

【研究紹介】

北海道における家畜 DNA 育種研究の変遷

内 藤 学

北海道立総合研究機構（道総研）農業研究本部 畜産試験場 基盤研究部 生物工学グループ
 (〒081-0038 上川郡新得町字新得西 5 線39番地)

〈はじめに〉

当初「DNA マーカー育種についての紹介を北海道獣医師会雑誌に書いてほしい」と依頼されたときには、「獣医師会雑誌にこのような記事は向かないのでは?」とか「獣医師の方は育種や選抜技術にあまり興味がないのでは?」と躊躇した。しかし畜産に関わる者にとっては選抜・淘汰、遺伝病などは身近な問題であるし、折角の機会を頂戴したのだからと考え直し、ペンをとった。普段はあまり馴染みのない内容だと思われるが、ご了承いただきたい。

・従来の育種法（育種価による選抜）

「Q: 牛の改良ってどうやるの?」「A: そんなの簡単。牛では人工授精で1頭の種雄牛から何万頭もの子供がくれるから、良い種雄牛を選べばいいのさ。」「Q: じゃあ、どうやってその牛を選ぶの?」「A: それは…」いわばこれこそが育種の基本であり、種雄牛の評価を行うことは“言うは易く行うは難し”である。選抜するための基準はその個体の能力値だけでは十分でなく、子孫にどれだけ能力を伝えられるかという遺伝的能力によって評価しなければならない。

近年、個体の遺伝的能力を評価する場合、“育種価 (Breeding Value)” という数値を算出することが主流である。この育種価は評価したい個体について多くの血縁個体の経済性に関する成績、乳用牛であれば乳量や乳脂肪率など、肉用牛であれば枝肉重量や BMS No. (脂肪交雑の度合い) などの観測値から環境の効果、すなわち年次や季節や農家などの影響を差し引いて算出される。育種価を用いることで、個体の有する遺伝的能力をより正しく他の個体と比較できる。

コンピューターの性能向上とプログラムの開発により、

非常に精度の高い育種価が算出されるようになり改良は飛躍的に進んだ。ただし、そのためには血縁個体、特に子や孫といった後代成績が多数必要であり、子牛のうちに将来の種雄牛候補についての予備選抜をする場合には、その両親の育種価などで期待値を推測するしかなかった。

・DNA 育種とは（キーワードには下線を表示した）

遺伝情報の基である DNA を選抜に使えたら…というのは1990年以前の育種研究者の夢であった。DNA の配列はアデニン、グアニン、シトシン、チミンの4種類の塩基で構成されており、ある個体が有する塩基配列全てをゲノムと呼んでいる。ヒト、牛、豚のゲノムは約30億もの塩基対で構成されている。DNA 情報で選抜するためには、この膨大な DNA の情報から個体ごとの DNA の違い (多型) を調査することが先決となる。この DNA 情報を扱いやすくするために染色体上に付けられた、それぞれの個体を特徴づけるための DNA の目印のことを DNA マーカー という。DNA マーカーは親から子に遺伝情報として引き継がれる。DNA マーカーのタイプ (遺伝子型) を調べることを ジェノタイプピング といい、DNA マーカーの遺伝子型から個体の経済的な成績 (表現型) を推定して選抜するのが “DNA マーカーアシスト選抜” である。それを実現するために行う DNA マーカーと経済形質との関連性の解析を QTL 解析 (Quantitative Trait Loci: 量的形質遺伝子座) という。

1990年代、QTL 解析の初期には、マイクロサテライト DNA マーカー (MS マーカー) が主に使用された。これは短い配列、特に2塩基の繰り返しの長さ (塩基数: bp) の違いで遺伝子型を判定する DNA マーカーである。他には1つの塩基の種類の違いを DNA マーカーとして利用する SNP マーカー (Single Nucleotide Polymorphism: 1塩基多型) もある。SNP マーカーは対立遺

伝子（アリル）としては2種類なのでMS マーカーより1 マーカーあたりの情報は少ないため、最初はあまり利用されていなかった。しかし一度に多数のSNP マーカーのタイピングを可能とする解析ツール、DNA チップ（DNA マイクロアレイとも呼ばれる）の普及によって短時間で大量の解析が可能となって以降、SNP マーカーの解析が盛んにおこなわれるようになってきている。

