



日本中央競馬会  
特別振興資金助成事業

牛ゲノム有効活用促進事業  
(牛有用ゲノム等探索・知的財産化事業)  
実施報告書

平成 21 年 3 月

社団法人 畜産技術協会

## まえがき

本報告書は、日本中央競馬会の畜産振興補助事業として（財）全国競馬・畜産振興会の助成により平成 18 年度から 20 年度において実施した牛有用ゲノム等探索・知的財産化事業の成果をとりまとめたものである。

当研究所ではこれまで家系を解析して、劣性遺伝病である不良因子の DNA 診断手法を確立し、不良因子キャリアのコントロールを可能にしてきた。また、脂肪交雑に代表される枝肉成績を対象とした解析を行い、牛の選抜育種に有用なゲノム情報を見出してきた。しかしながら、不良因子や枝肉成績だけでなく有用なゲノム情報を探索すべき対象は多い。たとえば、我が国の肉牛・乳牛ともに繁殖性の低下が危惧され、感染症等に対する対応も重要な懸案事項となっている。これらの経済形質の解析は家系作成が困難なだけでなく、たとえ家系を作成しマッピングしたとしてもその領域を絞ることはこれまでの経験から言っても時間がかかる。最近、ヒト生活習慣病や癌感受性などの解析において、家系を用いる必要のないゲノムワイドな連関解析が試みられ、いきなり数 100 kb レベルでマッピングされるなどその有効性が確立されつつある。このため、ウシにおいても新たな解析手法であるゲノムワイド連関解析手法の実用化が喫緊の課題となっている。

本事業ではウシのゲノムワイド連関解析を実施するための基盤整備を目的とした。この解析手法が有効なら、迅速な遺伝子同定まで可能にすると予想された。繁殖性に関連する採卵性を支配する遺伝子座では、確かに迅速に領域を約 300 kb にマッピングし、責任遺伝子を同定することができた。また、抗病性の 1 つである脂肪壊死抵抗性領域のマッピングにも成功した。今後取り組むべき課題が明らかとなったことも大きな収穫と考えられる。これらの結果は、ウシのゲノムワイド連関解析の有効性を保証するものと言えよう。したがって、解析の対象を定め、集団のサンプリングを行うことは、すなわち、有用なゲノム情報を明らかにするためのきわめて重要な一歩である。都道府県の畜産研究機関・登録団体・農業共済組合等からはこれまでも様々なご協力をいただき、ご便宜を図っていただいていたが、今後は、集団のサンプリングと明らかにしたゲノム情報を効果検証するため、さらなるご支援をお願いしたい。

最後に、この事業の実施に当たり、終始ご指導いただいた農林水産省、ご理解とご支援をいただいた日本中央競馬会、（財）全国競馬・畜産振興会に厚くお礼申し上げます。

平成 21 年 3 月 31 日

社団法人 畜産技術協会附属動物遺伝研究所  
所長 杉本喜憲

## 目 次

第 1 章 「牛有用ゲノム等探索・知的財産化事業」の概要	1
(1) 事業年次：平成 18 年～平成 20 年	1
(2) 事業の目的	1
(3) 牛有用ゲノム等探索・知的財産化事業技術推進委員会委員	1
(4) 研究目的と期待される成果	2
(5) 参考文献	3
第 2 章 マイクロサテライト DNA マーカーを用いるゲノムワイド関連解析	4
(1) ウシの連鎖不平衡ブロックとマーカー密度	4
(2) 採卵性ホルモン感受性	8
(3) 生時体重（分娩難易度）の解析	13
(4) 今後の進め方	14
(5) DNA マーカーマイクロサテライトと SNP の比較	14
(6) 参考文献	15
第 3 章 SNP を用いるゲノムワイド関連解析	16
(1) 集団の構造化の補正について	16
(2) 補正の方法	16
(3) SNP マーカーについて	18
(3)-1. Affymetrix ウシ 10K Array 脂肪交雑のゲノムワイド関連解析	18
(3)-2. Illumina ウシ 50K Chip	22
(3)-3. SNP を用いた研究の国内外の状況	31
(4) 今後の進め方	31
(5) 参考文献	32
第 4 章 学会発表	33

## 第1章「牛有用ゲノム等探索・知的財産化事業」の概要

### (1) 事業年次：平成18年～平成20年

### (2) 事業の目的

農畜生産物の国際競争が激化する中で、我が国固有の黒毛和種、世界水準の能力を有する乳用牛が保有する有用遺伝子を早期に特定し、知的財産として創造、確保及び活用し、畜産物生産の一層の効率化を図り、畜産経営の安定的発展を図ることが急務になっている。

また、脂肪交雑の責任遺伝子に代表される有用ゲノム情報を活用した牛の選抜育種（DNA育種）により我が国の肉用牛及び乳用牛の経済能力を向上させることが現実となりつつある。

このため、最新のDNA解析技術を活用した効率的かつ省力的なゲノム探索手法の開発・実用化及び開発した探索手法を活用した牛の有用遺伝子探索を加速化し、これにより我が国独自のゲノムリソースとして有用ゲノムの確保と活用を図る。

### (3) 牛有用ゲノム等探索・知的財産化事業技術推進委員会委員

本事業の技術推進委員会委員には次の方々に委員を委嘱し、事業の推進と評価をお願いした。

（以下敬称略、アイウエオ順）

居在家義昭 岩手大学農学部 教授（平成19年度～20年度）

河原 孝吉 社団法人日本ホルスタイン登録協会 北海道支局  
情報分析課長（平成19年度～20年度）

塩谷 康生 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構  
畜産草地研究所 研究管理監（平成18年度）

菅野 純夫 東京大学大学院新領域創成科学研究科 教授

豊 伸吾 道南NOSAI 北部支所 家畜診療センター 支所長

新山 正隆 社団法人 家畜改良事業団 専務理事

向井 文雄 神戸大学農学部 教授

安江 博 独立行政法人 農業生物資源研究所 ゲノム研究ユニット  
上席研究官

#### (4) 研究目的と期待される成果

これまでウシ経済形質のゲノム解析では、父方半きょうだい家系を対象に、マイクロサテライトのような多型性の高いDNAマーカーを用いるQTL解析を行ってきた。特定種雄牛から多数の産子が生産され、肥育された個体毎の枝肉形質は屠場において正確に測定・評価されているので、屠体のDNAサンプルを採取すれば、そのまま枝肉形質のゲノム解析を行うことができる。実際、これまでに道県と共同で多数の父方半きょうだい家系を解析し、成果を挙げてきたところである。

しかしながら、枝肉形質以外の経済形質である繁殖性・抗病性などのゲノム解析を実施するにはいくつかの問題がある。その内の最大の問題は、大規模な父方半きょうだい家系を作成することがきわめて困難なことである。たとえ、該当する遺伝子座をマッピングすることができたとしても、これまでの当研究所による枝肉形質のゲノム解析の経験から、領域を狭めるために相当な時間がかかることは容易に想像できる。家系を作成する必要が無く、迅速に遺伝子座を狭める手法が期待される。

家系解析によらないゲノム解析手法、すなわち、ゲノムワイド関連解析（以前は相関解析と称していたが、最近では関連解析と呼ばれるようになった）とは、世代毎の遺伝の際に蓄積されてきた染色体の組換えを利用する解析法である。家系の場合、父親から子へ遺伝には50%の頻度で組換えが起こるが、100世代離れると50回の組換えが起こる。ヒトにおいて、このゲノムワイド関連解析の手法が試行錯誤の過程を経て確立されてきている。糖尿病や本態性高血圧などのヒト生活習慣病の場合、正常群と疾病群の間で多数のDNAマーカーを調べ、アレル頻度の偏ったマーカーを見出す。そのために必要な集団のサイズ、必要なマーカー数、擬陽性を避けるための工夫など行われてきた。

このゲノムワイド関連解析をウシへ応用する。たとえば、雌牛集団内で繁殖性の良い群と悪い群の間で多数のDNAマーカーを調べ、アレル頻度の偏ったマーカーを見出すわけである。そのためには、雌牛個体の信頼性の高い繁殖記録を集めるシステムを作り、多数の個体サンプルを集める必要がある。しかしながら、ウシにおける成功例は未だ無く、集団のサイズ、必要なマーカー数など決定すべき条件・要素ははなはだ多い。ウシは産業動物であるため、人為的な改良がなされてきており、この点でもヒトとは歴史が異なる。基本的にヒトで確立されたゲノムワイド関連解析手法を参考に、ウシにおける条件を検討す

ることとした。本事業では、繁殖性の形質の内、「採卵性ホルモン感受性」を、抗病性では「腹腔内脂肪代謝」を解析の具体例とし、その他の経済形質の解析も視野の入れた解析手法の有効性を調べる。

本事業の遂行においてきわめて重要な要素である DNA マーカーについて、最近、当研究所は米国農務省の研究機関との共同で、DNA マーカーであるマイクロサテライトを約 4,000 個載せたウシ連鎖地図を作成した (Ihara ら、2004)。この地図をベースに、国際コンソーシアムはウシゲノム解読を進め、全ゲノムをほぼ解読した。ウェブサイト公開されたゲノム配列を探索すれば、任意の位置に存在するマイクロサテライトを多数得ることができる。また、以前、一塩基多型 (SNP) はゲノム上の位置が不明ゆえ役に立たなかったが、今や SNP はゲノム解読により位置の判明した DNA マーカーとして使うことができる基盤が整ってきた。したがって、多数の DNA マーカーを用いたゲノムワイド連鎖解析を行うことが可能になってきた。本事業の開始に伴い、新手法を活用しつつ、これまで解析の困難であった表現型も解析の対象に加え、有用な DNA 情報を探索していくことが現実的な課題となったのである。

## (5) 参考文献

Ihara, N., Takasuga, A., Mizoshita, K., Takeda, H., Sugimoto, M., Mizoguchi, Y., Hirano, T., Itoh, T., Watanabe, T., Reed, K.M., Snelling, W.M., Kappes, S.M., Beattie, C.W., Bennett, G.L., Sugimoto, Y.: A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. (2004) *Genome Res.*, **14**, 1987-1998.

## 第2章 マイクロサテライト DNA マーカーを用いるゲノムワイド連鎖解析

### (1) ウシの連鎖不平衡ブロックとマーカー密度

ゲノムワイド連鎖解析を行うために必要なマイクロサテライト DNA マーカー密度は、連鎖不平衡ブロック (LD ブロック : Historical recombination の過程で保存された領域) の長さで判断できる。そのような LD ブロックに 1 個以上の多型性マーカーを置けば、ゲノム全体をカバーしていると言うことができる。ウシの各品種は歴史的にそれぞれ独自の選抜および淘汰を受けているので、各集団内における LD ブロックの構成および LD ブロック長も異なっていることが予想される。従来、ウシにおける LD ブロック長は Farnir ら (2000) および Odani ら (2006) によるマイクロサテライトを用いた解析によりそれぞれ乳用品種および黒毛和種のいずれも数 10 cM に及ぶと報告されている。しかしながら、用いられた多型マイクロサテライトマーカー密度はいずれも平均間隔が 10 cM 程度と低密度であった。

Watanabe ら (2008) は、黒毛和種やホルスタイン種を用いた LD ブロック : についてマイクロサテライトマーカーを用いた研究を行い、ウシの LD ブロックは約 3-5 cM であり、染色体の領域によっては 1 cM 以下 (1 Mb 以下) であることを報告した。したがって、ウシの全ゲノムを対象に解析するには、約 1,000 個のマイクロサテライトマーカー (平均のヘテロ接合率 (個体でヘテロとなる頻度) 0.6、平均アレル数 4) が必要と予想される。そこで、本事業ではゲノム全体に 3 cM のマーカー密度で実施することとした。図 1 に用いたマイクロサテライトマーカー 1,157 個の染色体地図を示す (BTA = ウシ染色体)。これらの平均ヘテロ接合率は 0.57 であり、平均アレル数は 6.3 であった。

