

黒毛和種基幹種雄牛で検出された脂肪交雑に関するQTL

安部亜津子 渡邊敏夫¹⁾ 杉本喜憲¹⁾ 長谷川清寿 佐々木恵美 高仁敏光

要約 鳥根県有種雄牛A（sireA）の父方半きょうだい家系を用いた解析によって得られた脂肪交雑に関与する2か所（BTA9および14）のQTLについて、半きょうだいの個体数およびMSマーカを追加して解析を行い、QTL位置の95%信頼区間を推定した。さらに、解析に用いた半きょうだいを対象として、母由来のMSマーカ型と表現型値との関連性を調査することによって、信頼区間内のMSマーカ型が脂肪交雑に及ぼす効果の検証を試みた。

解析対象はsireAの産子である去勢肥育牛706頭とし、BTA9に30個、BTA14に20個のマイクロサテライト（MS）マーカをそれぞれ配置してQTL解析を行った。その結果、BTA9および14ともに、Chromosome-wise 0.1%水準で有意な領域が確認され、F値はBTA9では68cM（19.0）、BTA14では40cM（14.6）で最大となった。BMS No.に対するアレル置換効果はBTA9が0.61、BTA14が0.57であり、全分散に対する寄与率はそれぞれ2.5%および1.9%と推定された。bootstrapによって推定されたQTL位置の95%信頼区間は、BTA9では58-72および76-82cMの領域、BTA14では16、26-48、54-60、66、70、および104cMの領域であった。

信頼区間内に配置されたMSマーカについて、母由来Q保有の有無によって産子を区分し、母由来Qを保有する群（Q+）と保有しない群（Q-）との間でBMS No.の平均値の差を検定した。さらに、隣接する2マーカのアレル情報に基づいて、2マーカペアの母由来ハプロタイプを推定し、2マーカともQであるハプロタイプ（Q/Q群）と、2マーカともQでないハプロタイプ（-/-群）との間でBMS No.の平均値の差を検定した。その結果、BTA9では12マーカ中1個（9-10）、BTA14では20マーカ中3個（14-3、4および19）のマーカで有意（ $p < 0.05$ ）な差が認められ、いずれもQ+群のほうがQ-群よりもBMS No.の平均値は高かった。また、母由来ハプロタイプによって産子を区分してBMS No.の平均値の差を検定した結果、BTA9では3対（9-5、9-8および9-9）、BTA14では6対（14-3、14-4、14-5、14-14、14-15および14-18）のマーカペアにおいて有意（ $p < 0.05$ ）な差が認められ、いずれもQ/Q群のほうが-/-群よりもBMS No.の平均値は高かった。

以上のことから、BTA9および14で検出された2か所のQTLについて、95%信頼区間を推定することができた。さらに、信頼区間内に配置されたMSマーカについて、Qの脂肪交雑に及ぼすプラスの効果を確認することができ、信頼区間内に脂肪交雑に関与する遺伝子が存在することが示唆された。

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

ウシの育種改良は、段階的な改良目標に基づいて、経済的価値の高い個体を選抜することによって進められており、実際の選抜指標として血統、外貌審査、能力検定などのほか、統計遺伝学的な手法によって推定された育種価が利用されている。しかしながら、これらの指標に基づいて選抜された個体が優れた遺伝子を有しているかどうかを判断するには、少なくともその後代の表現型値を知る必要があり、選抜精度を高めるために多大な労力とコストが費やされてきた。仮に、経済的価値に影響を及ぼす形質（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情報が得られた集団から改良目標に適

合した遺伝子を保有している個体を抽出することが容易となる。このような観点から、現在の選抜体系にDNA情報を併せて利用すること、すなわちDNA育種は、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な手法であるといえる。そして、幾つかの肉用種においては、DNAマーカと表現型値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）の同定が試みられている。特に、黒毛和種では父方半きょうだいで構築された家系解析によって、体重および枝肉重量⁵⁾や脂肪交雑^{3,4,5)}に関与するQTLが報告されている。我々も

