

(2) ウシゲノム研究の歩みと 今後の展望

公益社団法人 畜産技術協会附属動物遺伝研究所 元所長 杉本 喜憲

公益社団法人畜産技術協会附属動物遺伝研究所・元所長の杉本喜憲氏、並びに同協会の御厚意により、我が国のウシゲノム研究黎明期から現在に至る道程について、畜産技術 2016年10月号～12月号に掲載された記事を再掲させて頂くことにより、御紹介させていただきます。

- 1回目 解析用ツールの開発から始まったウシゲノム研究
- 2回目 黒毛和種経済形質のゲノム解析
- 3回目 黒毛和種不良因子のゲノム研究：その光と影

解析用ツールの開発から始まった ウシゲノム研究

公益社団法人 畜産技術協会附属動物遺伝研究所 元所長 杉本 喜憲

動物遺伝研究所は来年2017年の3月に閉鎖することになりました。24年間の長いような短いような期間でしたが、黒毛和種に関する研究にまともに取り組んだ初めての研究機関だったと思います。その使命は、黒毛和種の不良因子のコントロールと産肉性等の経済形質の育種に役立つDNA情報の開発・実用化でした。閉鎖に当たって動物遺伝研究所はその使命をどの程度果たすことができたのか判断できるようにここに記録を残したいと思います。閉鎖されたからといって黒毛和種に関する研究も途絶えるわけではなく、更に発展した形で継続されることは間違いありません。この24年間、ご支援いただきました国・道県を始め関係者の方々に感謝いたします。

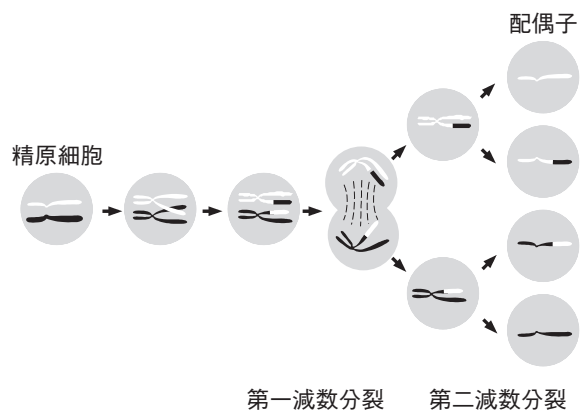
1. 1993年4月：動物遺伝研究所の始まり

1993年4月に畜産技術協会附属動物遺伝研究所の開所式が執り行われました。農林水産省から畜産局長が主賓で挨拶するなど今から考えると国の力の入れ方がわかります。家畜改良センターの敷地を借用した2階建て2,000平米の研究所でした。研究費は日本中央競馬会の畜産振興費で賄われ、申し分ありません。当研究所に与えられた最初の課題は、DNAマーカー情報を用いるウシの個体識別・親子判定手法を確立することでした。DNAマーカーは、個体によってDNA配列が異なるもので、個体識別・親子判定に役立ちます。1993年当時は公表されたDNAマーカーは少なく、お互いの位置関係を示すDNAマーカーで、作成されたウシゲノム地図は存在していませんでしたが、これは後で何とかなる問題と割り切りました。

2. ウシゲノム地図の作成とは

ウシゲノム地図は減数分裂で起こる染色体の組換え（交差）を利用して作ります。哺乳動物の有性生殖では減数分裂の過程で組換えを起こし、親の2本の染色体（父と母由来）から1本の染色体だけの配偶子が作られます。配偶子の持つ染色体は、父由来・母由来・組換え体（2種）の4種の内のどれかです（図1）。

（図1）減数分裂による精原細胞からの配偶子生成



異なる染色体に位置するDNAマーカー同士や同じ染色体でも距離が離れていれば、互いに独立に遺伝するので組換え頻度50%となります。同じ染色体に位置するマーカーは近接しているとマーカー間の組換え頻度は50%より小さくなります（共に遺伝する：連鎖という）。組換え頻度をそのまま遺伝距離とし、cM(センチモルガン)単位で表示します。マーカー数が増えてくると同じ染色体に位置するマーカー同士は連鎖グループを形成することになります。連鎖関係にあるDNAマーカー同士の片方は個体識別・親子判定には使えません。

地図作りに必要なものは、遺伝子型が多い（多型性が高い）多数のウシDNAマーカーと、産子200-300個体からなるウシ全きょうだい家系です（父方半きょうだい家系でも良いのですが、2倍の規模が必要です）。遺伝子型が多ければ親から子への伝わり方が正確に分かります。連鎖を知るには400-600回くらいの組換えを調べる必要があるのです。

当時、米国農務省が数百万ドルの経費をウシ・ブタ・ヒツジのゲノム地図作成に投入したというニュースがあり、我が国ではつくばの畜産試験場とSTAFF研究所でブタゲノム研究がスタートしたばかりでした。

3. 個体識別・親子判定のためのDNAマーカー

どのようなタイプのDNAマーカーを開発すべきか？その頃、マイクロサテライトでヒトゲノム連鎖地図作りが報告されるなど、マイクロサテライトの将来性を感じていました。当研究所には畜産関係の研究者らからなる運営協議会があり、研究への助言などを行っていました。1993年の最初の会議では研究の年度計画として、私はCAの2塩基繰り返し

返し構造を持つマイクロサテライトを開発して個体識別・親子判定の系を作ると報告しました。その理由として、ウシのゲノムライブラリー（ウシゲノムの200-300塩基対断片を集めたもの）からCAリピートをプローブにすれば容易にクローニングできること、一般的にマイクロサテライトは多型性が高いこと、ゲノムに数十万種存在すること、DNAシーケンサーで型判定ができることなどを挙げました。これに対し、各委員からマイクロサテライトだけでなく他のDNAマーカーなども調べたらどうかという助言が出ましたが、助言を聞きながらマイクロサテライトに固執したことに当時の農水OBの所長は驚いたそうです。実際、全ゲノム解読が進む2004年頃までマイクロサテライトは最も役に立つDNAマーカーでした。

黒毛和種からヘテロ接合率が高く、父権否定率の高いマイクロサテライト部位を10-12ヶ所見つけてくれば、全国の黒毛和種150万頭、黒毛和種種雄牛1,500頭を識別できるはずでした。ウシのゲノムライブラリーからCAの繰り返し数が12回以上のマイクロサテライト113種を得、DIK001からDIK113と名付けました。DIKは動物遺伝研究所で開発したことを意味します（後には3桁では足りず、4桁となり、世界中の研究者がDIKマーカーを使うこととなりました）。得たマイクロサテライトを黒毛和種40頭集団で遺伝子型を型判定し、ヘテロ接合率と父権否定率の高いマイクロサテライトを12種選びました。40頭集団での12種のマイクロサテライトの遺伝子型の分布を見る限り互いに独立に遺伝しており、連鎖関係は無いと考えられました。表1に個体識別・親子判定システムのまとめを示します。

表1に示す12種のマイクロサテライトは3

種類の蛍光色素を使い、PCR生成物のサイズを変えることでDNAシーケンサーの1つのレーンで同時に遺伝子型判定できるようにしています。ヘテロ接合率から個体識別できる個体数は 3.2×10^7 、父権否定率から区別できる種雄牛頭数は 1.6×10^4 でした（この後述べるように12種のマイクロサテライトはゲノム連鎖地図に位置付けられ、互いに異なった染色体に存在することがわかりました）。

