

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05945

研究課題名（和文）ゲノムリシーケンスデータに基づくウシ脂肪交雑を支配する遺伝子変異の網羅的探索

研究課題名（英文）Detection of candidate polymorphisms for beef marbling based on whole-genome resequencing data

研究代表者

笹崎 晋史（Sasazaki, Shinji）

神戸大学・農学研究科・准教授

研究者番号：50457115

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：GWASにより同定された脂肪交雑に対する候補領域について、ゲノムリシーケンスにより領域に存在する変異の網羅的探索を行った。サンプルの8個体とデータベース上のヘレフォードの塩基配列を比較したところ、127,090個の多型を検出した。そのうち遺伝子の機能について調査し、いくつかを原因候補多型として抽出した。その中でも唯一アミノ酸置換であったSLC27A6遺伝子のK81M多型について、兵庫県黒毛和種集団904個体を用いてロース脂肪割合に対する効果を調査した結果、p値は $p = 0.0009$ となり、本多型がロース脂肪割合に対して非常に高い効果を持つことが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

和牛の脂肪交雑を支配する遺伝子および遺伝子変異を同定するべく、これまでに国内外を問わず多くの研究がなされてきたが、脂肪交雑を支配する主要な責任遺伝子および変異は未だ解明されていない。本研究の結果、7番染色体の当該領域に脂肪交雑の有力なQTLが存在し、SLC27A6遺伝子のK81M多型は兵庫県集団においては非常に有力なマーカーとなることが示された。以上、我が国を代表する黒毛和種の象徴である脂肪交雑についてその遺伝的要因の解明、および脂肪交雑をコントロールすることのできるDNAマーカーの開発に向けて、本研究の結果は有益な情報となりえると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We performed genome-wide association study (GWAS) to identify the genomic region associated with beef marbling, and detected a candidate in BTA7 at 10-30 Mbp. Next, we comprehensively detected all polymorphisms in the candidate region using whole-genome resequencing data. Based on whole-genome resequencing of eight animals, we detected 127,090 polymorphisms within the region. Of these, 31,945 were located within the genes. We further narrowed the polymorphisms to 6,044 of 179 genes based on allele differences between the high and low marbling groups. We subsequently investigated the functions of these genes and selected 170 polymorphisms in eight genes as possible candidate polymorphisms. We focused on SLC27A6 K81M as a putative candidate polymorphism. We genotyped the SNP in a Japanese Black population ($n = 904$) to investigate the effect on marbling. Analysis of variance revealed that SLC27A6 K81M had a lower p-value ($p = 0.0009$) than the most significant SNP in GWAS ($p = 0.0049$).

研究分野：動物遺伝育種学

キーワード：和牛 脂肪交雑 遺伝子 ゲノムリシーケンス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

牛肉の脂肪交雑(霜降り、さし)は経済的に重要な形質であり、世界中の様々な肉用牛品種を対象として遺伝的解析が行われてきている。和牛は筋肉内脂肪量が世界的に最も多い品種として知られ、世界的にも【WAGYU】ブランドとして高い評価を得る要因となった。一方、それほどの改良が行われてきたにもかかわらず、和牛における脂肪交雑の遺伝率は高く(0.5-0.6)すなわち多くの責任遺伝子変異が依然として存在することを示している。それら脂肪交雑を支配する遺伝子および遺伝子変異を同定するべく、これまでに国内外を問わず多くの研究がなされてきたが、脂肪交雑を支配する遺伝子の存在するゲノム候補領域については多くの報告がなされているものの、現在のウシ集団における遺伝的分散を説明できる主要な責任遺伝子変異は未だ解明されていない。我が国を代表する黒毛和種の象徴である脂肪交雑についてその遺伝的要因を解明し、脂肪交雑をコントロールすることのできる DNA マーカーを開発することは、今後の和牛育種戦略において極めて重要なツールとなりうると考えられる。

2. 研究の目的

我々は先行研究において脂肪交雑を対象としたゲノムワイド関連解析(GWAS)を行い、責任変異の位置する有力な候補領域をいくつか同定した。兵庫県黒毛和種集団 1836 頭分のデータより、脂肪交雑について上位 100 個体、下位 100 個体を選抜し、各個体の DNA サンプルを等量混合し、SNP アレイにより約 5 万個の SNP に対して遺伝子型判定を行った。解析されたデータより、各 SNP における上位下位集団での遺伝子頻度を推定し、脂肪交雑データとの関連解析を行ったところ 7 番染色体において特に有力な候補領域を検出した(下図)。本研究では、全ゲノムリシーケンスを活用し、候補領域内に存在する DNA 変異を網羅的に検出し、GWAS 解析で検出された SNP との連鎖不平衡解析を通して、脂肪交雑に関わる遺伝子と原因変異の同定を行うことを目的とした。

