

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K08057

研究課題名(和文)高免疫豚判別法の開発と商用集団における有効性の検証

研究課題名(英文)Development of method for identifying immune competent pigs and validation of the efficacy in commercial pig population

研究代表者

新開 浩樹(Shinkai, Hiroki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・上級研究員

研究者番号：30502687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：豚の免疫能選抜により生じた遺伝的变化を明らかにするために、選抜群及び非選抜群間で遺伝子発現とプロモーター多型の比較を行った。マイクロアレイ解析により、両豚群のマクロファージ間でリポドA刺激後の発現に差がある30個の免疫系遺伝子を同定した。プロモーター多型解析により、リボヌクレアーゼLをコードするRNASEL遺伝子に両豚群それぞれに優勢なプロモーター型があることを明らかにした。多型と形質との関連解析により、選抜群に優勢なRNASEL遺伝子プロモーター型に白血球貪食能を亢進させる効果があることを明らかにした。これらの結果は、当該プロモーター型をDNAマーカーとした豚抗病性改良の可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

養豚業において、肺炎・下痢等の慢性感染症や豚熱・口蹄疫のような新興・再興感染症は経営を圧迫する主要な要因である。また、その予防及び治療に使用される大量の抗菌薬は薬剤耐性菌の出現リスクとなり、将来的に人類の健康の脅威となることが予想される。我々は、豚が本来持つ免疫能力を高めることで、抗菌薬やワクチンに過度に依存しない健全な養豚経営の実現を目指している。本研究では、豚のゲノム及びマクロファージの解析により、白血球貪食能を亢進させる効果のある遺伝子多型を発見した。当該多型をDNAマーカーとして種豚選抜と肉豚生産を行うことで、養豚現場における感染症被害の軽減と衛生経費の削減に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To identify the genetic changes caused by the immune selection based on phagocytic activity (PA), capacity of alternative complement pathway, and antibody response after vaccination, we compared gene expression and polymorphisms in the promoter region between pigs subjected to the immune selection and those that were not. After lipid A stimulation, Microarray analysis revealed that 30 genes related to immune function showed a difference in expression between macrophages derived from each pig group. Polymorphic analysis of the promoter region of these genes elucidated the predominant promoter-types in the immune-selected and non-selected pigs, respectively, in the genes encoding ribonuclease L (RNASEL). Association analysis between these promoter genotypes and the immune phenotypes revealed that the immune-selected promoter-type in RNASEL was associated with increased PA. These results indicate the possibility of improving disease resistance using RNASEL promoter-type as a DNA marker.

研究分野：ゲノム生物学 分子細胞生物学

キーワード：ブタ 感染症 抗病性 免疫 選抜 育種 遺伝子多型 プロモーター

## 1. 研究開始当初の背景

豚の育種は、これまで形質の表現型値を用いた統計遺伝学的手法により行われており、測定が比較的容易な肉質等の生産形質に関しては大きな成果が得られているが、測定自体あるいは重症度の判定等が困難な疾病に関する形質では、遺伝的改良の取組は大きく遅れている。養豚現場において、肺炎・下痢等の感染症は慢性的に流行しており、豚熱・口蹄疫のような新興・再興感染症も度々大きな社会問題となる。また、これらの予防及び治療のために大量の抗菌薬が使用されているが、養豚での使用量が人も含めた動物全体の中で大部分を占めており、薬剤耐性菌出現リスクの大きな要因となっている。以上のことから、豚抗病性の遺伝的改良は喫緊の課題であり、抗菌薬やワクチンに過度に依存しない健全な養豚経営の実現のために必要不可欠である。

## 2. 研究の目的

我々の研究グループでは、以前、大ヨークシャー種を対象として血液サンプルから比較的容易に測定可能な白血球貪食能、補体代替経路活性、豚丹毒ワクチン接種後の特異的抗体価を測定し、これらの育種価を指標とした6世代に渡る選抜を行い、高免疫能豚を作出した。本研究は、高免疫能豚に生じた遺伝的変化を明らかにすることで、免疫能選抜の生物学的効果を解明し、豚抗病性の遺伝的改良に利用可能なDNAマーカーの開発に繋げることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験豚について

