

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08051

研究課題名(和文) 肥育中組織を用いた発現量解析による脂肪交雑責任遺伝子の探索

研究課題名(英文) Search for responsible genes for beef marbling with gene expression analysis using tissues from fattening cattle

研究代表者

平野 貴 (HIRANO, Takashi)

東京農業大学・農学部・教授

研究者番号：50605087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：黒毛和種の脂肪交雑QTLであるMarbling-2のQ型とnon-Q型個体から肥育期間中に採取した最長筋組織における遺伝子発現をRNA-Seqにより分析した。Qとnon-Q型間、脂肪交雑が異なるnon-Q型個体間で発現量が異なる遺伝子を探索し、脂肪交雑関連遺伝子の同定を試みた。しかし、枝肉重量との関連はみられたが、脂肪交雑との関連はみられなかった。さらに、最長筋で発現している遺伝子のうち、ビタミンA(VA)取り込みに機能するSTRA6について解析し、アミノ酸置換SNPが脂肪交雑と関連することが示された。この多型はVA輸送孔近傍に位置し、VA輸送に影響することで脂肪交雑に関連すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

黒毛和種は脂肪交雑に優れた品種であり、脂肪交雑形成メカニズムは不明な点が多いことから、それに関わる遺伝子の特定は重要である。肥育期間中のVA給与制限は脂肪交雑を高めるとされているが、輸送されたVAを細胞が取り込む際に機能するSTRA6の多型が脂肪交雑と関連することはそれを支持している。また、検出された関連する多型は、脂肪交雑マーカーとしての利用も可能である。

研究成果の概要(英文)：It was attempted that a marbling gene was searched using longissimus muscle tissues from every three individuals of Q and non-Q type in Marbling-2, which was QTL for marbling in Japanese Black cattle. The expression analysis in these tissues was performed with RNA-Seq. Genes were searched that expression differences were detected between Q and non-Q types, and between non-Q type individuals with different marbling score. In the genes, polymorphisms were searched and performed an association analysis with carcass traits, it was found to associate with carcass weight, but not to marbling. Furthermore, from genes expressed in the longissimus muscle tissues, to detect a marbling gene, polymorphisms of STRA6, that function in vitamin A (VA) uptake, were searched and performed an association analysis. An amino acid-substituted SNP was associated with marbling. The SNP was located near the VA transport pore and it was suggested that the SNP is involved in marbling by affecting VA transport.

研究分野：農学

キーワード：脂肪交雑 遺伝子 発現 最長筋 ビタミンA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

黒毛和種は脂肪交雑に優れた品種であり、脂肪交雑形成に關与する遺伝子を特定することは、効率的な個体選抜が可能になるとともに、脂肪交雑形成メカニズムの解明が進み、肥育技術向上にも繋がること期待される。

Marbling-2 は、黒毛和種特定種雄牛 A の父方半きょうだい家系を用いて検出されたウシ第 7 番染色体 (BTA7) 上の脂肪交雑に關する量的形質遺伝子座 (QTL) であり、BTA7 のより狭い領域 (2.9 cM : 約 4.6 Mb) に特定されている (Hirano *et al.* 2007)。また、この Q 型は後代においても有効性が示されている。黒毛和種では、この *Marbling-2* を含む有意性の高い ($p < 0.001$) 脂肪交雑 QTL が 12 か所報告されているが、明確な責任遺伝子は特定されていない。

さらに、種雄牛 A の去勢産子から、種雄牛 A の Q 型 *Marbling-2* を遺伝した 3 頭と non-Q 型を遺伝した 3 頭を選抜し、同時期、同一農家、同じ飼料の同条件下で肥育し、この肥育前の導入期から肥育期間中にかけて 2 ヶ月間隔でバイオプシーにて最長筋組織を採取した。肥育後の平均脂肪交雑値は Q 型が高い値を示し、non-Q 型の 1 頭は Q 型と同等の値を示した。黒毛和種はビタミン A (VA) 給与を制限して肥育されるが、その脂肪交雑に対する効果は肥育前期から中期であることが報告されている。その肥育中期にあたる 20 ヶ月齢時に採取したこれら 6 頭の最長筋組織を用いて、RNA-Seq が行われていた。

