

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 TONG BIN
 学位 博士 (農学)
 学位記番号 新大院博 (農) 第 150 号
 学位授与の日付 平成 27 年 3 月 23 日
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
 博士論文名 黒毛和種牛の脂肪交雑に関連する分子マーカーの開発

論文審査委員 主査 教授・山田 宜永
 副査 教授・新村 末雄
 副査 教授・高田 良三
 副査 准教授・中野 優
 副査 准教授・杉山 稔恵

博士論文の要旨

脂肪交雑とは、脂肪が筋肉内に細かく網の目のように入り込んだ状態であり、霜降りとも呼ばれている。牛肉の品質を決定する重要な形質であることから、脂肪交雑形成の遺伝的能力を高い水準で安定的に維持していく、または向上していくことが大きな課題となっている。そのため、脂肪交雑の原因変異やその近傍の多型をマーカーとして取り入れた和牛 DNA 育種改良システムの構築が必要であり、この構築は畜産業に多大な貢献をすると考えられている。そこで本博士論文では、定量的 DD 法を利用した発現プロファイリングにより、脂肪交雑形成に関連した発現パターンをもつ遺伝子を同定し、機能情報を用いた候補選定の解析、リアルタイム PCR を用いた発現パターンの解析および QTL 情報を用いた候補選定の解析を行うことにより、脂肪交雑原因遺伝子の位置的機能的候補を同定した。さらに、そのような遺伝子の多型解析およびえられた多型と脂肪交雑との相関解析を行い、脂肪交雑関連マーカーを開発することとした。

本論文では、脂肪交雑形成の遺伝的能力が極端に高い黒毛和種体細胞クローン牛 2 頭 (高能力牛群) と、その能力が極端に低いホルスタイン種牛 2 頭 (低能力牛群) の最長筋組織を用いた遺伝子発現プロファイリングを行い、脂肪交雑形成に関連した発現パターンをもつバンドを同定した。90 プライマーペアを用いた解析により特定された 2,114 個のバンドのうち、2 牛群間で発現量に差がみられ、脂肪交雑形成と関連があると予想される候補バンドが 74 個選出された。候補バンドについてより詳細に分類したところ、群間でのみ有意な差が検出された候補バンドが 34 個、群と月齢との交互作用のみが有意であった候補バンドが 28 個、群間および群と月齢との交互作用の両方が有意であった候補バンドが 12 個存在することを明らかにした。

次に、得られた候補バンドから脂肪交雑原因遺伝子の候補の絞り込みを行うため、74 個のうち 10 個について塩基配列を決定し、ホモロジー解析を行った後、文献情報を用いた遺伝子機能の検索を行った。その結果、CDC10、TRDN、MFN2、MYBPC1、MYH1 および IRS1 という 6 個が既知遺伝子として同定され、機能の点から、これら 6 個の遺伝子の高能力牛群と低能力牛群との間での発現量の差は、脂肪交雑形成に関連をもつと考えられた。さらに、リアルタイム PCR 法を用いて、上記 6 個の遺伝子の定量的 DD 法で得られた発現プロファイルの確認を行ったところ、リアルタイム PCR 法においても、高能力牛群と低能力牛群との間に定量的 DD 法と同様の発現量の差が検出された。こうして、これらの 6 つの遺伝子は、機能および発現プロファイルの点から脂肪交雑原因遺伝子の機能的候補と

して同定できると考えられた。また、脂肪交雑 QTL の染色体位置との一致性の解析および近傍マイクロサテライトを用いた予備的相関解析の結果より、これらの 6 個の遺伝子は、脂肪交雑原因遺伝子の位置的候補として同定できると考えられた。以上のことから、CDC10、TRDN、MFN2、MYBPC1、MYH1 および IRS1 の 6 個の遺伝子は脂肪交雑原因遺伝子の位置的機能的候補になると考えられた。

