

令和 7 年 5 月 12 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K05969

研究課題名（和文）ウシ脂肪交雑形成機構の解明に向けた候補遺伝子変異の網羅的検証

研究課題名（英文）Comprehensive Analysis of Candidate Genetic Variants for Elucidating the Mechanism of Intramuscular Fat Deposition in Cattle

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：先行研究により同定された脂肪交雑QTL候補領域（7番染色体10-30Mbp）内の全127,090個の多型から選出した96SNPについて遺伝子型判定を行い、LDブロック図を作成したところ、候補領域は0.3Mbp（15.8-16.1Mbp）にまで大幅に絞られた。そこで宮崎県集団でゲノムリシーケンス解析を行い、候補領域内の全多型1846SNPを検出した。これらについて、BMSとの関連を分散分析によって算出したところ、ICAM（Intercellular Adhesion Molecule）遺伝子上のアミノ酸置換が最も高い効果を示し、脂肪交雑の原因遺伝子である可能性が高いと考えられた。

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番染色体の候補領域を大幅に絞り込むことに成功し、中でもICAM遺伝子上のアミノ酸置換が脂肪交雑と非常に高い効果を示した。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ると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Genotyping was conducted on 96 SNPs selected from a total of 127,090 polymorphisms within the candidate QTL region for beef marbling (chromosome 7, 10–30 Mbp) identified in our previous studies. An LD block map was created, and as a result, the candidate region was substantially narrowed down to 0.3 Mbp (15.8–16.1 Mbp). Subsequently, a genome sequencing analysis was performed on the Miyazaki population, detecting 1,846 polymorphisms (SNPs) within the candidate region. An analysis of variance (ANOVA) assessing the association with BMS (Beef Marbling Standard) revealed that an amino acid substitution in the ICAM (Intercellular Adhesion Molecule) gene exhibited the highest effect, suggesting it is a strong candidate for the causal gene of beef marbling.

研究分野：動物遺伝育種学

キーワード：黒毛和種 牛肉 脂肪交雑 遺伝子

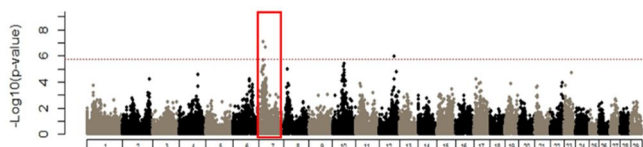
## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我が国における和牛の改良は、これまで脂肪交雑の増加が改良の焦点に当てられてきた。数十年にわたる改良努力の結果、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、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50-60%と高く、すなわち多くの責任遺伝子変異が依然として存在する。また、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主要な責任遺伝子および変異は未だ解明されていない。これは育種分野のみならず分子遺伝学における謎の一つであるが、本研究により責任遺伝子が解明されれば、責任遺伝子の同定が困難であった形質における成功例として一つの戦略を提示することができる。また、和牛育種においても、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る。

### 2. 研究の目的

これまでに我々は、GWASにより脂肪交雑の責任遺伝子が位置する候補領域を同定した。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個体を用い、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番染色体において有力な候補領域を検出した。



GWASによる脂肪交雑の責任遺伝子の位置する領域の探索

次に、7番染色体の候補領域(約10-30Mbp)について、脂肪交雑の上位4頭、下位4頭を用いて全ゲノムリシーケンスを行い、本領域に存在する多型を網羅的に検出した。本研究では、これらの多型を網羅的に検証することにより脂肪交雑に関わる遺伝子と責任変異の同定を試み、脂肪交雑に關与する遺伝的要因の解明を試みる。

### 3. 研究の方法

#### (1) ゲノムリシーケンスにより検出された全多型から解析候補の絞り込み

脂肪交雑の上位4頭、下位4頭の全ゲノムリシーケンスの結果、候補領域内に127,090個の多型が検出された。このうち遺伝子内にあるものは31,945個であった。次に、目的としている原因変異はGWASで最も有意な関連を示したSNP(以下、有意SNPとする)と強い連鎖不平衡にあることが確実であるため、有意SNPと連鎖不平衡にないものを除いたところ6,044個に絞られた。本研究では、そのうちイントロンに位置していた4,296個を除いた(イントロンでもスプライシングに関わる領域の多型は研究対象に含める)1,746個を検証対象とし、原因変異の同定を試みる。

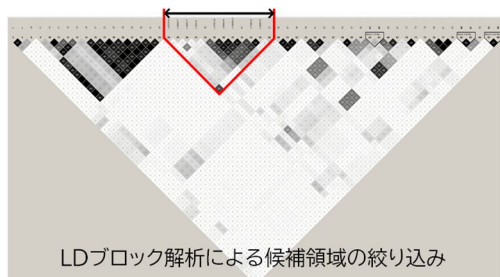
#### (2) 集積流体回路を利用した候補多型の検証

集積流体回路は、96SNP x 96サンプルを一度に遺伝子型判定できる方法である。本ツールを活用し、上記により得られた候補遺伝子多型1,746個について、兵庫県集団441個体に対して遺伝子型判定を行い、脂肪交雑に対する効果の検定およびGWASに用いたSNPを含めた本領域での連鎖不平衡解析を行い、候補領域および多型の絞り込みを試みる。選出された候補多型に対して、NCBI等の遺伝子データベースによりプロファイリングを行い、遺伝子の機能および当該多型の遺伝子への影響(アミノ酸置換の有無、遺伝子発現量への影響など)を考慮し、原因変異としての妥当性を考察する。