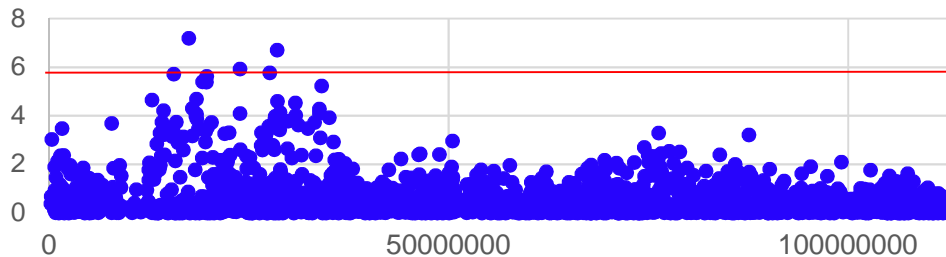


図 脂肪交雑に対する第 7 番染色体領域についてのマンハッタンプロット図
x 軸は 7 番染色体におけるポジション(UMD3.1)、y 軸は脂肪交雑に対する $-\log_{10}(P \text{ 値})$ 、赤実線は 5% 有意水準をそれぞれ示している。

3. 研究の方法

(1) GWAS により同定された脂肪交雑に対する候補領域について、ゲノムリシーケンスにより領域内に存在する変異の網羅的探索を行った。本研究では、GWAS により同定された候補領域のうち 7 番染色体の 10-30Mbp を対象に行った。ゲノムリシーケンスには兵庫県黒毛和種肥育牛集団 1836 頭の内から GWAS に用いた上下群の 200 頭から 8 頭を選出した。上位 100 個体から GWAS の最有意 SNP (NO.1 SNP) の遺伝子型が GG 型(優良アリル)を持つ去勢牛 4 個体、下位 100 個体から AA 型(劣性アリル)を持つ去勢牛 4 個体を選択した。計 8 個体について候補領域の全塩基配列決定を行い、多型の網羅的検出を行った。

(2) 上記により得られた候補遺伝子多型について、兵庫県集団 904 個体に対して遺伝子型判定を行い、脂肪交雑との関連解析を行った。次に、兵庫県集団において効果の見られた遺伝子変異について、遺伝的背景の異なる集団を用いて効果の検証を行った。用いる集団は岐阜県集団 461 頭、宮崎県集団 560 頭及び現場後代検定牛集団 450 頭を用いた。

4. 研究成果

(1) サンプルの 8 個体とデータベース上のヘレフォードの塩基配列を比較したところ、127,090 個の多型を検出した。全多型を NO.1 SNP との連鎖不平衡の度合いについて分類し、高い連鎖不平衡の関係にある(遺伝子型の一致度が 16/16 - 13/16) 20,102 個の多型を抽出した(下表)。次にこれらの多型をアノテーションごとに分類し、タンパク質の機能に影響する可能性が比較的高いと考えられる遺伝子上流、遺伝子下流、5' UTR、3' UTR、非同義置換に位置する多型をリストアップした。それらは全部で 1653 多型であり、179 の遺伝子に含まれていた。そこで、候補遺伝子をさらに絞り込むために遺伝子の機能に着目した。ロース脂肪割合に影響を与える遺伝子は、機能的に脂質代謝に関わると考えられる。そこで、過去の研究報告や遺伝子の機能についてまとめられた Gene Card を利用して、リストに存在する遺伝子について調査した。脂肪酸の合成や取り込みに関わる遺伝子、細胞内において取り込まれた脂肪酸を輸送する遺伝子、脂肪酸の分解反応を触媒する酵素、エネルギー過剰や欠乏を感知するホルモンの活性に関連する遺伝子のように脂質代謝に含まれる遺伝子、すなわち脂肪の蓄積に影響を与えられとされる遺伝子

に注目した。最終的に遺伝子の機能や遺伝子の含まれるパスウェイより、8 個の遺伝子、TECR、GCDH、PLIN3、DPP9、SIRT6、ACSL6、SLC27A6 を候補遺伝子として抽出した。

表 リシーケンスにより検出された、NO.1 SNP と高い連鎖不平衡の関係にある(16/16 - 13/16) 多型数とのアノテーションごとの内訳

	16/16	15/16	14/16	13/16	計
遺伝子間	1848	1948	3744	6536	14076
イントロン	631	350	627	2690	4298
遺伝子上流	168	122	60	316	666
遺伝子下流	207	132	82	402	823
5'UTR	15	5	5	12	37
3'UTR	18	14	11	52	95
同義置換	24	3	2	45	74
非同義置換	10	2	5	15	32
スプライス領域	3	4	7	5	19
計	2921	2575	4539	10067	20120

