

間接検定調査牛における脂肪交雑関連遺伝子 SNP 多型の効果の推定

2014 年

佐々木整輝

新潟大学大学院自然科学研究科博士後期課程

生命・食料科学専攻

## 目 次

第1章 緒 論	4
第2章 遺伝子多型の効率な測定法の開発	9
第1節 緒 言	
第2節 材料および方法	
第3節 結 果	
第4節 考 察	
第5節 要 約	
第3章 各遺伝子における遺伝子型の効果の検証	26
第1節 緒 言	
第2節 材料および方法	
第3節 結 果	
第4節 考 察	
第5節 要 約	
第4章 効果の見られた遺伝子の他の形質への影響の調査	43
第1節 緒 言	
第2節 材料および方法	
第3節 結 果	
第4節 考 察	

第5節 要約

第5章 総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 59

謝辞・・ 63

引用文献・・ 64

SUMMARY・・ 67

付属資料・・ 71

## 第1章 緒論

霜降りとして知られる脂肪交雑は、特に日本において牛肉の価値を決める大きな要因の1つである。1988年にBMSナンバーとして12段階で示される脂肪交雑基準が策定されて以来、BMSナンバーが8以上のものが最上位の5等級として評価されている(表1-1)。その実際の取引価格を例に取ってみると、歩留まり等級が同じAクラスであるもので比較すると、標準の3等級のものは枝肉1kgあたりおよそ1,500~2,000円であるのに対して5等級のものは約2,000~2,500円と1.3~1.4倍もの差がみられる(図1-1)。

国内の食肉生産者はその高い収益性や国際的な競争力といった経済形質としての重要性から、脂肪交雑に優れた肉牛を最新の知見を基に効率良く生産する方法に関心を寄せている。脂肪交雑は飼料の種類や肥育期間、気温といった環境要因に加え、遺伝的な要因によっても影響を受けている。生産現場に於いては、ビタミンAコントロール(Oka et al., 1998)に代表される高度な飼養管理技術が活用される一方で、血統を考慮した交配などで、脂肪交雑を高めるため、あらゆる努力がなされてきた。近年、飼料の高騰が進み、環太平洋戦略的経済連携協定(TPP)を見据えた輸入品との価格競争が激化する中、生産コストを抑えつつ品質を維持・向上させる事はますます重要となってくる。このため、脂肪交雑の遺伝的な改良を進め、効率よく脂肪交雑に優れた牛肉を生産することは、今後ますます重要になっていくと考えられる。

これまでのところ、脂肪交雑の改良は、統計育種学的な手法を用いて計算された個体の遺伝的能力すなわち推定育種価を用いた選抜によって行われてきた。Henderson(1975; 1993)によって開発されたBLUP法(最良線形不偏予測: Best Linear Unbiased Prediction)は、環境要因の影響を除き、正確かつ偏りのない育種価を推定する方法である。この方法の特徴は、血統記録を利用することができ、これによって推定育種価の

正確度を上げることができることにある。コンピュータの発達とともに膨大な数の血統情報を含む行列式を計算できるようになると、広く家畜の評価に用いられた。国内の黒毛和種においても 1990 年代以降、大いに育種改良に活用され、それは現在も続けられている。その成果は遺伝的趨勢の解析によって知ることができ、川田 (2003) らの報告や農林水産省の資料 (平成 17 年 家畜改良増殖目標) では、この 10 年で BMS ナンバーの育種価で 1 以上向上しているとされている。この BLUP 法は、現在のところ種畜の育種価を求める最も有効な統計手法とされている。しかし、あくまでも誤差を持つデータから推測をする手法であり、正確な育種価を求めるためには、質の良いデータを数多く得る必要があり、多くの後代牛の成績をもつ種雄牛を別として繁殖雌などでは正確性を上げるのが困難な場合が多い。

その一方で近年、ゲノム情報を活用し、より正確な個体の遺伝的能力を評価するための取り組みがなされてきた。Barendse ら (1994) や、Bishop ら (1994) のグループがほぼゲノム全体をカバーする最初のマイクロサテライトマーカーの連鎖地図を発表すると、遺伝病や毛色などメジャー遺伝子に支配される質的形質の連鎖解析が盛んに行われるようになった。連鎖解析で連鎖地図上にマッピングされた位置から原因遺伝子にたどり着く、いわゆるポジショナルクローニングの手法によって、これまで機能面からはなかなか辿りつけなかった原因遺伝子が次々と同定されていった (Charlier et al., 1996; Hirano et al., 2000; Ohba et al., 2000)。その後、各国で実施されたゲノム解析プロジェクトの成果によりマーカーの数は順次追加され (Kappes et al., 1997)、連鎖解析の精度が増すに従い、ポリ遺伝子で支配される量的形質 (Quantitative trait locus ;QTL) の解析に発展していった (Haley et al., 1994)。海外はもとより国内でも各県の試験場などで QTL 解析は盛んに行われ、黒毛和種の脂肪交雑に関与する染色体領域も多数報告された (Takasuga et al., 2007; 宮城県畜産試験場, 2013)。こうして同定された領域に含まれる複数のマイクロサテライトマーカー群は、育種選抜用のマーカー

一として、一部の種雄牛では実際の選抜に使われた例もある。こうした選抜法はマーカーアシスト選抜 (MAS: Marker Assisted Selection) と呼ばれ一時は従来の統計育種に変わる手法として期待された。しかし、異なる集団ではマイクロサテライトマーカー群のハプロタイプの相が組み換えにより崩れてしまうので、原則的には解析に用いた集団にしか適応できず汎用性が乏しい手法であった。

こういった不都合を解消するには、実際に遺伝的な差をもたらす遺伝子の変異を同定する必要がある。このため、領域のマーカーの数を増やし、高精度な連鎖解析による、領域の絞り込みを行い、さらに全ゲノムシーケンスの情報や、比較ゲノム解析の結果を用い候補遺伝子を同定する試みがなされた。しかしながら、量的形質は一つ一つは小さな効果を持つポリジーンの集まりであり、こういったアプローチのみで「その領域にどれくらい効果の遺伝子が何個存在しているか?」といったことを解析することは事実上、不可能であった。

連鎖解析からのアプローチではなかなか遺伝子変異の同定に辿りつけない状況の中、Sasaki et al. (2000)はこれまでとは逆側からのアプローチとして、ディファレンシャルディスプレイ法を用いた胸最長筋における網羅的な遺伝子発現プロファイリングを実施した。極めて高い能力をもつ牛群と、その能力が極端に低い牛群との間でその経時的発現パターンに差が見られる遺伝子を検索した結果、77 個の遺伝子をスクリーニングすることに成功した。その後の研究で、Yamada et al. (2007)はこれら 77 個の遺伝子について、遺伝子周辺の約 2kb の領域の塩基配列を詳細に解析し、遺伝子発現に関わる一塩基多型 (SNP : single nucleotide polymorphism) を多数検出した。さらにこれらの SNP について小集団での予備的な解析を行うとともに、QTL 解析で報告された脂肪交雑に関与する染色体領域と照らし合わせることで、より確実性の高い遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、endothelial differentiation、 sphingolipid G-protein-coupled receptor 1 遺伝子 (以下 EDG1)、titin 遺伝子 (以下 TTN)、akirin

2 遺伝子（以下 AKIRIN2）、ribosomal protein L27a 遺伝子（以下 RPL27A）という 4 つの遺伝子について、EDG1 のプロモーター領域の SNP (g. 1471620G>T)、EDG1 の非翻訳領域の SNP (c. -312A>G)、TTN のプロモーター領域の SNP (g. 231054C>T)、AKIRIN2 の非翻訳領域の SNP (c. \*188G>A)、RPL27A のプロモーター領域の SNP (g. 3109537C>T) という 5 つの候補となる一塩基多型（以下 SNP）をそれぞれ検出した。5 つの SNP は大分県産黒毛和種の種雄牛集団およびその後代肥育牛集団を対象にした相関解析によって脂肪交雑に対して有意な遺伝子型効果が観察されることが示された (Sasaki et al., 2009; Yamada et al., 2009a; Yamada et al., 2009b, c; Yamada et al., 2009d)。以上の研究によりこれら 5 つの SNP が育種改良に応用できる可能性が示されたが、この結果は限られた特定の地域や血統での解析結果であるため、黒毛和種集団全体で活用するには、解決すべき問題が残されている。

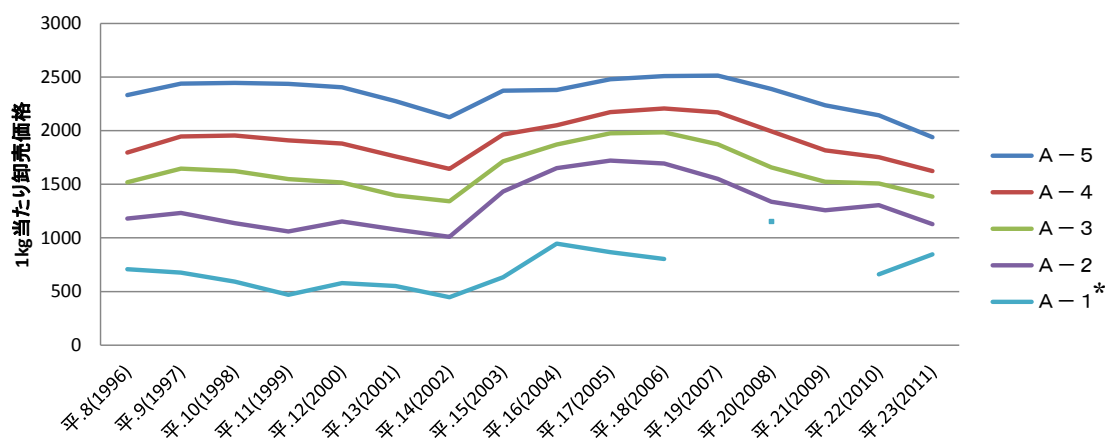
本博士論文では、脂肪交雑の育種改良に応用するため、5 つの SNP をより広い範囲にわたる多数の集団で解析し、効果の大きさをより正確に把握するとともに、脂肪交雑以外の形質への多面的な影響も検証した成果をまとめた。第 2 章では上記 5 つの SNP について多数の検体に対し効率的に遺伝子型のデータを得るための大規模タイピング法を確立した。第 3 章では、環境要因が一般の肥育牛集団よりも小さい家畜改良事業団の間接検定調査牛の集団を対象に、これらの SNP が脂肪交雑にどの程度影響を与えているかを推定した結果をまとめた。第 4 章では第 3 章で効果が確認された遺伝子型について他の形質に対しての影響を検証した結果をまとめた。

表 1-1 肉質等級（脂肪交雑）の区別

等級		B. M. S.
5	かなり良いもの	No. 8～No. 1 2
4	やや良いもの	No. 5～No. 7
3	標準のもの	No. 3～No. 4
2	標準に準ずるもの	No. 2
1	劣るもの	No. 1

\*

### 去勢和牛枝肉の卸売価格



### めす和牛枝肉の卸売価格

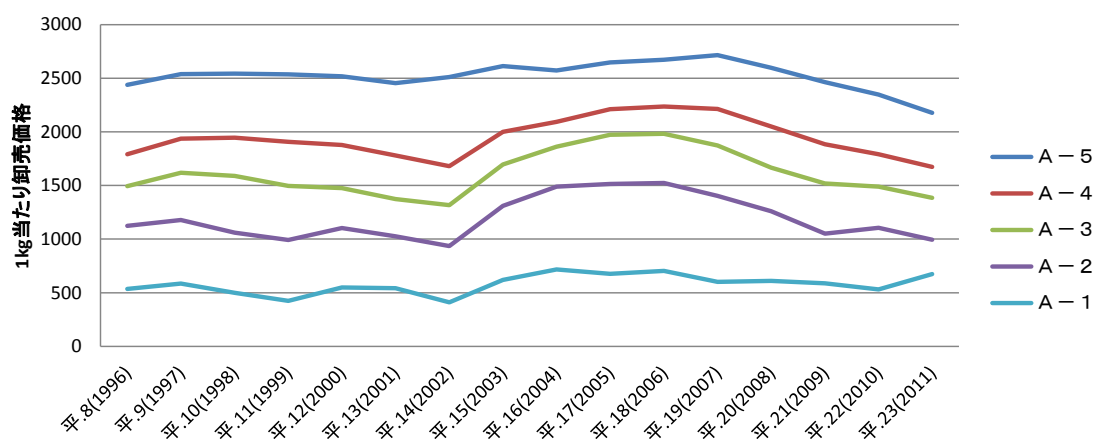


図 1-1 各格付けにおける枝肉 1 kg あたりの価格の推移

農林水産省 畜産物流通統計 食肉中央卸売市場規格別取引頭数・価格累年統計(2012)

より (\*出荷頭数が 0 頭の年は空白とした。)



## 第2章 遺伝子多型の効率的な測定法の開発

### 第1節 緒言

表現型に対する遺伝子の SNP の置換効果を正しく推定するためには、できるだけ多くの個体に対してその遺伝子型を検査し、データを蓄積する必要がある。本博士論文では、家畜改良事業団で実施された間接検定の集団を対象にしている。この間接検定では一年あたりおよそ 400 頭の検定材料牛で実施されており、3 年分を対象にすれば 1,351 頭ものサンプルをタイピングすることになる。さらに対象となる SNP は 5 個あるので 6,755 件もの膨大なタイピング数になるため、できるだけ効率的な手法を採用する必要がある。

SNP の遺伝子型をタイピングする方法として、これまでに様々な方法が開発、利用されてきている。最も代表的なものとして PCR-RFLP 法が挙げられる。本手法は PCR のためのサーマルサイクラーと一般的な電気泳動装置があれば、実験を行うことができ、極めて簡易で優れた方法であるため広く活用されている。しかしながら SNP が存在する配列に制限酵素の認識配列がない場合には適用することができず、汎用性は限られたものになる。また、遺伝子型の誤判定を防ぐには制限酵素にて完全に PCR 産物を消化する必要が有るため、反応に時間がかかり、多検体処理の妨げとなっている。その他にも PCR-SSCP 法(Kukita et al., 1997)、ダイレクトシーケンス法、Allele-Specific-PCR (もしくは Amplification Refractory Mutation System: ARMS) 法(Newton et al., 1989) などが広く利用されているが、特徴を表 2-1 に示したとおり、それぞれに長所短所がある。さらに、これらの手法は原則的に一回の操作で 1 つの SNP しかタイピングできず、処理能力にも限界がある。その一方で 96 個の SNP を一度に検出できる Digitag2 法(Nishida et al., 2007)や GolenGate 法(Shen et al., 2005)、さらに DNA アレイを用いた手法で数千から数万 SNP を一度の検出できるインフィニウム法などがあるが、数個程度の SNP を検出するには無駄が多くコストがかかりすぎるため本研究には不向きで

ある。

筆者は数ある検出法のうち、費用対効果の面から本研究に最も適したものとして、Hori ら(2003)の Sequence-Specific Primer Cycle Elongation (SSPCE)法に着目した。本手法は遺伝子型の配列特異的に伸長させた一本鎖 DNA (図 2-1) を専用の 1 分子蛍光分析装置 (MF10S: オリンパス光学工業株式会社) で測定するものであるが、本研究では、配列特異的プライマーに蛍光標識を施すことで、一般的な DNA シーケンサーで検出が可能になると考えられた。さらに SNP ごとに配列特異的に伸長させた一本鎖 DNA の鎖長を変更することで複数の SNP を一括して検出することが可能になると考え (図 2-2)、2STEP-MULTIPLE-PCR-SSP 法の開発を行った。

表 2-1 SNP 検出に使われる主な実験手法とその特徴

手法名	一回に検出する数	長所	短所
PCR-RFLP	1 個	安価、簡易な実験機器	制限酵素サイトがないものには使えない
PCR-SSCP	1 個	どんな配列にも対応できる 簡易	再現性が悪い
ダイレクト シーケンス	1 個	未知の SNP がある場合にも対応 どんな配列にも対応できる	シーケンサー装置が必要 試薬、キット代が高価
ARMS-PCR (Allele-Specific-PCR)	1 個	どんな配列にも対応できる 簡易	配列によって擬陽性が出やすい
Sequence-Specific Primer Cycle Elongation 法 (SSPCE)	1 個	どんな配列にも対応できる 簡易 擬陽性が出にくい	専用の装置が必要
TaqMan-PCR	1 個	簡易迅速	専用の装置が必要 試薬、キット代が高価
DNA アレイ	5000 ~ 100000 個	一度に数千~数十万の SNP を判定可能	専用の装置が必要 試薬、キット代が高価
DigiTag2 法	96 個		専用の装置が必要 試薬、キット代が高価

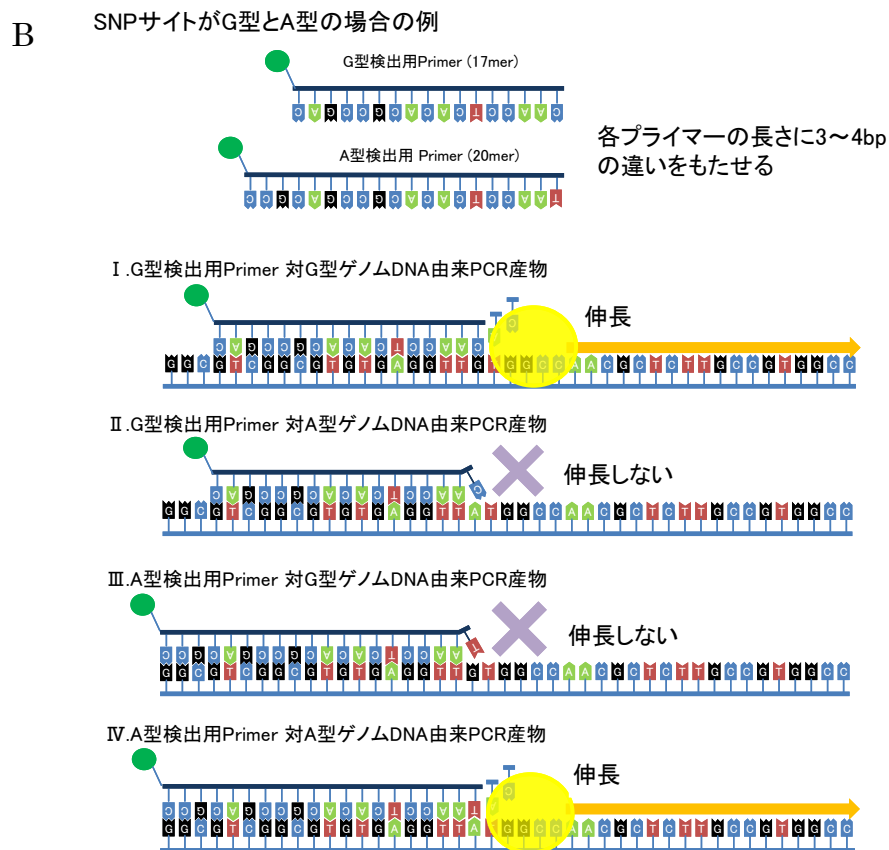
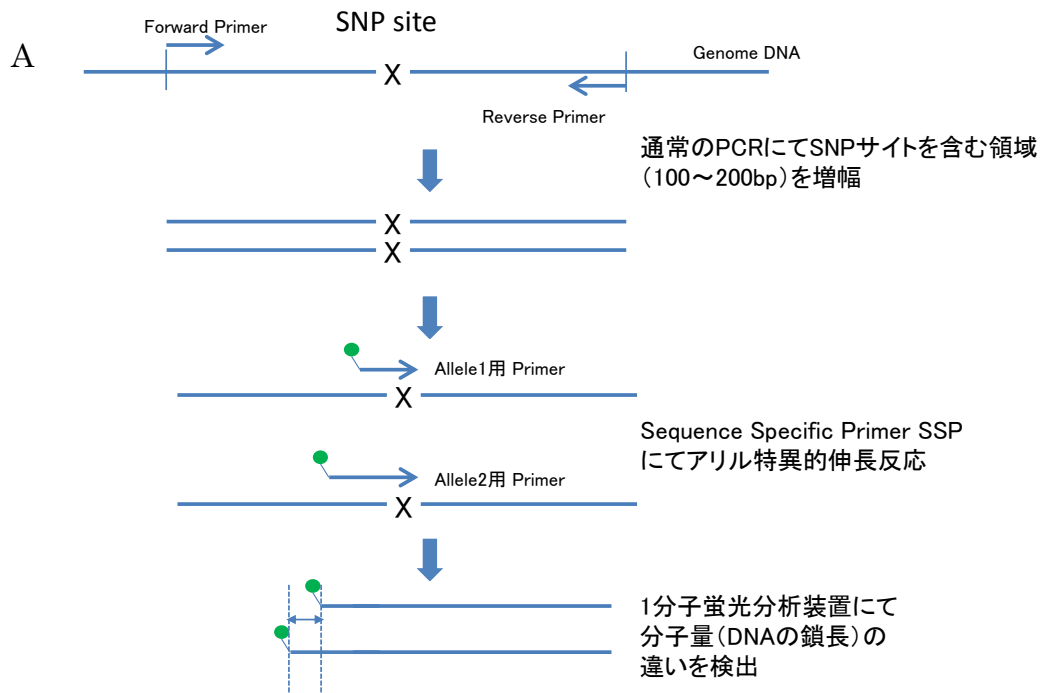


図 2-1 Sequence-Specific Primer Cycle Elongation (SSPCE)法の原理  
実験の流れと(A)、Sequence Specific Primer をもちいてアレル特異的伸長反応が起きる様子(B)