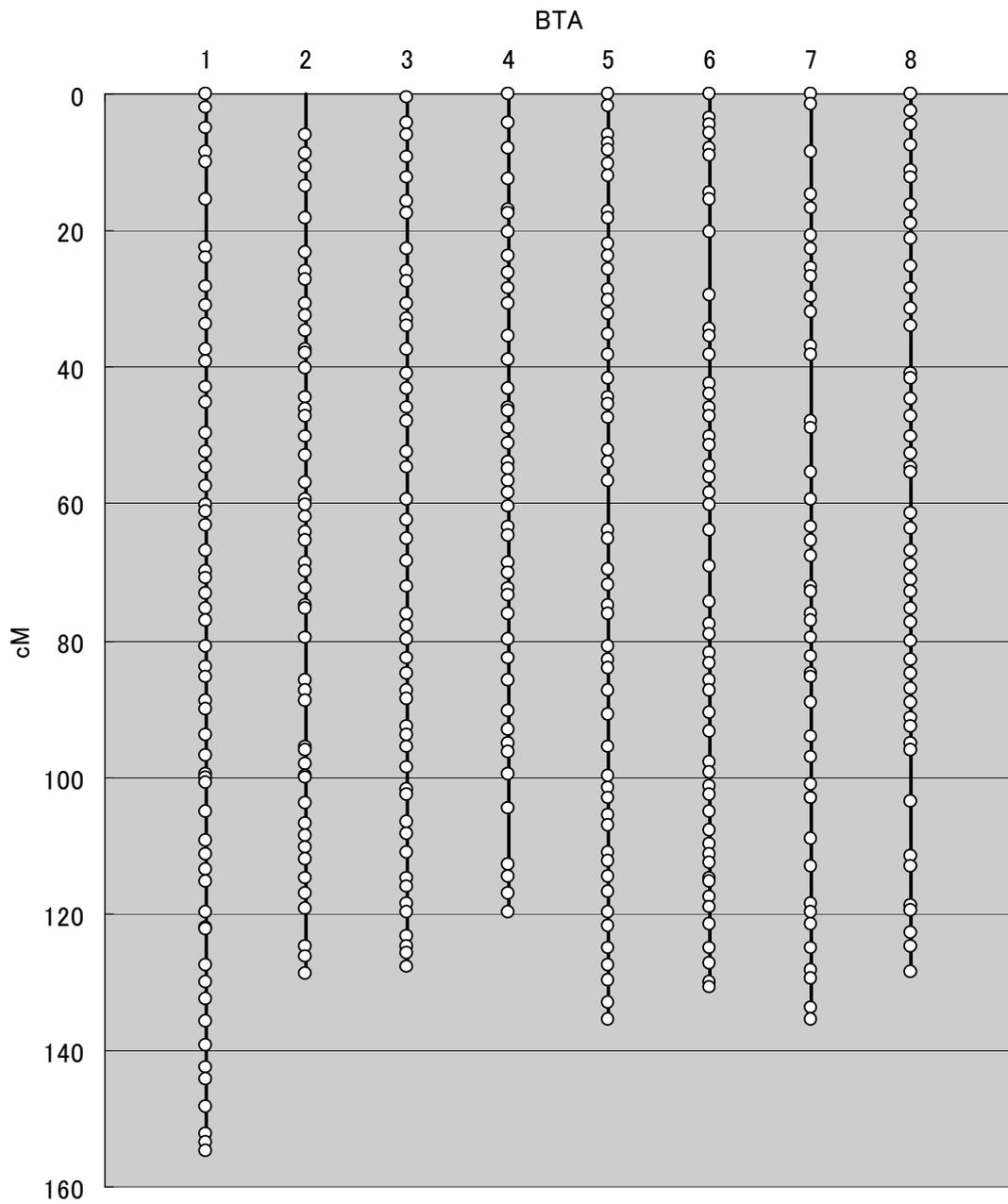


図 1-1. ウシマイクロサテライトマーカー地図 (BTA 1-8)

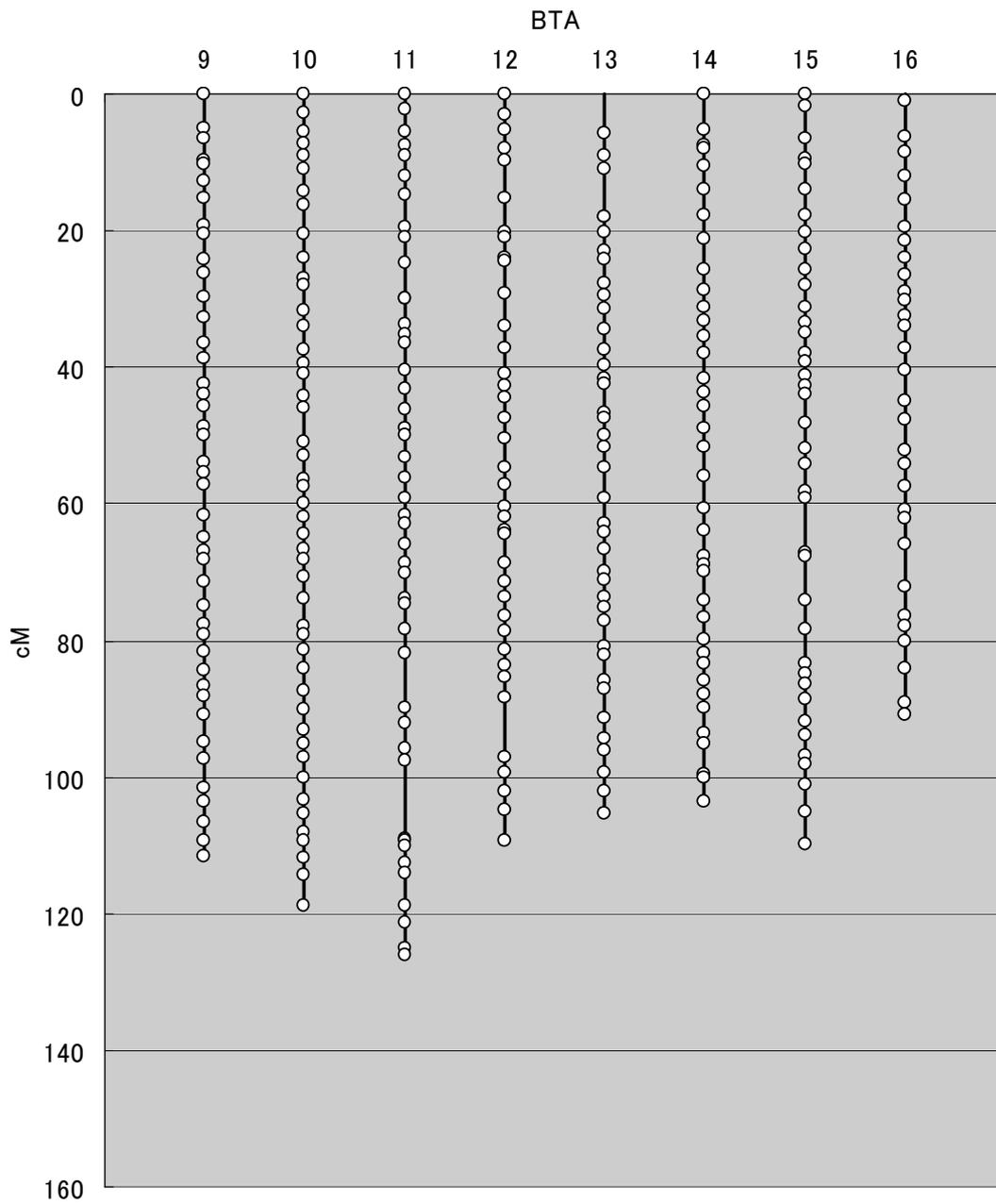


図 1-2. ウシマイクロサテライトマーカー地図 (BTA 9-16)

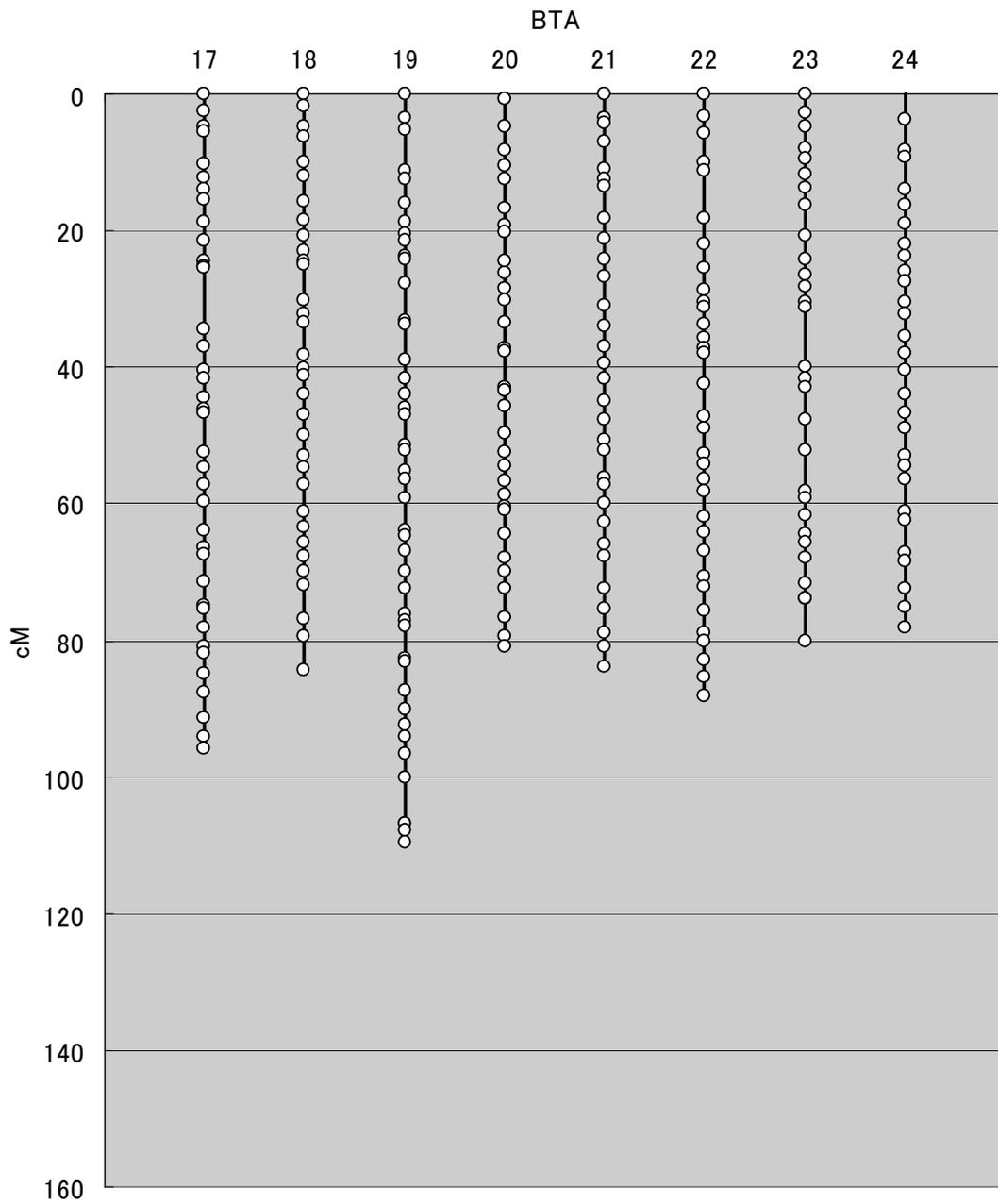


図 1-3. ウシマイクロサテライトマーカ―地図 (BTA 17-24)