DNAマーカーによる個体識別・親子判定手法についての問い合わせがありました。私どもも本当に識別できるのか試してみたいという気持ちで、依頼された親子判定を実施しました。結果を返してからしばらくしてある県から連絡があり、私どもの結果を基に訴えを起こされた、種雄牛の精液ストローを送るから親子判定をしてもらいたいとのことでした。研究者を騙すなど赤子の手をひねるようなものです。この件以来用心深くなったと思います。

4. 1994年7月：プラハで開催された国際動物遺伝学会

個体識別・親子判定手法の確立の次に、(1)黒毛和種の遺伝病の原因を解明し、遺伝子診断できるようにする、(2)黒毛和種のDNA情報を利用した産肉性などの経済形質の育種手法を確立する、を見据えていましたので、マイクロサテライトによるゲノム連鎖地図作りを急がねばなりません。マイクロサテライトのマッピング（ゲノム上の位置を決めること）にはウシの産子200-300個体で構成する全きょうだい家系のDNAが必要です。どうすれば良いのか？

1994年の4月に米国農務省肉畜研究センター（リーダーはDr. Beattie）と国際共同研究体（BovMap：リーダーはオーストラリア

(表1) 12種のマイクロサテライトで構成した個体識別・親子判定システム

このシステムは、 3.2×10^7 頭の個体識別を可能にし、 1.6×10^4 頭の種雄牛について親子判定が可能です。

標識 蛍光	DNA マーカー	染色体*	PCR生成物 (bp)	ヘテロ 接合率	父権 否定率	遺伝子 型数
HEX	DIK089	4	82-98	0.65	0.48	8
	DIK102	15	123-163	0.68	0.62	5
	DIK097	12	192-212	0.9	0.58	9
	DIK020	10	230-254	0.7	0.41	8
FAM	DIK023	11	85-109	0.83	0.67	10
	DIK069	3	142-164	0.68	0.54	10
	DIK010	24	185-201	0.68	0.56	9
	DIK024	1	229-251	0.78	0.58	11
TET	DIK106	8	95-123	0.7	0.68	13
	DIK068	28	145-220	0.88	0.57	10
	DIK039	19	194-220	0.6	0.45	10
	DIK096	9	246-256	0.83	0.38	7

のDr. Hetzel) は、別々にウシゲノム地図の論文を発表しました。その夏、チェコスロバキアのプラハで開催された国際動物遺伝学会でこの2人に会いました。黒毛和種由来のマイクロサテライトのマッピングをしたいとの提案に、Dr. Hetzelは快諾してくれたのでBovMapに入り、マッピングパネルである全きょうだい家系のDNA（21個体識別・親子判定手法の確立の次に、(1)黒毛和種の遺伝病の原因を解明し、遺伝子診断できるようにする、(2)黒毛和種のDNA情報を利用した産肉性などの経済形質の育種手法を確立する、を見据えていましたので、マイクロサテライトによるゲノム連鎖地図作りを急がねばなりません。マイクロサテライトのマッピング（ゲノム上の位置を決めること）にはウシの産子200-300個体で構成する全きょうだい家系のDNAが必要です。どうすれば良いのか？

1994年の4月に米国農務省肉畜研究センター（リーダーはDr. Beattie）と国際共同研究体（BovMap：リーダーはオーストラリアのDr. Hetzel) は、別々にウシゲノム地図の論文を発表しました。その夏、チェコスロバ

キアのプラハで開催された国際動物遺伝学会でこの2人に会いました。黒毛和種由来のマイクロサテライトのマッピングをしたいとの提案に、Dr. Hetzelは快諾してくれたのでBovMapに入り、マッピングパネルである全きょうだい家系のDNA (21た (これはこれで正しい選択であったと後に分かりました)。

おそらくこのプラハでのウシゲノムに関するワークショップは最もエキサイティングだったと思います。これからウシゲノム研究で何かが起こると期待でたいへんな熱気でした。4月に発表された2つの地図はまだまだ貧弱な道具立てでしたが、先頭を切っていたベルギーのDr. Georgesを始めとする研究者達の報告に心を揺さぶられました。

6. 連鎖地図作成の黎明から発展まで (1997年春まで)

連鎖地図を有用なものにするため、(1)多型の高いDNAマーカーであるマイクロサテライトを多数開発する、(2)マーカー間の空隙を埋める、(3)連鎖グループを染色体に対応させる、(4)蛍光in situ ハイブリダイゼーション (FISH) で染色体の方向を決めるなどが必要です。私たちはDr. Hetzelが率いるBovMapに加わり、マイクロサテライトの開発と位置付け (マッピング) を行ってきました。1997年の春、2つのグループはそれぞれ第2世代のウシ連鎖地図を発表しました。BovMapの703個のマイクロサテライトからなる地図のサイズは3,567cMと大きく、しかも252個の正確な位置が決まっていない。多くの機関が参加しているBovMapの地図にはマーカーの型判定エラーが多く含まれており、やり直すことが事実上できなかったのは致命的でした。一方、Dr. Beattie率いるUSDA-MARCの1,236個のマイクロサテライ

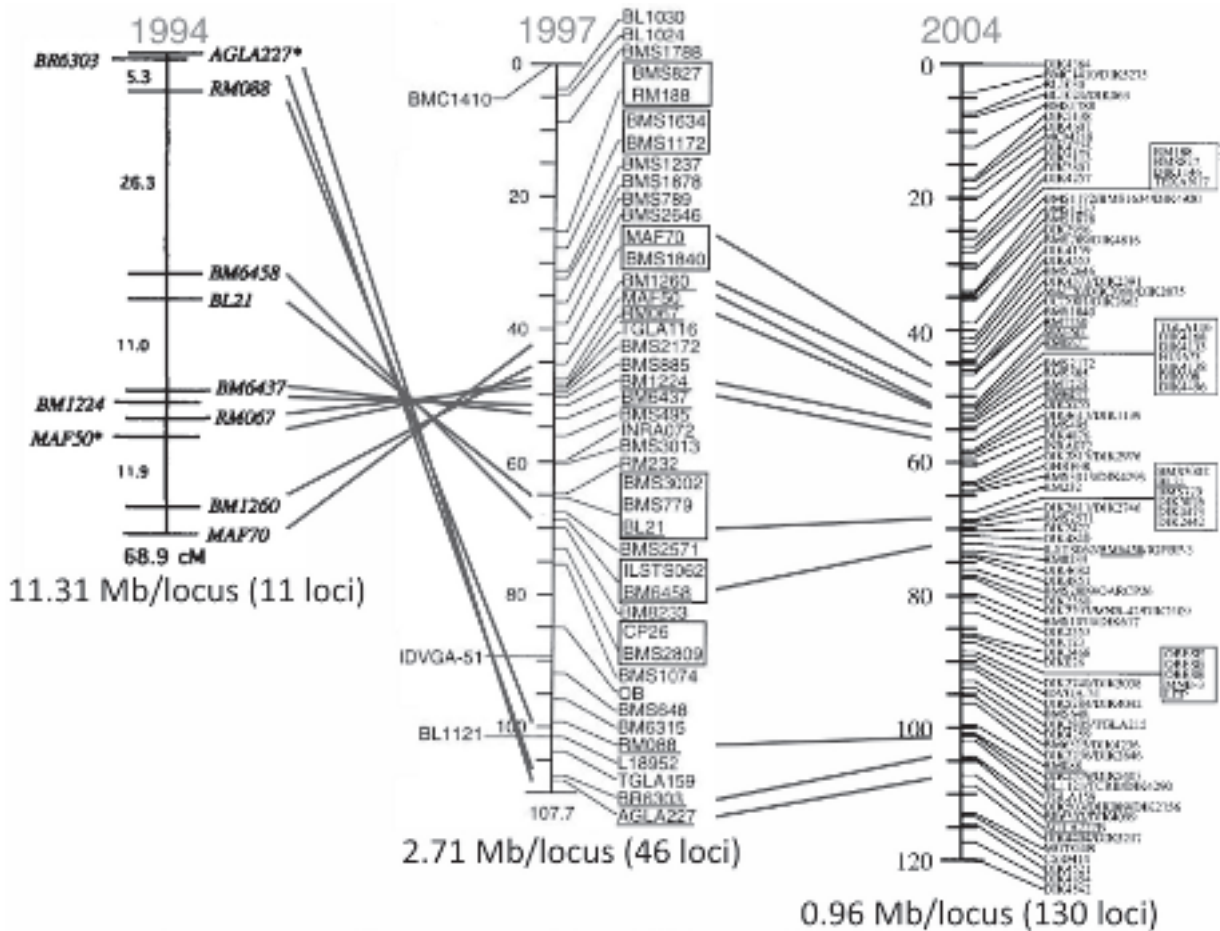
トからなる地図のサイズは2,990cMであり、これまで想定されていた3,000cMに近い。USDA-MARCは、エラーを厳しくチェックしながら地図作りを行いました。論文で「自分たちが行ったような大規模なマーカー開発で地図を改良することは近未来には無いだろう」と述べています。彼らの連鎖地図のDNAマーカーは平均して多型性が低く (<60%)、マーカー間隔が10cM以上のものが14% (177/1220) も存在するため、マーカーアシスト選抜には不十分であるにもかかわらず、USDA-MARCの地図はウシゲノム解析のゴールデンスタンダードとなって、遺伝病や経済形質のマッピングに世界中で使われました。