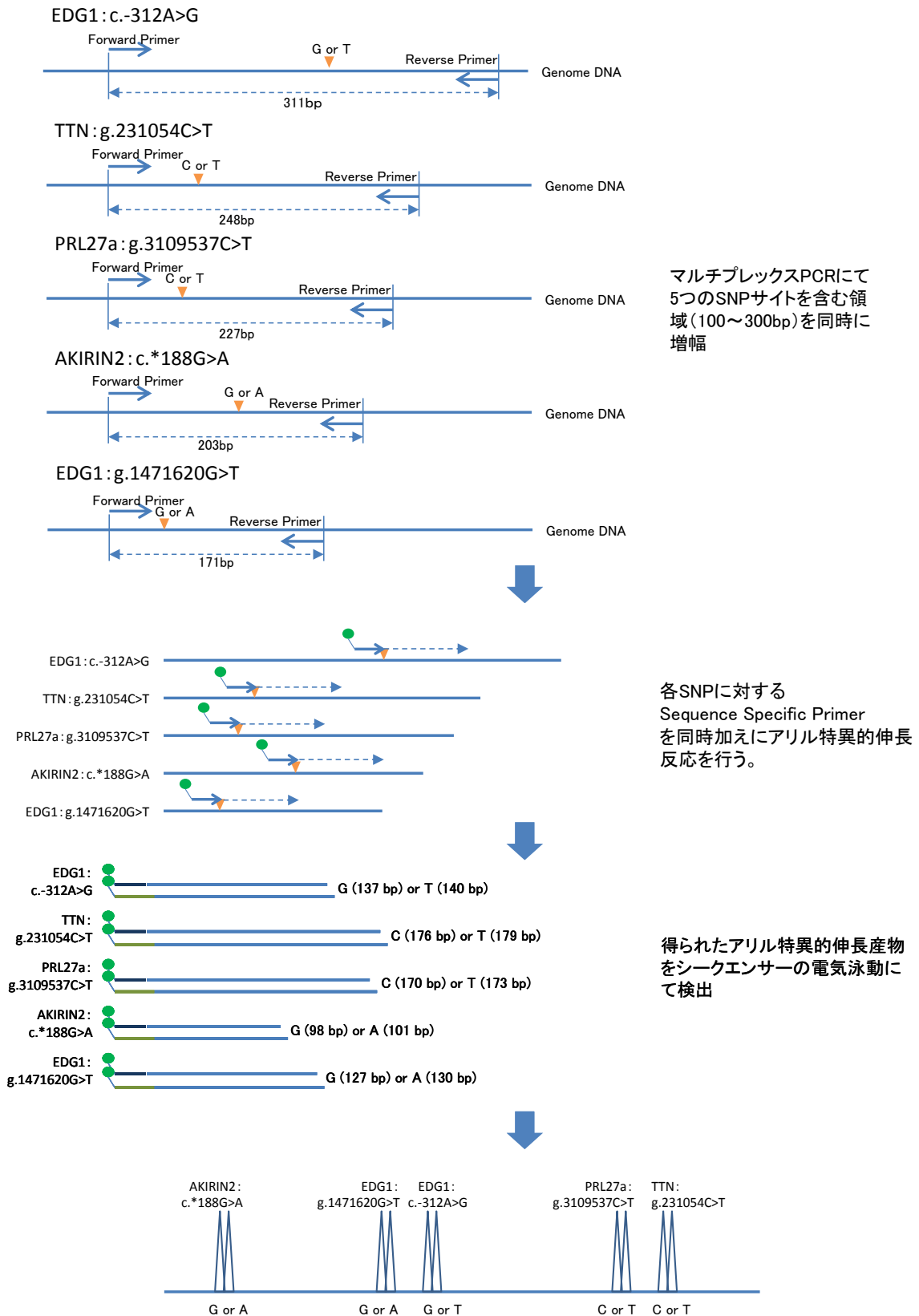


図 2-2 2STEP-MULTIPLE-PCR-SSP 法による 5SNP 同時検出の実験の流れ。

## 第2節 材料および方法

2STEP-MULTIPLE-PCR-SSP 法開発の試料として、先の研究で(Sasaki et al., 2009; Yamada et al., 2009c, b; Yamada et al., 2009d) SNP の探索に用いたホルスタイン種 2 頭、黒毛和種 2 頭をサンプルとして用いた。

最初に、対象とする 5 つの SNP を含む 100~300 bp の領域を同時に増幅するため、マルチプレックス PCR を行った。増幅用プライマーのデザインには Applied Biosystems 社の Primer Express™ を用い、5 つの SNP に対し選ばれた候補配列の中から、10 本のプライマーがお互いに最も相補鎖を持たないような配列を選択した(表 2-2)。相補鎖のチェックには Microsoft EXCEL に付属のマクロ言語 VBA を用いて作成したプログラムを用いた。マルチプレックス PCR には、キアゲン社の QIAGEN Multiplex PCR Kit を用いた。増幅用プライマーをそれぞれ 200  $\mu$ M になるように加え、反応液を調製した。PCR の条件は製品の標準の方法に従った。増幅産物の確認にはキアゲン社のキャピラリー電気泳動装置(HDA-GT12)を用いた。

次に、先の手順で増幅した PCR 産物を鋳型とし、アリル特異的な伸張反応を実施するための SNP 識別用プライマーのデザインを行った。SNP 識別用プライマーは図 2-1B に示すように 3' 末端が SNP サイトと重なるようになるようにし、プライマーの向きは、同時に反応させる 10 本の SNP 識別用プライマーがお互いに相補鎖を持たないような方向のものを選択した。相補鎖のチェックには前述のプログラムを用いた。反応液は 25  $\mu$ l の系で、Applied Biosystems 社の AmpliTaq polymerase を 0.5 U、dNTP を各 200 nM、表 2-3 のプライマーをそれぞれ 200  $\mu$ M、および先の PCR 反応液を 200 倍に希釈したものを鋳型 DNA として 1  $\mu$ l 加え調製した。プライマーはシーケンサーで検出するため、5' 末端を FAM 蛍光標識したのものを用いた。プライマーの配列によって GC 割合が異なるため、同濃度では T<sub>m</sub> 値が 10°C 近く異なる。このためプライマー毎に濃度を変え、表 2-4 に示した組成にて調製した。アリル特異的な伸張反応の条件については、95°C で 2 分間

の熱変性を行い、95°Cで20秒間、62°Cで40秒間を25サイクル繰り返した後、72°Cで10分間の伸長反応を行った。その後、伸長させたフラグメントをApplied Biosystems社の3730xl DNA Analyzerを用いて分離検出し、得られたエレクトロフェログラムから、フラグメント解析ソフトGeneMapper (Applied Biosystems社)を用い各遺伝子型の判定を行った。

表 2-2 目的部位増幅用 PCR プライマー配列

Gene	SNP	Direction	Sequence	GC (%)	Tm
EDG1	c. -312A>G	Forward	5' -TTGAGGCACTCAATCCTCCTC-' 3	52.4%	62.8 °C
		Reverse	5' -GCGTCGAGCTCTCAATTTACT-' 3	47.6%	59.8 °C
EDG1	g. 1471620G>T	Forward	5' -ATCTCTGGTTGGCAATTAAGA-' 3	38.1%	57.6 °C
		Reverse	5' -ACTGTATCGCTGAGCTAGGTT-' 3	47.6%	57.0 °C
TTN	g. 231054C>T	Forward	5' -AAACAAAACACTTGGCTACTCAG-' 3	39.1%	58.7 °C
		Reverse	5' -CAATGAAGAGAGTTAATTTATGCTATC-' 3	29.6%	57.2 °C
AKIRIN2	c. *188G>A	Forward	5' -AAGCTTTCGTCAGTGGCAA-' 3	47.4%	60.8 °C
		Reverse	5' -CACACCAGTGAAGGGCATGT-' 3	52.4%	64.4 °C
RPL27A	g. 3109537C>T	Forward	5' -AGGTTTCACAAAGAGACTCTGGAA-' 3	41.7%	61.7 °C
		Reverse	5' -TTCTGCTTGAGTTTCAATGAAATG-' 3	33.3%	61.6 °C

表 2 -3 SNP 識別用プライマー配列

Gene	SNP	Specific Allele	Sequence	GC (%)	Tm
EDG1	c. -312A>G	G Allele	5' -CAGCCGCACACTCCAAC-' 3	64.7%	61.3 °C
		A Allele	5' -CCGCAGCCGCACACTCCTAT-' 3	65.0%	69.1 °C*
EDG1	g. 1471620G>T	G Allele	5' -AGCTTGATAGTCAGGAAATAAGTG-' 3	37.5%	57.1 °C
		T Allele	5' -TGAAGCTTGATAGTCAGGAAATAAGTT-' 3	33.3%	61.0 °C
TTN	g. 231054C>T	C Allele	5' -GAATCTGAAAAAGAAATCATTACAC-' 3	26.9%	57.7 °C
		T Allele	5' -AAGGAATCTGAAAAAGAAATCATTACAT-' 3	24.1%	61.8 °C
AKIRIN2	c. *188G>A	G Allele	5' -AATACAGGTAGCAAAGGTCCAC-' 3	45.5%	58.4 °C
		A Allele	5' -ATTAATACAGGTAGCAAAGGTCCAT-' 3	36.0%	59.5 °C
RPL27A	g. 3109537C>T	C Allele	5' -CAGTGAGGTGAAGTACCTGG-' 3	55.0%	56.9 °C
		T Allele	5' -AGTCAGTGAGGTGAAGTACCTGA-' 3	47.8%	59.1 °C

表 2-4 アリル特異的な伸張反応のための反応液組成 A と反応条件 B

A

dH2O	5.15 ul
10X PCR Buffer	1.00 ul
dNTP (2.5mM )	0.80 ul
EDG1 c.-312A Allele Primer (10uM)	0.10 ul
EDG1 c.-312G Allele Primer (10uM)	0.04 ul
EDG1 g.1471620G Allele Primer (10uM)	0.08 ul
EDG1 g.1471620T Allele Primer (10uM)	0.08 ul
TTN g.231054C Allele Primer (10uM)	0.10 ul
TTN g.231054C Allele Primer (10uM)	0.10 ul
AKIRIN2 c.*188G Allele Primer (10uM)	0.10 ul
AKIRIN2 c.*188A Allele Primer (10uM)	0.10 ul
RPL27A g.3109537C Allele Primer (10uM)	0.70 ul
RPL27A g.3109537T Allele Primer (10uM)	0.50 ul
10 倍希釈 PCR 産物	1.00 ul
AmpliTaq polymerase	0.15 ul
<hr/>	
Total	10.00 ul

B

温度 (°C)	時間	
95°C	2 分	
↓		
95°C	20 秒	35CYCLES
60°C	40 秒	
↓		
72°C	10 分	



### 第3節 結果

開発の1段階目として目的の5つのSNPを含む100~300 bpの領域を同時に増幅するためのマルチプレックスPCRを行った。その結果、図2-3に示したように、5つの予想されるサイズのPCR産物を得ることができた。また、ノイズとなる非特異的な増幅産物やプライマーダイマーは見られなかった。

目的領域の増幅において極めて良好な結果が得られたため、次に2段階目であるアリアル特異的な伸張反応の条件検討を行った。最初の条件ではSNP識別用プライマーは完全に相補的な配列を用いて条件の検討を行った。しかし、EDG1:c. -312A>GのAllele2の反応において、本来起こるはずのないグアニン(G)とチミン(T)の組み合わせの3'末端から伸長が生じる、いわゆる擬陽性が見られた(図2-4A)。この擬陽性反応は、本来の陽性反応よりも弱いシグナル強度を示したが、その見極めは難しく、判定を困難なものにした。そこで図2-5に示したとおり、このプライマーの3'末端から3塩基目の配列がミスマッチとなるように配列の変更を行った。その結果、問題となる擬陽性は解消された(図2-4B)。最終的に決定した条件で一連の操作を行ったところ、図2-5に示すような明瞭な結果を得られ、それらの結果はすべて予め判明した結果と一致していた。

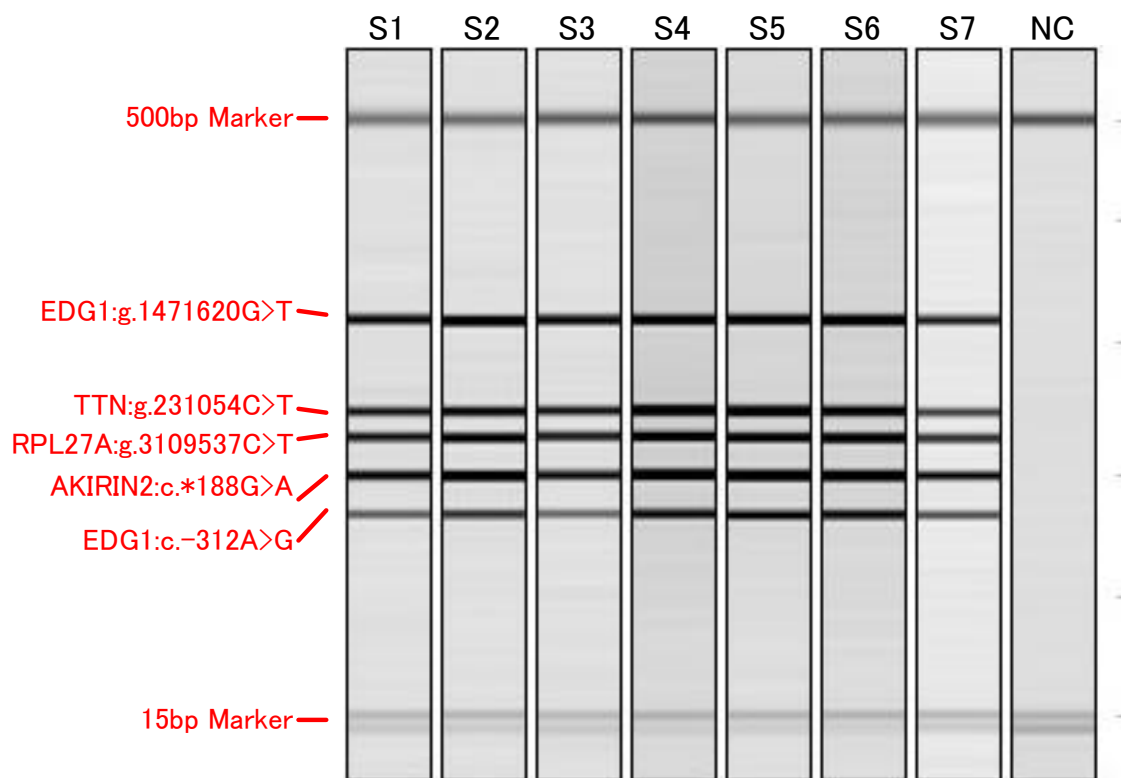


図 2-3 5つの SNP を含む 1 領域をマルチプレックス PCR にて一括増幅したもののキャピラリー電気泳動の結果。専用のサイズマーカーで調整されたデジタルイメージを示した。調整用サイズマーカーとして 15pb と 500bp の DNA 断片を使用。S1~S7 : サンプル NC : Negative Control DNA.

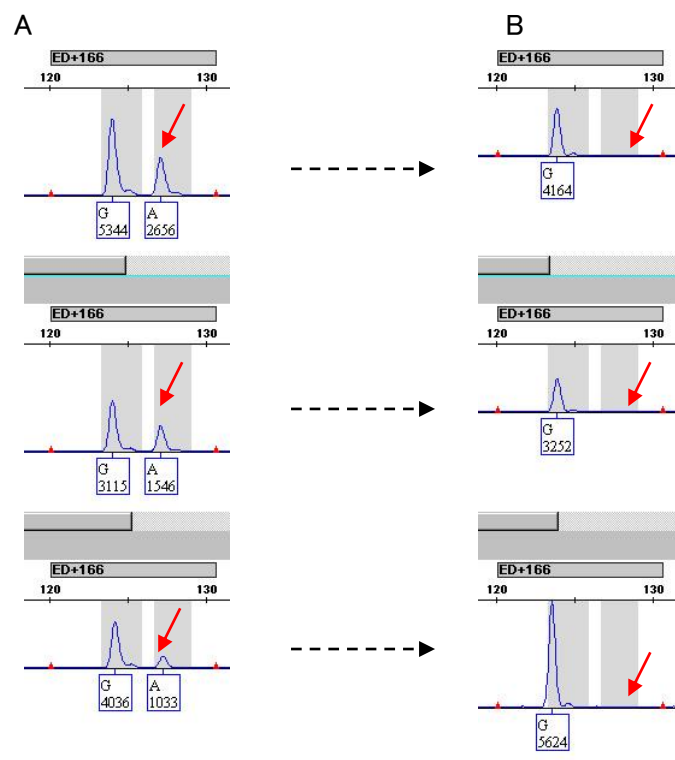


図 2-4 EDG1:c.-312A>G の GG 型サンプルで見られた擬陽性反応の例(A) と 変更後のプライマーでの結果(B) (プライマー変更にて疑陽性が完全に抑制されている。)

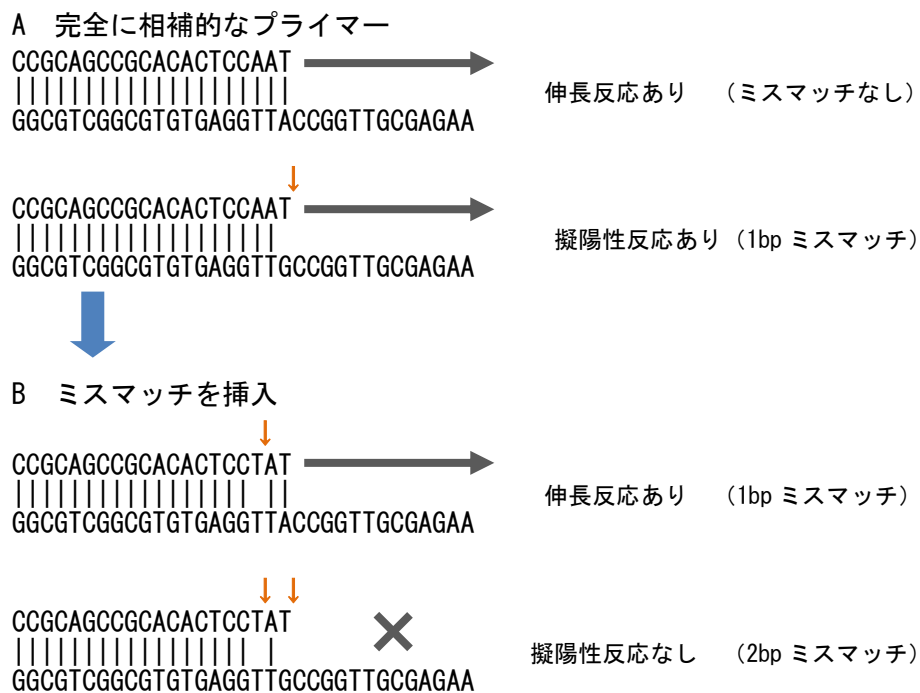


図 2-5 EDG1:c.-312A>G の Allele2 用プライマーの変更

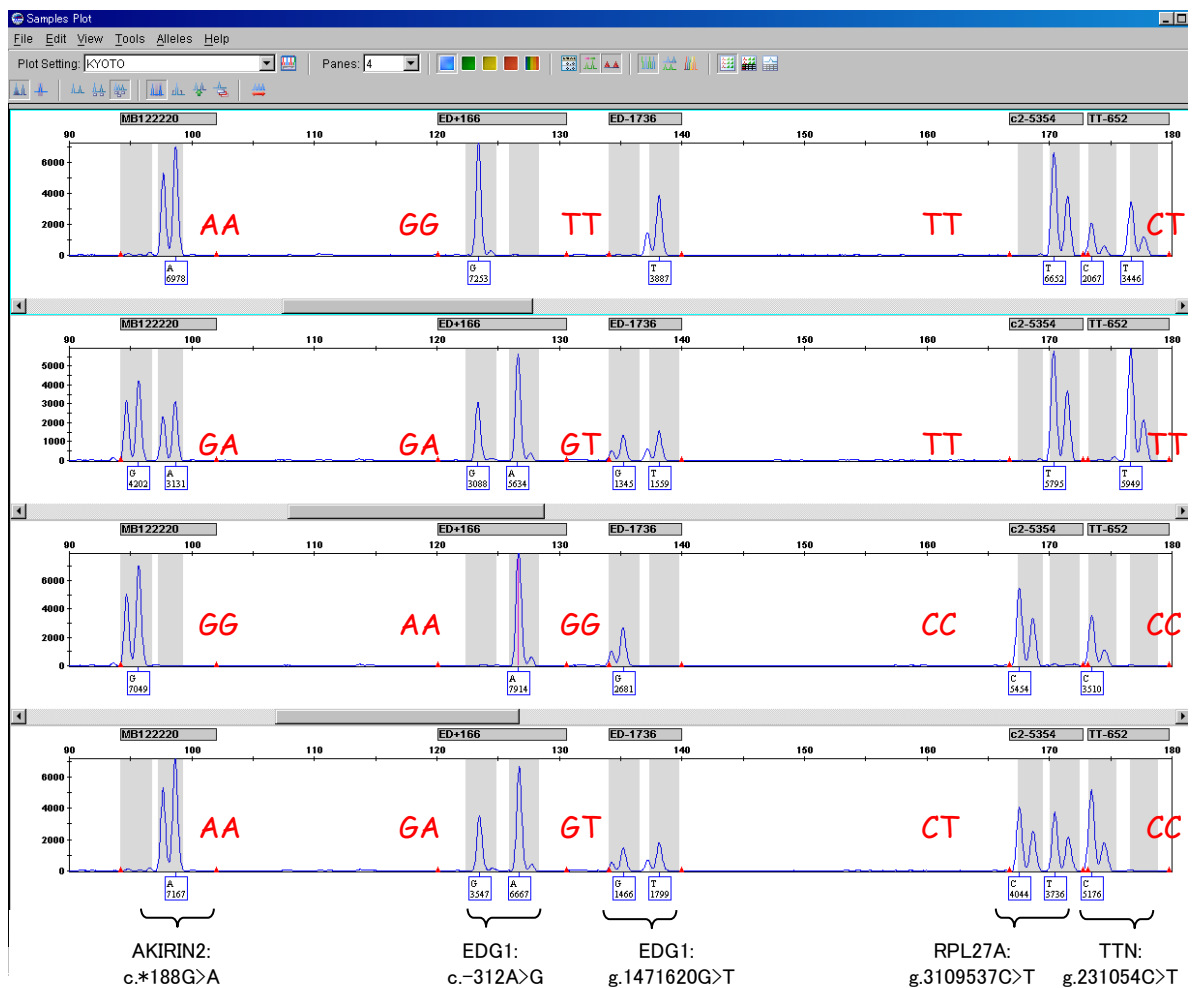


図 2-6 5つの SNP 一括検査による遺伝子型判定の結果

シーケンサーで得られたエレクトロフェログラム。左から AKIRIN2 の c. \*188G>A、EDG1 の c. -312A>G、EDG1 の g. 1471620G>T、RPL27A の g. 3109537C>T、TTN の g. 231054C>T の結果がピークとして観察されている。判定された遺伝子型をピークの隣に記している。得られた結果は全てダイレクトシーケンス法または PCR-RFLP 法の結果と一致していた。

