

選抜マーカーの作出と新品種育成システムの開発（第III報） —脂肪の品質に関するQTL解析—

新居雅宏・柏岡 静・林 武司*・森 直樹

要 約

脂肪の品質は食味のみならず栄養面にも大きな影響を与える重要な肉質を決定する要因である。本研究では脂肪の品質について日本イノシシと大ヨークシャー交雑家系におけるQTL解析を実施し、イノシシと大ヨークシャー間に存在する遺伝的差異を決定するゲノム領域を検索した。目的とする形質には脂肪の品質の指標として重要かつ脂肪の構成要素である脂肪酸組成（C14:0, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, other PUFAs）と脂肪融点を選定した。その結果、13領域に17形質の5%ゲノムワイズレベルで有意性を示す25個のQTLを検出した。そのうち、12形質10領域に位置づけられた16個のQTLは1%ゲノムワイズレベルの有意性を示した。これらの結果の多くは、今まで世界的に報告のない新規のQTLであることが示唆された。

背脂肪における飽和脂肪酸に關与するQTLはSSC1p, SSC9およびSSC15に位置づけられた。同じく背脂肪における不飽和脂肪酸に關与するQTLはSSC1p, SSC1q, SSC4, SSC5, SSC9, SSC15およびSSC17に位置づけられた。これらのうち、SSC5のQTLのみ、イノシシ由来のアリルが不飽和脂肪酸を増加させる効果として検出された。また、背脂肪厚を共変数として補正した回帰モデルにより解析したとき、SSC4とSSC17のリノール酸組成のQTLは有意レベルを下回った。一方、背脂肪厚により補正した解析を行うことで、SSC5に新たな有意レベルのQTLを検出した。

腹腔内脂肪における脂肪酸組成に關与するQTLはSSC2, SSC3, SSC4, SSC5, SSC6, SSC14, SSC16およびSSCXに位置づけられた。これらのうち、SSC2, SSC14およびSSC16のQTLのみイノシシ由来のアリルが飽和脂肪酸を増加させる効果として検出された。F2の表現型では飽和脂肪酸組成の割合は、腹腔内脂肪が最も多く、次に背脂肪内層、最後に背脂肪外層の順である。しかし、背脂肪では、イノシシ由来のアリルが飽和脂肪酸を高める効果を持つQTLが多く検出されたのに対し、腹腔内脂肪では逆の効果を持つQTLが多く検出された。

背脂肪における脂肪の融点はSSC1, SSC2, SSC15に、腹腔内脂肪ではSSCXに検出された。SSC1およびSSC15に位置づけられたQTLにおけるイノシシ由来のアリルの効果は融点を上げる効果を示したのに対し、SSC2およびSSCXのQTLは下げる効果として検出された。

これらのことより、SSC1, SSC9およびSSC15におけるイノシシ由来のアリルは背脂肪の飽和脂肪酸組成を高め、また、SSC2におけるイノシシ由来のアリルは背脂肪の脂肪融点を下げる効果を示すことから、DNAマーカーアシストイントログレーションによるブタ脂肪の遺伝的品質改良が期待される。

目 的

ブタにおいて体内に蓄積された脂肪は、生体時にはエネルギー源として重要であり、屠殺後には量的、質的に評価され、枝肉の商品価値を左右する重要な要因となる。脂肪は食べたときに感じる風味の重要な決定要因として（CameronとEnser, 1991; LawrenceとFowler, 1997）、さら

には食感（IrieとOhmoto, 1985）にも影響を与えることが報告されている。脂肪はグリセロールに3個の脂肪酸がエステル結合したトリアシルグリセロールである。脂肪に含まれる脂肪酸の割合（脂肪酸組成）は畜種、部位等で大きく異なり、脂肪の品質の重要な決定因子である。脂肪酸の中でも二重結合が2カ所以上に存在するリノール酸以上の不飽和脂肪酸が多いとオフフレーバーにな

*(独)農業生物資源研究所家畜ゲノム研究チーム

り、消費者から敬遠される (LawrenceとFowler 1997)。また、多価不飽和脂肪酸は空気中で非常に酸化されやすく過酸化物を生じる。過酸化物は分子内にペルオキシ結合を持ち、酸化力が強く、不安定なものが多い。過酸化物は食品脂質の栄養低下や腹痛の原因、あるいは各種成人病の引き金ともなる。

日本では、市販の一般的な飼料と異なる特殊飼料を給与し、豚肉の差別化を図った銘柄豚が100種類以上も存在する (銘柄豚ハンドブック, 2005)。単胃動物であるブタは、飼料中の脂肪酸により脂肪中の脂肪酸組成を大きく変化させることはよく知られており (Lizardoら, 2002)、銘柄豚はこの性質に注目し、地域毎の独自性と美味しさを追求している。しかしながら、ブタの脂肪酸組成には遺伝的な差も存在し、脂肪酸組成は環境要因と遺伝的要因により決定されていることが報告されている (Suzukiら, 2003)。また、脂肪酸組成に関わるQTL解析の報告も少ないが存在する (Perez-Encisoら, 2000; Grindflekら, 2001; Clopら, 2003)。これらの中でClopらは、イベリコ豚とランドレースの交雑家系を用いて複数のQTLを検出している。イベリコ豚は統計的手法を用いて改良されておらず (Serraら, 1998)、遺伝的に欧米種と離れているためQTLが多く検出されたことが示唆されている。

一方、遺伝的に欧米種と大きく離れている日本イノシシの脂肪は、不飽和脂肪酸が多く、融点が低いため柔らかいという報告 (岸田ら, 1983) と、逆に飽和脂肪酸が多いという報告がある (久家, 2002)。岸田ら (1983) は、構造脂肪酸に対する遊離脂肪酸の割合、および脂肪中のタンパク質含量がブタと異なることを報告した。しかし、日本イノシシを材料とした生化学的な研究は少ない上に、その結果の方向性も一貫していない。日本イノシシは地域によって食性が異なり、同じ地域でも、年齢、と殺条件、性別等が異なることがその要因と推察される。更にイノシシをブタと同様に

飼育することは困難であることから、イノシシの脂肪酸組成に関する遺伝能力は明らかになっていない。

イノシシとアワヨークの交雑家系における脂肪の品質に関するQTL解析の結果は既報 (新居ら, 2002) において簡単に報告した。今回、使用したDNAマーカーの数を207個から242個に増やすことで解析の精度を高め、また、QTL領域における候補遺伝子の考察を行った。さらに背脂肪厚を共変数として補正したモデルによる解析を実施することで、脂肪蓄積に関わる遺伝子とは独立して脂肪酸の生合成あるいは分解に関与するQTLの検出を試みた。得られたQTL情報はDNAマーカーアシストイントログレッションにより改良に利用すると共に日本イノシシの遺伝的な脂肪の特性を理解する上で有用な情報となることが示唆される。

材料および方法

1) 実験家系の作成および形質の測定

実験家系は既報のとおりである (新居ら, 2002)。試料は第6～7胸椎間のロースに付随する背脂肪および腎臓周囲の腹腔内脂肪より調整した。背脂肪は、最長筋に近い側から背脂肪内層、背脂肪外層に分離し、腹腔内脂肪と併せた合計3カ所の脂肪について、脂肪酸組成および脂肪の融点を測定した。

(1) 脂肪酸分析

約50 mgの試料を12 mlの小試験管にとり、0.5M NaOHメタノールを1 ml添加し、15分間95℃でケン化した。冷却後、三フッ化ホウ素メタノール水溶液 (和光純薬) を1 ml加え、10分間95℃でエステル化した。再度、冷却後、飽和食塩水2.5 ml、N-ヘキサン (和光純薬) を2 ml加え、振倒機で10分程度激しく振倒した。1晩5℃で保持した後、明瞭に分離した上層のヘキサン相1 μlをガスクロマトグラフィーに注入した。脂肪酸は脂肪酸標準物質 (スペルコ, PUFA2) とリテ

ンションタイムを比較することにより、ミリスチン酸 (C14:0)、パルミチン酸 (C16:0)、パルミトオレイン酸 (C16:1)、ステアリン酸 (C18:0)、オレイン酸 (C18:1 n9) + バクセン酸 (C18:1 n7) [C18:1]、リノール酸 (C18:2)、リノレン酸 (C18:3 n3) + イコセン酸 (C20:1 n9) + アラキドン酸 (C20:4 n6) + ドコサペンタエン酸

(C22:4 n6) + ドコサヘキサエン酸 (C22:6 n3) [C18:2] を同定した。ガスクロマトグラフィー GC14A (島津製作所) を用い分析条件は表 1 のとおりである。

(2) 脂肪融点の測定

脂肪融点は上昇融点法により測定した。

表1. ガスクロマトグラフィーの定性条件

使用カラム: Superko Omegawax 320, 30m x 0.32mm
検出器温度: Detector 280° C, Injection 260° C
昇温プログラム: カラム初期温度 180° C, 昇温率 4° C/min, 最終温度 250° C
キャリアーガス: ヘリウム (流量 26 cm/sec)
Make up ガス: 窒素 (Split ratio = 30:1)