7. 高密度連鎖地図から物理地図への道 (1997年から2005年)

私たちもUSDA-MARCの地図を使って遺伝病や経済形質のマッピングを行い、10ヶ所ほどの領域に辿り着きました。マッピングした領域をさらに狭め、マーカーアシスト選抜へ発展させるには多大な努力が必要でした。明らかにUSDA-MARCの地図の高密度化がなされるべきでしたが、各国の動きは鈍く、国際的に連携してマーカー開発することになりませんでした (国際動物遺伝学会、2000年夏、ミネアポリス)。その1つの理由は、もはやマイクロサテライトのDNAマーカー開発だけでは論文として評価されないことでした。

私はこの問題を解決するため、2000年頃にマイクロサテライトの大規模な開発を決断しました。誰もやらないのなら自分でやるしかありません。マイクロサテライト濃縮ライブラリーから1万クローンを拾い、約700種の新規マイクロサテライトを開発しました。こ

(図2) ウシ染色体4番のゲノム連鎖地図



1994年のUSDAによる第一世代の地図では11 マーカーで構成されていました。1997年には向きが変わり、46 マーカーとなりました。第三世代では130 マーカーに増やしました。マーカー名にDIKとあるのが動物遺伝研究所開発のマイクロサテライトです。

のプロトコルで実験を繰り返せば2,000種のマイクロサテライト開発ができることがわかりました。同時に、USDA-MARCのリーダーになっていたDr. Kappesにマッピング用の全きょうだい家系DNAを送ってもらい、マイクロサテライトのタイピング結果をUSDA-MARCに送り、地図に載せることにしました。研究員達に協力してもらいました。最終的に3,802種のマイクロサテライトからなる第三世代のShirakawa-USDA連鎖地図を作成することができました(2004年)。図2にその一部であるウシ染色体4番のゲノム連鎖地図を示します。

また、物理地図作成を始めることにしまし

た。ゲノム連鎖地図はマーカー間の組換え頻度から求められた遺伝的な距離ですが、物理地図はDNAの長さに則してマーカーや遺伝子を並べた地図です。そこで、物理地図作りに威力を発揮する放射線照射雑種細胞(Radiation hybrid: RH)パネルを作成しました。並行して、ウシで発現している遺伝子断片を約7,000種の遺伝子断片を分離しました(2001年)。最終的に、ネバダ大学と共同で、RHパネルにマイクロサテライト3,216種と遺伝子断片2,377種を位置付けた合計5,593種からなるウシ物理地図SUN-RH地図(Shirakawa-University of Nevada Radiation Hybrid 地図)を完成しました(2004年)。この頃は14名の

研究員、10名の研究補助員を抱えていましたからできたことと思います。

これらの地図はウシ全ゲノム解読の基盤となりました。USDA-MARCはウシ全ゲノム解読のため、統合地図を作成することを始めました。

私たちのShirakawa-USDA連鎖地図とウシ物理地図SUN-RH地図の全データの提供も依頼され、提供しました。他機関のRH地図のデータも加えた統合地図が作られていきました。

8. 2009年4月：ウシゲノム解読へ

USDA-MARCはウシゲノム解読のための国際コンソーシアムを立ち上げることを決め、第1回の会議を2000年1月のバンクーバーで開催する連絡がありました。ウシゲノムを解読できれば、ゲノム研究の様相が激変し、そのメリットは計り知れない。そのためにはヒトゲノム解読に成功した研究機関のノウハウが必要です。コンソーシアムでは、ウシゲノム解読へ向けて次のようなことを決めることになっていました；(1)解読の対象にヘレフォード種雄1頭を選び、そのBACライブラリー(約150kbのDNA断片を含むクローンで構成)をオークランド小児病院のDr. Dejongが作成し、必要機関に配布する(私たちにも配布されました)；(2)ヒトやマウスで経験豊富なブリティッシュ・コロニア大のDr. Marraが中心になって、フィンガープリントでウシBACの整列化を行う；(3)テキサスBaylor 医科大ヒトゲノムシーケンシングセンターのDr. Gibbsが中心になって、全ゲノムを対象にショットガンシーケンシングを行い、ゲノムの3倍長分の配列を決める；(4)参加機関は基金を拠出し、様々な品種のウ

シDNAを提供する。私たちも参加したかったのですが、周囲の反対が強くて諦めました。

Dr. Marraのフィンガープリントでは、各BACクローンを制限酵素で切断し、ゲル電気泳動を行うとクローン毎に特徴あるDNAのバンドパターンを示します。BACクローン同士でオーバーラップしている部分は、そのフィンガープリントも重なりますので、この重なりを利用してBACクローンをつなぐことができます(整列化するという)。整列化されたBACクローン集団の染色体への位置付けを正確に行うため、前述の統合地図が使われました。

たくさんの研究者の努力と巨額の資金を使ってウシゲノムのドラフト配列が完成し、ついに2009年4月のScience誌にウシゲノム解読の論文が掲載されました。コンソーシアムに参加していなかった私たちの貢献も正当に評価され、共著者として扱われました。

9. ウシゲノムの解読後：ポストゲノムの時代の始まり

ヒトゲノムの解読については、2001年2月のNature誌に掲載されました。この頃からゲノム研究分野で半導体の微細加工技術を活用した重要な発明が相次ぎました。

1つ目は、次世代シーケンサーの発明です。1回に解読できる長さは当初30bpに過ぎませんが、解読数は数千万から数億なのでゲノムサイズである30億bpに届きます。解読される個体数が増えると配列の違いであるSNP(一塩基多型)マーカーが大量に開発されることになりました。2つ目は、大量のSNPのタイピング技術です。これによりSNPタイピングのコストが下がり、かつ、迅速になりました。ウシでも50K(5万)SNPを搭載したチップが市販されました。

3つ目は、ゲノムの必要な領域だけを解読する技術です。タンパク質をコードしているエクソン領域や特定の数Mb（数百万bp）領域を効率よく読めます。特にエクソン領域を濃縮して読むエキソーム解析は重要な方法になりました。

