

(1) 「畜産ゲノムの研究と遺伝病の克服」 ～ 和牛ゲノムデータベースによる遺伝的不良形質の 原因変異の迅速な解明 ～

国立大学法人 琉球大学 農学部 亜熱帯農林環境科学科 准教授 佐々木 慎二
国立大学法人 東京大学 大学院新領域創成科学研究科 教授 鈴木 穰

はじめに

黒毛和種の育種改良は、遺伝的能力が高い種雄牛を選抜し、人工授精で交配することで着実に進んできた。現在、「ゲノム選抜」が黒毛和種でも実用化され、育種改良のさらなるスピードアップが期待されている。一方で、黒毛和種では枝肉成績の遺伝的能力に優れた「エリート種雄牛」に交配が偏る傾向にあることから、エリート種雄牛が劣性変異など有害変異を保因すると短期間に変異が集団に拡がることになる。これまでも黒毛和種で遺伝的不良形質、主に劣性遺伝病が発生し、農家や種雄牛の造成機関を苦しめてきた。今後、ゲノム選抜によって世代間隔の短縮が予想されることから新たな遺伝的不良形質の出現も危惧され、遺伝的不良形質を未然に防ぐ仕組みが求められている。このような背景から、種雄牛造成機関が中心となって、黒毛和種の持続的な生産と育種改良に向け、ゲノム選抜という車輪を回しつつ（図1、左の車輪）、もう一つの車輪である遺伝的不良形質の制御を補強するため（図1、右の車輪）、和牛ゲノムデータベースの構築が進められている。

本稿では、1) 取り組みに至った背景、2) 取り組みが可能になった技術的背景、3) 黒毛和種でゲノムデータベースが有効な理由、4) 和牛ゲノムデータベースの構築、5) 和牛ゲノムデータベースの活用方法とその具体事例、最後に、6) 和牛ゲノムデータの保護と利活用の両立について紹介する。

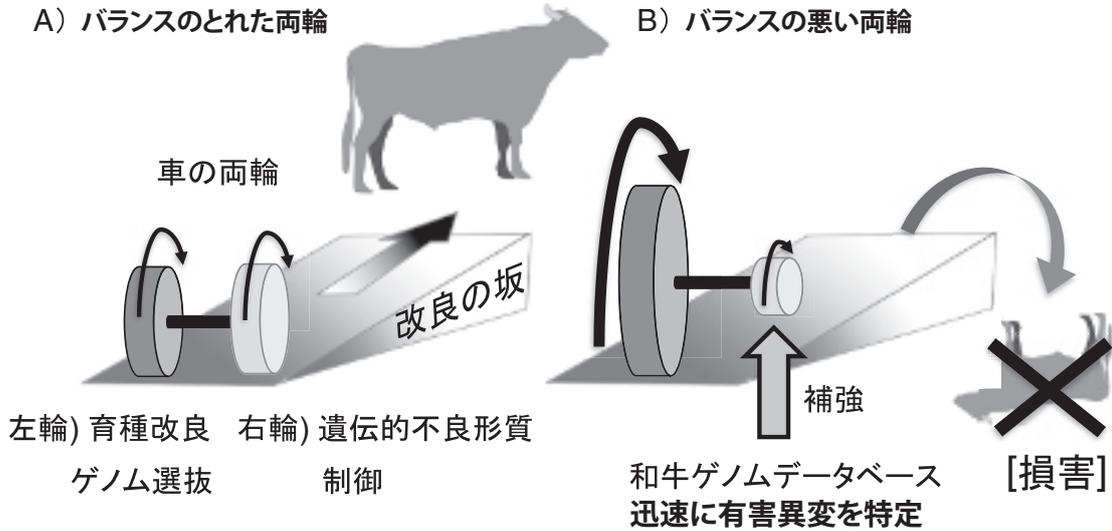
1. 取り組みに至った背景

黒毛和種の改良は、枝肉成績の育種価の高いエリート種雄牛を人工授精によって集中的に交配することで着実に進んできた。一方で「集団の有効な大きさ」が減少し（Nomura, Honda, & Mukai, 2001）、平均近交係数は約6.25%と上昇したため、エリート種雄牛の子