#### 第4節 考 察

本研究では、対象となる5つのSNPを一括して効率的なタイピングを行うため、2STEP-MULTIPLE-PCR-SSP法の開発を試みた。PCRによる5つの領域の一括増幅は効率化の最も大きなポイントである。この一括増幅が適切になされるためにはプライマーのデザインが最も重要だと考えられる。通常のPCRにおいても、互いの（あるいは自身の）プライマーの3'末端の配列が3bp以上相補的な配列になっている場合プライマーダイマーを形成し、本来の配列の増幅効率が著しく低下することが知られている。市販のプライマー設計ソフトにはこのプライマーダイマーを起こさないように3'末端の配列をチェックしながら適切なプライマーペアを自動に選択する機能が実装されているものがある。しかしながら、それらソフトウェアのほとんどが2本のプライマーペアについてのみチェックするもので、本研究で使ったように10本のプライマーを同時に反応させた場合のプライマーダイマーのチェックが可能なものはない。通常のPCRのように2本のプライマーペアをチェックする場合、プライマー自身の配列と、プライマー間の配列の3通りしかないので、目視による確認でも可能である。しかしプライマーが10本の場合、プライマー同士の組み合わせは55通りとなり、確認作業は現実的に困難なものとなる。本研究で作成した相補鎖のチェックプログラムは20本（210通り）までの確認が可能である。このチェックプログラムを活用したことで、10本の適切なプライマーセットを選択することが極めて効率的になった。こうして作成したプライマーはたった一回の実験で、図2-3で示したような、ほぼ満足出来る結果を得ることができ、今回使用したプライマー作成の手順は有効なものであると思われた。

SNP識別用プライマーのデザインは正しく遺伝子型を判定する上で最も重要なポイントである。しかしながら、アリル特異的な伸張反応をさせるには、SNP識別用プライマーは3'末端をSNP部位と一致させておく必要が有るためデザインの自由度は低い。デザイン時に決定しておくべき最も重要な事項は、伸長させる方向と思われる。伸長させ

る方向を遺伝子の上流側にするか下流側にするかによって、プライマーの配列は変わるため、同時に反応させる5つのSNP識別用プライマーセットの組み合わせは32 (=2<sup>5</sup>)通りとなる。適切なアリル特異的伸長反応を実施するためには、増幅用プライマーのデザインと同じく、プライマーダイマーを避ける必要があり、このためには、お互いに相補鎖を持たないような方向の配列を32通りの中から選択する必要がある。SNP識別用プライマーのデザインにおいても前述のチェックプログラムは大きな助けとなった。

Newton ら(1989)が開発したARMS法の報告によれば、アリル特異的な伸張反応において3'末端のミスマッチの組み合わせが、G-Tである場合、本来起きないはずの伸長反応が起きやすいことが報告されている。EDG1 : c. -312A>GのA Allele用のプライマーはG Allele由来のテンプレートDNAとアニールする際このG-Tの組み合わせになっている。このため最初に検討を行った「完全に相補的なプライマー」では擬陽性が発生してしまい、結果として3'末端から3塩基目に人為的なミスマッチを加える必要があった。この手法はARMS法でも使用されている方法であり、本研究における擬陽性の抑制に極めて有効であった。

ARMS法と2STEP-MULTIPLE-PCR-SSP法の実験手順を比較した場合、一見するとPCRの増幅とアリル特異的な伸張反応を1ステップで行うARMS法の方が、効率が良いように思われる。しかし、ARMS法はその原理において擬陽性を生じさせ安い傾向にあり、また一括反応系の構築が困難な理由がある。

擬陽性が出やすい原因として、図2-7Aに示すようなことが考えられる。アリル特異的な伸張反応は完全なものではなく一定の確率で擬陽性反応が生じていると考えられる。ARMS法のように増幅とアリル特異的な伸張反応が同時に行われている反応系の中では、一旦生じた産物はPCRの次のサイクルで増幅のための鋳型として機能している。このため本来の反応産物だけでなく、擬陽性の反応産物も反応系の中では等比級数的に増加してしまい、本来の陽性反応と区別がつかなくなる。

その一方で、2STEP-MULTIPLE-PCR-SSP 法で採用した、アリル特異的な伸張反応を増幅と分けて行う手法の場合、伸張反応の反応産物は、次のサイクルでの鋳型として機能しないため、伸長反応は等差級数的に生じ、サイクルごとに最初に投入した鋳型 DNA の量ずつ増えていく。もちろん ARMS 法の場合と同じく一定の確率で擬陽性反応は生じているが、等差級数的な反応の中では本来の反応と、擬陽性反応の比は常に一定であると考えられ(図 2-7B)、本来の陽性反応の区別が容易になり、より安定したタイピングができると考えられる。

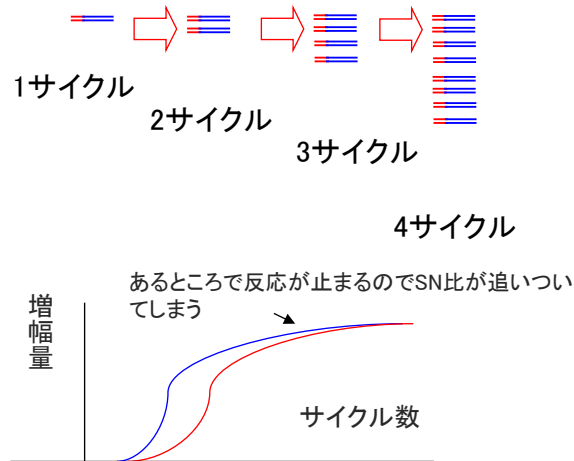
また ARMS 法は一度に増幅用と SNP 識別用のプライマーを一度に同じ反応液に加えるため、2STEP-MULTIPLE-PCR-SSP 法に比べ 2 倍の数のプライマーが入ることになる。同時に反応するプライマーの数が増えることで、その分、3' 末端同士が相補的になる組み合わせが生じる可能性は高くなり、結果プライマーダイマーが生じる可能性も高くなる。こういったことから ARMS 法にて一括反応系の構築をすることは困難なものと予想される。

2STEP-MULTIPLE-PCR-SSP 法においても同時に検査できる SNP の数には限界があり、前述の ARMS 法と同じ理由で、同時に反応させるプライマーの数が多くなればなるほど反応系の構築は困難なものと予想される。しかしながら本研究で示したように 5 個程度の SNP であれば反応系の構築はそれほど困難なものではなく数回の実験で完成させることができた。また、本手法は DNA シーケンサーのような 3bp 以上の差を正しく分離できる装置さえあれば、あとは専用のキットや特殊な試薬を必要とせず、極めて汎用性の高い手法である。

以上の理由から今回新たに開発した 2STEP-MULTIPLE-PCR-SSP 法は 5 つの SNP について多数の検体から効率的に遺伝子型のデータを得るための手法として、現時点で最も優れたものであると考えられた。

A ARMS 法での擬陽性産物の増え方

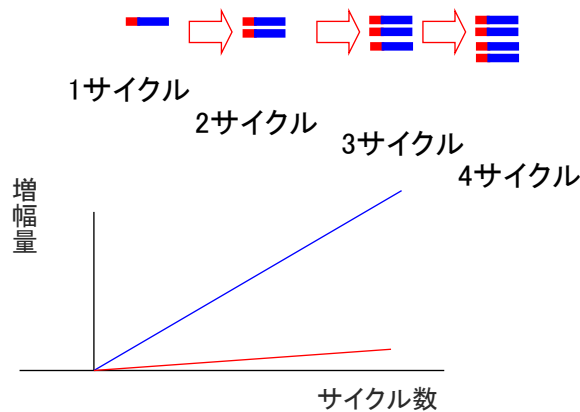
数十～数百分の一の確率で誤反応が起き、誤反応PCR産物が鑄型として機能



級数的に間違った産物が増え  
てしまう→ 誤判定しやすい

B 2STEP-MULTIPLE-PCR-SSP 法での擬陽性産物の増え方

数十～数百分の一の確率で誤反応が起きるが鑄型として機能しない。



加算的に増えるため、SN  
比は維持される

図 2-7 ARMS 法と 2STEP-MULTIPLE-PCR-SSP 法の比較



## 第5節 要約

1,351頭ものサンプルを対象に5つのSNPのタイピングを行うには、効率的な検査系の確立が必要である。本研究では目的の5つのSNPを含む100~300bpの領域を同時に増幅したあとで、5つのSNPに対してアリル特異的反応を行い、遺伝子型を検出する、2STEP-MULTIPLE-PCR-SSP法の開発を行った。最初にデザインしたミスマッチを含まないSNP識別用プライマーはEDG1:c.-312A>Gの検出において擬陽性を示したが、ARMS法で使われている人為的にミスマッチを追加する手法を応用することでこれを解決した。最終的に決定した条件で一連の操作を行ったところ、5つすべてのSNPに対し明瞭な結果が得られ、それらの結果は全て予め判明した結果と一致していた。本手法は専用の特異な装置やキットを必要とせず、反応系の構築も容易であり、本研究に用いる手法としては最も優れたものであると考えられた。

### 第3章 各遺伝子における遺伝子型の効果の検証

#### 第1節 緒言

これまでの研究(Sasaki et al., 2009; Yamada et al., 2009a; Yamada et al., 2009b, c; Yamada et al., 2009d) によって脂肪交雑に対して有意な遺伝子型効果が観察されることが示されたEDG1のg.1471620G>T、同じくEDG1のc.-312A>G、TTNのg.231054C>T、AKIRIN2のc.\*188G>A、RPL27Aのg.3109537C>Tという5つのSNPは大分県産黒毛和種の種雄牛集団およびその後代肥育牛集団を対象にした相関解析によって脂肪交雑に対して有意な遺伝子型効果が観察されることが示された。その中でEDG1のc.-312A>G、EDG1のg.1471620G>T、TTNのg.231054C>T、AKIRIN2のc.\*188G>A、RPL27Aのg.3109537C>Tの各SNPは、それぞれA、G、C、G、Cアリルに対してG、T、T、A、Tアリルが脂肪交雑についてプラスの効果をもつことが明らかにされた。このことから、これら5つのSNPが育種改良に応用できる可能性が示されたが、この結果は限られた特定の地域や血統での解析結果であるため、黒毛和種集団全体で活用するためには、より広い範囲にわたる多数の集団で解析し、効果の大きさを正確に把握する必要がある。

家畜改良事業団にて候補種雄牛の能力評価のため実施されていた間接検定では、ステーション方式を採用しており種雄牛の後代(調査牛)の集団を飼料や肥育方法などを一定の条件下で管理しているため、環境要因が一般の肥育牛集団よりも小さいと考えられる。候補種雄牛の数も年間30~40頭と多く、この候補種雄牛の集団に含まれる血統も遺伝的に多様なものとなっていて、現行の広く利用されている田尻系、気高系、藤良系、茂金系に加え岩田系など希少な系統も含まれている。このため従来の研究に比べより黒毛和種全体を反映した集団と考えられる。また、調査牛を生産するための調整交配も全国の道県で行われており、母系の面からもより黒毛和種集団全体の遺伝的な背景を反映しているものと考えられる。以上の理由から、家畜改良事業団の間接検定の集団はSNP

の効果を正確に把握するには最適なものと考えられる。

本研究では家畜改良事業団の多数の間接検定調査牛の集団を対象に、第2章で開発した2STEP-MULTIPLE-PCR-SSP法を用いてタイピングを実施し、そこから得られたSNPの遺伝子型と脂肪交雑成績との相関解析を行い、5つのSNPにおける遺伝子置換効果の検討を行った。

## 第2節 材料および方法

遺伝子型と脂肪交雑成績との相関解析のために、家畜改良事業団の間接検定で、2003年～2005年の間に生まれた検定調査牛を対象にした。脂肪交雑の成績として、検定のために測定された12段階で表される牛脂肪交雑基準値(BMS)を使用した。タイピングのための試料は、検定調査牛が格付けされる際に第6-7肋骨間の切開面の僧帽筋を薄くスライスすることで収集した。3年分で1,351頭の試料を収集し、得られた試料から既法に従いDNAを抽出した。

得られたDNAサンプルに対し第2章で開発した2STEP-MULTIPLE-PCR-SSP法を用いてタイピングを実施し遺伝子型を決定した。

間接検定調査牛の集団は一般の肥育牛集団に比べ環境要因がよく管理されている集団ではあるが、記録されている脂肪交雑の表現型には肥育された年の影響など考慮すべき環境要因が残っている。そこで、脂肪交雑成績から環境要因を除去するためBLUP法による育種価の推定を行った。算出のために1995年から2006年の間に生まれた検定調査牛5,154頭の脂肪交雑成績と、調査牛から三代祖まで遡って出現する20,597頭の血統データを用いた。統計モデルには変量効果として個体の育種価を、母数効果として検定場、検定年、肥育時期を取り上げ、赤池情報量基準(AIC)が最小になるように次式を採用した(付属資料3 参照)。

$$Y_{ijkl} = F_i + Y_j + T_k + A_{ijkl} + e_{ijkl}$$

ここで、 $Y_{ijkl}$  は形質の観測値、 $F_i$  は  $i$  番目の検定場に関する母数効果、 $Y_j$  は  $j$  番目の検定年に関する母数効果、 $T_k$  は  $k$  番目の肥育時期の母数効果、 $A_{ijkl}$  は  $ijkl$  番目の個体の育種価、 $e_{ijkl}$  は残差を表す。

上記の推定育種価の計算において、収集したフィールドデータおよび血統データの通番化には佐々木ら(1985)によるプログラム PRETRT を用い、推定育種価の計算用プログラムには Boldman ら(1993)によるプログラム MTDFREML を用いた。

こうして得られた推定育種価と遺伝子型の関連を調べるため、脂肪交雑の推定育種価を目的変数とし、各遺伝子型を要因として取り上げた一般線形モデルを用いた平均値の差の検定を行い、遺伝子型効果の有意性を検定した。その後、各遺伝子型の最小二乗平均値間の差について多重比較検定を行った。これらの検定には Tukey-Kramer の多重比較法を用いた。

### 第3節 結果

2STEP-MULTIPLE-PCR-SSP 法を用いて検定調査牛集団から収集したサンプルについて、5 つの SNP の遺伝子型をタイピングした結果を表 3-1 および図 3-1 に示した。シグナルが弱く遺伝子型が不明瞭であったものは統計解析から除外した。5 つの SNP における各遺伝子型の頻度と遺伝子頻度より予想される期待値との間の適合度についてフィッシャーの直接確率検定を行ったところ、いずれの SNP においてもハーディー・ワインベルグの法則に従っているとみなすことができた。このことから本研究に用いた集団は、階層化や恣意的な選抜淘汰などがなく、遺伝子型の効果を検討するにあたって問題のない集団であることが確認された。

脂肪交雑への各遺伝子型の効果を検討するにあたっては、直接、脂肪交雑成績を対象に平均値の差を検討したところで、環境要因が含まれているため正確な遺伝子型の置換効果を推定することはできない。そこで各環境要因を除去するため BLUP 法による育

種価の推定を行った。このため、遺伝子型をタイピングした個体はもとより、その前後の12年間に実施された間接検定の検定成績について収集整理を行った。

育種価推定のための統計モデルの構築のための予備的な解析として、育種価推定時の統計モデルに、どの環境要因を取り込むべきかを検討する必要がある。このため、各環境要因が脂肪交雑に影響を与えているかを検討した。

検定を行った年（以下、検定年）の効果については、図3-2および図3-3に示したとおり、脂肪交雑の成績が上昇しており、検定年次間でその平均値の差は有意であった（表3-3A）。このことから、検定年を要因として取り上げることが妥当と考えられ、母数効果としてモデル式に取りこむこととした。次に、検定を行った農場（検定場）の効果について検討を行った。本研究で対象にした間接検定は北海道と広島の2箇所の検定場で行われ（表3-2）、飼育等数において大きな偏りが見られないように配置されていた。原則として、飼料など飼育方法については共通であり、2つの検定場間で全体としては有意な差は見られなかった（表3-3B）。しかし、年度ごとに2つの検定場間差を比べたところ1999年において5%水準で優位な差が見られた（図3-4）。このことから、検定場についても要因として取り上げ母数としてモデル式に取り入れることとした。本間接検定では生年月日が近いもの（2ヶ月以内）を1つのグループ（期）としてまとめ、同じ期に含まれる調査牛は同時に肥育を開始し、同時に肥育を終了させ出荷、枝肉調査を行っている。このグループは4月上旬から6月下旬までの肥育開始時期によって1～9期までに分けられる。すなわち同じ期に属するものは同じ季節に肥育を実施したものとみなせる。この肥育時期に関しての効果について期-間での平均値の差を検定したところ、その差は有意であった（表3-3C）。このことから、肥育時期についても要因として取り上げることが妥当と考えられ、母数効果としてモデル式に取りこむこととした。

全てのグループでの肥育期間は52週に統一されていたため、肥育月齢のばらつきは2ヶ月以内であり、この短期間のばらつきの中では肥育月齢とBMSの間には相関は見ら

れなかった(図 3-4)。商業用集団を用いた脂肪交雑の育種価推定では肥育期間を共変量として取り上げることが多いが、本研究においては、前述の状況から、肥育期間を要因として取り上げないことにした。

このように決定したモデル式を用いて、BLUP 法による育種価の推定を行った結果、遺伝分散=2.35532、環境分散=1.06856、遺伝率=0.69 であった。推定された現場検定調査牛の育種価の正確度 (rTI) は 0.8~0.85 であり、候補種雄牛と同等の正確度であることが確認された(図 3-5)。

こうして得られた、検定調査牛における脂肪交雑の推定育種価を対象にして、遺伝子型ごとに一般線形モデルによる検定を行った結果を表 3-4 および図 3-6 に示した。EDG1 の g.1471620G>T、AKIRIN2 の c.188G>A、RPL27A の g.3109537C>T では有意な遺伝子型効果は観察されなかったが、EDG1 の c.-312A>G および TTN の g.231054C>T については有意な効果がみられた。遺伝子型の最小二乗平均値間を比較したところ、EDG1 の c.-312A>G については AA 型と GG 型の間において 5%水準で有意な差が認められ、A アリルよりも G アリルをもつ個体の脂肪交雑の推定育種価は高く、AA 型と AG 型の間で 0.13、AG 型と GG 型の間で 0.11 の差がみられた。また、TTN の g.231054C>T については TT 型と CT 型の間において 5%水準で有意な差が認められ C アリルよりも T アリルをもつ個体の脂肪交雑の推定育種価は高く、CC 型と CT 型の間で 0.06、CT 型と TT 型の間で 0.40 の差がみられた。

Sukegawa ら (2013) の報告によればこれら遺伝子間の交互作用が確認されている。2 つの遺伝子の SNP を組み合わせた型の平均値を比較したところ交互作用の存在を覗わせるプロットが得られたが、検定の結果交互作用はいずれの組み合わせでも有意ではなかった (付属資料 2 参照)。

表 3-1

間接検定調査牛の 5 つの SNP における遺伝子型のタイピング結果(A)、および遺伝子頻度(B)

(A)

SNP	遺伝子型	頭数	頻度	HWE 期待値*
EDG1: c.-312A>G	AA	426	0.331	420
	GA	619	0.481	630
	GG	242	0.188	236
EDG1: g.1471620G>T	GG	472	0.370	461
	GT	589	0.462	611
	TT	213	0.167	202
TTN: g.231054C>T	CC	708	0.613	700
	CT	382	0.331	399
	TT	65	0.056	57
AKIRIN2: c.*188G>A	GG	410	0.311	421
	GA	669	0.508	647
	AA	238	0.181	249
RPL27A: g.3109537C>T	CC	296	0.246	299
	CT	606	0.505	600
	TT	299	0.249	302

(B)

SNP	SNP	頻度
EDG1: c.-312A>G	A	0.646
	G	0.575
EDG1: g.1471620G>T	G	0.648
	T	0.546
TTN: g.231054C>T	C	0.637
	T	0.359
AKIRIN2: c.*188G>A	G	0.664
	A	0.598
RPL27A: g.3109537C>T	C	0.628
	T	0.629