この小論の次回は黒毛和種産肉性などの経済形質の解析に新しい技術がどのように使われたかも紹介します。

黒毛和種経済形質のゲノム解析

1. 1993年9月: 岐阜安福の死亡

動物遺伝研究所が開所した半年後に岐阜の安福が死亡したというニュースが全国紙に掲載されました。享年13歳5ヶ月で約4万頭の子を作り、岐阜県に一大産業を興したとのこと、驚きました。まず、牛に名前が付いていたということ、種雄牛1頭で飛騨牛ブランドができあがったということ。黒毛和種の実力を実感できる破天荒なニュースと思いました。

2. 1994年9月: 肉用牛ゲノム研究の始まり

1994年4月にスウェーデンのDr. Andersonらが、Science誌にブタの産肉性などの量的形質(QTL)をマッピングしたという報告がありました。解析に用いたのは大ヨークとイノシシの全きょうだい200頭からなる家系でした。ブタもウシ同様の貧弱なゲノム地図しかないにもかかわらずQTLマッピングに成功したのです。1994年7月にプラハで開催された国際動物遺伝学会でDr. Andersonやホルスタイン種のミルク生産性をマッピングしていたDr. Georgesらから、さらに刺激されました。帰国して、農林水産省畜産局家畜生産課の担当課長補佐らに、世界で何が行われているかについて報告しました。すると、ある日突然巨額の研究費が降ってきました。

日本中央競馬会畜産振興事業から肉用牛ゲノム研究に関わる事業費を獲得してくれました。国は豊かでした。

1994年10月から始まる新規事業のため、担当補佐は黒毛和種の種雄牛造成を行っている県などに参加を呼びかけ、9月に農水省で説明会を開きました。事業の目的は、黒毛和種経済形質のDNA育種手法を開発することでした。去勢産子8頭からなる後代検定家系をDNAマーカーのマイクロサテライトでタイピングして脂肪交雑・枝肉重量など産肉性をDNA情報で改良するというものです。参加機関は14道県と家畜改良事業団でした。このコンソーシアムの参加機関にはDNAシーケンサーなどの機器を提供し、マイクロサテライトのタイピングについて研修し、産肉性の連鎖解析を行うという真に贅沢な、かつ、向こう見ずなものです。この時の驚きは、北海道に通知していなかったにもかかわらず説明会に出席していたことです。さすがです。

黒毛和種の産肉性に関するゲノム研究が始まってみると、参加機関すべては種雄牛造成においてお互いライバル関係にあり、共同研究に欠かせない成果の共有は極めて困難なことがわかりました。規模の小さい後代家系を解析しますので、得られた結果の信頼性は再現性にありましたが、年2回の会議ではある染色体領域にある産肉性QTLを検出したというような秘密のベールに隠された報告が相次ぎました。これは大変厄介な問題でした。

時間はかかりましたが、コンソーシアム内で情報を共有できるようにしていきました。

後代検定家系解析では信頼できる結果を得ることが困難なことに気づき、屠場で特定種雄牛産子をサンプリングして規模の大きい父方半きょうだい家系解析を始めようと提案しました。複数の県はそれに応え、父方半きょうだい200-400個体規模の解析を始めました。参加機関のDNA育種に対する熱意はたいへんなものでした。しかし、当時のDNAマーカーの少なさ、間違いのあるゲノム連鎖地図、DNAマーカーであるマイクロサテライトをタイピングする煩雑さなど、この進め方で良いのかどうか確信が持てませんでした。折しも、打合せに訪ねた鹿児島県肉用牛改良研究所では所長に、「職員の溝下が家庭を犠牲にして無理をしている。こんなことをやらせていて成果は出てくるのか？」と厳しく言われる始末でした。これは何としても成功させなければならぬぞと思いました。

3. 1998年秋：大規模家系で枝肉重量QTLのマッピングに成功

1997年にUSDA-MARCからGold Standardとなる正確でマーカー数の多いゲノム連鎖地図が発表され、産肉性QTLの解析は加速されました。鹿児島県の担当者だった溝下主任研究員は、ついに、1998年秋、基幹種雄牛の半きょうだい家系解析で、後にCW-1と呼ぶ枝肉重量QTLを染色体14番に位置付けました（種雄牛名は伏せられていましたが）。そして研究員の溝口は兵庫県と共同で脂肪交雑QTLであるMarbling-1を染色体21番に発見しました。大規模な家系解析で何かが分かりそうでした。一方、産子8個体の後代検定家系解析は依然として続いていました。私はこの家系の解析は努力の割に報われていないと

思い、1999年秋に後代検定家系の解析は止め、大規模な半きょうだい家系解析への移行を研究員達に相談しました。驚くことに皆反対しました。「こんなに頑張ってきたのだから、続けて結果を出したい」と。そこで、QTLを検出した染色体14番と21番に絞って、黒毛和種で共通に存在する優良なハプロタイプ（DNAマーカー型をつないだ染色体断片）を明らかにする実験を2000年3月まで続けることにしました。しかし、明確な結果は出ませんでした。ゲノム全体でも1,200マーカーしかない1997年の状況ではとても無理な話でした（2016年現在は777,000マーカーが使えます）。

これで方針は変わり、大規模半きょうだい家系を使った産肉性QTL解析へ力を集中できることになりました。得られたDNA情報は後代の種雄牛選抜に有用と思われましたので、コンソーシアムのメンバーは積極的に屠場で産子を集め、マイクロサテライトのタイピングを行いました。

4. 2005年：採卵性QTL解析への挑戦

北海道士幌町にある全農ETセンターでは受精卵を販売しています。2005年頃、ETセンターの青柳所長から、(1)採卵性の善し悪しは血統によって偏っている、しかし、(2)枝肉形質解析のような父方半きょうだい家系を作ることはできない、何とかありませんかと相談を受け、採卵性QTLに挑戦することとしました。黒毛和種雌の採卵記録付きのDNAサンプルを得たところ、当然のことながら父方半きょうだい家系が構成できるほど特定種雄牛に偏っていません。当時、ヒト生活習慣病などの解析で、ゲノム全体の多数のマーカーを使って、健常群と疾病群間のマーカー

遺伝子型の偏りを調べるゲノムワイド関連解析 (GWAS) が始始めていました。ヒトでは500K (50万種) のSNPチップが2001年には市販されていましたが、ウシではありません (ウシの50Kは2007年に市販)。ヒトと比べ黒毛和種集団では組換えの歴史的な蓄積が少ないから、もっと少数のマイクロサテライトでできるのではないかと予想しました。そのためShirakawa-USDAゲノム連鎖地図の3,802種のマイクロサテライトから1,073種のマイクロサテライトを選びました。

GWASの最初は躓き、試行錯誤の連続でした。まず、個体毎の採卵成績のバラツキが大きいため、どんな表型値が信頼できるかわかりません。2つ目はマイクロサテライトのタイピングエラーは思ったより致命的だったことです。そこで体制を整え、最も信頼できる研究補助員がマイクロサテライトをタイピングすることにしました。解析の対象として、初回から5回以上連続の採卵記録のある個体約500頭から採卵数の上位および下位、各42頭を選びました。これは成功しました。翌年には採卵性に影響するGRIA1遺伝子のアミノ酸変異の決定まで行きました。GWASは役に立ったのです。しかしながら、マイクロサテライトを使うGWASは時間とコストがかかり過ぎ、おいそれと手掛けられる手法ではないこともわかりました。