孫間での交配の確率が高まっている。このため、エリート種雄牛が劣性変異を保因した場合、劣性変異がホモ接合になり劣性遺伝病を発症することから、これまでも大きな経済的損失を招いてきた。劣性遺伝病が発生すると、劣性変異を特定するための解析が行われ原因変異の特定後、保因牛の検査体制と抑制のための行政対応が行われてきた。しかし、原因変異の特定には多くの時間と費用が必要で、

(図1)

[持続的な生産・育種改良]



顕在化の段階では、既に集団内に劣性変異が高い頻度で拡まっていることから、劣性変異の集団内からの排除は容易ではない。今後、ゲノム選抜によって育種改良のスピードが速まることが予想されるが（渡邊, 2016）、もし新たな遺伝的不良形質が発生すれば、育種改良は大きな打撃を受けるであろう。このような背景から、黒毛和種集団内に存在する多型・変異である「多様体」を網羅する和牛ゲノムデータベースを構築し、この情報を基に育種、交配計画を立てることで遺伝的不良形質の発生を未然に防ぎ、また、たとえ遺伝的不良形質が発生してもデータベースを活用することで速やかに原因変異を特定できるシステムの構築が必要と考えられた。

畜産技術協会附属動物遺伝研究所は平成5年の設立以降、黒毛和種を造成する道県、関係団体、大学、農家等と黒毛和種のゲノム研究を行うための全国的なネットワークを構築してきた。このような背景から、遺伝的不良形質の対策、黒毛和種のゲノムツール開発の必要性についての問題意識を共有していた。そこで、このネットワークを礎としてコン

ソーシアムを組織し、黒毛和種の多様体を格納した和牛ゲノムデータベースを構築することで、迅速に遺伝的不良形質の原因変異を特定するシステムの構築を目指すことになった。また、和牛ゲノム関連の研究の予算面においては、国等からの支援のほか、JRA畜産振興事業からも助成を受けており、平成18年度～20年度の牛有用ゲノム等探索・知的財産化事業（畜産技術協会）に始まり、現在実施している黒毛和種の強化ゲノム情報の改善・活用事業（令和2年度～3年度、畜産技術協会、東京大学、琉球大学）まで、6つの事業を継続させながら、研究の発展と実用化を進めてきた。

2. 取り組みが可能になった技術的背景

このような取り組みが可能になった技術的背景として、100-200塩基の短い配列を一度に決定できる次世代DNAシーケンサーの登場がある。次世代DNAシーケンサーでは興味ある個体のゲノムを配列決定後、すでに公開されている参照配列にマッピングし、

配列を比較することで多型・変異を検出するため、多くの個体で全ゲノムレベルの多様体を比較的短期間、安価に調べることができる。

ヒトでは、平成15年に参照ゲノムが公開されると、次の段階として平成20年頃から次世代DNAシーケンサーを使って各人種1000人の個人の全ゲノム配列を解読する「1000ゲノムプロジェクト」で多様体情報を格納する多様体データベースの整備が進められ、遺伝性疾患の原因変異、疾患感受性多型の特定に利用されるなど、パワフルなゲノムツールであることが示された (Genomes Project et al., 2010)。ウシでも同様の戦略が取られ、平成21年にウシの参照ゲノムが公開されると、平成24年からオーストラリアのグループが主導し、次世代DNAシーケンサーを使って各品種で主要な種雄牛のゲノム配列を解読する「1000 bullプロジェクト」が立ち上げられ、平成26年には西洋4品種、234頭のデータの公開され (Daetwyler et al., 2014)、有害変異が特定されるなど、その成果が報告されつつある (2021. 7月時点で約5000頭が解析)。しかし、黒毛和種は我が国の貴重な遺伝資源であることなどから情報公開を前提とする国際プロジェクトに参加しておらず、多様体データベースは構築されていなかった。

3. 黒毛和種でゲノムデータベースの構築が有効な理由

ヒト集団では一般的に血縁関係が低いいため、個人個人のゲノムを次世代DNAシーケンサーで解読する必要があるため多大な時間と費用を要する (パーソナルゲノム解析)。一方、黒毛和種を見てみると、ゲノム解析を行う上で解析材料として有利な点が2つある。1つ目は、ウシでは、一般的に個体間の血縁関係が高く、また、黒毛和種は明治に短期間、

