

遺伝子発現プロファイリングに基づく  
脂肪交雑および増体重関連マーカーの  
開発に関する研究

2015 年

助川 慎  
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

	頁
第 1 章 序論 . . . . .	1
第 2 章 <i>EDG1</i> 遺伝子の一塩基多型 ( <i>EDG1+166 (c-312A&gt;G)</i> ) と 黒毛和種牛群の枝肉成績との相関解析 . . . . .	7
第 3 章 <i>EDG1</i> 、 <i>AKIRIN2</i> 、 <i>RPL27A</i> 遺伝子上に存在する 一塩基多型 <i>g.1471620G&gt;T</i> 、 <i>c*188G&gt;A</i> 、 <i>g.3129537C&gt;T</i> の 黒毛和種牛脂肪交雑に対する遺伝的効果と相互作用の検証 . . .	29
第 4 章 遺伝子プロファイリング手法のブタランドレース種増体重 に関連する遺伝子マーカー開発への応用 . . . . .	56
第 5 章 総括 . . . . .	97
参考文献 . . . . .	100
英文要約 . . . . .	109
謝辞 . . . . .	112

# 第 1 章

## 序論

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主要な要因の一つである。脂肪交雑は筋肉内に脂肪細胞が浸潤し、筋間に脂肪を蓄えることによって形成される。牛肉の評価において脂肪交雑は、ロース芯の脂肪組織の程度によって **Beef Marbling Standard (BMS)** と呼ばれるスコアがつけられ、日本における非常に重要な経済形質となっている (JMGA 1988)。脂肪交雑が高程度の牛肉は一般的に味がよく、嗜好性や香りが増すとされている (Busboom *et al.*, 1993、Boylston *et al.*, 1995、Matsuishi *et al.*, 2001)。その実際の取引価格を例にとってみると、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 1,500~1,800 円であるのに対して 5 等級のものは 2,000~2,300 円と 1.3~1.4 倍もの差がみられる (図 1-1、農林水産省統計情報より)。

国内の食肉牛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、脂肪交雑を効率よく高め、肉質に優れた肉牛を育成する方法に高い関心を寄せている。脂肪交雑は気温などの環境要因の他、飼料の種類や肥育方法、ビタミン A コントロール (Oka *et al.*, 1998) のような飼養方法、そして牛の元々の遺伝的要因などが複雑に影響しあうことで形成されている。生産現場においては飼料や飼養環境といった後天的な要因による脂肪交雑への効果を最大限高める工夫を行うとともに、血統を考慮した交配によって遺伝的な効果を高める取り組みがなされてきた。近年では飼料の高騰や環太平洋戦略的経済連携協定 (TPP) を見据えた海外の輸入品との価格競争、海外での高品質和牛のブランド戦略など、生産コストを抑えつつ品質を向上させることがますます重要になってくると考えられる。このため、脂肪交雑の遺伝的な改良を進めることで飼養環境や飼料に関係なく、効率的に脂肪交雑を高める取り組みが現在以上に重要になると考えられる。

現在までの脂肪交雑の改良方法は統計遺伝学的な手法を用いて推定された個体の各形質の遺伝的能力、即ち推定育種価を基に育種選抜を実施していくものであった。特に最良線形不偏予測法 (best linear unbiased prediction method、BLUP 法 (Henderson 1973)) は様々な異なる飼育環境で育てられた個体でも、その環境要因を統計的に排除し、血統情報を取り入れることで正確かつ偏りのない育種価を推定する方法として広く活用されている。特に近年はコンピュータの発達とともに膨大な数の個体情報、血統情報を基にした遺伝能力の推定が可能となり、牛に限らず様々な家畜に利用されるようになった。国内の黒毛和種においても 1990 年代以降より大いに活用され、川田ら (2003) の報告ではこの 10 年で BMS ナンバーは育種価で 1 以上向上したとされている。このように BLUP 法は種畜の育種価を推定するのに優れた方法であるが、誤差を持つフィールドデータを基にして遺伝的能力を推定する方法であるため、正確な育種価計算のためには質の良いデータを大量に得る必要がある。種雄牛においては人工授精による半きょうだい後代牛の成績を大量に得ることが可能であるが、そのためには半きょうだいを大量に飼育する莫大なコストが必要であり、また、抜けのないデータを採取する手間も要求される。また、繁殖雌では 1 回に 1 頭の出産しかできないため多くの後代牛を得ることは不可能であり、推定育種価の正確性を上げるのは困難である。その一方でゲノム情報を活用し、統計遺伝学的手法とは別に正確な個体の遺伝的能力を評価する取り組みがなされている。ウシゲノム全体をカバーするマイクロサテライトマーカーの連鎖地図が発表されて以来 (Barendse *et al.*, 1994、Bishop *et al.*, 1994)、遺伝病などの質的形質を支配する遺伝子を連鎖解析によって同定する試みがなされていった。連鎖地図上にマッピングすることで原因遺伝子の位置を特定するポジショナルクローニングにより、これ

まで同定が困難であった形質の原因遺伝子を同定することが可能になった (Charlier *et al.*, 1996、Hirano *et al.*, 2000、Ohba *et al.*, 2000)。その後のゲノム解析プロジェクトによってマーカーの数と精度は向上し (Kappes *et al.*, 1997)、より複雑な多数の遺伝子の機能によって支配される量的形質 (Quantitative trait loci: QTL) の解析が可能となった (Haley *et al.* 1994)。これにより黒毛和種においても様々な形質に対する QTL が同定され、特に脂肪交雑に関与する染色体領域も報告されている (Takasuga *et al.*, 2007)。このような QTL 情報を基に育種選抜を行うことをマーカーアシスト選抜 (MAS) と呼び、従来の統計遺伝学に代わる手法として期待されたが、QTL にはいくつかの欠点が存在した。それはある集団で同定した QTL は他の遺伝的集団では QTL のハプロタイプが異なる可能性があり、原則的には解析した集団にしかな適用できないこと、また、マッピングによる手法では原因遺伝子の領域を絞り込むにも限界があり、量的形質の責任遺伝子や責任遺伝子多型を特定するのは非常に困難なことがあげられる。このように QTL 分析からの遺伝子マーカー開発のアプローチは汎用性や原因遺伝子の特定が困難なことなどからマーカーアシスト選別への応用が進まなかった。

一方で Sasaki *et al.* (2006) は形質値が著しく異なる組織中の遺伝子発現を網羅的に比較することで、標的とする形質に関与する遺伝子を同定する試みを実施している。ディファレンシャルディスプレイ法を用いて脂肪交雑が極端に異なる牛の胸最長筋に発現する遺伝子の網羅的な発現プロファイリングを実施した結果、77 個の遺伝子をスクリーニングすることに成功した。また、その後の研究において 77 個の遺伝子の周辺の塩基配列を詳細に分析することで形質の異なる個体間に存在する一塩基多型 (SNPs) を多数検出した (Yamada *et al.*, 2007-2008、Sukegawa *et al.*, 2007-2008)。さらにこれら

の遺伝子多型について小集団での予備的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合することでより脂肪交雑との関連性の確度の高い遺伝子を絞り込んだ。その結果、*endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1 (EDG1)*、*TITIN*、*AKIRIN2*、*RPL27A* という 4 遺伝子の中に存在する 5 つの一塩基多型について、脂肪交雑との有意な関連性を検出した。また、これらの一塩基多型が大分県の種雄牛集団、およびその後代肥育牛集団を用いた相関解析において脂肪交雑に対して有意な遺伝子多型効果を示すことが確認された (Sasaki *et al.*, 2009、Yamada *et al.*, 2009a、Yamada *et al.*, 2009b、Yamada *et al.*, 2009c)。これらの研究から 5 つの一塩基多型がマーカーアシスト選抜に応用できる可能性が示されたが、多様な遺伝的背景を持つ他の黒毛和種集団においても適用可能かどうか、また、1 つの一塩基多型だけでなく、複数の一塩基多型を同時にマーカーアシスト選抜することによって遺伝子間の相互作用がどの程度影響するのかなど、実際に活用するにはまだ解決すべき課題が残されている。

さらに、このような遺伝子の網羅的な発現プロファイリングによる責任遺伝子のスクリーニングと遺伝子マーカー開発の手法は牛に限らず他の畜種や他の形質においても有効な手法であると考えられるが、本手法を他の畜種、形質に応用し、実施した報告はなく、本手法が汎用的に適用可能かどうかはいまだ確認されていない。

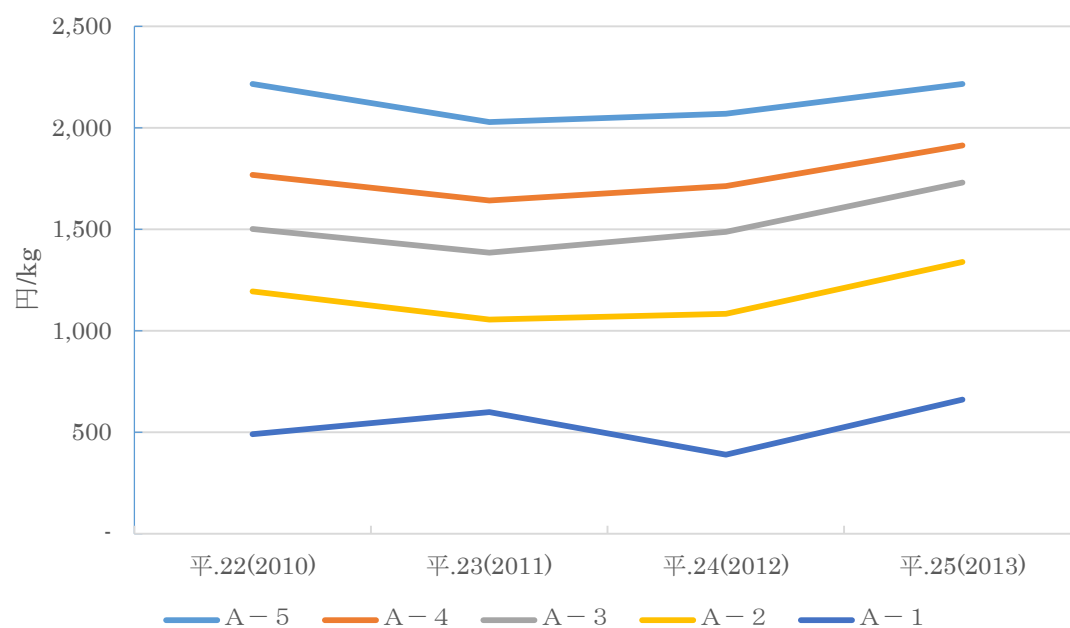
本博士論文では、これまでに同定した脂肪交雑関連遺伝子マーカーが様々な黒毛和種集団で広く汎用的に活用できるかどうか、また、同時に複数の遺伝子マーカーを用いて選抜を行った場合の遺伝子間相互作用の影響について

検証した成果をまとめた。また、遺伝子発現プロファイリングによる量的形質責任遺伝子同定の手法が他の畜種、形質においても有効かどうかの検証を実施した。第2章では *EDG1* 遺伝子の1つの一塩基多型について様々な種雄牛由来で、遺伝的背景が多様な商用黒毛和種集団における脂肪交雑との関連性のレプリケーション研究を行うとともに、他の産肉形質への影響について分析を行った。

第3章では *EDG1*、*AKIRIN2*、*RPL27A* の3遺伝子の遺伝子多型について第2章と同様に遺伝的背景が多様な商用黒毛和種集団における脂肪交雑との関連性のレプリケーション研究を行うとともに、3遺伝子多型間の相互作用効果について検証し、3遺伝子を同時にマーカーアシスト選抜した場合の脂肪交雑への効果について検討し、これらの遺伝子多型の遺伝子マーカーとしても有用性について明らかにした。第4章では遺伝子発現プロファイリングによる量的形質責任遺伝子同定の手法をブタランドレース種の増体重に適用することで他畜種、他形質での本手法の有効性を明らかにした。



図 1-1 和牛枝肉の 1kg 当たり卸売価格



## 第 2 章

*EDG1* 遺伝子の一塩基多型  
(*EDG1+166 (c-312A>G)*) と黒毛和種牛群の  
枝肉成績との相関解析

## 緒言

第1章において述べたとおり、国内における牛肉の市場価値にもっとも影響を及ぼす形質は脂肪交雑であり、特に和牛において脂肪交雑向上をターゲットとした育種技術の開発はその経済的価値を高める重要な要素の一つである。我々は遺伝子発現プロファイリングに基づく位置的機能的遺伝子の探索法によって *endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1 (EDG1)* 遺伝子の5'側の非翻訳領域に、脂肪交雑と相関のある遺伝子多型 *c.-312A>G* を見出した。(Sasaki *et al.*, 2006)

*c.-312A>G* は遺伝子発現プロファイリングに供した黒毛和種とホルスタイン種においてそれぞれ *G* アリルホモ型、*A* アリルホモ型であり、*G* アリルの脂肪交雑に対する遺伝的効果が *A* アリルよりも高いことが報告されている。また、黒毛和種では *G* アリルと *A* アリル両方とも存在しており、ヘテロ種雄牛の後代牛による半きょうだいの相関解析においても *G* アリルが脂肪交雑への遺伝的効果が有意に高いことが見出されている (Yamada *et al.*, 2009c)。

しかしながら遺伝子マーカーとして本遺伝子多型を黒毛和種に汎用的に用いることを考えた場合、いくつかの問題点が存在する。一つは様々な遺伝的背景を持つ商用の黒毛和種集団においてこの遺伝子多型の効果を検証するレプリケーションスタディが必要となることである。遺伝的背景が異なる場合、*EDG1* に対する他の遺伝子多型が及ぼす遺伝的効果もそれぞれ異なると考えられ、*c.-312A>G* 遺伝子多型が脂肪交雑に常に同じように関与するかどうかは不明である。そのため *c.-312A>G* 遺伝子多型の脂肪交雑に対する効果が様々な遺伝的背景を持つ黒毛和種集団においても普遍的に存在するかどうかを確認しなければならない。もう一つは脂肪交雑以外の経済的な形質への影響である。牛肉の経済的価値に最も影響があるのは脂肪交雑ではあるが、そ

のほかにも肉量を高めるための増体重や歩留を向上させるための皮下脂肪厚、ロース芯面積など牛肉の評価に関わる形質が存在する。*c.-312A>G* が脂肪交雑以外のこれらの形質に対して悪影響を及ぼさないかどうかについては検証がなされておらず、脂肪交雑への効果と合わせて遺伝的背景に依存することなく悪影響がないことを明らかにする必要がある。特にいくつかの脂肪交雑と関連性のある遺伝子と皮下脂肪厚との有意な正の相関関係が報告されており (Jiang *et al.*, 2005)、脂肪交雑の向上とともに皮下脂肪厚の増大という望ましくない形質が付与される恐れもある。

本章では日本で出荷された様々な遺伝的背景を持つ 3 地域の商用黒毛和種集団を用い、*c.-312A>G* と脂肪交雑との関連性を検証するレプリケーションスタディを実施するとともに、脂肪交雑以外の皮下脂肪厚、枝肉重量、ロース芯面積、バラ厚の 4 つの経済形質について *c.-312A>G* との相関解析を行った。

材料および方法

サンプルおよびデータ

*c.-312A>G* 遺伝子多型と遺伝的能力の相関解析を行うサンプルとして、2006年8月から2007年7月までに3県（鹿児島県、長崎県、宮崎県）の各1ヶ所の処理場に出荷された黒毛和種840頭より脂肪組織および形質データを採取した。形質データとは脂肪交雑の度合いを示す Beef Marbling Standard (BMS) のほか、皮下脂肪厚 (Subcutaneous Fat Thickness (SFT))、枝肉重量 (Carcass Weight (CWT))、ロース芯面積 (Rib Eye Area (REA))、ばら厚 (Rib Thickness (RT)) の牛の市場価値に関連する5つである。これら5つの形質は、日本公益社団法人日本食肉格付協会の格付基準に則って各処理場の検定員がと殺後に行う検定のデータを用いた (JMGA 1988)。

鹿児島県の処理場では489頭からサンプルを採取した。この黒毛和種は72頭の種雄牛の後代牛であり、1種雄牛あたり1頭～110頭の半きょうだいが存在している。また、宮崎県の処理場では160頭からサンプルを採取した。この黒毛和種は45頭の種雄牛の後代牛であり、1種雄牛あたりの半きょうだいの数は1頭～18頭である。長崎県の処理場では191頭からサンプルを採取した。この黒毛和種は40頭の種雄牛の後代牛であり、1種雄牛あたりの半きょうだいの数は1頭～36頭である。各県ごとに独立した血縁関係が存在する可能性を考慮し、3県についてはそれぞれ別に相関解析を実施することとした。

各県の牛の出荷日齢、性別、各形質の度数と平均値について詳細を表2-1、および図2-1にまとめた。3県の中で最も試験に用いた頭数が多かったのは鹿児島県の集団であった。また、性別については長崎県で去勢牛がやや多いものの、3県ともに極端な偏りは見られなかった。3県の種雄牛は合計で104頭であり、県間で共通の種雄牛も存在していた。形質値を県間で比較をする

と、BMS、SFT、REA、RT は 3 県ではほぼ同様の分布を示していた。一方で CWT については長崎県の黒毛和種集団で他県よりも大きい個体の割合がやや高い傾向にあった。各県の集団の各形質の分布状況をみると、すべての集団のすべての形質で極端な分布の偏りはなく、統計的な分析にあたっての問題は検出されなかった。

各形質の育種価は形質データを基に血縁、環境の効果を考慮した最良線形不偏予測法 (best linear unbiased prediction method、BLUP 法(Henderson 1973)) を用いて推定を行った。分析には MTDFREML プログラム (Boldman *et al.*, 1995) の REML 法による単形質アニマルモデルを用い、遺伝分散と環境分散を計算し、各形質の育種価を推定した。育種価の推定にあたっては脂肪組織を採取し、*c.-312A>G* 遺伝子型分析を行った 840 頭を含む、3 県で合計 2806 頭の黒毛和種肥育牛の形質データを用いた。これはより多くの形質データを基に育種価を推定することで、その正確度の向上が図れると考えたためである。育種価計算に用いた黒毛和種個体は外れ値を排除するため、と殺日齢、肥育期間、枝肉重量について平均値 $\pm 2$  標準偏差以内であることを確認した。その上で基準から外れる個体、即ち経産牛や何らかの影響で発育不良であった個体を排除し、育種価推定の精度を高めた。データの計算や該当データの抽出、排除は PRETRT プログラム (佐々木義之 1985) を用いて実施した。

MTDFREML プログラムでは性別、出荷年、肥育農場を固定効果、肥育期間、と殺日齢を共変量として環境要因に組み入れ、相加的遺伝効果をランダム効果として分析を行った。*c.-312A>G* 遺伝子型分析を行った個体の推定育種価を抽出し、遺伝子型と育種価の相関解析に供した。

## DNA 抽出

採取した脂肪組織からの DNA の抽出には DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を使用した。即ち、まず脂肪組織 25mg 程度を 1.5ml エッペンチューブに量りとり、Buffer ALT を 180 $\mu$ l、Proteinase K を 20 $\mu$ l 加え、56 $^{\circ}$ C の恒温槽で振とうしながら一晩インキュベートした。組織を完全に溶解した後、Buffer AL を 200 $\mu$ l 添加し、続いて 100% エタノールを 200 $\mu$ l 添加し混和した。続いてサンプルを全量 DNeasy Mini spin カラムに入れ、8,000rpm で 1 分間遠心分離した。ろ液を廃棄し、Buffer AW1 を 500 $\mu$ l 添加後、8,000rpm で 1 分間遠心分離した。再度ろ液を廃棄し、Buffer AW2 を 500 $\mu$ l 添加後、14,000rpm で 3 分間遠心分離した。最後にカラムを新しい 1.5ml エッペンチューブに入れ、Buffer AE を 100 $\mu$ l 添加して DNA を溶出させた後、8,000rpm で 1 分間遠心分離して DNA 溶液を回収した。DNA は Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) で濃度を測定し、50ng/ $\mu$ l に濃度を調整した。

## SNP 型別

*c.-312A>G* 遺伝子多型の型別は PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法によって行った (Yamada *et al.*, 2008、Yamada *et al.*, 2009c)。

即ち、抽出した DNA 溶液を鋳型にして PCR 反応溶液を作成した。PCR 反応溶液は TaKaRa Ex Taq (5U/ $\mu$ l) (タカラバイオ、滋賀県) を 0.25  $\mu$ l、10x EX Buffer を 5  $\mu$ l、2.5mM dNTP Mixture を 4  $\mu$ l、プライマー (表 2-2、10  $\mu$ M) を各 1  $\mu$ l、抽出した DNA 溶液を 1  $\mu$ l 添加し、蒸留水で 50  $\mu$ l までメスアップした。プライマーは転写開始点から 1bp~19bp の領域と 378bp~360bp の領

域にそれぞれ設計した。調製した PCR 反応溶液は T100™ サーマルサイクラー (Bio-Rad, Hercules, USA) を使用し、PCR 反応を行った。PCR 反応は 95℃の解離反応を 2 分行い、その後 95℃30 秒、55℃30 秒、72℃1 分の増幅反応を 40 サイクル行い、最後に 72℃10 分のサイクル条件で実施した。

得られた *c-312A>G* 遺伝子多型を含む 378 bp の PCR 産物を制限酵素 *Msc* I (New England Biolabs Inc., Ipswich, U.S.A) で消化した。即ち、PCR 産物を 1 µl、10x CutSmart Buffer を 1 µl、*Msc* I (5,000 units/ml) を 0.1 µl 添加し、蒸留水で 10 µl にメスアップした制限酵素反応液を恒温槽で 37℃、1 時間インキュベートした。

制限酵素消化物をゲルローディングバッファーと混合し、2%アガロースゲルにアプライ後電気泳動することで DNA 断片を分離した。この方法により、*c-312A>G* の *G* アリルは 378bp、*A* アリルは 163bp と 215bp の DNA 断片が検出される。そのため、*GG* ホモ型であれば 1 本のバンド (378bp) が検出され、*AA* ホモ型であれば 2 本のバンド (163bp、215bp)、*AG* ヘテロ型であれば 3 本のバンド (163bp、215bp、378bp) が検出される。

#### 相関解析

*c-312A>G* 遺伝子型と 5 つの経済形質の遺伝的能力との関連性を評価するため、一般線形モデルによる分散分析を行った。各経済形質の遺伝的能力を従属変数とし、*c-312A>G* 遺伝子型を固定効果、種雄牛をランダム効果として分析した。分析には SAS (SAS institute Inc., Cary, USA) を用い、各形質に対する遺伝子型の効果を評価した。