県有種雄牛A (sireA) 家系を用いた解析によって、3本の染色体 (BTA4、9および14) 上に脂肪交雑に関するQTL領域を見出し、このうち、BTA9および14で検出されたQTLのBMS No.に及ぼすハプロタイプ置換効果はそれぞれ0.8および0.7と推定した¹⁾。また、これらのQTLの効果は相加的であることが示唆され、2か所のQTLのハプロタイプ情報を併せて利用することによって、選抜マーカーとしての効果が十分期待できることも指摘した¹⁾。同時に、これらのQTLを実際に育種改良に活用するには、選抜マーカーとしての信頼度を高めることが必要で、QTL領域を絞り込むこと、また、DNAマーカー型が表現型に及ぼす効果を検証することが課題としてクローズアップされた。

そこで本研究では、sireA家系で得られた脂肪交雑QTLについて、解析対象個体数を増やすとともにマイクロサテライト (MS) マーカーを追加して解析を行い、QTL領域の絞込みとQTL位置の信頼区間の推定を試みた。さらにMSマーカーアリルと脂肪交雑との関連性についての解析を行い、QTL領域内のMSマーカーの表現型値に及ぼす効果を検証した。

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706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。解析対象形質は脂肪交雑 (BMS No.)、染色体はBTA9および14とした。

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マーカーは、ウシ連鎖地図にマップされたマーカー²⁾ 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 MgCl₂、0.2mM each dNTPs、6.25pmol プライマーおよび0.375unit Taq DNA Polymerase (AnimalTaq, ABgene) を含む15uL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°Cで4分間の熱変性を行った後、94°Cで30秒、55または60°Cで30秒、72°Cで30秒のサイクルを30サイクル、最後に72°Cで5分間の伸長反応を行った。増幅産物はABI PrismTM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems) で電気泳動後、GeneScanTM およびGenotyperTM 2.1 (Applied

Biosystems) によって型判定を行った。

QTL解析

QTLの検出は解析プログラム (Glissado1.2.3 build131) 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おいて、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F値を用いた。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行った。MSマーカーはBTA9に30個、BTA14に20個をそれぞれ配置し、インターバルは2cMとして解析を行った。QTL位置の95%信頼区間は、bootstrap⁷⁾ によって推定した。

QTL領域におけるMSマーカーの効果検証

QTL解析に用いた産子は、bootstrapで推定された信頼区間内の全てのMSマーカーについて、母から受け継いだアリル (母由来アリル) を推定した。ただし、BMS No.にプラスの効果を持つアリルをQ、持たないアリルをq、その他のアリルをaとした。そして、MSマーカーごとに、半きょうだいを母由来Q保有の有無によって区分し、母由来Qを保有する群 (Q+) と保有しない群 (Q-) との間でBMS No.の平均値の差を検定した。さらに、隣接する2マーカーのアリル情報に基づいて、産子が母から受け継いだ2マーカーペアのハプロタイプ (母由来ハプロタイプ) を推定した。ただし、2マーカーともQであるハプロタイプをQ/Q、2マーカーともqあるいはaであるハプロタイプを-/ーとし、マーカー間で組み換えが生じている個体は除外した。産子は母由来ハプロタイプによってQ/Q群と-/ー群に区分し、2群間でBMS No.の平均値の差を検定した。このとき、表現型値は父由来Qの効果を除くために、父からのQ伝達確率を0.5として補正した値を用いた。すなわち、 $BMS + effect * (Prob - 0.5)$ により補正值を算出した。すべての統計処理はt検定で行った。

結 果

解析対象家系におけるBMS No.の分布は図1に示したとおりであり、平均値は5.51、標準偏差は1.85であった。QTL解析の結果、BTA9および14ともに、Chromosome-wise 0.1%水準で有意な領域が確認された (表1および図2)。BTA9においてF値が最大であった染色体上の位置は68cMであり、F値は19.0