〈北海道における DNA 育種研究の変遷〉

・黎明期—DNA マーカーアシスト選抜研究の開始

1993～94年に豚の染色体上におけるMS マーカーの配置図の作成、およびそのMS マーカーと豚の経済形質の関連性を示した論文が海外で報告された。日本でも当時の農水省畜産試験場（現：独立行政法人畜産草地研究所）が中心となり、豚についてMS マーカーと経済形質との関連性の解析、QTL 解析のプロジェクトが1995年から開始された。複数の県の畜産試験場とともに北海道では滝川畜産試験場（滝川畜試）養豚科がそれに参画した。

このころのQTL 解析では、品種の異なる交雑種によるF1を作成し、そのF1同士をさらに交配したF2による



写真1. 豚の解析用標準家系、梅山豚×ランドレースのF2

る解析専有家系である標準家系（リファレンスファミリー）を構築して行っていた。滝川畜試では梅山豚の雄とランドレースの雌を交雑した。F2（写真1）について発育成績や枝肉成績を調査するとともに、祖父である梅山豚と祖母であるランドレースのどちらのアリルを受け継いでいるかMS マーカーをジェノタイプングして判定した。その当時の遺伝子増幅装置では0.5 ml チューブで反応を行い最大数は48本、電気泳動ごとにその都度写真撮影して判定（写真2）という非効率なもので、いわば日本全国を徒歩で探し回るに等しい状況であった。そのような状況下で約5年かけて、139頭のF2についての経済形質と164のMS マーカーによる解析で、1番染色体に椎骨数およびロース長、4番染色体に日増体量などのQTL 候補を検出した。これはDNA マーカーを用いた選抜技術（DNA マーカーアシスト選抜）の先駆的な成果だった。

豚のQTL 解析の進行と前後して、牛においても畜産技術協会附属動物遺伝研究所（動物遺伝研）を中心としたQTL 解析のプロジェクトが始動していた。新得畜産試験場（新得畜試）の肉牛科がその事業に参画し、全国の研究機関と共同で黒毛和種の間接検定牛を用いた解析や、黒毛和種とヘレフォードで構築した標準家系で小型ピロプラズマ抵抗性の研究を行った。黒毛和種は優性の小型ピロプラズマ抵抗性遺伝子を有しており、その関連するDNA マーカーを検出したが、育種選抜に利用できる段階までには至らなかった。

・成長期—QTL の検出から実用化に向けて

2000年に滝川畜試は新得畜試と統合し、北海道立畜産試験場（道立畜試）となった。それに伴い豚では大ヨークシャーの新たな系統造成とSPF 環境下での飼養試験に集中することとなり梅山豚を利用した標準家系の構築ができなくなったことから、以降の道立畜試における豚

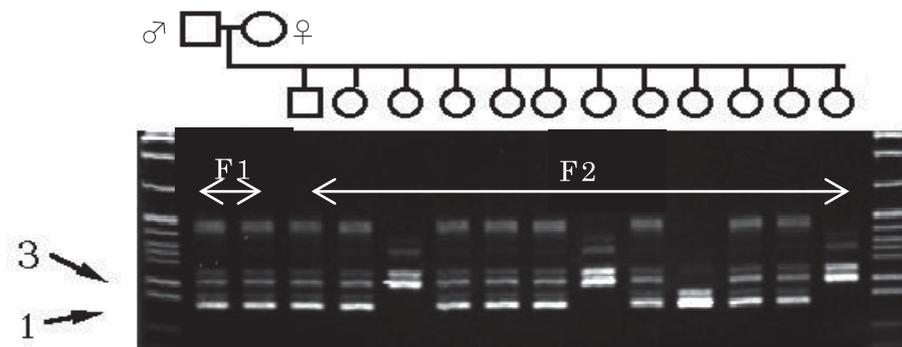


写真2. DNA マーカーの解析（電気泳動したゲルを写真撮影して判定）

：3 = ランドレース由来アリル125 bp

：1 = 梅山豚由来アリル101 bp

QTL 解析は休止している。

肉牛改良を担当する肉牛育種科では、研究対象として黒毛和種に重点を置くこととなった。試験場内牛で標準家系は作成せずに、十勝の枝肉市場に上場された黒毛和種肥育牛（写真3）から DNA 抽出用サンプル、血統情報および枝肉成績を入手して、QTL 解析することがメインとなった。具体的には、特定の種雄牛の半きょうだいの産子が、種雄牛でヘテロ接合の MS マーカーのどちらのアリルを受け継ぐかジェノタイピングして解析した。この頃は96穴プレートと PCR 装置（写真4）、判定に DNA シーケンサー（写真5）を用いることによって一日192のジェノタイピングが可能となったが、徒歩から自転車程度の進歩であった。2007年以降、私も牛の QTL 解析プロジェクトに携わるようになった（写真6）。動物遺伝研に出張して、より効率的な DNA シーケンサー

