

## 黒毛和種基幹種雄牛における脂肪交雑に関するQTL領域の検索

安部亜津子 渡邊敏夫<sup>1)</sup> 杉本喜憲<sup>1)</sup> 長谷川清寿 佐々木恵美 高仁敏光

**要約** 黒毛和種の肉質に関与する染色体領域を特定するために、県基幹種雄牛A (sireA) の父方半兄弟家系を用いて、脂肪交雑をターゲットとしたQTL解析を行った。全染色体を対象とした1次スクリーニングでは、脂肪交雑について上位と下位の個体を抽出して、selective genotypingによる解析を試みた。2次スクリーニングでは、1次スクリーニングで脂肪交雑との連鎖が検出された染色体を対象に、マーカー数を増やして詳細な解析を行った。

解析対象家系は、sireAの産子である去勢肥育牛527頭とした。1次スクリーニングには、解析対象家系のうち、BMS No.の上位(8～10)および下位(2～3)の個体を抽出した161頭を用い、常染色体上に227個のMSマーカーを配置してQTL解析を行った。その結果、Genome-wise 5%水準で有意な領域が3か所(BTA4： $p<0.05$ 、BTA9： $p<0.05$ 、BTA14： $p<0.001$ )検出された。

2次スクリーニングは、1次スクリーニングで有意な領域が検出された染色体のうち2本の染色体(BTA9、14)にMSマーカー28個、20個をそれぞれ配置し、527頭を用いて解析した。その結果、BTA9および14ともに有意な領域(Chromosome-wise  $p<0.001$ )が確認された。BTA9のQTL領域(67～83cM)で最も有意性が高かったのは80cMで、最大LOD scoreは9であった。BTA14(28～48cM)では、38cMが最も有意性が高く、最大LOD scoreは7.4であった。ハプロタイプ置換効果は、BMS No.でBTA9が0.8、BTA14が0.7であった。

QTL領域のsireA由来ハプロタイプが特定できた個体について、脂肪交雑にプラスの効果を持つハプロタイプをQ9、Q14、効果のないものをq9、q14として、BTA9および14のハプロタイプの組み合わせ(Q9Q14、Q9q14、q9Q14、q9q14)がBMS No.の平均値に及ぼす効果を検討した。その結果、BMS No.の平均値についてBTA9、14のハプロタイプの組み合わせによる差が認められた( $p<0.0001$ )。

**キーワード：**ウシ 黒毛和種 脂肪交雑 DNA Quantitative Trait Loci

近年の分子生物学の急速な発展にともない、家畜の育種改良を目的として、経済形質等に関与する遺伝子の単離が試みられている。このような遺伝子が特定され、遺伝子診断法が確立すれば、個体のDNAから育種改良に有用な遺伝子を保有しているかどうかを判定でき、優良個体を早期に、効率的に選抜することが可能になる。肉用牛においては、DNAマーカーと経済形質との連鎖解析によって、経済形質に関与する遺伝子が存在する染色体領域、すなわち、Quantitative Trait Loci (QTL) を同定する試みがなされている。特に、黒毛和種では、体重・枝肉重量<sup>10)</sup>や脂肪交雑<sup>5,7,10)</sup>に関与する遺伝子座が報告されている。

今回、県内で広く利用されている黒毛和種種雄牛A (sireA) を対象として、父方半兄弟家系を用いたQTLの検出を試みた。全染色体を対象とした1次スクリーニングでは、脂肪交雑に注目して、selective genotypingを行った。さらに、1次スクリーニング

で脂肪交雑との連鎖が検出された染色体について、マーカー数を増やして詳細な解析を行った(2次スクリーニング)。また、検出されたQTL領域について、sireAから受け継いだハプロタイプの種類とBMS No.との関連性を検討した。

### 材料および方法

#### 解析対象

解析対象家系は、sireAの産子である去勢肥育牛527頭とした。DNA材料は食肉処理場において採取した腎臓周囲脂肪とし、枝肉成績は(社)日本食肉格付協会による格付結果を用いた。1次スクリーニングには、解析対象家系のうち、BMS No.の上位(8～10)および下位(2～3)の個体を抽出した161頭を用い(selective genotyping)、2次スクリーニングには全ての個体(527頭)を用いた。