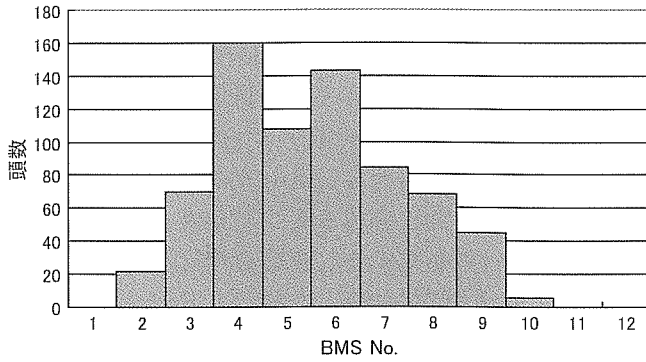
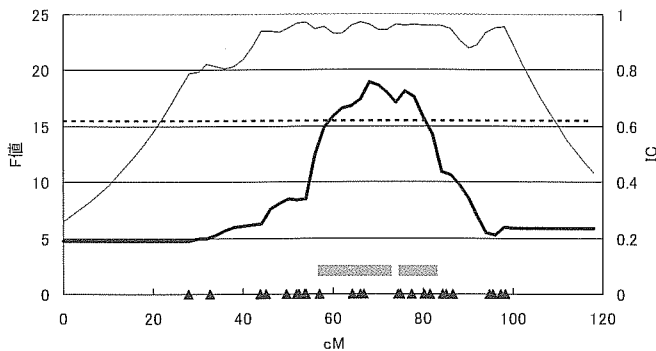


図1 解析対象家系におけるBMS No.の分布

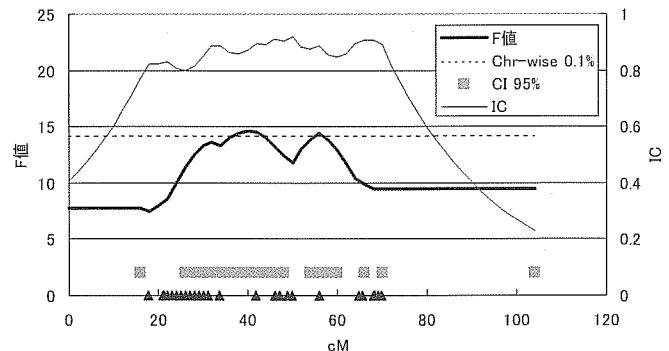
表1 QTL解析の結果

BTA	F値のピーク cM	F値	有意水準 Chromosome- wise	アリル 置換効果 ^a	寄与率 (%) ^b	IC
9	68	19.0	<0.001	0.61	2.5	0.96
14	40	14.6	<0.001	0.57	1.9	0.87

a アリル間のBMS No.の平均値の差
b 解析対象の全分散に対する寄与率



a) BTA9



b) BTA14

図2 BTA9および14におけるF値の分布

▲は配置したマーカー位置を示す。

表2 QTL信頼区間内のMSマーカーにおける母由来ラージQアリルの有無別のBMS No.

a) BTA9

	9-1	9-2	9-3	9-4	9-5	9-6	9-7	9-8	9-9	9-10	9-11	9-12
cM	57.088	57.088	64.412	66.025	66.895	74.316	74.884	77.554	77.554	77.554	80.265	81.569
Q+	5.46	5.56	5.48	5.53	5.77	5.48	5.51	5.78	5.77	5.71 ^a	5.29	5.32
(n)	(342)	(210)	(326)	(283)	(130)	(325)	(361)	(36)	(277)	(201)	(195)	(116)
Q-	5.58	5.53	5.59	5.55	5.48	5.55	5.54	5.53	5.51	5.43 ^b	5.61	5.57
(n)	(343)	(477)	(345)	(346)	(551)	(344)	(326)	(622)	(238)	(486)	(470)	(535)