2) ゲノムスキャン

(1) DNA マーカー

DNA マーカーは、USDA-MARC の連鎖地図 (Rohrer ら、1996) の 500 個のマイクロサテライト DNA マーカーについて、親および F1 世代のアリル型を調べた。それらのうち、利用可能と判定した 247 個を選択し、F2 世代についてタイピングした。また、AMP-activated protein kinase gamma subunit (PRKAG3: AF214521) のイントロン部にシトシンリピートに親世代で差のある配列を検出し、多型として識別できるプライマーを設計し、DNA マーカーとして使用した (PRKAG3: Forward 5'-AGGAGCACACCTGCTACGAT-3', Reverse 5'-AGTTGCAGAGCGGGATGAC-3')。

(2) 連鎖地図

連鎖地図の作成には、CRI-MAP (Green ら、1990) を用いた。CRI-MAP では、雄個体、雌個体それぞれでの配偶子形成における組換え価の計算により、雄親および雌親における連鎖地図が別個に作成でき、雄の方が組換え価が大きく連鎖地図が長くなるが、本研究の QTL 解析においては、それらを平均した連鎖地図 (Sex averaged linkage map) を用いた。

(3) QTL 解析

既報 (新居ら、2002) の QTL 解析モデルに加え、

背脂肪厚を共変数として補正したモデルを採用した。すなわち、解析する形質における i 番目の F2 個体の表現型値 y_i について、次のような線形モデルを想定した。

$$y_i = \mu + \alpha_{s(i)} + \beta_{p(i)} + \gamma w_i + (P_{QQ^{(i)}} - P_{qq^{(i)}})a + P_{Qq^{(i)}}d + e_i \quad (1)$$

ここで、 μ は線形モデルの定数、 $\alpha_{s(i)}$ は性の効果、 $\beta_{p(i)}$ は産次の効果である。性の効果については、 i 番目の F2 個体が雄であるか雌であるかに対応して α_1 および α_2 となるが、パラメータの推定可能性を考慮して $\alpha_2 = 0$ とした。産次の効果については 7 水準に対応して、同様に $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_7$ となるが、 $\beta_7 = 0$ とした。また、 a と d は、QTL の相対効果および優性効果を表す。さらに、 w_i は共変数としてモデルに含めた他形質における i 番目の F2 個体の表現型値であり、 γ はその共変数に対する回帰係数である。QTL の検出および QTL 効果の推定については、残差平方和と (1) で $a = d = 0$ としたモデルにおける残差平方和をもとに計算された F 値を用いた。

結果および考察

1) 連鎖地図

親世代における PCR 反応の状態および多型の有無により、全部で 248 個の DNA マーカーについ

て、親、F1およびF2世代のタイピングを実施した。このうち、S0107とS0217 (SSC4)、SW70とSW436 (SSC5) およびSWR1120とSW1133 (SSC17) 間に、組換えを生じている個体が存在しなかったため、各染色体の2種のマーカーのうちS0107、SW70およびSWR1120を解析に使用した。また、SW413 (USDA-MARC map; SSC5)、SW1135 (USDA-MARC map; SSC11) およびS0076 (USDA-MARC map; SSC13) は、本家系においていずれのDNAマーカーとも連鎖しなかったために、解析から除外した。独自に開発したPRKAGIIは、SSC15セントロメアのSW2083とSW936間にマップされ、既報と同様の結果となった(Ciobanuら, 2001)。これらのことより、最終的に242個のDNAマーカーを用いて遺伝子地図を作成した結果、18の常染色体とX染色体に相当する19の連鎖地図が作成された。これらの地図の全長は、2,098.8センチモルガン(cM)、DNAマーカー間の平均距離は、8.7 cMとなった。この地図はこれまでに作成されているブタ連鎖地図、USDA-MARC map (Rohrerら, 1996) ; Nordic map (Ellegrenら, 1994) ; TonMap (Mikawaら, 1999) と比較してSSC5以外については、ゲノムのほぼ全域をカバーしてい

ると考えられる。SSC5のp末端から染色体中心部にかけてDNAマーカーを配置できなかった。本研究の連鎖地図では、SW70が0 cMとなるが、USDA-MARCマップでは、SW70は72.3 cMに位置づけられている。SSC5における0~72 cM領域には、USDA-MARCマップにおいて位置づけられているDNAマーカーの数は、わずかに7個であり (<http://www.marc.usda.gov/genome/genome.html>)、そのうち、ACR (USDA; 0 cM)、SJ024 (USDA; 0 cM)、ACO (USDA; 24 cM)、SW491 (USDA; 31.5 cM) および SWR453 (USDA; 57.9 cM) の5個のDNAマーカーは本家系において多型性に乏しく、また、SW1482 (USDA; 39.9 cM) はnullアリルが存在し、遺伝様式の判定が困難であり、これら6個のDNAマーカーは利用できなかった。一方、SW413 (USDA; 8.4 cM) の遺伝様式に矛盾はなかったが、SW70との連鎖は見られなかった。第4染色体 (SSC4) および第15染色体 (SSC15) には、ラフマッピングの結果、重要な形質のQTL候補を検出したため、ファインマッピングを目指して、一部の領域に多くのDNAマーカーを配置した。図1a~sに徳島イノシシー大ヨークシャー家系連鎖地図 (TOKU-MAP) を示す。

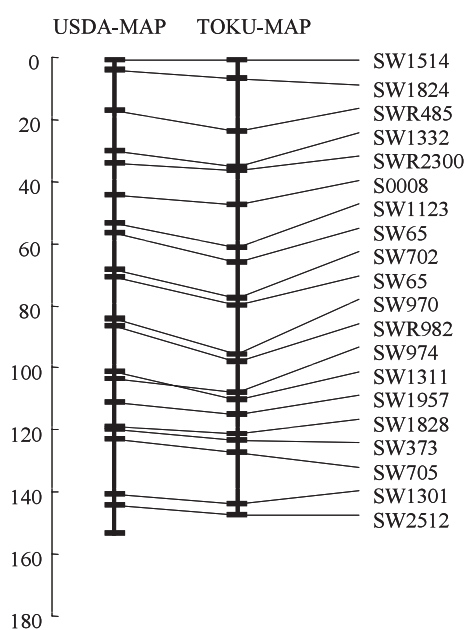


図 1a. SSC1

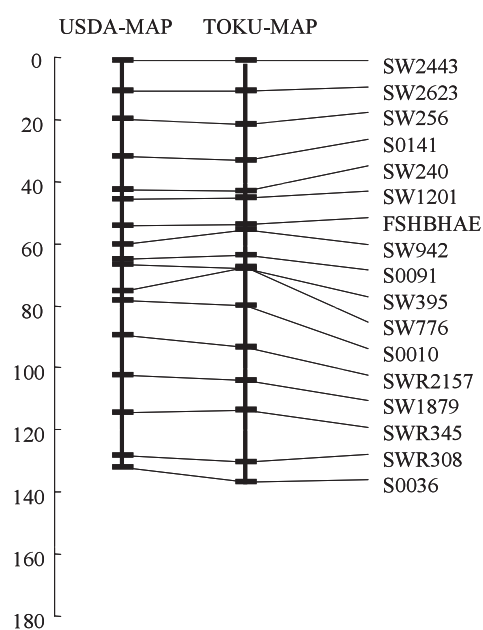
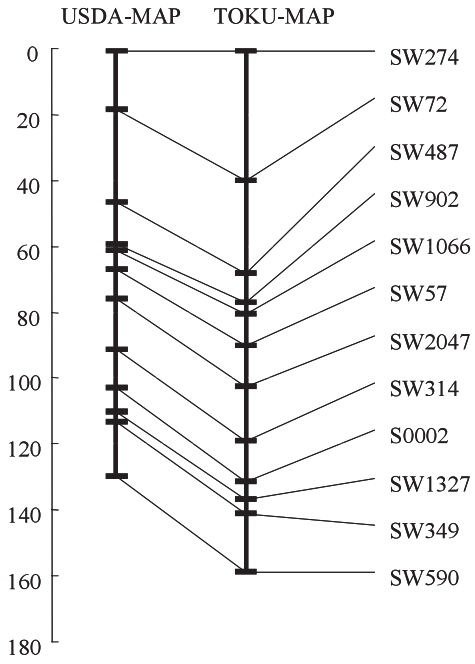
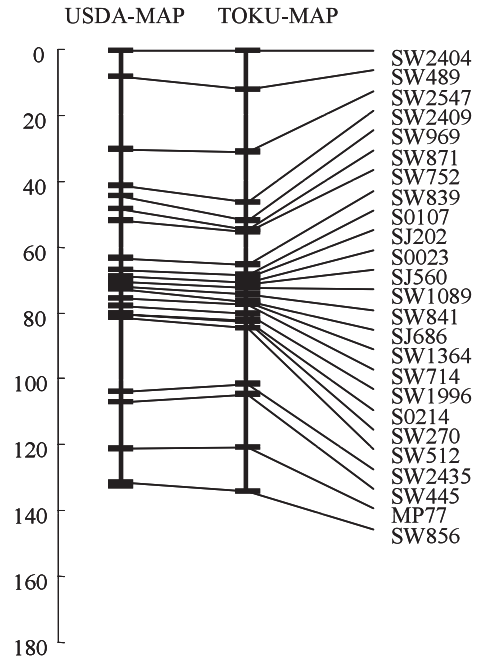


