8 箇所の Indel 遺伝子座の遺伝子型をもとに、祖先集団に由来する各集団の遺伝的構造および集団間の遺伝的混合を推定した。このとき分集団数を示す K は 2-11、Burn-in および MARKOV CHAIN MONTE CARLO を 50000 に設定し 10 回の独立な計算を行った。さらに結果に対する尤もらしい K を推定するために、STRUCTURE2.3.3 によって算出された対数尤度 ($\ln Pr(X|K)$) をもとに、 K の指標に従って、Structure Harvester0.6.94 によってグラフ化し、最大

値を示した K を尤もらしい分集団数として推定した。

(4) インド系ウシのリシーケンス解析と新規 Indel マーカーの開発

現在、ウシの全塩基配列の基本配列は西洋品種 (ヘレフォード) である。また、インド系ウシの塩基配列の利用は限定的であるため、インド系ウシ 3 頭を用いた全ゲノムリシーケンスを実施し、北方系ウシとインド系ウシを区分できる新規 Indel マーカーの開発を試みた。

DNA サンプルの品質は電気泳動および濃度測定により確認した。サンプルを数百 bp となるように物理的に断片化、タグ配列アダプター付加により、シーケンスの鋳型となる DNA ライブラリーを作製した。次いでイルミナ社シーケンサー HiSeq を用いて、全ゲノムリシーケンスを行った。解析は、150base 両末端解析 (1 件あたり 90Gbase 以上) を実施した。リード配列における塩基の 75% 以上が QV30 以上となるように解析を行い、得られた塩基配列を参照ゲノム配列に対してマッピングすることで変異塩基位置を検出した。

50bp 以上の Indel を対象として、マーカーを選出・精査した。これらの Indel がマーカーとして利用できるかを検討するために、インド系ウシ 8 頭、北方系ウシ 8 頭を用いて PCR 増幅と多型の有無を調査した。

4. 研究成果

(1) アレル頻度、遺伝的多様性指標の算出および HWE 検定

本研究の対象である 11 集団計 327 個体の遺伝子型判定結果をもとに 8 Indel それぞれに対してアレル頻度の算出を行った。この結果、多型が確認できた Indel マーカーは集団によって異なる結果となった。また H_e と H_o の平均値ではカザフスタン在来牛 ($H_e:0.457, H_o:0.433$) が最も高い値を示し、モンゴル在来牛やアンガス、ヘレフォードなどのヨーロッパ品種が次に高い値を示した。しかし、*Bos indicus* 集団は全体的に低い値を示した。HWE 検定では、ホルスタインの BTA4-1、アンガスの BTA2-5 と BTA4-1 の Indel マーカーにおいてボンフェローニ補正後の $p < 0.00625$ を下回り、ハーディ・ワインベルグ平衡を逸脱する結果となった。さらに多様性指標を示す Average gene diversity over loci の値もヘテロ接合度 (H_e, H_o) の値とほとんど一致する結果となった。

(2) 集団間の遺伝距離および類縁関係

各集団間の遺伝距離 (Nei's genetic distance) 及び遺伝的分化の値 (F_{st}) を算出した。遺伝距離は *Bos taurus* 集団と *Bos indicus* 集団間で高い値 (0.2025-0.5222) が観察されたが、その中でもラオス在来牛とホルスタイン間で最も高い値を示した (0.5222)。モンゴル在来牛は *Bos indicus* 集

団との遺伝距離が低く(0.2025-0.2563)、バングラデシュ在来牛との間で最も低い値を示した(0.2025)。Bos taurus 集団の中では黒毛和種と韓牛間で最も低い値(0.0204)を示し、黒毛和種とヘレフォード間で最も高い値(0.1858)を示した。一方で、Bos indicus 集団の中では、ブータン在来牛とラオス在来牛間で最も値(0.0032)が低く、ブータン在来牛とバングラデシュ在来牛間で最も高い値(0.0371)を示し、Bos taurus 集団と比較して全体的に低い値が観察された。集団間の Fst に関して、遺伝距離と同様の値を示した。