\*ハーディー・ワインベルグ平衡の期待値と実際の頭数の間に有意差無し。

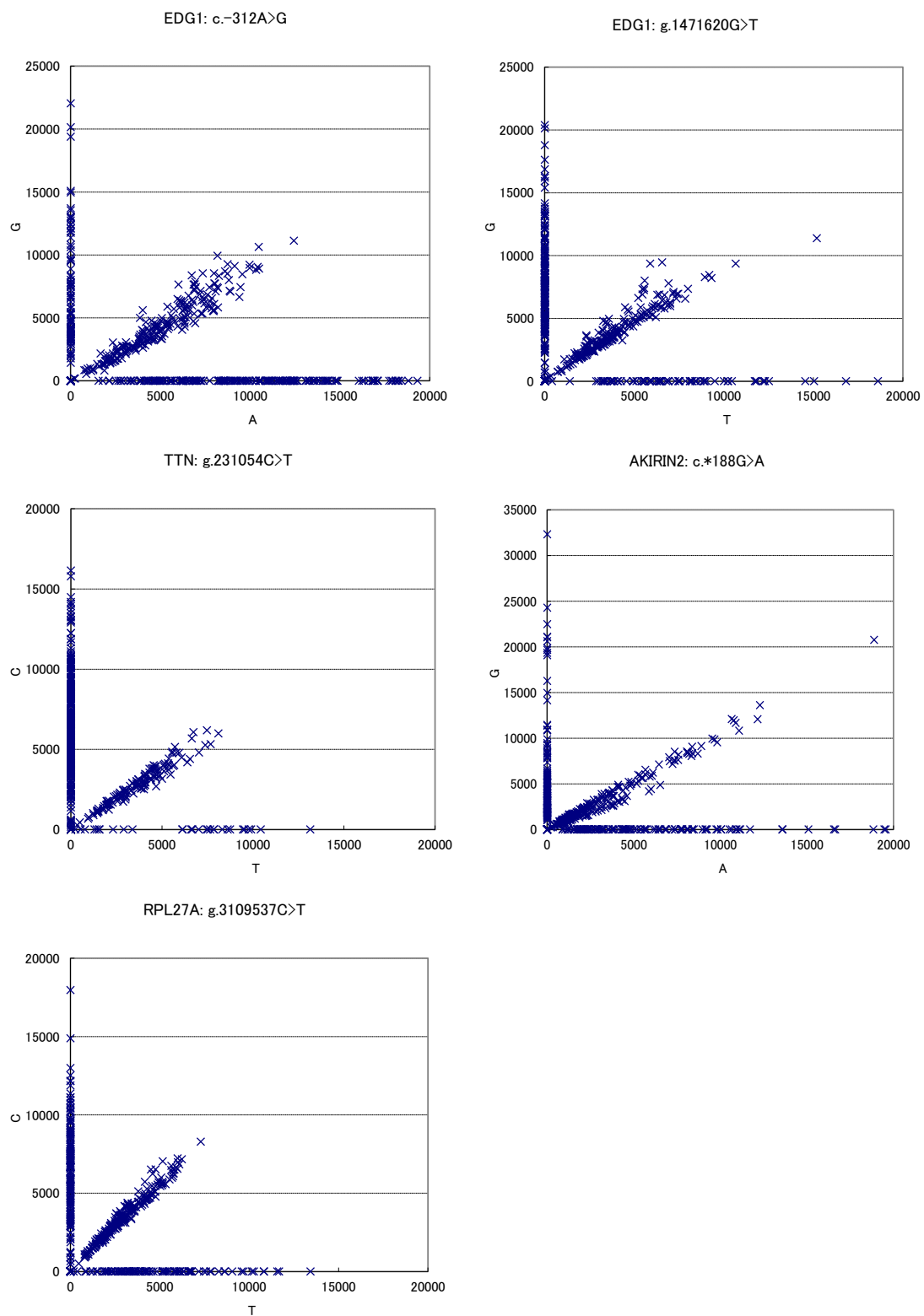


図 3-1 間接検定調査牛の 5 つの SNP における遺伝子型のタイピング結果



表 3-2 推定育種価計算に用いた間接検定調査牛の検定場、検定年、肥育グループのデータ数をまとめたクロス表

(A) 検定場×検定年

検定年	検定場		
	北海道	広島県	総計
1995	199	207	406
1996	174	179	353
1997	177	198	375
1998	191	203	394
1999	262	258	520
2000	238	217	455
2001	214	205	419
2002	231	216	447
2003	236	241	477
2004	205	202	407
2005	227	222	449
2006	229	223	452
総計	2583	2571	5154

(B) グループ×検定年

検定年	グループ*										総計
	1期	2期	3期	4期	5期	6期	7期	8期	9期	10期	
1995	53	54	54	23	53	56	59	54			406
1996	46	47	46	23	48	50	49	44			353
1997	53	49	55	53	50	46	21	48			375
1998	39	56	57	37	52	57	51	45			394
1999	55	28	55	59	58	58	59	30	58	60	520
2000	56	27	56	46	55	54	56	25	41	39	455
2001	48	54	53	49	51	57	58	49			419
2002	55	53	56	56	56	57	57	57			447
2003	54	52	48	47	57	53	53	49	64		477
2004	53	55	55	56	51	46	42	49			407
2005	55	55	54	50	61	60	58	30	26		449
2006	53	55	55	57	54	56	57	65			452
総計	620	585	644	556	646	650	620	545	189	99	5154

\*検定材料牛は4月から7月までの間に1～10期に分けて出荷される。

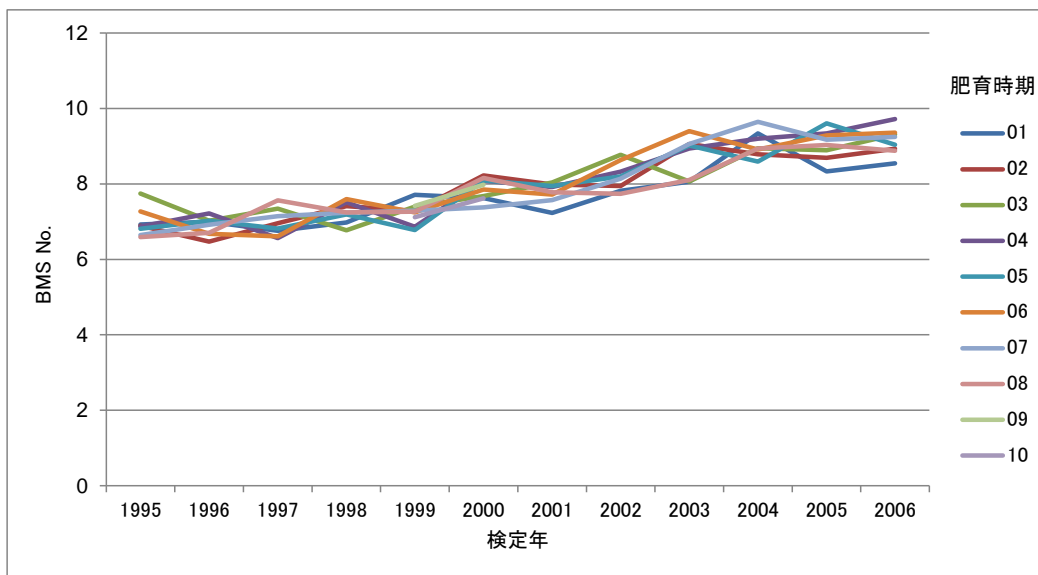


図 3-2 間接検定調査牛の各肥育時期の脂肪交雑成績の年ごとの変化

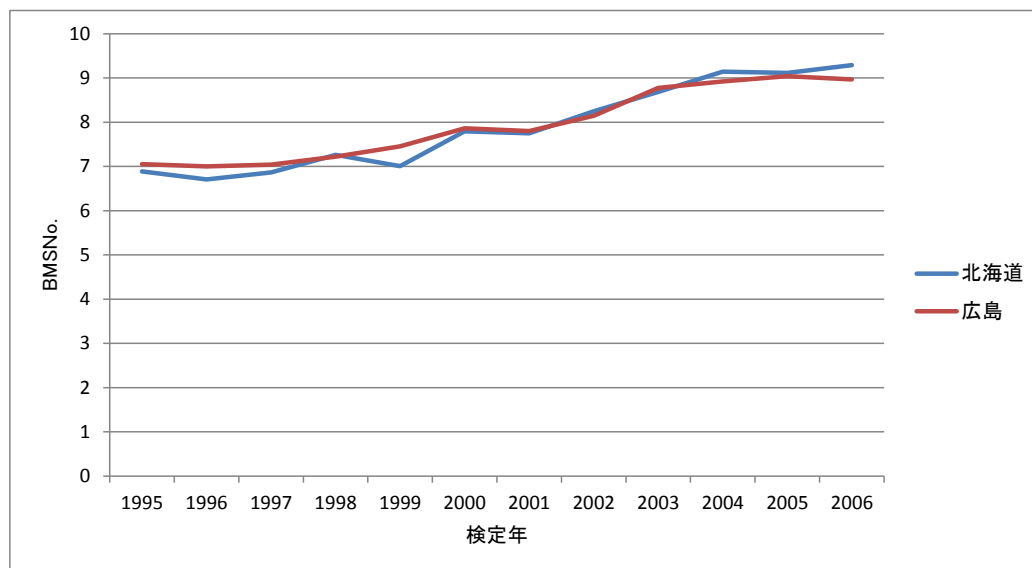


図 3-3 間接検定調査牛の各検定場の脂肪交雑成績の年ごとの変化、肥育時期

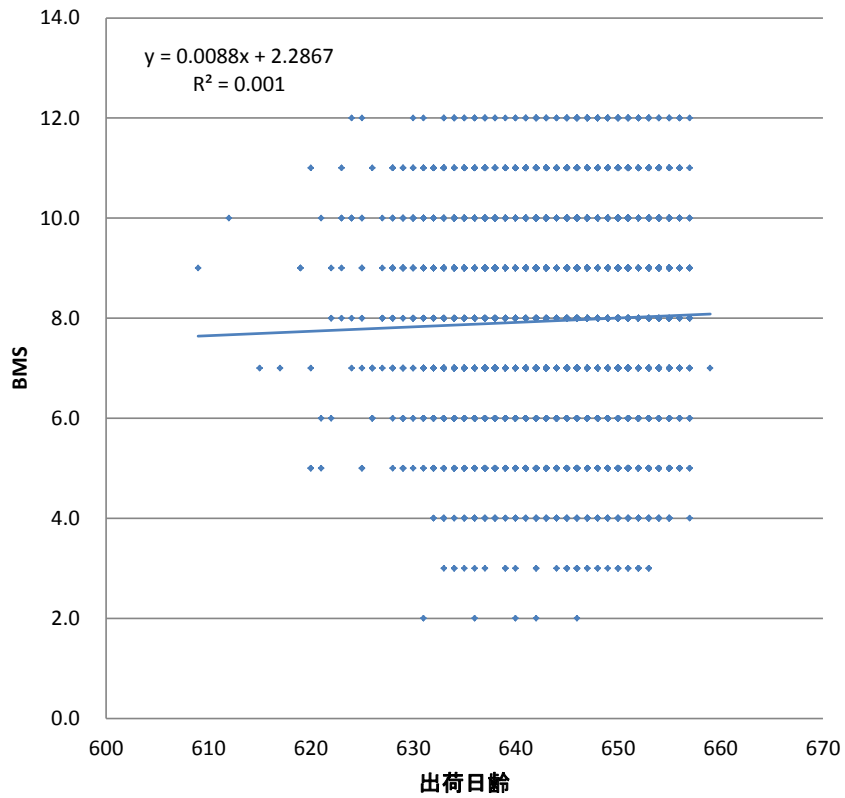


図 3-4 間接検定調査牛の出荷日齢の脂肪交雑成績との相関

表 3-3 脂肪交雑に対する 各要因の分散分析の結果

(A)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
YEAR	11	3660.6	332.79	99.95	<2.2e-16 ***
Residuals	5142	17120.4	3.33		

(B)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
FARM	1	0.8	0.8310	0.206	0.6499
Residuals	5152	20780.2	4.0334		

(C)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
GROUP	9	136.8	15.2034	3.7883	8.913e-05 ***
Residuals	5144	20644.2	4.0133		

significant. Codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

### 正確度の分布

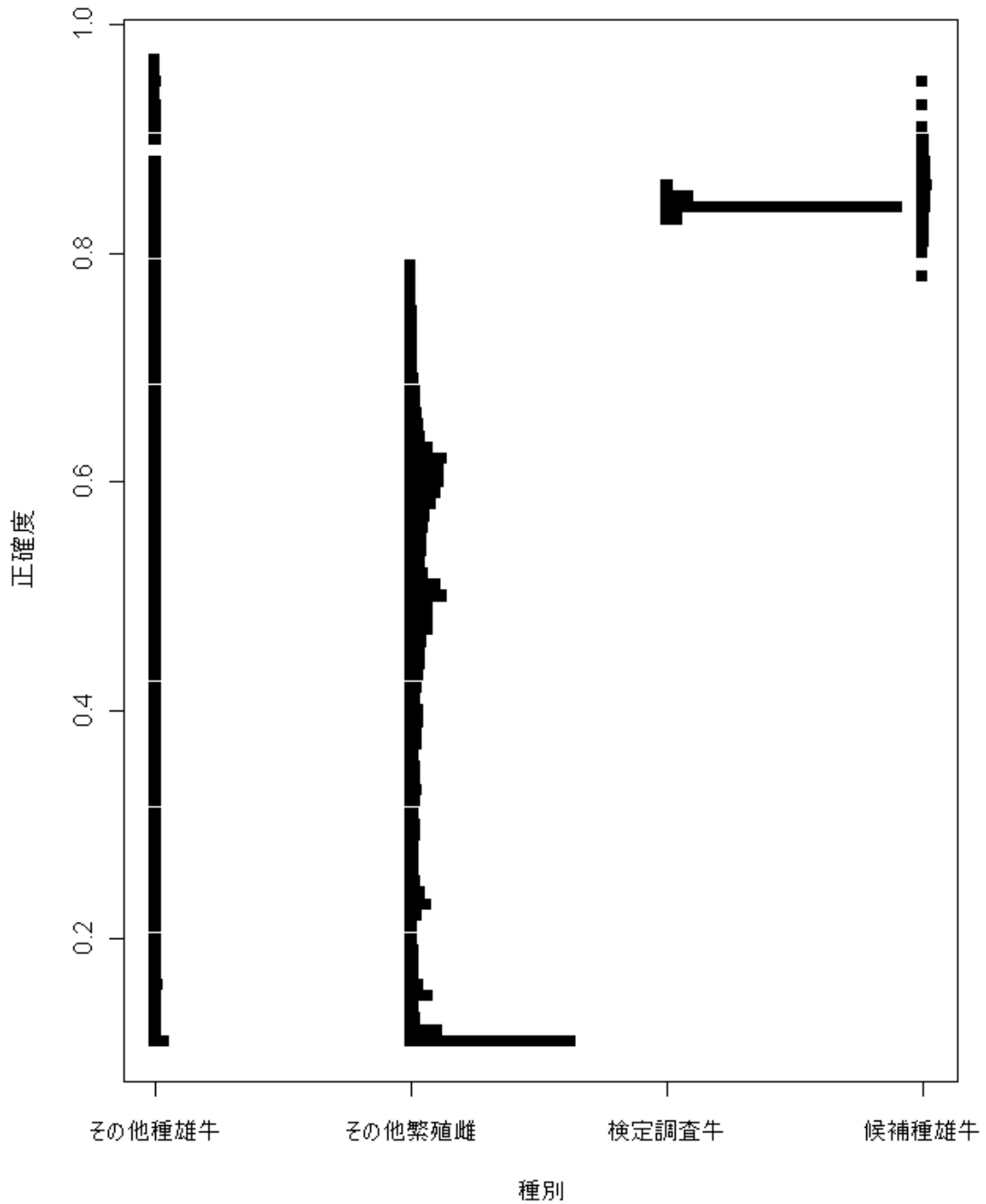


図 3-5 個体ごとの推定育種価の正確度（縦軸）の分布を示した群別プロット図

表 3-4 相関解析の結果, および5つのSNPにおける遺伝子型ごとの脂肪交雑推定育種価の最小二乗平均値

SNP	遺伝子型	平均値	95%信頼区間	有意確率
EDG1: c.-312A>G	AA	1.034	±0.124 <sup>a</sup>	0.034
	GA	1.160	±0.103 <sup>ab</sup>	
	GG	1.268	±0.164 <sup>b</sup>	
EDG1: g.1471620G>T	GG	1.068	±0.118	0.136
	GT	1.167	±0.105	
	TT	1.246	±0.175	
TTN: g.231054C>T	CC	1.079	±0.096 <sup>a</sup>	0.008
	CT	1.141	±0.131 <sup>a</sup>	
	TT	1.541	±0.318 <sup>b</sup>	
AKIRIN2: c.*188G>A	GG	1.198	±0.126	0.376
	GA	1.119	±0.099	
	AA	1.075	±0.166	
RPL27A: g.3109537C>T	CC	0.076	±0.149	0.381
	CT	0.053	±0.104	
	TT	0.076	±0.148	

<sup>a, b</sup> 共通の符号をもたない最小二乗平均値間に有意差あり (P<0.05)。

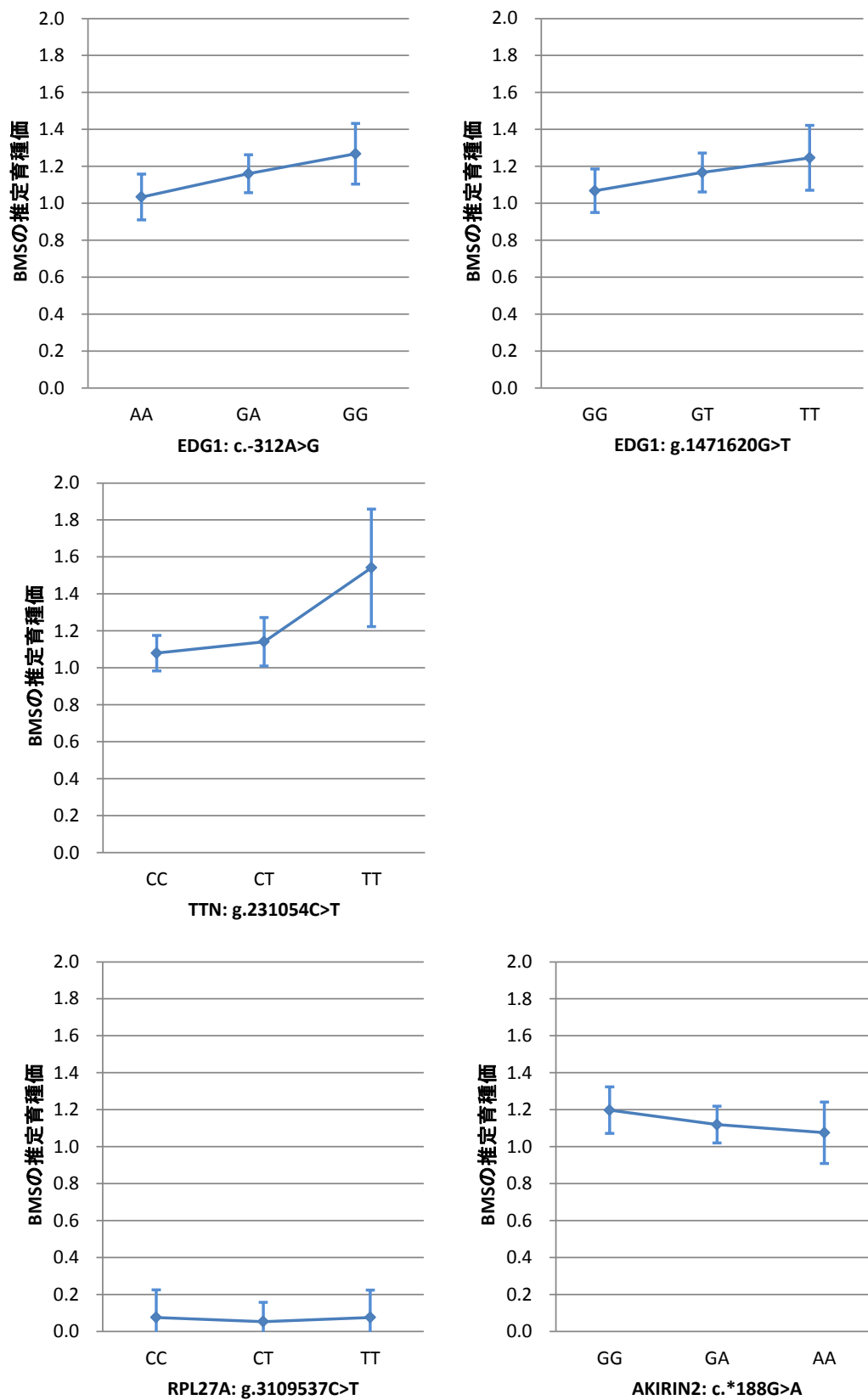


図 3-6 遺伝子型ごとの脂肪交雑推定育種価の最小二乗平均値  
エラーバーは平均値の95%信頼区間を示す。

#### 第4節 考察

本研究に用いた集団は、種雄牛選抜を目的に実施した間接検定のために計画的な交配によって作られた集団であるため、検定場や、肥育時期、種雄牛あたりの後代数（調査牛数）は大きな偏りが無いように配置されており、正確な育種価推定には理想的な形態をしていると考えられる。実際に BLUP 法を用いた育種価推定において、算出された遺伝率は 0.69 であり、これまでに報告された、商業用の肥育牛集団を用いて算出された遺伝率 0.42~0.56 (Ibi et al., 2006)、0.56~0.64 (Sasaki et al., 2006a) と比較すると高い値を示した。これは、本研究で用いられた調査牛が、極力均一化された環境で飼育されているため、環境分散が低く抑えられ、相対的に遺伝率が高くなったことを表している。また、調査牛の正確度は候補種雄牛と同等の正確度が得られており、妥当な育種価の推定がなされていると考えられた。

こうして得られた脂肪交雑の推定育種価と、対象とした 5 つの SNP の遺伝子型との関連を検討した結果、EGD1 の c. -312A>G においては 5% 水準で有意性が示され、GG 型、AG 型、AA 型の順に高い推定育種価を持つことが示された。この結果は、大分県の黒毛和種集団 (Yamada et al., 2009a)、佐賀県の黒毛和種集団 (和田ら, 2009)、および宮崎県、鹿児島県、長崎県の一部の農場における黒毛和種集団 (Sukegawa et al., 2010) を用いたこれまでの一連の報告と一致していた。同じ EDG1 遺伝子上に存在している SNP である g. 1471620G>T については、本研究において有意な差がみられなかったが、T アリルが G アリルよりも高い脂肪交雑の推定育種価を示す傾向がみられ、Yamada ら (2009c) の報告と矛盾はみられなかった。本研究のタイピングの結果では EDG1 の c. -312A>G の A アリルと g. 1471620G>T の G アリル、あるいは c. -312A>G の G アリルと g. 1471620G>T の T アリルは同一のハプロタイプ上にみられるものが多かったが、一部の個体ではハプロタイプの組み合わせが異なるものが存在していた。このことが 2 つの SNP の間で関連性に差をもたらした原因であり、本研究においては、より強い関連性を