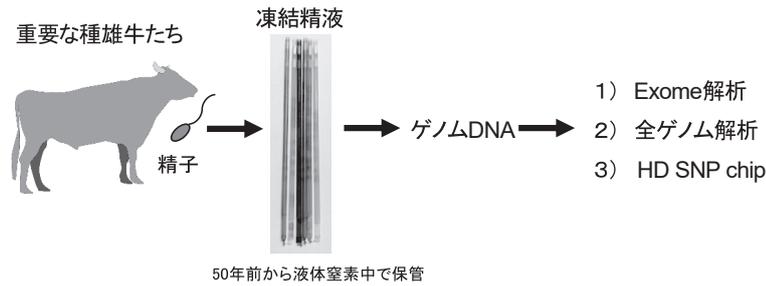
在来種と西洋品種との交雑後、国内で閉鎖登録され品種が確立され、その後の育種改良は少数のエリート種雄牛を人工授精で交配することで進んできた歴史を持つことから ((社)全国和牛登録協会, 2007)、他のウシ品種と比較しても「集団の有効な大きさ」が小さく、少数の個体の多様体を把握することができれば、黒毛和種集団に存在する遺伝的不良形質の原因変異を網羅する多様体データベースを構築できることが予想された。2つ目の有利な点として、和牛造成機関は、約50年前から種雄牛の凍結精液を液体窒素中に大切に保管しており、ゲノム解析に必要な高品質のDNAを取得できる環境にあった (図2A)。

4. 和牛ゲノムデータベースの構築

そこで、昭和32年から平成26年に誕生した種雄牛の中から「黒毛和種で要となる種雄牛」517頭のDNAを、関係機関の協力によって確保した (図2A)。ゲノムはタンパク質へ翻訳される遺伝子のエクソンの部分とそれ以外の部分に大きく分けることができるが、これまでの報告から多くの遺伝的不良形質の原因変異がエクソンのDNA配列の変異であることが分かっている。エクソン部分は全ゲノムの1-1.5%を占めるため、エクソン部分のみを濃縮し解読できる「エクソーム解析 (エクソン部分のシーケンスで得られたデータセットを用いた解析)」を、解析の効率化のため採用した。517頭のエクソームシーケンスを実施した結果、1塩基を平均約60回繰り返しシーケンスしたことに相当する十分量のエクソームデータを取得することができた (Sasaki et al., 2021)。最終的に、35万SNP、2.3万indel (数から数十塩基の挿入・欠損をindelと呼ぶ) と5.6千CNV (数千から数メガ塩

(図2)

A) 重要な種雄牛の凍結精液からゲノム解析



B) ロングリードとショートリードを併用した和牛のde novoゲノムアセンブリ

	ARS-UCD1.2 (1 sample)	WGDB de novo (74 sample)
Assembly	GCA_002263795.2	WGDB_2_74
Genome coverage	X 80.0	X 88.3
Total sequence length (chr1-29, X, MT)	2,628,411,261	2,557,488,576
Contig N50	25,896,116	9,937,825

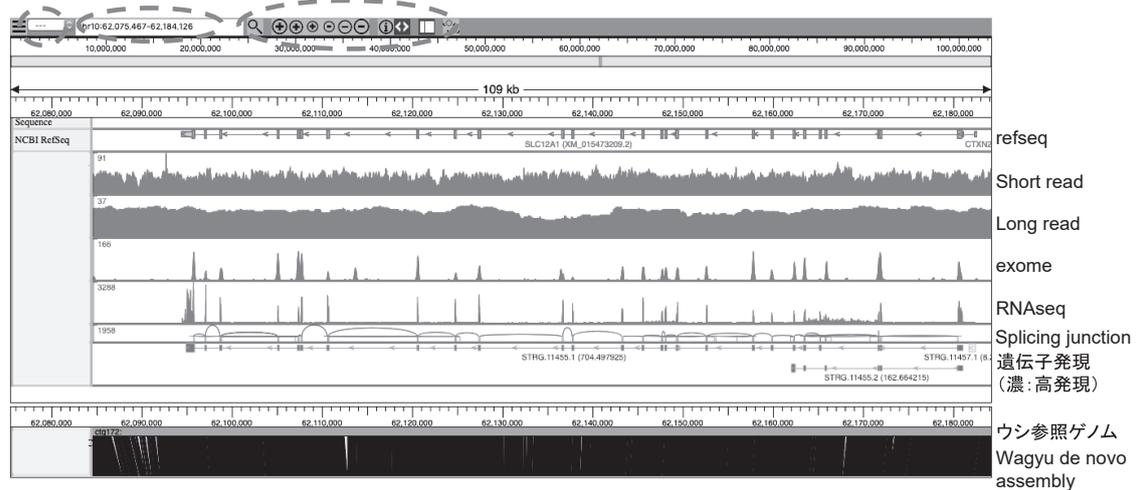
C) ショート・リード・シーケンサー(左)
ロング・リード・シーケンサー(右)