次に、算出した遺伝距離(Nei ' s genetic distance)を用いて UPGMA 法による系統樹を構築し、集団間の系統関係を推定した。UPGMA-tree より Bos indicus 集団と Bos taurus 集団間の明確な分岐が観察された。また、Bos indicus 集団は分化の程度が浅く、それぞれが集団内で近い系統関係を示した。Bos taurus では、ホルスタインとアンガスのヨーロッパ集団が同じクラスターを形成し、黒毛和種と韓牛、モンゴル在来牛が同じクラスターを形成した。さらにカザフスタン在来牛とヘレフォードが同じクラスターを形成した。

(3) 集団の主成分分析

easyPCA を用いて個体の主成分得点を算出し、集団毎の平均値をもとに主成分分析を行った。分析では第二主成分までを採用し、第一主成分(PC1)の寄与率と固有値はそれぞれ 58.3%、2.16、第二主成分(PC2)の寄与率と固有値はそれぞれ 18.2%、1.21 であった。これらの値は元の遺伝子型判定結果を十分に説明していると判断できる値であった。結果より Bos taurus 集団と Bos indicus 集団は明確に分離し、Bos indicus 集団は密接なクラスターを形成した。一方で Bos taurus 集団はやや分散するクラスターを形成する結果となり、どの集団においても密接に集合するものは見られなかった。Bos taurus 集団の中で、モンゴル在来牛とカザフスタン在来牛は中間に位置付けられ、ヘレフォードはやや独立する分布となった。

(4) 集団の遺伝的構造解析

STRUCTURE2.3.3 を用いて遺伝子型判定の結果から、牛集団における遺伝的構造の推定を行った。K=2 のとき、Bos indicus 集団と Bos taurus 集団間でほとんど明確に分かれた。モンゴル在来牛、カザフスタン在来牛、韓牛、黒毛和種、ヘレフォードでは Bos indicus で大半を占める構造を持つ個体もいくつか観察された。一方で、カンボジア在来牛やブータン在来牛では Bos taurus で大半を占める構造を持つ個体がいくつか確認された。K=3 では Bos indicus 集団と Bos taurus 集団に分かれ、さらに Bos taurus 集団では、ホルスタイン、アンガス、ヘレフォードのヨーロッパ品種とそれ以外に分かれた。その中でも、モンゴル在来牛とカザフスタン在来牛は韓

牛、黒毛和種とホルスタイン、アンガス、ヘレフォードの中間の混在を示す遺伝構成が観察された。

さらに STRUCTURE Harvester により、最適な K の推定を行った。結果より K の最大値(10.89)から、最適な K は K=4 と評価された。K=4 より、Bos indicus 集団とホルスタインとアンガス、黒毛和種と韓牛、ヘレフォードとモンゴル在来牛、カザフスタン在来牛の 4 つのクラスターを形成した。しかし、K=4 以降ではヘレフォードはやや独立したクラスターを形成することが示された。K=5 の時は Bos indicus の要素がモンゴル在来牛やカザフスタン在来牛、韓牛、黒毛和種など Bos taurus 集団に見られる結果となった。K=6-11 では、より詳細な混在程度が読み取れる結果となった。特に K=10、11 において細かい混在は確認できるが、Bos taurus 集団と Bos indicus 集団で大きく分かれる結果となった。K=11 では集団は独立したクラスターは形成せず、混在する結果となった。

結果として、Bos indicus 集団はほとんど独立したクラスターを形成したものの Bos taurus 集団の遺伝構造は混在する結果となった。その中でもカザフスタン在来牛やモンゴル在来牛は複数の構造を持ち、その他の Bos taurus 集団は遺伝構造の単一化が観察された。これらは地域の品種改良の程度の違いによるものであり、遺伝構造や遺伝的多様性が結果に反映されたことが考えられた。

この研究では研究報告が極めて少ない Indel マーカーを開発し、世界の家畜ウシ 11 集団の遺伝構造および系統解析、遺伝的多様性解析を行った。先行研究の結果と一致する箇所も観察されたが、異なる結果も得ることができた。このように様々な分子マーカーを用いた解析によって、新規データの蓄積や先行研究との比較が可能となり、遺伝構造や系統・類縁関係、遺伝的多様性を包括的に考察することができる。本研究結果も今までの研究結果に付加することで、今後の研究への応用が期待でき、データの蓄積が世界の遺伝資源の保護に繋がるだろう。