## 結果

### *c.-312A>G* 遺伝子型分析

検出された3県の黒毛和種集団の遺伝子型出現頻度を表2-3に示す。3県の*c.-312A>G* 遺伝子型とアリル頻度についてハーディー・ワインベルグ平衡からの有意な逸脱は認められなかった。

鹿児島県の処理場から出荷された集団では *GG* 型が166頭(33.9%)、*AG* 型が242頭(49.5%)、*AA* 型が81頭(16.6%) 検出された。また、宮崎県の処理場から出荷された集団では *GG* 型が44頭(27.5%)、*AG* 型が91頭(56.9%)、*AA* 型が25頭(15.6%) 検出された。この2県においては *G* アリルがそれぞれ58.7%、55.9%となり、*A* アリルよりも優勢であった。この結果は以前に報告されている大分県での遺伝子型別分析結果と同様の傾向にある (Yamada *et al.* 2009c)。一方で、長崎県の処理場から出荷された集団は *GG* 型が33頭(17.3%)、*AG* 型が94頭(49.2%)、*AA* 型が64頭(33.5%) 検出された。今回収集した長崎県の個体群では *A* アリルが58.1%と優勢であり、他の2県とは異なるアリル出現頻度であった。

### *c.-312A>G* 遺伝子型と各形質の育種価との相関分析

各形質の育種価に対する *c.-312A>G* 遺伝子型の効果を分析した結果を表2-4に示す。

脂肪交雑 (BMS) 育種価と *c.-312A>G* 遺伝子型間では長崎県、宮崎県の集団において有意な差が検出され (それぞれ  $P = 0.038$ ,  $P = 0.001$ )、鹿児島県の集団においても関連性を示唆する傾向が観察された ( $P = 0.079$ )。このことは過去の大分県の黒毛和種集団の分析結果と同様である。また、長崎県、宮崎県の集団においては *GG* ホモ型の効果が最も大きく、その次に *AG* ヘテ

ロ型の効果が大きく *AA* ホモ型が最も効果が小さかった。3 県いずれにおいても *GG* ホモ遺伝子型の効果が最も大きく、*G* アリルが *A* アリルよりも BMS に対する効果が大きい傾向にあった。最も効果の大きい遺伝子型と最も効果の小さい遺伝子型間の BMS 育種価に対する遺伝的効果の差は鹿児島県の集団では 0.14、宮崎県の集団では 0.50、長崎県の集団では 0.84 であった。

また皮下脂肪厚 (SFT) 育種価では宮崎県の集団で関連性が示唆される傾向があった ( $P = 0.061$ ) もの、他の 2 県の集団も含め、3 県の集団ともに有意な関連性は観察されなかった (鹿児島 :  $P = 0.126$ 、長崎 :  $P = 0.740$ )。

枝肉重量 (CWT) 育種価については長崎県の集団で有意な関連性が検出された ( $P = 0.001$ ) が、他の 2 県の集団では有意な関連性は観察されなかった (鹿児島 :  $P = 0.193$ 、宮崎 :  $P = 0.181$ )。遺伝子型間で CWT の育種価に有意差が認められた長崎県の集団では *GG* ホモ型が最も効果が大きく、次いで *AG* ヘテロ型、*AA* ホモ型の順となった。最も効果の大きい *GG* ホモ型と最も効果の小さい *AA* ホモ型間の効果の差は 16.79kg であった。

ロース芯面積 (REA) は鹿児島県の集団で有意な関連性が検出された ( $P = 0.003$ ) が、他の 2 県の集団では有意な関連性は観察されなかった (宮崎 :  $P = 0.264$ 、長崎 :  $P = 0.096$ )。遺伝子型間で REA の育種価に有意差が認められた鹿児島県の集団では *GG* ホモ型が最も効果が大きく、次いで *AG* ヘテロ型、*AA* ホモ型の順となった。最も効果の大きい *GG* ホモ型と最も効果の小さい *AA* ホモ型間の効果の差は 1.28cm<sup>2</sup> であった。

最後にバラ厚 (RT) は長崎県の集団で有意な関連性が検出された ( $P = 0.0002$ ) が、他の 2 県の集団では有意な関連性は観察されなかった (鹿児島 :  $P = 0.287$ 、宮崎 :  $P = 0.483$ )。遺伝子型間で RT の育種価に有意差が認められた長崎県の集団では *GG* ホモ型が最も効果が大きく、次いで *AG* ヘテロ型、

*AA* ホモ型の順となった。最も効果の大きい *GG* ホモ型と最も効果の小さい  
*AA* ホモ型間の効果の差は 4.62mm であった。

## 考察

本章においては過去に脂肪交雑の位置的機能的候補遺伝子として選抜された *EDG1* に存在し、脂肪交雑との関連性が半きょうだいなどの遺伝的背景の多様さが小さい黒毛和種集団において報告されている遺伝子多型 *c.-312A>G* について、遺伝的背景や飼育環境が多様である 3 つの県（鹿児島県、宮崎県、長崎県）の市場に出荷された商用集団における遺伝子多型と脂肪交雑育種価との関連性についてレプリケーションスタディを実施するとともに、脂肪交雑以外の枝肉の歩留、品質に関わる 4 つの評価指標の育種価との相関解析を実施した。

その結果、3 県の集団すべてで *c.-312A>G* 遺伝子多型と脂肪交雑育種価との間に有意な関連性、もしくはその傾向が観察された。また、その遺伝的効果は共通して G アリルが大きく、A アリルが小さかった。この結果は大分県の黒毛和種集団（Yamada *et al.*, 2009c）、佐賀県の黒毛和種集団（和田ら、2009）、間接検定調査牛の集団（佐々木整輝、2014）を用いて行われた一連の研究結果とも一致している。他の研究で用いられた特定の種雄牛の半きょうだいのみからなる遺伝的背景が比較的小さい黒毛和種集団だけでなく、本研究で用いている、一般商用農場から出荷された遺伝的背景や飼育環境が幅広い黒毛和種集団でも *c.-312A>G* 遺伝子多型と脂肪交雑育種価との関連性が示されたことから、本遺伝子多型は遺伝的背景が異なる一般的な黒毛和種集団で適用可能な遺伝子マーカーであることが示唆された。

また、いずれの集団においても皮下脂肪厚は *c.-312A>G* 遺伝子多型と有意な相関がみられなかった。Yamada *et al.* (2009c) が大分県の種雄牛の半きょうだい集団を用いて分析した報告においても同様の結果が得られている。筋肉内脂肪（脂肪交雑）と皮下脂肪の蓄積は異なる遺伝的要因によるものであ

り、それぞれ異なる QTL が報告されている (Takasuga *et al.*, 2007、宮城県畜産試験場 2013)。皮下脂肪の蓄積は歩留の低下にもつながるが、*c.-312A>G* を用いることで皮下脂肪を余計に蓄積させずに脂肪交雑を向上させることが可能であるかもしれない。

枝肉重量、ロース芯面積、ばら厚に関してはいずれも 3 県の集団の内の 1 つで *c.-312A>G* 遺伝子多型と有意な相関がみられている。このことからこれらの形質は、黒毛和種集団の遺伝的背景によっては、*c.-312A>G* 遺伝子多型の効果が認められる可能性があるため、育種選抜の際に考慮する必要があるかもしれない。しかしながら、有意な関連性が認められた集団における効果を見ると、いずれの形質でも *GG* ホモ型でその効果が大きく、*AG* ヘテロ型が中間の大きさ、*AA* ホモ型が最も効果が小さかった。そのため、脂肪交雑を向上させるために *GG* ホモ型を選抜した場合、これらの形質の遺伝的能力も同時に向上することになる。よって、*c.-312A>G* 遺伝子多型による選抜は枝肉重量、ロース芯面積、ばら厚に対しマイナスの影響を及ぼすことはないと考えられる。

*c.-312A>G* 遺伝子多型は過去に遺伝的背景が似通った黒毛和種集団において脂肪交雑への有意な関連性を見出され、有用な選抜育種用の遺伝子マーカーとして提唱されてきたが、本研究において、遺伝的背景が多様な一般の商用黒毛和種集団においても本遺伝子多型が脂肪交雑と有意な関連性をもつことが示され、より汎用的な脂肪交雑向上のための遺伝子マーカーとして利用可能であることが示された。また、他の経済的形質との関連性を検討した結果、皮下脂肪厚とは有意な相関がなく、皮下脂肪を厚くすることなく脂肪交雑を向上させることが可能であることが明らかとなった。さらに、枝肉重量、ロース芯面積、ばら厚といった脂肪蓄積と関係のない指標についても本遺伝

子多型がその遺伝的能力を低下させないことが確認された。以上のことより *EDG1* 遺伝子中に存在する *c-312A>G* 遺伝子多型は一般的な黒毛和種集団の脂肪交雑を向上させる遺伝子マーカーとして有用であると結論付けた。

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)知られている。本研究で対象とした *c-312A>G* はタンパク質をコードするエキソンではなく遺伝子の調節領域に位置しており、SNP の違いが遺伝子発現の度合いに影響している可能性がある。これら遺伝子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)を用い、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には本研究の対象である *EDG1* は含まれていなかった。このことから本研究で対象と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ものと考えられる。

将来的には本遺伝子の機能の詳細を明らかにすることで、脂肪交雑形成のメカニズムの一端を解明し、また、その知見が育種改良、飼養管理などの牛生産の実地へ応用されることで効率の良い生産技術の開発へとつながることが期待される。

表 2-1 遺伝子型を決定した黒毛和種牛集団の基本情報（出荷された県、総頭数、性別、種雄牛数、形質値の平均）

県	頭数				
	合計	去勢	雌	種雄牛	
鹿児島県	489	322	167	72	
長崎県	191	148	43	40	
宮崎県	160	88	72	45	
3 県の合計	840	558	282	104	

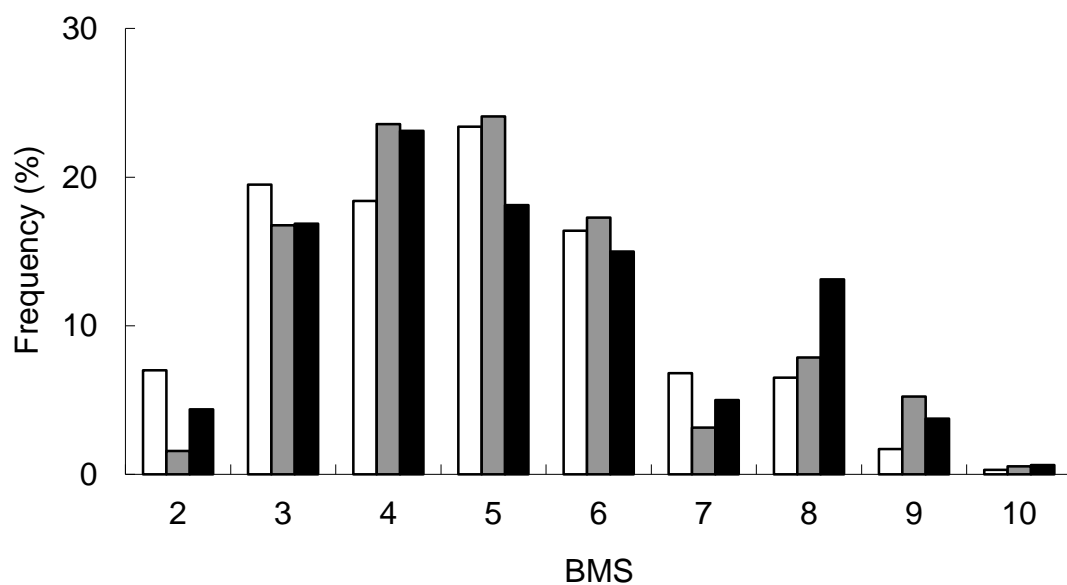
  

県	形質値				
	BMS <sup>†</sup>	SFT <sup>†</sup>	CWT <sup>†</sup>	REA <sup>†</sup>	RT <sup>†</sup>
鹿児島県	4.93±1.72	25.53±7.80	427.91±50.18	52.73±7.58	73.20±8.74
長崎県	5.09±1.74	27.54±7.24	474.97±52.31	53.40±7.28	77.13±8.72
宮崎県	5.13±1.90	27.80±7.88	408.86±45.56	52.77±7.13	73.11±7.96
3 県の合計	4.93±1.76	26.42±7.75	434.98±54.78	52.89±7.43	74.08±8.74

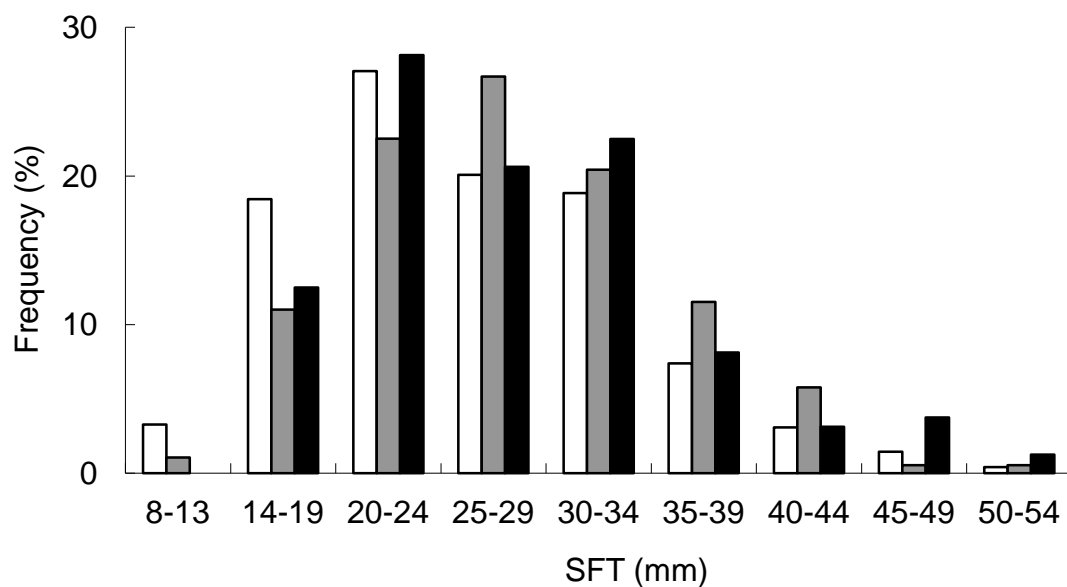
<sup>†</sup> 全解析個体の平均 ± S.D. で表記した。

図 2-1 各県の形質値 (BMS、SFT、CWT、REA、RT) の分布

BMS

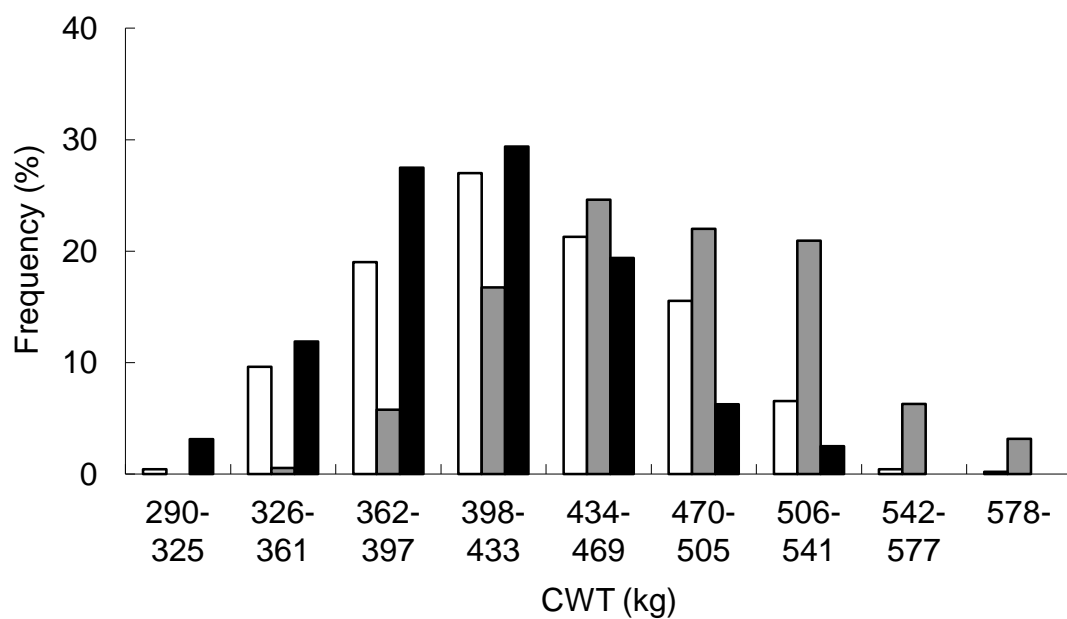


SFT

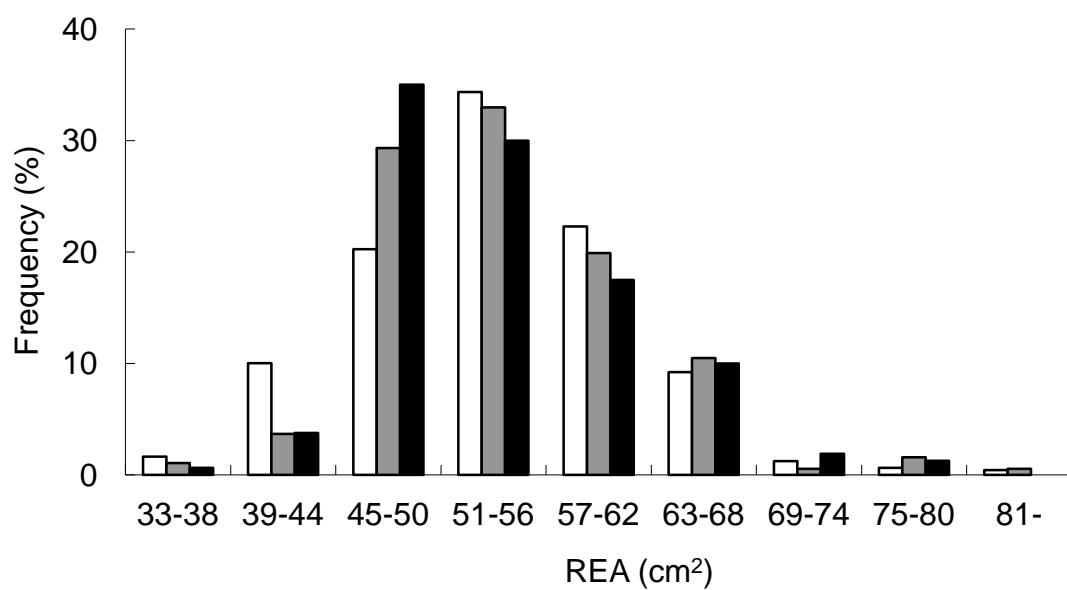




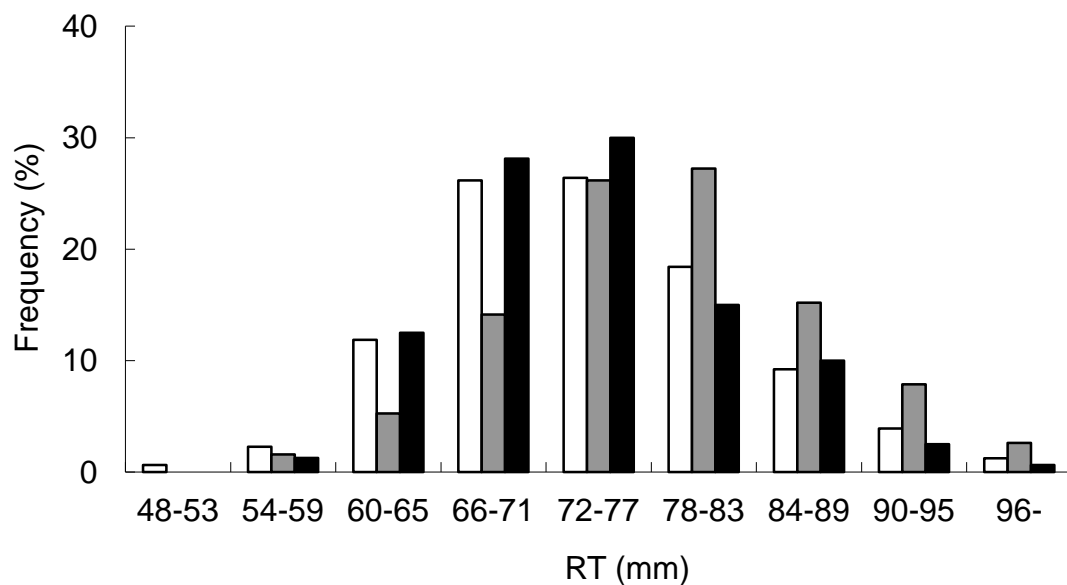
## CWT



## REA



RT



鹿児島県は白抜きのグラフ(open bars:  $N = 489$ )、長崎県は灰色のグラフ(gray bars:  $N = 191$ )、宮崎県は黒のグラフ(solid bars:  $N = 160$ )で示した。横軸は各形質値の範囲 (BMS、SFT、CWT、REA、RT)、縦軸は各県における該当する各形質値の範囲の個体の割合 (%) を表す。

表 2-2 遺伝子型別に使用したプライマー配列

遺伝子多型	プライマー	配列
<i>c. -312A&gt;G</i>	Forward	5'- GTCTCAGCTGCACAGATCC -3'
	Reverse	5'- GAAGACCTCCGGCCGCGAT -3'

表 2-3 3 県（鹿児島県、長崎県、宮崎県）で出荷された黒毛和種集団の  
*c.-312A>G* 遺伝子型頻度

県	遺伝子型	頭数	頻度
鹿児島県 (n = 489)	<i>GG</i>	166	0.339
	<i>AG</i>	242	0.495
	<i>AA</i>	81	0.166
宮崎県 (n = 160)	<i>GG</i>	44	0.275
	<i>AG</i>	91	0.569
	<i>AA</i>	25	0.156
長崎県 (n = 191)	<i>GG</i>	33	0.173
	<i>AG</i>	94	0.492
	<i>AA</i>	64	0.335

表 2-4 3 県（鹿児島県、長崎県、宮崎県）で出荷された黒毛和種集団の肉質  
関連形質（BMS、SFT、CWT、REA、RT）に対する *c-312A>G* の遺伝的効  
果

