

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850173

研究課題名(和文)ブタの免疫能選抜がもたらした遺伝的特性の変化の解明

研究課題名(英文)Elucidation of genetic change associated with selection of immune competence in swine

研究代表者

新開 浩樹(Shinkai, Hiroki)

国立研究開発法人農業生物資源研究所・動物生体防御研究ユニット・任期付研究員

研究者番号：30502687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、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抗体応答を指標として選抜を行った高免疫豚を作出している。本研究では、高免疫豚と一般豚のマクロファージを用いてマイクロアレイ解析を行い、豚群間でリガンド刺激後の発現変化に3倍以上の差がある44個の免疫系遺伝子を同定した。これらの遺伝子のプロモーター領域5kbについて、豚群間で分布に偏りのある多型の検索と、多型により構成されるハプロタイプの推定を行い、RNASEL、SAMHD1、STAT3、TRIM21、TMEM150Cの各遺伝子において、免疫能選抜により頻度が有意に高くなったと考えられる特定のプロモーター型を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We had previously produced pigs with high immune competence by selection of phagocytic capacity, complement-activating capacity by alternative pathway, and antibody response after vaccination with swine erysipelas. In this study, we performed microarray analysis by using macrophages from pigs of high immune competence or control, and identified 44 immune genes showed more than three times difference in the changes of gene expression after ligand stimulation between pig groups. Furthermore, we searched polymorphisms which had biased distribution between the pig groups in 5 kb of promoter region of these genes, and estimated haplotypes consisting of these polymorphisms. As a result, we elucidated specific types of promoter which were considered to be significantly increased in frequency by selection of immune competence in the genes encoding RNASEL, SAMHD1, STAT3, TRIM21, and TMEM150C, respectively.

研究分野：分子免疫学

キーワード：ブタ 感染症 多型 抗病性 免疫 選抜 育種 マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

ブタの育種は、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。一方、肺炎・下痢等の感染症に対する感受性/抵抗性に関わる抗病性形質については、疾病・病変等の程度の測定が困難であり、遺伝的改良の試みは大きく遅れている。近年の大規模集約的な養豚経営において、密飼い等の劣悪な飼養環境に起因する感染症の流行は、生産コストを押し上げる主要な要因であり、ブタの抗病性に関する遺伝的改良は、養豚業における最重要課題であると言える。

2. 研究の目的

我々の研究グループ(農業生物資源研究所・日本ハム株式会社・東北大学)では、血液サンプルから比較的容易に測定可能な免疫能形質が、病変等の直接的形質の代替となる可能性について検討しており、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の育種価を指標として、6世代に渡る選抜を繰り返した高免疫能大ヨークシャー豚(高免疫豚)を作出している(図1)。本研究では、高免疫豚に生じた遺伝的特性の変化を解明することで、免疫能選抜の生物学的効果の検証を行った。

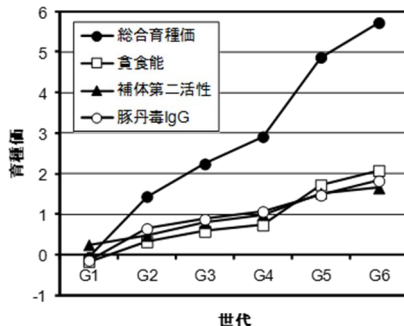


図1 高免疫能大ヨークシャー豚

3. 研究の方法

マクロファージは、感染初期において病原体の認識及び貪食を担う細胞であり、また貪食した病原体の情報を未刺激T細胞に伝達し、T細胞による細胞性免疫及びB細胞による液性免疫を誘導する等、自然免疫系・獲得免疫系の両面において極めて重要な役割を持つ。本研究では、高免疫豚及び同一の遺伝的背景を持つ無選抜豚(一般豚)のマクロファージを用いて、免疫系遺伝子の発現及びプロモーター配列の多型解析を行うことにより、免疫能選抜により生じた遺伝的变化の解明を行った。

(1)マクロファージの培養増殖

高免疫豚及び一般豚それぞれ同腹4頭ずつから、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、10µg/ml

インシュリン、100µM 2-メルカプトエタノール、50U/ml ペニシリン、50µg/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%CO₂インキュベーター(37℃)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。このマクロファージは、培地の回収と追加を繰り返すことにより1か月以上に渡り増殖し^{1,2}、回収したマクロファージを以下の実験に供した。

(2)免疫系遺伝子の発現解析

高免疫豚及び一般豚それぞれ同腹4頭ずつ由来のマクロファージを、24-well細胞培養プレートに1×10⁶個ずつ分注し(8頭×3-well)MG培地(無刺激)10ng/ml lipid A(細菌感染を想定)10µg/ml poly I:C(ウイルス感染を想定)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の抽出を行った。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³。シグナル検出後のデータ解析は既報の通り行い³、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算出した。高免疫豚/一般豚間で刺激後の発現変化に差があるプローブ(遺伝子)を抽出し、Gene Ontology(GO)において、免疫に関わるとされる遺伝子のみを解析の対象とした。