日本ハム株式会社で飼養されている大ヨークシャー種の一般豚を「非選抜群」、これを基礎豚として6世代に渡る免疫能選抜を行った豚を「免疫能選抜群」と定義して、採血やゲノムDNA抽出のための実験豚とした。選抜第3世代目の豚を、遺伝子型と形質値との関連解析に用いた。

### (2) 末梢血からのマクロファージの培養

免疫能選抜群及び非選抜群それぞれ同腹4頭ずつの豚から、抗凝固剤入り採血管を用いて採血を行った。フィーダー細胞(ブタ腎臓上皮細胞)をMG培地(DMEM、10%ウシ胎子血清、10 $\mu$ g/mlインシュリン、100 $\mu$ Mメルカプトエタノール、50U/mlペニシリン、50 $\mu$ g/mlストレプトマイシン)で増殖させておいたT75フラスコに血液を添加し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター(37 $^{\circ}$ C)で培養した。翌日にPBSで3回洗浄してマクロファージ以外の付着していない血液成分を除いた後、MG培地を添加して培養を継続した。3日おきに培地交換を行い、約2週間でマクロファージが培地中に活発に増殖してきた。培地の回収と追加を繰り返すことにより培養を継続し、回収したマクロファージを以下の実験に供した。

### (3) マイクロアレイによる遺伝子発現解析

上記方法により準備したマクロファージを、24-well細胞培養プレートに1 $\times$ 10<sup>6</sup>個ずつ分注し(8頭 $\times$ 2-well)MG培地(無刺激)又は10ng/mlリポドAで4時間刺激した。マクロファージを遠心分離により回収し、RNeasy Mini Kit(QIAGEN)を用いてtotal RNAを抽出した。無刺激及び刺激サンプルからのtotal RNA(400ng)を、それぞれCy3及びCy5で標識し、当研究室でプローブ設計を行ったDNAマイクロアレイ(Agilent)に対してハイブリダイズさせた後、蛍光シグナルを検出した。免疫能選抜及び非選抜群間でリポドA刺激後の発現に3倍以上の差があるプローブ(遺伝子)を抽出し、Gene Ontology(GO)で免疫に関わるとされる遺伝子(GO:0002376)のみを解析対象とした。

### (4) プロモーター領域の多型解析

免疫能選抜及び非選抜群間で発現に差が見られた遺伝子について、転写開始点上流5kbの領域にプライマーを設計し、次世代シーケンサー(Ion PGM、Life Technologies)を用いたターゲットリシーケンスにより塩基配列を解読した。両豚群それぞれ10頭ずつのゲノムDNAを解析対象とし、得られた塩基配列を比較することで一塩基多型(SNP)及び挿入/欠失(Indel)を検出した。Arlequin 3.5 softwareを用いて、これらの多型により構成されるハプロタイプを推定し、<sup>2</sup>独立性の検定により豚群間での分布の偏りについて検定した。