形質*	県	<i>P</i> -value	遺伝子型 <sup>§</sup>		
			<i>GG</i>	<i>AG</i>	<i>AA</i>
BMS	鹿児島県	0.0786	0.42±0.05	0.28±0.04	0.37±0.07
	宮崎県	0.0377	0.43±0.13 <sup>a</sup>	0.36±0.09 <sup>b</sup>	-0.07±0.17 <sup>b</sup>
	長崎県	0.0012	0.52±0.18 <sup>a</sup>	0.01±0.11 <sup>b</sup>	-0.32±0.13 <sup>b</sup>
SFT	鹿児島県	0.1256	-0.59±0.22	-0.89±0.18	-1.36±0.31
	宮崎県	0.0619	0.88±0.26	0.45±0.18	-0.14±0.34
	長崎県	0.7401	0.05±0.45	0.25±0.27	-0.07±0.32
CWT	鹿児島県	0.1927	8.83±1.60	6.62±1.32	3.83±2.28
	宮崎県	0.1811	-0.19±0.50	0.25±0.35	-1.12±0.66
	長崎県	0.0014	16.30±3.69 <sup>a</sup>	5.78±2.19 <sup>a</sup>	-0.49±2.65 <sup>b</sup>
REA	鹿児島県	0.0029	1.26±0.23 <sup>a</sup>	0.45±0.19 <sup>b</sup>	-0.02±0.34 <sup>b</sup>
	宮崎県	0.2642	0.71±0.26	0.48±0.18	0.00±0.35
	長崎県	0.0960	0.13±0.30	-0.48±0.18	-0.67±0.22
RT	鹿児島県	0.2868	1.14±0.20	0.73±0.16	0.92±0.28
	宮崎県	0.4833	-0.12±0.42	0.45±0.29	-0.12±0.55
	長崎県	0.0002	3.30±0.96 <sup>a</sup>	1.50±0.57 <sup>b</sup>	-1.32±0.69 <sup>b</sup>

\* BMS : 脂肪交雑、SFT : 皮下脂肪厚(mm)、CWT : 枝重(kg)、REA : ロース  
芯面積(cm<sup>2</sup>)、RT : バラ厚(mm)

§ 育種価は推定育種価±SE で表記した。

第2章 *EDG1* 遺伝子の一塩基多型 (*EDG1+166 (c>312A>G)*) と  
黒毛和種牛群の枝肉成績との相関解析

a, b 異なる肩文字間の遺伝子型において推定育種価に有意差 ( $p<0.05$ ) があることを示す。

## 要約

脂肪交雑は日本において牛の経済的価値を高める大きな要因となる。この脂肪交雑は筋肉内への脂肪細胞、脂肪の蓄積によって形成され、日本では **Beef Marbling Score (BMS)** という指標によって表される。

我々は近年、*endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1 (EDG1)* 遺伝子上に存在する一塩基多型の *c*→*312A*>*G* が大分県黒毛和種牛集団の **BMS** 育種価レベルと有意に相関することを報告した。*c*→*312A*>*G* は *G* アリルである時に高い **BMS** 育種価を示していた。このことから *c*→*312A*>*G* はマーカーアシスト選抜のための遺伝子マーカーとして有用であることが示唆されたが、本章ではこの **BMS** 育種価に対する *c*→*312A*>*G* の効果が他の血縁的に異なる商用黒毛和種集団においても同様に有意であるかを検証するためにレプリケーション研究を実施するとともに、他の経済的に重要な形質への影響について検証を行った。

その結果、*c*→*312A*>*G* は宮崎県の黒毛和種集団 ( $P = 0.0377$ )、および長崎県の黒毛和種集団 ( $P = 0.0012$ ) において **BMS** 育種価との間で有意な相関が検出された。また、鹿児島県の黒毛和種集団においても相関性を持つ傾向が確認された ( $P = 0.0786$ )。いずれの集団においても *c*→*312A*>*G* が *G* アリルである場合に **BMS** 育種価がよい傾向があり、過去の研究結果と一致した。また、他の産肉形質についても *G* アリルにおいて *A* アリルと同等、もしくは好ましい効果が検出され、選抜による悪影響はないと考えられた。これらの結果から *c*→*312A*>*G* と **BMS** との関連性が様々な遺伝的背景を持つ黒毛和種集団においても有意であることが確認され、また本 **SNP** を基にした選抜による他の形質への負の効果がみられないことが示唆された。従って *c*→*312A*>*G* は **BMS** を改良するためのマーカーアシスト選抜に有用なマーカーであると結論付け

た。



### 第 3 章

*EDG1*、*AKIRIN2*、*RPL27A* 遺伝子上に存在する一塩基多型 *g.1471620G>T*、*c\*188G>A*、*g.3129537C>T* の黒毛和種牛脂肪交雑に対する遺伝的効果と相互作用の検証

## 緒言

牛肉の脂肪交雑の向上を目的として、様々な QTL や遺伝子が脂肪交雑との関連性について報告されている (Takasuga *et al.*, 2007)。このような量的形質に関与する遺伝子はそれ一つで形質を大きく変化させるものではなく、多数の遺伝子の働きの組み合わせの結果としてその形質を形作る。そのため一つ一つの遺伝子の形質への寄与は小さく、その遺伝子中に存在する遺伝子多型が形質に及ぼす影響も、同様に小さいと考えられる。そのため、このような遺伝子多型をマーカーとして選抜育種を行う場合には、複数の QTL もしくは遺伝子中の多型を同時に選抜することで、より改良効果を高め、かつ改良のスピードを速めることができると考えられる。

しかしながら、同時に複数の遺伝子多型を選抜する場合にはそれぞれの多型の効果が相加的に得られるとは限らない。脂肪交雑に関与する遺伝子は相互に影響しあっているため、各遺伝子中の多型が他の遺伝子の効果に影響を及ぼすことで脂肪交雑への効果が変化することが考えられる。したがって、選抜に使用する遺伝子多型間の相互作用を考慮したうえで、最も効果の大きい組み合わせを選抜していくことが必要となる。

我々は前章において言及した *EDG1* 遺伝子中の *c.-312A>G* の他、遺伝子プロファイリング法を用いることでいくつかの脂肪交雑と有意な関連性を持った遺伝子多型を見出してきた。Yamada *et al.*, (2009a) は *EDG1* のもう 1 つの遺伝子多型であり、プロモーター領域に存在する *g.1471620G>T* を報告している。そして、この多型は脂肪交雑との相関分析結果、および位置的な機能予測から、*c.-312A>G* より脂肪交雑への原因変異に近いと考えられることを述べている。また、レポーターアッセイによって *c.-312A>G* はその変異自体が *EDG1* の RNA 発現量に影響を及ぼさず、原因変異ではないことも示

唆されている (Yamada *et al.*, 2009a)。そのため、以後の解析では *EDG1* の多型として *g.1471620G>T* を取り扱う。また、*AKIRIN2* 遺伝子中に存在する遺伝子多型 *c\*188G>A* も *EDG1* の *g.1471620G>T* 同様に脂肪交雑との有意な関連性が報告されている (Sasaki *et al.*, 2009)。さらに、*RPL27A* 遺伝子中に存在する遺伝子多型 *g.3129537C>T* にも脂肪交雑との有意な関連性があることが示されている (Yamada *et al.*, 2009b)。これらのようにわれわれは遺伝子プロファイリング法によって複数の脂肪交雑と関連する遺伝子多型を見出し、黒毛和種集団での脂肪交雑との有意な関連性を確認してきた。しかしながらこれらの遺伝子多型を選抜マーカーとして使用するためには 2 つの点を検証する必要がある。

一つは本論文の第 2 章において検証したことと同様に、遺伝的背景の多様な集団を用いたレプリケーションスタディを行い、遺伝子多型が一般的な黒毛和種集団に対して汎用的に脂肪交雑と関連し、汎用的にマーカーとして使用可能であることを確かめることである。前述した 3 つの遺伝子多型は黒毛和種の半きょうだい集団など比較的遺伝的背景がある程度斉一な集団で検証されたにすぎない。より市場に近い集団での脂肪交雑との関連性を検証することによって、広く一般的に遺伝子マーカーとして使用可能であるかどうかを確かめる必要がある。

もう一つは 3 つの遺伝子多型が相互作用することによる上位性効果 (エピスタシス) の影響を検討し、その効果を含めたより正確な選抜効果を推定することである。実際に複数の遺伝子マーカーで選抜を行うことを想定した場合、選抜に使用した遺伝子多型同士が影響しあって、単独の遺伝子多型で分析した時と異なる効果が発現する可能性がある。このような遺伝子多型間の相互作用の有無、効果の大きさを検証し、より正確な遺伝子マーカー選抜効

果を算出することで、計画的な選抜改良が可能になる。

本研究では発現プロファイリング法に基づいて見出された脂肪交雑関連遺伝子マーカーである *c\*188G>A*、*g.1471620G>T*、*g.3129537C>T* の3つの遺伝子多型について2つの検討を実施した。1つ目に各遺伝子多型と脂肪交雑との関連性を過去とは別の、遺伝的背景が多様な商用黒毛和種集団を用いたレプリケーションスタディを各遺伝子多型単独で分析を行った。2つ目に3つの遺伝子多型間の相互作用（上位性効果）を含めたモデルを用いて相互作用の有無とその効果の大きさを分析し、3遺伝子多型を同時に選抜した場合の遺伝子効果の算出を行った。

## 材料および方法

### サンプルおよびデータ

2006 年 8 月から 2007 年 7 月までに鹿児島県、長崎県、宮崎県の 3 県で出荷された 892 頭の黒毛和種から脂肪組織を採取し、遺伝子型分析に供した (表 3-1)。この 892 頭は去勢雄牛が 598 頭、雌牛が 294 頭から構成され、113 頭の種雄牛の後代牛である。各県ごとの収集した黒毛和種の BMS の分布は図 3-1 に示したとおりであり、各県で大きな BMS の違いは見られなかった。

また、遺伝子型分析を行った 892 頭を含む、同時期に出荷された 2806 頭の黒毛和種について形質情報、血縁情報を入手し、BMS 育種価を最良線形不偏予測法 (Best Linear Unbiased Prediction : BLUP 法、Henderson 1973) で推定した。今回分析に供した黒毛和種集団は 3 つの県にまたがっているが、表 3-2 のとおり共通した種雄牛の存在が確認され、血縁的につながっているため、まとめて育種価分析と遺伝子型の相関分析を行った。育種価計算に用いた黒毛和種個体は外れ値を排除するため、と殺日齢、肥育期間、枝肉重量について平均値  $\pm$  2 標準偏差以内であることを確認した。その上で基準から外れる個体、即ち経産牛や何らかの影響で発育不良であった個体を排除し、育種価推定の精度を高めた。データの計算や該当データの抽出、排除は PRETRT プログラム (佐々木義之 1985) を用いて実施した。

育種価推定には MTDFREML プログラム (Boldman *et al.*, 1995) の単形質アニマルモデルを用いた。線形モデル内の環境要因として出荷された県、性別、出荷年、出荷月、肥育農場を固定効果とし、と殺日齢を共変量効果とした。また、相加的遺伝効果と残差を変量効果とした (図 3-2)。このモデルで推定された BMS の遺伝率は 0.39 であり、推定された育種価の正確度は平均で  $0.68 \pm 0.03$  であった。

## SNP 遺伝子多型分析

収集した脂肪組織サンプルからゲノム DNA を DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を使用して抽出した。

即ち、まず脂肪組織 25mg 程度を 1.5ml エッペンチューブに量りとり、Buffer ALT を 180μl、Proteinase K を 20μl 加え、56℃の恒温槽で振とうしながら一晩インキュベートした。組織が完全に溶解した後、Buffer AL を 200μl 添加し混和、続いて 100% エタノールを 200μl 添加し混和した。続いてサンプルを全量 DNeasy Mini spin カラムに入れ、8,000rpm で 1 分間遠心分離した。ろ液を廃棄し、Buffer AW1 を 500μl 添加後、8,000rpm で 1 分間遠心分離した。再度ろ液を廃棄し、Buffer AW2 を 500μl 添加後、14,000rpm で 3 分間遠心分離した。最後にカラムを新しい 1.5ml エッペンチューブに入れ、Buffer AE を 100μl 添加して DNA を溶出させた後、8,000rpm で 1 分間遠心分離して DNA 溶液を回収した。DNA は Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) で濃度を測定し、50ng/μl に濃度を調整した。

3 つの SNPs (*c\*188G>A*、*g.1471620G>T*、*g.3129537C>T*) は PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法によってそれぞれ分析を実施した (Sasaki *et al.*, 2009; Yamada *et al.*, 2009a, b)。

即ち、抽出した DNA 溶液を鋳型にして PCR 反応溶液を作成した。PCR 反応溶液は TaKaRa Ex Taq (5U/μl) (タカラバイオ、滋賀県) を 0.25 μl、10x EX Buffer を 5 μl、2.5mM dNTP Mixture を 4 μl、それぞれの SNP に対応したフォワードプライマー (10 μM) を 1 μl、リバープライマー (10 μM) を 1 μl、抽出した DNA 溶液を 1 μl 添加し、蒸留水で 50 μl までメスアップした。

使用したプライマーの配列は表 3-3 に示したとおりである。*AKIRIN2* (*c\*188G>A*)は転写開始点から 22,167bp～22,186bp の領域と 22,336bp～22,312bp の領域にそれぞれプライマーを設計した。*EDG1* (*g.1471620G>T*)は転写開始点から-1,775bp～-1,737bp の領域と-1,621bp～-1,642bp の領域にそれぞれプライマーを設計した。*RPL27A* (*g.3129537C>T*)は転写開始点から-7,345bp～-7,323bp の領域と-7,154bp～-7,178bp の領域にそれぞれプライマーを設計した。調製した PCR 反応溶液は T100™ サーマルサイクラー (Bio-Rad, Hercules, USA) を使用し、PCR 反応を行った。PCR 反応は 95℃ の解離反応を 2 分行い、その後 95℃30 秒、55℃30 秒、72℃1 分の増幅反応を 40 サイクル行い、最後に 72℃10 分のサイクル条件で実施した。

得られた *c\*188G>A*、*g.1471620G>T*、*g.3129537C>T*を含む各 PCR 産物をそれぞれ制限酵素 *Fok* I、*Tsp*509I、*Bsu*36I (New England Biolabs Inc., Ipswich, U.S.A) で消化した。即ち、PCR 産物を 1 µl、各制限酵素に適合する 10x Buffer を 1 µl、各制限酵素を 0.1 µl 添加し、蒸留水で 10 µl にメスアップした制限酵素反応液を恒温槽で 37℃、1 時間インキュベートした。

制限酵素消化物をゲルローディングバッファーと混合し、2%アガロースゲルにアプライ後電気泳動することで DNA 断片を分離した。この方法により、*c\*188G>A* の *A* アリルは 170bp、*G* アリルは 65bp と 105bp の DNA 断片が検出される。そのため、*AA* ホモ型であれば 1 本のバンド (170bp) が検出され、*GG* ホモ型であれば 2 本のバンド (65bp、105bp)、*AG* ヘテロ型であれば 3 本のバンド (65bp、105bp、170bp) が検出される。また、*g.1471620G>T* の *G* アリルは 155bp、*T* アリルは 38bp と 117bp の DNA 断片が検出される。そのため、*GG* ホモ型であれば 1 本のバンド (155bp) が検出され、*TT* ホモ型であれば 2 本のバンド (38bp、117bp)、*GT* ヘテロ型であれば 3 本のバン

ド(38bp、117bp、155bp)が検出される。*g.3129537C>T*の *C*アリルは 192bp、*T*アリルは 73bp と 119bp の DNA 断片が検出される。そのため、*CC*ホモ型であれば1本のバンド(192bp)が検出され、*TT*ホモ型であれば2本のバンド(73bp、119bp)、*CT*ヘテロ型であれば3本のバンド(73bp、119bp、192bp)が検出される。

#### 相関解析

892頭の黒毛和種集団のBMS育種価と3つの遺伝子型の相関解析をシングルマーカーモデルとマルチマーカーモデルの2つのモデルを使って実施した。シングルマーカーモデルはBMS育種価を従属変数、各遺伝子型をそれぞれ固定効果として分析し、遺伝子型一つ一つと脂肪交雑との関連性を分析したモデルである(図3-3)。一方、マルチマーカーモデルは3つの遺伝子型とその遺伝子多型間相互作用(上位性効果)をモデル中に取り込んで分析を実施した(図3-4)。しかし、遺伝子多型間相互作用は相加的遺伝効果ではないため、マルチマーカーモデルでは相加的遺伝効果であるBMS育種価をそのまま従属変数として分析することはできない。そのため、BMS育種価と残差の和(以後、BMS評価値とする)をマルチマーカーモデルの従属変数として採用した。このBMS評価値はもとのBMS形質値から推定された固定効果、共変量効果を引くことで求めた。始めはすべての遺伝子多型間相互作用を取り込んで分析を実施し、相互作用が有意ではなかった場合( $P \geq 0.05$ )にはモデルから除外して再度分析を行った。すべての相関解析にはSASソフトウェア(SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA)のGLMプロシジャを用いた。



## 結果

シングルマーカーモデルによる相関解析の結果、すべての遺伝子多型と BMS 育種価の間に有意な相関が確認された (*c\*188G>A* では  $P = 0.0017$ 、*g.1471620G>T* では  $P = 0.0145$ 、*g.3129537C>T* では  $P = 0.0001$ ) (表 3-4)。各遺伝子の遺伝子型間で脂肪交雑育種価への効果の最小二乗値を比較すると、*c\*188G>A* では *GA* 型で最も脂肪交雑を向上させる効果が強く、続いて *AA* 型、*GG* 型の順に強い効果が検出された。ただし、*GA* 型、*AA* 型間に有意な差は検出されず、*GA* 型、*AA* 型と *GG* 型間に有意な効果の差が認められた。もっとも効果が高いと予測された *GA* 型と最も効果が低いと予測された *GG* 型の効果の差は 0.18 であった。また、*g.1471620G>T* では *TT* 型が最も強く、次いで *GT* 型、*GG* 型の順に効果が大きかった。ただし、*TT* 型、*GT* 型に有意な差は検出されず、*TT* 型、*GT* 型と *GG* 型間に有意な効果の差が認められた。もっとも効果が高いと予測された *TT* 型と最も効果が低いと予測された *GG* 型の効果の差は 0.18 であった。*g.3129537C>T* では *TT* 型が最も効果が強く、次いで *CT* 型、*CC* 型の順に効果が大きかった。本 SNP では遺伝子型間それぞれの効果に有意差が認められ、もっとも効果が高いと予測された *TT* 型と最も効果が低いと予測された *CC* 型の効果の差は 0.43 であった。

これら各遺伝子のアリルの効果に関する結果はいずれも過去に報告したそれぞれの遺伝子多型の脂肪交雑への効果と一致している (Sasaki *et al.*, 2009; Yamada *et al.*, 2009a, b)。これらの結果から、それぞれの SNP において脂肪交雑により高い影響を及ぼす、好ましいアリルは *c\*188G>A* では *A* アリル、*g.1471620G>T* では *T* アリル、*g.3129537C>T* では *T* アリルであると考えられる。

マルチマーカーモデルによる解析では最初の全遺伝子間相互作用を取り込

んだモデルによる分析を実施したところ、*c\*188G>A* と *g.3129537C>T* 間、*g.1471620G>T* と *g.3129537C>T* 間の相互作用は有意ではなかったため、モデルから排除して再解析を行った (*c\*188G>A*・*g.3129537C>T*:  $P = 0.6430$ 、*g.1471620G>T*・*g.3129537C>T*:  $P = 0.6719$ )。(図 3-4、表 3-5)

その結果、相互作用を含まない遺伝子型単独の効果（主効果）では *g.1471620G>T* と *g.3129537C>T* はシングルマーカーモデルと同様に有意な関連性が認められた (*g.1471620G>T*:  $P = 0.0031$ 、*g.3129537C>T*:  $P = 0.0001$ )。その遺伝子型間の効果はシングルマーカーモデルと同様に *g.1471620G>T* では *TT* 型が最も強く、次いで *GT* 型、*GG* 型の順に効果が大きかった。ただし、*TT* 型、*GT* 型に有意な差は検出されず、*TT* 型、*GT* 型と *GG* 型間に有意な効果の差が認められた。もっとも効果が高いと予測された *TT* 型と最も効果が低いと予測された *GG* 型の効果の差は 0.50 であった。また、*g.3129537C>T* では *TT* 型が最も効果が強く、次いで *CT* 型、*CC* 型の順に効果が大きかった。本 SNP では遺伝子型間それぞれの効果に有意差が認められ、もっとも効果が高いと予測された *TT* 型と最も効果が低いと予測された *CC* 型の効果の差は 0.67 であった。一方で、*c\*188G>A* はシングルマーカーモデルとは異なり、マルチマーカーモデルでは BMS 評価値に対する効果が有意ではなかった ( $P = 0.1989$ )。

また、遺伝子型間の相互作用として *c\*188G>A* と *g.1471620G>T* の間の相互作用に有意な効果が検出された ( $P = 0.0132$ )。個々の遺伝子型の組み合わせの効果を検討すると、*c\*188G>A* の *GG* 型はシングルマーカーモデルでは最も効果の弱い遺伝子型であったが、*g.1471620G>T* が *TT* 型の時の相互作用効果では *GA* 型、*AA* 型よりも好ましい効果が検出された。また、*c\*188G>A* が *AA* 型（シングルマーカーモデルでは中間の効果を持つ遺伝子型）で、

*g.1471620G>T* が *GT* 型（シングルマーカーモデルでは中間の効果を持つ遺伝子型）の組み合わせの場合、および *c\*188G>A* が *GA* 型（シングルマーカーモデルでは最も好ましい効果を持つ遺伝子型）で、*g.1471620G>T* が *GG* 型（シングルマーカーモデルでは最も好ましくない効果を持つ遺伝子型）の組み合わせの場合に他の組み合わせに比べて BMS 評価値に対し有意に好ましい効果が検出された（それぞれ  $0.38 \pm 0.19$ 、 $0.31 \pm 0.14$ ）。

## 考察

本章においてはこれまでに脂肪交雑との関連性を報告してきた *c\*188G>A*、*g.1471620G>T*、*g.3129537C>T* の 3 つの SNP について、遺伝的背景が多様な商用黒毛和種集団を用いたレプリケーションスタディを行うとともに、遺伝子多型間の相互作用（上位性効果）を含めたモデルを用いて相互作用の有無とその効果の大きさを分析した。