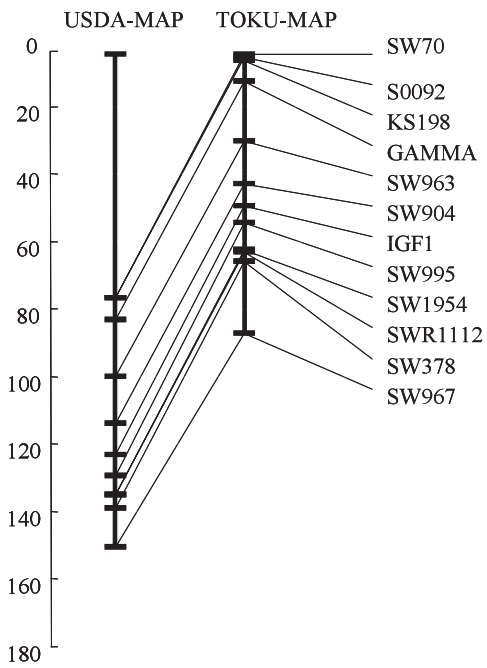
図 1b. SSC2



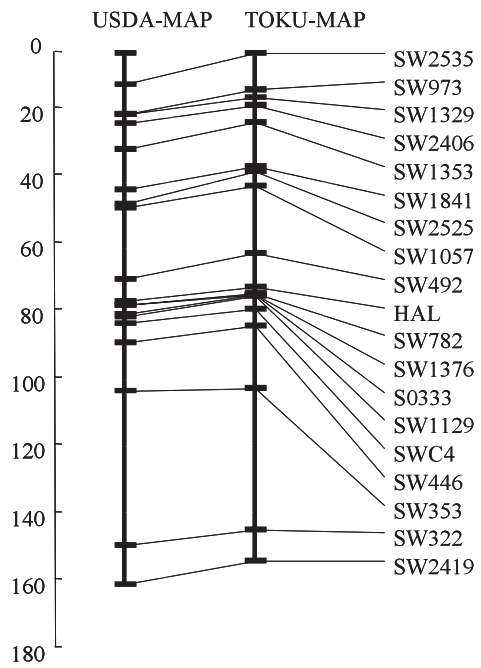
☒ 1 c. SSC3



☒ 1 d. SSC4



☒ 1 e. SSC5



☒ 1 f. SSC6

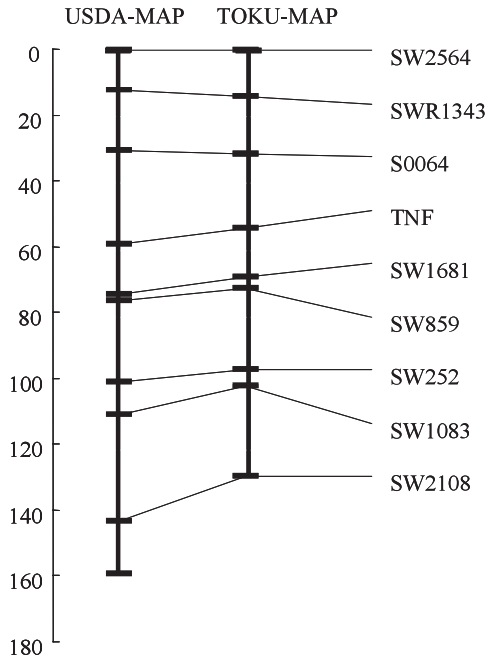


図 1 g. SSC7

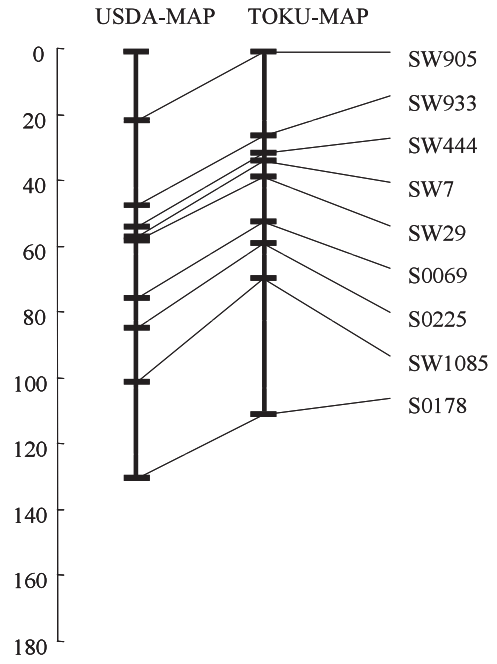


図 1 h. SSC8

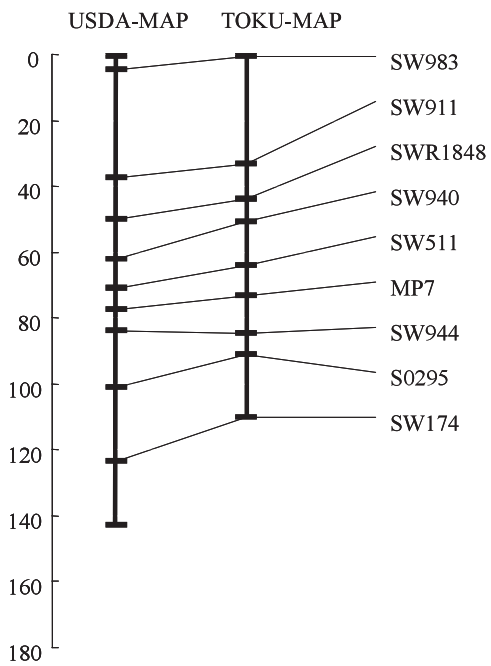


図 1 i. SSC9

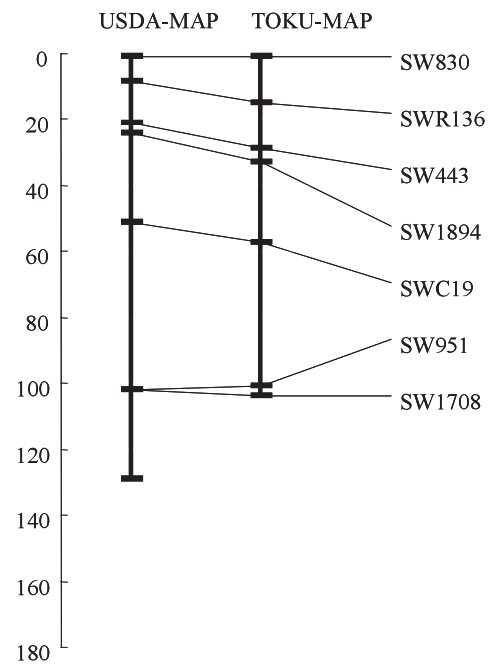
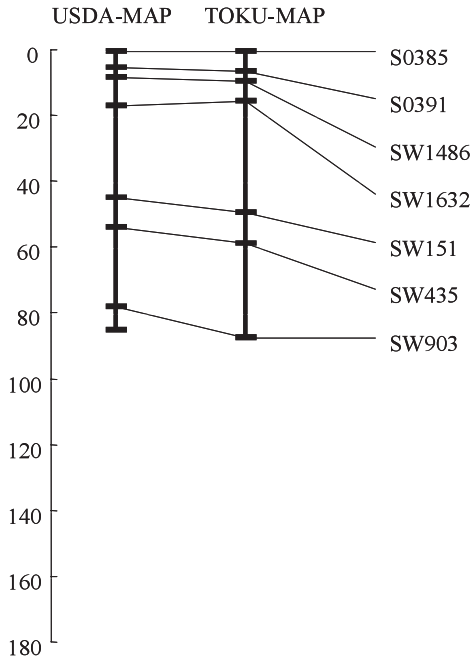
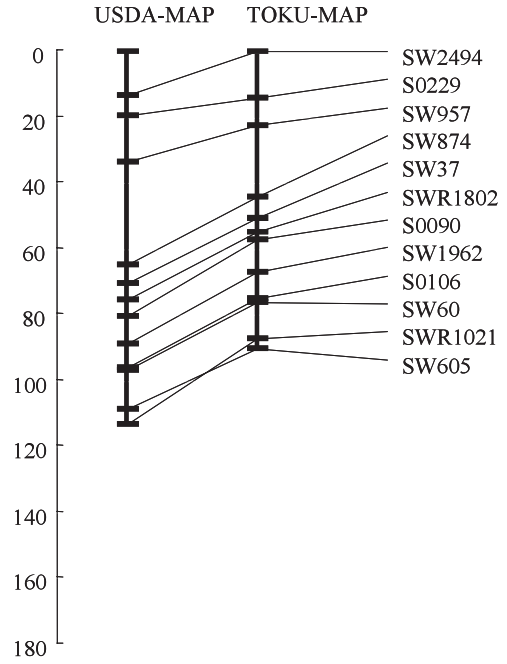