5. 1998年から2012年：大規模家系による産肉性QTLマッピングのまとめ

産肉性のゲノム解析では、道県でそれぞれ基幹種雄牛の産子DNAを屠場で集め、200頭以上の父方半きょうだい家系を作成し、平均300種のマイクロサテライトのタイピングを行いました。複数の家系で繰り返し検出されたQTLは、信頼できるQTLであり、比較す

ることで領域を狭めることができます。この頃になりますと、会議での報告は随分とオープンになり、種雄牛名を出し、「検出したこのQTLは何県の種雄牛何々のQTLと同じと考えられる」ようになりました。2009年10月までに11年かけて33の父方半きょうだい家系、14,400個体をマイクロサテライトで解析しました。

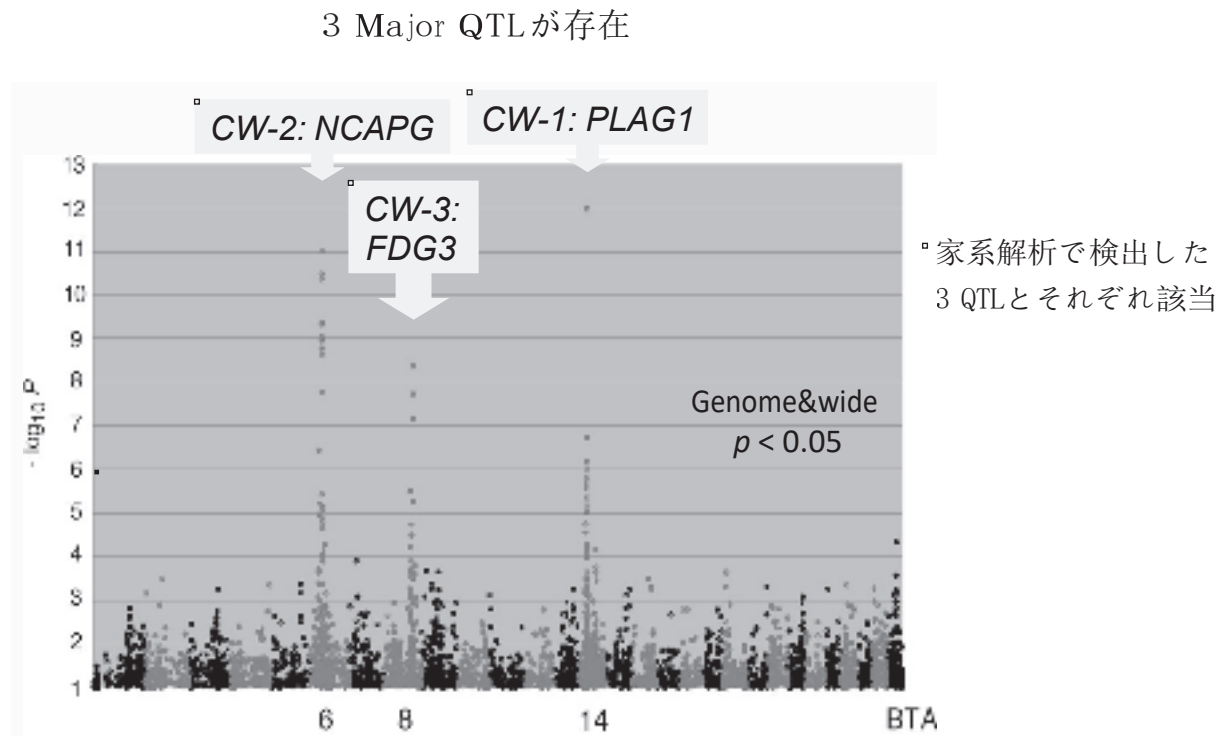
2007年12月に米国で50KのSNPチップが発売され、前章で述べましたゲノムワイド関連解析に進みますが、SNPのタイピングの容易さとコストパフォーマンスの良さに驚き、2008年に黒毛和種で使えそうな3,000種のSNPを選び、カスタムで製作してもらい、父方半きょうだい家系の解析に利用しました。2010年には正規に3K SNPチップが発売されました。SNPチップで解析した結果を含めると図1のように44家系、18,714個体となりました。

枝肉重量QTLでは、染色体14番のCW-1、6番のCW-2、8番のCW-3というそれぞれ効果の大きい3つのQTLが繰り返し検出されましたが、脂肪交雑では目立つQTLを検出できません。そこで、50K SNPチップを使ったゲノムワイド関連解析 (GWAS) の方法を脂肪交雑QTL検出に適用しました。芝浦と大阪南港の屠場で集めた肥育牛サンプル約4万頭から、成績の上位下位10%を抽出し、血統が偏らないようにした606頭のSNP型判定をしました。しかし、効果の大きな脂肪交雑QTLを検出できません。次に、枝肉重量QTLについて成績の上位下位502頭を使って解析したところ、CW-1, 2, 3の3QTLが出てきました (図2)。家系解析の結果と一致しています。すなわち、黒毛和種において脂肪交雑に影響するいわゆるメジャー遺伝子は存在しないこと、および、枝肉重量



(図1) 家系解析：和牛枝肉形質 QTL マップ

(図2) 枝肉重量のゲノムワイド関連解析



肥育去勢牛1,156頭を50K SNPチップでジェノタイプング、線形混合モデル（EMMAX）で解析。

には3つのメジャージーンが存在することがわかりました。しかし、GWASでは半きょうだい数が増えると構造化の問題が起きて精度が低下するため、黒毛和種ではこれ以上の解析はできないのです。

GWASによる産肉性の解析は限界に達しましたが、BOS1という660K SNPアレーを大量に購入していました。目下、使い道がありません。そこへ、鳥取県の田淵主任研究員からオレイン酸含量のGWASをやりたいという提案がありました。GWASでオレイン酸含量に関する有用な結果は出ませんでした。最終的に606頭のSNP型情報を得ました。これが後でゲノム選抜に役に立ちました。

黒毛和種産肉性遺伝子の特許化を目指して、2011年までにCW-1, 2, 3とMarbling-3の責任遺伝子を決めることまで進めました。では、それらのQTLは産肉性にどの程

(表1) CW-1, 2, 3の効果

CW-1, 2, 3の効果 - 1,156頭				
QTL	責任候補遺伝子	アレル置換効果 (kg)	P-value	Q頻度 (%)
CW-1	PLAG1	28.4	4.1E-14	75.4
CW-2	NCAPG	35.2	5.4E-12	20.0
CW-3	FDG3	48.3	7.9E-17	9.3

- ・ゲノム関係行列 (EMMAX)
- ・Pseudo-heritability: $h^2 = 0.637$
- ・CW-1, 2, 3を固定効果とすると、 $h^2 = 0.408$
- ・CW-1, 2, 3で説明できる遺伝分散:
(0.637-0.408)/0.637 x 100 = 36.1 (%)
- ・CW-1, 2, 3で説明できる全分散: 0.637 x 36.1 = 23.0 (%)

度の効果を持っているのか？ 枝肉重量の3つのメジャージーンの効果について、1,156頭で調べたところ、表1に示すように効果は大きいものの遺伝分散の36.1%、約3分の1しか説明できないことがわかりました。Marbling-3については、同じ1,156頭の集団での優良型の頻度は0.1%程度と低く、その

効果の評価はできませんでした。これでは統計遺伝学に基づいたBLUP法による育種価算定に勝てません。外部から常々言われていました「動物遺伝研のゲノム研究は遺伝病に役立つが、産肉性への貢献は全くない、統計育種であるBLUP法には適わない」の通りでした。何とかしなければ。