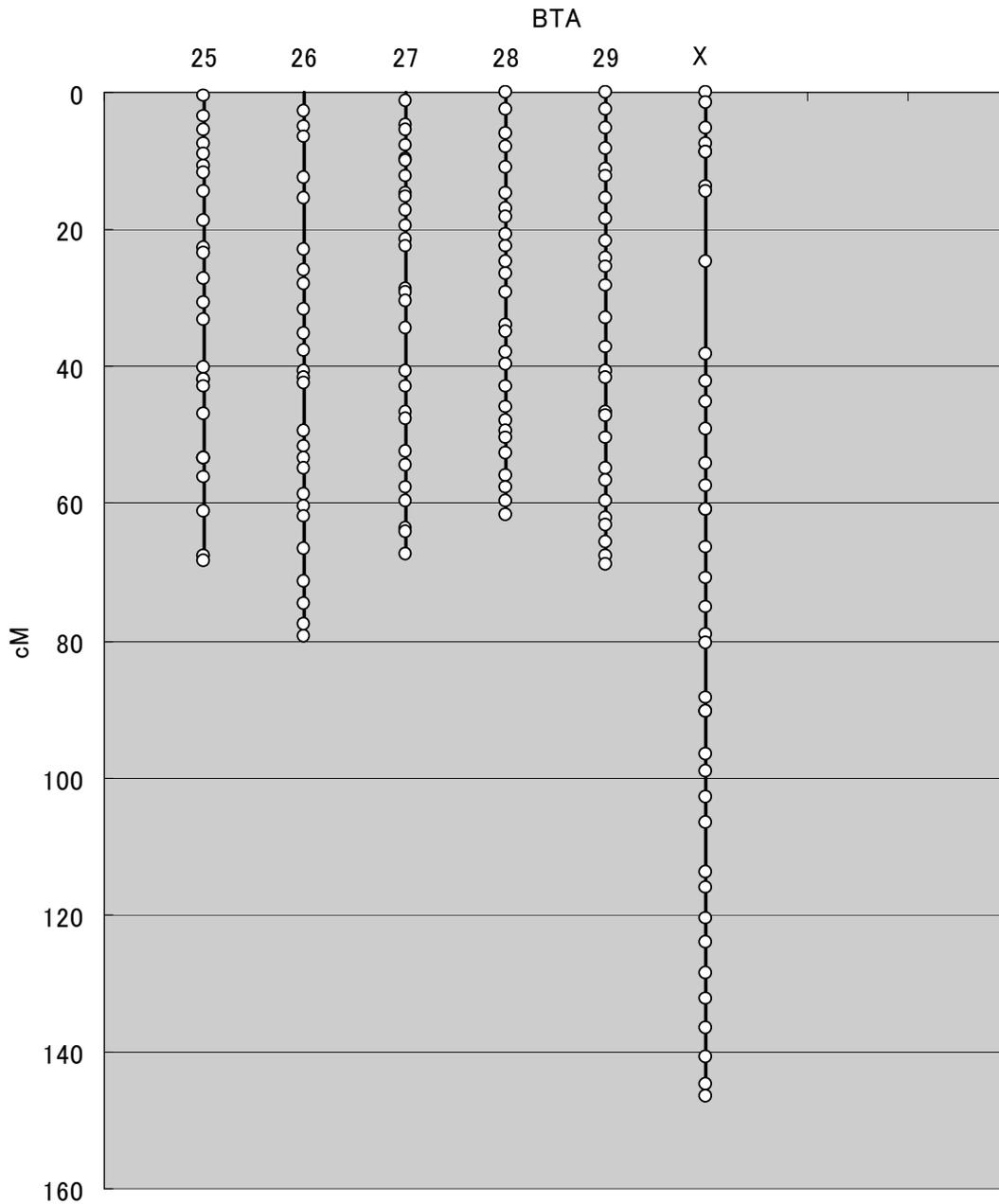


図 1-4. ウシマイクロサテライトマーカー地図 (BTA 25-X)

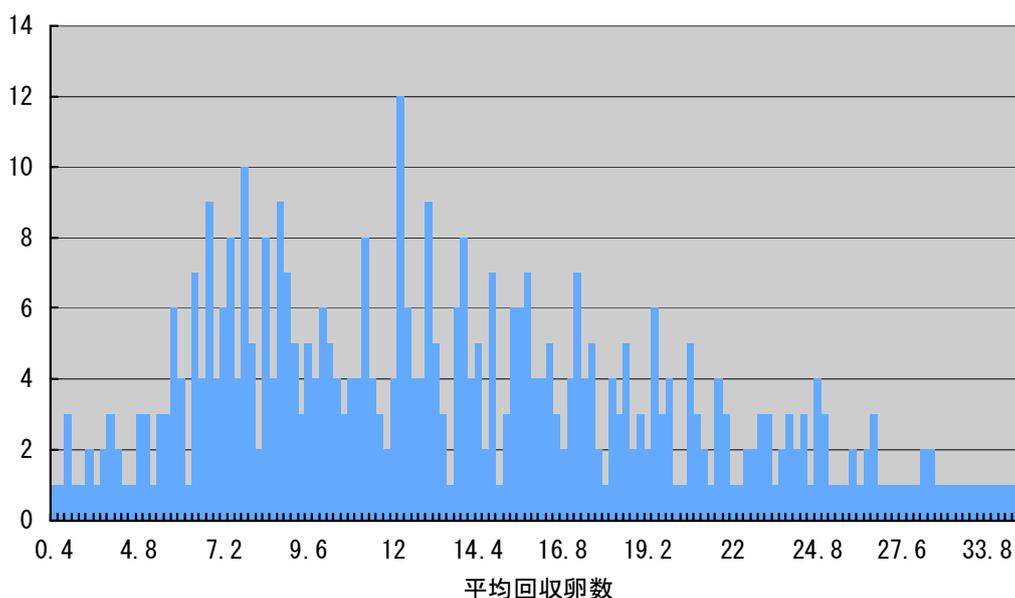
## (2) 採卵性ホルモン感受性

黒毛和種では、遺伝的な能力の高い雌牛を FSH など過排卵処理して採卵し、受精卵として販売されている。しかしながら、購入した雌牛から採卵できない場合がある。あらかじめ採卵性の高い牛を DNA 情報で選抜する手法の確立が期

待されている。そこで、全農 ET センター・家畜改良センターと共同で本研究を行った。

全農 ET センターでは、FSH 過排卵処理して受精卵を生産している。本解析には延べ 8,438 回の採卵成績付きの 910 頭の黒毛和種雌牛を用いた。個体の採卵成績のバラツキを軽減するため、複数回の成績のある個体を選び分布を調べたところ、5 回以上の採卵データのある個体ではほぼ正規分布に近かった(図 2)。

採卵回数5回の成績 (歪度 : 1.1585)



全農ETセンター 910頭  
採卵成績 8,438回

図2. 採卵成績の分布

そこで、採卵数の上位および下位、各 42 頭ずつを抽出し、常染色体 1—29 番および X 染色体に配置した上記 1,157 個のマイクロサテライトマーカーの型判定を行った。その結果、13 個の染色体で 5%水準 (多重検定補正済み) の有意な領域を得た (図 3: 後述では集団の構造化の補正を行い、擬陽性結果を避けるための検定を行っているが、この場合のようにマーカー数が 1,000 個では検定できないため、有意と思われる領域についてマーカー数を増やすことと、個体数を増やすことで真の結果を得ることとした)。

頭数を上位下位 67 頭ずつに増やした 2 次スクリーニングを行い、上記 13 染色体の内 9 個の染色体で有意な結果を得た (図 4)。3 次スクリーニングでは、

当研究所ですでに開発されていたマイクロサテライトを使って、3本の染色体に絞った（図5）。4次スクリーニングにおいて染色体7番の最も相関していた領域を新規に開発した87個のマイクロサテライトでさらに解析したところ、約280 kbの領域が有意となった。マーカー密度は80 kb/マーカーであった。この領域には遺伝子が1個存在し、塩基配列を調べたところ、アルギニン（N）からセリン（S）へのアミノ酸変異が検出された（図6）。