#### DNA型判定

脂肪組織からのゲノムDNA調製は、FastDNA Kit

(Q-Biosystems) を用いて行った。MS-DNAマーカーは、ウシ連鎖地図にマップされたマーカー<sup>4)</sup> から sireA でヘテロ接合型を示すマーカーを選定し、解析に用いた。MS-DNA領域の増幅は、10ng ゲノムDNA、1.67mM MgCl<sub>2</sub>、0.2mM each dNTPs、6.25pmol プライマーおよび0.375unit Taq DNA Polymerase (AnimalTaq、ABgene) を含む15μLの反応液で行った。PCR反応は、サーマルサイクラー GeneAmp9600 (Applied Biosystems) を用い、94℃で4分間の熱変性を行った後、94℃で30秒、55または60℃で30秒、72℃で30秒のサイクルを30サイクル、最後に72℃で5分間の伸長反応を行った。増幅産物はABI Prism™ 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems) で電気泳動後、GeneScan™ およびGenotyper™ 2.1 (Applied Biosystems) によって型判定を行った。

#### QTL解析

QTLの検出は、脂肪交雑を対象形質とし、解析プログラム Glissado (Glissado0.4.1 build43) によって行った。まず、マーカー型判定結果をもとに、染色体上の任意の点について、sireAのどちらの染色体を受継いだかを確率として推定した。そして、一方の染色体を受け継いだ場合ともう一方の染色体を受け継いだ場合とで表現型値に差があるかどうか、すなわち、QTLの有無を検定した。QTLの有無を検定するための統計量にはLODスコアを用いた。すなわち仮説「QTL効果≠0」と仮説「QTL効果=0」との尤度比の常用対数である。検定の有意水準の算出には10,000回のパーミュテーションテストをおこなった。

1次スクリーニングでは、常染色体上に227個のMSマーカーを配置し、インターバルは2cMとした。2次スクリーニングは、1次スクリーニングで有意な領域が検出された染色体のうち2本の染色体(BTA9および14)を対象として行った。MSマーカーは、BTA9に28個、BTA14に20個をそれぞれ配置し、1cMとして解析を行った。得られたQTL位置の信頼区間はLOD drop-off method<sup>11)</sup> によって推定した。

#### QTL領域のハプロタイプとBMS No.との関連性調査

解析に用いた個体のうち、QTL領域におけるsireA由来ハプロタイプが特定できた個体については、脂肪交雑にプラスの効果を持つハプロタイプをQ9、Q14、効果のないものをq9、q14として、ハプロタイプの組み合わせ(Q9Q14、Q9q14、q9Q14、q9q14)に基づいて分類した。BMS No.の平均値に及ぼすハプロタイプの効果は分散分析で検討した。

また、ハプロタイプの組み合わせによるBMS No.の平均値の比較には、t検定を用いた。

## 結 果

### 解析対象家系の表現型値

解析対象家系のBMS No.の分布は図1に示した。全個体(527頭)の平均値は5.51であり、標準偏差は1.89であった。このうち、BMS No.が8以上の個体は93頭(17.6%)、3以下は68頭(12.9%)であり、合計161頭(30.5%)を1次スクリーニングに用いた。抽出後の個体(161頭)のBMS No.の平均値は6.10で、標準偏差は2.86であった。

#### 1次スクリーニング

常染色体上に配置したマーカーの間隔は、平均13.6cM(最大38.6cM、最小0cM)であり、Information Content(IC)は平均0.72であった。Genome-wise 5%水準で有意な領域は3か所(BTA4:p<0.05、BTA9:p<0.05、BTA14:p<0.001)検出された(表1)。これらの領域のChromosome-wiseでの有意水準は、BTA4がp<0.05、BTA9がp<0.001、BTA14がp<0.001であった。

#### 2次スクリーニング

1次スクリーニングで有意であった染色体のうち、Chromosome-wise 0.1%水準で有意な領域が検出された2本の染色体(BTA9および14)を対象として2次スクリーニングを行った。各染色体に配置したマーカー間隔の平均は、BTA9が4.1cM(最大11.5cM、最小0cM)で、BTA14が5.5cM(最大13.2cM、最小0.4cM)であった。また、平均ICは、BTA9、14