6. 2008年：ゲノム選抜への道のり

2008年に米国ではUSDAを中心に乳牛のゲノム育種価を算出しているという情報が入り、5月にAI事業体を含む関係者が集まり、10月の米国へ調査派遣を決めました。USDAとカナダは、BLUP育種価を持つ種雄牛8,000頭を訓練群とし、それらの50K SNP型情報からゲノム育種価予測式を立て、予測群である若雄のゲノム育種価を算出するというものでした（選抜済みの訓練群とこれから選抜する予測群のズレを補正するため搾乳牛群のSNPデータも後に加えられ、精度を向上させている）。この時のゲノム育種価とBLUP育種価の相関性は0.85ときわめて高いことが分かりました。2009年1月に米国ホルスタイン登録協会はそのホームページに種雄牛の育種価（EBV）と並んでゲノム育種価（GEBV）を掲載しました。「GEBVとは一体何なのか？」と国内の酪農関係者は驚きました。

私は、黒毛和種産肉性の解析で思うような成果が上がっていないこともあり、ゲノム選抜を考えました。しかし、米国と同じことはできません。黒毛和種の育種価評価された種雄牛の頭数は少なく、比較にもなりません。訓練群として肥育牛の成績を使うことしか可能性はないように見えました。しかし、肥育個体の産肉成績はBLUP育種価と比べ、表型値としての信頼性が貧弱に思え、到底使い物

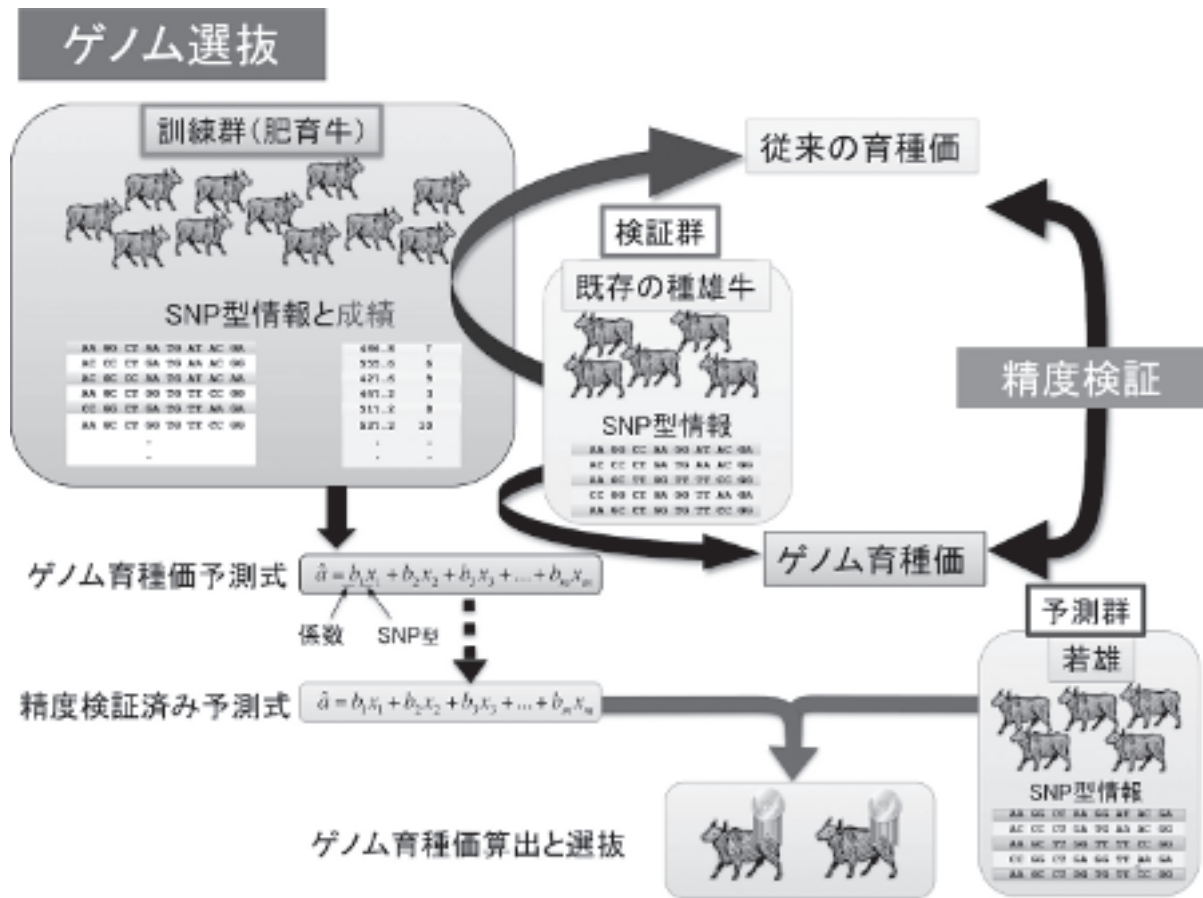
にならないように見えました。そういった状況のときに京都大学の祝前教授から50K SNP型情報を使わせてほしいという提案がありました。2009年12月に渡邊研究員と祝前教授を訪ね、産肉性能力をSNP型情報で予測するための打ち合わせをしました。その後の検討で産肉性6形質の内、枝肉重量がSNP型情報で説明できそうな様子でしたが、特に引きつけられるようなものではありませんでした。

2013年になって初めて期待できる結果が出ました。SNP型情報と産肉性6形質成績付きの芝浦・南港の肥育牛1,602頭を訓練群とし、検証群として鳥取県から提供された種雄牛の育種価とそのSNP情報を使い、血統情報の代わりにSNP情報を使うG-BLUP法でゲノム育種価を算出しました。産肉性6形質について相関性0.52–0.89のゲノム育種価が得られました。訓練群に鳥取県のデータを加えて2,555頭に増やしますと、相関性0.58–0.90となりました。参照群を増やすことでゲノム育種価とBLUP育種価間の相関性を改善できると確信しました。頼りない表型値でも数を増やせば使えるかもしれない。

7. 2013年11月：全国会議での方針転換

黒毛和種の肥育牛2,555頭からなる訓練群を使って、能力評価に希望が持てる結果を出しましたので、訓練群の規模を2万頭まで拡大することを考えました。11月に開催しました17道県の参加する全国会議で、「来年度から特定種雄牛産子からなる家系のQTL解析ではなく、ランダム集団を使うゲノム選抜に方針を変える」ことを打ち出しました。すでに来年度の予算も決まっている段階でしたので無理は承知でした。お金が無くなってしまった畜産技術協会に新たな負担を承知して

(図3) 黒毛和種で行っているゲノム選抜手法



ゲノム育種価を推定するため肥育牛からなる訓練群を構成します。それぞれの肥育牛はSNP型情報と産肉成績を持っています。SNP毎についてそのSNP型の成績への効果を係数で表したゲノム育種価予測式を作成します。この予測式はどの程度の正しいかを検証群で調べます。検証群は正確度0.95以上のBLUP育種価を持っている種雄牛からなります。この検証群のSNP型情報を調べ、SNP型を訓練群で作成したゲノム育種価予測式に代入し、ゲノム育種価を得ます。これらの育種価の相関性で予測式の精度検証をします。訓練群を増やすことで予測式の改善を図ろうとしています。最終目標は、予測群である若雄や繁殖雌牛の能力を正確に推定することです。

もらい、日本中央競馬会の畜産振興事業に応募し、2016年度までの事業費を確保しました。2013年12月にジェネティクス北海道の土門部長に説明し、さらに、2014年5月に岡山市と12月に熊本市で事業の説明会を開き、協力を依頼しました。家畜改良事業団・全農ET研究所も加わって、事業は加速しています。枝肉6形質について、ゲノム育種価とBLUP育種価間の相関性を0.85以上にするという目標達成は近付きました(図3)。