シングルマーカーモデルによる解析において、3 つすべての SNP は BMS 育種価と有意な相関を示し、各 SNP の脂肪交雑への効果が好ましいアリルは *c\*188G>A* では A アリル、*g.1471620G>T* では T アリル、*g.3129537C>T* では T アリルであった。これらの結果は半きょうだいで相関解析などを報告している過去の報告と同様の結果であった（Sasaki *et al.*, 2009; Yamada *et al.*, 2009a, b）。また、本研究に用いた黒毛和種集団におけるそれぞれの好ましいアリルの頻度は *c\*188G>A* の A アリルでは 43.2%、*g.1471620G>T* の T アリルでは 48.3%、*g.3129537C>T* の T アリルでは 59.4%であった。*EDG1* には本研究において取り上げた遺伝子多型（*g.1471620G>T*）の他、前章で取り上げたもう一つの遺伝子多型（*c.-312A>G*）が存在する。この 2 つの SNPs は非常に強く連鎖しているが、完全な連鎖不平衡になっているわけではない。本研究に用いた黒毛和種集団における 2 つの SNP の決定係数は  $\Delta^2 = 0.769$  であった。前章における *c.-312A>G* の脂肪交雑との相関解析の結果と比較すると、本研究における *g.1471620G>T* の脂肪交雑との関連性解析の結果は非常によく似ているが、*g.1471620G>T* のほうがより強く脂肪交雑の大きさとの関連性が検出された。

脂肪交雑は量的形質であり、非常に多くの遺伝子の機能により形成されると考えられており、また、多くの遺伝子多型の効果が影響しあうことで脂肪

交雑の多寡が決定される。他の遺伝子多型の効果に影響されることで、本研究で対象とした SNPs はいままでの育種価を基にした選抜においては固定されることなく黒毛和種集団において多様性を保持していたものと考えられる。これらのことから、3 つの SNPs は黒毛和種集団においてアリルが固定されておらず、今後の育種改良において選抜指標として用いることが可能であると考えられた。3 つの SNPs を好ましいアリルになるように選抜することで脂肪交雑の育種価を平均的に向上させられるかもしれない。

マルチマーカーモデルによる解析において、*g.1471620G>T* および *g.3129537C>T* はシングルマーカーモデルの時と同様に主効果として BMS 評価値に対して有意な効果を保持していた。また、BMS に対し好ましい効果をもつアリルについてもシングルマーカーモデルと同様であった。一方で、*c\*188G>A* についてはシングルマーカーモデルの結果とは異なり、遺伝子型単独での主効果については有意な効果が検出されなかった。しかし、*c\*188G>A* と *g.1471620G>T* の間に有意なエピスタシスな相互作用効果が検出されている。これらのことから、*g.3129537C>T* は他の 2 つの SNPs とは独立に BMS に対して効果を及ぼしていること、また、*c\*188G>A* は BMS に対して *g.1471620G>T* との相互作用効果を通じて効果を及ぼしていること、*g.1471620G>T* はその遺伝子型単独での効果と *c\*188G>A* との相互作用効果の 2 つの効果を BMS に及ぼしていることが示唆された (図 3-5)。特に *c\*188G>A* の BMS に対する好ましいアリルについては *g.1471620G>T* が *TT* 型の時にシングルマーカーモデルでの結果と異なるアリル (*G* アリル) となっている。このことは我々がマーカーアシスト選抜(MAS)を様々な遺伝子多型を用いて行う際には、各遺伝子型間の相互作用を考慮に入れて遺伝子型の選抜を行う必要があることを示唆している。

それぞれの SNP の主効果、相互作用効果の BMS に影響する割合は大きいわけではないが、本研究における 3 SNPs の主効果と *c\*188G>A* と *g.1471620G>T* の間の相互作用効果を合わせると BMS 評価値の分散のおよそ 6%程度を担うものと考えられる。この 3 つの SNPs の最も BMS に対し好ましい遺伝子型の組み合わせと、最も好ましくない遺伝子型の組み合わせを比較すると、BMS ナンバーに 1.77 の差があると計算される ( $=0.39 - (-1.38)$ )。最も BMS に対し好ましい遺伝子型の組み合わせは *c\*188G>A* が *GG* 型 ( $-0.12$ )、*g.1471620G>T* が *TT* 型 ( $0.06$ )、*g.3129537C>T* が *TT* 型 ( $0.18$ ) であり、この時に *c\*188G>A* の *GG* 型と *g.1471620G>T* の *TT* 型との間の相互作用効果 ( $0.27$ ) が得られる。そのため、この組み合わせでの BMS 評価値に対する効果は  $-0.12 + 0.06 + 0.18 + 0.27 = 0.39$  となる。最も BMS に対し好ましくない遺伝子型の組み合わせは *c\*188G>A* が *AA* 型 ( $-0.26$ )、*g.1471620G>T* が *GG* 型 ( $-0.44$ )、*g.3129537C>T* が *CC* 型 ( $-0.49$ ) であり、この時に *c\*188G>A* の *AA* 型と *g.1471620G>T* の *GG* 型との間の相互作用効果 ( $-0.19$ ) が得られる。そのため、この組み合わせでの BMS 評価値に対する効果は  $-0.26 + -0.44 + -0.49 + -0.19 = -1.38$  となる。現在の遺伝子型判別に必要となる費用は 3 遺伝子型でおよそ一検体あたり 90 円程度(佐々木整輝、家畜改良事業団との personal communication 2012) と考えられるため、本研究の 3 遺伝子型をマーカーアシスト選抜 (MAS) に利用することは経済的にも十分に利益が見込める効果が期待できると考えられる。

エピスタシスによる遺伝子間相互作用は 2 つかそれ以上の遺伝子の個々の遺伝的効果の和ではなく、それらの遺伝的効果を統合した効果として検出され (Frankel *et al.*, 1996)、このような遺伝子間相互作用効果は進化の上でも重要な意義があったと考えられている (Rieseberg *et al.*, 1996, Schork 1997)。

Matsuhashi *et al.*, (2011) は近年、黒毛和種牛の脂肪酸組成やその他のいくつかの形質について 4 つの遺伝子多型との関連性についてマルチマーカーモデルによる分析を報告している。しかしその報告においてはエピスタシスによる遺伝子間相互作用は検出されなかった。我々は本研究において *AKIRIN2* (*c\*188G>A*) と *EDG1* (*g.1471620G>T*) 間に脂肪交雑形成に関する遺伝子間相互作用が存在する可能性を明らかにした。この相互作用が脂肪交雑形成カスケードにおいて具体的にどのような機能を果たしているのかは明らかではない。前章でも記述した通り、*EDG1* はマウスにおいて血管形成に関与していることが報告されている (Liu *et al.*, 2000)。また、*AKIRIN2* は自然免疫の反応に関わることが報告されている (Goto *et al.*, 2008、Macqueen *et al.*, 2009)。また、*RPL27A* はリボソーム形成に関与するリボソーム構成タンパク質の一つであると報告されている (Kusuda *et al.*, 1999)。リボソームは細胞のタンパク質合成に関与するタンパク質であり、*RPL27A* はタンパク質合成の量に関与することで脂肪交雑形成に影響している可能性があるが、脂肪交雑形成に対する *RPL27A* の具体的な機能についてはいまだに報告されていない。また、本研究においては *RPL27A* の遺伝子多型 *g.3129537C>T* は他の 2SNPs (*g.3129537C>T*、*g.1471620G>T*) との有意な相互作用効果は認められなかったが、他の脂肪交雑形成に関わる量的形質遺伝子多型と相互作用している可能性については否定できない。これらの遺伝子の機能や遺伝子間相互作用が牛の脂肪交雑形成において重要な役割を果たしているのかもしれない。あるいは *EDG1*、*AKIRIN2*、*RPL27A* の近傍にあり、本研究の SNP と連鎖不平衡にある真の脂肪交雑責任遺伝子多型が存在し、その遺伝子多型を含む真の脂肪交雑原因遺伝子同士の相互作用が脂肪交雑形成に影響を与えている可能性も考えられる。今後の研究として *EDG1*、*AKIRIN2*、および *RPL27A*

の脂肪交雑形成に対する具体的な機能の解明や、近傍に存在する可能性のある真に脂肪交雑形成に機能している遺伝子の特定とその機能の解明をすることで、いまだに明らかとなっていない脂肪交雑形成のメカニズムを明らかにするとともに、信頼性の高いマーカーアシスト選抜（MAS）のための遺伝子マーカー開発が実現できると考えられる。そのためにも原因遺伝子解明のための研究や、他の黒毛和種集団を用いたさらなるレプリケーション研究の積み重ねが今後必要となる。

本研究において、我々は *AKIRIN2*、*EDG1*、*RPL27A* に存在する遺伝子多型、*c\*188G>A*、*g.1471620G>T*、*g.3129537C>T* が脂肪交雑と有意な関連性を示し、かつこれらの遺伝子多型間に有意な相互作用効果が存在することを、これまでに報告されている黒毛和種集団とは異なる遺伝的背景が多様な商用黒毛和種集団を用いて明らかにした。これらのことから、商用黒毛和種集団の脂肪交雑の育種改良にマーカーアシスト選抜(MAS)を取り入れる場合に、遺伝子マーカーとして用いる遺伝子多型間の相互作用効果を考慮することが重要であると考えられた。

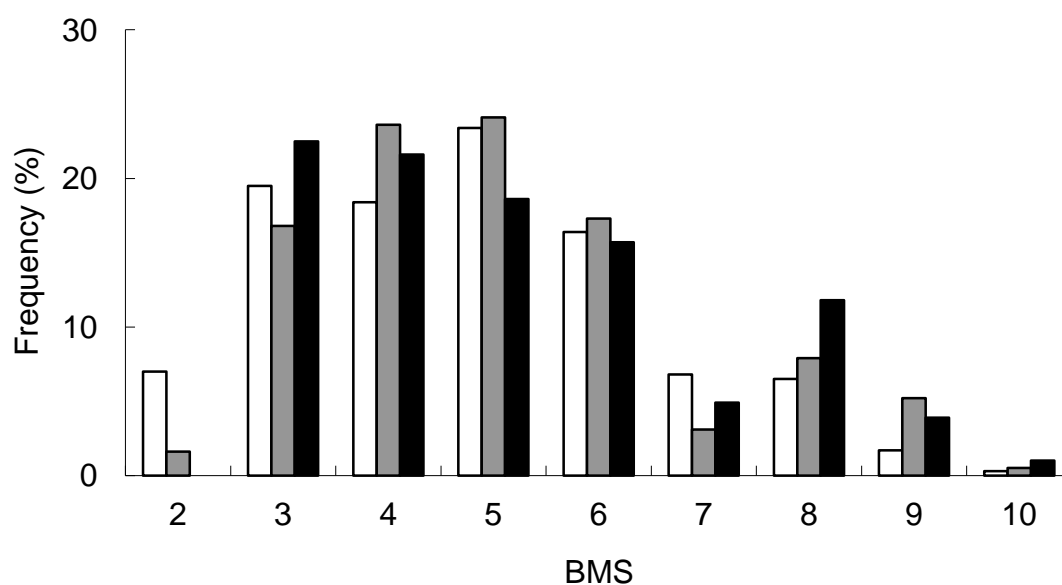


表 3-1 遺伝子型を決定した黒毛和種集団の基本情報(出荷された県、総頭数、性別、種雄牛数、BMS ナンバーの平均、BMS 育種価の平均、BMS 評価値の平均)

県	頭数				BMS	BMS	BMS
	合計	去勢	雌	種雄牛	ナンバー†	育種価†	評価値†
鹿児島県	599	394	205	96	4.79 ± 1.71	0.44 ± 0.66	2.64 ± 1.56
長崎県	191	148	43	40	5.09 ± 1.74	0.21 ± 0.70	2.41 ± 1.63
宮崎県	102	56	46	26	5.15 ± 1.85	0.40 ± 0.62	2.63 ± 1.71
合計	892	598	294	113	4.90 ± 1.74	0.38 ± 0.67	2.59 ± 1.59

† 全解析個体の平均 ± S.D.で表記した。

図 3-1 遺伝子型を決定した黒毛和種集団の BMS の分布



鹿児島県は白抜きのグラフ(open bars:  $N=599$ )、長崎県は灰色のグラフ(gray bars:  $N=191$ )、宮崎県は黒のグラフ(solid bars:  $N=102$ )で示した。横軸は BMS 形質値 (BMS ナンバー)、縦軸は各県における該当する BMS ナンバーの個体の割合 (%) を表す。いずれの県においても BMS ナンバーが 1, 11, 12 の個体は存在しなかったため省略した。

表 3-2 各県間で共通する種雄牛

県	共通する種雄牛数
鹿児島県 & 長崎県	29 †
鹿児島県 & 宮崎県	19 †
長崎県 & 宮崎県	6 †
3 県に共通	5

† 3 県に共通する種雄牛を含む

図 3-2 BMS 育種価推定に用いた BLUP モデル

$$Y_{hijkl} = P_h + S_i + N_j + M_k + F_l + D + a_{hijkl} + e_{hijkl}$$

形質値： Y: 形質値 (BMS ナンバー)

固定効果： P: 出荷県、S: 性別、N: 出荷年、M: 出荷月、F: 肥育農場

共変量：D: 出荷日齢

変量効果：a: 育種価、e: 残差

表 3-3 遺伝子型別に使用したプライマー配列

遺伝子多型	プライマー	配列
<i>c*188G&gt;A</i>	Forward	5'- TCTTAGGCAGCAACCGGATT -3'
	Reverse	5'- GAAGGGCATGTTCTTAGAA TACCAG -3'
<i>g.1471620G&gt;T</i>	Forward	5'- GTGTAATATGTATGAAGCTTG ATAGTCAGGAAATAAAT -3'
	Reverse	5'- CCACTGTATCGCTGAGC TAGGT -3'
<i>g.3129537C&gt;T</i>	Forward	5'- CCTGTTTCAGAGAATCT AAGTCC -3'
	Reverse	5'- CTGAT CAGTTTCACTTCTA G TTCAG -3'

図 3-3 BMS 育種価とそれぞれの遺伝子多型との関連性を分析するためのシングルマーカーモデル

$$Y_{hij} = A_h + B_i + C_j + e_{hij}$$

形質値： Y: BMS 育種価

固定効果： A: *c\*188G>A*、B: *g.1471620G>T*、C: *g.3129537C>T*

変量効果： e: 残差

図 3-4 BMS 評価値とそれぞれの遺伝子多型、および遺伝子型間相互作用効果との関連性を分析するためのマルチマーカーモデル

最初に解析したモデル式

$$Y_{hij} = A_h + B_i + C_j + (A_h * B_i) + (B_i * C_j) + (A_h * C_j) + e_{hij}$$

最終的な解析モデル

$$Y_{hij} = A_h + B_i + C_j + (A_h * B_i) + e_{hij}$$

形質値： Y: BMS 評価値

固定効果： A: *c\*188G>A*、B: *g.1471620G>T*、C: *g.3129537C>T*

相互作用効果：(A\*B): *c\*188G>A* と *g.1471620G>T* の相互作用効果

(B\*C): *g.1471620G>T* と *g.3129537C>T* の相互作用効果

(A\*C): *c\*188G>A* と *g.3129537C>T* の相互作用効果

変量効果： e: 残差

表 3-4 シングルマーカーモデルによる 3 遺伝子型の BMS 育種価に対する主効果

遺伝子多型	遺伝子型	頭数	最小二乗平均値 <sup>†</sup>
<i>c.*188G&gt;A</i>	<i>AA</i>	148	$0.03 \pm 0.06^a$
	<i>GA</i>	474	$0.06 \pm 0.03^a$
	<i>GG</i>	270	$-0.12 \pm 0.04^b$
<i>g.1471620G&gt;T</i>	<i>TT</i>	199	$0.08 \pm 0.04^a$
	<i>GT</i>	463	$0.01 \pm 0.03^a$
	<i>GG</i>	230	$-0.10 \pm 0.05^b$
<i>g.3109537C&gt;T</i>	<i>TT</i>	334	$0.14 \pm 0.04^a$
	<i>CT</i>	391	$0.00 \pm 0.03^b$
	<i>CC</i>	167	$-0.29 \pm 0.05^c$

<sup>†</sup> BMS 推定育種価の最小二乗平均値(Least-squares mean)  $\pm$  S.E. を示す。

最小二乗平均値は BMS 推定育種価の平均値 (= 0.38368) からの差を表記した。

<sup>a,b,c</sup> 異なる肩文字間の数値に有意差があることを示す( $P < 0.05$ )。



表 3-5 マルチマーカーモデルによる 3 遺伝子型の BMS 評価値に対する主効果、および相互作用効果

遺伝子多型	遺伝子型	頭数	最小二乗平均値 †
<i>c.*188G&gt;A</i>	<i>AA</i>	148	$-0.26 \pm 0.14$
	<i>GA</i>	474	$0.01 \pm 0.08$
	<i>GG</i>	270	$-0.12 \pm 0.10$
<i>g.1471620G&gt;T</i>	<i>TT</i>	199	$0.06 \pm 0.12^a$
	<i>GT</i>	463	$0.00 \pm 0.09^a$
	<i>GG</i>	230	$-0.44 \pm 0.12^b$
<i>g.3109537C&gt;T</i>	<i>TT</i>	334	$0.18 \pm 0.09^a$
	<i>CT</i>	391	$-0.06 \pm 0.09^b$
	<i>CC</i>	167	$-0.49 \pm 0.12^c$
<i>c.*188G&gt;A</i> & <i>g.1471620G&gt;T</i> ‡	<i>AA &amp; TT</i>	39	$-0.12 \pm 0.25^b$
	<i>AA &amp; GT</i>	73	$0.38 \pm 0.19^a$
	<i>AA &amp; GG</i>	36	$-0.19 \pm 0.26^b$
	<i>GA &amp; TT</i>	96	$-0.08 \pm 0.16^b$
	<i>GA &amp; GT</i>	253	$-0.16 \pm 0.10^b$
	<i>GA &amp; GG</i>	125	$0.31 \pm 0.14^a$
	<i>GG &amp; TT</i>	64	$0.27 \pm 0.20^a$
	<i>GG &amp; GT</i>	137	$-0.15 \pm 0.14^b$
	<i>GG &amp; GG</i>	69	$-0.05 \pm 0.19^b$

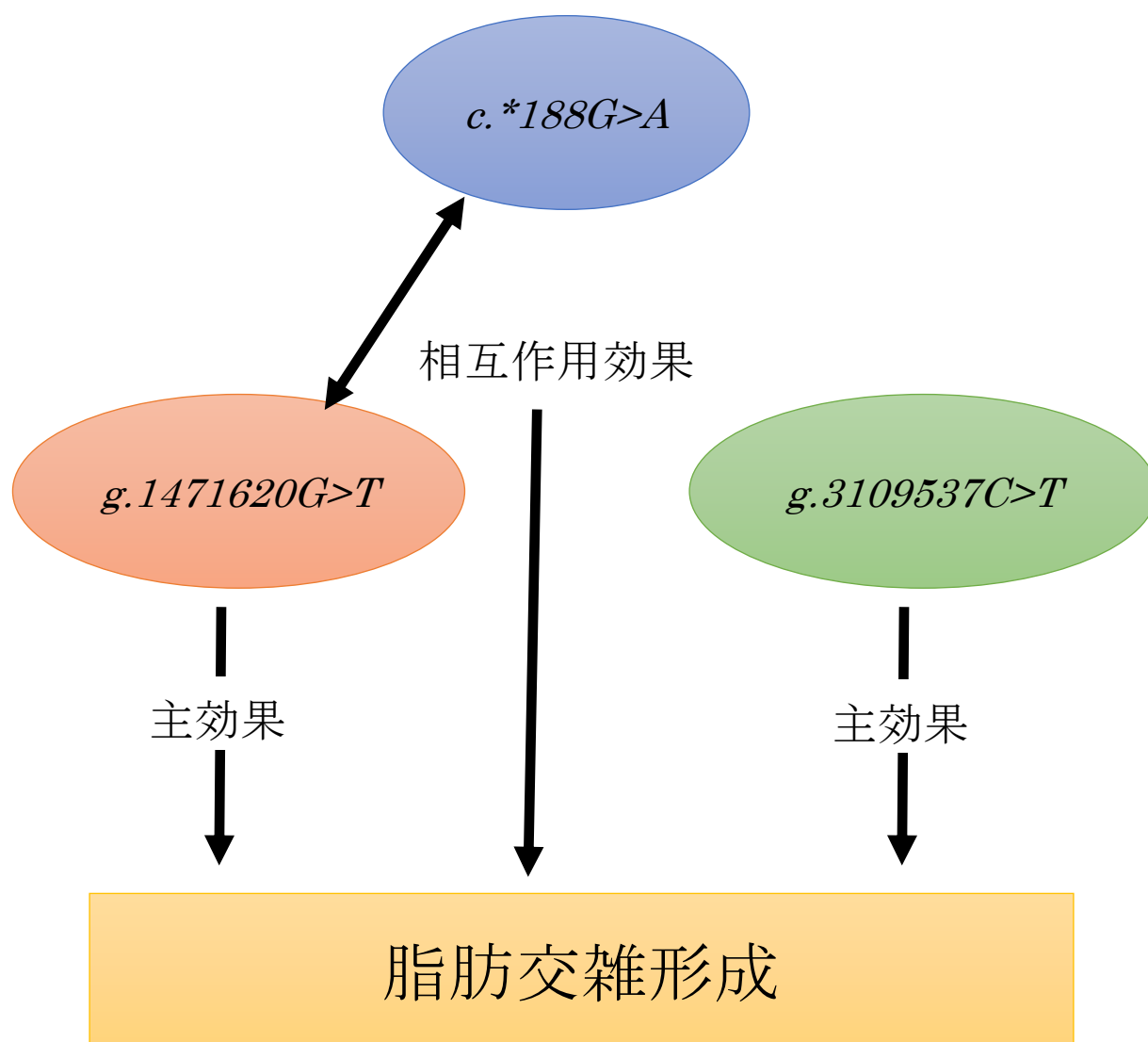
†BMS 推定育種価の最小二乗平均値(Least-squares mean) ± S.E. を示す。最小二乗平均値は BMS 評価値の平均値 (= 2.58816) からの差を表記した。

第3章 *EDG1*、*AKIRIN2*、*RPL27A* 遺伝子上に存在する一塩基多型 *g.1471620G>T*、*c.\*188G>A*、*g.3129537C>T* の黒毛和種牛脂肪交雑に対する遺伝的効果と相互作用の検証