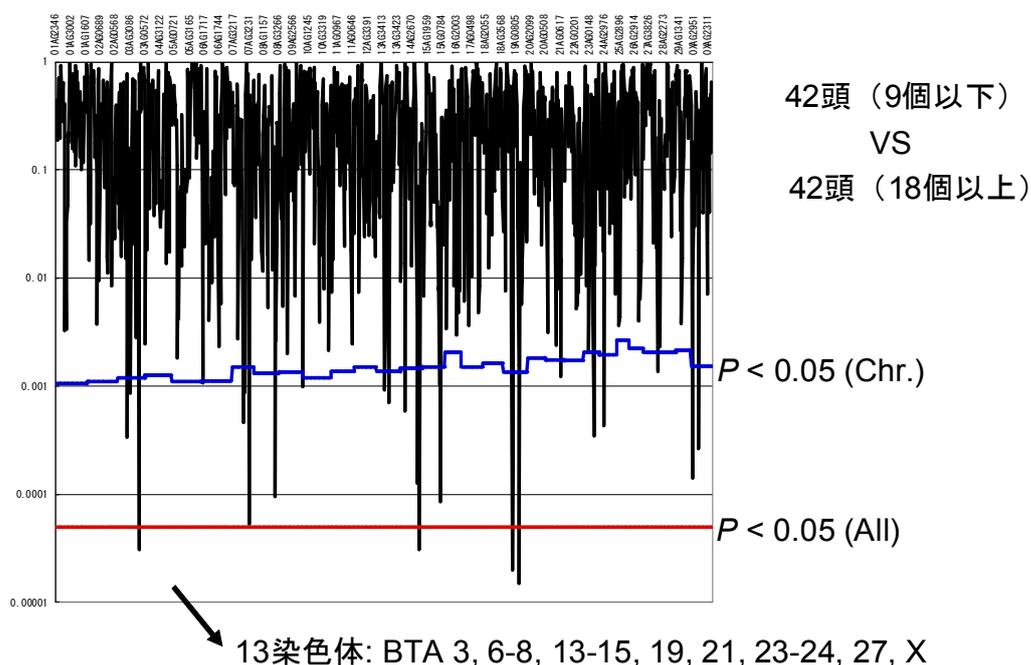


図3. 1次スクリーニングの結果

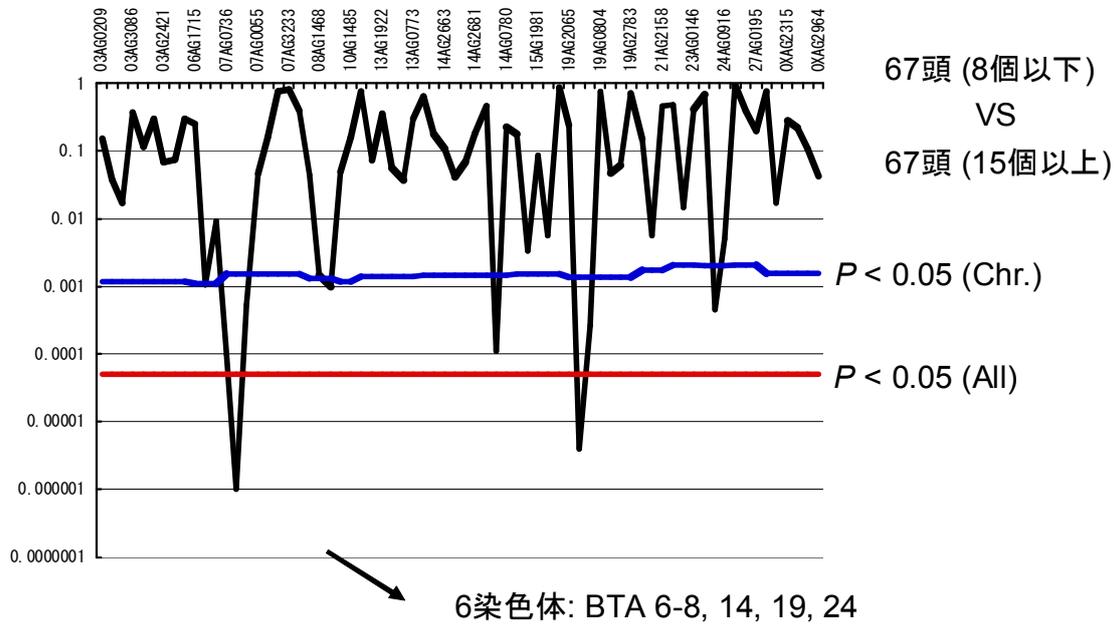


図4. 2次スクリーニングの結果

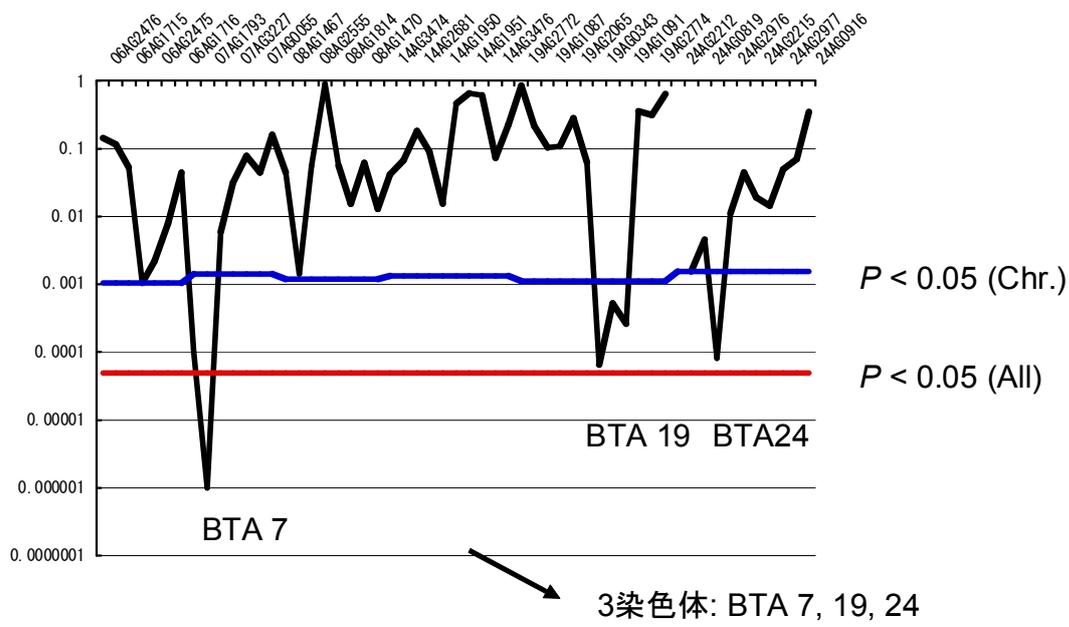


図5. 3次スクリーニングの結果

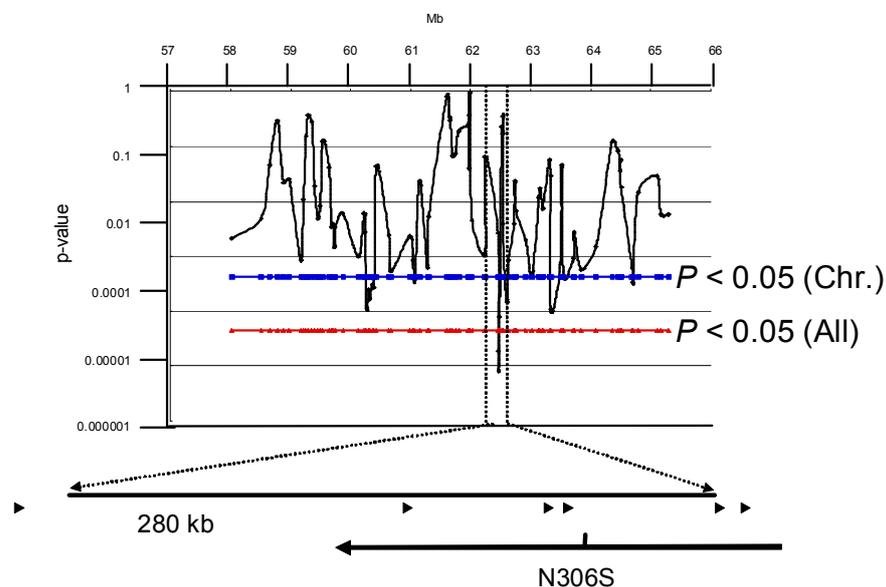


図6. 4次スクリーニングの結果

このアミノ酸変異の効果をアフリカツメガエル卵母細胞で調べたところ、S型の方がN型より活性が高かった。供卵牛の成績では、Sを1アレル有すると採卵数は平均3個増えた。S/S、S/N、N/Nの遺伝子型を持つ雌牛の卵胞形成を超音波で調べたところ、小卵胞形成数に有意な差が認められた。これらの結果をまとめ、特許申請した。

したがって、図1のように多型性マイクロサテライトを約1,000個用いるゲノムワイド関連解析は、適正な黒毛和種の集団を対象にすれば有効であることがわかった。

### (3) 生時体重（分娩難易度）の解析

黒毛和種の集団で、マイクロサテライトを用いるゲノムワイド関連解析が有効であることがわかったので、乳用牛であるホルスタイン種を対象とした研究を行った。近年、ホルスタイン種では、ミルク生産性の改良の進展に伴って、個体の大型化が進み、初産時の分娩難易度が高まっている。そこで、家畜改良センターと共同で、生時体重を支配している遺伝子を見出すことを目的として解析を始めた。

材料となる約 1,483 頭のホルスタイン種子牛集団は家畜改良センターから入手した。生時体重の上下 15%に当たる 86 頭ずつのグループ (high, 51-65 kg vs. low, 22-35 kg) について 1,151 個のマイクロサテライトを用いた一次スクリーニングを行い、有意な相関性が見られた 12 個の染色体についてマーカーを増やした二次スクリーニングを行った。有意な相関が見られた 9 個の染色体について三次スクリーニング中である。ホルスタイン種産子の生時体重についても、マイクロサテライトマーカーを用いるゲノムワイド関連解析の手法は有効であることが明らかとなった。事業年度内に最終結果を得ることはできなかった。

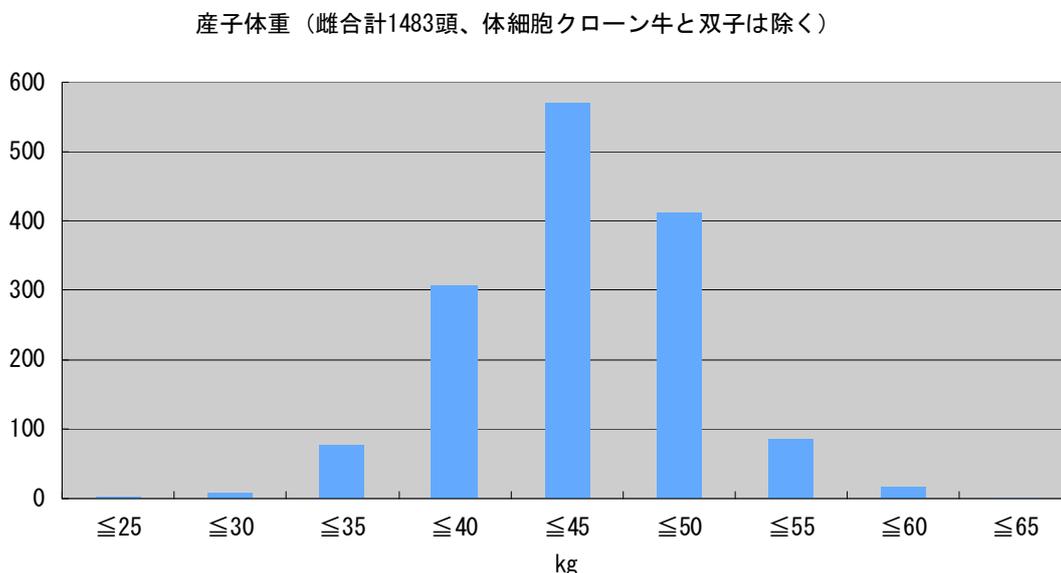


図7. ホルスタイン種産子の生時体重分布。  
1,483頭：体細胞クローン牛と双子は除く

#### (4) 今後の進め方

黒毛和種過排卵処理への反応性について、見出した変異と採卵性の関連をウシだけでなく、ノックアウトマウスやノックインマウスを使って調べていく。また、黒毛和種の繁殖性一般、たとえば受胎率・初産次月齢・4産次月齢・空胎日数・滞在日数などとの関連も今後調べていく予定である。

生時体重の解析は継続し、遺伝子の同定、効果の検証、特許申請を目指す。

#### (5) DNA マーカーマイクロサテライトと SNP の比較

ゲノムワイド関連解析においてマイクロサテライトが有用であることが明らかとなった。マイクロサテライトの弱点は、型判定が難しく、熟練を要することである。また、時間がかかり、コストもかかることは否めない。一方の SNP は、利用可能な数が 10,000--50,000 に限定され、多型性に優れた SNP (2 アリルの内、低頻度の割合が 0.3 以上の SNP) が少ないため、現段階では確かに検出能力に問題がある。しかしながら、今後、SNP は質量共に改善されていくのは明らかである。当面はマイクロサテライトを使用するものの、将来的には SNP に切り替わっていくことになるだろう。

表 1. DNA マーカーの比較

DNA マーカー	マイクロサテライト	SNP
アリル数	4-5	2
利用可能な数	5,000	10,000--50,000
1 サンプル当たりの型判定コスト (試薬消耗品費)	10 万円	3 万円
時間	かかる (10 倍?)	かからない
型判定エラー	避けるために工夫が必要。見逃すと結果に影響。	「データ無し」としてシステム内で処理。実害は少ない。
ハプロタイプ再構成	困難	比較的容易
データ処理の自動化	無理	可能

\*やり直しを 20%、3 回で完結。使用したマイクロサテライト 1,157 個のデータ。

## (6) 参考文献

Farnir, F., Coppieters, W., Arranz, J.-J., Berzi, P., Cambisano, N., Grisart, B., Karim, L., Marcq, F., Moreau, L., Mni, M., Nezer, C., Simon, P., Vanmanshoven, P., Wagenaar, D., Georges, M. (2000) Extensive Genome-wide Linkage Disequilibrium in Cattle. *Genome Research.*, **10**: 220-227.

Odani, M., Narita, A., Watanabe, T., Yokouci, K., Sugimoto, Y., Fujita, T., Oguni, T., Matsumoto, M., Sasaki, Y. (2006) Genome-wide linkage disequilibrium in two Japanese beef cattle breeds. *Animal Genetics*, **37**: 139-144.

Watanabe, T., Hirano, T., Takano, A., Mizoguchi, Y., Sugimoto, Y., Takasuga, A. (2008) Linkage disequilibrium structures in cattle and their application to breed identification testing. *Animal Genetics*, **39**: 374-382.