先行していた鳥取県で、後代検定中の若雄の脂肪交雑のゲノム育種価を出したところ、3頭に驚くほど高い予測値が出ました。検

定が終わって若雄の成績が出たとき、3頭ともほぼその予測が当たっていました。これに勇気づけられて鳥取県では県内の全繁殖雌牛3,000頭のゲノム育種価算出を実施しました。今や期待が先行している状況です。これから後代検定が終わるたびにゲノム育種価の正しさが検証されていくことになります。若雄の能力評価ができているのかどうかなど、これからやるべきことは山積しています。

2017年3月に動物遺伝研究所は閉鎖しますが、黒毛和種の育種に関係する皆様方によって、このゲノム選抜事業が継続発展していくよう願っています。

黒毛和種不良因子の ゲノム研究：その光と影

1. 不良因子のゲノム解析前夜： 生化学的な方法の限界

この連載の1回目に述べましたとおり、ウシの不良因子や経済形質のゲノム解析には正確なウシゲノム連鎖地図が欠かせません。このために相応しい地図は、1997年にUSDA-MARC（米国農務省肉畜研究センター）のDr. Beattieらが作成し、Gold Standardと評価されるほどでした。この地図によってウシゲノム解析は始まったと言えます。では、これ以前のウシの不良因子はどのようにして解明されてきたのでしょうか？そこでは専ら生化学的な方法が使われました。

黒毛和種におけるバンド3欠損症の原因変異解明はNOSAI山形（山形県農業共済組合連合会）の伴 顕 獣医師らの先覚的な仕事から始まりました。1994年頃山形県内の黒毛和種子牛に見られた貧血がきっかけになり、赤血球の成分分析からバンド3タンパク質の欠損が分かり、バンド3遺伝子の変異が検出されました。黒毛和種の血液凝固第XIII因子欠損症や、ホルスタイン種に見られた白血球粘着不全症（BLAD）・ウリジル酸合成酵素不全症（DUMPS）の原因変異の解明でも生化学的な方法が威力を発揮しました。

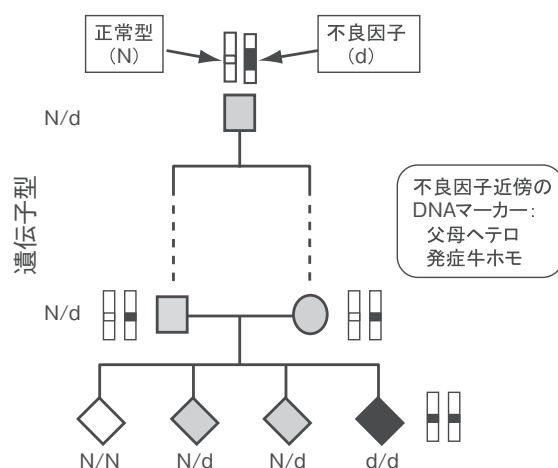
しかしながら生化学的な方法は万能ではありません。たとえば、腎臓にキサンチンが蓄積するキサンチン尿症（モリブデン補酵素欠

損症）は、キサンチン代謝に関するキサンチン脱水素酵素ではなくモリブデン補酵素硫化酵素（その当時未知）の変異が原因でした。また、甚大な被害をもたらしていたと思われる腎尿細管形成不全症（クローディン16欠損症）などの解明には全く無力でした。モリブデン補酵素欠損症もクローディン16欠損症もゲノム解析の方法で解決しました（後述）。

2. 1996年：黒毛和種不良因子の ゲノム解析始まりと引き起こされた混乱

ほとんどの不良因子は常染色体性劣性遺伝病の原因変異です。図1に示しますように、不良因子が発生した始祖牛の後代の父親と母

（図1）不良因子の遺伝様式



不良因子を持つ始祖牛の後代同士を交配して発症牛が出るのが常染色体劣性遺伝病の典型的なケースです。性染色体に変異がある場合は、産子の雌に比べて雄に頻発します。発症産子の症状が同じでも、異なる不良因子が原因ならマッピングできません。稀に複数の遺伝子変異が原因となっている場合もあります。

親がその不良因子を保因すると、その産子は25%の確率でホモ化して発症します。つまり、原因変異の領域は、発症個体ではホモ接合体となり、その両親ではヘテロ接合体になっています。ゲノム解析では発症個体とその両親のDNAマーカー型を調べ、発症個体はホモ、かつ、両親ヘテロのDNAマーカーを探します。発症個体が多いほど、正確に原因変異の位置を決めることができます（マッピングと言います）。この考えでマッピングできれば、その不良因子は常染色体劣性遺伝病の原因になっていると言えます（図2）。

1996年頃から複数の県の担当者が、研究員（当研究所の研究員にはそれぞれ担当する道県を決めていました）と密かにDNAマーカーの型判定をするようになっていました。当然ながら遺伝病についてなかなか教えてくれません。岐阜県の小林直彦主任技師は、発症牛17個体と1997年のゲノム地図を使って不良因子をマッピングすることに成功しました（図3）。発育不全タイプ1とだけ研究所年報（平成9年度）に記載され、どの県がマッピングしたのかも、マッピングできた染色体も明らかではありません。岐阜県だけでなくどの県も風評被害を恐れていました。他県では承知のことでも隠すのです（この傾向は今でもあります）。

この不良因子、腎尿細管形成不全症（後に、クローディン16欠損症と呼ばれる）はDNAマーカーのBM9019への強い連鎖がありました。しかしながら、BM9019からその両隣のBMS4030とINRA119間の距離は10cM（1,000万塩基対）もありました。当時、岐阜県では2002年の全国和牛能力共進会のための雄牛選抜をしており、不良因子を保因していない若雄を選ぼうとしていました。ある日、岐阜県肉用牛試験場の中丸場長が候補若雄7-8頭

（図2）ゲノム解析の原理：常染色体劣性遺伝病のマッピング

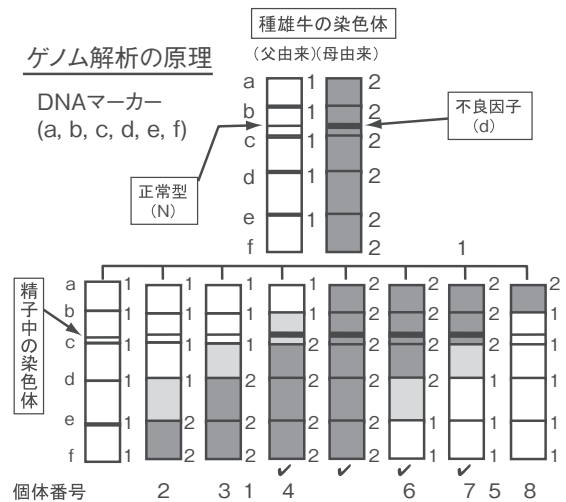
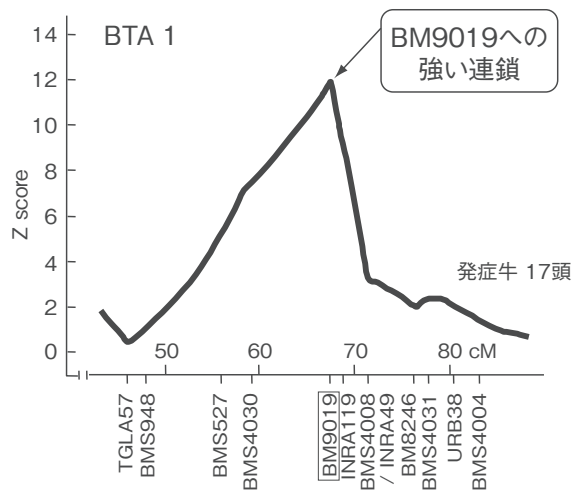