図1 解析対象家系におけるBMS No.の分布

表1 1次スクリーニングの結果

BTA	LOD Scoreのピーク		有意水準	
	(cM)	(Score)	Genome-wise	Chromosome-wise
4	8	5.62	<0.05	<0.05
9	58	6.40	<0.05	<0.001
14	6	11.51	<0.001	<0.001

表2 2次スクリーニングの結果

BTA	LOD Scoreのピーク (cM)	LOD Scoreのピーク (Score)	QTL信頼区間 <sup>a</sup> (cM)	有意水準 Chromosome-wise	ハプロタイプ 置換効果 <sup>b</sup>	寄与率 (%) <sup>c</sup>
9	80	9	67~83	<0.001	0.8	3.9
14	38	7.4	28~48	<0.001	0.7	3.2

a QTL位置の約90%信頼区間  
b ハプロタイプ間のBMS No.の平均値の差  
c 解析対象の全分散に対する寄与率

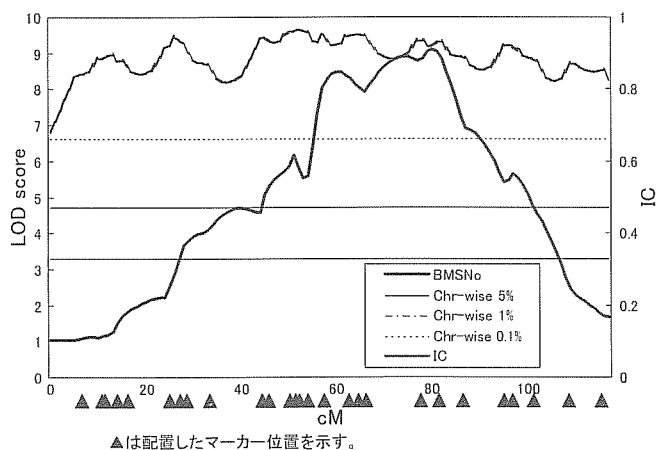


図2 BTA9の解析結果

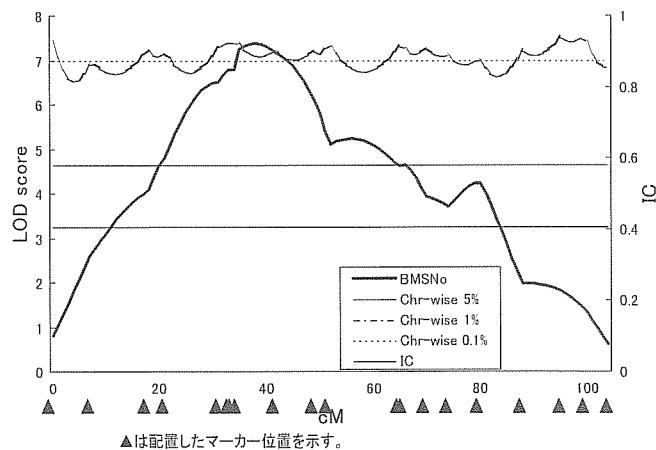


図3 BTA14解析結果

表3 BTA9と14のハプロタイプの組合せとBMS No.の平均値との関係

BMS No.	Haplotype				F-value	p-value
	Q9Q14 (n=124)	Q9q14 (n=93)	q9Q14 (n=103)	q9q14 (n=70)		
Mean	6.30	5.44	5.45	4.67	12.17	<0.0001
(SD)	(2.00)	(1.80)	(1.81)	(1.71)		

ともに0.88であった。BTA9および14ともに、有意な領域 (Chromosome-wise  $p < 0.001$ ) が確認された (表2および図2、3)。BTA9のQTL領域は67~83cM (16cM) と推定され、最も有意性が高かったのは80 cMで、最大LOD scoreは9であった。BTA14については28~48cM (20cM) と推定され、38cMが最も有意性が高く、最大LOD scoreは7.4であった。また、これらのBMS No.に対するハプロタイプ置換効果は、BTA9が0.8、BTA14が0.7であった。

QTL領域のハプロタイプとBMS No.との関連性調査

2か所のQTL領域の父由来ハプロタイプが特定できた個体は390頭 (Q9Q14: 124頭、Q9q14: 93頭、q9Q14: 103頭、q9q14: 70頭) であった。BMS No.の平均値について、2か所のハプロタイプの組み合わせが及ぼす効果を分散分析で検討した結果、有意 ( $p < 0.0001$ ) な効果が認められた (表3)。また、t検定によって平均値の差を検定した結果、q9q14とQ9q14、q9Q14 ( $p < 0.01$ ) およびq9q14とQ9Q14 ( $p < 0.001$ ) の間で、それぞれ平均値に有意な差が認