示した c. -312A>G が脂肪交雑に影響を与える原因変異であると考えられた。また、TTN の g. 231054C>T においては 5%水準で有意性が示され、TT 型、CT 型、CC 型の順に高い推定育種価をもつことが示された。これは、Yamada ら (2009d) の大分県の黒毛和種集団を対象にした結果と一致していた。高い脂肪交雑の推定育種価と関連をもつ T アリルが集団に少ないことから、このアリルを選抜することで大きな効果が得られると考えられる。しかしながら、TT 型の個体が少ないことで、その最小二乗平均値の標準誤差が大きくなっている。このため遺伝子置換効果を正しく把握するためには、より多くの TT 型の個体を含む集団で解析する必要があると考えられた。一方で、AKIRIN2 と RPL27A の SNP では遺伝子型と脂肪交雑との間で有意な関連は認められなかった。先の報告との違いをもたらした原因としては、集団の違いが考えられる。従前の報告 (Sasaki et al., 2009; Yamada et al., 2009b) が大分県だけの限られた血統の集団であるのに対し、本研究で対象となった集団は候補種雄牛 114 頭の後代であり、候補種雄牛あたり 8~15 頭の半きょうだい家系で構成されている。つまり本集団は多くの種雄牛の後代で構成されており、また各調査牛は全国に出生地が散在していることから、より黒毛和種全体を反映した集団と考えられる。このため大分県の集団では今回対象としている SNP と真の原因変異が強い連鎖不平衡にあったのに対し、本研究で用いた集団では真の原因変異との間で組み換えが生じている個体が多く含まれたため、関連性が検出できなくなったと考えられる。今後は、高密度な SNP データを用いたハプロタイプの解析を行い、これら 2 つの遺伝子が存在する領域の SNP を詳細に解析することで、より関連の強い SNP を同定できると考えられる。

これまでの結果から、EDG1 の c. -312A>G と TTN の g. 231054C>T についてはマーカーアシスト選抜等に利用できるものと考えられる。しかし、現在のところ関連解析による結果しか得られていないため、真の原因変異を同定し、普遍的に活用できるマーカーとするためには、レポータージーンアッセイなど分子生物学的な解析も必要になると考え



られる。

遺伝子の機能の面から考えれば EDG1 は上皮細胞の分化、血管新生に関与する遺伝子として(Liu et al., 2000)、TTN は Z 線からミオシンフィラメントをつなぐ筋肉の構造を形成するタンパク質の遺伝子として(Itoh-Satoh et al., 2002)知られている。本研究で対象にした SNP はいずれも遺伝子の調節領域に位置しており、これら SNP の配列の違いが遺伝子の発現を与えることが示されている(Sasaki et al., 2006b)。これら遺伝子の発現量の差が、脂肪細胞の分化誘導に何らかの影響を与え、最終的に脂肪交雑の成績に影響を与えると推察されるが、具体的にどのような遺伝子カスケードで機能しているかは不明である。Mizoguchi ら(2010)は、牛筋肉内脂肪前駆細胞(Nakajima et al., 2002)用い、脂肪細胞への分化誘導を行った時の遺伝子発現の変化を網羅的に解析した。報告された分化誘導時に発現が変化する遺伝子群のリストには本研究で対象にした遺伝子は含まれてはいなかった。このことから、本研究で対象にした遺伝子は脂肪組織内で機能しているものではなく、脂肪組織以外の組織で機能し、その結果、筋肉内脂肪前駆細胞が何らかの形で刺激され脂肪組織へと分化していくものと考えられる。

将来、これらの遺伝子の機能を調べることによって、脂肪交雑が形成されるメカニズムの解明の足がかりとなり、また、それらの知見が育種改良のみならず、飼養管理等へも応用され、効率の良い家畜生産につながっていくことが期待される。

## 第5節 要約

従前の研究において、EDG1、TTN、AKIRIN2、RPL27A という4つの遺伝子上に存在する5つの一塩基多型（SNP）が、脂肪交雑に対して有意な遺伝子型効果をもつことが観察されている。本章において、これら5つのSNPの効果を検証するため、家畜改良事業団で実施した間接検定の調査牛を対象に5つのSNPの相関解析を行った。はじめに、第2章で開発した2STEP-MULTIPLE-PCR-SSP法を用いてタイピングを実施した。次に脂肪交雑と遺伝子型の関連を検証するため、統計的な解析を行った。解析にあたっては検定成績そのままの数値ではそのデータに遺伝的要因だけでなく環境要因も含まれているため正確な解析は困難となる。そのため、血統情報と検定成績からBLUP法にて育種価を推定したうえで、一般線形モデルを用いた検定を行った。その結果、EDG1のg.1471620G>T、AKIRIN2のc.188G>A、RPL27Aのg.3109537C>Tでは有意な遺伝子型効果は観察されなかったが、EDG1のc.-312A>GおよびTTNのg.231054C>Tについては有意な効果がみられた。これら2つのSNPの遺伝子型を選抜に活用することで、改良の有効なツールとなりうる可能性が示された。

## 第4章 効果の見られた遺伝子の他の形質への影響の調査

### 第1節 緒言

これまでの研究において、EDG1、TTN、AKIRIN2、RPL27A という4つの遺伝子上に存在する5つの一塩基多型 (SNP) が、脂肪交雑に対して有意な遺伝子型効果をもつことが観察されている。3章では、これらのSNPが脂肪交雑にどの程度影響を与えているかを家畜改良事業団の間接検定調査牛の集団を対象に解析を行い、EDG1のc. -312A>GおよびTTNのg. 231054C>Tについてはその遺伝子型間において統計学的に有意な差がみられることを示した。これによりこの2つのSNPについてはマーカーアシスト選抜等に利用し、脂肪交雑の改良に貢献できるものと考えられる。

しかしながら、実際の肉牛の改良においては脂肪交雑さえ向上すれば良いというものではなく、枝肉重量や飼料効率など産肉性にも配慮し、市場のニーズを捉えつつ、総合的に改良を行っていく必要がある。

このため本章においては脂肪交雑に有効性がみとめられたEDG1のc. -312A>GおよびTTNのg. 231054C>Tについて脂肪交雑以外の枝肉形質および産肉性に関わる形質への影響について解析し、これらSNPが選抜に活用した場合の多面的な影響について検討した。

### 第2節 材料および方法

脂肪交雑以外の枝肉形質および産肉性に関わる形質と遺伝子型との相関解析の対象として第3章同様に家畜改良事業団の間接検定で、2003年～2005年の間に生まれた検定調査牛を対象とした。肥育成績として開始体重、開始体高、終了体重、終了体高、1日平均増体重を、枝肉成績として枝肉重量、ロース芯面積、バラ厚、皮下脂肪厚の成績を用いた。

これらの成績について、脂肪交雑での解析と同様に、脂肪交雑成績から環境要因を

除去するため BLUP 法による育種価の推定を行った。算出のために用いた検定成績と、血統データは 3 章で育種価推定に用いたものと同じ個体の記録を用いた。統計モデルには変量効果として個体の育種価を、母数効果として検定場、検定年、肥育時期を取り上げ、形質ごとに AIC が最小となる式を採用した。

開始体重、開始体高、終了体重、バラ厚、皮下脂肪厚

$$Y_{ijkl} = F_i \times Y_j \times T_k + A_{ijkl} + e_{ijkl}$$

(乗算は組み合わせ効果を表す)

終了体高、1 日平均増体重、枝肉重量、ロース芯面積、

$$Y_{ijkl} = F_i + Y_j + T_k + A_{ijkl} + e_{ijkl}$$

( $Y_{ijkl}$  は形質の観測値、 $F_i$  は  $i$  番目の検定場に関する母数効果、 $Y_j$  は  $j$  番目の検定年に関する母数効果、 $T_k$  は  $k$  番目の肥育時期の母数効果、 $A_{ijkl}$  は  $ijkl$  番目の個体の育種価、 $e_{ijkl}$  は残差を表す。)

こうして得られた各形質の推定育種価を目的変数とし、各遺伝子型を要因として取り上げた一般線形モデルを用いた平均値の差の検定を行い、遺伝子型効果の有意性を検定した。その後、各遺伝子型の最小二乗平均値間の差について多重比較検定を行った。これらの検定には Tukey-Kramer の多重比較法を用いた。

### 第 3 節 結 果

効果の見られた 2 つの SNP (EDG1:c. -312A>G、TTN:g. 231054C>T) の他の形質への影響を検討するにあたって肥育成績、および枝肉形質の基礎的な統計量について表 4-1 および図 4-1 にまとめた。対象にしたデータについては極端な外れ値などは見られず、正規分布する範囲に収まっていた。

これらの成績について、脂肪交雑での解析と同様に、各検定成績から環境要因を除

去するため BLUP 法による育種価の推定を行った結果を表 4-2 に示した。検定調査牛の推定育種価の正確度は平均値の周辺に収束しており、候補種雄牛の正確度と比較するとやや低い値であった。

こうして得られた、検定調査牛における各形質の推定育種価を対象にして、遺伝子型ごとに一般線形モデルによる検定を行った結果を表 4-3 および図 4-2、図 4-3 に示した。

EDG1:c. -312A>G においては終了体重で 5%水準の有意な差が見られたほか、1 日平均増体重、枝肉重量、バラ厚、皮下脂肪厚で 0.5%水準で有意な差が見られた。これらの形質においては脂肪交雑の場合と同様に A アリルよりも G アリルをもつ個体の推定育種価は高く、AA 型<AG 型<GG 型の順に平均値が高くなった。皮下脂肪厚では 0.5%水準で有意な差が見られたがその差は 0.15cm とごく僅かな差であった。逆に開始体重では有意確率が 5%に満たないものの、AA 型<AG 型<GG 型の順に平均値が高くなる傾向が見られその差は約 3kg であった。開始体高、終了体高に関しては遺伝子型間で差は見られず、その差はそれぞれ 0.1cm、0.26cm と僅かなものであった。

TTN:g. 231054C>T においては皮下脂肪厚で 5%水準の有意な差が見られたが、その差は 0.06cm と EDG1:c. -312A>G の場合と同様に、ごく僅かな差であった。また、終了体重、1 日平均増体重、枝肉重量、バラ厚で 0.5%水準の有意な差が見られ、脂肪交雑の場合と同様に C アリルよりも T アリルをもつ個体の推定育種価は高く、CC 型<CT 型<TT 型の順に平均値が高くなった。開始体重では有意確率が 5%に満たないものの、終了体重と同様に CC 型<CT 型<TT 型の順に平均値が高くなる傾向が見られ、その差は約 3kg であった。開始体高、終了体高に関しては遺伝子型間で差は見られず、EDG1:c. -312A>G と同様にその差はそれぞれ 0.29cm、0.2cm と僅かなものであった。

ローズ芯面積に関しては有意確率が 5%に満たないが、CC 型>CT 型>TT 型の順に平均値が低くなる傾向が見られた。

表 4-1 各形質における集団の平均値と標準偏差

形質	頭数	最小値	最大値	平均値	標準偏差
開始体重 (kg)	5154	142	375	257.6	31.8
開始体高 (cm)	5154	97	126	113.0	3.8
終了体重 (kg)	5154	409	830	587.0	56.7
終了体高 (cm)	5154	120	148	134.2	3.9
1日平均増体重(kg/日)	5154	0.54	1.3	0.9	0.1
枝肉重量 (kg)	5154	237	491	348.2	36.3
ロース芯面積 (cm <sup>2</sup> )	5154	31	72	47.8	5.8
バラ厚 (cm)	5154	3.4	9.4	6.3	0.7
皮下脂肪厚 (cm)	5154	0.5	5.1	2.0	0.5

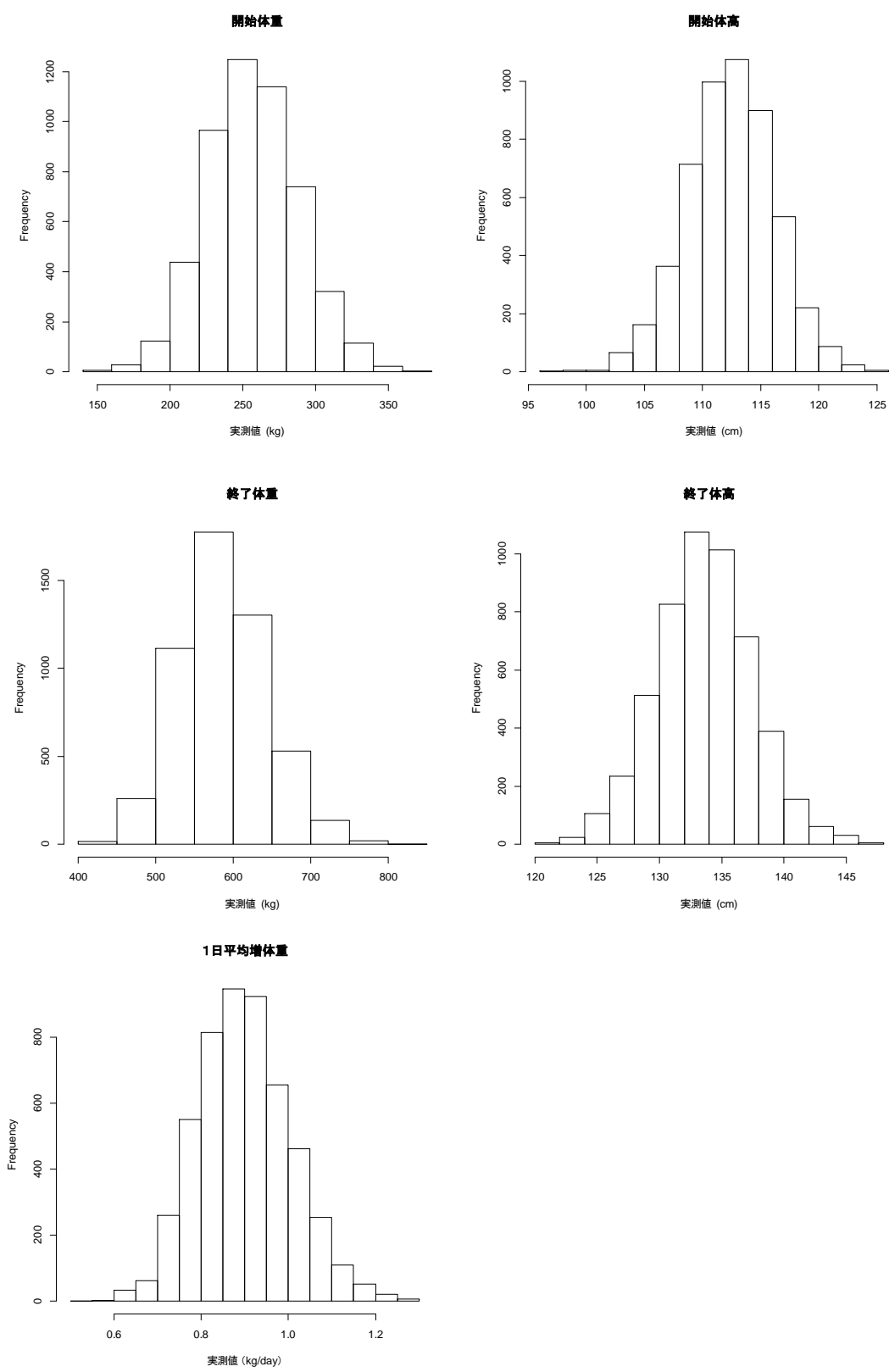


図 4-1A 各形質の成績（表現型）のヒストグラム（肥育成績）

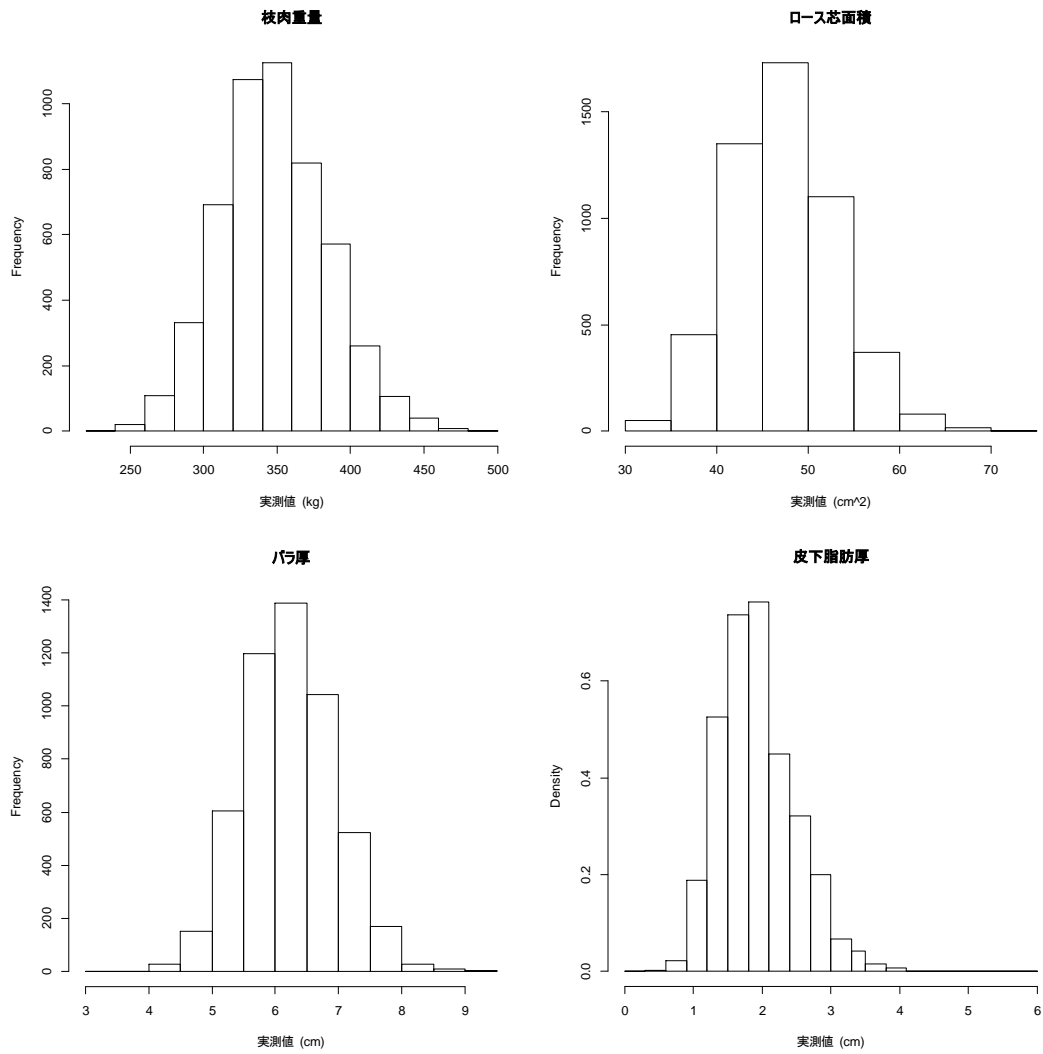


図 4-1B 各形質の成績（表現型）のヒストグラム（枝肉成績）



表 4-2 BLUP 法による育種価推定次の各種遺伝的パラメータ

形質	遺伝率	遺伝分散	環境分散	正確度の平均	
				検定調査牛	候補種雄牛
開始体重	0.56	507.54	400.74	0.77	0.82
開始体高	0.55	6.92	5.72	0.76	0.82
終了体重	0.67	1982.17	971.09	0.82	0.85
終了体高	0.56	8.04	6.22	0.78	0.83
1日平均増体重	0.54	0.01	0.00	0.77	0.82
枝肉重量	0.69	829.71	376.78	0.83	0.85
ロース芯面積	0.57	18.43	14.15	0.77	0.83
バラ厚	0.51	0.25	0.24	0.75	0.82
皮下脂肪厚	0.53	0.15	0.14	0.76	0.82

表 4-3 相関解析の結果および各形質の推定育種価の最小二乗平均値

EDG1 : c. -312A>G

形質	P 値	最小二乗平均			TukeyHSD の有意確率		
		AA	GA	GG	AA_GA	AA_GG	GA_GG
開始体重 (kg)	0.093	-2.65	-1.40	0.34	0.48	0.08	0.37
開始体高 (cm)	0.809	-0.07	-0.06	0.03	1.00	0.81	0.83
終了体重 (kg)	0.006 *	0.50	5.36	10.63	0.13	0.00	0.19
終了体高 (cm)	0.339	-0.10	-0.01	0.16	0.80	0.31	0.56
1日平均増体重(kg/日)	0.001 **	0.01	0.02	0.03	0.04	0.00	0.15
枝肉重量 (kg)	0.002 **	-0.69	2.76	6.64	0.09	0.00	0.12
ロース芯面積 (cm <sup>2</sup> )	0.467	0.40	0.64	0.49	0.45	0.93	0.81
バラ厚 (cm)	0.000 **	0.02	0.10	0.22	0.00	0.00	0.00
皮下脂肪厚 (cm)	0.000 **	-0.15	-0.07	0.00	0.00	0.00	0.01

TTN : g. 231054C>T

形質	P 値	最小二乗平均			TukeyHSD の有意確率		
		CC	CT	TT	CC_CT	CC_TT	CT_TT
開始体重 (kg)	0.108	-2.47	-0.62	0.97	0.21	0.27	0.77
開始体高 (cm)	0.275	0.01	-0.15	-0.27	0.39	0.49	0.88
終了体重 (kg)	0.003 **	1.11	8.63	13.20	0.01	0.06	0.68
終了体高 (cm)	0.720	0.01	-0.05	-0.19	0.88	0.75	0.89
1日平均増体重(kg/日)	0.000 **	0.01	0.02	0.04	0.00	0.00	0.24
枝肉重量 (kg)	0.000 **	-0.41	5.15	8.95	0.00	0.02	0.53
ロース芯面積 (cm <sup>2</sup> )	0.058	0.70	0.37	-0.11	0.23	0.11	0.49
バラ厚 (cm)	0.000 **	0.04	0.17	0.23	0.00	0.00	0.52
皮下脂肪厚 (cm)	0.014 *	-0.11	-0.05	-0.07	0.01	0.60	0.90