(3)免疫系遺伝子のプロモーター配列の多型解析

公開されている最新のブタゲノム塩基配列(SScrofa10.2)から、上述の解析対象遺伝子の転写開始点上流5kbの配列を抽出し、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シングを行うことにより塩基配列の解読を行った。DNAサンプルとして、高免疫豚及び一般豚集団に属する、それぞれ10頭ずつの血縁の遠い個体のゲノムDNAを用いた。アンプリコンシーケンシング用プライマーはIon AmpliSeq™ Designerを用いて設計した。得られた塩基配列を比較することにより、一塩基多型(SNP)及び挿入/欠失(Indel)の検出を行った。高免疫豚/一般豚間で分布に偏りのある多型を、²独立性の検定(p<0.05)により同定した。これらの多型により構成されるハプロタイプを、Arlequin 3.5 software⁴を用いて推定し、²独立性の検定におけるp値を算出することにより、高免疫豚/一般豚間でハプロタイプ分布に偏りがあるかの検定を行った。

4. 研究成果

(1) 免疫系遺伝子の発現解析

全 38,721 個のプロープのうち、高免疫豚/一般豚間で、有意 (Benjamini-Hochberg 法) に刺激後の発現変化に差があるものとして、lipid A 刺激で 5,794 個、poly I:C 刺激で 2,721 個のプロープが同定された。解析対象を絞り込むために、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 GO で免疫との関連もしくは転写因子活性があるとされる遺伝子のみを抽出した。さらに高免疫豚/一般豚群間で刺激後の発現変化に 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、重ねて解析対象の絞り込みを行った。その結果、GO の Immune system process (GO:0002376)、Nucleic acid binding transcription factor activity (GO:0001071)、Autophagy (GO:0006914) 及び Ubiquitin protein ligase activity (GO:0061630) と関連する遺伝子として、lipid A 刺激でそれぞれ 30、13、4 及び 2 個 (図 2)、poly I:C 刺激でそれぞれ 21、4、3 及び 1 個が検出された (図 3)。GO 間で共通する遺伝子の重複を除外すると、検出された遺伝子数は、lipid A 刺激で 42 個、poly I:C 刺激で 27 個であった。27 個のうち、MND4 と SERPINB9 を除く 25 個の遺伝子が lipid A/poly I:C 刺激間で共通して検出され、両刺激間で発現変化する遺伝子に大差はないことが示唆された。また、検出された多くの遺伝子において、刺激による発現の誘導/抑制の程度は一般豚よりも高免疫豚で大きくな

っており、免疫能選抜により刺激後の発現変化が増幅されたことが示された。

(2) 免疫系遺伝子のプロモーター配列の多型解析

発現解析により検出された 44 個の免疫系遺伝子のうち、FOXS1 と PLSCR1 についてはゲノム情報が不十分でプロモーター領域の塩基配列を得られなかったため、残りの 42 個の遺伝子を対象として、810 個のアンプリコンを増幅するプライマーを設計した。塩基配列を解読した結果、1,654 個の SNP と 577 個の Indel が検出された。このうち、20 頭全てで遺伝子型判別が成功し、かつ高免疫豚/一般豚間で分布に有意な偏りがあるものとして、RNASEL で 9 個 (SNP-7、Indel-2)、SAMHD1 で 6 個 (全て SNP)、STAT3 で 30 個 (全て SNP)、TMEM150C で 20 個 (SNP-19、Indel-1) 及び TRIM21 で 50 個 (SNP-46、Indel-4) の多型が検出された (表 1 - 5)。これらの多型で構成されるハプロタイプは、RNASEL で 2 個、SAMHD1 で 2 個、STAT3 で 5 個、TMEM150C で 3 個及び TRIM21 で 4 個であると推定され、5 個の遺伝子全てにおいて、高免疫豚/一般豚間でハプロタイプ分布に有意な偏りのあることが示された (表 1 - 5)。これらの結果は、免疫能選抜により集団における頻度が有意に高くなった免疫系遺伝子のプロモーター型の存在を示唆しており、今後、当該プロモーター型を指標とした選抜による抗病性改良の可能性について検討していく必要がある。