2. 研究の目的

本研究では、20 ヶ月齢最長筋組織を用いて行った RNA-Seq データを用いて、(1) Q 型と non-Q 型間で発現量の異なる遺伝子を探索し、*Marbling-2* に關連する脂肪交雑遺伝子の探索を試みた。(2) non-Q 型で脂肪交雑が高い個体と、それ以外の個体間で発現量が異なる遺伝子を探索し、*Marbling-2* 關連とは異なる脂肪交雑遺伝子の探索を試みた。(3) 最長筋組織で発現している遺伝子で候補遺伝子を探索し、脂肪交雑遺伝子の探索を試みた。

3. 研究の方法

(1) Q 型と non-Q 型間の発現量解析

RNA-Seq データを Q 型 3 頭と non-Q 型 3 頭間で解析した。発現量が 2 倍以上異なる遺伝子を選抜し、定量的 RT-PCR を行った。定量的 RT-PCR は SYBR Green 法で行い、コントロールには GAPDH を用いた。定量的 RT-PCR によって、発現量に有意差または有意傾向が認められた遺伝子について、機能や遺伝子ネットワークなどをデータベース解析した。*Marbling-2* との關連が予測される遺伝子について、肥育導入から肥育期間中まで (9 ヶ月齢~26 ヶ月齢) の最長筋組織における発現変動を定量的 RT-PCR で調べた。各個体の採取した全最長筋組織から total RNA は TRIzol を用いて抽出した。また、cDNA は random primer (9 mer) を用いて合成した。

(2) 異なる脂肪交雑を示す non-Q 型個体間の発現量

Marbling-2 關連とは異なる脂肪交雑遺伝子を探索するために、non-Q 型 3 頭において、Q 型個体と同等の高い脂肪交雑を示した 1 頭と低い値を示した 2 頭間で RNA-Seq データを解析した。発現量が 1.5 倍以上異なる遺伝子について機能や染色体位置などを調査した。遺伝子機能が脂肪交雑に關連すると考えられ、しかも、黒毛和種の脂肪交雑 QTL 近傍に位置する遺伝子を探索した。その遺伝子の多型を探索し、黒毛和種一般去勢肥育牛集団を用いて各種枝肉形質との關連を解析した。

(3) 最長筋で発現する候補遺伝子の解析

黒毛和種の肥育は脂肪交雑を高めるために VA 給与を制限して行われる。また、VA は脂肪細胞分化を抑制することが示されている。そこで、RNA-Seq データに含まれる遺伝子から、VA 取り込みに機能する細胞膜タンパクの *STRA6* を候補として選抜した。*STRA6* の多型を探索し、黒毛和種一般去勢肥育牛集団を用いて各種枝肉形質との關連を解析した。

4. 研究成果

(1) Q 型と non-Q 型間の発現量解析

RNA-Seq データの解析により、Q 型と non-Q 型間で発現量が有意に 2 倍以上異なる遺伝子が 26 個検出された。これら発現量差を再確認するために、これら 26 遺伝子について定量的 RT-PCR を行ったところ、13 個の遺伝子で正常な増幅が確認され、20 ヶ月齢時の最長筋で発現していることが示唆された。Q 型 3 個体と non-Q 型 3 個体間で有意差 ($p < 0.05$) が検出された遺伝子は 4 遺伝子 ($Q > non-Q$: 1 遺伝子、 $Q < non-Q$: 3 遺伝子) であり、有意傾向 ($p < 0.1$) であったものは 2 遺伝子 ($Q > non-Q$: 1 遺伝子、 $Q < non-Q$: 1 遺伝子) であった。 $Q < non-Q$ で有意傾向の 1 遺伝子は、WNT signaling pathway を抑制する遺伝子であり、脂肪細胞分化に關係することが示唆され、霜降り形成に關わる可能性が考えられた。また、その遺伝子の発現に *Marbling-2* 領域に位置する遺伝子が關係する可能性も考えられた。そこで、肥育導入期から肥育期間中 (9 ヶ月齢

～26ヶ月齢)における発現変動を調べたところ、肥育導入期(9ヶ月齢)で有意差が検出されたが、肥育期間中にQ型とnon-Q型間で大きな差を示す時期は検出されなかった。9ヶ月齢で検出された発現量差は、20ヶ月齢時とは逆のQ<non-Qであった。また、Q型3頭と同等の脂肪交雑を示すnon-Q型個体は、他のnon-Q型2頭に比べ、肥育前期～中期で発現量が低かった。肥育前期～中期はVA給与制限の効果が現れる時期であり、脂肪交雑形成に関わる可能性が考えられたため、この遺伝子の多型をダイレクトシーケンスにより探索したが関連する多型は検出されなかった。