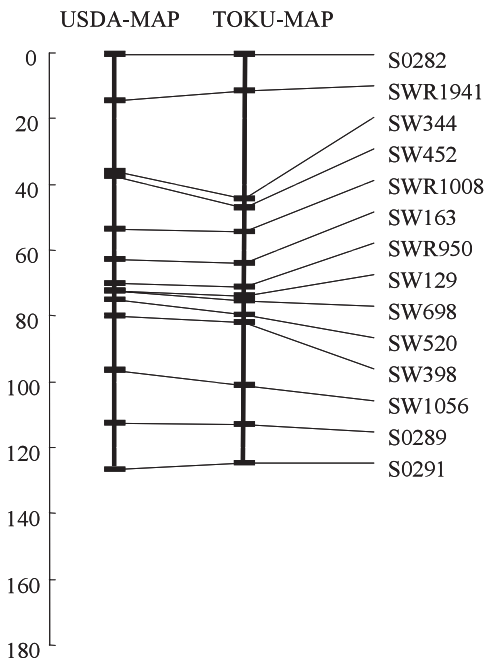
図 1 j. SSC10



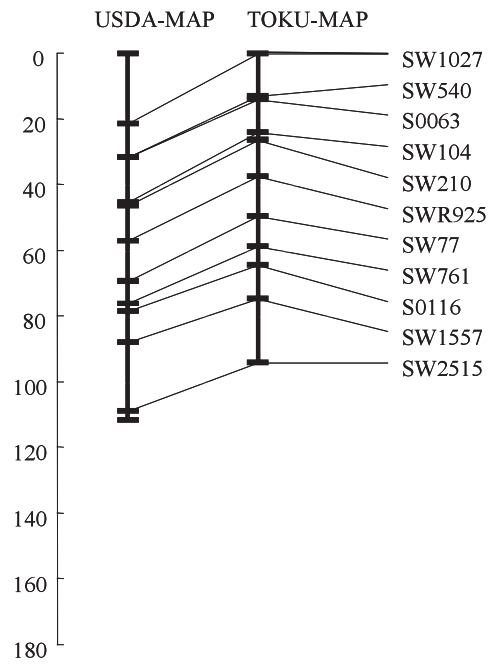
☒ 1k. SSC11



☒ 1l. SSC12



☒ 1m. SSC13



☒ 1n. SSC14

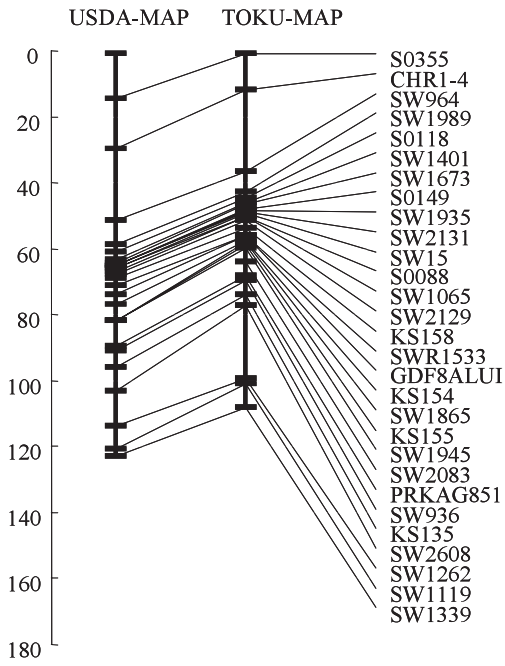


図 1 o. SSC15

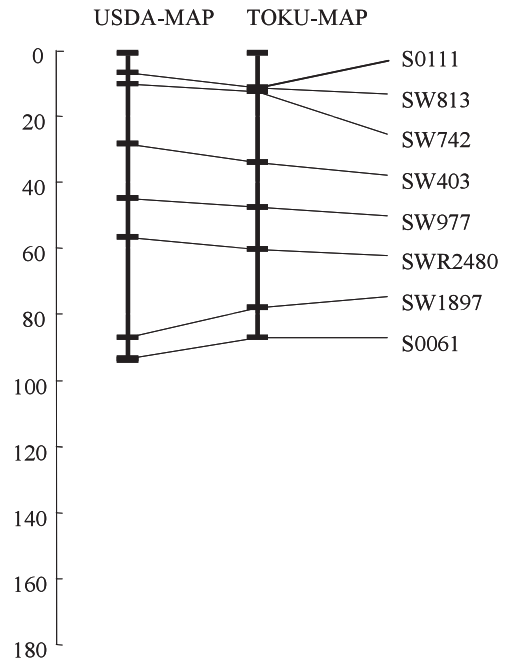


図 1 p. SSC16

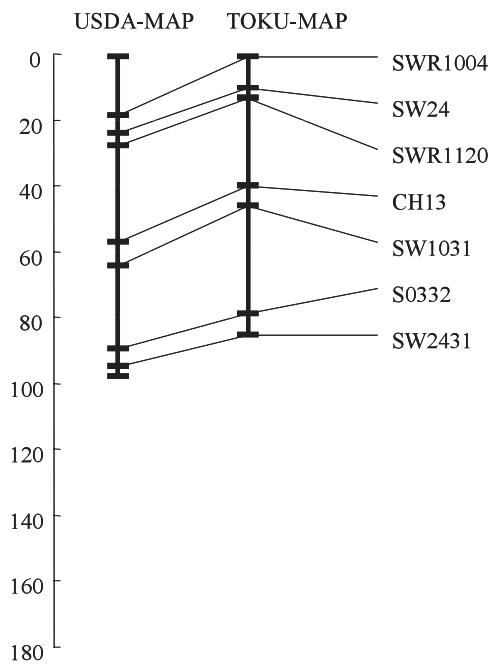


図 1 q. SSC17

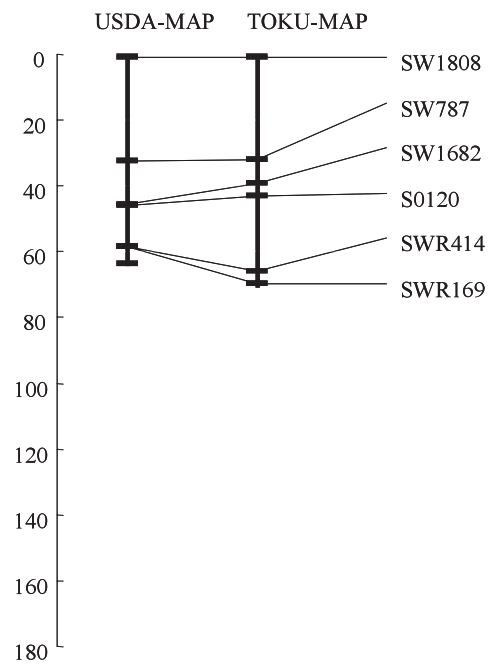


図 1 r. SSC18

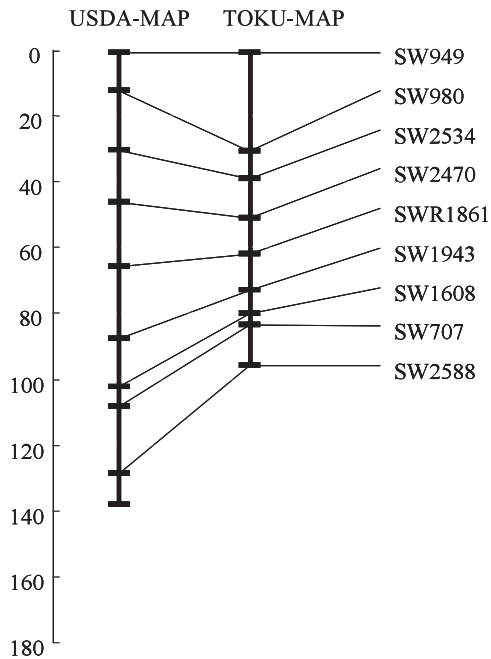


図 1s. SSCX

2) 各組織由来の脂肪酸組成および脂肪融点

各組織由来の脂肪酸組成および脂肪融点の表現型の平均を表 2 に示した。C18:1 が各組織ともに最も多く含み、以下、C16:0、C18:0、C18:2 の順であった。これらの脂肪酸で全体の 94~95% を占めていた。部位間の比較では C18:0 および C18:1 の差が大きく、外層、内層、腹腔内脂肪の順で C18:0 の割合が高くなり、逆に C18:1 は低くなった。これは、従来の報告と同様の結果となった (Cristie ら, 1972)。

3) QTL 解析

ゲノムワイズレベルで有意性を示す QTL を表 3 および図 2 ~ 図 13 に示した。各脂肪につきそれぞれ 8 種類計 24 種類の脂肪酸組成と融点を測定した。その結果、13 領域に 17 形質の 5% ゲノムワイズレベルで有意性を示す 25 個の QTL を検出した。そのうち、12 形質 10 領域に位置づけられた 16 個の QTL は 1% ゲノムワイズレベルの有意性が示された。SSC4 を除く、これらほとんどの QTL は今までに報告されておらず、新規の QTL であることが示唆された。以下、ゲノムワイズレベルの有意性が示された染色体について個別に記述する。

図 1. a~q 各染色体における連鎖地図左側: USDA-MARC map、右側: 徳島イノシシー大ヨークシャー連鎖地図 (TOKU-MAP) を示す。242 個の DNA マーカーを用いて全長 2,098. センチモルガン (cM)、DNA マーカー間の平均間隔 8.7cM となった。地図を結んでいる線は USDA-MARC map と TOKU-MAP に対応している DNA マーカーの位置関係を示している。