Short read sequencer (Novaseq6000) Long read sequencer (PromethION)

D) 和牛のカスタムゲノムブラウザ

検索BOX: 画面設定 (染色体、位置、遺伝子名) 拡大、縮小など (下の点線の囲み)



基の欠損・重複をゲノムコピー数多型CNVと呼ぶ)を多様体データベースに格納することができた (Sasaki et al., 2021)。このデータベースでは、変異の遺伝子上での位置や種類を基に、変異が遺伝子機能に有害な影響を与

える可能性があるかどうかを注釈情報として加えており、遺伝的不良形質の原因変異となりうるかの判断材料にすることができる。また、517頭の種雄牛 (直接検定に合格した健康な個体) におけるアレル頻度、遺伝子型類

度も算出しており、これらの頻度情報も加味し変異の有害度を評価できる。このデータベースには、過去に黒毛和種で報告された遺伝的・不良形質の原因変異が全て含まれており (Sasaki et al., 2021)、高性能の多様体データベースであることが確認できた。しかし、このエクソーム解析では、黒毛和種と西洋品種のゲノム構造が違うにも関わらず、西洋品種1頭から得られた参照配列にシーケンスをマッピングしているため、黒毛和種に特徴的な多型・変異の情報を失っている可能性があった。そこで、和牛ゲノムデータベースをさらに強化するため、次のステップとして黒毛和種の正確な全ゲノム配列「プラチナゲノム」を得るため、短鎖と長鎖のシーケンサーを併用し参照配列に依存せず全ゲノム配列を構築 (de novo assembly) する取り組みを進めている (図2 B、C)。現在までに、参照ゲノムの解析精度に匹敵する74頭の黒毛和種のゲノム配列を構築している。加えて、黒毛和種の71臓器(成牛)、胎子(妊娠4ステージ)、65臓器(子牛2ステージ)の合計131サンプルを採材し、RNAシーケンスを行い、「和牛の遺伝子情報のカタログ化」も進めている (図2 D)。このようなRNAの発現データセットは、胚死滅、胎子死亡、子牛損耗・死亡に関与する原因変異を探索する際、候補遺伝子・候補変異の注釈付に役立つ。また、これらのデータは保管、解析の利便性を高めるため、カスタムの和牛ゲノムビューアーによって閲覧し解析することが可能となっている (図2 D)。