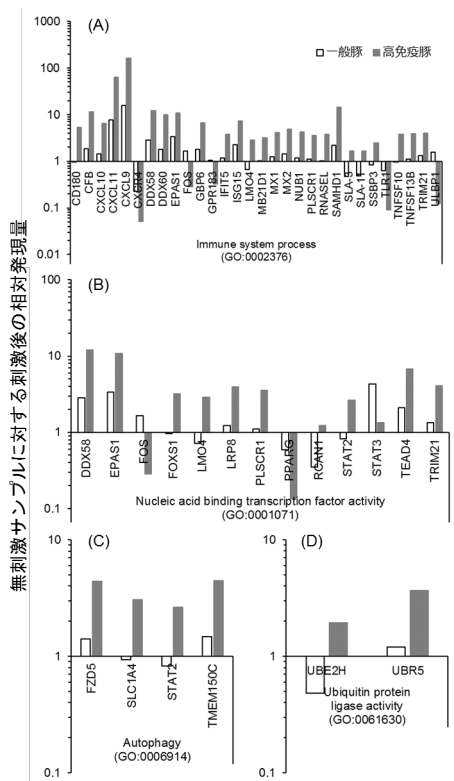


図 2 高免疫豚/一般豚群間でlipid A刺激後の発現変化に3倍以上の差が検出された遺伝子。Gene Ontologyで、免疫応答 (A)、転写因子 (B)、オートファジー (C)、ユビキチンリガーゼ (D)に関連するとされる遺伝子を示した。

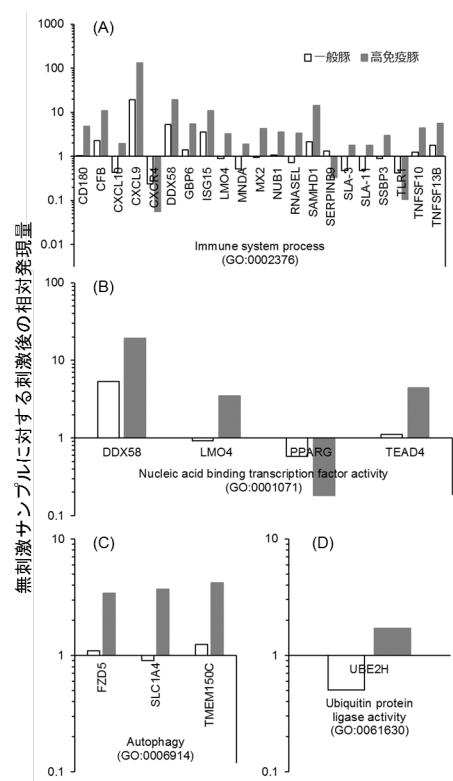


図 3 高免疫豚/一般豚群間でpoly I:C刺激後の発現変化に3倍以上の差が検出された遺伝子。Gene Ontologyで、免疫応答 (A)、転写因子 (B)、オートファジー (C)、ユビキチンリガーゼ (D)に関連するとされる遺伝子を示した。

<引用文献>

- 1) Kitani H, Takenouchi T, Sato M, Yoshioka M, Yamanaka N, A simple and efficient method to isolate macrophages from mixed primary cultures of adult liver cells. *Journal of Visualized Experiments* 51:e2757, 2011.
- 2) Takenouchi T, Suzuki S, Shinkai H, Tsukimoto M, Sato M, Uenishi H, Kitani H, Extracellular ATP does not induce P2X7 receptor-dependent responses in cultured renal- and liver-derived swine macrophages. *Results in Immunology* 4:62-67, 2014.

- 3) Matsumoto T, Nakajima I, Eguchi-Ogawa T, Nagamura Y, Hamasima N, Uenishi H, Changes in gene expression in a porcine preadipocyte cell line during differentiation. *Animal Genetics* 43:535-544, 2012.
- 4) Excoffier L, Lischer HE, Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10:564-567, 2010.

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0件)

(学会発表)(計1件)

新聞浩樹、高萩陽二、松本敏美、土岐大輔、竹之内敬人、木谷裕、鈴木啓一、上西博英、ブタの免疫能選抜により生じた遺伝的特性変化の解明、日本畜産学会第121回大会、2016年3月27日～2016年3月30日、日本獣医生命科学大学

(図書)(計0件)

表1 RNASEL プロモーター領域の多型と予測されるハプロタイプ

Sscrofa10.2での位置 (染色体、塩基番号)								
	9_136225014	9_136226551	9_136226580	9_136227605	9_136228153	9_136229254	9_136229261	9_136229299 ^b
	転写開始点からの位置							
ハプロタイプ	-604	-2141	-2170	3195	3743	4405	4844	4851
1	C	T	G	A	A	T	C	G
2	T	A	C	G	G	0	T	A
	1	2	11	9				

^a0, TCCCGCA; 1, T

^b0, AAGAGCAAAGC; 1, A

表2 SAMHD1 プロモーター領域の多型と予測されるハプロタイプ

Sscrofa10.2での位置 (染色体、塩基番号)								
	17_45580310	17_45580423	17_45580482	17_45581237	17_45582918	17_45584682		
	転写開始点からの位置							
ハプロタイプ	-4758	-4645	-4586	3831	-2150	386		
1	A	T	A	C	G	C	10	2
2	G	C	G	T	A	A	10	18