‡ 有意差が認められた *c.\*188G>A* と *g.1471620G>T* の相互作用効果のみを示した( $P < 0.05$ )。

a,b,c 異なる肩文字間の数値に有意差があることを示す( $P < 0.05$ )。

図 3-5 3 遺伝子型の BMS に対する相互作用モデル



## 要約

前章において述べた *EDG1* 遺伝子内の一塩基多型 *c-312A>G* の他、BMS として評価される和牛の脂肪交雑に関連する遺伝子多型として、我々は過去に大分県黒毛和種集団を用いて、*AKIRIN2*、*EDG1*、*RPL27A* 遺伝子内にそれぞれ存在する一塩基多型 *c.\*188G>A*、*g.1471620G>T*、*g.3109537C>T* を見出している。しかし他の黒毛和種集団での再現性、および 3 遺伝子多型間の相互作用については未だ明らかではない。本章では 3 遺伝子多型と BMS との関連性、および多型間相互作用について過去の研究とは別の黒毛和種集団（鹿児島、宮崎、長崎）を用いて解析を行った。それぞれの遺伝子多型と BMS との関連性を単独で解析した結果、すべての遺伝子型で有意な関連性が観察され、それぞれの優良型アリルは過去の報告と一致した。また、3 遺伝子多型の主効果と相互作用について解析を行ったところ、*c.\*188G>A* と *g.1471620G>T* の間に有意な相互作用が存在することを確認した。また、*c.\*188G>A* を除き、*g.1471620G>T* と *g.3109537C>T* の主効果は、単独での解析と同様に BMS との有意な関連性が認められた。これらの結果は脂肪交雑形成において遺伝子多型間の相互作用が影響する可能性を示しており、その改良のためのマーカーアシスト選抜では遺伝子間相互作用を考慮することが重要になると考えられる。

## 第 4 章

遺伝子プロファイリング手法の  
ブタランドレース種増体重に関連する  
遺伝子マーカー開発への応用

## 緒言

我々はこれまでに和牛の脂肪交雑に関連する汎用的な遺伝子マーカー開発の手法として発現プロファイリングによる手法の有効性を明らかにしてきた。発現プロファイリング手法によって開発された遺伝子マーカーは様々な和牛集団において幅広く脂肪交雑と関連しており、また、相互作用を考慮した相関解析から、本マーカーを用いて選抜を行うことで効率的に脂肪交雑育種価を改良することが可能であることを本論文の第2章、第3章で明らかにしてきた。しかしながら、本手法を他の畜種、特に牛と同様に重要な家畜の一つであるブタに対し適用した例は非常に少ない。

ブタランドレース種は産業ブタの主要品種であり、繁殖能力、増体能力に優れた品種である。ブタの商業的生産においては繁殖能力、増体能力に重きを置いて造成された本系統に他の品種を交雑させることでコマーシャル豚の作出が行われている。このため、増体形質に対してより高い遺伝的能力および遺伝的斉一性を有するランドレース種系統を、より早くより安価に造成していくことは養豚業界での大きな課題である。このような課題の解決には、ランドレース種の増体形質の遺伝的ばらつきの原因となる DNA 変異およびその近傍の DNA 多型を増体関連マーカーとして取り入れた DNA 育種改良システムの構築が有効であると考えられる。

これまでもランドレース種を対象にした増体関連形質に関わる遺伝子多型の研究が数多く報告されており、その中で8個の遺伝子多型 (*IGF1*, *CRH*, *MYF6*, *SLC27A4*, *LEP*, *PIT1*, *GH*, *GHRH*) が増体関連形質に関与することが示されている (Kennes *et al.*, 2001, Murani *et al.*, 2006, Wyszynska *et al.*, 2006, Xu *et al.*, 2009)。しかしながらこれらの遺伝子多型の増体への効果はそれほど大きくはなく、さらなる増体関連マーカーの開発は必要不可

欠な課題である。また、ブタの QTL に基づいた研究も数多く報告されているが、品種間交雑群家系を用いた解析が一般に行われており (Hu *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2010)、ランドレース種内での増体遺伝子の QTL 分析や原因遺伝子同定はされておらず、遺伝子マーカー開発にはいまだ至っていない。

発現プロファイリングによるブタの増体形質に関連する研究は国内外で報告がなされているが、そのほとんどは増体の良い（能力が高い）品種と悪い（能力が低い）品種の比較によるものであり、同一品種内の遺伝的ばらつきを評価する研究ではない (Tuggle *et al.*, 2007; Davoli *et al.*, 2007; Pomp *et al.*, 2001)。また、Zhao *et al.* (2003) および Janzen *et al.* (2000)の研究では品種内での発現プロファイリング分析を行っているが、前者は日齢による経時的な遺伝子発現の差を評価しており、後者は特定の遺伝子 (*ARPP16*) のみに焦点を当てており網羅的な発現プロファイリングを行っていない。以上のような状況から、同一品種内での発現プロファイリングは行われておらず、ランドレース種内での増体形質に関連する原因遺伝子の同定と遺伝子マーカー開発には至っていない。

我々はこれまでに黒毛和種の脂肪交雑原因遺伝子同定と遺伝子マーカー開発に、機能情報、染色体位置情報、発現プロファイリング情報の 3 つの情報を組み合わせた新規の遺伝子マーカー開発戦略を適用し、汎用性が高くかつ効果の大きい遺伝子マーカー開発を行ってきた。そこで、我々は本戦略が幅広い畜種、形質の遺伝子マーカー開発に適用でき、今回のブタランドレース種における増体関連形質の遺伝子マーカー開発への適用も可能であると考えた。また、近年ブタ全ゲノムの解読に伴ってゲノムデータベースの整備が飛躍的に進んだことによって、増体関連形質原因遺伝子の位置的・機能的候補

の選定に必要なあらゆる角度からのゲノム情報（QTL 情報および機能注釈情報）を利用したバイオインフォマティクス解析が行いやすくなっている。このことは、発現プロファイリング情報が得られた遺伝子に機能注釈情報や染色体位置情報を追加することを可能にし、標的とする形質への機能が予測される候補遺伝子が選抜しやすくなったことを意味している。

そこで本研究ではランドレース種内での増体関連形質の遺伝的ばらつきの原因遺伝子同定のため、増体の遺伝的能力に差のあるランドレース種の発現プロファイリングを行った。さらに発現に差のあった遺伝子について *in silico* マッピング解析やバイオインフォマティクス解析を行うことで位置的・機能的遺伝子候補を選定し、それらの遺伝子の発現を調節すると考えられるゲノム領域の一塩基多型を決定した。また、これらの研究を通じて発現プロファイリングに基づく遺伝子マーカー開発手法が黒毛和種の脂肪交雑以外の他畜種、他形質に適用可能であることを示した。



## 材料・方法

### 高増体能力・低増体能力ブタの選定と組織採取

本研究では増体形質として 100kg 到達時予測日齢を採用し、これに基づいて高増体・低増体能力ブタを選抜した。この 100kg 到達時予測日齢はある固定された週齢でブタの体重を測定し、測定体重と週齢をもとに 100kg に到達する日齢を予測したものである。そのため、高増体能力のブタは 100kg 到達時予測日齢が少なく、低増体能力のブタは多くなる。

本研究では同一農場のランドレース純粋種を対象とし、本農場にて継続的に採取した約 10,000 頭のブタの測定データを育種価算出に用いた。100kg 到達時予測日齢の育種価は形質データを基に血縁、環境の効果を考慮した最良線形不偏予測法 (best linear unbiased prediction method、BLUP 法 (Henderson 1973)) を用いて推定を行った。分析には MTDFREML プログラム (Boldman *et al.* 1995) の REML 法による単形質アニマルモデルを用い、遺伝分散と環境分散を計算し、各形質の育種価を推定した。MTDFREML プログラムでは性別、測定年、測定月を固定効果、相加的遺伝効果および母系統、母豚とその産次数をランダム効果として分析を行った。

発現プロファイリングには増体能力の差が発現し始める若い日齢の個体の組織を用いるため、生後 23 日目の離乳直後の仔豚で、互いに血縁のない雄個体から高増体能力群 3 頭 (B1,B2,B3)、低増体能力群 3 頭 (S1,S2,S3) を選び、解析に供した。仔豚は直接検定を受ける前であるため、母親の育種価と父親の育種価の平均値を仔豚の推定育種価として選抜を行った。これら 6 頭の 100kg 到達時予測日齢育種価は表 4-1 に示した通りである。

これら 6 頭の胸最長筋を採取し、液体窒素で即座に凍結し、発現プロファイリングに供した。

#### サブトラクション法

本研究では発現プロファイリング法として mRNA サブトラクション法を採用し、低増体能力群と比べて高増体能力群で高く、あるいは特異的に発現する遺伝子のクローニングを試みた。なお、サブトラクション法の概要を図 4-1 に示した。

#### サブトラクションサンプルの調製

高増体能力群、低増体能力群のそれぞれの個体の胸最長筋組織を 330mg 採取し、各群でプールしたものをサンプルとしてトータル RNA を抽出した。即ち、サンプルに TRI REAGENT (コスモバイオ、東京、日本)を添加し、ポリトロンホモジナイザーでホモジナイズした。ホモジナイズ液を 1ml 採取し、12,000xg、4℃、10 分間遠心分離し、上清を回収した。さらにクロロホルムを 0.2ml 添加し、15 秒間ボルテックスした。その後 12,000xg、4℃、10 分間遠心分離し、上清（水層）を回収した。回収した上清にイソプロパノールを 0.5ml 添加し、よく攪拌して 10 分間静置した。12,000xg、4℃、10 分間遠心分離することで RNA をチューブの底にペレットとして回収した。さらに 70% エタノールによって洗浄したものを DEPC 水に溶解し、RNA サンプルとした。得られた RNA サンプルは分光光度計によってトータル RNA 量を測定した。

mRNA の抽出（ポリ A-RNA の回収）を行うために、トータル RNA サンプルは脱塩のためエタノール沈殿（5M 酢酸アンモニウム、100%エタノール）

を行い、Nuclease-free の水に再溶解させた。さらにこのサンプルから NucleoTrap® mRNA Mini kit (タカラバイオ、滋賀、日本)を使用して mRNA (ポリ A-RNA) を抽出、精製した。即ち、まず RNA サンプルを Oligo dT 修飾ラテックスビーズと反応させ、ポリ A-RNA のみを吸着させた。さらに吸着させたラテックスビーズを専用スピncラムに負荷し、洗浄液で 3 回洗浄した。最後に Nuclease-free の水で 2 回溶出操作を行って、高増体、低増体能力群それぞれに合計 400 $\mu$ l の mRNA サンプル溶液を得た。この mRNA サンプル溶液を濃縮のため再度エタノール沈殿によって RNA を沈殿させ、最終的に 7 $\mu$ l の DEPC 水に溶解させた。

#### サブトラクション用 cDNA の調製

回収した高増体能力群、低増体能力群のサンプルをサブトラクション法の Tester、Driver として以後の試験を実施した。また、コントロールとして人骨格筋由来 Poly A<sup>+</sup> RNA を用いた。Tester、Driver およびコントロールサンプルは AMV Reverse Transcriptase (プロメガ、東京、日本)を用いて 1st strand cDNA を合成した。試薬の組成、方法については当実験室のプロトコルに従った。

次に合成した 1st strand cDNA をテンプレートとして 2nd strand cDNA を合成した。2nd strand cDNA 作成は Second-strand enzyme mix および T4 DNA Polymerase (タカラバイオ、滋賀、日本)を用い、当実験室のプロトコルに従って実施した。作成した 2nd strand cDNA はフェノール・クロロホルム法を用いて精製し、エタノール沈殿法で回収したのち、50 $\mu$ l の滅菌水に溶解させた。

### *Rsa*I による消化

上記で得られた double strand (ds) Tester、Driver およびコントロールサンプルを制限酵素 *Rsa*I で消化することで平滑末端を持つ ds DNA フラグメントの生成を行った。即ち、得られたそれぞれの ds DNA に *Rsa*I restriction Buffer、*Rsa*I を添加し、37℃で 90 分インキュベートした。その後サンプルはフェノール・クロロホルム法を用いて精製し、エタノール沈殿法で回収したのち、5.5μl の滅菌水に溶解させた。またサンプルの一部を 2%アガロースゲルで電気泳動し、*Rsa*I による消化状況を確認した。

### アダプターライゲーション

各群間で発現量の異なる遺伝子を選抜するため、サブトラクション法を実施した。サブトラクション法は Clontech PCR-Select™ cDNA サブトラクションキット(タカラバイオ、滋賀、日本)を用い、キットのプロトコルと当実験室のプロトコルを基に、最適な条件を検討、改変して実験を実施した。*Rsa*I 消化によって得られた平滑末端 Tester ds DNA フラグメントに 2 つのアダプターを付加した。即ち、Tester ds DNA フラグメントに各アダプター (Adaptor 1、Adaptor 2R) をそれぞれ別に添加し、T4 DNA Ligase (タカラバイオ、滋賀、日本)を用いて各アダプターを Tester ds DNA フラグメントにライゲーションした。高増体、低増体、コントロールの各サンプルについて一部を採取し、Tester として用いるため上記の操作を実施した。また、非サブトラクションサンプルとして、Adaptor 1、Adaptor 2R の両方を添加、ライゲーションしたサンプルを作成した。ライゲーションの方法については当実験室のプロトコルに従って実施した。

### ハイブリダイゼーション

以下の操作では **Tester** サンプルに過剰量の **Driver** サンプルを添加し、ハイブリダイゼーションさせる。これによって **Driver** に対し **Tester** で発現量が多い ds DNA が選抜され、**Tester** と **Driver** の遺伝子発現の比較が可能となる。本研究においては高増体能力群のサンプルを **Tester**、低増体能力群のサンプルを **Driver** として、低増体群に対し高増体群で多く発現している遺伝子を探索するサブトラクションをフォワードサブトラクションとする。また、逆に低増体能力群のサンプルを **Tester**、高増体能力群のサンプルを **Driver** として、高増体群に対し低増体群で多く発現している遺伝子を探索するサブトラクションをリバースサブトラクションとする。

まず、異なるアダプターが付加した 2 種類の **Tester** サンプルにそれぞれ、**RsaI** 処理した **Driver** サンプル、4x Hybridization Buffer を添加し、98℃で 90 分、68℃で 8 時間インキュベートした (1st ハイブリダイゼーション)。さらに発現量に差のある遺伝子を濃縮するため新たに **Driver** と **Adaptor 1** の 1st サブトラクションサンプル、**Adaptor 2R** の 1st サブトラクションサンプルをすべて混合し、68℃で 1 晩インキュベートした (2nd ハイブリダイゼーション)。

### PCR によるサブトラクションサンプルの増幅

各サブトラクションサンプルおよびそれに対応した非サブトラクションサンプルをテンプレートとして **Nested PCR** によりサブトラクションサンプルの増幅を実施した。

まず、1st PCR のテンプレートとして各サブトラクションサンプルおよびそれに対応した非サブトラクションサンプルを準備し、各テンプレートに当

実験室のプロトコルに従って調製した 1st PCR mix を添加した。使用したプライマーの配列は以下の通りである。

PCR Primer 1: 5'-CTA ATA CGCA CTC ACT ATA GGG C-3'

また 1st PCR 条件は以下の通りである。まず、75℃、5 分の前処理を行った後 94℃、30 秒の熱変性、66℃、30 秒のアニーリング、72℃、90 秒の伸長反応を 27 サイクル実施、最後に 72℃10 分の伸長処理を行った。

実施した 1st PCR 産物を 10 倍に希釈し、2nd PCR のテンプレートとした。各テンプレートに当実験室のプロトコルに従って調製した 2nd PCR mix を添加した。使用したプライマーの配列は以下の通りである。

Nested PCR Primer 1: 5'-TCG ACG GGC CGC CCG GGC AGG T-3'

Nested PCR Primer 2R: 5'-AGC GTG GTC GCG GCC GAG GT-3'

また 2nd PCR 条件は以下の通りである。まず、94℃、2 分の前処理を行った後 94℃、30 秒の熱変性、68℃、30 秒のアニーリング、72℃、90 秒の伸長反応を 10 サイクル実施、最後に 72℃10 分の伸長処理を行った。

各 PCR 産物は一部を 2%アガロースで電気泳動し、増幅産物の確認を実施した。

#### ディファレンシャルスクリーニング

サブトラクションにより得られた PCR 増幅産物をクローニングし、コロニーハイブリダイゼーションによってクローン断片の各サンプルでの発現量を再度比較することで高増体能力群、低増体能力群で発現量の異なる遺伝子のスクリーニングと同定を行った。

#### ハイブリダイゼーション用 DNA プローブの作成

フォワードサブトラクション、リバーサブトラクションサンプルおよび両者の非サブトラクションサンプルの計4つのサンプルを用い、DIG修飾したDNAプローブを作成した。即ち、PCR DIG ラベリングミックス（ロシュ・ダイアグノスティックス、東京、日本）を用いて Nested PCR Primer 1、Nested PCR Primer 2R を用いた PCR を実施し、DIG 修飾 DNA プローブを得た。PCR 条件は以下の通りである。まず、94℃、2 分の前処理を行った後 94℃、30 秒の熱変性、68℃、30 秒のアニーリング、72℃、90 秒の伸長反応を 10 サイクル実施、最後に 72℃10 分の伸長処理を行った。各 PCR 産物は一部を 2%アガロースで電気泳動し、増幅産物の確認と DIG 付加の有無の確認を実施した。

#### TA クローニング

TOPO® Cloning Reaction キット（ライフテクノロジーズジャパン、東京、日本）を使用し、フォワードサブトラクションによって得られた高増体能力群で発現量の高い遺伝子群の PCR 増幅産物をクローニングした。TOPO ベクターへのライゲーション、トランスフォーメーション、抗生物質（カナマイシン）による形質転換大腸菌の選抜についてはキット、および研究室の常法に従って実施した。選抜した大腸菌は LB 液体培地（日本ベクトン・ディッキンソン、東京、日本）で培養し、培養液をカナマイシン加 LB 寒天培地に次のように植菌してマスタープレートと 4 つのハイブリダイゼーション用メンブレンプレートを作成した。マスタープレートは 52 区画に分けたグリッド台紙を貼り、各区画にクローニングした大腸菌株を植菌した。また、ハイブリダイゼーション用メンブレンプレートは寒天培地上にあらかじめ 52 区画を区切ったメンブレンを敷き、その上に大腸菌株を植菌した。これらの培地

は 37℃、一晚培養を実施した。

#### コロニーハイブリダイゼーション

作製した 4 つのハイブリダイゼーション用メンブレンプレートに、ハイブリダイゼーション用 DNA プロブのラベリングのステップで作製した 4 つの DIG ラベルされた DNA ハイブリダイゼーションプロブであるフォワードサブトラクション産物、非サブトラクションテスター産物、リバーサブトラクション産物および非サブトラクションドライバー産物をハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーションは研究室の常法に従って行った。即ち、形質転換大腸菌を培養したメンブレンプレートをアルカリ処理することで菌体を溶解させたのち、UV クロスリンカーを用いて DNA をメンブレンに固定した。続いてプロテイナーゼ K で処理したメンブレンプレートを洗浄し、余計な菌体成分を取り除いて、ハイブリダイゼーション用のメンブレンプレートとして、DIG プレハイブリダイゼーション溶液に浸して 42℃、1 時間のプレハイブリダイゼーションを行った。作成した前述の DIG プロブは 95℃ 5 分間のヒートショックをした後プレハイブリダイゼーションが終了したメンブレンプレートに添加して 42℃、1 晩ハイブリダイゼーション反応を行った。その後、洗浄溶液にて 4 回の洗浄操作を行った後、ブロッキングバッファーで 30 分ブロッキングを行った。続いてハイブリダイズしている DIG プロブに抗 DIG 抗体を反応させるため、抗 DIG 抗体溶液で 30 分処理し、さらに発色基質溶液で処理することで抗 DIG 抗体のシグナルを検出した。

#### シーケンス解析およびホモロジー検索

コロニーハイブリダイゼーションによるディファレンシャルスクリーニン



グによって選出された 14 個の遺伝子をインサートにもつプラスミド DNA をそれぞれの形質転換体大腸菌から抽出した。大腸菌の培養はカナマイシン加 LB 液体培地で 37°C 1 晩インキュベートし、回収した菌体から QIAprep Spin Miniprep Kit (キアゲン、ドイツ)を用いてプラスミド DNA を抽出した。

さらにプラスミド DNA を鋳型にして T7 プライマー (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') をプライマーとして遺伝子配列をシーケンスした。シーケンスは、韓国 SolGent 社の DNA シーケンシング受託解析サービスを用いて行った。得られたシーケンスデータからのベクター配列の除去は、目視により行い、インサート配列を得た。さらに、得られたインサート配列をもとにして、National Center for Biotechnology Information (NCBI) 上の nr データベースおよびブタゲノムデータベースを用いて、BLAST 検索による相同性解析を行った。相同性解析では、e スコアを算出し、e-20 以下のスコアをもつ配列を相同性があるものとしてみなした。

ブタゲノムデータベースにおいて照合されたゲノム領域については National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Map viewer データベースを用いてその照合ゲノム領域が遺伝子の転写領域に合致するものであるか否かの検討を行った。

#### *in silico* 解析による増体形質原因遺伝子の位置的・機能的候補の同定

ディファレンシャルスクリーニング、シーケンス解析およびホモロジー検索を行うことで、低増体能力個体群に比べて高増体能力個体群で高く発現している可能性をもつ 8 個のクローンに挿入されていた 5 遺伝子について、National Center for Biotechnology Information (NCBI) 上の PubMed データベースを用いた文献検索を行うことによって、機能情報および品種間発現プ

ロファイル情報を得た。また、それらの遺伝子について、NCBI 上の Gene データベースを用いた遺伝子検索を行うことにより、機能注釈情報を得た。品種間発現プロファイリングについては、低増体能力品種に比べて高増体能力品種において発現量が増加しているか否かを調べることで、本研究の結果と一致しているかについて検討した。機能情報については、5 遺伝子の予測された機能が増体形質に関与するかどうか、また、発現量の増加が増体を高める表現型につながるかどうかについて検討した。こうして、本研究で得られた発現プロファイリング情報に加えて、品種間発現プロファイル情報および機能情報を取り入れることで、5 遺伝子が増体形質原因遺伝子の機能的候補になり得るかどうかを検討した。

さらに、National Animal Genome Research Program (NAGRP) 上の Animal Genome Tracks pig II データベースを用いて 5 遺伝子の染色体位置における QTL 情報を得た。QTL 情報については、5 遺伝子の染色体位置にブタ増体形質に関与する QTL が存在するか否かについて検討した。そしてこれらの情報から低増体能力個体群に比べて高増体能力個体群で高く発現している可能性が高い 5 遺伝子が、増体形質原因遺伝子の位置的・機能的候補となりうるかどうかを検討した。