5. 和牛ゲノムデータベースの活用方法とその具体事例

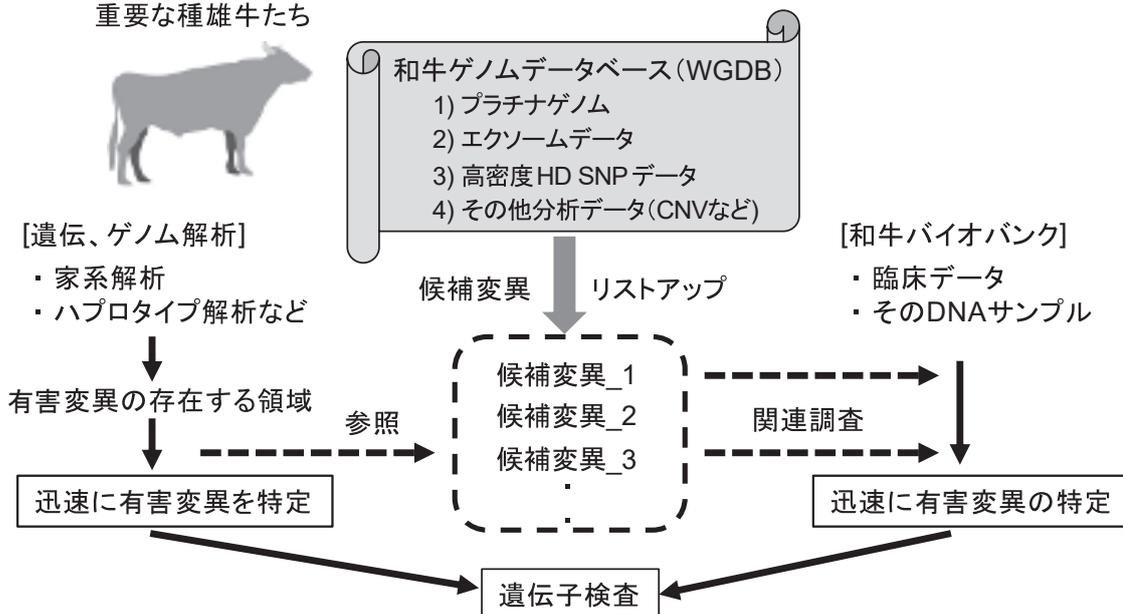
構築された和牛ゲノムデータベースの活用方法は、主に2種類ある。1つ目は、遺伝的・不良形質が発症した個体(家系など)の表現

型を基にした遺伝、ゲノム解析から、染色体上の原因領域が特定された時の活用である (図3 A、左側の矢印群)。このケースでは、データベースを使って領域に存在する変異を素早く検索することができる。また、このケースでは、ハプロタイプ解析で予めリスクハプロタイプを保有する種雄牛が特定できるため、データベースに格納された種雄牛のリスクハプロタイプと変異の保有状況を加味し原因変異の絞り込みを行うことができる。2つ目は、和牛ゲノムデータベースなどの大規模データベースに特徴的な活用法で、事前にデータベースから候補変異をリストアップし、その後、候補変異と臨床症状との関連を調査し、原因変異を特定するものである。先程解説したように和牛ゲノムデータベースでは、変異の遺伝子機能に対する有害度予測、遺伝子頻度情報から、既に多くの候補変異がリストアップされている (図3 A、真ん中矢印)。そこで、リストアップされた候補変異が実際に遺伝的・不良形質の原因となり得るか、候補変異と臨床症状との関連を調べることで検討する (図3 A右側の矢印群)。このようにデータベースを活用し適切な交配計画を立てることで、遺伝的・不良形質が発生し生産現場で問題になる前に未然に発生を防ぐことができる。

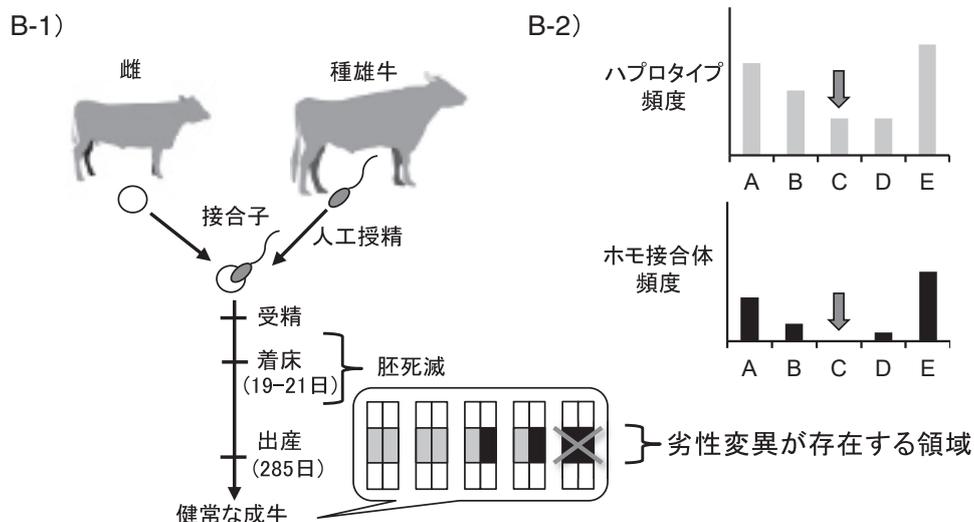
和牛ゲノムデータベースの具体的な活用事例として、受胎率の低下の原因の1つである胚死滅に関与する劣性変異の特定事例について解説する。胚死滅の原因となる劣性変異を特定するためには、多くの死滅した胚のDNAサンプルが必要になるが、死滅した胚は微小で母体内で吸収・分解されるなどサンプリングが困難で、技術的な制約からこれまでゲノム解析が行われてこなかった。このような技術的問題を克服する手法として、ゲノ