引き続き、脂肪交雑形成過程と関連した発現パターンをもち、脂肪交雑原因遺伝子の位置的機能的候補と考えられた 6 個の遺伝子について PCR ダイレクトシーケンスを行い、脂肪交雑形成能力の異なる牛群間（高能力牛群と低能力牛群の間）での多型の検出を行った。その結果、CDC10-323、TRDN+412435、MFN2+1323、MFN2+1104、MFN2+1078、MFN2+810、MFN2-681、MFN2-1587、MYBPC1-4927、MYBPC1-4035、MYBPC1-3394、MYH1-2622 および IRS1-2910 の 13 個の SNP が検出された。13 個の SNP を脂肪交雑関連マーカーとして同定していくためには、脂肪交雑形成能力との間に相関があるか否かを解析する必要がある。最初に、このような解析を行うためには、多数のサンプルの遺伝子型を判定していく必要がある。こうして、13 個の SNP について、PCR-RFLP 法による簡便な遺伝子型判定法を確立し、高能力牛群と低能力牛群を用いることで、本手法が有効なタイピング法であることを明らかにした。次に、血縁関係のない大分県有黒毛和種種雄牛集団（100 頭）の中で高い脂肪交雑育種価をもつ牛群 17 頭と、低い脂肪交雑育種価をもつ牛群 17 頭について遺伝子型判定を行い、2 つの牛群間でのアリル頻度分布の比較により、SNP と脂肪交雑との予備的相関解析を行った。その結果、13 個の SNP の内、MYBPC1 遺伝子のプロモーター領域に存在する MYBPC1-4927 SNP において、G アリルが脂肪交雑育種価の極めて高い大分県有黒毛和種種雄牛群で、A アリルが脂肪交雑育種価の極めて低い大分県有黒毛和種種雄牛群で、高い頻度を持つことが明らかにされ、この G アリルは高い脂肪交雑レベルに関連している可能性があると考えられた。さらに、MYBPC1-4927 SNP と脂肪交雑形成能力との関連を確認するために、大分県有黒毛和種種雄牛 100 頭および大分県産の父方半きょうだい黒毛和種去勢肥育牛 745 頭を用いて、脂肪交雑と MYBPC1-4927 SNP との間の相関解析を行った。その結果、種雄牛を用いた解析において、MYBPC1-4927 SNP では、AG ヘテロ型の個体の方が AA ホモ型の個体より統計的に有意に高い脂肪交雑育種価を示した。また、肥育牛を用いた相関解析において、MYBPC1-4927 SNP では、AG ヘテロ型の個体の方が AA ホモ型の個体より統計的に有意に高い脂肪交雑育種価を示した。以上の結果より、MYBPC1-4927 SNP は、黒毛和種牛の脂肪交雑のレベル向上を目指した選抜育種における分子マーカーとして有用であると考えられた。

これらの結果より、MYBPC1-4927 SNP は、黒毛和種牛における脂肪交雑に関連する分子マーカーとして同定され、当該品種の脂肪交雑のレベルを向上させるマーカーアシスト選抜に適用できるものと考えられた。

審査結果の要旨

本研究は、定量的 DD 法を利用した発現プロファイリングにより、脂肪交雑形成に関連した発現パターンをもつ遺伝子を同定し、機能情報を用いた候補選定の解析、リアルタイム PCR を用いた発現パターン確認の解析および QTL 情報を用いた候補選定の解析を行うことにより、CDC10、TRDN、MFN2、MYBPC1、MYH1 および IRS1 という 6 個の脂肪交雑原因遺伝子の位置的機能的候補を同定した。さらに、そのような 6 個の遺伝子の多型解析およびえられた多型と脂肪交雑との相関解析を行い、MYBPC1-4927 SNP が黒毛和種牛における脂肪交雑に関連する分子マーカーとして有用であることを明らかにした。これらの研究成果は、脂肪交雑に関わる分子機構を解明するための重要な学術的知見であるとともに、選抜育種に応用することによって畜産業界の課題克服に貢献するものと考えられる。

本研究の内容は、いずれもレフリーシステムの確立された学術雑誌に 14 件掲載されており、学術的価値が非常に高いと評価された。

よって、本論文は博士（農学）の博士論文として十分であると認定した。