#### 位置的機能的遺伝子の一塩基多型検出

*in silico* 解析によって位置的機能的遺伝子として同定した *TTN*、*EEF1A2*、*TSG101*、*ND1*、*ND4* 遺伝子について、遺伝子発現や mRNA 安定性に関わると考えられる領域について低増体能力個体群 3 個体、高増体能力個体群 3 個体のそれぞれの遺伝子配列のシーケンスを行い、群間の遺伝子配列を比較することで一塩基多型 (SNPs) の検出を行った。ゲノム染色体上に座上す

る *TTN*、*EEF1A2*、*TSG101* は第一エキソンとプロモーターと予想される領域について NCBI のデータベース配列を基にプライマーを設計した(表 4-2)。また、*ND1*、*ND4* については当該遺伝子領域のすべて、およびミトコンドリア遺伝子発現量の調節に機能するとされる D-loop 領域のすべてについて NCBI のデータベース配列を基にプライマーを設計した (表 4-2)。設計したプライマーを用い、それぞれの遺伝子領域を PCR によって増幅した。PCR 反応溶液は TaKaRa Ex Taq (5U/  $\mu$ l) (タカラバイオ、滋賀県) を 0.25  $\mu$ l、10x EX Buffer を 5  $\mu$ l、2.5mM dNTP Mixture を 4  $\mu$ l、プライマー (10  $\mu$ M) を各 1  $\mu$ l、抽出した DNA 溶液を 1  $\mu$ l 添加し、蒸留水で 50  $\mu$ l までメスアップした。調製した PCR 反応溶液は T100™ サーマルサイクラー (Bio-Rad, Hercules, USA) を使用し、PCR 反応を行った。PCR 反応は 95℃の解離反応を 2 分行い、その後 95℃30 秒、55℃30 秒、72℃1 分の増幅反応を 40 サイクル行い、最後に 72℃10 分のサイクル条件で実施した。アガロース電気泳動によって PCR 増幅産物を確認した後、増幅に用いたプライマーおよび、増幅産物内に設計したインターナルプライマーを用いてダイレクトシーケンスを行った (表 4-2)。シーケンスは、韓国 SolGent 社の DNA シーケンシング受託解析サービスを用いて行った。得られたシーケンス波形を低増体能力個体群と高増体能力個体群で比較することにより、群間で異なっている遺伝子多型を検出した。

## 結果

### サブトラクション法

高増体能力個体群および低増体能力個体群の3頭ずつからそれぞれ330mgの胸最長筋組織を取り出し、トータルRNAの抽出を行った。高増体および低増体能力個体群それぞれの、約1gの胸最長筋組織より得られたトータルRNAの濃度を、分光光度計を用いて定量した結果、高増体および低増体能力個体群で共に1.7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ であり、高増体能力個体群のトータルRNAの収量は1020 $\mu\text{g}$ 、低増体能力個体群については1224 $\mu\text{g}$ であった。得られたRNAからPoly(A) RNAを精製し、cDNAを合成した。また、cDNA合成後にRsa I消化を行った(図4-2)。

得られたRsa I消化cDNAにアダプターをライゲーションし、テスターcDNAおよびドライバーcDNAの2回のハイブリダイゼーションを行った。この時、テスターを高増体能力個体群Rsa I消化cDNA、ドライバーを低増体能力個体群Rsa I消化cDNAとして、フォワードサブトラクションのためのハイブリダイゼーションを行った。さらに、テスターを低増体能力個体群Rsa I消化cDNA、ドライバーを高増体能力個体群Rsa I消化cDNAとしたリバーサブトラクションのためのハイブリダイゼーションもフォワードサブトラクションと同様に行った。

次に、フォワードサブトラクションのハイブリダイゼーション産物を鋳型DNAとし、アダプター配列の5'末端をプライマーとした1st PCRおよびその3'末端をプライマーとした2nd nested PCRによって、低増体能力個体群に比べて高増体能力個体群で特異的に発現または高く発現している遺伝子を特異的に増幅させるフォワードサブトラクションPCRを行った。また、同様

な方法でリバーササブトラクションのハイブリダイゼーション産物を鋳型 DNA としたリバーササブトラクション PCR により、高増体能力個体群に比べて低増体能力個体群において特異的に発現または高く発現している遺伝子 を特異的に増幅した (図 4-3)。

#### ディファレンシャルスクリーニング

サブトラクションによって得られたフォワードサブトラクション産物を TA クローニングし、大腸菌へトランスフォーメーションした。形質転換されたコロニーを採取し、核酸をメンブレンに固定、作成した DIG ラベルプローブとのコロニーハイブリダイゼーションを行った (図 4-4)。フォワードサブトラクション産物、リバーササブトラクション産物をプローブとして用いたハイブリダイゼーションの結果から、14 個のコロニーでシグナルの強弱に差がみられ、リバーササブトラクション産物に比べ、フォワードサブトラクション産物で高いシグナル強度が検出された。さらに、非サブトラクションテスト産物と非サブトラクションドライバ産物をプローブとして用いたハイブリダイゼーションの結果も同様に比較したところ、リバーササブトラクション産物にくらべてフォワードサブトラクション産物で高いシグナル強度が検出された 14 個のコロニーのうち 8 個のコロニーにおいて、シグナル強度に差が見られた (表 4-3)。

#### シーケンス解析およびホモロジー検索

ディファレンシャルスクリーニングによって得られた 14 個のコロニーのプラスミド DNA のインサートの遺伝子配列のシーケンスを行った。これら 14 個のクローン化インサートのシーケンスデータを、National Center for

Biotechnology Information (NCBI)上の nr 遺伝子データベースおよびブタゲノムデータベースを用いた BLAST 検索による相同性解析を行った。2 つのデータベース検索の結果から、クローン No.2 と No.10 以外はすべて、既知遺伝子の遺伝子配列と近縁な配列であった。さらに、興味深いことに、クローン No.5、No.11 および No.13 は *NADH dehydrogenase subunit 1 (ND1)* 遺伝子をコードしていた。また、No3 および No8 は *Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2 (EEF1A2)* 遺伝子をコードしていた。これらの重複は、低増体能力個体群および高増体能力個体群との間での *ND1* および *EEF1A2* の発現量の差が確実であることを意味するものと考えられる。

なお、それぞれのコロニーがもつ遺伝子は、No1 は *Tripartite motif containing 44 (TRIM44)*、No2 は *BTB/POZ domain containing6 (BTBD6)*、No3 および No8 は *EEF1A2*、No4 は *ND4*、No5、No11 および No13 は *ND1*、No6 は *Titin (TTN)*、No7 は *Splicing factor 3b, subunit 1 (SF3B1)*、No9 は *TBC1 domain family, member 10B (TBC1D10B)*、No10 は *Glutamate decarboxylase-like 1 (GADL1)*、No12 は *cysteine-rich with EGF-like domains 1 (CRELD1)*、No14 は *Tumor susceptibility gene 101 (TSG101)* に相当しており、14 個のクローン化プラスミド DNA は 11 個の遺伝子で構成されていることが明らかになった (表 4-4)。

*in silico* 解析による増体形質原因遺伝子の位置的・機能的候補の同定

上記の解析によって *TRIM44*、*BTBD6*、*EEF1A2*、*ND4*、*ND1*、*TTN*、*SF3B1*、*TBC1D10B*、*GADL1*、*CREED1* および *TSG101* の 11 個の遺伝子が、低増体能力個体群に比べて高増体能力個体群で高く発現していることが明らかとなった。このうち、ディファレンシャルスクリーニングでより明確

に発現差が確認された 8 個のクローンのインサートとなっていた 5 個の遺伝子に (*TTN*、*EEF1A2*、*TSG101*、*ND1* および *ND4*) ついて、データベース検索にもとづく *in silico* 解析を行い、低増体能力個体群に比べて高増体能力個体群で高く発現している遺伝子が増体形質原因遺伝子の候補となりうるか検討した (表 4-4)。

*TTN*、*EEF1A2*、*TSG101*、*ND1* および *ND4* の 5 つの遺伝子は、*TSG101*を除いたそれぞれが、増体能力に差のあるブタの品種間において発現量に差のあることが報告されている (Lin *et al.*, 2005、Wimmers *et al.*, 2007、Davoli *et al.*, 2011、Zhao *et al.*, 2003、Serao *et al.*, 2011)。これらのことから、選抜した 5 つの遺伝子のうち 4 つの遺伝子は品種間の遺伝子発現の比較から、ブタの増体重への関与が過去に報告されていることが明らかとなった。しかし、今回のように品種内の増体重の差を検証した過去の報告はなかった。

さらに機能注釈情報に注目した場合、*TTN* は筋節の維持および集合 (Wimmers *et al.*, 2007、Davoli *et al.*, 2011)、*ND1* および *ND4* はミトコンドリアにおける ATP 合成のための酸化的リン酸化 (Lin *et al.*, 2005)、*EEF1A2* はタンパク合成および筋管のアポトーシス抵抗性 (Zhao *et al.*, 2003)、*TSG101* は細胞増殖に関与 (Liu *et al.*, 2010、Krempler *et al.*, 2002) することがそれぞれ報告されている。

さらに QTL 情報に注目した場合、ミトコンドリアゲノム上に存在する *ND1*、*ND4* を除く 3 つの遺伝子である *TSG101*、*EEF1A2* および *TTN* の染色体上での位置は、ブタ増体形質 QTL が存在すると報告のあるゲノム領域に存在していた (Hu *et al.*, 2007、Hu *et al.*, 2005、Zhi *et al.*, 2010)。また、ブタは増体形質に対し細胞質遺伝効果が報告されている (Fernandez *et al.*, 2008)。このことからミトコンドリアゲノム上に位置する *ND1* および *ND4* 遺伝子に

についても増体形質への効果が考えられた。

#### 位置的機能的遺伝子の一塩基多型検出

位置的機能的遺伝子として同定した *TTN*、*EEF1A2*、*TSG101*、*ND1* および *ND4* について増体能力との関連性解析を行うため、それぞれの遺伝子の発現量、mRNA の安定性などに関与すると考えられる領域の遺伝子配列を決定し、低増体能力個体群と高増体能力個体群の間に存在する可能性のある遺伝子多型の検出を試みた。

ミトコンドリア上に存在する *ND1*、*ND4*、およびミトコンドリア遺伝子発現量の調節に機能するとされる D-loop 領域の遺伝子配列を比較したところ、*ND1* で 20 か所、*ND4* で 16 か所、D-loop 領域で 24 か所の遺伝子多型が検出された（表 4-5、4-6、4-7）。*ND1* では特に 14 か所において高増体能力個体群で特徴的な遺伝子多型が検出された。20 か所の遺伝子多型は解析した 6 個体では 4 種類のハプロタイプとして検出された。*ND4* においても特に 14 か所において高増体能力個体群で特徴的な遺伝子多型が検出された。16 か所の遺伝子多型は解析した 6 個体では 2 種類のハプロタイプとして検出された。また、D-loop 領域では特に 17 か所において高増体能力個体群で特徴的な遺伝子多型が検出された。24 か所の遺伝子多型は解析した 6 個体では 4 種類のハプロタイプとして検出された。

ゲノム領域中に存在する *TTN* 遺伝子では転写開始点を +1 とした場合に、プロモーター領域にあたる -2243 の 1 ヶ所遺伝子多型が検出された（表 4-8）。高増体能力個体群の 1 頭と低増体能力個体群の 2 頭が *TT* ホモ型であり、他は *AT* ヘテロ型であった。*EEF1A2* 遺伝子では転写開始点上流の 4 か所（-2169、-2613、-2780、-3003）で遺伝子多型が検出された。2 種類のハプロタイプが



存在すると考えられ、高増体能力個体群は3頭すべてが一方のハプロタイプホモ型であった（表 4-8）。低増体能力個体群は両方のハプロタイプホモ型が1頭ずつ、ハプロタイプヘテロ型が1頭という内訳であった。*TSG101* 遺伝子では転写開始点上流の+153 の1ヶ所に遺伝子多型が検出された。高増体能力個体群は3頭すべてが *TT* ホモ型、低増体能力個体群は3頭すべてが *AA* ホモ型であった（表 4-8）。

## 考察

### サブトラクションおよびディファレンシャルスクリーニング

増体に関連する形質の育種価が大きく異なるランドレース種集団の仔豚より胸最長筋を採取し、RNAを抽出してサブトラクション法、ディファレンシャルスクリーニングのプロープとして用いた。今回用いた個体は離乳直後の仔豚であり、筋中では活発な筋肉組織の合成が行われていると考えられる。そのように筋組織形成の盛んな時期の遺伝子発現量を比較することで、筋組織発達の初期で機能し、増体への効果の大きい位置的・機能的遺伝子候補をスクリーニングできる可能性が高いと考えた。

ディファレンシャルスクリーニングではまず 14 クローンにおいてフォワードサブトラクション産物で高いシグナル強度が検出された。さらに非サブトラクションプロープによるハイブリダイゼーションでも高増体能力群で強いシグナルが検出された 8 クローンが低増体能力個体群よりも高増体能力個体群で高く発現している可能性が高いと考え、シーケンスして遺伝子同定と *in silico* 解析を行った。残りの非サブトラクションプロープで差の見られなかった 6 コロニーについては、2つの可能性が考えられる。1つ目はこれら 6 コロニーが発現量に差がない遺伝子に相当するインサートをもつ可能性である。2つ目は、高増体能力個体群で高く発現している遺伝子をインサートに持つが、胸最長筋組織において発現量が低く、非サブトラクション産物を用いたプロープではメジャー遺伝子のプロープに阻害され、差が検出できなかった可能性である。後者の場合、増体能力によって遺伝子発現量に差があることになる。また、筋組織形成の上流を支配する遺伝子の場合、組織中の発現量が少ないことも十分に考えられる。以上のことから非サブトラクション

プローブで差の見られなかった 6 コロニーについてもシーケンスによる遺伝子同定を試みた。

#### シーケンス解析およびホモロジー検索

14 クローンのシーケンスとデータベースによる遺伝子同定の結果、11 遺伝子のインサートが確認された。このうち高増体能力個体群で遺伝子発現が高くなっている可能性の強い 8 クローンは計 5 遺伝子 (*TTN*, *EEF1A2*, *TSG101*, *ND1* および *ND4*) のインサートであることが明らかとなった。それぞれの遺伝子の機能注釈情報から、これらの遺伝子のいずれにおいても発現増加によって筋肉組織の形成を亢進できる可能性があり、結果として増体の向上につながると考えられる。実際に、非サブトラクションプローブによる発現プロファイリングにおいてもこれらの遺伝子は低増体能力個体群と比べて高増体能力個体群で高く発現していたことから、これら 5 つの遺伝子は、増体形質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。

さらに、*TTN*は 15 番染色体、*EEF1A2*は 9 番染色体、*TSG101*は 2 番染色体に位置しており、すべて増体に関与する形質の QTL として報告のある位置に座上している。また、ミトコンドリア上に座上する *ND1* と *ND4* についても細胞質遺伝効果を通じて増体に関与する可能性が考えられ、本研究において同定された 5 遺伝子はすべて増体能力との関連性が報告されるゲノム領域上に座上することが明らかとなった。

以上のように高増体能力個体群で高発現している可能性の高いクローン 8 つのシーケンスによって 5 遺伝子を同定し、それらの機能注釈情報による遺伝子機能の推定と染色体位置情報と QTL 情報の比較から、5 遺伝子が増体に関連する可能性の高い位置的機能的遺伝子であることを明らかにした。

#### 位置的機能的遺伝子の一塩基多型検出

同定した位置的機能的遺伝子の発現量に関連する遺伝子多型を特定するため、ゲノム上に座する遺伝子についてはプロモーターから第一エクソンにかけて、ミトコンドリア上に座する遺伝子については遺伝子全長と、ミトコンドリア遺伝子の発現を制御する D-Loop 領域について遺伝子配列をシーケンスし、ディファレンシャルスクリーニングに用いた高増体能力個体群と低増体能力個体群の間に存在する遺伝子多型を探索した。ミトコンドリア上に位置する *ND1*、*ND4*、および D-Loop 領域では合計 6 個体の間に複数のハプロタイプが検出された。さらに、高増体能力個体群に特有のハプロタイプも観察された。*in silico* 解析から、*ND1*、*ND4* は ATP 合成に関与すると推定されるが、これらのハプロタイプが遺伝子の発現量や安定性に関与している可能性も考えられる。また、*TTN* は転写開始点上流のプロモーター領域において遺伝子多型が検出された。高増体能力個体群の 2 頭は該当する多型がヘテロ型であり、転写制御に重要な役割を果たすプロモーターの遺伝子多型が *TTN* 遺伝子の発現量に変化を及ぼし、筋節の維持に働くと推定される *TTN* 遺伝子の機能に影響を及ぼしているのかもしれない。*EEF1A2* 遺伝子もプロモーター領域に複数の遺伝子多型が検出され、2 種類のハプロタイプを持つと考えられた。高増体能力個体群はすべて一方のハプロタイプのホモ型であったことから、ハプロタイプの違いが本遺伝子の発現量に影響を及ぼしている可能性がある。さらに、*TSG101* 遺伝子も前述の 2 遺伝子と同様にプロモーター領域に遺伝子多型が検出され、高増体能力個体群と低増体能力個体群で明確に遺伝子多型のアリルが分かれていた。細胞増殖に関与するとされる *TSG101* の遺伝子発現量は筋肉細胞の形成、増殖と関連する可能性があり、

プロモーター領域の遺伝子多型が本遺伝子の発現量に関与することで増体重への影響を及ぼしているのかもしれない。

しかしながら今回の位置的機能的遺伝子候補はそれぞれの遺伝子多型を特定するに至ったものの、その遺伝子多型、ハプロタイプが増体重と関連するかについて相関解析を実施するには至らなかった。この検証を実施しなければ今回検出した遺伝子内の遺伝子多型をブタの増体重に関連する遺伝子多型として確定させることは困難である。そのため、今後はより多くのブタランドレース集団における遺伝子型の調査と増体重関連形質との相関解析がなされていくことが期待される。

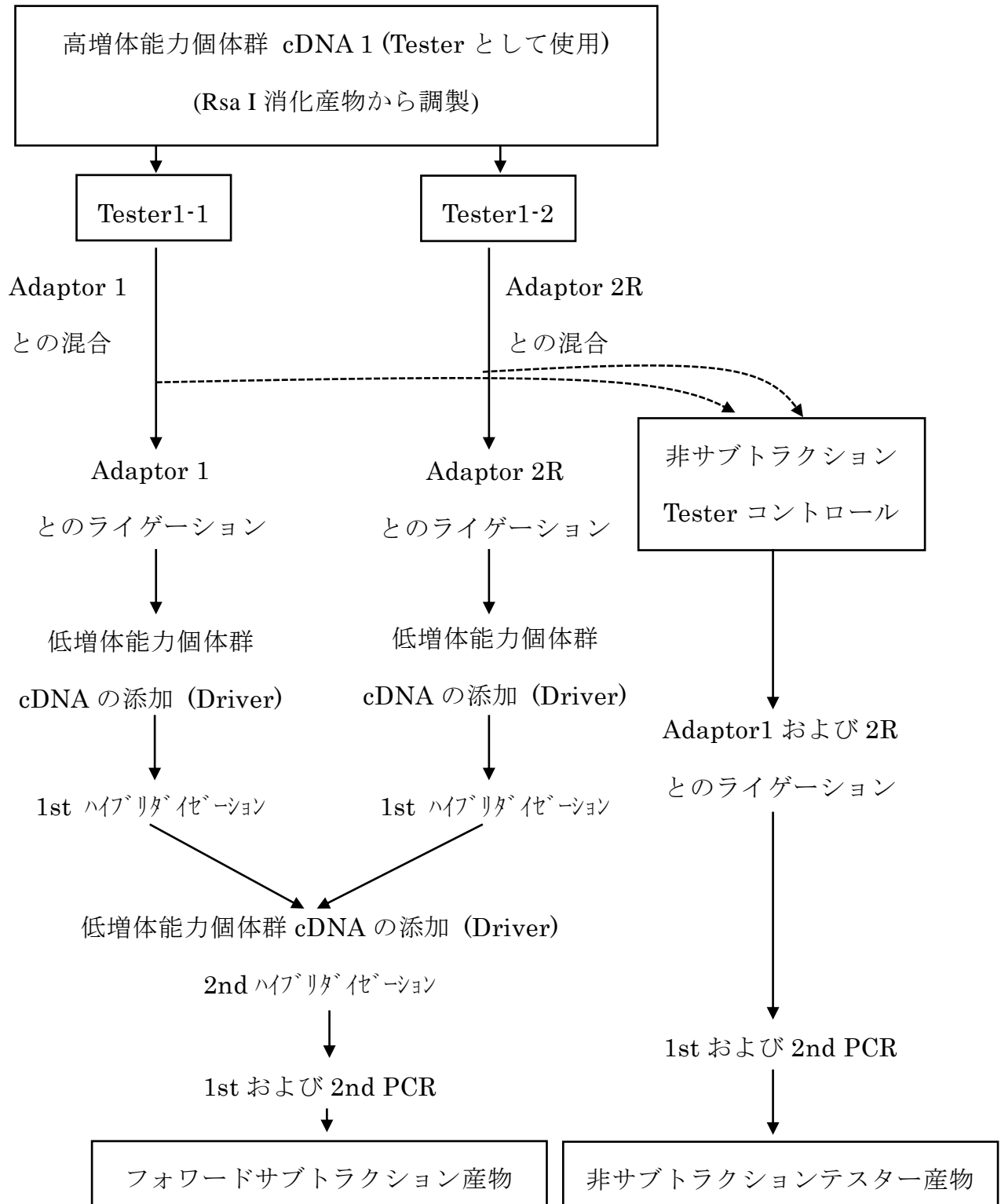
本章の研究では、ブタランドレース種内における増体重の遺伝的能力が異なる個体を対象にサブトラクション法、コロニーハイブリダイゼーションによるディファレンシャルスクリーニングによる遺伝子発現プロファイリングを行うことで、増体重に関連する可能性のある遺伝子を同定することに成功した。また、同定した位置的機能的遺伝子候補ゲノム配列の比較と *in silico* 解析から、高増体能力個体群と低増体能力個体群間でアレル、もしくはハプロタイプが偏りを持って存在する各位置的機能的遺伝子候補の遺伝子多型を発見するに至った。これらのことから黒毛和種の霜降りに関連する遺伝子の探索で用いた、形質間差の大きい個体による遺伝子発現プロファイリングによる形質関連遺伝子の同定法は黒毛和種以外の種や形質においても関連遺伝子を探索する有効な手法であることが明らかとなった。