(5) インド系ウシのリシーケンス解析と新規 Indel マーカーの開発

現在、ウシの全塩基配列の基本配列は西洋品種(ヘレフォード)である。インド系ウシの塩基配列の利用は限定的であるため、インド系ウシ 3 頭を用いた全ゲノムリシーケンスを実施し、その後北方系ウシ(ヘレフォード)のレファレンス配列と比較した変異解析を行った。

変異解析の結果、得られた変異は約 3800 万であり、そのうち Indel 変異は 380 万であった。50bp 以上の Indel 長に加え、インド系ウシと北方系ウシで差のある変異を選出したところ、967 Indel が検出された。その中で、反復配列や AGTC 比率の偏った配列を除き、265 の Indel マーカー候補を得た。

この候補マーカーの中から、各常染色体から2つずつ選出しマーカーとして供した。これらのIndelがマーカーとして利用できるかを検討するために、インド系ウシ8頭、北方系ウシ8頭を用いてPCR増幅と多型の有無を調査した。

その結果、48 Indel マーカーでPCR増幅が認められ、43 Indel で変異が認められた。この変異の分布を詳細に調査したところ、北方系ウシでは比較的変異が固定しているが、インド系ウシでは亜種内で変異を持つ割合が高いことが示された。これら2亜種の祖先は33万年前に分岐したことが示唆されているが、変異分布にばらつきがあることは、インド系ウシにおいて家畜化の初期段階で北方系ウシとの遺伝的混在があったことを示唆していた。

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)

Mannen H, Yonesaka R, Noda A, Shimogiri T, Ohima I, Katahira K, Kanemaki M, Kunieda T, Inayoshi Y, Mukai F, Sasazaki S. Low mitochondrial DNA diversity of Japanese Polled and Kuchinoshima feral cattle. *Anim. Sci. J.* 査読有、88(5):739-744. 2017. DOI: 10.1111/asj.12716.

Kawaguchi F, Kitamura Y, Nakajima R, Takahashi M, Goto H, Washida Y, Yamamoto Y, Sasazaki S, Mannen H. Application of DNA markers for discrimination between Japanese and Australian Wagyu beef. *Anim. Sci. J.* 査読有、89(1): 257-258. 2018. DOI: 10.1111/asj.12938.

Noda A, Yonesaka R, Sasazaki S, Mannen H. The mtDNA Haplogroup P of Modern Asian Cattle: a Genetic Legacy of Asian Aurochs? *PLoS One*, 査読有、13(1):e0190937. 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0190937.

[学会発表](計 4 件)

Noda A, Sasazaki S, Mannen H. Genetic diversity and origin of mtDNA haplogroup P observed in Japanese Shorthorn. 35th International Society for Animal Genetics Conference. 7. 23-29. 2016. Salt Lake City (U.S.A.).
Yamanaka H, Sasazaki S, Lwin M, Moe H, Shimogiri T, Mannen H. Genetic structure and relationships among 11 cattle populations using indel markers. 36th International Society for Animal Genetics Conference. 7. 16-23. 2017. Dublin (Ireland).

Tabata R, Sasazaki S, Bakhtin M, Kazymbet P, Alyan M, Suleimenov M, Nishibori M, Mannen H. Phylogenetic analysis of Kazakhstani goats using mtDNA HV1 and SRY gene sequences. 36th International Society for Animal Genetics Conference. 7. 16-23. 2017. Dublin (Ireland).

山中颯・笹崎晋史・Hla Hla Moe・Moe Lwin・下桐猛・万年英之. Indel マーカーを用いた家畜ウシ 11 集団に対する遺伝的構造および系統解析. 第 67 回関西畜産学会大会, 9 月 18-19 日, 大阪府立大学 (大阪).

[図書](計 1 件)

万年英之 他, 朝倉書店, 動物育種のこれから, 動物遺伝育種学, pp.189-196. 2017.

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

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

下桐 猛 (SHIMOIRI, Takeshi)
鹿児島大学・農学部・准教授
研究者番号: 40315403