(1) SSC1

SSC1p には、背脂肪外層および背脂肪内層にそれぞれ C16:1 および C18:0 に関するゲノムワイズレベルの有意性を示す QTL が検出された。これらの QTL におけるイノシシ由来のアリルの効果は C18:0 については正の相加的効果を示し、C16:1 については負の相加的効果を示した (表 3、図 2)。また、本領域にはイノシシ由来のアリルが正の相加的効果を持ち、ゲノムワイズレベルで有意性を示す背脂肪内層融点に関する QTL も位置づけられた。脂肪酸は、炭素数が多いほど融点は高くなり、炭素間の結合に二重結合が入ると融点は劇的に低下する (King ら, 2004)。これらのことより、本領域におけるイノシシ由来のアリルは、飽和脂肪酸を増加させる効果を持ち、飽和脂肪酸割合の増加に伴い脂肪融点が上昇した結果、脂肪融点に関する QTL が検出されたと推察された。

また、SSC1q には、背脂肪外層 C16:1 に関するゲノムワイズレベルで有意性を示す QTL を検出した。本領域には suggestive レベルの QTL は検出されず、単独の QTL として検出された。これら SSC1 に検出された QTL は背脂肪厚を共変数とし

て補正した解析においても統計量はほとんど変化しないことから、脂肪蓄積とは独立したQTLであることが示唆された。

(2) SSC2

SSC2には、背脂肪内層融点、腹腔内脂肪C18:1およびC18:2に関するゲノムワイズレベルで有意性を示すQTLが位置づけられた(表3、図3)。本QTLにおけるイノシシ由来のアリルの効果はC18:1を増加させ、C18:2を減少させた。また、同じ位置にイノシシ由来のアリルが負の効果を持つsuggestiveレベルの腹腔内総飽和脂肪酸(TSA: total saturated fatty acid)に関するQTLを検出した(F値 = 7.0, cM = 63.2, a = -0.66, d = 0.17, PVE(寄与率) = 0.03)。本QTLは、イノシシ由来のアリルがC18:1を増加させ、C18:2と飽和脂肪酸を減少させる効果が示された。また、SSC2の53cM付近に位置づけられた背脂肪内層融点のQTLは、イノシシ由来のアリルが融点を下げる効果を持っていた。しかし、該当領域にsuggestiveレベルの内層脂肪酸組成に関するQTLは検出されなかった。脂質は脂肪組織に蓄えられており、脂肪組織は脂肪細胞によって構成される。脂肪細胞は結合組織に存在する線維芽細胞が特異的に変化したものであり、内部に脂肪滴をためて肥大化している。蓄積脂肪を形成する脂肪組織は90%の脂質、7~8%の水分および2~3%のタンパク質からなり、脂質は全て中性脂肪によって構成されている。脂肪の融点は中性脂肪を構成する脂肪酸の飽和度および炭素数の違いに起因する(沖谷, 1997)。流通段階および栄養学上過度の不飽和脂肪酸は好ましくないものの、融点の低い脂肪が舌触りの良いことから好まれる。従って、SSC2のQTLは背脂肪内層の融点を低下させる効果が認められ、遺伝資源として有用であることが示唆された。しかしながら、作用機序については、不明であり更なる生化学的な検討を要する。

(3) SSC3

SSC3の88cM付近には、腹腔内脂肪における

C16:0に関するゲノムワイズレベルで有意性を示すQTLを検出した(表3、図4)。本QTLにおけるイノシシ由来のアリルの効果はC16:0を減少させた。また、同じ領域にsuggestiveレベルで有意性を示すC14:0に関するQTL(F値 = 8.2, cM = 85.8, a = -0.04, d = -0.04, PVE = 0.04)が位置づけられた。これらイノシシ由来のアリルは飽和脂肪酸を減少させる効果を持つQTLに対し、不飽和脂肪酸であるC18:1を増加させるsuggestiveレベルの有意性を示すQTLが70 cM付近に位置づけられた(F値 = 5.8, a = 0.69, d = 0.26, PVE = 0.04)。これらのことより、SSC3に位置づけられたQTLにおけるイノシシ由来のアリルはC14:0およびC16:0の飽和脂肪酸を減少させ、相反してC18:1を増加させる効果があることが示唆された。

(4) SSC4

SSC4セントロメアには75 cM付近を境界にして2つのQTLが検出された。すなわち66~72 cMに最大統計量を持つ背脂肪内層のC18:2、腹腔内脂肪のC18:1およびC18:2に関するゲノムワイズレベルで有意性を示すQTLが位置づけられた。これらのQTLにおけるイノシシ由来のアリルの効果は、腹腔内脂肪のC18:1に対しては正の、背脂肪内層のC18:2および腹腔内脂肪のC18:2に対してはともに負の相加的效果を示した(表3、図5)。また、82~83 cM付近にはゲノムワイズレベルで有意性を示す背脂肪内層C18:2、suggestiveレベルで有意性を示す背脂肪外層C18:2に関するQTL(F値 = 8.11, a = -0.39, d = 0.20, PVE = 0.03)が位置づけられた。これらのことから腹腔内脂肪に関するQTLは、SSC4の72 cM付近に1つのピークを持つグラフを描くのに対し、内層脂肪および外層脂肪に関するQTLは、72 cMと82 cM付近の2カ所にピークを持つグラフを描くことが明らかとなった。SSC4セントロメアには成長等に関するQTLが位置づけられており(新居ら, 2002)、特に背脂肪厚のQTLのピークは81 cMに位置づけられている(F値 =

10.54, $a = 0.15$, $d = 0.01$, $PVE = 0.04$)。脂肪の蓄積と不飽和脂肪酸組成は負の相関関係にあり、イノシシの脂肪蓄積に対し、正の効果を持つアリの効果により、多価不飽和脂肪酸であるC18:2の減少を招いたことが推察された。このことは、背脂肪厚を共変数として補正する解析を行うことで、これらのQTLの統計量が大幅に低下し、腹腔内脂肪C18:2以外は、ゲノムワイズレベル以下になることから示唆された。Cropら (2003) は、スペインの固有種イベリコ豚とランドレースの交雑家系によるQTL解析を行った結果、マイクロサテライトDNAマーカーSW839付近にイベリコ豚においてC18:2を減少させる効果を持つQTLを位置づけた。しかし、背脂肪を共変数として加えたモデルを使ってQTL解析した場合は、ゲノムワイズレベルの有意水準を下回ったと報告している。本研究においてSW839は65 cMに相当し、第4染色体の前方のQTLのピークに一致した。従って、本領域には改良された西洋種とそれ以外の種における脂肪蓄積に関与するQTLの存在が強く示唆され、QTLの多面的効果として脂肪酸組成に関するQTLも検出されたことが推察された。しかし、SSC4の脂肪酸組成に関与するQTLが分離して2カ所に存在するか否かは今後の検討を待たねばならない。

(5) SSC5

SSC5の48 cM付近にはゲノムワイズレベルで有意性を示す背脂肪内層および腹腔内における [C18:3 + C20:1 + C20:4 + C22:4 + C22:6] (other PUFAs)のQTLを検出した (表3、図6)。背脂肪内層および腹腔内脂肪のF値は10.2および11.5、相加的効果は0.05および0.04、優性効果は0.05および-0.04、寄与率はともに0.05であった。本QTLにおけるイノシシ由来のアリルは、other PUFAsを増加させる効果を保持していた。背脂肪内層と腹腔内脂肪は同程度の統計量が示されたが、背脂肪外層についてはsuggestiveレベルのQTLさえ検出されなかった。

一方、背脂肪厚を共変数として補正する解析を行うことで、suggestiveレベルの背脂肪内層TSAがゲノムワイズレベルで有意性を示すQTLへと変化した (F値 = 5.8から8.8へ)。SSC5の背脂肪内層のother PUFAsの統計量はほとんど変化しなかった。SSC5には20 cM付近をピークとする背脂肪厚に関するQTLが検出されている。QTLのピークの位置は30 cM程度異なるが、その間で組み替えの生じなかった個体について、背脂肪厚で補正することで、脂肪酸組成に関与するQTL以外の要因の影響を少なくすることとなり、結果としてゲノムワイズレベルのQTLが検出されたことが推察された。

(6) SSC6

SSC6の73 cM付近にはゲノムワイズレベルで有意性を示す腹腔内脂肪C16:0のQTLを検出した (表3、図7)。また、数cM程度後方の78 cMにはsuggestiveレベルで有意性を示すQTLとして背脂肪内層C16:0 (F値 = 8.5, $a = -0.32$, $d = 0.17$, $PVE = 0.04$) およびTSA (F値 = 6.5, $cM = 79.7$, $a = -0.55$, $d = 0.15$, $PVE = 0.03$) に関与するQTLが位置づけられた。更に、80 cM付近には背脂肪外層TSA (F値 = 6.1, $a = -0.51$, $d = 0.0$, $PVE = 0.03$) に関与するQTLも位置づけられた。これらのQTLは、イノシシ由来のアリルがC16:0およびTSAを減少させる効果がみられた。一方、Cropら (2003) は、SSC6に不飽和脂肪酸に関するQTLを報告している。しかしながら、彼らが検出したQTLは34 cMおよび105 cMであり、今回の結果と離れていることから、異なるQTLと推察された。