(2) その中でも唯一対象となる多型がアミノ酸置換であった SLC27A6 遺伝子の K81M 多型を最有力候補多型と考え効果の検証を行った。兵庫県黒毛和種集団 904 個体を用いて、TaqMAN 法により本多型の遺伝子型判定を行い、ロース脂肪割合に対する効果を調査した。遺伝子型判定の結果、KK、KM、MM の各遺伝子型の頻度はそれぞれ 0.059、0.402、0.540 であり、K アリル、M アリルの頻度はそれぞれ 0.259 および 0.741 であった。また、分散分析による統計解析の結果、p 値は $p = 0.0009$ となり、本多型がロース脂肪割合に対して非常に高い効果を持つことが確認された。また、同様の集団を用いて、GWAS においてもっとも有意性を示した SNP (NO.1 SNP) の効果を確認したところ、ANOVA の p 値は $p = 0.0049$ となり、本研究での K81M 多型の p 値は、NO.1 SNP の p 値よりも低く、K81M 多型はロース脂肪割合の原因変異である可能性が示唆された(下表)。

表 兵庫県黒毛和種 904 頭における ARS-BFGL-NGS-35463 と SLC27A6 K81M 多型の脂肪交雑に対する効果

Polymorphism	Genotype frequency (n)			Allele frequency		p-value
	AA	AG	GG	A	G	
ARS-BFGL-NGS-35463	0.100 (90)	0.435 (393)	0.466 (421)	0.317	0.683	0.0049
SLC27A6 K81M	0.059 (53)	0.402 (363)	0.540 (488)	0.259	0.741	0.0009

SLC27A6 遺伝子は、脂肪酸輸送たんぱく質である FATP ファミリーメンバーに含まれ、長鎖脂肪酸の取り込みと、アシル CoA 合成酵素活性の機能を持つ。骨格筋や脂肪組織において細胞内に取り込まれる脂肪酸量は、筋肉や脂肪組織に存在する脂肪滴に貯蔵されるトリグリセリド量に関わっている。以上により SLC27A6 遺伝子の機能変化が、ロース脂肪割合に対して影響を及ぼす可能性が考えられた。

さらに、本多型が脂肪交雑に与える影響について詳細に調査し、本多型が原因変異であるか検討を行うため、複数の県集団を用いて効果の検証を行った。集団としては、兵庫県 441 頭、岐阜県 461 頭、宮崎県 560 頭および全国から様々な県の個体を含む現場後代検定牛 450 頭を対象に、TaqMan SNP genotyping assay による K81M の遺伝子型判定を行い、分散分析および Tukey の HSD 検定により BMS に対する効果を検定した。分析の結果、兵庫、岐阜、宮崎、全国の A アリル頻度はそれぞれ 0.247、0.534、0.229、0.498 であり、集団間で差がみられた。また分散分析の p 値はそれぞれ、0.00056、0.0225、0.559、0.044 となった。すなわち岐阜県や全国集団では一定の効果が見られたものの、宮崎県では効果が認められず、本多型の効果は集団により異なることが明らかとなった。また、Tukey の HSD 検定の結果、兵庫県における AA 型個体と TT 型個体の BMS 最小二乗平均は 6.51 と 5.22 となり、1.29 と非常に大きい差を示した。以上の結果により、現時点では本多型が脂肪交雑の原因かは不明であるが、兵庫県ではマーカーとしての効果が非常に高いことが確認された。

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 1件）

1. 著者名 Shinji SASAZAKI, Fuki KAWAGUCHI, Ayaka NAKAJIMA, Takayuki AKIYAMA, Namiko KOHAMA, Emi YOSHIDA, Eiji KOBAYASHI, Takeshi HONDA, Kenji OYAMA, Hideyuki MANNEN	4. 巻 -
2. 論文標題 Detection of candidate polymorphisms around the QTL for fat area ratio to rib eye area on BTA7 using whole-genome resequencing in Japanese Black cattle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	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） 10.1111/asj.13335	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 近藤陽菜、小浜 菜美子、秋山 敬孝、吉田 恵実、小林 栄治、川口英岐、万年英之、笹崎晋史
2. 発表標題 集積流体回路を用いた兵庫県黒毛和種集団におけるロース脂肪割合候補多型の効果の検証
3. 学会等名 第21回日本動物遺伝育種学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamamoto R; Toyomoto S; Kohama N; Akiyama T; Yoshida E; Kobayashi E; Oyama K; Mannen H; Sasazaki S
2. 発表標題 Validation of candidate SNPs for fat percentage in bovine rib-eye area using Integrated Fluidic Circuit
3. 学会等名 37th International Society for Animal Genetics Conference（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本雷斗
2. 発表標題 複数の黒毛和種集団を用いたSLC27A6遺伝子多型のBMSに対する効果の検討
3. 学会等名 第125回日本畜産学会
4. 発表年 2019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
研究 分担者	万年 英之 (Mannen Hideyuki) (20263395)	神戸大学・農学研究科・教授 (14501)	
研究 分担者	大山 憲二 (Oyama Kenji) (70322203)	神戸大学・農学研究科・教授 (14501)	

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
---------	---------