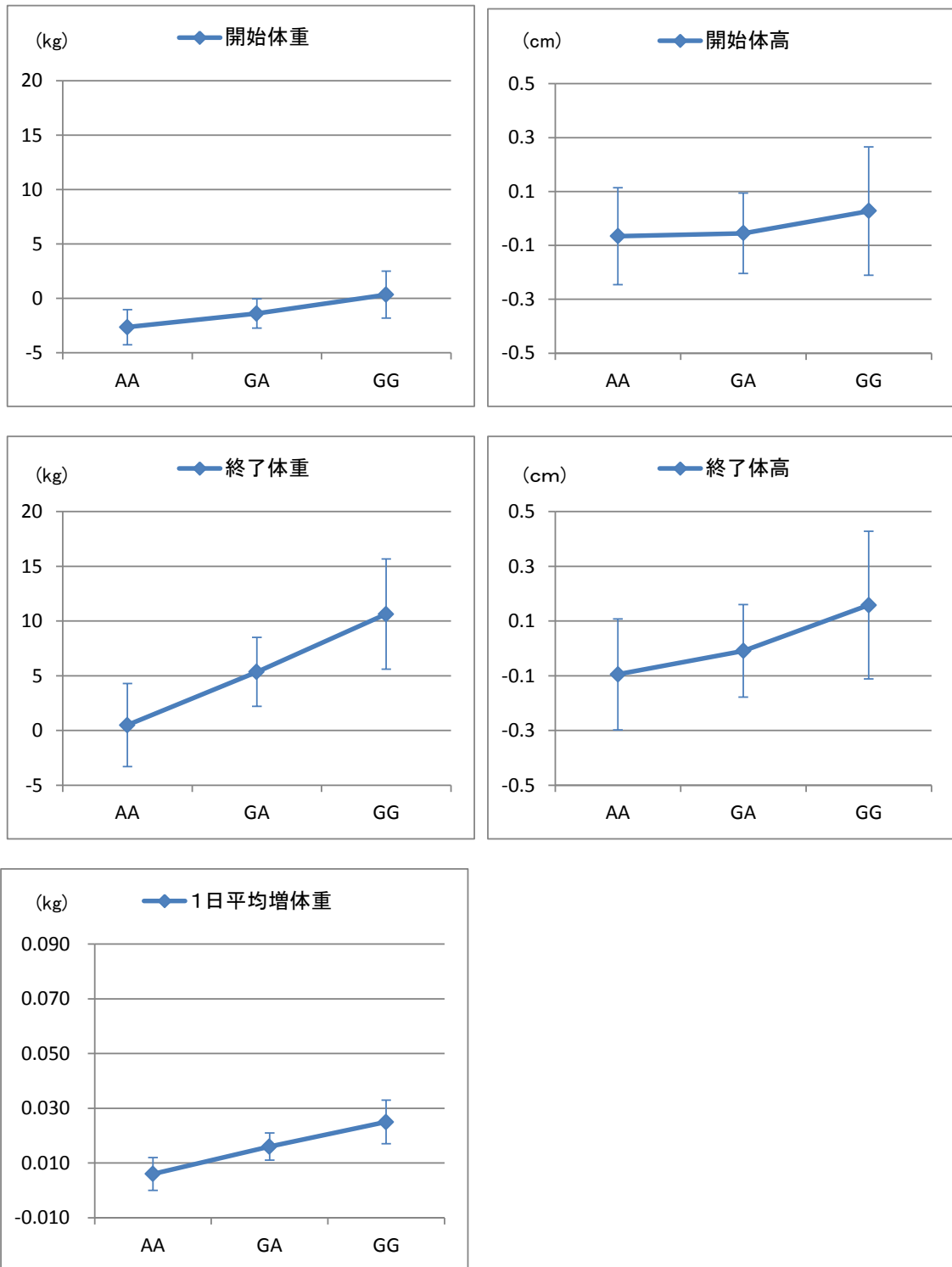


図 4-2A EDG1:c.-312A>G の各遺伝子型の推定育種価の最小二乗平均値（肥育成績）  
エラーバーは平均値の 95%信頼区間を示す。

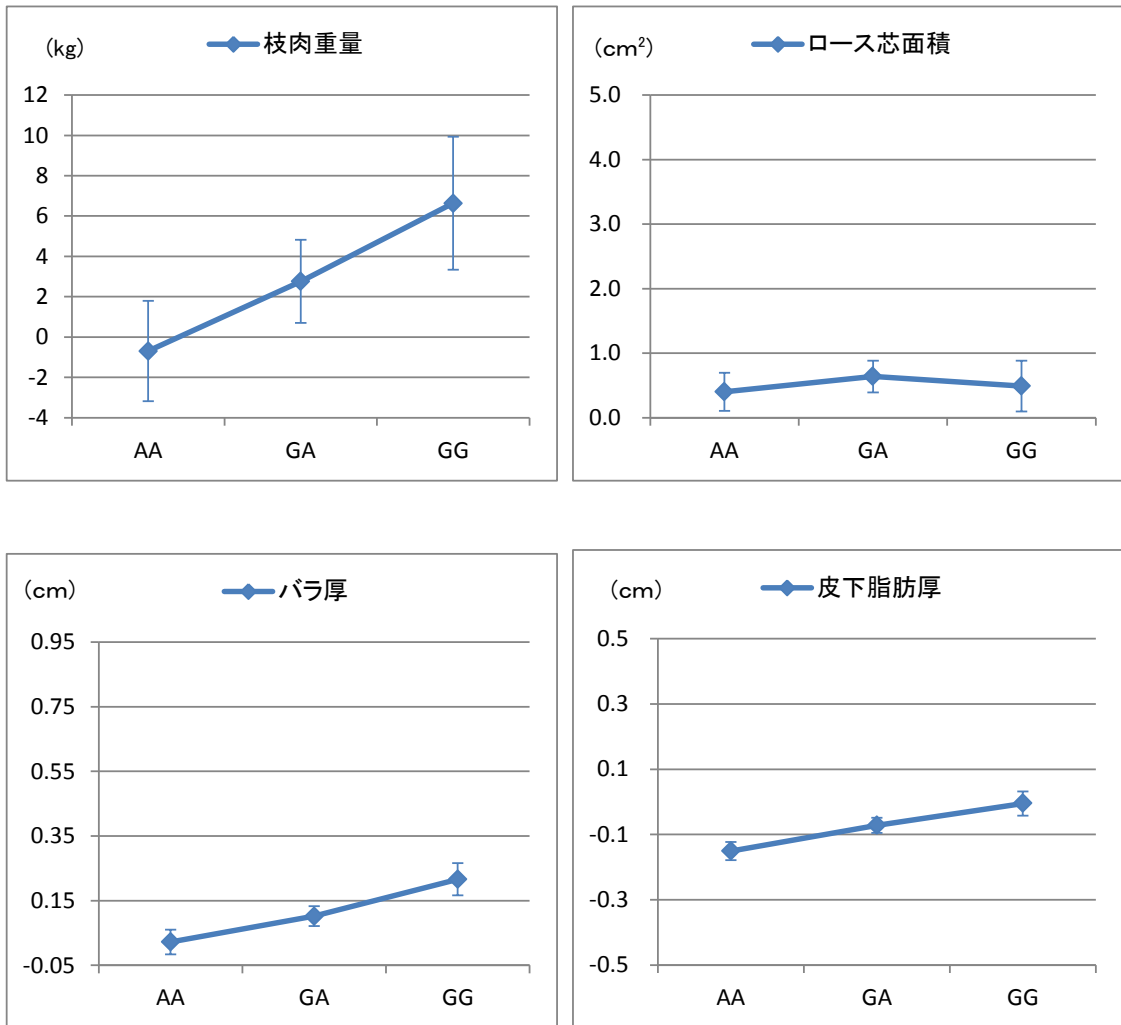


図 4-2B EDG1:c. -312A>G の各遺伝子型の推定育種価の最小二乗平均値 (枝肉成績)  
エラーバーは平均値の 95%信頼区間を示す。

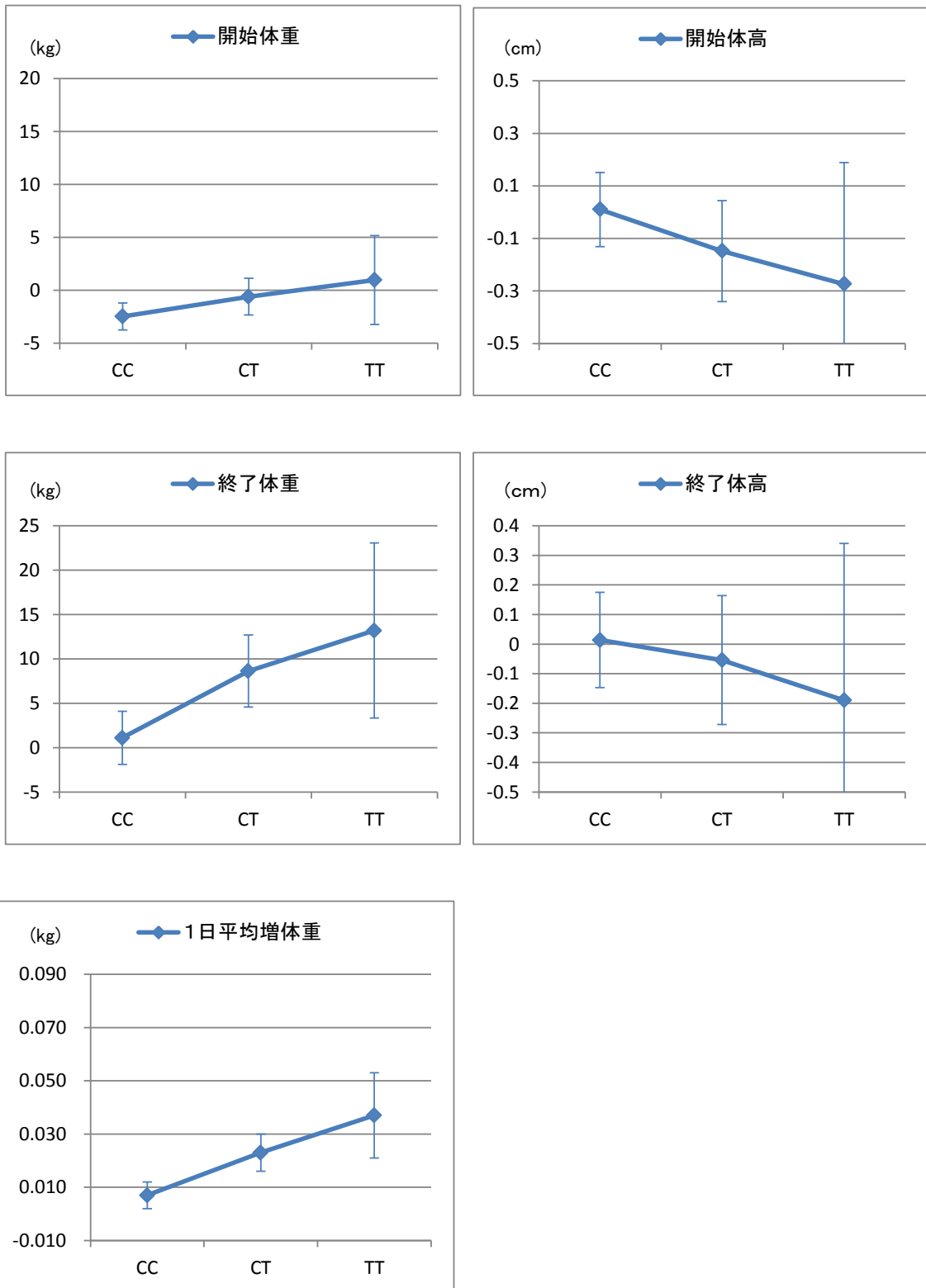


図 4-3A TTN:g. 231054C>T の各遺伝子型の推定育種価の最小二乗平均値（肥育成績）  
エラーバーは平均値の 95%信頼区間を示す。

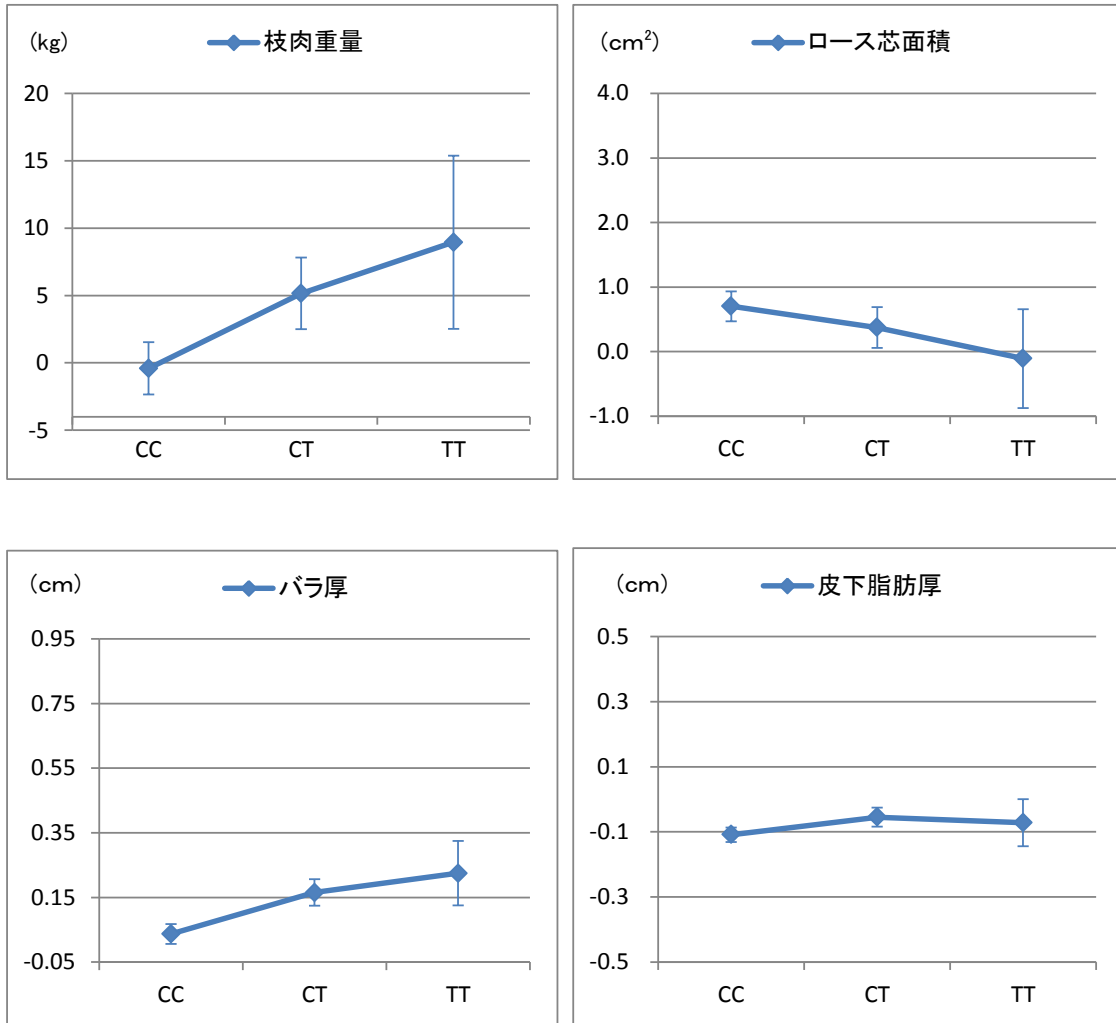


図 4-3B TTN:g. 231054C>T の各遺伝子型の推定育種価の最小二乗平均値 (枝肉成績)  
エラーバーは平均値の 95%信頼区間を示す。

#### 第4節 考察

本章においては脂肪交雑において効果の見られた EDG1:c. -312A>G および TTN:g. 231054C>T の2つの SNP が他の形質にどんな影響をおよぼすかを検討した。その結果、1日平均増体重、終了体重、枝肉重量といった増体に関わるような形質で EDG1:c. -312A>G および TTN:g. 231054C>T の両方で遺伝子型の影響が確認された。3章において脂肪交雑に好ましい結果となった EDG1:c. -312A>G の G アリル、TTN:g. 231054C>T の T アリルは、これらの形質においても好ましい影響を示し、1日平均増体重、終了体重、枝肉重量を増加させることが示された。このことによって、この2つの SNP を選抜に活用することによって肉の質と量を同時に向上させることが可能と考えられた。

増体に関わる遺伝子の SNP に関しては、様々な報告がなされてきた。ひとつの例として、Tatsuda ら (2008) は黒毛和種においてウシ成長ホルモンの多型が枝肉重量と脂肪交雑に影響をあたえることを示した。ウシ成長ホルモンの遺伝子型間の差は最大で枝肉重量、脂肪交雑でそれぞれ 18.86kg、1.02 であるが、枝肉重量が良い型は脂肪交雑が悪くなり、逆に枝肉重量が悪い型は脂肪交雑が良くなる結果となっていた。本研究の結果において、枝肉重量の差は EDG1:c. -312A>G および TTN:g. 231054C>T でそれぞれ 7.33 kg, 9.36 kg (表 4-3)、脂肪交雑の差は EDG1:c. -312A>G および TTN:g. 231054C>T でそれぞれ 0.23, 0.46 (表 3-4) であった。Tatsuda ら (2008) の報告では数値は表現型値であるのに対し本研究では推定育種価となっているので、その大小について直接比較することはできないが、影響の大きさは小さいと推測される。しかし、EDG1:c. -312A>G および TTN:g. 231054C>T では枝肉重量、脂肪交雑ともに好ましい方向に影響があるのに対し、ウシ成長ホルモンの多型はそれぞれ逆の方向に好ましい影響が見られることから、本研究で見出された2つの SNP はウシ成長ホルモンに比べ利用しやすいものと考えられる。

また別の例として Hoshiba ら (2013) は黒毛和種の PLAG1 (Pleiomorphic Adenoma Gene 1) 遺伝子と NCAPG (non-SMC condensin I complex, subunit G) 遺伝子の影響につ

いて報告している。この2遺伝子は多くの報告中でも増体について特に大きな効果が報告されている。報告の中で彼らは PLAG1 遺伝子については、特定のアリルが終了体重、終了体高、枝肉重量、ロース芯面積を向上させ、NCAPG 遺伝子については、特定のアリルが終了体重、終了体高、枝肉重量、ロース芯面積を向上させ皮下脂肪厚を低減させることを示した。枝肉重量を例に取れば、PLAG1 遺伝子、NCAPG 遺伝子において、それぞれ遺伝子間で 23.6kg、39.6kg もの差が報告されている。一方、脂肪交雑についてはどちらの遺伝子も影響を与えないことが示唆されていた。本研究で見出した2つの SNP と比較すると、PLAG1 遺伝子、NCAPG 遺伝子はどちらも体重のみならず体長、体高など体全体を大きくする働きがあるのに対し、EDG1:c.-312A>G および TTN:g.231054C>T は体高については大きな影響を与えていない(表 4-3)。すなわち、EDG1:c.-312A>G および TTN:g.231054C>T は骨格の大きさには影響せず、純粹に筋肉の量を増やす特徴を持つことが推察される。

また、EDG1:c.-312A>G および TTN:g.231054C>T は開始体重には大きな影響を与えずに、終了時体重および肥育中の1日平均増体重に大きな影響を与えている(表 4-3)。すなわち、EDG1 遺伝子、TTN 遺伝子は肥育時に活発にその成長を促す特徴を持つことが示唆されている。NCAPG では生時から遺伝子型によって体の大きさが異なることが示されていることから(Setoguchi et al., 2011)、この点においても大きく異なっている。生時体重が大きくなるらないということは分娩時の事故が低減することが期待され、この点は EDG1:c.-312A>G および TTN:g.231054C>T の利点であると考えられた。

遺伝子の機能面から考えれば、EDG1 は血管新生に関わる遺伝子であり、この遺伝子が活発に機能することは、血管がしっかり張り巡らせ、栄養が組織に行き渡りやすくと考えられる。また TTN 遺伝子は筋肉繊維の材料そのものであり、この遺伝子が活発に機能することは、筋肉が発達することを意味する。第3章において遺伝子発現の面から、この2つの遺伝子は脂肪組織内で機能しているものではなく、脂肪組織以外の組織



で機能し、その結果、筋肉内脂肪前駆細胞が何らかの形で刺激され脂肪組織へと分化していくことを考察した。この考察は、EDG1 ならびに TTN の遺伝子の働きが肥育時の筋肉の発達を左右する考えを強く支持する。しっかりと発達した筋肉で栄養が豊富な環境が形成された時、筋肉内脂肪組織は2次的な影響として発達するのではないかと考えられる。

「小さく生まれ (安産)、大きく育ち、肉量が多く、さしが入る」ことは黒毛和種に求められる一つの理想形と考えられる。本研究で見出されたこの2つの SNP は、形質に与える影響は他の遺伝子に比べ大きい方ではないが、この理想の全てをみたしており、選抜の場面で利用しやすいものと考えられる。

## 第5節 要約

3章では、EDG1 : c. -312A>G および TTN : g. 231054C>T についてはその遺伝子型間において統計学的に有意な差がみられることを示した。これにより、マーカーアシスト選抜等に利用の可能性が示されたが、実際の肉牛の改良においては脂肪交雑さえ向上すれば良いというものではなく、枝肉重量や飼料効率など産肉性にも配慮し、総合的に改良を行っていく必要がある。

そこでEDG1:c. -312A>G および TTN:g. 231054C>T について脂肪交雑以外の枝肉形質および産肉性に関わる形質への影響について解析した。その結果、終了体重、1日平均増体重、枝肉重量、バラ厚、皮下脂肪厚などで有意な差が見られ、脂肪交雑を向上させる遺伝子型では終了体重、1日平均増体重、枝肉重量、バラ厚においても向上させることが示された。しかし、脂肪交雑を向上させる遺伝子型では皮下脂肪厚は厚くなり、好ましくない差が観察されたが、その差は0.15cmであり、ごく僅かな差であった。

EDG1:c. -312A>G および TTN:g. 231054C>T は体高や開始体重には大きな影響がみられないことから、EDG1 遺伝子、TTN 遺伝子は肥育時に筋肉の発達を促す特徴を持つことが示唆され、脂肪交雑はその2次的な影響から発達が促されるものと考えられた。