(7) SSC9

SSC9セントロメア近傍の狭い範囲には、本研究において最多となるQTLが位置づけられた。すなわち、60~80 cMにはゲノムワイズレベルで有意性を示す背脂肪外層C16:1、C18:0、TSAおよび背脂肪外層C18:0に関するQTLを位置づけた (表3、図8)。また、60~70 cMには、suggestiveレベルで有意性を示す背脂肪内層

C18:1 (F値 = 7.5, cM = 76.6, a = -0.52, d = 0.29, PVE = 0.04)、外層C16:1 (F値 = 6.0, cM = 64.6, a = -0.09, d = 0.4, PVE = 0.03)、外層融点 (F値 = 6.8, cM = 72.6, a = -0.57, d = -0.75, PVE = 0.03)、腹腔内脂肪C18:0 (F値 = 8.5, cM = 62, a = 0.45, d = -0.47, PVE = 0.04)、C16:1 (F値 = 7.0, cM = 63.6, a = -0.05, d = 0.06, PVE = 0.04)、およびTSA (F値 = 6.6, cM = 60.2, a = 0.62, d = -0.51, PVE = 0.03)のQTLを検出した。第9染色体の60~80 cMの間にsuggestiveレベルも含めると10形質のQTLが位置づけられ、これらのQTLにおけるイノシシ由来のアリルの効果は、飽和脂肪酸を増加させる効果を持っていた。また、本領域のQTLは、いずれも相加的効果とは逆方向の優性効果を持っていた。さらに、60~80 cMの間には67 cM付近をピークとするQTLと78 cMをピークとするQTLがあり、統計量は異なるが両方にQTLを持つ個体がほとんどであり、これら近接する領域に2つのQTLが存在する可能性を否定できない。

一方、第9染色体のQTLについて背脂肪厚を共変数として考慮して解析した場合、ほとんどの形質のF値は0.4~0.6ポイント上昇し、効果および奇与率も高く見積もられた。このことは脂肪の蓄積という直接的に脂肪酸組成の変化に関係しない要因を取り除くことで、より脂肪酸組成の遺伝子の効果が鮮明になったことを示している。これらの結果より、SSC9セントロメアには3部位全ての脂肪組織において脂肪蓄積とは無関係にイノシシ由来のアリルが飽和脂肪酸を高める効果を持つQTLが存在することが明らかとなり、飽和脂肪酸と食味の関係から育種素材として有用であることが示唆された。

(8) SSC14

SSC14, 17~22cMの近接した領域にはゲノムワイズレベルで有意性を示す腹腔内脂肪C14:0およびC16:0、また、suggestiveレベルで有意性を示す腹腔内脂肪C18:1 (F値 = 7.4, cM = 22.2, a = -0.79, d = 0.20, PVE = 0.04) およびTSA (F値 = 6.3, cM

= 18.2, a = 0.62, d = -0.38, PVE = 0.03)のQTLを位置づけた(表3、図9)。本QTLにおけるイノシシ由来のアリルの効果は、C14:0、C16:0およびTSAを増加させ、逆にC18:1を減少させる効果を持っていた。

SSC14には、Stearoyl-CoA desaturase (SCD) 遺伝子が雑種細胞パネルやin situハイブリダイゼーションを用いた手法により位置づけられている(Wimmersら, 2002; Renら, 2003)。和牛においては神戸大学のグループが、SCDの遺伝子型と、モノ不飽和脂肪酸組成の相関関係を明らかとし(Taniguchiら, 2004)、実際に選抜に応用されている。SCDは、C16:0やC18:0からモノ不飽和脂肪酸であるC16:1あるいはC18:1を生成する酵素であり(Enochら, 1976)、SSC14のQTLを機能面から説明することが可能である。しかしながら、上述のWimmersら(2002)はSSC14q15-16と報告したのに対し、Renら(2003)はSSC14q27と報告し、本研究におけるQTLの位置はWimmersら(2002)の報告により近い。既に豚のSCDについてはクローニングもされていることから、本家系の造成に用いた親世代のシーケンスを決定し、イノシシ特異的な多型を検出できた場合、本家系における詳細なマッピングおよびQTL解析が可能となる。

(9) SSC15

SSC15の36~57 cMにゲノムワイズレベルで有意性を示す背脂肪外層C16:0、C18:1、TSAおよび融点のQTLを検出した(表3、図10)。さらに、38~46 cMの範囲に背脂肪内層C18:0 (F値 = 6.4, cM = 45.3, a = 0.37, d = 0.20, PVE = 0.03)、TSA (F値 = 7.0, cM = 43.6, a = 0.46, d = 0.48, PVE = 0.03) および融点 (F値 = 6.5, cM = 45.6, a = 0.62, d = 0.01, cM = 0.03) のQTLを検出した。これらのQTLは一貫してイノシシ由来のアリルがC16:0およびC18:0等の飽和脂肪酸を増加させ、C18:1等の不飽和脂肪酸を減少させる効果として検出された。また、飽和脂肪酸組成の変遷に伴い、

結果として融点のQTLが同じ領域に位置づけられたと推察された。本領域のQTLにおいてゲノムワイズレベルで有意性を示す形質は背脂肪外層のみであり、主に背脂肪、特にその外層部において強く発現する遺伝子の関与が示唆された。さらにこれらの領域に検出されたQTLは、台形状のF値のグラフとなり、QTLが1つ以上存在することが示唆された。

Fatty acyl-Coenzyme As (CoAs) は、タンパク質輸送、酵素の活性化、脂質代謝のような細胞質における多くの生化学的プロセスにおいて必要不可欠な働きを行う生物活性脂肪酸代謝物である(Weimarら, 2002)。また、fatty acyl-CoAsは脂肪酸β酸化経路やタンパク質合成経路において基質として使われる(GlickとRothman, 1987; Pfannerら, 1990)。Fatty Acid Coenzyme a Ligase long chain 2 (FACL2)はfatty acyl-CoAsに作用し、その構成を触媒する(Bronfmanら, 1989; Laiら, 1993)。ブタにおけるFACL2遺伝子は、体細胞雑種パネルを使った解析によりSSC15上のマイクロサテライトDNAマーカーSW1989の近傍にマッピングされた(VidalとA Mills, 2004)。本研究においては、脂肪酸組成における統計量としては最大となる背脂肪外層C16:0のQTLがSW1989の近傍のSW936近傍に位置づけられており、FACL2が候補遺伝子の1つとなる。しかしながら、ブタにおけるFACL2が脂肪酸の合成分解に果たすカスケードについては未だ不明である。いずれにしても、SCD同様、本家系の造成に用いた親世代のシーケンスを決定し、本家系における詳細なマッピングを行う予定である。

SSC15には、イノシシ由来のアリルが好ましい効果を持つpHおよびMinolta b*値のQTLが検出され、DNAマーカーアシストイントロgressionにより大ヨークシャーに導入した系統を造成中であり、脂肪酸組成についてもイノシシ由来のアリルの効果の検証を進めたい。

(10) SSC16

SSC16の0 cM付近にゲノムワイズレベルで有意性を示す腹腔内脂肪C14:0のQTLが検出された(表3、図11)。本QTLにおけるイノシシ由来のアリルはC14:0を増加させる効果を持っていた。

(11) SSC17

SSC17の62 cM付近にゲノムワイズレベルで有意性を示す背脂肪外層C18:2のQTLを検出した(表3、図12)。また、近接した領域にsuggestiveレベルで有意性を示す背脂肪内層C18:2 (F値 = 7.8, cM = 62.3, a = -0.51, d = 0.38, PVE = 0.04) および背脂肪肩 (F値 = 8.0, cM = 54.3, a = 0.17, d = 0.13, PVE = 0.02) のQTLを位置づけた。これらのQTLにおけるイノシシ由来のアリルはC18:2を減少させ、背脂肪肩を厚くする効果を示した。また、背脂肪厚を考慮したQTL解析により、F比が大幅に下がることから(補正なし:補正有り、外層C18:2、10.2:7.7;内層C18:2、7.8:6.7)、本QTLは脂肪蓄積に関与する遺伝子の効果により脂肪酸組成が変動した結果、間接的に検出したQTLであることが示唆された。

(12) SSCX

SSCX、24 cM付近および69 cM付近にゲノムワイズレベルで有意性を示す腹腔内脂肪C18:0および融点のQTLをそれぞれ検出した(表3、図13)。また、suggestiveレベルで有意性を示す背脂肪外層C18:1、TSA、背脂肪内層C18:2および腹腔内脂肪C18:1、TSAを検出した。X染色体には大きく30 cM、45 cM、70 cM付近をピークとするQTLが存在し、背脂肪内層C18:2以外、一貫して不飽和脂肪酸を増加させる効果を示した。