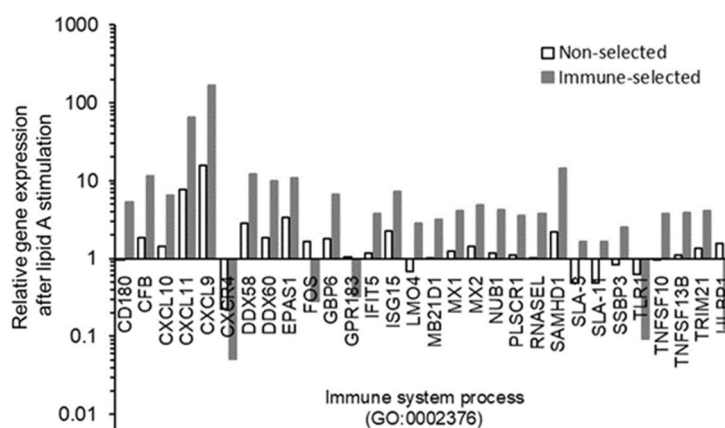
### (5) プロモーター型と免疫形質との関連解析

免疫能選抜第3世代目の豚220頭のデータを解析に用いた。対象遺伝子のプロモーター型を区別できるSNPを挟むようにプライマーセットを設計し、AmpliTaq Gold polymerase(Thermo Fisher Scientific)を用いてPCRを行った。サンガーシーケンサー(ABI 3730XL Genetic Analyzer)によりPCR産物の塩基配列を解読し、複数のSNPの組み合わせによりプロモーター型を決定した。プロモーター型と免疫形質(白血球貪食能、補体代替経路活性、豚丹毒ワクチン接種後の特異的抗体価)との関連について、SPSS version 25(IBM)の一般化線形モデルにより解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 免疫能選抜及び非選抜群間での遺伝子発現の比較

免疫能選抜及び非選抜群間で、リポド A 刺激後の発現に差がある遺伝子を同定するために、両豚群それぞれ同腹 4 頭ずつの血液からマクロファージを培養増殖し、リポド A 刺激後のマクロファージから RNA を抽出してマイクロアレイ解析に供した。全 38,721 個のプロープのうち、豚群間でリポド A 刺激後の発現に有意な差があるものとして、5,794 個を同定した。同一遺伝子に複数設計されているプロープの重複を除外し、また、豚群間で発現に 3 倍以上の差があるプロープという制限を加えることにより、解析対象の絞り込みを行った。さらに、GO で免疫と関連がある (Immune system process, GO:0002376) とされる遺伝子のみを抽出して、解析対象として 30 個の遺伝子を同定した (図 1)。これらの遺伝子のほとんどで、刺激による発現の誘導/抑制の程度は非選抜群よりも選抜群で大きくなっており、免疫能選抜によりリポド A 刺激後の発現変化が増幅されたことが示された。



**図 1** 免疫能選抜及び非選抜群間でリポド A 刺激後の発現に 3 倍以上の差が見られた遺伝子  
両豚群 4 頭ずつの血液から培養したマクロファージに対してリポド A で 4 時間刺激を行い、抽出したトータル RNA をマイクロアレイに供した。無刺激サンプルにおける遺伝子発現量を 1 とした時の、刺激サンプルにおける相対発現量を示した。Gene Ontology で免疫に関わるとされる遺伝子 (GO:0002376) のみを解析対象とした。

##### (2) *RNASEL* 遺伝子プロモーター領域の多型

免疫能選抜及び非選抜群間における遺伝子発現の差の原因となる多型を同定するために、上記 30 個の遺伝子のプロモーター領域の多型の検出を試みた。ブタゲノム (Sscrofa10.2) で情報が不完全であった *PLSCR1* を除く 29 個の遺伝子の転写開始点上流 5kb にプライマーセットを作製し、両豚群それぞれ 10 頭ずつのゲノム DNA を対象にターゲットリシーケンスを行ったところ、両豚群間で分布に偏りのあるものとして、*RNASEL* で 9 個 (表 1、SNP, 7; Indel, 2)、*SAMHD1* で 6 個 (データ非表示、全て SNP)、*TRIM21* で 50 個 (データ非表示、SNP, 46; Indel, 4) の多型が検出された。これらの多型により構成されるハプロタイプは、*RNASEL* で 2 個 (表 1)、*SAMHD1* で 2 個 (データ非表示)、*TRIM21* で 4 個 (データ非表示) であることが推定され、非選抜群及び免疫能選抜群それぞれに優勢なプロモーター型 (haplotype 1 及び haplotype 2) が存在することが明らかとなった (表 1)。

**表 1** *RNASEL* 遺伝子プロモーター型の免疫能選抜及び非選抜群における頻度

Gene	Haplotype <sup>a</sup>	Position from transcription start site								Non-selected	Immune-selected	P value ( $\chi^2$ test)	
		4901 <sup>c</sup>	4851	4844	4412 <sup>d</sup>	3743	3195	2170 <sup>b</sup>	2141 <sup>b</sup>				604
<i>RNASEL</i>	1	0	T	A	0	C	C	G	T	A	18	9	0.0024
	2	1	C	G	1	T	T	C	A	G	2	11	

*RNASEL*, ribonuclease L.