(2) 異なる脂肪交雑を示すnon-Q型個体間の発現量

non-Q型の1頭は他の2頭よりも脂肪交雑が高くQ型個体と同等の値を示したため、これら1頭と2頭間でRNA-Seqデータを再解析し、*Marbling-2*関連とは異なる脂肪交雑遺伝子の探索も試みたところ、有意に発現量が異なり($P<0.05$)、報告されている黒毛和種の脂肪交雑QTLの近傍に位置し、しかも、ノックアウトマウスで除脂肪体重が増加することが示されている*MOXD1*が検出された。そこで、*MOXD1*と各種枝肉形質の関連を調べるために、コード領域に位置するSNPを黒毛和種SNPデータ(平野ら2013)により探索したところ、c.765C>Tとc.1536G>T(いずれも同義置換)が検出された。これらSNPsを枝肉市場で収集された肥育去勢牛集団260頭について、ダイレクトシーケンスで型判定したところ、新たにc.1546C>T($p.R516^*$)が検出された。これら3SNPsによる遺伝子型をPHASEで予測したところ、4種の対立遺伝子が検出された。これら対立遺伝子間で各種枝肉形質の平均値差を解析したところ、枝肉重量と関連する可能性が示された($p=0.07$)が、脂肪交雑と関連は示さなかった。c.1546C>Tはナンセンス変異であるが、R516*は全ての機能的ドメインよりもC末端側に位置し、正常に成長した肥育去勢牛集団でT/T型個体が検出されたことから、アミノ酸置換のタンパク機能への影響は小さいと思われる。

(3) 最長筋で発現する候補遺伝子の解析

黒毛和種の肥育は脂肪交雑を高めるためにVA給与を制限して行われる。また、VAは脂肪細胞分化を抑制することが示されている。そこで、RNA-Seqデータに含まれる遺伝子は最長筋で発現していると考え、VA取り込みを促進する細胞膜受容体の*STRA6*を候補として、RNA-Seqに含まれる遺伝子から選抜した。黒毛和種における*STRA6*の多型をダイレクトシーケンスにより探索したところ、7種のSNPsが検出された。これらのうち、アミノ酸置換を伴うものはc.866A>G($p.Q289R$)のみであった。また、p.Q289RはPolyPhen-2によってタンパク機能に重大な影響を与えないと判定された。

このSNPの型判定を肥育去勢牛集団1,235頭についてダイレクトシーケンスで行ったところ、遺伝子型頻度とアレル頻度はA/A型:0.06、A/G型:0.36、G/G型:0.58、Aアレル:0.24、Gアレル:0.76であった。これら遺伝子型間で各種枝肉形質の平均値差を解析したところ、G/G型の脂肪交雑(5.88 ± 0.07)がA/G型(5.60 ± 0.09)とA/A型(5.46 ± 0.20)よりも有意に高いことが示された($p<0.05$)。さらに、個体間の遺伝的背景をなるべく均等にするために、1,235頭からA/A型個体とその半きょうだい個体を選抜し($n=150$)、改めて脂肪交雑との関連を解析したところ、同様にG/G型が他の遺伝子型よりも有意に高いことが示された($p=0.05$)。STRA6 p.Q289RはVA輸送孔周辺に位置し、アミノ酸置換がVA輸送を妨げることが示されているアミノ酸残基に隣接している。このことから、c.866A>G($p.Q289R$)はウシの生理機能を著しく損なわない範囲でSTRA6の機能を低下させ、脂肪細胞分化を促進させることで脂肪交雑形成を向上させることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 佐藤 真子、原 ひろみ、半澤 恵、平野 貴	4. 巻 -
2. 論文標題 STRA6多型と黒毛和種枝肉形質との関連	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 動物遺伝育種研究	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平野貴、石毛太郎、原ひろみ、半澤恵
2. 発表標題 肥育中組織を用いた発現量解析による脂肪交雑関連遺伝子の探索
3. 学会等名 日本動物遺伝育種学会第20回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤真子、平野貴、原ひろみ、半澤恵
2. 発表標題 黒毛和種におけるSTRA6遺伝子多型と枝肉形質の関連解析
3. 学会等名 日本動物遺伝育種学会第20回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平野貴、石毛太郎、原ひろみ、半澤恵
2. 発表標題 肥育中組織を用いた発現量解析による脂肪交雑責任遺伝子の探索
3. 学会等名 日本動物遺伝育種学会第19回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----