表2 F2世代における脂肪酸組成および脂肪融点の表現型

Trait	背脂肪外層			背脂肪内層			腹腔内脂肪		
	No. ^a	Mean	SD	No. ^a	Mean	SD	No. ^a	Mean	SD
ミリスチン酸(C14:0), %	345	1.40	0.16	353	1.31	0.14	346	1.37	0.15
パルミチン酸(C16:0), %	345	26.83	1.36	353	27.54	1.26	346	28.81	1.29
パルミトレイン酸(C16:1), %	345	2.10	0.36	353	1.59	0.28	346	1.24	0.24
ステアリン酸(C18:0), %	345	12.84	1.37	353	15.77	1.62	346	19.90	1.91
オレイン酸+バクセン酸(C18:1), %	345	44.72	2.00	353	42.49	2.06	346	37.07	2.85
リノール酸(C18:2), %	345	10.33	1.59	353	9.60	1.50	346	9.87	1.59
other PUFAs ^b , %	345	1.78	0.18	353	1.71	0.20	346	1.58	0.17
SFA ^c , %	345	41.07	2.25	353	44.62	2.28	346	50.07	2.69
融点, °C	341	33.96	3.30	342	38.57	2.66	345	44.03	2.44

a 形質とDNAマーカー型を調査した個体数

b 多価不飽和脂肪酸

c 総飽和脂肪酸

表3 脂肪酸組成および脂肪融点に関するQTL解析のまとめ

Trait	ゲノムワイズ ^a		CW ^b 補正						CW ^b and BF ^c 補正						
			Map position		効果 ^d				Map position		効果 ^d				
			5%	1%	SSC	cM	F値 ^e	a	d	PVE ^f	SSC	cM	F値 ^e	a	d
背脂肪内層															
C16:1 (%)	8.65	10.64	1	20.1	12.69	-0.10	-0.02	0.06	1	21.1	13.48	-0.11	-0.02	0.07	
			9	64.6	9.24	-0.06	-0.08	0.05	9	64.6	9.72	-0.07	0.08	0.05	
C18:0 (%)	8.67	10.88	1	16.1	12.76	0.60	-0.06	0.06	1	17.1	13.50	0.61	-0.04	0.06	
			9	67.6	15.18	0.48	-0.57	0.07	9	66.6	15.85	0.50	-0.56	0.07	
C18:2 (%)	8.73	10.15	4	69.7	10.83	-0.44	0.03	0.04	ns						
other PUFAs (%)	8.44	9.95	5	48.0	10.22	0.05	-0.05	0.05	5	48.0	10.05	0.05	-0.05	0.05	
SFA (%)	8.55	10.32	ns						5	33.8	8.82	-0.62	0.29	0.04	
			9	78.6	9.52	0.56	-0.57	0.04	9	76.6	10.25	0.63	-0.42	0.04	
融点°C	8.76	10.45	2	53.4	10.92	-0.82	0.00	0.04	2	53.4	11.54	-0.84	-0.04	0.05	
背脂肪外層															
C16:0 (%)	8.50	9.98	15	35.9	15.41	0.50	-0.05	0.07	15	36.9	14.00	0.47	0.01	0.06	
C16:1 (%)	8.59	10.24	1	22.8	13.02	-0.13	-0.07	0.07	1	22.8	12.95	-0.13	-0.07	0.07	
			1	84.4	13.60	-0.15	0.04	0.07	1	84.4	13.62	-0.15	0.04	0.07	
C18:0 (%)	8.80	11.01	1	23.8	10.64	0.39	0.24	0.05	1	23.8	11.85	0.41	-0.17	0.05	
			9	67.6	9.75	0.39	-0.19	0.04	9	67.6	11.40	0.14	-0.17	0.05	
C18:1 (%)	8.73	10.49	15	57.0	10.14	-0.56	-0.21	0.04	15	57.0	10.10	-0.55	-0.21	0.04	
C18:2 (%)	8.53	9.83	17	62.3	10.24	-0.51	0.38	0.04	ns						
SFA (%)	8.52	10.40	15	45.3	14.23	0.67	0.38	0.05	15	56.6	14.79	0.72	0.21	0.05	
融点(°C)	8.67	10.30	1	21.1	8.93	0.73	0.92	0.04	1	21.1	9.65	0.75	0.91	0.04	
腹腔内脂肪															
C14:0 (%)	8.77	10.62	16	0.0	8.99	0.03	0.04	0.04							
C16:0 (%)	8.74	10.58	3	87.8	10.57	-0.40	-0.25	0.05							
			6	73.2	11.81	-0.44	0.07	0.05							
			14	17.2	12.56	0.50	-0.09	0.06							
C18:0 (%)	8.70	10.53	X	24.0	9.04	-0.63	nd	0.04							
C18:1 (%)	8.50	10.40	2	63.2	13.85	0.99	0.05	0.06							
			4	71.6	11.33	0.99	0.03	0.06							
C18:2 (%)	8.87	10.75	4	65.5	11.36	-0.46	0.21	0.05							
PUFA (%)	8.83	10.82	5	49.9	11.50	0.04	-0.04	0.05							
融点(°C)	8.55	10.11	X	68.7	8.89	-0.36	nd	0.04							

a パーミュテーションテストによるゲノムワイズ5%および1%レベルF値の閾値 (反復数 = 1000)。

b と体重

c 肩部背脂肪厚

d 日本イノシシと大ヨークシャーのアリルを比較した時、a : 相対効果、d : 優性効果、nd : not done

e ns : no significant

f PVE : 表現型の分散におけるQTLの割合 (寄与率)