（写真7）を判定に用いることで一日最大2,880の MS マーカーをジェノタイピングできるようになった。それでも解析はひたすら PCR と泳動を繰り返す“力技”の感が強かった。



写真3. 黒毛和種の枝肉（サンプル採取）



写真5. 初期の DNA シーケンサーを用いたタイピング



写真6. 動物遺伝研究所の外観



写真4. DNA 増幅装置（PCR）



写真7. 動物遺伝研の DNA シーケンサー

表1. 枝肉重量関連 DNA マーカー “CW1” の遺伝子型と表型値 (Q のタイプは枝肉重量を10~17kg 増加する効果)

種雄牛	CW1タイプ		枝肉重量 (kg)	差 (kg)
A (n=823)	Q/Q	(n=245)	461.5	> +10.8
	Q/-	(n=419)	450.7	
	-/-	(n=159)	439.0	
B (n=373)	Q/Q	(n=177)	504.3	> +12.8
	Q/-	(n=196)	491.4	
C (n=189)	Q/Q	(n=86)	454.3	> +17.1
	Q/-	(n=103)	437.2	

黒毛和種における一連の解析で、枝肉重量と強く関連する QTL を牛14番染色体上に検出した。“CW1” と命名されたこの枝肉重量関連 QTL は他の複数の家系においても検出され (表1)、その後様々な検証を経て育種利用への有効性が実証され、牛の経済形質についての DNA マーカーアシスト選抜が現実のものとなった。一方、黒毛和種において最も重要な選抜形質である脂肪交雑、BMS No. についても同様の解析を積み重ねてきたが、DNA マーカーアシスト選抜に利用できるような効果を有する QTL の検出は困難であった。

・成熟期一解析手法の革命

21世紀に入って以降、DNA 研究は飛躍的に発展を遂げた。2009年4月にははじめて牛の全ゲノムが解読された。技術の進歩によって SNP マーカーをジェノタイプングする “DNA チップ” が解析ツールとして広く研究に利用されるようになり、2008年以降は牛においても利用できるような実験環境が整えられつつあった。例えば、牛の解析用に最適化した約3,000の SNP マーカーを配置した3K カスタム DNA チップを使用することで、DNA 抽出から結果判定まで約3週間で最大288頭分約3,000の SNP マーカーのジェノタイプングが可能となる。これは1日あたり57,600マーカー相当と、従来の MS マーカーに比べ著しく効率的で、解析のスピード感は一気に新幹線まで進んだ印象であった。

道立畜試から地方独立行政法人北海道立総合研究機構畜産試験場 (道総研畜試) となった2010年には、この3K カスタム DNA チップを用いて牛の1~29番染色体まで広くカバーする QTL 解析の1次解析 (スクリーニング) を行った。そして得られた QTL 候補についてその後 MS マーカーを高密度に配して2次解析するという手法で効率化と精度向上を図った。この解析で用いた種雄牛の家系において BMS No. に関連する QTL 候補が検

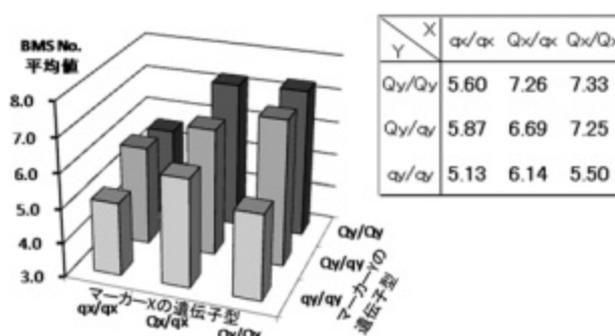


図1. 特定家系において BMS No. に効果のある DNA マーカーの遺伝子型と表型値 (DNA マーカー2つの組み合わせで平均値の差が最大約2.2)