表 4-1 試験に用いたランドレース種個体の推定育種価

グループ	個体番号	100kg 到達日 齢育種価
高増体能力個体群	B1	-3.030
	B2	-3.496
	B3	-6.498
.....		
低増体能力個体群	S1	4.100
	S2	5.913
	S3	2.706

図 4-1 サブトラクション法の概略

4-1-1 フォワードサブトラクション



#### 4-1-2 リバースサブトラクション

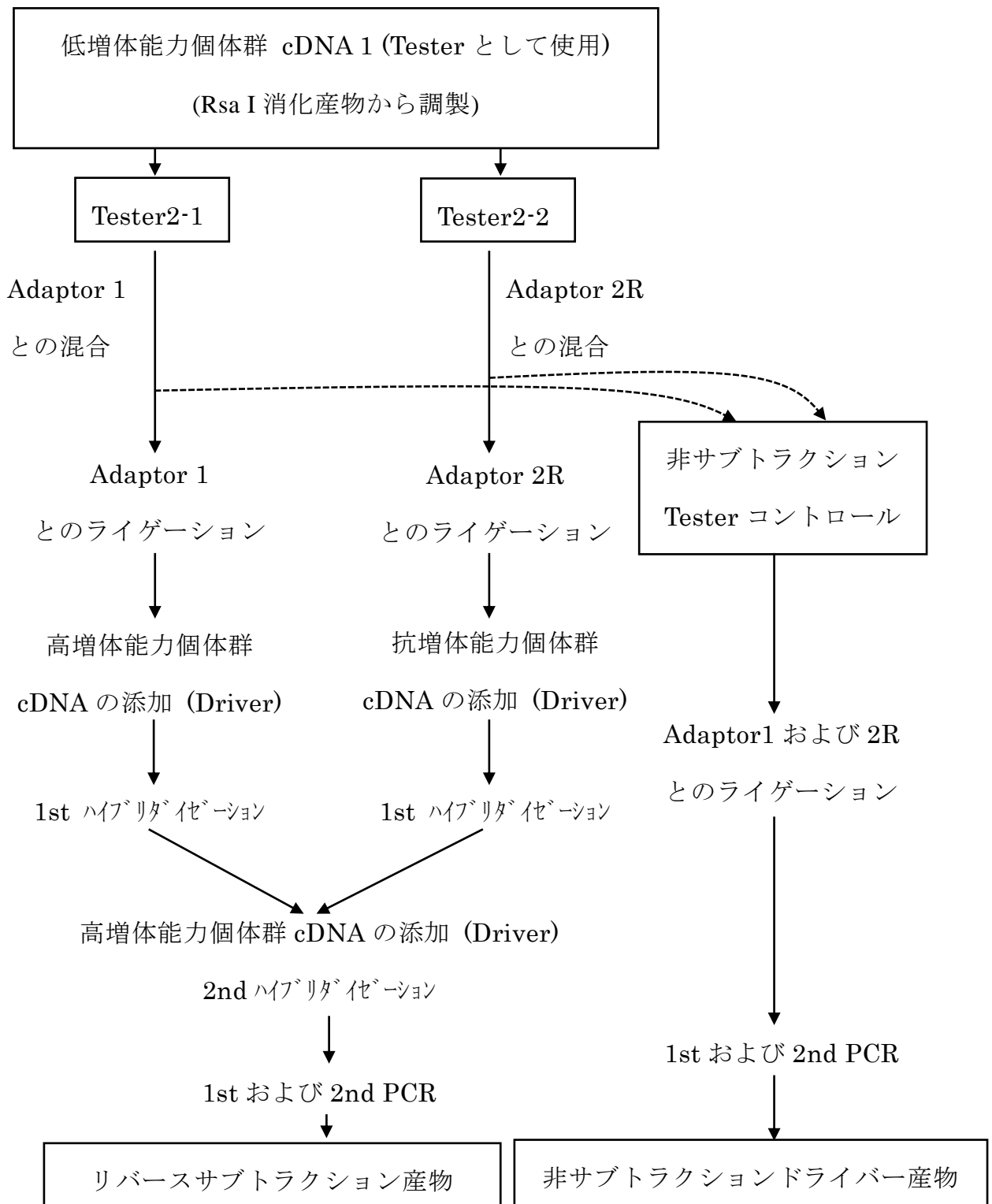




表 4-2 シーケンスに使用したプライマー配列

増幅領域 (長さ)	プライマー	塩基配列	位置 <sup>†</sup>
<i>ND1</i> (1425bp)	ND1-F	CCCAGTACGAAAGGACAAGAGAAA	-194~-171
	ND1-R	TATGGCTAGGGGTCAGGATGTAAA	549~526
	ND1-1F	CATATACTCTATCAACCCTAATCACAACAC	476~505
	ND1-1R	GATTATTACTAGTATGGTTCCGGACATTAC	1231~1202
<i>ND4</i> (1874bp)	ND4-1F	AAAAGGCCTAGAATGAGCAGAATA	-383~-360
	ND4-1R	TCGGAGAAGAATGTTAAGGAAAAA	176~153
	ND4-F	CCTTAACATTCTTCTCCGACTCACTATCA	158~186
	ND4-R	GATTATGGTTCGGCTGTGTACTCGTT	1029~1004
	ND4-2F	AGCTCTATCTGCTTACGTCAAACCGACCTA	817~846
	ND4-2R	TTTAAGTGTGGAAGCATGAGTTAGCAGTTC	1491~1461
D-Loop 領 域 (1173bp)	DLOOP1-F	CGCCATCAGCACCCAAAGCT	16569~16588
	DLOOP1-R	TGGGCGATTTTAGGTGAGATGGT	465~443
	DLOOP2-F	CCGTGGGGGTTTCTATTGA	390~408
	DLOOP2-R	ATTTTGGGAGGTTATTGTGTTGTA	1128~1105
<i>TTN</i> (3155bp)	TTN-1F	GTACACAAGCACATTTCAAATAGCC	-1549~-1525
	TTN-1R	GCTCACCTGATTTCTCAAGAGTG	149~127
	TTN-2F	GTTGTTGGGGTCAGCGTGTT	-3006~-2987
	TTN-2R	CACTTTTCCCGCTATAGACTCTACC	-1339~-1363
<i>TTN</i>	TTN-1R1	GCTCATTTATACTCTCTGGGTTCTC	-568~-592

第4章 遺伝子プロファイリング手法の  
ブタランドレース種増体重に関連する遺伝子マーカー開発への応用

シーケンス用	TTN-2R1	TGCAGCATTGTCGAGTCTTGT	-1889~-1909
<hr/>			
	EEF1A2-2F	AGGCCAAAATGAGAGGGTACCA	-3132~-3111
<i>EEF1A2</i>	EEF1A2-2R	ATTCCACCTTTGCCCCCTCAA	-1377~-1397
(1756bp)	EEF1A2-2F	AGGCCAAAATGAGAGGGTACCA	-3132~-3111
	EEF1A2-2R	ATTCCACCTTTGCCCCCTCAA	-1377~-1397
<hr/>			
<i>EEF1A2</i>	EEF1A2-2R1	CAAGCTATGTCTGTGACCTACACC	-2050~-2073
シーケンス用			
<hr/>			
<i>TSG101</i>	TSG101-1F1	GGCCAAAATTAACCTACTTCTTCCCTCTCT	-758~-729
(813bp)	TSG101-1R1	GGTATCCGGATGGGTACGCTGAA	55~33

† NCBI Nucleotide データベースの情報を参照し、*ND1*、*ND4* はコード領域開始点を、D-Loop 領域は領域開始点を、ゲノム遺伝子は第 1 エキソン領域の転写開始位置を+1 としてプライマーの位置を示した。

図 4-2 *Rsa* I 消化効率の確認

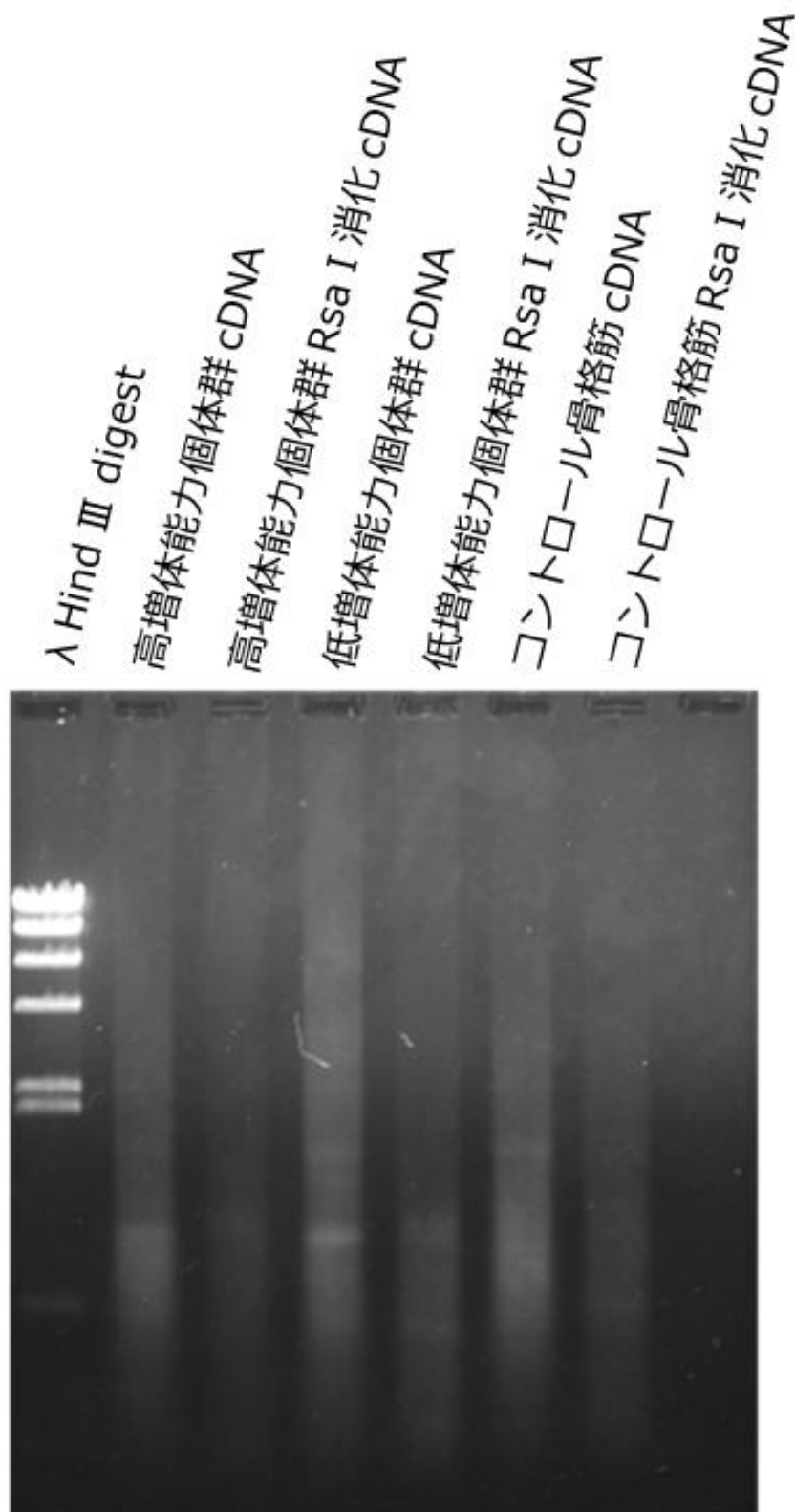


図 4-3 サブトラクション PCR 増幅産物の分析

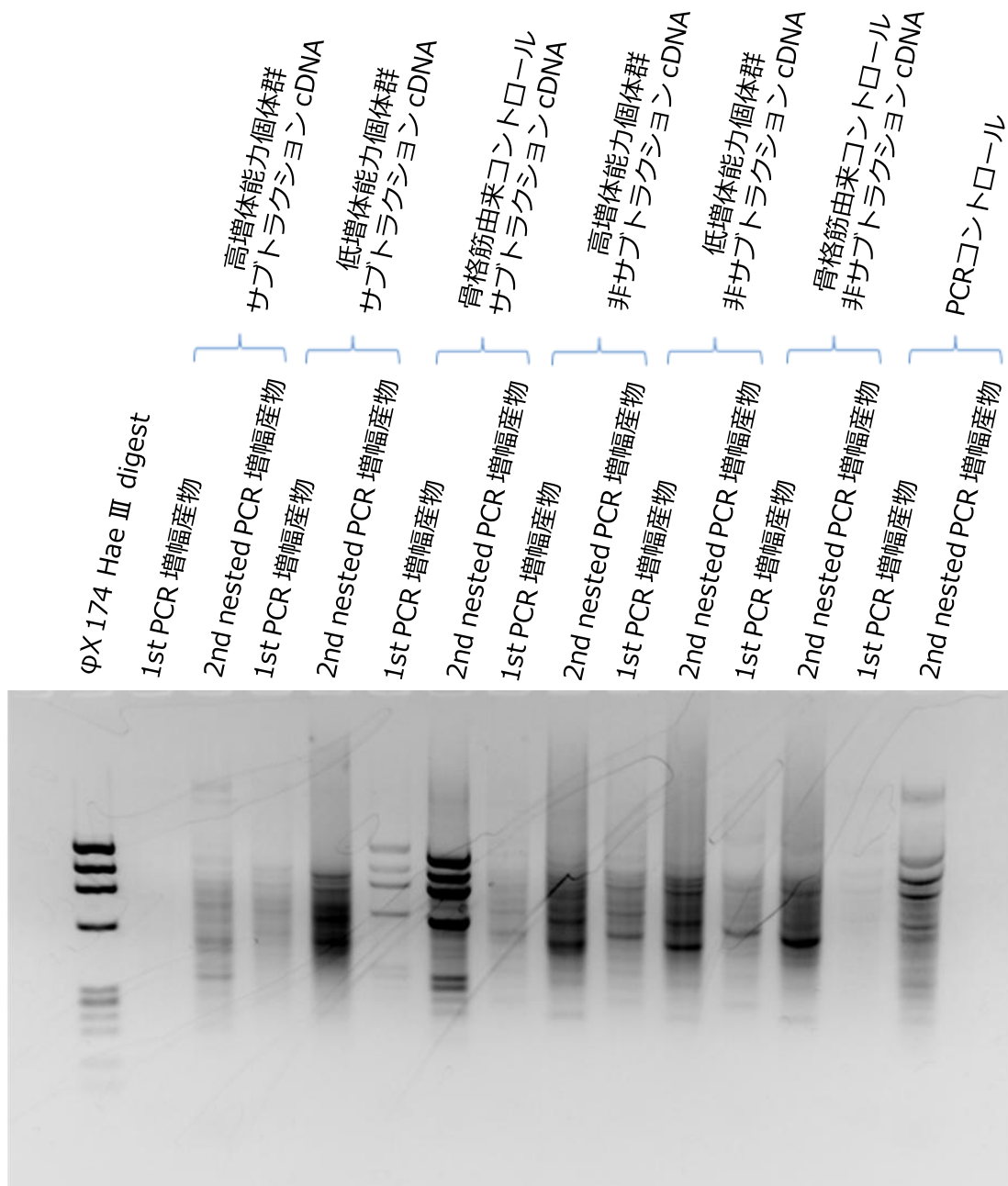
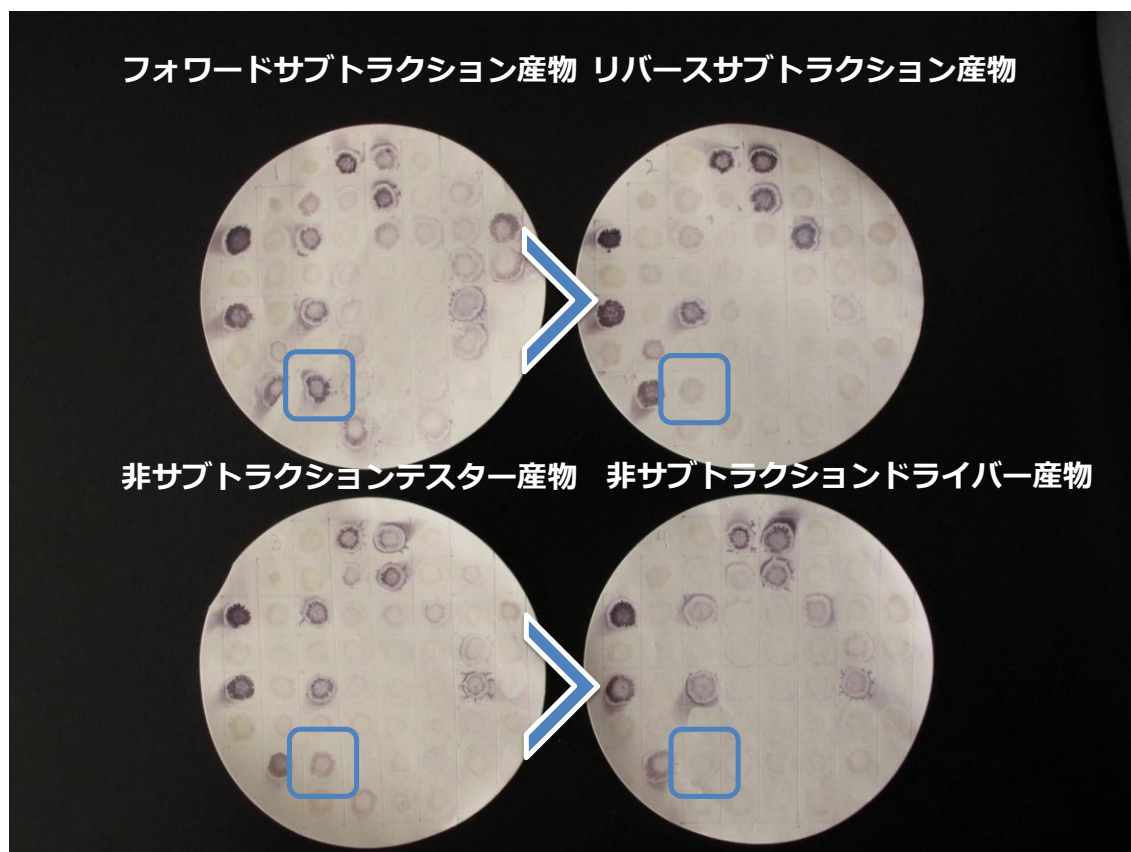


図 4-4 ディファレンシャルスクリーニング

4-4-1 コロニーハイブリダイゼーション



4-4-2 プレート上のコロニー位置

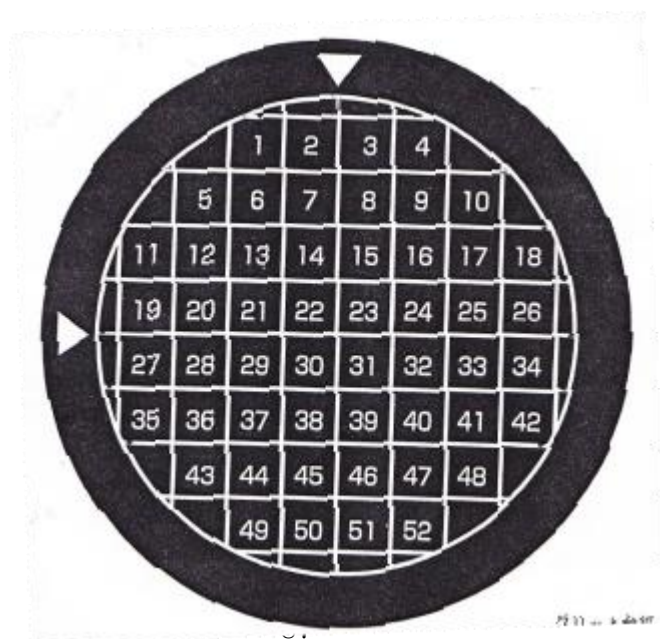


表 4-3 ディファレンシャルスクリーニングで高増体能力群で発現の高かったクローン

クローン	プローブ			
	フォワード	リバース	非サブトラクション	非サブトラクション
	サブトラクション産物	サブトラクション産物	テスト産物	ドライバ産物
1	+	-	-	-
2	+	-	-	-
3	+	-	+	-
4	+	-	+	-
5	+	-	+	-
6	+	-	+	-
7	+	-	-	-
8	+	-	+	-
9	+	-	-	-
10	+	-	-	-
11	+	-	+	-
12	+	-	-	-
13	+	-	+	-
14	+	-	+	-

表 4-4 *in silico*解析による高増体能力個体群で発現の高いクローンの位置的  
機能的遺伝子の推定

4-4-1 クローンの相同性解析

クローン	Insert size	Against NCBI nr database		Against NCBI pig genome database	
		Gene name	E value	Gene name	E value
1	420	<i>TRIM44</i>	1e-70	LOC100524974	1e-49
2	222	<i>BTBD6</i>	3e-68	no similarity	
3	364	<i>EEF1A2</i>	e-137	LOC100514912	1e-63
4	100	<i>ND4</i>	5e-27	Mitochondria genome	6e-26
5	362	<i>ND1</i>	e-180	Mitochondria genome	3e-168
6	539	<i>TTN</i>	0	LOC100519519	0
7	285	<i>SF3B1</i>	e-134	SF3B1	6e-105
8	286	<i>EEF1A2</i>	e-120	LOC100514912	2e-65
9	408	<i>TBC1D10B</i>	0	LOC100515603	0
10	156	<i>GADL1</i>	4e-52	Chr13	2e-27

第4章 遺伝子プロファイリング手法の  
ブタランドレース種増体重に関連する遺伝子マーカー開発への応用

11	513	<i>ND1</i>	0	Mitochondria genome	0
12	268	<i>CRELD1</i>	e-127	LOC100152256	7e-119
13	361	<i>ND1</i>	0	Mitochondria genome	7e-170
14	241	<i>TSG101</i>	e-108	LOC100524788	14

4-4-2 位置的機能的遺伝子候補の *in silico* 解析

Expression profiling				
Gene	This study (within Landrace breed) High vs.Low growth	Between breeds high vs. low growth	Function	QTL Location
<i>TTN</i>	○	○	○	○
<i>ND1,ND4</i>	○	○	○	- Cytoplasmic genetic effect
<i>EEF1A2</i>	○	○	○	○
<i>TSG101</i>	○	-	○	○