(図3)

A) 和牛ゲノムデータベースの活用法
重要な種雄牛たち



B) [胚死滅を引き起こす劣性変異が存在するハプロタイプの特定]



ム選抜のため大規模に収集されている健全な成牛のSNPデータを活用する解析手法が報告された (VanRaden, Olson, Null, & Hutchison, 2011; Sasaki et al., 2021)。この解析では、胚死滅を引き起こす原因が劣性変異の場合、胚は母体内で死滅するため、健全な成牛集団に劣性変異をホモ接合に保有する個体は存在しえないことを基にしており (図3 B-1)、健全な成牛集団でホモ接合が存在しないゲノ

ム領域内に、胚死滅を引き起こす劣性変異が存在すると仮定できる (図3 B-1の黒の領域)。黒毛和種で、このようなハプロタイプ領域を探索したところ (図3 B-2)、胚死滅と関連する候補リスクハプロタイプが7カ所特定された。そこで、次に、和牛ゲノムデータベースを活用し、該当するハプロタイプ領域に存在する変異を検索した結果、細胞分裂の制御に関わるCDC45のスーパーサイト

変異を特定することができた。その後、健常集団における頻度調査、保因牛同士の交配実験によって、この変異が胚死滅を引き起こす劣性変異であることが明らかとなった (Sasaki et al., 2021)。受胎は、配偶子 (精子、卵子)、接合子 (受精卵)、母体と異なるゲノムが関わって成立する複雑なプロセスで、それぞれのプロセスが大きく環境の影響を受けることから、従来の育種手法では受胎成績を向上させることは容易ではない。しかし、和牛ゲノムデータベースを活用することで、胚死滅の原因となる劣性変異を特定できたことから、遺伝的側面からも受胎成績を向上できる可能性が示唆された。また、現在、致死など重篤な遺伝的不良形質に加え、和牛の生産現場で問題となっている「生産の質」を低下させる遺伝的要因についても解析対象を拡げ、解析を進めている。

6. 和牛ゲノムデータの保護と利活用の両立

和牛は、先人によって守られ地域ごとに改良されてきた「我が国にとって核心的遺伝資源」である。和牛のゲノムデータという「デジタル情報」が、今度どのような意味を持ち得るのかについては、和牛個体や凍結精液、卵、受精卵などの海外への流出状況などから不透明な点が多い。このため、和牛ゲノムデータは有体物ではないが、遺伝資源としての側面を持つものとして扱うことが妥当と考えられる。一方、和牛造成機関は、地域間競争がある中においても協力し、遺伝的不良形質に対応するため、和牛のゲノム情報を整備すべきとの問題意識を共有している。このような背景から、和牛ゲノム情報の「保護」と「遺伝的不良形質の原因変異の特定への活用」の両立を目指し (図 4 A)、和牛造成機関を中

心に和牛ゲノムデータベース協議会が立ち上げられ (佐々木, 2020b)、和牛ゲノムデータベースの構築と整備が進められている (図 4 B)。このゲノムデータベースは、和牛のゲノム情報の保護の観点から「閉鎖型」ではあるが、国内の和牛研究者のニーズに対応して確実に情報を届ける「研究支援型」のデータベースとして運用が始められている (佐々木, 2020b)。

本稿では、全国の関係機関と協力し黒毛和種の多型・変異である「多様体」を網羅する和牛ゲノムデータベースを構築し、このデータベースを活用することで遺伝的不良形質の原因変異を迅速に特定するシステムの構築に取り組んでいることを紹介した。このシステムが遺伝的不良形質の排除や交配計画に利用され、先人たちの努力によって長い期間をかけて築かれた黒毛和種を今後も守り、関係機関、農家が安心して育種改良、生産できるようになることを願っている。