## 第3章 SNP を用いるゲノムワイド関連解析

### (1) 集団の構造化の補正について

ゲノムワイド関連解析の解析対象集団が遺伝的バックグラウンドの異なるいくつかの分集団から構成されている状態を集団の構造化 (Stratification) と呼ぶ。構造化の影響が大きいとき、たとえば、Case-Control Study で Case-Control 間の分集団の比率が均一でない (血統に偏りがある) 場合、分集団間でアリル頻度に差がある座位が解析対象の形質とは関連がないにも関わらず偽陽性として検出される。ウシの品種を確立する過程で集団のランダムさを排除し、特定の形質を固定することが歴史的に行われてきた。したがって、乳用種・肉用種共に、ヒトよりも構造化について注意しなければならない。

### (2) 補正の方法

#### Genomic Control

集団の構造化の影響下では観測統計量が帰無仮説において期待される値よりも過大に評価される。Genomic Control では以下の式で表される  $\lambda$  を用いて統計量を補正することで構造化による偽陽性を抑えることができる。

$$\lambda_{GC} = \frac{\text{median}(\chi_{obs}^2)}{0.455}$$
$$\chi_{corr}^2 = \frac{\chi_{obs}^2}{\lambda_{GC}}$$

※0.455 は  $P = 0.5$  を与える  $\chi^2$  値

ただし、Genomic Control では形質と真に関連する座位も含めて一律に補正するので、偽陽性を抑える反面、偽陰性が生じやすくなる。そのため、実際には構造化の補正というよりも構造化の程度を表す指標として  $\lambda$  を用いる。  $\lambda$  が 1 に近いほど構造化の程度が小さいと考えられる。

#### PLINK

PLINK はゲノムワイド関連解析に特化したプログラムで、その中に構造化の

補正を行うコマンドも含まれている。個体間の見かけの同祖由来領域（Identity-By-State: IBS）を考慮して解析集団をクラスタリングすると、近縁の個体が同一のクラスターに分類される。このクラスターごとにアレル頻度の偏りを検定することで構造化の影響を低減することができる。

## EIGENSTRAT

EIGENSTRAT は主成分分析<sup>\*</sup>を利用して構造化を補正するプログラムである。個体数×SNP 数の遺伝子型データを対象に主成分分析を行い、個体間の遺伝的ばらつきを説明する成分を決定する。個体間のばらつきを最大にする成分から、第1成分、第2成分、第3成分…と順次決定していく。個体ごとに各成分の固有値が与えられ、第1成分と第2成分について平面上にプロットすると、個体間の遺伝的距離を視覚化することができる。黒毛和種集団を対象にこの解析を行った場合、気高系、田尻系、藤良系の3系統に大まかに分類される傾向が見られる（図8）。Case-Control 間で有意差のある成分で各個体の遺伝子型値と表現型値を補正することで構造化の影響を低減することができる。

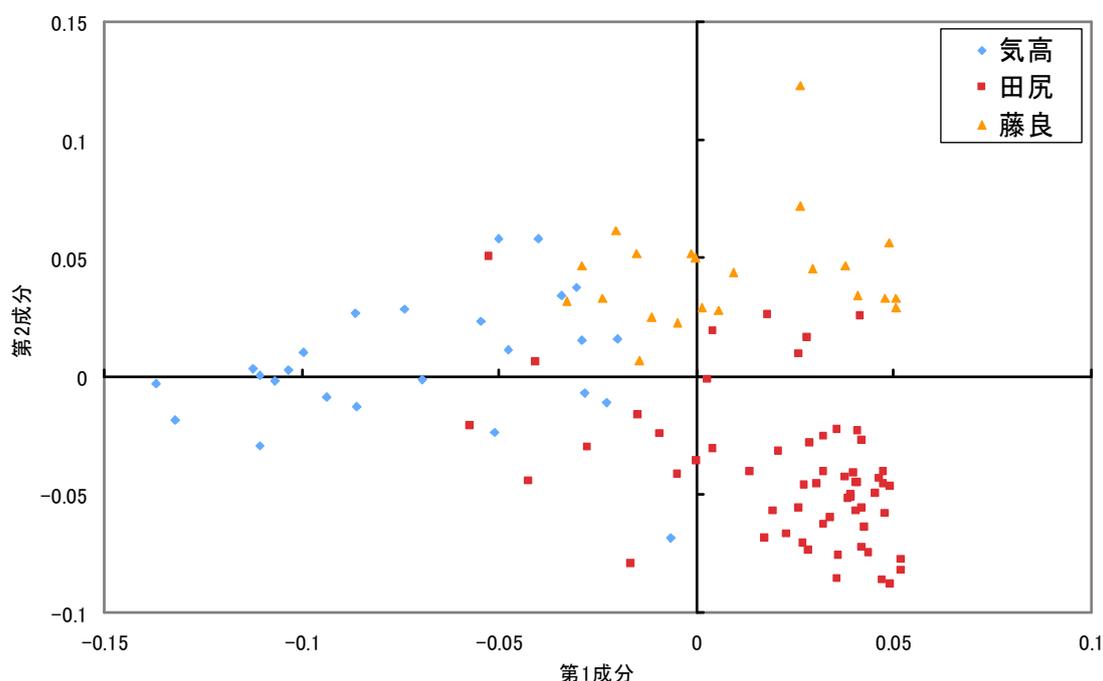


図8. 主成分分析のプロット(黒毛和種集団)

### ※主成分分析

複数の変数間の共分散(相関)を少数の合成変数で説明する手法。共分散行列の固有値問題の解として得ることができる。

### (3) SNP マーカーについて

#### (3)-1. Affymetrix ウシ 10K Array 脂肪交雑のゲノムワイド関連解析

ゲノム解析の進展により多数の SNP (一塩基多型) マーカーが開発され、1 万個の SNP を含む DNA チップ (Affymetrix 社) が利用可能となった。このうち約 9,000 個の SNP は、最新のウシゲノムドラフト配列 (2006 年 8 月) 上に位置付けられ、その結果、黒毛和種で多型性のある SNP については、5 Mb 以上のギャップは 5 ヲ所となった。しかし、1—5 Mb のギャップは 760 ヲ所もあることから、カバーできていない LD ブロックが多数あることが推察された。また、SNP の平均的な密度は 0.3—0.5 cM/マーカーであるが、分布に偏りがあることも問題点と考えられた。

そこで、この SNP Array を用いるゲノムワイド関連解析の有効性について検証するため、脂肪交雑を対象に解析した。すでに当研究所では家系解析の手法で脂肪交雑 QTL を複数の領域に位置付けており、家系内の効果の大きさ・寄与率などについて報告してきた (Mizoshita ら、2004 ; Mizoguchi ら、2006 ; Takasuga ら、2007)。これらの家系解析結果をポジティブコントロールとして 10K SNP Array の有効性を調べた。

#### 1. 材料・方法

##### ・解析サンプル

芝浦・南港市場から収集した肥育牛サンプルについて脂肪交雑成績の両極端の群を抽出した。上位の成績群 (High : BMS No.  $\geq 10$ ) と下位の成績群 (Low :

表 2. 相関解析に用いたサンプル内訳

市場	High	Low	合計
芝浦	86	91	177
南港	72	66	138
合計	158	157	315

BMS No.  $\leq 3$ ) として去勢肥育牛の合計 315 頭を用いた。できるだけ High と Low

で半きょうだい数をマッチングさせた (表 2)。

- ・ Affymetrix ウシ 10K SNP Array

SNP 数 9,919 個

型判定できた SNP の割合 : Assay Call Rate  $\geq$  85%

SNP の多型性指標、マイナーアレル頻度 (Minor Allele Frequency) : MAF  $\geq$  0.01

ハーディ・ワインバーグ (H.W) 平衡検定の  $P \geq 0.001$

利用できる SNP 数 : 6,441 個

隣り合う 2 マーカー間距離の平均値...358  $\pm$  510 kb (3 bp—4.17 Mb)

マーカー間距離が 1 Mb 以上のマーカーペアの割合...10.2%

- ・ EIGENSTRAT を用いた補正

Call Rate = 100%、MAF  $\geq 0.1$ 、未補正の相関解析で  $P \geq 0.01$ 、マーカー間隔 > 1 Mb として 571 個の SNP を主成分分析に用いた。

## 2. 結果

未補正の  $\lambda_{GC}$  は 2.03 で、EIGENSTRAT による補正後は  $\lambda_{GC} = 1.45$  となった。10 番染色体 (BTA 10) で最も  $P$  値の低い SNP を検出 (rs29020708,  $P = 1.2 \times 10^{-4}$ ) したが、帰無仮説からの乖離はほとんど認められなかった (図 9、10)。この SNP 周辺にマーカーを追加して有意な連関かどうかを調べることにしたが、用いている集団で有用な SNP を開発することはできないため、容易に開発できるマイクロサテライトマーカーを用いた。BTA 10 の上 40 cM 以降の領域にマイクロサテライトマーカーを 21 個 (平均 3.5 cM 間隔) 配置し、サンプル数を 384 頭に増やしてファインマッピングを行ったところ、約 60 cM の領域で  $P = 1 \times 10^{-4}$  のピークが見られた。SNP の位置は連鎖地図で約 100 cM なので 40 cM のずれが見られた (図 11)。