表 4-5 *ND1* で検出された遺伝子多型

個体 No.	遺伝子多型位置 <sup>†</sup>																			
	1	3	8	1	1	1	2	3	3	4	4	4	4	5	5	7	7	7	8	9
				3	6	9	3	4	6	2	3	5	8	2	9	1	3	5	4	3
	5	0	1	2	6	1	3	2	9	0	8	9	9	8	4	7	7	4	6	9
B1	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>G</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>T</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>C</i>
B2	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>G</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>T</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>C</i>
B3	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>A</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>G</i>	<i>G</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>T</i>
S1	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>A</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>G</i>	<i>G</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>T</i>
S2	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>A</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>G</i>	<i>G</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>T</i>
S3	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>A</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>G</i>	<i>G</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>T</i>

<sup>†</sup>コード領域の開始点を 1 とする。

各個体の色は推定されるハプロタイプを示す。

表 4-6 *ND4* で検出された遺伝子多型

個体 No.	遺伝子多型位置 <sup>†</sup>															
	2	3	3	5	6	6	8	8	9	9	1	1	1	1	1	1
	4	4	9	0	2	7	0	6	1	3	0	0	1	2	2	2
	6	9	3	7	7	2	4	1	8	3	3	8	4	1	3	8
B1	<i>T</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>G</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>G</i>	<i>G</i>	<i>G</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>C</i>
B2	<i>T</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>G</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>G</i>	<i>G</i>	<i>G</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>C</i>
B3	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>A</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>C</i>	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>C</i>
S1	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>A</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>C</i>	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>C</i>
S2	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>A</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>C</i>	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>C</i>
S3	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>A</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>C</i>	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>C</i>

<sup>†</sup>コード領域の開始点を 1 とする。

各個体の色は推定されるハプロタイプを示す。

表 4-7 D-Loop 領域で検出された遺伝子多型

		遺伝子多型位置 <sup>†</sup>																							
個体 No.	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	4	4	5	6	7	7	8	1	
	0	2	3	3	4	5	5	8	4	7	8	9	0	2	5	9	0	5	7	9	0	0	4	0	
	9	4	1	6	5	3	8	1	1	9	8	4	6	3	9	0	5	2	5	2	4	6	6	5	
																									7
B1	T	T	G	C	C	C	A	C	T	T	G	A	C	C	G	C	T	C	A	A	A	A	G	C	
B2	T	T	G	C	C	C	A	C	T	T	G	A	C	C	G	C	T	C	A	A	A	A	G	C	
B3	C	A	A	/	T	T	G	C	C	C	A	G	T	T	G	T	C	T	G	A	G	G	A	C	
S1	C	A	A	/	T	T	G	C	C	T	A	G	T	T	A	T	T	C	G	G	G	G	A	C	
S2	C	A	A	/	T	T	G	C	C	T	A	G	T	T	A	T	T	C	G	G	G	G	A	C	
S3	C	A	A	/	T	T	G	C	C	T	A	G	T	T	G	T	T	C	G	A	G	G	A	C	

<sup>†</sup>D-Loop 領域の開始点を 1 とする。

各個体の色は推定されるハプロタイプを示し、/ は塩基の欠失を示す。

表 4-8 ゲノム領域の 3 遺伝子の遺伝子多型 (*TTN*, *EEF1A2*, *TSG101*)

個体 No.	遺伝子多型位置 <sup>†</sup>					<i>TSG101</i>
	<i>TTN</i>	<i>EEF1A2</i>				
	-2243	-2169	-2613	-2780	-3003	153
B1	<i>AT</i>	<i>AA</i>	<i>GG</i>	<i>GG</i>	<i>TT</i>	<i>TT</i>
B2	<i>AT</i>	<i>AA</i>	<i>GG</i>	<i>GG</i>	<i>TT</i>	<i>TT</i>
B3	<i>TT</i>	<i>AA</i>	<i>GG</i>	<i>GG</i>	<i>TT</i>	<i>TT</i>
S1	<i>TT</i>	<i>GG</i>	<i>AA</i>	<i>TT</i>	<i>CC</i>	<i>AA</i>
S2	<i>AT</i>	<i>AG</i>	<i>AG</i>	<i>TG</i>	<i>TC</i>	<i>AA</i>
S3	<i>TT</i>	<i>AA</i>	<i>GG</i>	<i>GG</i>	<i>TT</i>	<i>AA</i>

<sup>†</sup>それぞれの遺伝子の第 1 エキソン転写開始点を 1 とする。

文字色は各ゲノム位置の遺伝子型を示す（赤、青：アレルホモ型、緑：アレルヘテロ型）

## 要約

2章、3章において我々は黒毛和種集団の脂肪交雑形質を標的とした、遺伝子プロファイリングに基づくマーカーアシスト選抜のための遺伝子マーカー開発手法が有効であることを示した。この遺伝子プロファイリングは形質差の大きい個体同士の遺伝子発現量を比較することで対象形質に関連する遺伝子多型をスクリーニングする手法であり、黒毛和種に限らず他の育種改良が望まれる畜種、形質に適用可能であると考えられる。そこで本章では牛と並んで重要な畜種であるブタを対象とし、ランドレース種の増体重を標的とした遺伝子プロファイリングを実施することで本手法の広汎な家畜への適用性を証明するとともに、新たなブタ増体重の遺伝子マーカー開発を試みた。

増体重の指標となる 100kg 到達予測日齢の推定育種価が大きく異なる 6 頭の離乳仔豚の胸最長筋を供試材料とし、サブトラクション法によるディフアレンシャルスクリーニングによって育種価の大小と発現が連動する 14 クローンをスクリーニングした。さらに高増体能力個体群において発現量が著しく高いと考えられた 8 クローンについて *in silico* 分析を行い、位置的機能的遺伝子候補となりうるかどうかを検証した。その結果、8 クローンがコードしていると予測された 5 遺伝子 (*TTN*、*EEF1A2*、*TSG101*、*ND1* および *ND4*) は過去の QTL 情報やブタ品種間の比較情報、遺伝子機能の予測などから増体に関連する可能性が高いことが示唆された。そこでミトコンドリアゲノム上に座する ND1 および ND4 は遺伝子全長とミトコンドリア遺伝子の発現を制御するとされる D-loop 領域、核ゲノム上に座する他の遺伝子はプロモーター領域の遺伝子配列をそれぞれ決定し、増体能力と相関する一塩基多型の有無を検索した。各遺伝子の配列決定部位にはそれぞれ増体能力の高低によ

って異なる一塩基多型が存在しており、遺伝子選抜マーカーとなりうることが示唆された。

本章における研究により、遺伝子プロファイリングに基づく遺伝子マーカー開発手法がブタなど広汎な畜種において適用可能であることを明らかにするとともに、ブタランドレース種の増体重と関連する新たな位置的機能的遺伝子候補を同定し、その一塩基多型を明らかにした。

## 第 5 章

### 総括

近年の家畜育種は統計遺伝学的手法を基にした遺伝的能力の評価法を用いることで飛躍的な対象形質の向上を実現している。特に日本においては経済的な価値の高い黒毛和種の脂肪交雑形質の改良がこれまで精力的に実施されてきた。第1章ではこの統計遺伝学的手法による家畜改良の現状とその課題について論じている。これまでの手法により推定された育種価という遺伝的能力の評価指標では、数多くの遺伝子が関わる量的形質の総合的な評価となり、個々の遺伝子の効果を個別に評価、選抜することはできない。この課題を克服するため、対象形質と関連する遺伝子と遺伝子多型を特定し、選抜に用いる遺伝子マーカーの開発がこれまでも盛んに報告されている。我々はこの遺伝子マーカー開発にあたり、遺伝子プロファイリングに基づく手法を着想し、黒毛和種の脂肪交雑形質を標的として、脂肪交雑と関連する複数の遺伝子多型を同定するに至っている。しかしながらこれらの同定した遺伝子多型を遺伝子マーカーとして確立するにはいくつかの検討すべき課題が存在している。そこで第2章では同定した遺伝子多型の一つである *c-312A>G* が遺伝的背景の多様な黒毛和種集団において適用可能かどうか、また脂肪交雑以外の経済形質への影響の有無について検討した。その結果、*c-312A>G* は遺伝的背景が多様な商用黒毛和種集団においても脂肪交雑形質に有意な相関があることを確認し、他の経済形質への悪影響がないことを明らかにした。これによって *c-312A>G* がマーカーアシスト選抜における遺伝子マーカーとして有用であることが明らかとなった。

さらに3章では同様に同定した3つの遺伝子多型 (*g.1471620G>T*、*c\*188G>A*、*g.3129537C>T*) について、選抜マーカーとして用いる場合に互いの遺伝子多型の相互作用が脂肪交雑形質に与える影響について検証を実施した。その結果、遺伝子多型間の有意な相互作用効果を検出し、マーカーア



シスト選抜において複数の遺伝子マーカーを用いる場合の相互作用効果の検討の重要性を明らかにした。これら 2 章、3 章の研究を通して、遺伝子プロファイリング法に基づいて開発した遺伝子多型のマーカーアシスト選抜における遺伝子マーカーとしての有用性と効果的な運用方法について明らかにし、本手法による黒毛和種牛の脂肪交雑遺伝子マーカー開発の有効性を確認した。

ここまで黒毛和種牛の脂肪交雑形質を標的とした遺伝子プロファイリング法の有効性を論じてきたが、一方で本手法が他の畜種、形質を標的にした場合に有効な遺伝子マーカー開発手法であるかどうかについては検証が不十分であった。そこで 4 章では本手法をブタランドレース種の増体能力に対して適用することで、遺伝子プロファイリング手法に基づく遺伝子マーカー開発が様々な畜種と形質においても有効な方法であることを確認するとともに、ブタ増体能力に対する新規な遺伝子マーカーの開発を試みた。増体能力が異なる個体間の遺伝子プロファイリングとしてサブトラクション法によるディファレンシャルスクリーニングを採用し、増体能力の異なる個体群間で発現量の異なる遺伝子クローンを得るとともに、その遺伝子についての *in silico* 分析による機能情報、過去の QTL 分析情報を合わせ、増体との関連が強く示唆される 5 つの遺伝子のスクリーニングに成功した。さらに 5 遺伝子の発現を制御すると予測されるプロモーター部位を中心にシーケンス分析を実施し、増体能力の異なる個体群間で偏りのある遺伝子多型を特定した。

上記 1 章から 4 章までの研究を通じて、家畜育種において選抜をさらに効率的に実施することを可能にするマーカーアシスト選抜に必要な遺伝子マーカーの開発手法としての遺伝子プロファイリング手法の有効性と、開発した遺伝子マーカーの効果を明らかにした。これらの研究成果は実際に本手法によって開発された遺伝子マーカーが家畜育種へ活用されることによって、家

畜の遺伝的能力のさらなる発展とそれに伴う畜産の効率化、高付加価値化への寄与が期待される。

## 参考文献

Barendse *et al.*, 1994. A genetic linkage map of the Bovine genome. *Nat Genet*, 6: 227-235.

Bishop *et al.*, 1994. A genetic linkage map for cattle. *Genetics*, 136: 619-639.

Boldman K. G. *et al.*, 1995. A Manual for Use of MTDFREML, A Set of Programs to Obtain Estimates of Variances and Covariances. Washinton, DC: Agricultural Research Servise, United States Department of Agriculture, USA.

Boylston T. D. *et al.*, 1995. Lipid content and composition of Wagyu and domestic breeds of beef. *J Agri Food Chem*, 43: 1202-1207.

Busboom J. R. *et al.*, 1993. Effects of biological source on cooking and palatability attributes of beef produced for the Japanese market. *Meat Sci*, 35: 241-258.

Charlier C. *et al.*, 1996. Microsatellite mapping of the bovine roan locus: a major determinant of White Heifer disease. *Mamm Genome*, 7: 138-142.

Davoli R. *et al.*, 2007. Molecular approaches in pig breeding to improve meat quality. *Brief Funct Gen Pro*, 6: 313-321.

Davoli R. *et al.*, 2011 Expression profiling of functional genes in prenatal skeletal muscle tissue in Duroc and Pietrain pigs. *J Anim Breed Genet*, 128: 15-27.

Fernandez A. I. *et al.*, 2008. Mitochondrial genome polymorphisms associated with longissimus muscle composition in Iberian pigs. *J Anim Sci*, 86: 1283-1290

Frankel W. N. *et al.*, 1996. Who's afraid of epistasis? *Nat Genet*, 14: 371-373.

Goto A. *et al.*, 2008. Akirins, highly conserved nuclear proteins, required for NF- $\kappa$ B dependent gene expression in *Drosophila* and mice. *Nature Immun*, 9: 97-104.

Haley C. S. *et al.*, 1994. Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. *Genetics*, 136: 1195-1207.

Henderson C. R. 1973. Sire evaluation and genetic trends. In: *Proceedings of the Animal Breeding and Genetics Symposium in Honor of Dr. Lush. JL*, pp 10-41, American Society of Animal Science and American Dairy Science Association, Champaign, Illinois. USA.

Hirano T. *et al.*, 2000. Null mutation of PCLN-1/Claudin-16 results in bovine chronic interstitial nephritis. *Genome Res*, 10: 659-663.

Hu Z. L. *et al.*, 2005. A QTL resource and comparison tool for pigs: Pig QTLDB. *Mamm Genome*, 16: 792-800

Hu Z. L. *et al.*, 2007. Animal QTLdb: beyond a repository. A public platform for QTL comparisons and integration with diverse types of structural genomic information. *Mamm Genome*, 18: 1-4.

Hu Z. L. *et al.*, 2010. Invited Lecture with full paper published electronically on The 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Leipzig Germany, 1-6

Janzen M. A. *et al.*, 2000. ARPP-16 mRNA is up-regulated in the longissimus muscle of pigs possessing an elevated growth rate. *J Anim Sci*, 78: 1475-1484.

Japan Meat Grading Association (JMGA) 1988. New Beef Grading Standards Tokyo Japan: Japan Meat Grading Association.

Jiang *et al.*, 2005. Significant associations of the mitochondrial transcription factor A promoter polymorphisms with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F2 crosses. *Biochem Biophys*

Res Commun, 334: 516-523.

Kappes S. M. *et al.*, 1997. A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Res*, 7: 235-249.

Kennes Y. M. *et al.*, 2001. Characterization of swine leptin (LEP) polymorphisms and their association with production traits. *Anim Genet*, 32: 215-218.

Krempler A. *et al.*, 2002. Targeted deletion of the Tsg101 gene results in cell cycle arrest at G1/S and p53-independent cell death. *J Biol Chem*, 8: 43216-43223

Kusuda J. *et al.*, 1999. Genomic structure and chromosome location of RPL27A/Rpl27a, the genes encoding human and mouse ribosomal protein L27A. *Cytogenetics and cell genetics*, 85: 248-251.

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.

Liu F. *et al.*, 2010 TSG101, identified by screening a cancer cDNA library and soft agar assay, promotes cell proliferation in human lung cancer. *Mol Biol Rep*, 37: 2829-2838.

Lin C. S. *et al.*, 2005 Differentially transcribed genes in skeletal muscle of Duroc and Taoyuan pigs. J Anim Sci, 83:2075-2086.

Macqueen D. J. *et al.*, 2009. Evolution of the multifaceted eukaryotic akirin gene family. BMC Evol Biol, 9: 34.

Matsuhashi T. *et al.*, 2011. Effects of bovine fatty acid synthase, stearoyl-coenzyme A desaturase, sterol regulatory element-binding protein 1, and growth hormone gene polymorphisms on fatty acid composition and carcass traits in Japanese Black cattle. J Anim Sci, 89: 12-22.

Matsuishi M. *et al.*, 2001. Wagyu beef aroma in Wagyu (Japanese Black cattle) beef preferred by the Japanese over imported beef. Anim Sci J, 72: 498-504.

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.

Murani E. *et al.*, 2006. Association of corticotropin-releasing hormone gene variation with performance and meat quality traits in commercial pig lines. Anim Genet, 37: 509-512



Nakajima I. *et al.*, 2002. Extracellular matrix development during differentiation into adipocytes with a unique increase in type V and VI collagen. *Biol Cell*, 94: 197-203.

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 *et al.*, 1998. Influence of vitamin A on the quality of beef from the Tajima strain of Japanese Black cattle. *Meat Sci*, 48: 159-167.

Pomp D. *et al.*, 2001. Applying functional genomics research to the study of pig reproduction. *Reprod Suppl*, 58: 277-292.

Rieseberg L.H. *et al.*, 1996. Role of gene interactions in hybrid speciation: evidence from ancient and experimental hybrids. *Science*, 272: 741-745.

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.*, 2006. Exploration of genes showing intramuscular fat deposition-associated expression changes in musculus longissimus muscle. *Anim Genet*, 37: 40-46.

Schork N. J. 1997. Genetically complex cardiovascular traits origins, problems, and potential solutions. *Hypertension*, 29: 145-149.

Serao N. V. *et al.*, 2011. Candidate gene expression and intramuscular fat content in pigs. *J Anim Breed Genet*, 128: 28-34.

Sukegawa S. *et al.*, 2007-2008. Polymorphisms for 7 expressed sequence tags showing Marbling-associated expression changes. *Res Comm in Mol Path and Pharm*, 120-121: 33-42.

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.

Tuggle C. K. *et al.*, 2007. Advances in swine transcriptomics. *J Biol Sci*, 9: 132-152.

Wimmers K. *et al.*, 2007. Associations of functional candidate genes derived from gene-expression profiles of prenatal porcine muscle tissue with meat quality and muscle deposition. *Anim Genet*, 38: 474-484

Wyszynska K. J. *et al.*, 2006. Polymorphisms in coding and regulatory regions of the porcine MYF6 and MYOG genes and expression of the MYF6

gene in mlongissimus dorsi versus productive traits in pigs. J Appl Genet, 47: 131-138.

Xu Z. Y. *et al.*, 2009. Genetic polymorphisms and preliminary association analysis with production traits of the porcine SLC27A4 gene. Mol Biol Rep, 36: 1427-1432.

Yamada T. *et al.*, 2007-2008. Polymorphisms in promoter regions of PDHB, SORBS1, and EDG1 genes showing marbling-associated expression changes. Res Comm in Mol Path and Pharm, 120-121: 105-115.

Yamada T. *et al.*, 2008. 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.*, 2009a. 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.*, 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. 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.

Zhao S. H. 2003. Complementary DNA macroarray analyses of differential gene expression in porcine fetal and postnatal muscle. *J Anim Sci*, 81: 2179-2188.

Zhi L. H. *et al.*, 2010. Invited Lecture with full paper published electronically on The 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Leipzig Germany, 1-6.

川田啓介 *et al.* 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. *日本畜産学会報* 74: 187-193.

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.

宮城県畜産試験場 2013. 黒毛和種 種雄牛案内. P9. 宮城県.

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.

## 英文要約

Research on development of gene markers associated with marbling and  
growth traits based on the gene expression profiling

Shin Sukegawa

Summary

The recent livestock breeding has improved target traits tremendously with the evaluation techniques of genetic capacity based on statistical genetic method. Especially the improvement of marbling trait in Japanese Black Cattle, which has great economic value in Japan, has been strenuously implemented. In chapter 1, the current status and problems of livestock breeding with the statistical genetic method were discussed. The classical method comprehensively evaluates a total sum of a lot of genes involved in quantitative traits, so that it cannot evaluate or select the effect of each gene.

The identification of genes and their polymorphisms associated with target traits and the development of the various genetic markers which are available for livestock selection have been reported to overcome this problem.

To develop the gene markers which can be used to improve beef marbling trait of Japanese Black cattle, we had the idea of utilization of the method based on gene expression profiling and achieved the identification of multiple gene polymorphisms associated with marbling. However there are several problems to be considered to establish these identified gene polymorphisms as gene markers. We therefore investigated in chapter 2

whether *c-312A>G*, an identified gene polymorphism, can be applied to the population of Japanese Black cattle with various genetic background and whether there is any influence on economic traits other than marbling or not. The results demonstrated that *c-312A>G* had significant association with marbling trait in the population of commercial Japanese Black cattle with various genetic background and clarified that there was no negative effect on other economic traits. That is, the usefulness of *c-312A>G* as a genetic marker for marker assist selection was revealed.

In chapter 3, the influence of interactions among gene polymorphisms useful as selection marker on marbling trait was examined for the three gene polymorphisms (*g.1471620G>T*, *c\*188G>A*, *g.3129537C>T*) which were identified in Japanese Black cattle. The result revealed the importance of detection and elucidation of significant interaction effects among the gene polymorphisms when plural gene markers were used in marker assist selection. Through chapter 2 and 3, we revealed the usefulness of the effective operation manner for target trait associated polymorphisms developed by the gene expression profiling method as genetic markers for marker assisted selection and verified the benefit of the development of marbling gene markers for Japanese Black Cattle with this method.

We discussed the effectivity of the gene expression profiling method using marbling trait of Japanese Black cattle as target trait so far, while at the same time, the effectivity of this method on other livestock or traits has not been verified sufficiently. In chapter 4, we adapted this method to

daily gain traits of landrace pig and tried to ascertain that this method was effective in various livestock and traits. We also tried to develop a new gene marker useful for daily gain traits in pig. We applied subtraction cloning and differential screening, as gene expression profiling method, to two pig groups with high and low genetic capacity of daily gain and identified several genes with differential gene expression among the two pig groups. With function annotation information of these genes gained by *in silico* analysis as well as past QTL analysis information, we successfully screened 5 genes possessing strong association with daily gain. Furthermore, we performed sequence analysis focusing on promotor region which was expected to control the gene expression of 5genes and identified the gene polymorphism with different allele frequency between the two pig groups with different daily gain genetic capacity.

Through the chapter 1 to 4, we revealed the usefulness of new method of gene expression profile for development of the gene markers required for efficient marker assist selection of livestock breeding and the effects, main and epistatic, of the developed gene markers on the target traits. These findings are expected to further enhance a variety of economical important genetic capacity of livestock and contribute to the corresponding efficient livestock breeding towards increase of economic value of livestock by utilizing the genetic marker developed with this method for livestock breeding as a practical matter.



## 謝辭

本研究の遂行にあたり、終始ご指導、ご助言を賜りました新潟大学 山田宜永教授に深く謝意を表します。また、本論文をご精読いただき有用なご指摘、ご助言を賜りました新潟大学 新村末雄教授、高田良三教授、中野優准教授、杉山稔恵准教授に深謝いたします。本研究の遂行にあたって多大なるご指導、ご協力を賜りました京都大学 佐々木義之名誉教授、京都大学 三宅武准教授、岡山大学 揖斐隆之准教授に深く感謝いたします。

また本研究の遂行に多大なるご支援をいただきました、小生の勤務先である日本ハム株式会社中央研究所の皆様にご心から感謝の意を表します。

最後に、本研究を温かく見守ってくれた両親、妻、息子にご心から感謝いたします。