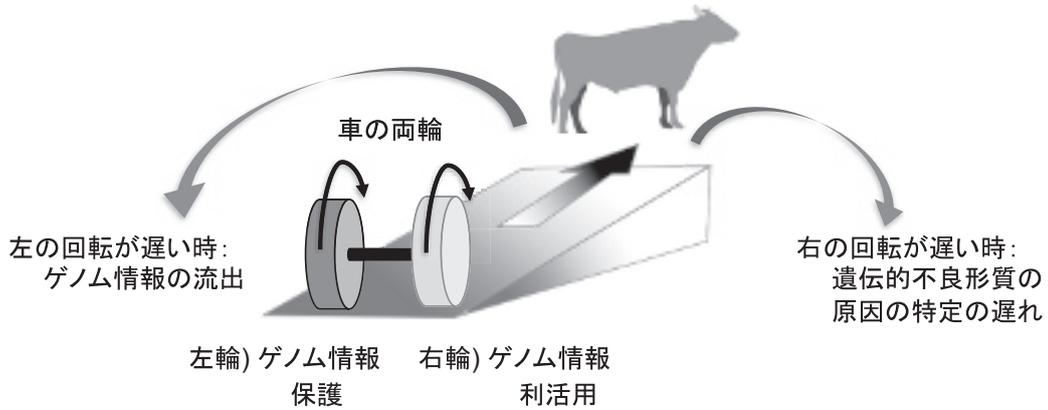
謝辞

本稿で紹介した研究は、日本中央競馬会「畜産振興事業」、農林水産省、農林水産技術会議「農林水産業・食品産業科学技術研究推進委託事業」、農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」の支援を受け、和牛ゲノムデータベース協議会 (畜産技術協会、岐阜県畜産研究所、兵庫県立農林水産技術総合センター、鳥取県畜産試験場、鹿児島県肉用牛改良研究所、島根県畜産技術センター、一般社団法人家畜改良事業団、沖縄県畜産研究センター、岡山県農林水産総合センター畜産研究所、岩手県農業研究センター、大分県農林水産研究指導センター、地方独立行政法人青森県産業技術センター、長

(図4)