表3 STAT3 プロモーター領域の多型と予測されるハプロタイプ

Sscrofa10.2での位置 (染色体、塩基番号)																
	12_20775600	12_20775911	12_20775952	12_20776180	12_20776238	12_20776514	12_20776647	12_20777055	12_20777104	12_20777179	12_20777268	12_20777509	12_20777549	12_20777551	12_20777654	12_20778194
	転写開始点からの位置															
ハプロタイプ	-29	-340	-381	-409	-467	-1077	-1403	-1484	-1533	-1608	-1697	-1938	-1978	-1980	-2083	-2623
1	A	C	G	C	C	A	A	T	C	G	C	A	T	A	A	G
2	G	A	T	A	C	G	G	A	T	G	C	A	C	A	G	G
3	G	A	T	A	T	G	G	A	T	G	C	C	G	C	G	C
4	G	A	T	A	T	G	G	A	T	A	T	G	C	G	C	G
5	G	C	G	A	C	G	A	A	T	G	C	A	C	A	G	C
	2	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

表4 TMEM150C プロモーター領域の多型と予測されるハプロタイプ

Sscrofa10.2での位置 (染色体、塩基番号)																
	8_14509982	8_14509982	8_14509982	8_14509982 ^b	8_14509982	8_14509982	8_14509982	8_14509982	8_14509982	8_14509982	8_14509982	8_14509982	8_14509982	8_14509982	8_14509982	8_14509982
	転写開始点からの位置															
ハプロタイプ	-4807	-4729	-4568	-4379	-4375	-4334	-4283	-4219	-4190	-4061	-4008	-3637	-3166	-3033	-2992	-592
1	G	T	0	G	G	G	C	A	A	G	T	G	T	T	C	A
2	T	C	1	A	A	A	T	A	C	A	G	A	C	G	T	T
3	T	C	1	A	A	A	T	A	C	A	G	A	C	G	T	T
	12	20	0	0	0	0	0	0	7	0	0	12	20	0	0	

^a0, A; 1, AT

表5 TRIM21 プロモーター領域の多型と予測されるハプロタイプ

Sscrofa10.2での位置 (染色体、塩基番号)																
	9_6533752	9_6533772	9_6533788	9_6533816	9_6533844	9_6533860	9_6533871	9_6533922	9_6533992	9_6533992	9_6534024	9_6534027	9_6534199	9_6534211	9_6534387	9_6534475
	転写開始点からの位置															
ハプロタイプ	3289	2349	2335	2305	2271	2261	2250	2199	2155	2129	2097	2084	1922	-1910	-1724	-1646
1	C	C	A	T	G	C	C	C	C	C	A	A	T	C	G	C
2	G	C	A	A	T	G	G	G	G	C	A	A	T	C	T	T
3	G	T	A	T	A	C	C	A	A	T	T	G	A	T	A	A
4	T	T	C	A	T	G	G	T	G	T	G	G	C	T	C	A
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

^a0, GT; 1, G

^b0, CGA; 1, C

^c0, T; 1, TCTCCG

^d0, AG; 1, A

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：高免疫能ブタの判別方法、およびそのための多型マーカー

発明者：新開浩樹、上西博英、高萩陽一、助川慎

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2016-52805

出願年月日：平成 28 年 3 月 16 日

国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新開 浩樹 (SHINKAI, Hiroki)

国立研究開発法人農業生物資源研究所・動物生体防御研究ユニット・任期付研究員

研究者番号：30502687

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

上西 博英 (UENISHI, Hirohide)

国立研究開発法人農業生物資源研究所・家畜ゲノム研究ユニット・主任研究員

研究者番号：80391556

木谷 裕 (KITANI, Hiroshi)

国立研究開発法人農業生物資源研究所・動物生体防御研究ユニット・ユニット長

研究者番号：30355739

竹之内 敬人 (TAKENOUCHI, Takato)

国立研究開発法人農業生物資源研究所・動物生体防御研究ユニット・主任研究員

研究者番号：20292518

高萩 陽一 (TAKAHAGI, Yoichi)

日本ハム株式会社・中央研究所・研究員

研究者番号：80520379

(4) 研究協力者

鈴木 順一 (SUZUKI, Junichi)

インターファーム株式会社・今金種豚農場

松本 敏美 (MATSUMOTO, Toshimi)

国立研究開発法人農業生物資源研究所・農業生物先端ゲノム研究センター

土岐 大輔 (TOKI, Daisuke)

公益社団法人農林水産・食品産業技術振興協会・農林水産先端技術研究所