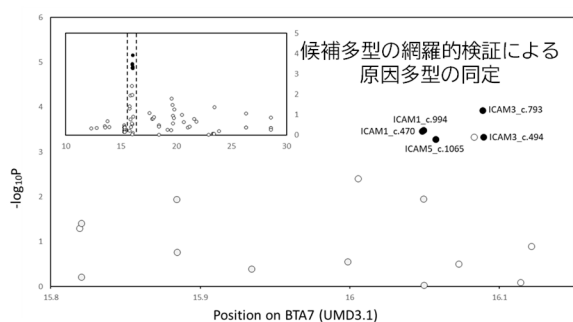
### 4. 研究成果

(1) 先行研究により同定された脂肪交雑QTL候補領域(7番染色体10-30Mbp)について、ゲノムリシーケンスにより検出された全127,090個の多型から、遺伝子の機能を考慮し選出した96SNPについて、兵庫県441頭および宮崎県529頭の2集団を用いて集積流体回路による遺伝子型判定を行い、各SNPの脂肪交雑基準値(BMS)に対する効果の検証を行った。有意水準( $p = 0.05$ )を下回ったSNPは7個存在し、それらは7個の遺伝子に属する多型であった。最も低いp値を示したのはICAM1遺伝子のmissense多型(SNP37\_ICAM1)であった( $p = 3.33 \times 10^{-4}$ )。SNPの遺伝子型より、Haploviewを用いてLDブロック図を作成したところ、兵庫県集団においては予想通り96SNPでの絞り込みは難しく更なるSNPの追加が必要であったが、宮崎県集団においては本領域

において兵庫県集団よりも非常に LD が狭く、有力 SNP を含む領域が 15.8-16.1Mbp のブロックに絞られた。すなわち、96SNP の解析段階で候補領域は 20Mbp(7 番染色体 10-30Mbp)から 0.3Mbp(15.8-16.1Mbp)にまで大幅に絞られたため、今後は計画を上方修正し、宮崎県集団を対象を絞り実験を進めることとした。



そこであらためて宮崎県集団において、BMS 上位 4 頭、下位 4 頭の計 8 頭についてゲノムリシーケンス解析を行い、候補領域内の全多型 1846SNP を検出した。そのうちタンパク質に与える影響の程度の指標となる annotation-impact に着目し、moderate 以上である 13SNP を候補多型として選出した。それらに対して宮崎県 529 頭を用いて遺伝子型判定を行い、BMS との関連を分散分析によって算出したところ、特に p 値の低かった多型 ( $p < 0.001$ ) は 5SNP あり、いずれも ICAM ファミリー遺伝子 (ICAM1, ICAM3, ICAM5) に存在する多型であった。ICAM1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) は免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、細胞間相互作用を媒介することにより、免疫系で主要な役割を担うタンパク質として報告されてきた。一方近年になって、ヒト間葉系幹細胞 (MSC) から脂肪細胞への分化過程において、ICAM1 が脂肪前駆細胞の段階で特異的に高発現していること、MSC における ICAM1 の過剰発現は、細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) および p38MAP キナーゼ (p38) を活性化し、C/EBP を介して脂肪形成遺伝子の発現を促進することが示された。すなわち ICAM1 は脂肪細胞の分化を制御し、脂肪形成に寄与する上流因子であると考えられる。以上のことから、ICAM が脂肪交雑の原因遺伝子である可能性が高いと考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Sasazaki Shinji, Kondo Hina, Moriishi Yurika, Kawaguchi Fuki, Oyama Kenji, Mannen Hideyuki	4. 巻 25
2. 論文標題 Comprehensive genotyping analysis of single nucleotide polymorphisms responsible for beef marbling in Japanese Black cattle	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 BMC Genomic Data	6. 最初と最後の頁 17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12863-024-01199-w	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 -

1. 著者名 Shinji Sasazaki, Raito Yamamoto, Shintaro Toyomoto, Hina Kondo, Takayuki Akiyama, Namiko Kohama, Emi Yoshida, Fuki Kawaguchi, Kenji Oyama and Hideyuki Mannen	4. 巻 13
2. 論文標題 Verification of Candidate SNP Effects Reveals Two QTLs on BTA7 for Beef Marbling in Two Japanese Black Cattle Populations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 1190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes13071190	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shinji Sasazaki, Hina Kondo, Yurika Moriishi, Fuki Kawaguchi, Kenji Oyama, Hideyuki Mannen
2. 発表標題 Comprehensive verification of all SNPs within a QTL region suggested that ICAM gene polymorphisms would be responsible for beef marbling in Japanese Black cattle
3. 学会等名 31th Plant & Animal Genome Conference（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Shinji Sasazaki, Raito Yamamoto, Shintaro Toyomoto, Hina Kondo, Namiko Kohama, Emi Yoshida, Eiji Iwamoto, Fuki Kawaguchi, Kenji Oyama and Hideyuki Mannen
2. 発表標題 Verification of Candidate SNP Effects Reveals Two QTLs on BTA7 for Beef Marbling in Two Japanese Black Cattle Populations
3. 学会等名 30th Plant & Animal Genome Conference（国際学会）
4. 発表年 2023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	川口 芙岐  (Kawaguchi Fuki)  (00879968)	神戸大学・農学研究科・助教   (14501)	
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
---------	---------