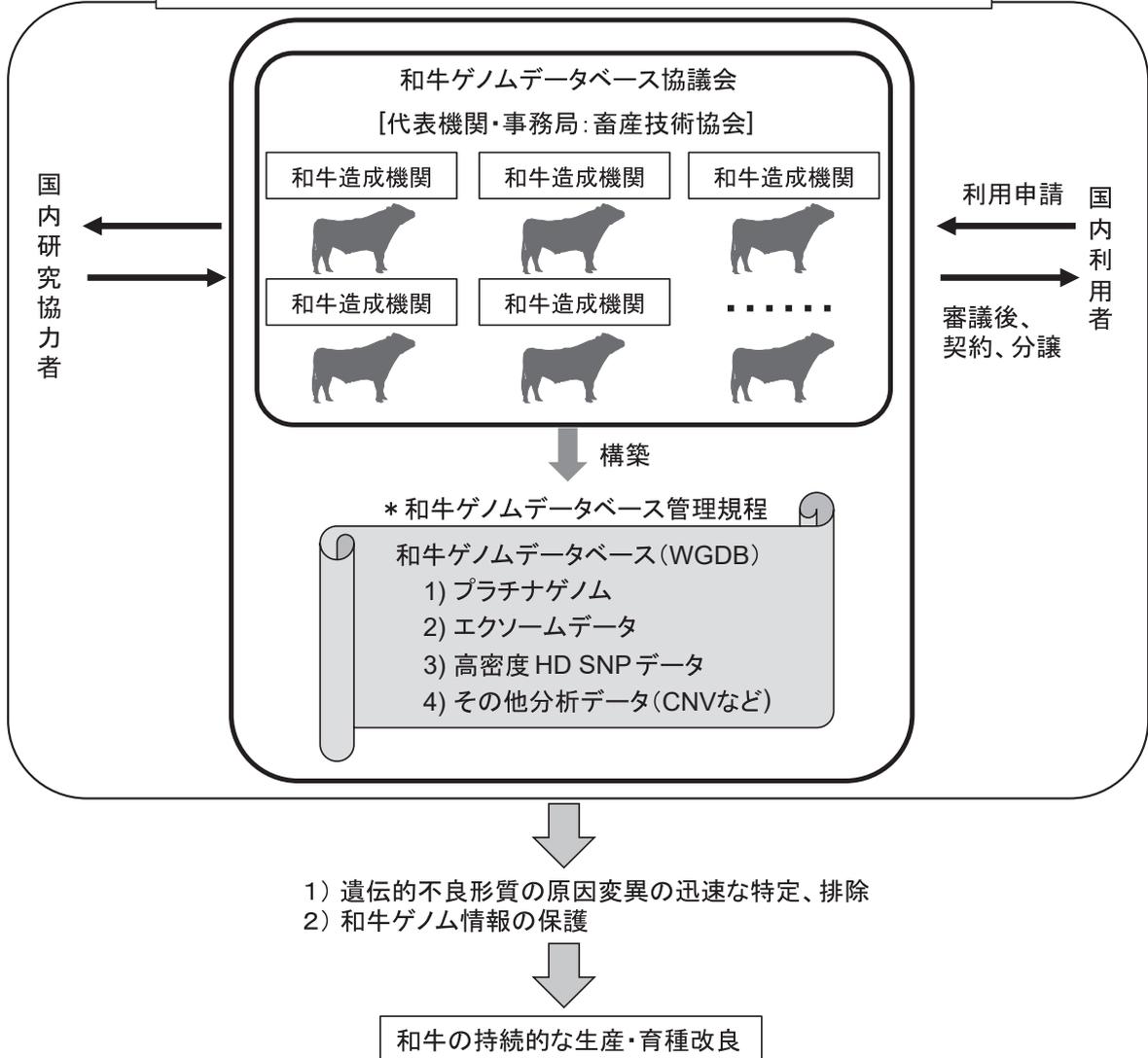
A) 和牛のゲノム情報の保護と利活用

[黒毛和種: 我が国の重要な遺伝資源]



B)

和牛ゲノムデータベースの構築、国内における利活用の仕組み



崎県肉用牛改良センター、福島県農業総合センター畜産研究所)が主体となり、共同研究機関や民間牧場の協力も得て進められたものである。また、和牛生産阻害因子解明プラットフォームコンソーシアム(畜産技術協会、東京大学、北里大学、東京農業大学、岐阜県、兵庫県、鳥取県、鹿児島県、島根県、家畜改良事業団、家畜改良センター、琉球大学)とご指導いただいた国枝哲夫先生、稲葉睦先生、農林水産・食品産業技術振興協会高橋秀之先生に深謝する。

渡邊 敏夫. (2016). 黒毛和種経済形質のゲノム育種価評価. *The journal of Animal Genetics*, 44, 3-10.

<引用文献>

(社)全国和牛登録協会. 2007. これからの和牛の育種と改良:改訂版.

Daetwyler, H. D., Capitan, A., Pausch, H., Stothard, P., van Binsbergen, R., Brondum, R. F., . . . Hayes, B. J. (2014). Whole-genome sequencing of 234 bulls facilitates mapping of monogenic and complex traits in cattle. *Nat Genet*, 46, 858-865.

Genomes Project, C., Abecasis, G. R., Altshuler, D., Auton, A., Brooks, L. D., Durbin, R. M., . . . McVean, G. A. (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*, 467, 1061-1073.

Nomura, T., Honda, T., & Mukai, F. (2001). Inbreeding and effective population size of Japanese Black cattle. *Journal of Animal Science*, 79, 366-370.

佐々木 慎二 (2020). 和牛ゲノムデータベース協議会の立ち上げ(研究レポート), 畜産技術, 10月号, 42-46.

Sasaki, S., Watanabe, T., Ibi, T., Hasegawa, K., Sakamoto, Y., Moriwaki, S., . . . Suzuki, Y. (2021). Identification of deleterious recessive haplotypes and candidate deleterious recessive mutations in Japanese Black cattle. *Scientific Reports*, 11, 6687.

VanRaden, P. M., Olson, K. M., Null, D. J., & Hutchison, J. L. (2011). Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. *J Dairy Sci*, 94, 6153-6161.