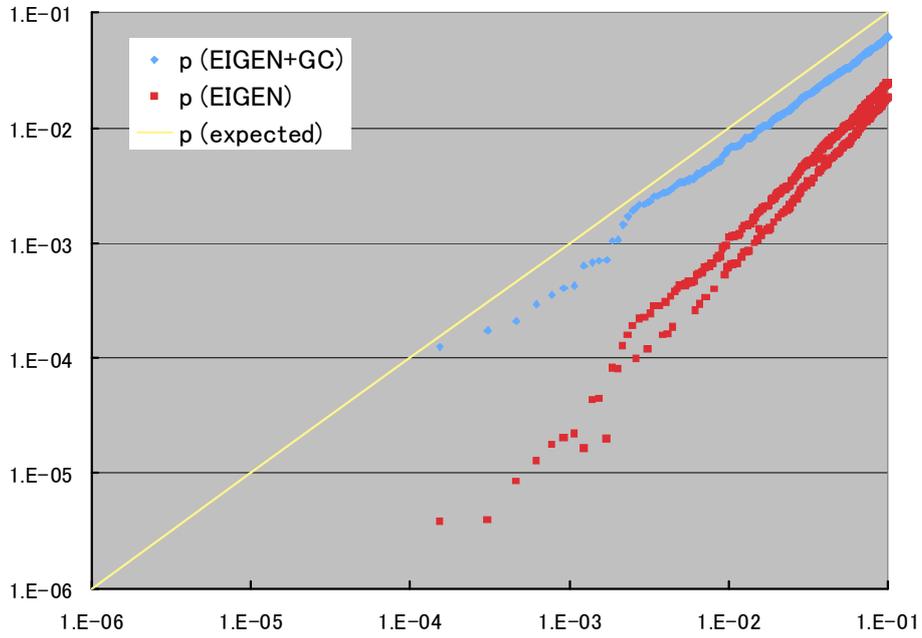


図 9. 連関解析の Q-Q plot

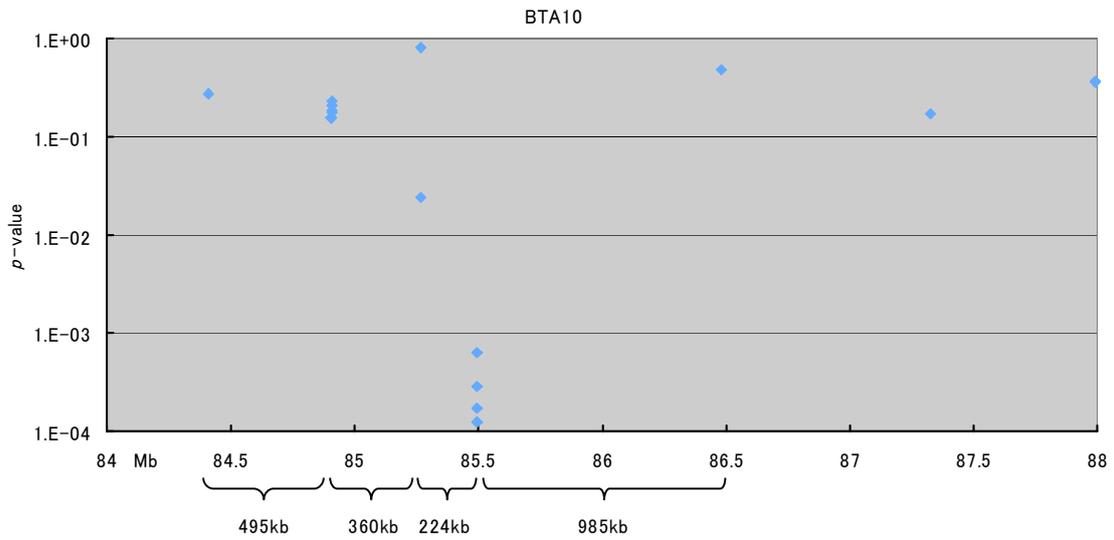


図 10. 最小の  $P$  値が検出された BTA 10

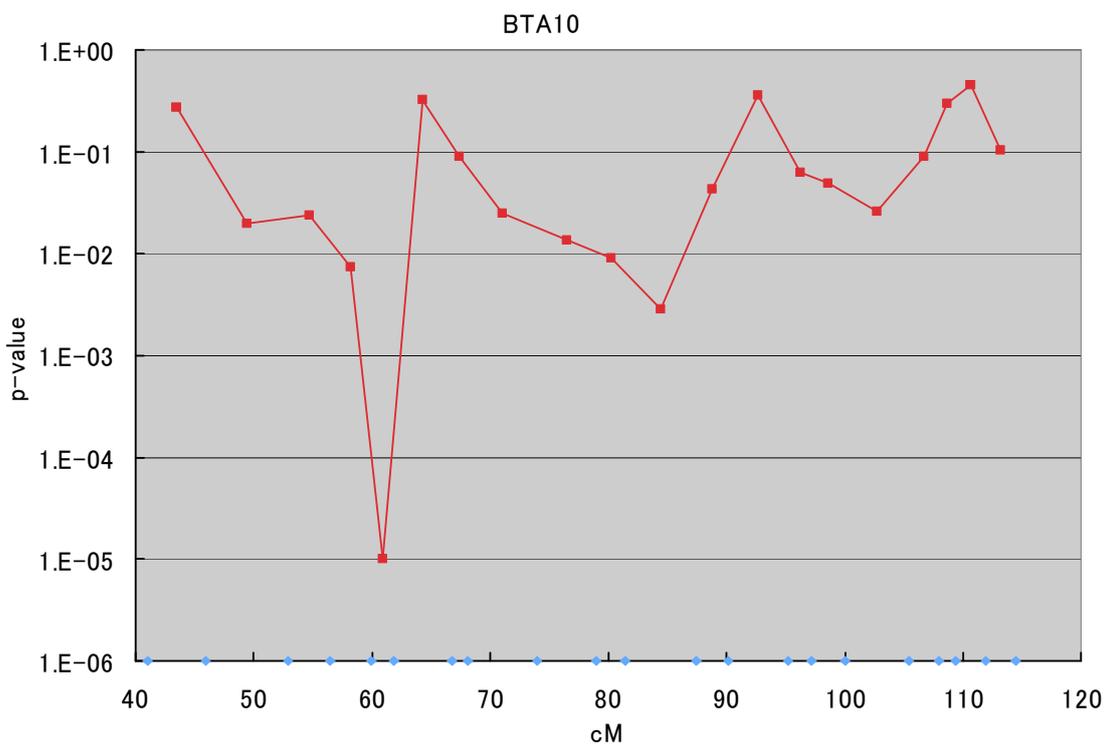


図 11. マイクロサテライトマーカーを用いたファインマッピング

### 3. 問題点の考察

- ・ サンプル集団の構造化

両極端集団のHighとLowで半きょうだい数が十分にマッチングできていない。半きょうだい数が多く（最大 17 頭）、構造化の大きい集団となっている。

- ・ Affymetrix ウシ 10K SNP Array 自体の問題

マーカー間隔が広い領域が多く、BTA 10 で検出された SNP の近傍でも 200 kb から 1 Mb のギャップがあり、取りこぼしている領域が多数あると考えられる。

- ・ 構造化の補正に問題

EIGENSTRAT による補正後も  $\lambda_{GC}$  が大きく (1.45)、十分な補正ができていない。Genomic Control による補正量が大きいため検出力が低下し、真に関連のある SNP が偽陰性となっている可能性も考えられる。

EIGENSTRAT の主成分分析による補正を行うには SNP 数が 571 個では少ないのかもしれない。

### (3)-2. Illumina ウシ 50K Chip

Illumina 社は、国際ウシゲノム解析コンソーシアムと共同で、次世代型 DNA シークエンサーによるホルスタイン、アングス、その他交雑肉牛品種の部分的なリシーケンシングを行い、120,000 個 (120K 個) の SNP を開発した。それらの中から (i) 型判定が容易、(ii) 多型性が高い、(iii) ゲノム上に満遍なく位置付けられる 50,000 (50K) 個の SNP を選んでチップ化した。2007 年 12 月にウシ 50K SNP Chip として市販を始めた。

#### 1. 2つの SNP Array/Chip の比較

解析に用いることのできる SNP (マイナーアリル頻度  $MAF \geq 0.01$ ) は、6,441 個 (Affymetrix ウシ 10K Array) から 40,693 個 (Illumina ウシ 50K Chip) に増加した (表 3、図 12)。最大ギャップも 13.4 Mb が 1 箇所、その他は 3 Mb 以内で、ゲノムカバー率も大きく向上したと考えられる。

表 3 ウシ SNP array/chip の比較

	Affymetrix ウシ 10K Array*		Illumina ウシ 50K Chip
	黒毛和種 87 頭	ホルスタイン種 85 頭	黒毛和種 309 頭
Assay Call Rate > 85%	8,751	8,847	51,360
MAF* $\geq 0.05$	6,225	7,441	35,153
Gaps (1-5 Mb) on the bovine genome assembly	761	695	7

\*歩留まり率 : DNA の質のレベルで 89.6%パス (349 頭/368 頭、4 回試験)。1 個の SNP に付き 85%以上のデータが取れてない SNP は削除 (88.0%)。合計で 78.8%。黒毛和種 87 頭の結果は脂肪壊死解析の正常群として使用。

\*MAF, マイナーアリルの頻度

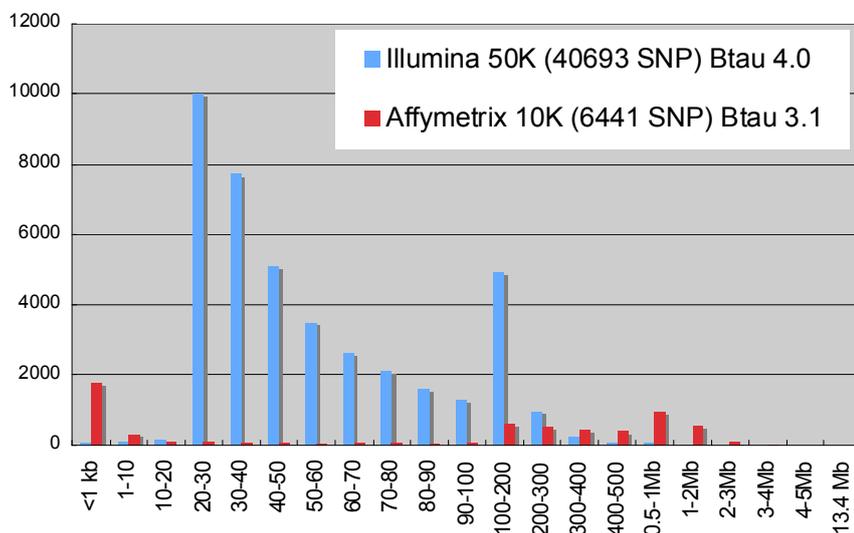


図 12. SNP マーカー間隔の比較

## 2. 黒毛和種腹腔内脂肪代謝のゲノムワイド関連解析

黒毛和種において腹腔内脂肪代謝の異常は、腎周囲や腸管に硬化した脂肪蓄積をもたらすいわゆる脂肪壊死を引き起こす。加齢と共に発症しやすくなると言われており、種雄牛や繁殖雌牛にとって大きな問題となってきた。比較的若年で出荷される肥育牛であっても、時として発症することがある。特定の系統に多発することから、遺伝的要因が大きいことが推定されてきた。しかしながら、家系を作成することは困難なため、脂肪壊死感受性遺伝子座を特定されて報告はされていない。当研究所は、この脂肪壊死の問題に取り組むため、「これまでに各地の NOSAI に依頼して脂肪壊死が主因の死廃牛を約 500 頭集めてきた。この集団を対象としてゲノムワイド関連解析を行った。

### 2-1. 材料・方法

#### ・解析サンプル

Case : 脂肪壊死が主因の死廃牛、または重篤な症状の個体を 7 県の NOSAI お

よび畜産試験場から収集した。4歳以上の雌を繁殖群、3歳未満を肥育群とした。Control；脂肪壊死の症状が確認されていない健常牛、22県の共同研究機関から6歳以上の繁殖雌牛であって、直腸検査で壊死を検出できない個体。また、肥育群として、山形NOSAIと鹿児島県の協力で肥育牛を収集。父親、あるいは母方祖父がCaseとControlで共通とし、半きょうだいはCaseとControlで各5頭以内とした（表4）。

表4. 脂肪壊死関連解析に用いたサンプル内訳

	繁殖群	肥育群	合計
Case	87	55 (22)	142
Control	85	82 (32)	167
合計	152	137 (54)	309

（去勢の頭数）

・ Illumina ウシ 50K SNP chip

SNP 数 54,001 個

型判定できた SNP の割合：Assay Call Rate  $\geq$  95%

SNP の多型性指標、マイナーアレル頻度（Minor Allele Frequency）：MAF  $\geq$

0.01

ハーディ・ワインバーグ（H.W）平衡検定の  $P \geq$  0.001

利用できる SNP 数：40,000 個

隣り合う 2 マーカー間距離の平均値…63.4  $\pm$  60.0 kb（1 bp～2.08 Mb）

マーカー間距離が 1 Mb 以上のマーカーペアの割合…0.01%

## 2-2. 結果

未補正の Genomic Control（GC）の  $\lambda$  は 1.56 で、PLINK を用いた補正を別々に行い、Cochran-Mantel-Haenszel test でアレル頻度の偏りを検定したところ、 $\lambda = 1.04$  と改善された。検定した結果、BTA 3 の 2 個の SNP が  $P = 5.1 \times 10^{-6}$ 、 $7.5 \times 10^{-6}$  で帰無仮説からの乖離が見られた（図 13、14）。2 つの SNP は完全連鎖不平衡（LD）状態にあり、約 76 kb の LD ブロックを構成していた（図 15）。このブロック内の遺伝子については、ヒトの内臓脂肪における発現量が Body Mass Index（BMI）と負の相関があると報告されている。