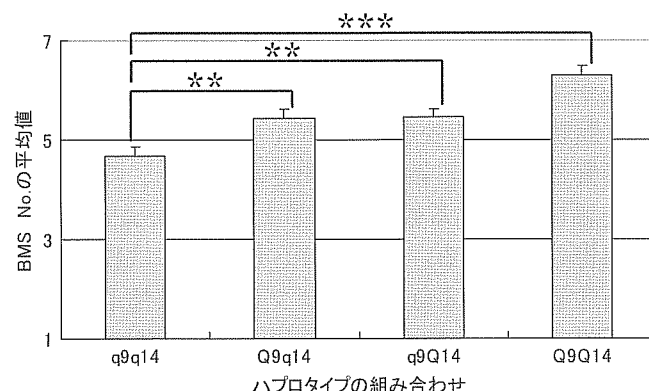


図4 BTA9とハプロタイプの組み合わせによるBMS No.の平均値の差

められた (図4)。BMS No.にプラスの効果を持つハプロタイプを両方有するQ9Q14と、いずれのハプロタイプも持たないq9q14との平均値の差は1.6であり、2つのQTL領域の優良ハプロタイプが両方存在する場合の効果は相加的であった。

## 考 察

ウシの育種改良は、現在、外貌審査や能力検定のほか、統計遺伝学的な手法によって推定された育種価に基づく選抜によって進められている。しかしながら、育種価の高い種畜から生産された個体が優れた遺伝子を受け継いでいるかどうかを判定するには、その後代の表現型値が判明するまで待たねばならず、優良後継牛の選抜には多大な労力とコストを要するのが課題である。一方、経済形質に関与する遺伝子を特定することができれば、個体のDNAが得られた段階で優れた遺伝子を保有しているかどうかを判定できる。したがって、現在の選抜体系にDNA情報を併せて利用することは、遺伝的に優れた個体を早期に、効率的に選抜するために有効であると考えられる。

今回は、県内で比較的多数の産子が得られている sireA由来の父方半兄弟家系を対象として、肉用牛の枝肉形質の中でも特に重要視される脂肪交雑に注目してQTL解析を行った。常染色体を対象とした1次スクリーニングでは、BTA4、9および14において有意な領域を検出した。このうち、BTA9および14については、2次スクリーニングを行い、それぞれ有意な領域を特定することができた。BTA9については、すでに黒毛和種において、今回解析対象としたsireA家系のほか、3家系で脂肪交雑に関するQTL領域が得られている<sup>5,15)</sup>。一方、BTA14については、sireA家系でマップされた脂肪交雑のほか、4家系で枝肉重量が、3家系でロース芯面積に関するQTL領域がマップされている<sup>10,15)</sup>。また、外国種においても脂肪交雑<sup>3,14)</sup>や枝肉重量<sup>6)</sup>、背脂肪厚<sup>2,12)</sup>といった形質と連鎖する領域が検出されており、特に、脂肪交雑に関与する候補遺伝子としてthyroglobulin<sup>1)</sup>が報告されている。このほか、BTA14には乳牛の乳脂肪含量に関するQTLがマップされ、候補遺伝子としてdiacylglycerol acyltransferase (DGAT1) が報告されている<sup>16)</sup>ことから、BTA14は脂肪交雑の形成や皮下脂肪の蓄積にも影響するとも考えられる。これらのことから、BTA9およびBTA14には脂肪交雑に関連する遺伝子の存在が強く示唆され、さらに、BTA14にはその他の枝肉形質に関与する遺伝子の存在も推察される。今回対象とした家系についても、これら候補遺伝子について多様性を調査するとともに、脂肪交雑に及ぼす効果を分析することによって、有用な情報が得られる可能性がある。