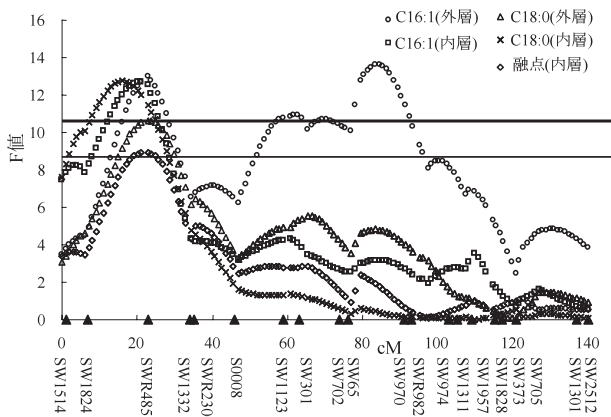


图 2 SSC1

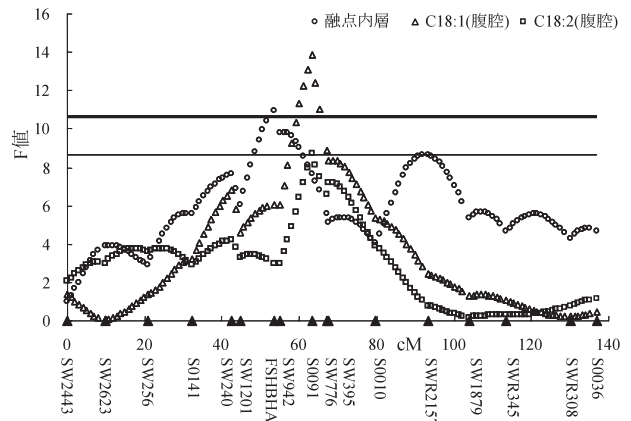


图 3 SSC2

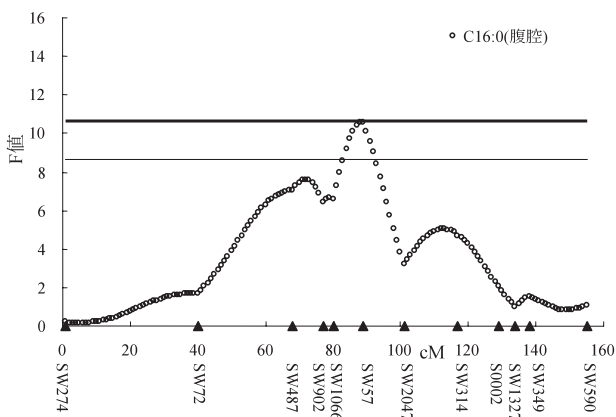


图 4 SSC3

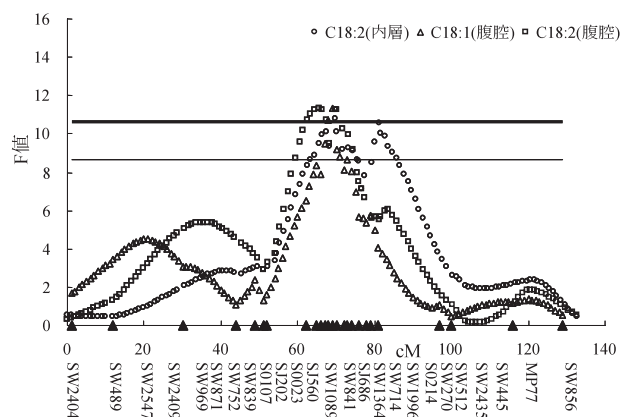


图 5 SSC4

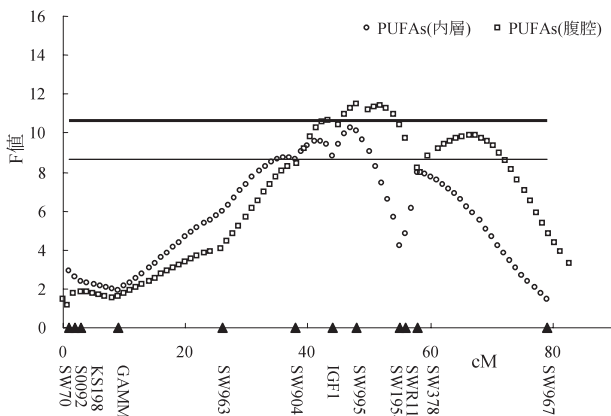


图 6 SSC5

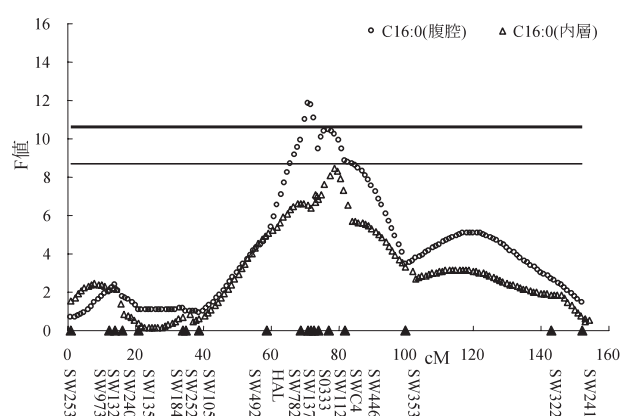


图 7 SSC6

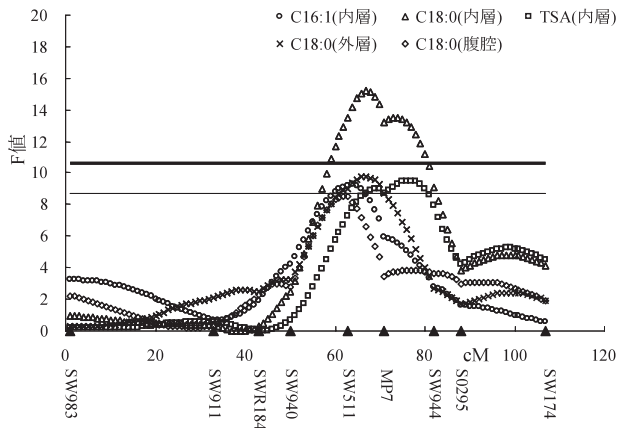


図 8 SSC9

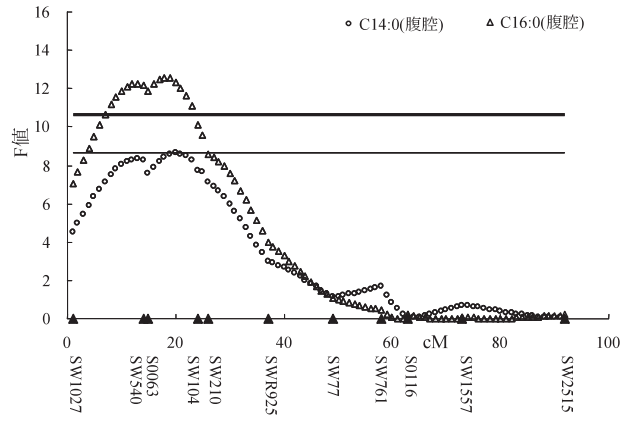


図 9 SSC14

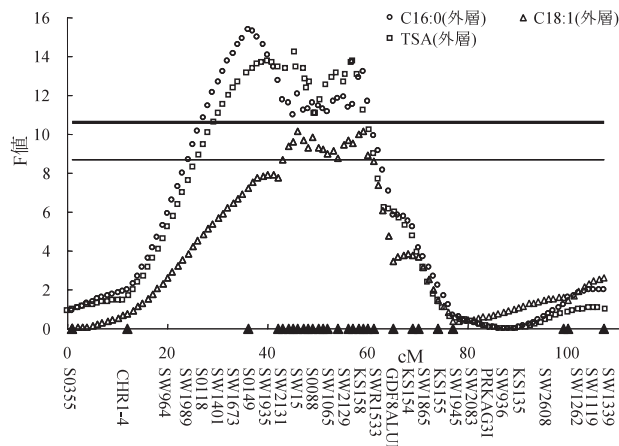


図 10 SSC15

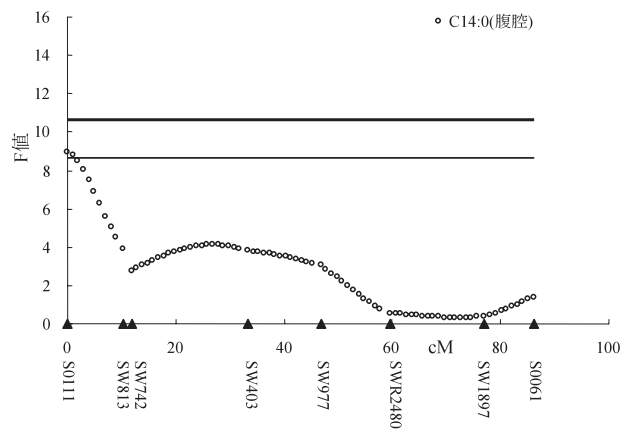


図 11 SSC16

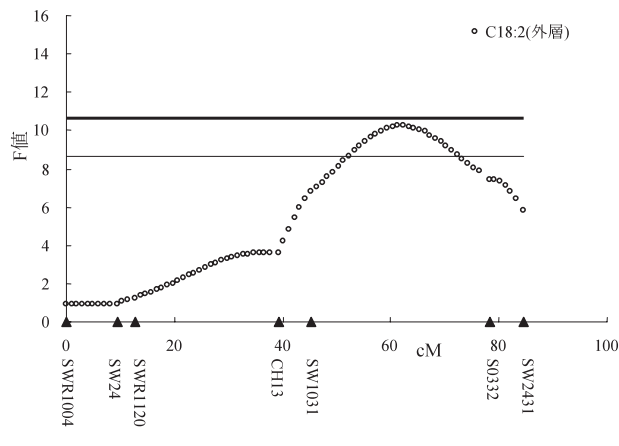


図 12 SSC17

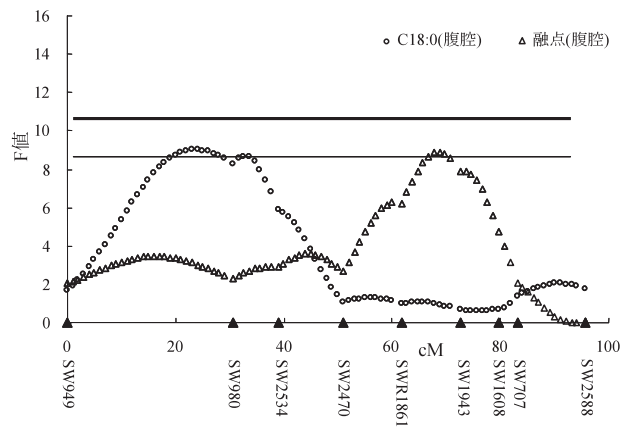


図 13 SSCX

引用文献

- 1) Cameron, N. D.ら, 1991. Meat Sci 29: 295-307.
- 2) Ciobanu, D.ら, 2001. Genetics 159(3): 1151-1162.
- 3) Clop, A.ら, 2003. Mamm Genome 14(9): 650-656.
- 4) Ellegren, H.ら, 1994. Genetics 137(4): 1089-1100.
- 5) Enoch, H.ら, 1976. J Biol Chem 251(16): 5095-5103.
- 6) Glick, B. S.ら, 1987. Nature 326(6110): 309-312.
- 7) Green, P., K.ら, 1990. CRIMAP, Version 2.4. Washington University School of Medicine, St. Louis, MO.
- 8) Haley, C.ら, 1994. Genetics 136:1195-1207.
- 9) Irie, M.ら, 1985. Jap J Swine Sci 22: 168-173.
- 10) King, D.ら, 2004. Meat Sci 67: 675-681.
- 11) Lai, J. C.ら, 1993. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 82(3): 331-338.
- 12) Lawrence, T. L.ら, 1997. Growth of Farm Animals. CABI, New York.
- 13) Lizardo, R.ら, 2002. Livest Product Sci 75: 167-299.
- 14) Mikawa, S.ら, 1999. Anim Genet 30(6): 407-417.
- 15) Perez-Enciso, M.ら, 2000. J Anim Sci 78(10): 2525-2531.
- 16) Pfanner, N.ら, 1990. J Cell Biol 110(4): 955-961.
- 17) Ren, J.ら, 2003. Anim Genet 34(6): 471-473.
- 18) Rohrer, G. A.ら, 1996. Genome Res. 6:371-391.
- 19) Serra, X.ら, 1998. Livest. Prod. Sci. 56:215?223.
- 20) Taniguchi, M.ら, 2004. Mamm Genome 15(2): 142-148.
- 21) Vidal, O.ら, 2004. Anim Genet 35(3): 245.
- 22) Weimar, J. D.ら, 2002. J Biol Chem 277(33): 29369-29376.
- 23) Wimmers, K.ら, 2002. Anim Genet 33(4): 255-263.
- 24) 沖谷明紘ら, 1997, 肉の科学. 朝倉書店.
- 25) 岸田忠昭ら, 1983. 家政学雑誌 34: 58-61.
- 26) 久家美奈 2002.しまねの味開発指導センター 業務・研究報告: 16-20.
- 27) 新居雅宏ら, 2002. 徳島畜研報 2, 38-48
- 28) 銘柄豚ハンドブック2005.