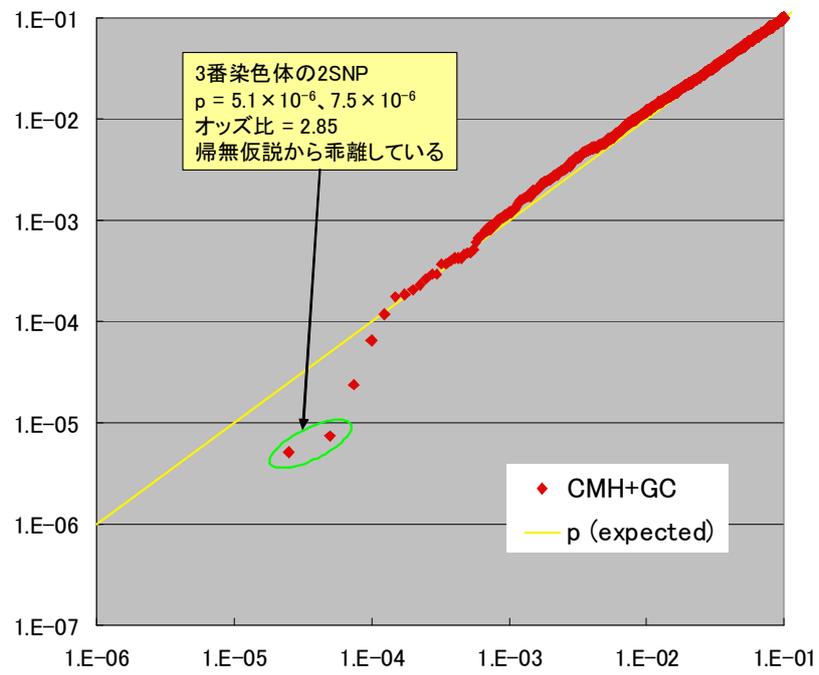


図 13. 脂肪壊死関連解析の Q-Q plot

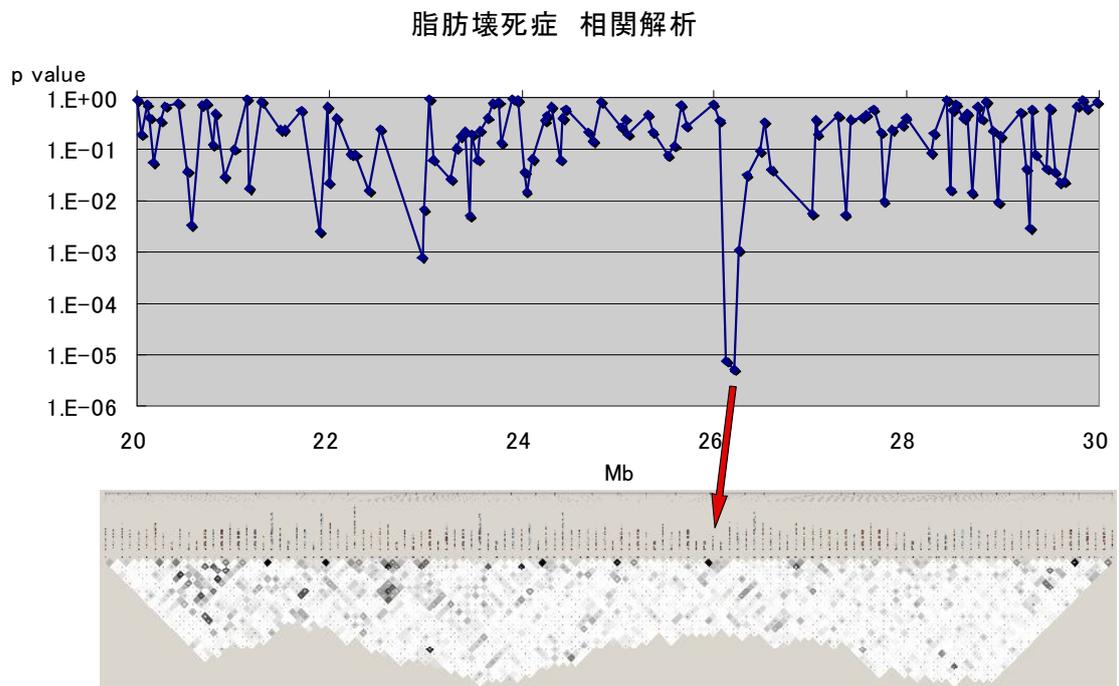


図 14. 脂肪壊死の連関解析

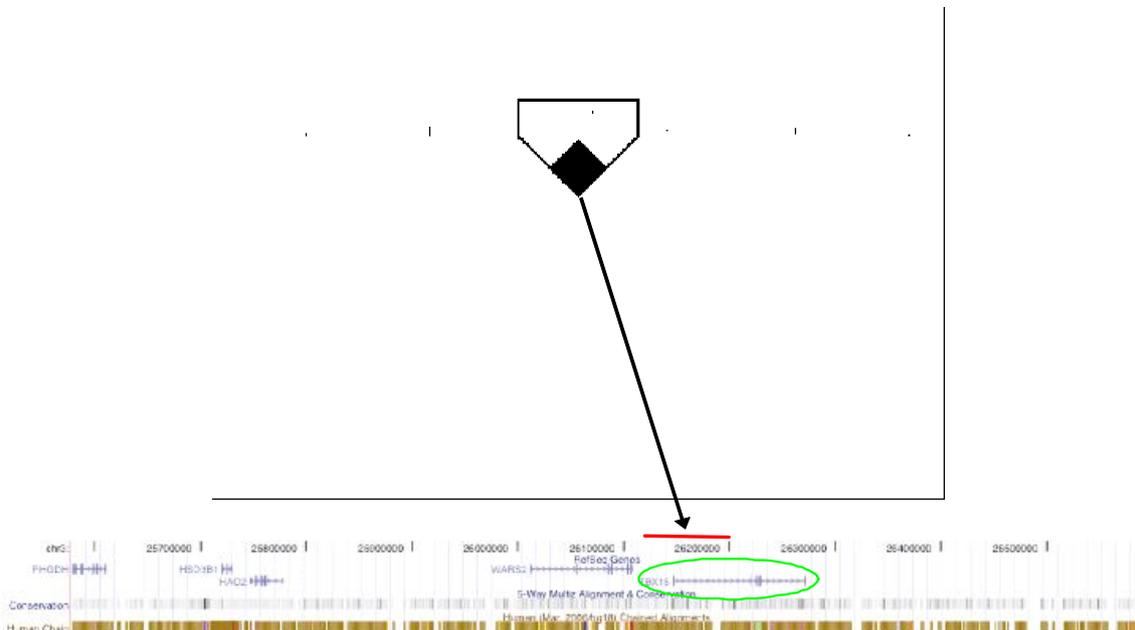


図 15. マッピングした LD ブロック

### 2-3. 考察

これまでウシの脂肪壊死感受性領域をマッピングした報告は無い。500 頭程度の Case 群の規模であっても、50K SNP を使用すれば感受性領域が検出できることが明らかとなった。マーカーを追加した 2 次スクリーニングで確認する必要があるが、Genomic Control の  $\lambda$  が 1.04 とほぼ 1 であったことから擬陽性の可能性は少ないと考えられる。

なぜ、1 カ所だけしか検出できなかったのかという問題が残る。この領域のオッズ比は 2.85 と高いので、効果の大きな QTL だけが検出されたのかもしれない。効果のより小さい QTL を検出するには、集団のサイズを大きくし、SNP マーカーの質（高い多型性：MAF > 0.3）と量（50K ではなく 100K か 200K 以上のマーカー数）の改善が必要とされるだろう。検出された SNP の抵抗型アレルの頻度は低いので、この SNP による選抜は有意義かもしれない。

### 3. 黒毛和種脂肪交雑のゲノムワイド関連解析

脂肪壊死感受性領域についてオッズ比 2.85 の SNP が検出されたが、このオッズ比は効果の大きさ・寄与率に換算することができない。そこで家系解析によって効果の大きさの判明している脂肪交雑 QTL をポジティブコントロールとして 50K SNP Chip の有効性を調べた。

東京芝浦市場と大阪南港市場から収集した肥育去勢牛について、脂肪交雑 BMS No の上位と下位 10% ずつからサンプルを選抜し、ゲノムワイド関連解析を行った。

#### 3-1. 材料・方法

##### ・解析サンプル

表 5. 脂肪交雑関連解析に用いたサンプル内訳

	東京芝浦	大阪南港	合計
BMS_High	184	119	303
BMS_Low	180	123	303
合計	364	242	606

BMS\_High : 上位 10%、BMS No. 10 以上

BMS\_Low : 下位 10%、BMS No. 4 以下

市場別に、BMS 上位・下位で半きょうだいをマッチさせるように個体を選び、上位と下位で 303 頭ずつ、合計 606 頭を解析に用いた（表 5）。High と Low で父方半きょうだいをマッチングさせ、芝浦・南港合わせて 8 頭以内になるようにサンプル選抜した。

##### ・Illumina ウシ 50K SNP Chip

SNP 数 54,001 個

型判定できた SNP の割合 : Assay Call Rate  $\geq$  95%

SNP の多型性指標、マイナーアレル頻度 (Minor allele frequency) : MAF  $\geq$  0.01

ハーディ・ワインバーグ (H.W) 平衡検定の  $P \geq 0.001$

利用できる SNP 数 : 40,000 個

隣り合う 2 マーカー間距離の平均値…63.4 ± 60.0 kb (1 bp~2.08 Mb)

マーカー間距離が 1 Mb 以上のマーカーペアの割合…0.01%

### 3-2. 結果

まず PLINK で脂肪壊死サンプルと同様に統計解析を行ったが、母方の血統の偏りによってクラスタリングでは構造化を補正できなかった可能性がある。そこで EIGENSTRAT プログラムを用いて主成分分析による補正を行った。Armitage's Trend Test で遺伝子型頻度の偏りを検定し、相加的モデル・優性モデル・劣性モデルを比較した。SNP ごとに最も  $P$  値が小さくなるモデルを選択した。この補正で Genomic Control の  $\lambda = 1.39$ — $1.53$  から  $\lambda = 1.06$ — $1.14$  と改善された。

連関解析の結果、BTA 4、BTA 19、BTA 23 で有意な SNP を検出した (図 16)。特に BTA 4 の SNP は  $P = 6.1 \times 10^{-7}$  でボンフェローニの補正を考慮しても  $\alpha = 0.05$  で有意であった。BTA 4 の SNP は近傍の SNP と約 500 kb の範囲に LD ブロックを構成しており、この領域は家系解析で検出された脂肪交雑 QTL の近くに存在していた (図 17)。

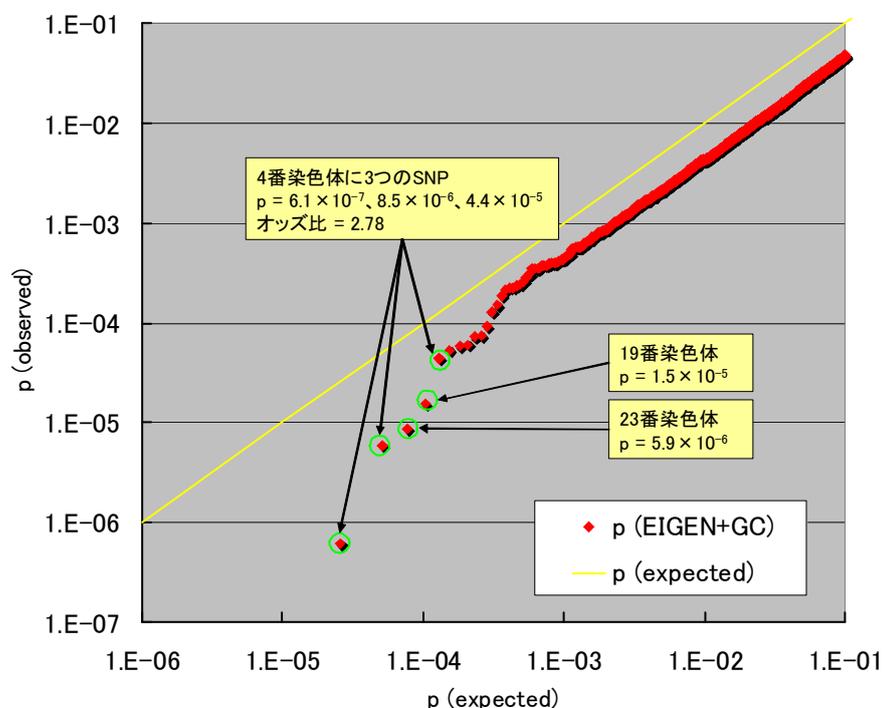


図 16. 脂肪交雑の Q-Q profile

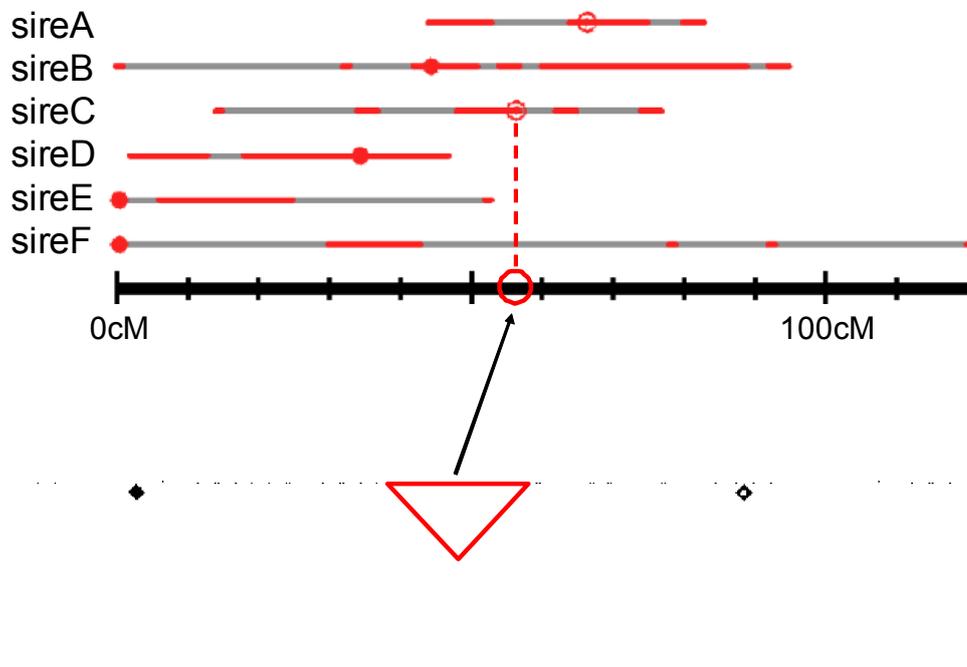


図 17. 家系解析による脂肪交雑 QTL 領域と LD ブロック

### 3-3. 考察

ウシ 50K SNP Chip を用いたゲノムワイド連鎖解析により、脂肪交雑と関連のある SNP がいくつか検出された。血統を考慮したサンプリングやプログラムを用いた補正により、集団の構造化の影響を低減することができ、黒毛和種一般集団を対象とした相関解析が有効な手法であると考えられた。しかし、現在のサンプル数 300—600 頭で検出できるのは効果の大きい SNP が数個程度であるため、効果の小さい（オッズ比で 1.5 以下）SNP を多数検出するにはさらに解析頭数を増やす必要があると考えられる