出され、2つの効果のある MS マーカーが示された (図1)。ただし、この QTL を他の種雄牛家系で検証したところ、CW1の様に多くの家系で利用することは困難で、実用的な育種に利用できない可能性が大きかった。育種に広く利用可能な BMS No. の DNA マーカーが検出できないという結果は他県でもほぼ同様で、黒毛和種において最も重要な脂肪交雑に対する DNA マーカーによる改良については十分な成果をあげられない状況であった。

・転換期一DNA マーカーアシスト選抜からゲノム育種へ

他方、乳牛であるホルスタインでは欧米を中心に、種雄牛に対する DNA チップによる SNP マーカー解析が着々と進行し、多くの研究データが蓄積されてきた。そのことで育種改良における研究の方向は、従来の QTL 検出から DNA チップで解析した SNP マーカーのデータを基にした育種価 (ゲノム育種価) の算出へと推移してきた。2009年にアメリカ農務省が最初にゲノム育種価を公表して以来、2012年にはヤングブルすなわち種雄牛候補牛のゲノム育種価算定の割合は約80%にまで到達し、ゲノム育種価で選抜を行う取り組みが実用化に至るようになった。

黒毛和種についても、動物遺伝研を中心とした日本の牛 DNA 育種の共同研究プロジェクトにおいて、2013年に DNA マーカーアシスト選抜から DNA チップを用いたゲノム育種価選抜の方向へ研究をシフトする方針が示され、まさに転換期を迎えた。

・新たな取り組みと展望

道総研畜試も今年度からジェネティクス北海道と共同で新たなプロジェクトに参画している。2014年6月には、十勝枝肉市場において上場された任意の288頭の肥育牛

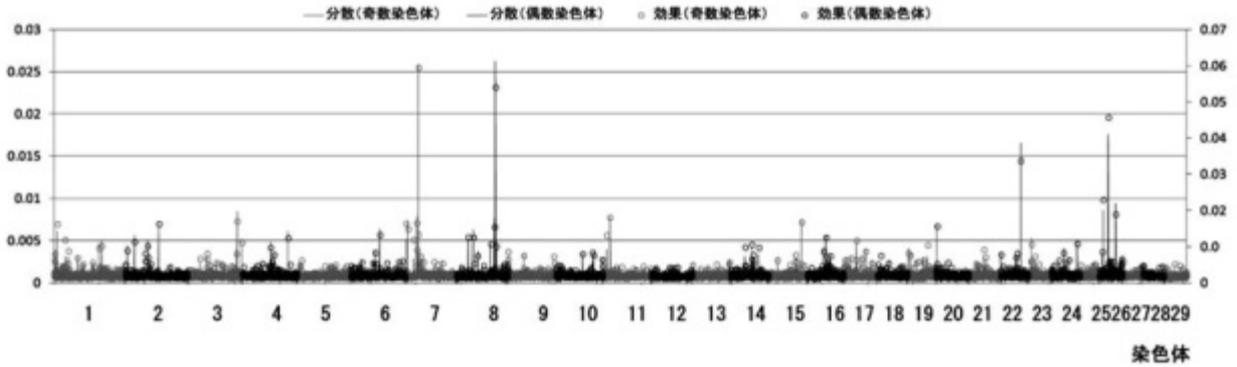


図 2. DNA チップ解析で得た染色体ごとの筋肉内脂肪オレイン酸割合の分散と効果 (7番、8番、22番および26番染色体にある SNP マーカーが効果を示している)

をゲノム育種価算出のための試験供試牛（訓練群）として、SNP マーカー数約7,000の DNA チップを用いた解析を行ったところである（写真 8. 9）。今回の解析では牛肉の食味に関連すると言われている不飽和脂肪酸、オレイン酸含量などについて変異と効果を示す SNP マーカーが検出された（図 2）。今後 2 年はこの訓練群の頭数を増やし、ゲノム育種価算出のためのジェノタイプングデータを充実させるとともに、道内種雄牛を中心とした正確度の高い育種価を有する複数の牛についてゲノム育種価の実用性に対する評価を行う集団（検証群）として、より高密度な（SNP マーカー数50,000以上と多い）DNA チップによる解析を施す計画である。



写真 8. DNA チップを用いた解析作業

ゲノム育種価情報に基づく早期選抜技術の開発および実用化に向けた研究が進めば、将来的には黒毛和種において現在より高精度、短期間かつ低コストで優良な次世代産子を選抜することが可能となる。道内の黒毛和種牛群の改良をさらに進めるには、道総研や大学等の研究機関、行政、種雄牛精液供給団体そして地域の改良組合などの畜産関係者が一体となった連携協力が必要であり、こうした体制の構築を目指して欲しい。