b) BTA14

	14-1	14-2	14-3	14-4	14-5	14-6	14-7	14-8	14-9	14-10	14-11	14-12	14-13	14-14	14-15	14-16	14-17	14-18	14-19	14-20
cM	17.85	21.30	31.26	33.74	41.71	46.12	46.12	47.12	47.12	47.12	48.93	49.83	49.83	56.02	64.88	65.54	68.09	68.44	69.01	69.79
Q+	5.63	5.46	5.81 ^a	5.90 ^a	5.71	5.64	5.62	5.57	5.61	5.52	5.61	5.56	5.6	5.61	5.76	5.61	5.68	5.83	5.91 ^a	5.95
(n)	(262)	(300)	(225)	(215)	(200)	(360)	(407)	(279)	(308)	(554)	(299)	(247)	(206)	(444)	(253)	(131)	(205)	(150)	(92)	(101)
Q-	5.47	5.78	5.46 ^b	5.43 ^b	5.52	5.46	5.52	5.54	5.53	5.69	5.6	5.57	5.53	5.47	5.46	5.51	5.48	5.47	5.50 ^b	5.58
(n)	(333)	(276)	(418)	(430)	(448)	(291)	(235)	(358)	(371)	(129)	(327)	(424)	(473)	(221)	(416)	(493)	(461)	(527)	(581)	(442)

であった。BTA14では40cMの位置においてF値が最大となり、F値は14.6であった。また、これらQTLのBMS No.に及ぼすアリル置換効果はBTA9が0.61、BTA14が0.57であり、全分散に対する寄与率はそれぞれ2.5%および1.9%と推定された。bootstrapによって推定されたQTL位置の95%信頼区間は、BTA9では58-72および76-82cMの領域、BTA14では16、26-48、54-60、66、70、および104cMの領域であった。

QTL位置の95%信頼区間内に配置されたMSマーカーは、BTA9では12個(9-1~12)、BTA14では20

個(14-1~20)であった。これらのMSマーカーについて、母由来Qアリルを保有する群(Q+)と保有しない群(Q-)との間でBMS No.の平均値の差をそれぞれ検定した結果、BTA9では1個(9-10)、BTA14では3個(14-3、4および19)のマーカーにおいて有意(p<0.05)な差が認められ、いずれもQ+群のほうがQ-群よりもBMS No.の平均値は高かった(表2)。また、母由来ハプロタイプによって産子を区分してBMS No.の平均値の差を検定した結果、BTA9では3対(9-5、9-8および9-9)、BTA14

表3 BTA14のQTL信頼区間内のマーカーにおける母由来ラージQアレルの有無別のBMS No.

a) BTA9												
	9-1	9-2	9-3	9-4	9-5	9-6	9-7	9-8	9-9	9-10	9-11	9-12
cM	57.088	57.088	64.412	66.025	66.895	74.316	74.884	77.554	77.554	77.554	80.265	81.569
Q/Q	5.49 (90)	5.42 (15)	5.47 (143)	5.77 (111)	6.79 ^a (17)	5.61 (155)	6.19 (27)	6.44 ^a (27)	6.1 ^a (119)	5.27 (68)	5.24 (53)	
-/-	5.54 (215)	5.46 (74)	5.51 (61)	5.46 (60)	5.78 ^b (90)	5.55 (107)	5.67 (228)	5.6 ^b (155)	5.62 ^b (168)	5.61 (255)	5.61 (208)	

b) BTA14																				
	14-1	14-2	14-3	14-4	14-5	14-6	14-7	14-8	14-9	14-10	14-11	14-12	14-13	14-14	14-15	14-16	14-17	14-18	14-19	14-20
cM	17.85	21.30	31.26	33.74	41.71	46.12	46.12	47.12	47.12	47.12	48.93	49.83	49.83	56.02	64.88	65.54	68.09	68.44	69.01	69.79
Q/Q	5.36 (119)	5.55 (47)	5.88 ^a (191)	5.91 ^a (94)	5.71 ^a (175)	5.65 (209)	5.59 (255)	5.59 (267)	5.57 (277)	5.59 (282)	5.65 (182)	5.61 (167)	5.68 (148)	5.79 ^a (182)	5.85 ^a (100)	5.85 (79)	5.86 (88)	5.88 ^a (87)	6.00 (72)	
-/-	5.74 (110)	5.88 (67)	5.47 ^b (146)	5.39 ^b (186)	5.33 ^b (114)	5.4 (85)	5.39 (133)	5.54 (44)	5.63 (74)	5.12 (46)	5.62 (85)	5.5 (316)	5.49 (37)	5.35 ^b (128)	5.46 ^b (263)	5.69 (148)	5.32 (260)	5.39 ^b (422)	5.60 (338)	