<sup>a</sup> 1, predominant haplotype in non-selected pigs; 2, predominant haplotype in immune-selected pigs.

<sup>b</sup> Representative SNPs to discriminate haplotype predominant in non-selected pigs from that in immune-selected pigs.

<sup>c</sup> 0, TGCTTTGCCTCT; 1, T.

<sup>d</sup> 0, GTGCGGG; 1, G.

(3) *RNASEL* 遺伝子プロモーター型と白血球貪食能との関連

免疫能選抜群及び非選抜群それぞれに優勢なプロモーター型が、免疫能選抜の結果として生じたことを確かめるために、両豚群に優勢なプロモーター型が比較的均等に存在すると予想される選抜第 3 世代目の豚のデータを用いて、一般化線形モデルによるプロモーター型と免疫形質との関連解析を行った。*RNASEL* については、免疫能選抜群に優勢なプロモーター型をホモに持つ豚 (2/2) は、非選抜群に優勢なプロモーター型をホモに持つ豚 (1/1) よりも白血球貪食能が有意に高かった (表 2、 $P < 0.01$ )。また、*RNASEL* プロモーター型と補体代替経路活性及び豚丹毒ワクチン接種後の特異的抗体価との間にも有意な関連が検出されたが、選抜の方向を考慮するとその効果は明確ではなかった (データ非表示)。*SAMHD1* については、いずれの免疫形質でもプロモーター型との関連は検出されなかった。*TRIM21* については、プロモーター型と補体代替経路活性との間に有意な関連が検出されたが、選抜の方向を考慮するとその効果は明確ではなかった (データ非表示)。

表 2 *RNASEL* 遺伝子プロモーター型が白血球貪食能に及ぼす効果の推定

Genotype	PA		95% Wald CI		Hypothesis test	
	Estimate	S.E.	Lower	Upper	Wald	P
Sex						
Female	Reference					
Male	24.53	12.13	0.768	48.30	4.094	0.043*
<i>RNASEL</i>						
1/1	Reference					
1/2	3.151	20.35	-36.74	43.04	0.024	0.877
2/2	52.62	15.64	21.95	83.28	11.31	0.001**
(Intercept)	129.8	33.96	63.29	196.4	14.62	< 0.001***

*RNASEL*, ribonuclease L; PA, phagocytic activity; CI, confidence interval; S.E., standard error. Significant difference compared to reference are indicated (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

(4) 結論

大ヨークシャー種を基礎豚とした免疫能選抜により、豚集団における *RNASEL* 遺伝子の特定プロモーター型の頻度が上昇したことが明らかとなった。この *RNASEL* 遺伝子の免疫能選抜群に優勢なプロモーター型をホモに持つ豚では、非選抜群に優勢なプロモーター型をホモに持つ豚と比較して、白血球貪食能が大きく亢進していた。また、免疫能選抜群の豚のマクロファージでは、非選抜群の豚と比較して、リポド A 刺激後の *RNASEL* 遺伝子の発現が大きく増加していた。これらの結果は、*RNASEL* 遺伝子のプロモーター型を DNA マーカーとして、豚抗病性の遺伝的改良が可能であることを示している。

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 1件）

1. 著者名 Shinkai H, Takahagi Y, Matsumoto T, Toki D, Takenouchi T, Kitani H, Sukegawa S, Suzuki K, Uenishi H	4. 巻 83
2. 論文標題 A specific promoter-type in ribonuclease L gene is associated with phagocytic activity in pigs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1407-1415
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.21-0142	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	上西 博英  (Uenishi Hirohide)  (80391556)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・グループ長    (82111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関