〈おわりに〉

滝川畜試・新得畜試から道立畜試を経て今の道総研畜試に至るまでの長期にわたる北海道における家畜 DNA 解析についての取り組みは、畜産関係者においてもほとんど知られていないのではないだろうか。

気付けば DNA 育種というものに関わって以来今年で約20年となる。この間、試験課題としては中断、再開を繰り返してきた。何をやっているのかよく解らないとか、費用や労力の割に成果が少ないという評価であったが、研究の性格上やむを得ないことも知れない。しかし、

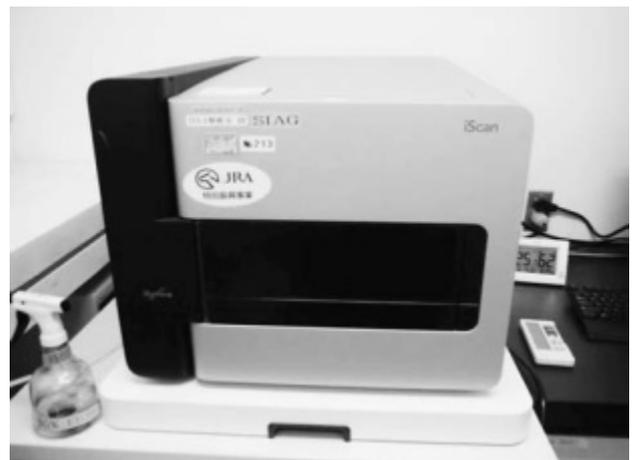


写真 9. DNA チップの情報を読み取る装置

育種技術の進歩が畜産業の生産性向上へ大きく貢献することは間違いのないところである。北海道が育種技術の新展開へと挑戦し続けられる状況にあるのは、これまでの道立の研究機関における継続した DNA マーカー育種に対する取り組みも寄与しているであろうと思っている。

“千里の道も一歩から、ゲノム育種の道も一マーカータイピングから”。

〈謝 辞〉

今回紹介した研究については「DNA マーカーを用いた新育種技術の開発（豚）：国費（H5-11）」、「牛のDNA マーカー育種技術の開発：国費補助（H12-17）」、「牛の選抜におけるDNA マーカー情報の活用：道費（H18-21）」、「画像解析による牛肉のコザシに関するDNA マーカーの探索（外部資金 JST A-step FS ステージ（H23-24）」、「黒毛和種牛における脂肪交雑 QTL の効果検証：民間共同（H25）」、「北海道黒毛和種のゲノム育種価情報に基づく早期選抜技術証：民間共同（H26）」等の予算で行って来ました。そして農水省畜産試験場（現：畜草研）、STAFF 研究所（現：JATAFF 研）、動物遺伝研、各県の畜産研究機関、十勝農協連およびジェネティクス北海道等の多岐にわたる関係各位の御協力と御指導により遂行してきたものであります。関係した皆様に対してここに謝意を表します。

参 考 文 献

Anderson, L., C.S. Herry, H. Ellegren, S.A. Knott, M. Johansson, K. Andersson, L. Andersson-Eklund, I. Edfors-Lilja, M. Fredholm, I. Hansson, J. Hakansson and K. Lundstrom : Genetic mapping of quantitative

trait loci for growth and fatness in pigs. *Science* : No.263 : 1771-1774 (1994)

Rohrer, G. A., L. J. Alexander, J. W. Keele, T. P. Smith and C. W. Beattie : A Microsatellite Linkage Map of the Porcine Genome : *Genetics*, 136 : 231-245 (1994)

内藤 学、山田 渥：梅山豚×ランドレース実験家系における DNA マーカーと豚の経済形質との連鎖解析：北海道立畜産試験場研究報告 第25号 8-15 (2003)

藤川 朗：研究トピックス「DNA はとっても便利」：北海道肉牛研究会報 77-83 (2002)

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, Oqino A, Sugimoto Y : 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 (2007)

Christine G. Elsik, Ross L. Tellam, and Kim C. Worley : The Genome Sequence of Taurine Cattle : A window to ruminant biology and evolution. *Science*, 324 (5926) : 522-528. doi : 10.1126/science.1169588 (2009)

内藤 学：道内の黒毛和種半きょうだい家系において検出された脂肪交雑関連 QTL：畜産技術12月号(2013)