## 第5章 総括

霜降りとして知られる脂肪交雑は、特に日本において牛肉の価値を決める大きな要因の1つである。海外からの輸入肉との競争が激化する中、日本の食肉生産において生産コストを抑えつつ品質を維持・向上させる事は、今後ますます重要となってくる。このため、脂肪交雑の遺伝的な改良を進め、効率よく脂肪交雑に優れた牛肉を生産することは、今後も重要になっていくと考えられる。これまで脂肪交雑の改良は、BLUP法を主軸とした統計育種学的な手法による個体の遺伝的な評価、すなわち推定育種価を用いた選抜によって行われてきた。近年、より正確に個体の遺伝的な評価を行うために、経済的形質に関連する遺伝子を解析し、活用する試みがなされている。

Yamadaら(2009a; 2009b, c; 2009d)は大分県産黒毛和種の種雄牛集団およびその後代肥育牛集団を対象にした相関解析によって、EDG1のプロモーター領域のSNP (g. 1471620G>T)、EDG1の非翻訳領域のSNP (c. -312A>G)、TTNのプロモーター領域のSNP (g. 231054C>T)、AKIRIN2の非翻訳領域のSNP (c. \*188G>A)、RPL27Aのプロモーター領域のSNP (g. 3109537C>T)という5つのSNPが有意な遺伝子型効果をもつことを示した。しかし、この結果は限られた特定の地域や血統での解析結果であるため、黒毛和種集団全体で活用するには、解決すべき問題が残されている。

本研究では、脂肪交雑の育種改良に応用するため、5つのSNPをより広い範囲にわたる多数の集団で解析し、効果の大きさを正確に把握するとともに、脂肪交雑以外の形質への多面的な影響も検証することを目的とした。

表現型に対する遺伝子のSNPの置換効果を正しく推定するためには、できるだけ多くの個体に対してその遺伝子型を検査し、データを蓄積する必要がある。そこで本研究では、環境要因が一定に管理され、広範囲の血統で構成された家畜改良事業団の間接検定調査牛の集団(1,351頭)を対象にした。

この集団を対象に5つのSNPのタイピングを実施すると6755件と膨大になるため、できるだけ効率的な手法を採用する必要がある。このため、第2章では、数あるタイピング方法の中から、Sequence-Specific Primer Cycle Elongation (SSPCE)法に着目し、これを発展させた2STEP-MULTIPLE-PCR-SSP法の開発に取り組んだ。この手法は目的の5つのSNPを含む100~300 bpの領域を同時に増幅(1段階目)したあとで、5つのSNPに対してアリル特異的反応(2段階目)を行い、遺伝子型を検出するものである。最終的に決定した条件で一連の操作を行ったところ、1段階目の目的領域の増幅において極めて良好な結果が得られ、続く2段階目のアリル特異的反応においても5つ全てのSNPに対し明瞭な特異的伸長反応が得られ、また、それらの結果は全て予め判明した結果と一致していた。本手法は専用の特異な装置や高価なキットを必要とせず、反応系の構築も容易であり、本研究のように数個程度のSNPを大規模にタイピングする場合の手法としては最も優れたものであると考えられた。

この2STEP-MULTIPLE-PCR-SSP法を用いて第3章では、家畜改良事業団の間接検定調査牛の集団(1,351頭)のタイピングを行い、5つのSNPと脂肪交雑の成績との関連を検討した。この際、脂肪交雑の成績そのままでは環境要因が含まれているため、正しく遺伝子型の効果を推定できない。このため分析にあたっては、予めBLUP法で各検定調査牛の育種価推定を行い、環境要因を取り除いた。この育種価に対し5つのSNPの検証を行った結果、EDG1のg.1471620G>T、AKIRIN2のc.188G>A、RPL27Aのg.3109537C>Tでは有意な遺伝子型効果は観察されなかったが、EDG1のc.-312A>GおよびTTNのg.231054C>Tについては有意な効果がみられた。EDG1およびTTNの遺伝子型の最小二乗平均値間をそれぞれ多重比較検定したところ、EDG1のc.-312A>GについてはAA型とGG型の間において5%水準で有意な差が認められ、AアリルよりもGアリルをもつ個体の脂肪交雑の推定育種価は高く、AA型とAG型の間で0.13、AG型とGG型の間で0.11の差がみられた。また、TTNのg.231054C>TについてはTT型とそれ以外の型の間において

5%水準で有意な差が認められCアレルよりもTアレルをもつ個体の脂肪交雑の推定育種価は高く、CC型とCT型の間で0.06、CT型とTT型の間で0.40の差がみられた。一方でEDG1およびTTNの遺伝子の交互作用については、有意な差は確認できなかった。

この結果から、EDG1のc.-312A>GとTTNのg.231054C>Tについては脂肪交雑の選抜や評価といった育種改良に利用できるものと考えられた。

この2つの遺伝子を選抜や評価に利用するにあたっては、脂肪交雑さえ向上すれば良いというものではなく、枝肉重量や飼料効率など産肉性にも配慮し改良を行っていく必要がある。このため第4章では第3章で脂肪交雑への効果が確認されたEDG1のc.-312A>GとTTNのg.231054C>Tについて他の形質に対しての影響を検証した。脂肪交雑以外の枝肉形質および産肉性に関わる形質として開始体重、開始体高、終了体重、終了体高、1日平均増体重、枝肉重量、ロース芯面積、バラ厚、皮下脂肪厚の成績を取り上げた。これらの形質について、脂肪交雑での解析と同様に、相関解析に先立ち脂肪交雑成績から環境要因を除去するためBLUP法による育種価の推定を行った。その結果、EDG1:c.-312A>Gにおいては、開始体重、開始体高、終了体高に関して遺伝子型間の差は見られなかったが、終了体重、1日平均増体重、枝肉重量、バラ厚、皮下脂肪厚で有意な差が見られた。これらの形質においては脂肪交雑の場合と同様にAアレルよりもGアレルをもつ個体は食肉生産上好ましい成績を示した。一方、TTN:g.231054C>Tにおいては終了体重、1日平均増体重、枝肉重量、バラ厚で有意な差が見られ、脂肪交雑の場合と同様にCアレルよりもTアレルをもつ個体は食肉生産のうえで好ましい数値を示した。開始体重、開始体高、終了体高に関しては遺伝子型間で差は見られなかった。

この2つの遺伝子の機能面から考えれば、EDG1は血管新生に関わる遺伝子であり、この遺伝子が活発に機能することは、血管がしっかり張り巡らされ、栄養が組織に行き渡りやすくなると考えられる。またTTN遺伝子は筋肉繊維の材料そのものであり、この遺伝子が活発に機能すれば筋肉は発達すると考えられる。これらのことから第3章にお

いては、この2つの遺伝子は脂肪組織内で機能しているものではなく、脂肪組織以外の組織で機能し、2次的な効果として、筋肉内脂肪前駆細胞が何らかの形で刺激され脂肪組織へと分化していくことを考察した。

また第4章では脂肪交雑以外の解析の結果から、この2つの遺伝子は体高には影響を与えず、肥育時の増体に関連する形質に影響を与えていることを明らかにし、このことから、これらの遺伝子は、筋肉内の環境を栄養が豊富な状態に維持することで、筋肉内脂肪組織が2次的な影響として発達することを考察した。

本研究で見出されたこの2つのSNPは、脂肪交雑に対し好ましい効果を持つアリルはその他の形質に対しても好ましい影響を持っており、黒毛和種の育種改良において利用しやすいものと考えられた。

## 謝 辞

本研究を取りまとめるにあたり、ご指導を頂きました本学 山田宜永教授に心より感謝致します。また、本論文をご精読頂き有用なコメントを頂きました本学 高田良三教授、新村末雄教授、中野優准教授、杉山稔恵准教授に深謝致します。

本研究の遂行にあたり、育種価推定のプログラムの利用法についてご指導頂いた、京都大学農学部 佐々木義之名誉教授、三宅武准教授に心から感謝の意を申し上げます。

本研究を遂行する場を与えていただき、終始ご支援いただいた家畜改良事業団 家畜改良技術研究所 森田光夫所長代理に厚く御礼を申し上げます。

本研究に使用されたデータは家畜改良事業団 家畜改良技術研究所の職員の皆様のご協力により得られたものであり、感謝の念に堪えません。

最後に博士号取得に向けて背中を押し、常に支えてくれた妻に深く感謝します。

## 引用文献

- Barendse, W. et al. 1994. A genetic linkage map of the bovine genome. *Nat Genet* 6: 227-235.
- Bishop, M. D. et al. 1994. A genetic linkage map for cattle. *Genetics* 136: 619-639.
- Charlier, C. et al. 1996. Microsatellite mapping of the bovine roan locus: a major determinant of White Heifer disease. *Mamm Genome* 7: 138-142.
- Haley, C. S., S. A. Knott, and J. M. Elsen. 1994. Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. *Genetics* 136: 1195-1207.
- Henderson, C. R. 1975. Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model. *Biometrics* 31: 423-447.
- Hirano, T. et al. 2000. Null mutation of PCLN-1/Claudin-16 results in bovine chronic interstitial nephritis. *Genome Res* 10: 659-663.
- Hori, K., W. S. Shin, C. Hemmi, T. Toyo-oka, and T. Makino. 2003. High fidelity SNP genotyping using sequence-specific primer elongation and fluorescence correlation spectroscopy. *Curr Pharm Biotechnol* 4: 477-484.
- Hoshiya, H. et al. 2013. Comparison of the effects explained by variations in the bovine PLAG1 and NCAPG genes on daily body weight gain, linear skeletal measurements and carcass traits in Japanese Black steers from a progeny testing program. *Anim Sci J* 84: 529-534.
- Ibi, T., A. K. Kahi, and H. Hirooka. 2006. Effect of carcass price fluctuations on genetic and economic evaluation of carcass traits in Japanese Black cattle. *J Anim Sci* 84: 3204-3211.
- Itoh-Satoh, M. et al. 2002. Titin mutations as the molecular basis for dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 291: 385-393.
- Kappes, S. M. et al. 1997. A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Res* 7: 235-249.
- KG, B., K. LA, V. V. LD, V. T. CP, and K. SD. 1993. A manual for use of MTDFREML. A set of programs to obtain estimates of variance and covariance. U. S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, .
- Kukita, Y., T. Tahira, S. S. Sommer, and K. Hayashi. 1997. SSCP analysis of long DNA fragments in low pH gel. *Hum Mutat* 10: 400-407.
- Liu, Y. et al. 2000. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest* 106: 951-961.
- Mizoguchi, Y. et al. 2010. Differentially expressed genes during bovine intramuscular adipocyte differentiation profiled by serial analysis of gene expression. *Anim Genet*



- 41: 436-441.
- Nakajima, I., S. Muroya, R. Tanabe, and K. Chikuni. 2002. Extracellular matrix development during differentiation into adipocytes with a unique increase in type V and VI collagen. *Biol Cell* 94: 197-203.
- Newton, C. R. et al. 1989. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 17: 2503-2516.
- Nishida, N., T. Tanabe, M. Takasu, A. Suyama, and K. Tokunaga. 2007. Further development of multiplex single nucleotide polymorphism typing method, the DigiTag2 assay. *Anal Biochem* 364: 78-85.
- Ohba, Y. et al. 2000. A deletion of the paracellin-1 gene is responsible for renal tubular dysplasia in cattle. *Genomics* 68: 229-236.
- Oka, A., Y. Maruo, T. Miki, T. Yamasaki, and T. Saito. 1998. Influence of vitamin A on the quality of beef from the Tajima strain of Japanese Black cattle. *Meat Sci* 48: 159-167.
- Sasaki, S. et al. 2009. Association of a single nucleotide polymorphism in akirin 2 gene with marbling in Japanese Black beef cattle. *BMC Res Notes* 2: 131.
- Sasaki, Y. et al. 2006a. Comparison of genetic gains per year for carcass traits among breeding programs in the Japanese Brown and the Japanese Black cattle. *J Anim Sci* 84: 317-323.
- Sasaki, Y. et al. 2006b. Exploration of genes showing intramuscular fat deposition-associated expression changes in musculus longissimus muscle. *Anim Genet* 37: 40-46.
- Setoguchi, K. et al. 2011. The SNP c.1326T>G in the non-SMC condensin I complex, subunit G (NCAPG) gene encoding a p.Ile442Met variant is associated with an increase in body frame size at puberty in cattle. *Anim Genet* 42: 650-655.
- Shen, R. et al. 2005. High-throughput SNP genotyping on universal bead arrays. *Mutat Res* 573: 70-82.
- Sukegawa, S. et al. 2013. Multiple marker effects of single nucleotide polymorphisms in three genes, AKIRIN2, EDG1 and RPL27A, for marbling development in Japanese Black cattle. *Anim Sci J*.
- Sukegawa, S. et al. 2010. Replicated association of the single nucleotide polymorphism in EDG1 with marbling in three general populations of Japanese Black beef cattle. *BMC Res Notes* 3: 66.
- Takasuga, A. et al. 2007. Identification of bovine QTL for growth and carcass traits in Japanese Black cattle by replication and identical-by-descent mapping. *Mamm Genome* 18: 125-136.

- Tatsuda, K. et al. 2008. Relationship of the bovine growth hormone gene to carcass traits in Japanese black cattle. *J Anim Breed Genet* 125: 45-49.
- Yamada, T. et al. 2009a. Association of single nucleotide polymorphisms in the endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1 gene with marbling in Japanese Black beef cattle. *Anim Genet* 40: 209-216.
- Yamada, T. et al. 2009b. Association of a single nucleotide polymorphism in ribosomal protein L27a gene with marbling in Japanese Black beef cattle. *Anim Sci J* 80: 631-635.
- Yamada, T. et al. 2009c. Novel SNP in 5' flanking region of EDG1 associated with marbling in Japanese Black beef cattle. *Anim Sci J* 80: 486-489.
- Yamada, T. et al. 2007. Polymorphisms in promoter regions of PDHB, SORBS1, and EDG1 genes showing marbling-associated expression changes. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 120-121: 105-114.
- Yamada, T. et al. 2009d. Association of a single nucleotide polymorphism in titin gene with marbling in Japanese Black beef cattle. *BMC Res Notes* 2: 78.
- 佐々木義之. 1985. 前処理のためのコンピュータプログラム「PRETRT」 京都大学動物遺伝育種学コンピュータプログラムライブラリーNO.15. 京都大学, 京都.
- 和田康彦 et al. 2009. 佐賀黒毛和種牛における EDG1 遺伝子の 1 塩基置換と枝肉形質との関連性. *日本暖地畜産学会会報* 52: 37 - 41.
- 宮城県畜産試験場. 2013. 黒毛和種 種雄牛案内. p 9. 宮城県.
- 川田啓介, 兼松重任, 黒澤弥悦, 揖斐隆之, and 佐々木義之. 2003. 岩手県南地方における黒毛和種集団の産肉性形質に関する統計遺伝学的解析 No. 74. p 187-193. *日本畜産学会報*.
- 農林水産省. 2012. 畜産流通調査 長期累年統計表一覧 食肉中央卸売市場規格別取引頭数と価格累年統計. [http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tikusan\\_ryutu/#r](http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tikusan_ryutu/#r).

## Summary

Marbling defined by the amount and distribution of intramuscular fat is an economically important trait of beef cattle in Japan. While competition with imported meat is intensifying, it will become increasingly important for meat production of Japan to improve the quality and reduce the cost of production. In improvement of marbling, genetic evaluation calculated by BLUP method (i. e. estimated breeding value: EBV) have been used. In recent years, to perform genetic evaluation more accurately, a lot of studies begin to try identifying the genes that responsible for economical trait.

Previous studies have reported, five single nucleotide polymorphisms (SNPs) in endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1(EDG1), titin(TTN), akirin 2(AKIRIN2), ribosomal protein L27a(RPL27A) were associated with marbling in Japanese Black beef cattle population of the Oita prefecture (Yamada et al. 2009a; 2009b, 2009c; 2009d).

The SNPs were reported to be located in the promoter region of EDG1 (g. 1471620G>T), the untranslated region of EDG1 (c. -312A>G), the promoter region of TTN (g. 231054C>T), the 3' untranslated region of AKIRIN2 and the promoter region of RPL27A (g. 3109537C>T) respectively. However, the results of these associations were studied obtained only the population which consists of limited strain in a part of area, thus it is important to confirm usefulness of these SNPs for establishment of breeding program of whole Japanese black cattle populations.

The objectives of this study were to estimate an effect of the five SNP genotypes on marbling more exactly and to analyze association of the SNP genotypes with the

carcass traits other than the BMS, by utilizing a large population consisting of various strains.

For this purpose, our present study used large population of 1,351 Japanese black steers, in which the environmental factors were controlled and various strains were included in the Livestock Improvement Association of Japan.

For the necessary to genotype the five SNPs for a large number of DNA samples, in the second chapter, we developed a new protocol, which was named “2 STEP-MULTIPLE-PCR-SSP method”, by modifying the Sequence-Specific Primer Cycle Elongation (SSPCE) method. The main feature of this method is that it is performed in two steps. In the first step, the SNP-containing target region which spanned 100~300 bp were amplified by PCR, In the second step, allele specific reaction was carried out to detect genotype. When the series of these procedures were performed with the optimized conditions, in the 1st step, 5 different PCR products from the five SNPs were observed definitely, and in the 2nd step, allele specific reaction occurred in each SNP sites correctly. Furthermore, genotyping results of the 2STEP-MULTIPLE-PCR-SSP were in complete agreement with genotypes of previous study. This method should be useful for a several SNPs typing a number of samples, because it requires neither particular equipment nor expensive kit, and it also is easy to optimize a condition of reaction.

In the third Chapter, 1,351 Japanese black steers population that took progeny test in the Livestock Improvement Association of Japan were genotyped with 2STEP-MULTIPLE-PCR-SSP method, and associations of these 5 SNPs with beef marbling standard number (BMS) were investigated. The raw data of recorded BMS should contain environmental variances, so that it is impossible to exactly predict

allele substitution effect using its raw data. Thus, we used estimated breeding value (EBV) which were calculated by BLUP method to analyze association between the SNPs and BMS, as a result of association analysis between EBV of BMS and the SNPs, statistically significant differences were detected on c.-312A>G and g.231054C>T in EDG1 and TTN genes, respectively. But no significant differences were detected on g.1471620G>T in EDG1, c.188G>A in AKIRIN2, and g.3109537C>T in RPL2 7A. Differences between least squares means for genotypes within a SNP were examined by Tukey-Kramer's test. As a result, GG homozygotes showed significantly higher value than AA homozygotes in EDG1:c.-312A>G. The differences between AA and AG genotypes were 0.13 and the differences between AG and GG genotypes were 0.11. TT homozygotes also exhibited significantly higher value than the other genotypes in TTN:g.231054C>T. The differences between CC and TC genotypes were 0.06 and the differences between CT and TT genotypes were 0.40. In the other hand, no inter-allelic interaction between EDG1 and TTN was detected. Thus, I concluded that the SNPs in EDG1:c.-312A>G and TTN:g.231054C>T may be regarded as useful markers for breeding program such as selection or evaluation.

Whereas the two SNPs are useful for selection or evaluation for BMS, attention should be paid to other trait such as carcass weight, feed efficiency and so on. Consequently, in the fourth chapter, we investigated whether EDG1:c.-312A>G and TTN:g.231054C>T affect other traits. The association of the EDG1:c.-312A>G and TTN:g.231054C>T with the subcutaneous fat start weight (SWT), end weight (ET), start height (SH), end height (EWH), daily gain, subcutaneous fat thickness (SFT), carcass weight (CWT), rib eye area (REA), and rib thickness (RT), were studied. The breeding values for each trait were predicted by BLUP in the same way as the

BMS, prior to the analysis of association between the two SNPs and these traits. In the case of EDG1:c.-312A>G, statistically significant differences were detected in EWT, DG, CWT, RT and SFT, but not in SWT, SH and EH. In these traits, G allele of EDG1:c.-312A>G was more favorable than A allele for meat production. In the case of TTN:g.231054C>T, statistically significant differences were detected in DG and RT, and T allele of TTN:g.231054C>T was more favorable than C allele for meat production.

EDG1 is involved in angiogenesis in terms of function, therefore active expression of this gene result in the development of mature vessels, in which nutrient are delivered. On the other hand, TTN encodes a protein that is responsible for passive elasticity of muscle, active expression of this gene leads to the muscle development. The fact of this function suggested that EDG1 and TTN exert a function in physiological or anatomical milieux surrounding adipocyte-lineage cells rather than intramuscular adipocyte-lineage cells. The milieux were thought to promote proliferation, differentiation or maturation of adipocyte-lineage cells by controlling intramuscular vascularization and structural integrity of the sarcomere.

This study demonstrated that G allele of EDG1:c.-312A>G and T allele TTN:g.231054C>T revealed favorable effects on both of beef quality and productivity, suggesting that the two SNPs might be able to apply to breeding program for Japanese Black beef cattle.