では6対(14-3、14-4、14-5、14-14、14-15および14-18)のマーカーペアにおいて有意(p<0.05)な差が認められ、いずれもQ/Q群のほうが-/-群よりもBMS No.の平均値は高かった(表3)。

考 察

これまでに我々は、sireAにおいて脂肪交雑に関与するQTLを検出するとともに、脂肪交雑に及ぼすQTLの効果を推定し、選抜マーカーとしてフィールドにおいて実際に活用できる可能性を指摘した¹⁾。しかしながら、この時点での課題として、(1)選抜マーカーとしての精度向上、そして、(2)脂肪交雑に及ぼすハプロタイプ効果を検証することが残されていた。そこで今回、QTL領域の絞込みと同時にQTL位置の信頼区間を推定し、さらに、信頼区間内のMSマーカーについて脂肪交雑に及ぼす効果の検証を試みた。

706頭、50マーカーによるQTL解析の結果、BTA9および14ともにChromosome-wise 0.1%水準で有意な領域が確認された。F値が最大となったのはBTA9では68cM、BTA14では40cMであり、527頭を用いた解析(BTA9:80cM、BTA14:38cM)¹⁾とほぼ同様の結果を得た。bootstrapによって推定されたQTL位置の95%信頼区間は、BTA9では58-72および76-82cMの領域、BTA14では16、26-48、54-60、66、70および104cMの領域であり、527頭を用いた解析においてLOD drop-off method⁶⁾によって算出された約90%信頼区間¹⁾と比較して広がった。この理由として、LOD drop-off methodで算出された信頼区間は、bootstrapと比較して過小評価される傾向にある⁷⁾ことが考えられた。またこれら2つの解析手法の特徴を比較してみると、LOD drop-off methodで

は、染色体上で観察されたLOD scoreの最大値との差が1以内のLOD scoreを示す領域をQTL位置の約90%信頼区間とみなしており、いわば、経験的に信頼区間を推測しているのにすぎない。これに対してbootstrapでは、シミュレーションによって得られた検定統計量の最大値の度数分布に基づいて、信頼区間を実際に計算していることから、bootstrapはLod drop-off methodよりも、QTL位置の信頼区間推定の手法として精度が高いといえる。これらのことから、bootstrapで推定した各染色体のQTL信頼区間の信頼性は十分に高いと推察される。また、この信頼区間は、95%の確率で脂肪交雑に関与する遺伝子が存在すると推定される領域を意味していることから、sireAの後代について信頼区間内のMSマーカー型を調査することによって、優良遺伝子を受け継いでいるかどうかを高精度に推定することができると期待される。

BTA9および14のQTL信頼区間内に配置されたMSマーカーについて、産子が母から受け継いだQの脂肪交雑に及ぼす効果を検討した結果、BTA9では1マーカー、BTA14では3マーカーにおいて、母由来Qを保有する(Q+)群と保有しない(Q-)群との間で有意な差が認められ、いずれのマーカーにおいてもQ+群の方がQ-群よりもBMS No.の平均値は高かった。さらに、2マーカーペアによるハプロタイプで産子を区分し、Q/Qハプロタイプの効果を検討した結果、BTA9では3対、BTA14では6対のマーカーペアにおいて有意な差が認められ、いずれもQ/Qハプロタイプを有する群の方がBMS No.の平均値は高かった。これらの結果から、BTA9および14のQTL位置の信頼区間内には、QアレルあるいはQ/QハプロタイプがBMS No.に対してプラスの効果