BTA4で特定した脂肪交雑に関するQTLについて、Mizoshitaら<sup>10)</sup>は、そのハプロタイプ置換効果を1.18、

寄与率を8.2%と推定している。今回我々が、sireA家系の解析で得た2か所のQTL領域のハプロタイプ置換効果 (BTA9:0.8、BTA14:0.7) および全分散に対する寄与率 (BTA9:3.9%、BTA14:3.2%) から、QTLが脂肪交雑に及ぼす効果はMizoshitaら<sup>10)</sup>の報告と比較して小さいことが推察された。そして、BTA9および14ハプロタイプの組み合わせが脂肪交雑に及ぼす効果を検討した結果、両者がともにプラスの効果をもつハプロタイプである場合には、BMS No.で1.6の効果が得られると推定された。一般に、脂肪交雑などの経済形質の多くは量的形質と呼ばれ、連続的な変異を示すことが知られている。また、このような形質は多数の遺伝子によって支配されており、一つ一つの遺伝子の効果は小さいが、それらの組み合わせによって表現型値に違いが生じると考えられている<sup>17)</sup>。これらのことから、単独のQTLの効果は小さいものの、2か所のQTLのハプロタイプ情報を併せて利用すれば、選抜マーカーとしての効果が十分期待できると思われる。

今回特定したQTLのハプロタイプ情報を、フィールドにおいて実際に活用するためには、(1)選抜マーカーとしての精度向上、(2)脂肪交雑に及ぼすハプロタイプ効果の検証が重要な課題である。選抜マーカーとしての制度を高めるためには領域をさらに絞り込む必要がある。それは、2か所のQTLの信頼区間は、いずれも20cM程度であり、領域内での組換えが起こる可能性もあるからである。既報によれば、MSマーカーを用いた解析によって数Mbから数100kbまでの領域の絞り込みが可能であると報告されている<sup>8,13)</sup>。このことから、今回得られた領域についても、新規にMSあるいはSNPなどのDNAマーカーを単離することによってマーカー密度を高め、解析頭数を増やして分析を行っていかねばならない。また、QTL領域の効果検証の手法として、溝下ら<sup>9)</sup>は、一般肥育牛を用いてハプロタイプと脂肪交雑との関連を分析し、肥育成績に及ぼすハプロタイプの効果を確認している。sireAで得られたQTL領域についても同様な調査を行うことは、実際の肥育成績に及ぼすハプロタイプ効果を検証する上で有意義であると思われる。さらに、sireA後代種雄牛のハプロタイプと検定成績、あるいは、繁殖雌牛の育種価との関連を調査することも、QTL領域のハプロタイプ情報を種牛選抜に利用した場合の有用性を検証するための直接的な手段として有効であろう。

### 引用文献

- 1) Barendse, W. J. Assessing lipid metabolism. Internarional Patent No. WO 99/23248, World Int. Property Org. 1999.
- 2) Casas, E. et. al. Journal of Animal Science, 79: 854-860, 2001.
- 3) Casas, E. et. al. Journal of Animal Science, 81: 2976-2983, 2003.
- 4) Ihara N. et. al. Genome Research, 14: 1987-1998, 2004.
- 5) Imai K. et. al. 29th International Conference on Animal Genetics, p.136, 2004.
- 6) Kim, J. et. al. Journal of Animal Science, 81: 1933-1942, 2003.
- 7) 小林直彦ら. 岐阜県畜産研究所研究報告, 3: 22-26, 2003.
- 8) Mizoguchi Y. et. al. 29th International Conference on Animal Genetics, p.137, 2004
- 9) 溝下和則ら. 鹿児島県肉用牛改良研究所報告, 8: 9-11, 2003.
- 10) Mizoshita K. et. al. Journal of Animal Science, 82: 3415-3420, 2004.
- 11) Ott, J. Analysis of Human Genetic Linkage. Rev. ed. The Jhons Hopkins Univ. Press, Baltimore, MD. 1992.
- 12) Stone, R. et. al. Journal of Animal Science, 77: 1379-1384, 1999.
- 13) Takano A. et. al. 29th International Conference on Animal Genetics, p.136, 2004.
- 14) Thaller, G. et. al. Animal Genetcs, 34: 354-357, 2003.
- 15) Watanabe T. et. al. 29th International Conference on Animal Genetics, p.136, 2004.
- 16) Winter, A. et. al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99: 9300-9305, 2002.
- 17) 山田宣永, 三宅 武. 家畜ゲノム解析と新たな家畜育種戦略. 動物遺伝育種シンポジウム組織委員会編. pp.67-69. シュプリンガー・フェアラーク東京. 2000.