付 属 資 料

資料1 相補鎖のチェック用プログラム。

```

Sub dimer_check ()

Dim SEQ(20) As String 'プライマー3 末端配列
Dim ALSEQ(20) As String 'プライマー配列
Dim RSEQ(20) As String '逆鎖プライマー配列
Dim ALRSEQ(20) As String '逆鎖プライマー3 末端配列
Dim SNAME(20) As String '配列名
Range("R5:T1000").ClearContents
Chech_Num = 0
For base_Num = 4 To 15

'候補配列読み取りと相補鎖、逆鎖作成
A = 1
For i = 1 To 30
If Cells(i + 5, 12).Value <> "" Then
SNAME(A) = Cells(i + 5, 13).Value
ALSEQ(A) = UCase(Cells(i + 5, 12).Value)
ALRSEQ(A) = reverseDNA(Cells(i + 5, 12).Value)
SEQ(A) = UCase(Right(Cells(i + 5, 12).Value, base_Num))
RSEQ(A) = UCase(Left(CreverseDNA(Cells(i + 5, 12).Value), base_Num))
A = A + 1
End If
Next i

'配列間総当り相補鎖確認
For J = 1 To 20
For i = J To 20
If SEQ(J) = "" Or RSEQ(i) = "" Then Exit For
For H = 1 To base_Num '3 末端を1塩基つつずらしながら一致を確認
If Mid(SEQ(J), H, 1) = Mid(RSEQ(i), H, 1) Then
same_mark = same_mark & "|"
match_num = match_num + 1
If pre_state = 0 Then
match_len = 1
ElseIf pre_state + 1 = H Then
match_len = match_len + 1

ElseIf pre_state + 1 > H And match_len >= 2 Then
match_len = match_len + 0
Else
match_len = 0
End If
pre_state = H

Else
same_mark = same_mark & " "
End If
Next H

'配列の描画
If Left(same_mark, 2) = "|" Or Right(same_mark, 2) = "|" Then dimer_alert = " Check !!"
'3' が2塩基以上連続してマッチする場合、警告を強調
If (match_num / base_Num > 0.5 And match_len >= 2) Or match_num / base_Num > 0.75 Then
'2塩基以上連続してマッチするもの、もしくは75%以上のマッチ率の組合せの場合ダイマーの状態を表示
'以下ダイマーの作成
left_spc_num = Len(ALSEQ(J)) - base_Num

For H = 1 To left_spc_num
space_mk = space_mk & " "
Next H
Cells(Chech_Num * 4 + 5, 13 + 7).Value = "3"

```



```

Cells(Chech_Num * 4 + 5, 11 + 7).Value = SNAME(J) & " 5' "
Cells(Chech_Num * 4 + 5, 12 + 7).Value = ALSEQ(J)
Cells(Chech_Num * 4 + 6, 12 + 7).Value = space_mk & same_mark
Cells(Chech_Num * 4 + 7, 11 + 7).Value = SNAME(i) & " 3' "
Cells(Chech_Num * 4 + 7, 13 + 7).Value = "5'"
Cells(Chech_Num * 4 + 7, 12 + 7).Value = space_mk & ALRSEQ(i)
Cells(Chech_Num * 4 + 6, 13 + 7).Value = dimer_alert
Cells(Chech_Num * 4 + 8, 13 + 7).Value = match_num & " bp / " & base_Num & " bp"
Chech_Num = Chech_Num + 1

End If
same_mark = ""
match_num = 0
left_spc_num = ""
space_mk = ""
match_len = 0
pre_state = 0
dimer_alert = ""
Next i
Next J
Next base_Num

End Sub

```

逆相補鎖の作成用関数。

---

```
Function CreverseDNA(strDNA As String) As String
```

```
' 逆相補鎖作成-使い方 :
```

```
' CreverseDNA("塩基配列")
```

```
' 具体例 :
```

```
' = CreverseDNA("AATGGCACGTTAA")
```

```
strDNA = UCase(strDNA)
```

```
strDNA = Replace(strDNA, "A", "t")
```

```
strDNA = Replace(strDNA, "T", "a")
```

```
strDNA = Replace(strDNA, "G", "c")
```

```
strDNA = Replace(strDNA, "C", "g")
```

```
strDNA = StrReverse(strDNA)
```

```
strDNA = UCase(strDNA)
```

```
CreverseDNA = strDNA
```

```
End Function
```

‘3→’5 方向配列（逆鎖）の作成用関数。

---

```
Function reverseDNA(strDNA As String) As String
```

```
' 逆鎖作成-使い方 :
```

```
' reverseDNA("塩基配列")
```

```
' 具体例 :
```

```
' = reverseDNA("AATGGCACGTTAA")
```

```
strDNA = UCase(strDNA)
```

```
strDNA = StrReverse(strDNA)
```

```
strDNA = UCase(strDNA)
```

```
reverseDNA = strDNA
```

```
End Function
```

---

相補鎖のチェック用プログラムの実行画面

length	GC	Tm(C)	3'end	Opposit	Mismatch type	SSP Sequence	Name	Grade	Direction	Dimmer Check
20	55.0%	56.9	G	T	GT	CAGTGAAGTGAAGTACCTGG	C25354G	5	F	C25354G 5' CAGTGAAGTGAAGTACCTGG 3'
23	47.8%	59.1	A	C	AC	AGTCGATGAGTGAAGTACCTGA	C25354A	4	F	MBI22220C 3' CACCTGGAACGATGGACATAA 5'
24	37.5%	57.1	G	A	GA	AGCTTGTATTCAGAAATTAATA	ED1738G	1	F	C25354G 5' CAGTGAAGTGAAGTACCTGG 3'
27	33.3%	61.0	T	C	TC	TGAACTCTGATGTCAGAAATTAATA	ED1738T	3	F	MBI22220T 3' TACCTGGAACGATGGACATAA 5'
22	45.5%	58.4	C	A	CA	AGTACAGGTGACAAAGTCCAG	MBI22220C	4	F	C25354G 5' CAGTGAAGTGAAGTACCTGG 3'
25	39.0%	59.5	T	G	TG	ATTAATACAGTTCACAAAGTCCAT	MBI22220T	5	F	C25354G 5' CAGTGAAGTGAAGTACCTGG 3'
26	26.9%	57.7	C	A	CA	GGATCTGAAAGAGAGATCATTACAC	TT652C	4	F	C25354G 5' CAGTGAAGTGAAGTACCTGG 3'
29	24.1%	61.8	T	G	TG	AGGAGATCTGAAAGAGAGATCATTACAT	TT652T	5	F	C25354G 5' CAGTGAAGTGAAGTACCTGG 3'
17	64.7%	61.3	C	A	CA	CAGCCGACACCTCCAG	ED+186C	4	F	ED+166C 3' CAACCTCACACCCGAC 5'
20	65.0%	69.1	T	G	TG	CCGACCCGACACCTCCAT	ED+186TM	5	NG	ED+166C 3' CAACCTCACACCCGAC 5'
0		-294.8								ED1736T 5' TGAAGCTTGATGTCAGAAATTAAGTT 3'
0		-294.8								ED1736T 3' TTGAATAAAGGATGATGATGTCGAAGT 5'
0		-294.8								ED1736G 5' AGCTTGATGTCAGAAATTAAGTG 3'
0		-294.8								ED+166TM 3' TATCCTCACACCCGACGCC 5'
0		-294.8								ED1736T 5' TGAAGCTTGATGTCAGAAATTAAGTT 3'
0		-294.8								ED+166TM 3' TATCCTCACACCCGACGCC 5'
0		-294.8								C25354G 5' CAGTGAAGTGAAGTACCTGG 3'
0		-294.8								MBI22220T 3' TACCTGGAACGATGGACATAA 5'
0		-294.8								C25354A 5' AGTCGATGAGTGAAGTACCTGA 3'
0		-294.8								MBI22220T 3' TACCTGGAACGATGGACATAA 5'

Primer濃度 100 nM  
Na+濃度 50 mM

付属資料 2 2 遺伝子間の交互作用を含めての検定結果

付表 2-1 一般線形モデルを用いての検定結果

Model: 脂肪交雑の EBV = SNP(1) + SNP(2) + SNP(1) × SNP(2) + 残差  
 SNP(1), SNP(2)にはそれぞれの SNP 型が入る

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)	
(Intercept)	220.36	1	166.3661	< 2e-16	***
EDG1: c. -312A>G	9.69	2	3.6582	0.02608	*
TTN: g. 231054C>T	5.88	2	2.219	0.10918	
EDG1: c. -312A>G : TTN: g. 231054C>T	3.04	4	0.5729	0.68236	
Residuals	1512.64	1142			

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)	
(Intercept)	167.56	1	125.8207	< 2e-16	***
EDG1: c. -312A>G	0.11	2	0.0401	0.96074	
AKIRIN2: c. *188G>A	6.71	2	2.5179	0.08104	.
EDG1: c. -312A>G : AKIRIN2: c. *188G>A	5.83	4	1.0949	0.35758	
Residuals	1660.63	1247			

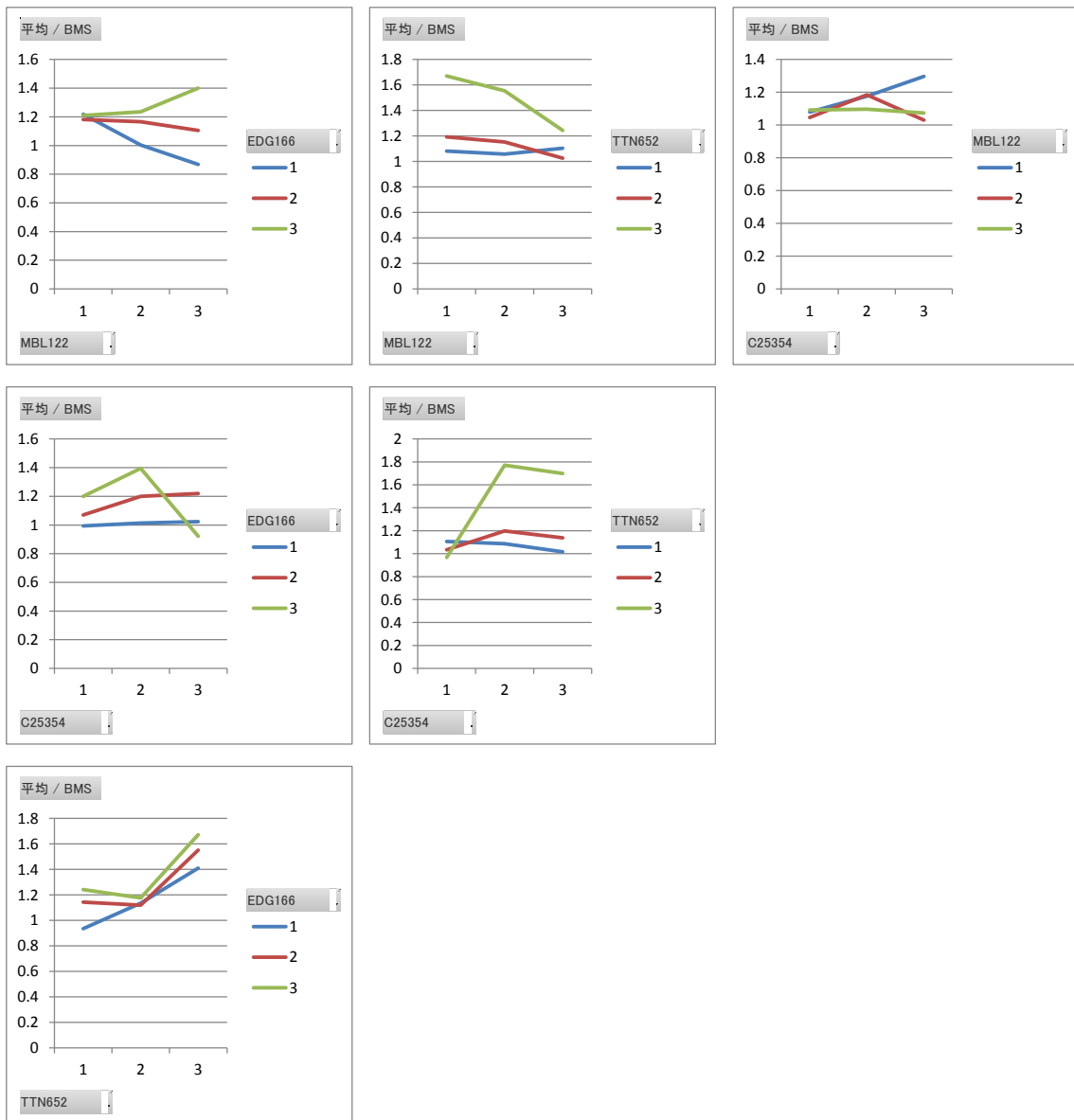
	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)	
(Intercept)	108.76	1	82.7787	< 2e-16	**
EDG1: c. -312A>G	1.5	2	0.57	0.5657	
RPL27A: g. 3109537C>T	0.05	2	0.0173	0.9829	
EDG1: c. -312A>G : RPL27A: g. 3109537C>T	7.97	4	1.5158	0.1952	
Residuals	1553.04	1182			

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)	
(Intercept)	235.22	1	176.6066	< 2e-16	***
TTN: g. 231054C>T	9.38	2	3.521	0.0299	*
AKIRIN2: c. *188G>A	0.23	2	0.0861	0.9175	
TTN: g. 231054C>T : AKIRIN2: c. *188G>A	1.9	4	0.3576	0.8389	
Residuals	1498.4	1125			

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)	
(Intercept)	214.13	1	161.4442	< 2e-16	***
TTN: g. 231054C>T	0.48	2	0.1796	0.8357	
RPL27A: g. 3109537C>T	0.76	2	0.2866	0.7509	
TTN: g. 231054C>T : RPL27A: g. 3109537C>T	7.48	4	1.4093	0.2287	
Residuals	1468.28	1107			

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)	
(Intercept)	97.8	1	73.2507	< 2e-16	***
AKIRIN2: c. *188G>A	0.11	2	0.0424	0.9585	
RPL27A: g. 3109537C>T	1.93	2	0.7235	0.4853	
AKIRIN2: c. *188G>A : RPL27A: g. 3109537C>T	3.26	4	0.6097	0.6557	
Residuals	79.55	1183			

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1



付図 2-1 2 遺伝子間の組み合わせた遺伝子型の平均値プロット図

附属資料3 MTDFREML ProgramにてBMSの育種価を計算した場合の出力結果

Started 00:00:00.00 on 00/00/0000

```

+++++
PROGRAM "MTDFRUN" - Estimate Covariance Components for MT-IAM
                    Last revised      2/      2/      96
+++++

```

BMS

Cold start, i.e., not a continuation of previous run  
 Run option 1: iterate for variance components

0 constraints imposed by user

(Co)variances in model:

```

No. in likelihood calculation      =      2
No. to be held constant            =      0
No. to be maximized                =      2

```

Starting values for this run:

G matrix:  
 2.4

C matrix:

R matrix:  
 1.1

size and rank are: 20621 20619

```

** FSPAK solve called **
** FSPAK solve completed **
The elapsed time was: 00:00:00.00
Warning! non full rank matrix
Value corresponds to a generalized inverse

```

```

*****
**** FSPAK ****
*****
MPE / IM / MAE
Jun 1994

```

```

SPARSE STATISTICS
DIMENSION OF MATRIX =      20621
RANK                 =      20619
STORAGE AVAILABLE   =     31300024
MAXIMUM NEEDED      =     948381
NZE IN UPPER TRIANGULAR =     102632
NZE IN FACTOR       =     206891
NO. OF CALLS NUM FACT =          1
NO. OF CALLS SOLVE   =          1
NO. OF CALLS SPARS SOLV =          0
NO. OF CALLS DET / LDET =          1
NO. OF CALLS SPARS INV =          0
TOTAL CPU TIME IN FSPAK =     .000000
TIME FOR FINDING ORDER =     .000000
TIME FOR SYMBOLIC FAC  =     .000000
TIME FOR NUMERICAL FAC =     .000000
TIME FOR SOLVE         =     .000000
TIME FOR SPARSE SOLVE  =     .000000
TIME FOR SPARSE INVERSE =     .000000

```

\*\*\*\*\* RESULTS FROM SIMPLEX \*\*\*\*\*

OPTIONS SET FOR THIS RUN:

MAXIMUM NO. OF SIMPLEX ITERATES ALLOWED = 10000  
MINIMUM VARIANCE OF FUNCTION VALUES IN SIMPLEX = .1000000000E-15

RESULTS FOR THIS RUN:

NO. OF SIMPLEX ITERATIONS CARRIED OUT = 35  
NO. OF LIKELIHOODS EVALUATED = 68  
NO. OF NON-PERMISSABLE PARAMETER VECTORS = 0  
NO. OF FAILED CONTRACTIONS = 0  
VARIANCE OF SIMPLEX FUNCTION VALUES = .5204170428E-17  
Convergence criterion attained

Final Simplex: (++) best L; \*\*\* parameter held constant)

++ 1 10815.90373 2.3553 1.0686  
2 10815.90373 2.3553 1.0685  
3 10815.90373 2.3553 1.0685  
-2 log L = 10815.9037312061 ( 1) Var = .0000000000

Estimates:

GENETIC VARIANCES AND COVARIANCES :

a1  
a1 : 2.35532

ENVIRONMENTAL VARIANCES AND COVARIANCES :

e1  
e1 : 1.06856

PHENOTYPIC VARIANCES AND COVARIANCES :

p1  
p1 : 3.42388

HERITABILITIES AND GENETIC CORRELATIONS

a1  
a1 : .69

ENVIRONMENTAL PROPORTION OF TOTAL VARIANCE AND CORRELATIONS

e1  
e1 : .31

Files written:

MTDF4 (ascii): Parameter file (IUN5) for "cold" restart  
MTDF54 (ascii): Last simplex  
MTDF58 (binary): SPARSPAK reordering  
MTDF59 (ascii): Constraints imposed  
MTDF68 (ascii): Likelihoods by rounds  
MTDF67 (ascii): Sampling variances if requested  
MTDF72 (ascii): Predicted BVs and PEVs if requested  
MTDF76 (ascii): Program log file  
MTDF77 (ascii): Solutions for covariates and fixed effects if requested  
MTDF78 (ascii): Solutions for trait within animal if requested  
MTDF79 (ascii): Solutions for independent random effects if requested

The current time is: 00:00:00.00

Total time of analysis  
The elapsed time was: 00:00:00.00

附属資料 4 脂肪交雑以外の形質のモデル式に取り込む要因の検定結果

従属変数：開始体重

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
(Intercept)	14378309	1	15450.043	< 2.2e-16 ***
肥育時期	111884	9	13.358	< 2.2e-16 ***
検定場	109954	1	118.149	< 2.2e-16 ***
検定年	204170	11	19.944	< 2.2e-16 ***
Residuals	4776005	5132		

従属変数：開始体高

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
(Intercept)	3038300	1	235806.048	< 2.2e-16 ***
肥育時期	2159	9	18.614	< 2.2e-16 ***
検定場	1169	1	90.722	< 2.2e-16 ***
検定年	3439	11	24.263	< 2.2e-16 ***
Residuals	66124	5132		

従属変数：終了体重

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
(Intercept)	78099285	1	25483.2404	< 2.2e-16 ***
肥育時期	34096	9	1.2361	0.2675
検定場	134788	1	43.9805	3.658e-11 ***
検定年	669918	11	19.8718	< 2.2e-16 ***
Residuals	15728201	5132		

従属変数：終了体高

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
(Intercept)	4362016	1	3.1847e+05	< 2.2e-16 ***
肥育時期	391	9	3.1745e+00	0.0007832 ***
検定場	1775	1	1.2960e+02	< 2.2e-16 ***
検定年	3969	11	2.6342e+01	< 2.2e-16 ***
Residuals	70292	5132		

従属変数：日増体重量

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
(Intercept)	192.259	1	17580.9291	< 2.2e-16 ***
肥育時期	0.953	9	9.6836	8.258e-15 ***
検定場	0.010	1	0.8867	0.3464
検定年	1.641	11	13.6437	< 2.2e-16 ***
Residuals	56.122	5132		

従属変数：枝肉重量

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
(Intercept)	28663931	1	22623.9802	< 2e-16 ***
肥育時期	25304	9	2.2192	0.01824 *
検定場	105627	1	83.3700	< 2e-16 ***
検定年	166253	11	11.9292	< 2e-16 ***
Residuals	6502096	5132		

従属変数：ロース芯面積

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
(Intercept)	543935	1	16621.9021	< 2.2e-16 ***
肥育時期	234	9	0.7942	0.6217
検定場	95	1	2.8917	0.0891 .
検定年	2894	11	8.0387	4.597e-14 ***
Residuals	167939	5132		

従属変数：バラ厚

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
(Intercept)	8683.3	1	17778.5910	< 2.2e-16 ***
肥育時期	14.3	9	3.2504	0.0006019 ***
検定場	1.4	1	2.8706	0.0902727 .
検定年	163.3	11	30.3954	< 2.2e-16 ***
Residuals	2506.5	5132		

従属変数：脂肪交雑（参考）

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
(Intercept)	11128.7	1	3351.1271	< 2.2e-16 ***
肥育時期	74.9	9	2.5060	0.007369 **
検定場	2.7	1	0.8278	0.362949
検定年	3600.6	11	98.5662	< 2.2e-16 ***
Residuals	17042.8	5132		

従属変数：皮下脂肪厚

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
(Intercept)	998.74	1	3580.1008	< 2.2e-16 ***
肥育時期	11.35	9	4.5211	6.022e-06 ***
検定場	21.95	1	78.6948	< 2.2e-16 ***
検定年	42.20	11	13.7525	< 2.2e-16 ***
Residuals	1431.68	5132		

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

全記録の検定で有意な差が見られない項目も年度ごとの検定で有意な差が見られたので、全ての形質で母数効果の要因として取り込んだ。

附属資料 5 脂肪交雑以外の形質の最適なモデル式の検討

母数効果として取り上げた要因（検定場:F、検定年:Y、肥育時期:T）を以下の線形モデルを考え比較検討した。

Model 1-1:

$$Y_{ijkl} = F_i \times Y_j \times T_k + A_{ijkl} + e_{ijkl}$$

Model 1-2:

$$Y_{ijkl} = F_i + Y_j \times T_k + A_{ijkl} + e_{ijkl}$$

Model 1-3:

$$Y_{ijkl} = F_i + Y_j + T_k + A_{ijkl} + e_{ijkl}$$

( $Y_{ijkl}$  は形質の観測値、 $F_i$  は  $i$  番目の検定場に関する母数効果、 $Y_j$  は  $j$  番目の検定年に関する母数効果、 $T_k$  は  $k$  番目の肥育時期の母数効果、 $A_{ijkl}$  は  $ijkl$  番目の育種価、 $e_{ijkl}$  は残差を表す。)

上記 3 つのモデルを用いてそれぞれ BLUP 法で育種価を推定した場合の対数尤度、赤池情報量基準 (AIC) は以下のとおり。

<i>Model</i>	<i>対数尤度</i> <i>-2 × log Likelihood</i>	<i>赤池情報量基準</i> <i>AIC</i>	<i>パラメータ数</i> <i>npar</i>
Model 1-1	10828.2	11218.2	195
Model 1-2	10825.9	11033.9	104
Model 1-3	10815.9	10863.9	24

上記結果より、AIC の値が最も低かった Model 1-3 を最適なものとした。