を持つマーカーが存在することが確認された。したがって、これらのMSマーカーの近傍には脂肪交雑の形成に関与する遺伝子の存在が強く示唆された。

信頼区間内のMSマーカー効果検証において、シングルマーカーのアリルによる区分と、2マーカーペアのハプロタイプによる区分とでは、異なる結果が得られた。すなわち、シングルマーカーのアリルで産子を区分した場合、BTA9では1個(9-10)、BTA14では3個(14-3、4および19)のマーカーにおいて有意な差が認められたのに対し、2マーカーペアのハプロタイプによって区分した場合には、3対(9-5、9-8および9-9)、BTA14では6対(14-3、14-4、14-5、14-14、14-15および14-18)のマーカーペアで有意な差が認められた。この理由として考えられたことは、Qと推定された母由来アリルが必ずしもsireA由来Qと同一由来(Identical by descent; IBD)ではなかった可能性である。言い換えれば、Qとして判定した母由来アリルの中には、sireA由来Qアリルと見かけ上は同じアリル値を示しているも、BMS No.に対してsireA由来Qと同等の効果を持たないアリル(Identical by state; IBS)が存在していたことが考えられる。そのために、BMS No.に対して効果を持たないアリルも含めてQの効果の評価した結果であるといえよう。一方、2マーカーペアのハプロタイプによるQの効果検証においては、母由来ハプロタイプを推定した際に、2マーカー間での組み換えによって異なるアリルを保有する個体を除外したことによって、IBSのQアリルを保有する個体が排除されたため、Qの脂肪交雑に対する効果が明確化されたのではないかと考えられた。

2マーカーペアのハプロタイプで産子を区分すると、母由来Qを保有する個体数はBTA9のマーカーペアでは17~155頭であったのに対し、BTA14のマーカーペアでは47~282頭であり、解析対象の母牛におけるQ頻度は、BTA9について低く、BTA14については高い傾向が認められた。sireAが保有するQハプロタイプの由来を調査すると、BTA9についてはsireAの父牛(県外産)から、BTA14については

母牛(県内産)から受け継いでいることがわかった。このことから、BTA9については県内の雌牛集団におけるQ頻度は低いことが推察されるのに対し、BTA14については比較的高い頻度でQを有する個体が存在しすると考えられた。

今回の解析によって、BTA9および14で検出された2か所のQTLについて、95%信頼区間を推定することができた。さらに、信頼区間内に配置されたMSマーカーについて、Qの脂肪交雑に及ぼすプラスの効果を確認することができ、信頼区間内に脂肪交雑に関与する遺伝子が存在することが示唆された。これらのことから、sireA後代については、信頼区間内のマーカー型を判定することによって優良遺伝子を保有するかどうかを判定することが可能となり、脂肪交雑を対象形質とした選抜において、選抜精度向上や効率化が図られると期待される。これらQTLのマーカー情報の育種改良への実用化のためには、今後、実際に種雄牛選抜や優良雌牛の選定に活用することによって、選抜マーカーとしての精度および有用性を検証していく必要があると考えられる。

引用文献

- 1) 安部亜津子ら. 島根県立畜産試験場研究報告, 38: 9-13, 2005
- 2) Ihara N. et. al. Genome Research, 14: 1987-1998, 2004.
- 3) Imai K. et. al. 29th International Conference on Animal Genetics, p.136, 2004.
- 4) 小林直彦ら. 岐阜県畜産研究所研究報告, 3: 22-26, 2003.
- 5) Mizoshita K. et. al. Journal of Animal Science, 82: 3415-3420, 2004.
- 6) Ott, J. Analysis of Human Genetic Linkage. Rev. ed. The Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore, MD. 1992.
- 7) Visscher P. M. et. Al. Genetics, 143: 1013-1020, 1996.