黒毛和種について、50K SNP の多型性は他品種とほぼ同等で、枝肉重量 QTL のように他品種にも存在している QTL の解析には有効であるが、脂肪交雑のように黒毛和種に特有の形質のマッピングについては、その有用性を早期に検証する必要がある。また、黒毛和種では互いの個体に血縁関係があるために集団の構造化が起こりやすく、解析個体の選択に工夫が必要であることがわかってきている。種々の解析方法を試み、解析法を確立する必要がある。

### (3)-3. SNP を用いた研究の国内外の状況

連鎖不平衡 LD は、これまで、ベルギーやイスラエルで経済形質のファインマッピングの手法として使われてきた。Kirkpatrick ら（Wisconsin 大）は、市販されている Affymetrix ウシ 10 K SNP Array を用いて、乳牛の双子産率を 9 家系の父方半きょうだい家系で連鎖-連鎖不平衡マッピングを行い、以前に半きょうだい家系でマッピングした 5 番染色体の同じ領域に QTL を見出した。

Illumina ウシ 50K SNP Chip は、開発に携わった研究者に対し市販より半年前にリリースされており、彼らが研究面でも先行しているように思われる。この SNP Chip を用いて、アメリカでは、ホルスタイン種の種雄牛選抜を、従来の育種価による選抜からゲノム選抜 (Genomic Selection) に移行しようとしている。ゲノム選抜というのは、種雄牛数千頭についての遺伝子型と育種価との相関を基に各 SNP の遺伝子型にスコアを付けておき、種雄牛候補牛の能力を遺伝子型によるスコアで評価し、選抜するというものである。ある程度の正確度が保たれれば、育種価選抜に比べて、後代の成績を得るまでの時間やコストを削減できるのでメリットは大きいらしい。遺伝子型検査にかかる費用を減らすために、効果の大きい方から 384 個の SNP を用いて種雄牛の能力を推定するという。Taylor ら（ミズーリ大）はアンガス種の種雄牛約 2,000 頭のタイピングを行い、脂肪交雑については 129 個の SNP で 59% の遺伝分散が説明できるとしている。

Charlier ら（2008）は、多数の SNP を 5 種の劣性遺伝病解析に使い、3 種の遺伝子にそれぞれ原因となるアミノ酸変異を見出した。発症個体において見られる連続した多型性のない SNP 領域を捜し、共通する領域を探索する方法である。正確な臨床的観察がなされていることが条件となる。

ウシゲノム配列はほぼ解読されたので、今後は何頭かの全配列を解読して多数の SNP を開発する段階となった。各品種間あるいは各品種内のゲノム配列を詳細に比較することで新たな知見が得られる期待がある。

### (4) 今後の進め方

本事業の実施によって、黒毛和種でもホルスタイン種でもゲノムワイド連鎖解析が有効な手法として活用できることが明らかになった。今後さらに SNP の開発が進み、マーカーアレイ/チップの解析のパワーはアップし、型判定も容易になり、解析のコストも軽減されていくことは間違いないだろう。したがって、これから重要になるのは、解析のためのサンプル収集である。これまでに家系

解析で取り組みが困難であった繁殖性・抗病性などの解析のためのサンプル収集を組織的に取り組んでいかねばならない。

#### (5) 参考文献

Mizoshita, K., Hayashi, H., Kubota, T., Yamakuchi, H., Todoroki, J., Watanabe, T., Sugimoto, Y. Quantitative trait loci analysis for growth and carcass traits in a half-sib family constructed from a commercial population of purebred Japanese Black (Wagyu) cattle. (2004) *J. Anim. Sci.*, **82**: 3415-3420..

Mizoguchi, Y., Watanabe, T., Fujinaka, K., Iwamoto, E., Sugimoto, Y. (2006) Mapping of quantitative trait loci for carcass traits in a Japanese Black (Wagyu) cattle population. *Animal Genetics*, **37**: 51-54.

Takasuga, A., Watanabe, T., Mizoguchi, Y., Hirano, T., Ihara, N., Takano, A., Yokouchi, K., Fujikawa, A., Chiba, K., Kobayashi, N., Tatsuda, K., Oe, T., Furukawa-Kuroiwa, M., Nishimura-Abe, A., Fujita, T., Inoue, K., Mizoshita, K., Ogino, A., Sugimoto, Y. (2007) Identification of bovine QTL for growth and carcass traits in Japanese Black cattle by replication and identical-by-descent mapping. *Mammalian Genome*, **18**: 125-136.

Charlier, C., Coppieters, W., Rollin, F., Desmecht, D., Agerholm, J. S., Cambisano, N., Carta, E., Dardano, S., Dive, M., Fasquelle, C., Frennet, J. C., Hanset, R., Hubin, X., Jorgensen, C., Karim, L., Kent, M., Harvey, K., Pearce, B. R., Simon, P., Tama, N., Nie, H., Vandeputte, S., Lien, S., Longeri, M., Fredholm, M., Harvey, R. J., Georges, M. Highly effective SNP-based association mapping and management of recessive defects in livestock. (2008) *Nature Genetics*, **40**: 449-454.

## 第 4 章 学会発表

1. Watanabe, T., Ideta, A., Mizoguchi, Y., Aoyagi, Y., Sugimoto, Y.: Whole-genome LD mapping of bovine QTL that control superovulatory response of ovary using microsatellite markers. *30<sup>th</sup> International Conference on Animal Genetics*. 第 30 回国際動物遺伝学会大会、2006 年 8 月、ポルトセグロ、ブラジル。
2. 西村翔太、高須賀晶子、渡邊敏夫、杉本喜憲：SNP を用いたゲノムワイド連関解析によるウシ脂肪交雑 QTL のマッピング。第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会、2007 年 12 月、横浜。

### 学会発表 1.

題目：Whole-genome LD mapping of bovine QTL that control superovulatory response of ovary using microsatellite markers. (マイクロサテライトマーカーを用いたウシ過排卵処理反応性 QTL の全ゲノム LD マッピング)

発表者：T. Watanabe<sup>1</sup>, A. Ideta<sup>2</sup>, Y. Mizoguchi<sup>1</sup>, Y. Aoyagi<sup>2</sup>, Y. Sugimoto<sup>1</sup>

所属：<sup>1</sup> 畜技協・動物遺伝研、<sup>2</sup> 全農 ET セ

要旨：過排卵処理反応性に関する遺伝因子を探索し、ウシの繁殖製を向上させる目的で、マイクロサテライトマーカーを用いた全ゲノムを対象とした QTL の LD マッピングをおこなった。FSH により過排卵処理をおこなった 703 頭の黒毛和種メスから表現型値が両極端のもの、すなわち排卵数の平均値が上位のものと同位のもの 96 頭ずつを選択した。染色体 1~29 番および X の 1,073 個のマイクロサテライトについてこれら個体の型判定をおこなった。上位および下位集団における隣接する 2 マーカーからなるハプロタイプの頻度推定をそれぞれおこない、Fisher 正確検定によりハプロタイプの偏りを検定した。17 カ所において有意な結果( $P < 10^{-3}$ )を得、うち 7 カ所においては  $P < 4.8 \times 10^{-5}$  となる非常に有意な結果を得た。6 カ所についてマーカーを追加して検査したところ、うち 4 カ所について強い相関が維持された。興味深いことにこのうち 2 カ所はプロスタグランジン合成経路に関わる遺伝子座の近傍であった。プロスタグランジンは卵成熟、排卵、マウスにおけるリッターサイズに関与することがすでに報告されている。われわれは家畜動物種においてはじめてマイクロサテライトによ

る QTL の全ゲノム LD マッピングに成功した。これらのマーカーは過排卵処理反応性に関するより正確な選別基準を与えうるであろう。

(国際動物遺伝学会第 30 回大会、2006 年 8 月、ブラジル)

学会発表 2.

発表者：西村翔太<sup>1</sup>、高須賀晶子<sup>1</sup>、渡邊敏夫<sup>1</sup>、杉本喜憲<sup>1</sup>

所属：<sup>1</sup> 畜技協・動物遺伝研

要旨：演者らは黒毛和種牛の脂肪交雑 QTL のマッピングを目的として、ゲノムワイドの相関解析を行った。脂肪交雑基準値 (BMS. No. 1-12) に関して、屠場で収集した去勢牛 1 万 3 千頭の上位と下位それぞれ約 5% の集団から 192 頭ずつ 384 頭を抽出した。半兄弟は各集団で 10 頭以内になるようにした。これらの個体について、10K SNP Array (Affymetrix) のタイピングを行い、上位 158 頭、下位 157 頭の計 315 頭と、6441 個の SNP について解析した。集団の構造化の補正を行うために EIGENSTRAT のプログラムを用いて主成分分析を行い、上位と下位の集団で有意差のある成分について補正した。解析の結果、10 番染色体上に位置する SNP の  $P$  値が  $3.8 \times 10^{-6}$  と最も低かった (Armitage's Trend Test)。これを Genomic Control で補正した値は  $1.2 \times 10^{-4}$  であった。ゲノムワイド解析に用いた個体 384 頭について、シーケンシングでこの SNP のタイピングを行い  $2 \times 2$  表で Fisher の正確検定を行ったところ、 $P = 3.16 \times 10^{-7}$  であった。この SNP を含む領域に半きょうだい家系解析ですでに脂肪交雑 QTL (染色体レベル、 $P < 0.05$ ) が検出されているので、この SNP の周辺約 1.8 Mb に 450 kb 間隔でマイクロサテライトマーカー 5 個を配置し、384 頭について  $2 \times n$  表で Fisher の正確検定を行ったところ、SNP を含む領域で  $P$  値が最も低かった ( $P = 9.0 \times 10^{-4}$ )。家系解析で得られている BMS を高めるハプロタイプ  $Q$  とその対立ハプロタイプ  $q$  の頻度を比較すると、 $Q$  ハプロタイプ頻度は上位集団で 0.21、下位集団で 0.13 であったのに対し、 $q$  ハプロタイプ頻度は上位集団で 0.13、下位集団で 0.22 であった。家系解析で検出された QTL 領域とゲノムワイド相関解析で検出された SNP の位置が一致したことから、この領域に脂肪交雑 QTL が存在することが確認された。

(第 30 回日本分子生物学会年会、2007 年 12 月、横浜)