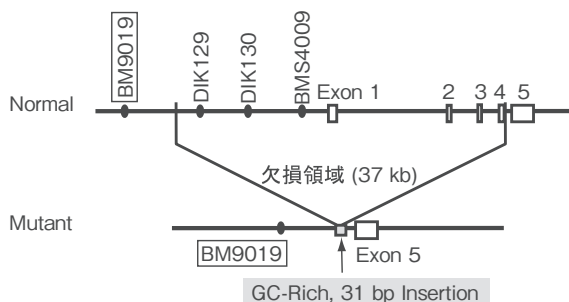
図2では、種雄牛の母由来の不良因子（d：正常な対立遺伝子をNとする）をDNAマーカーbとcの間に想定しています。個体4や5のように不良因子の近傍で組換えが起こるとDNAマーカーの遺伝子型だけでは保因かどうか判定困難です。個体4-7を保因としています。この中に母からも不良因子を受け取ってホモ化していれば、不良因子周辺のDNAマーカー遺伝子型は2の割合が高くなりますので、マッピングできるわけです。

（図3）発育不全タイプ1（腎尿細管形成不全症）のマッピング



のDNAマーカー型判定結果を持ってやってきました。「試験場で保因か否かを判定しようとしたが、できなかったのでぜひ判定してください」ということでした。候補若雄の父は平茂勝でした。この父は不良因子と連鎖しているBM9019アリル（遺伝子型）と同じアリルをたまたま持っていました。私は、染色体組換えは1箇所以下という考えでハプロタ

(図4) 腎尿管形成不全症(クローディン16欠損症)の欠損変異



イプを予想し、若雄の保因か否かの印を付けていきました。中丸場長はその手書きのメモを「ありがとうございます」と言って持ち帰りました。遺伝子検査ができるようになって調べた結果と一致していたのでほっとしましたが、危ない判断でした。

3. 1998年2月:腎尿管形成不全症(クローディン16欠損症)の遺伝子診断法の確立

腎尿管形成不全症の原因変異の決定では、平野研究員が強運なところを見せました。この成果をまとめた論文を査読したUSDA-MARCのDr. Beattieは、「これはフェアじゃない」と言っていました。当時のゲノム解析用ツールでは、候補領域の1,000万塩基対を調べることは無理なため、BM9019周辺の10万塩基対(候補領域の1%に相当)からDNAマーカーを開発することにしました。

BM9019周辺の10万塩基対からDNAマーカーとしてDIK129・DIK130・DIK131(BM4009と同じでしたが、元のプライマー設計が良くなかったため扱いにくいので使っておらず再発見でした)を開発し、型判定したところ、3マーカーとも発症牛とその両親の間で親子関係が成り立たないことに気付きました。不良因子と関連する欠損アレルを想定すれば親

(表1) CL16欠損症診断と脂肪交雑育種価

平準化事業における脂肪交雑育種価(BMS No.)		
(1999)	(2005)	(2009)
P191: 3.87	P191: 3.87	P421: 3.90
P150: 3.47	P421: 3.86	P647: 3.79
P232: 3.10	P317: 3.79	P555: 3.77
P162: 2.96	P465: 3.42	P646: 3.64
P204: 2.93	P433: 3.14	P465: 3.42
P263: 2.78	P232: 3.10	P602: 3.34
P153: 2.74	P375: 2.98	P433: 3.25
P272: 2.70	P428: 2.88	P526: 3.03
P147: 2.58	P291: 2.85	P569: 2.99
P214: 2.56	P445: 2.70	P616: 2.97

保因牛、父または母の父が保因

保因牛は四角で囲み、父または母の父が保因の非保因産子である種雄牛には下線を引いています。

子関係が成り立ちます。近接している3マーカーすべてが欠損アレルを持つということはこの領域に欠損変異がある。その後の展開はスムーズでした。ここに37kbの欠損があり、新規遺伝子のエクソン1-4が含まれていました。配列を調べると京都大学の月田教授のグループが研究しているクローディンファミリーに属すると思われました。月田教授と連絡を取り、16番目のファミリーだからクローディン16(CL16)と命名しました。

しかし、正常と欠損変異を区別できる遺伝子診断法の確立は大変でした。この領域はGCリッチなためPCR増幅できないのです。平野は、考えられるかぎりのPCRプライマーを試しました。農水省の家畜生産課担当補佐からは毎日のように「未だか」「未だか」の電話がありました。表1に示しますように当時の家畜改良事業団のトップテン種雄牛の内、脂肪交雑育種価上位4頭が保因なため、能力を落とさずに後継種雄牛をどうやって作るかは大問題でした。ようやく間に合ったようです。遺伝子診断ができれば、不良因子を持っていない後代を選抜できます。このような選抜は脂肪交雑の能力に悪影響は無かったようです。

その半年後にヒトの遺伝病の原因として

Paracellin 1 (CL16と同じ遺伝子)の変異がScience誌に掲載されるという出来事がありました。岐阜県内の行政的な対応のため1年間発表を見合わせていたところでした。研究者にとって成果がメジャーな雑誌へ掲載されることは名誉なことです。周囲の理解を得て投稿しましたが、やはり2番煎じ扱いされました。もう一つの残念なことは、特許の権利を放棄したことです。当時は研究成果を個人の特許にするのはいかなるものかというような風潮でした(なんとその直後に風潮は変わり、論文発表より特許化となりました)。

4. 1998-2016年：連続した不良因子の解明と現在までの成果

クローディン16欠損症に続いて、ウガンダ出身のAgaba研究員と鹿児島県肉用牛改良研究所の山口主任研究員は、チェディアック・ヒガシ症候群(CHS)を解明しました。2015番目のヒスチジンがアルギニンに変わるミスセンス変異でした。診断法が確立したので大々的な遺伝子検査を実施できるはずでしたが、鹿児島県は致死的な変異ではないという理由で結局2年間引き延ばしてしまいました。この間、情報の無い他県に変異が広がったかもしれません。

渡邊研究員は大分県のキサランチン尿症(モリブデン補酵素欠損症)の原因変異を突き止めました。大分県では過去に2回発症が頻発し、その都度交配の調整で凌いできましたが、3回目には対処できなくなり、京都大学と私たちに不良因子解明を依頼したのです。渡邊は、キサランチン尿症をマッピングして劣性変異であることを明らかにし、このキサランチン尿症はII型であり、ショウジョウバエのma-1変異株と同じII型であることを突き止めました(ショウジョウバエでは眼の色が栗色に

なるだけ)。さらに渡邊は、米国エモリー大学のFinnerty教授らによるハエma-1遺伝子の部分配列決定を知り、教授から配列情報を提供していただきました。この情報を基に未知のMolybdopterin cofactor sulfurase (MCSU) 遺伝子を決定し、257番目のチロシン欠失となる3塩基欠損変異がキサランチン尿症II型の原因であることを示しました。褐毛和種の軟骨異形成性矮小躯体症は熊本県にとって厄介な不良因子でした。1997年に熊本市で開催した講演会で、熊本県の佐藤敬明研究参事が、竹田研究員と行った不良因子のマッピングを報告したとき、聴衆から喜びの声があがりました。この不良因子について岡山大学の国枝教授らと競争していましたが、進展しません。東京の武蔵境で開催された畜産学会への途中で国枝教授と会い、共同研究を持ちかけました。熊本県の収集したサンプルと九州東海大学の収集したサンプルを併せ、竹田が獅子奮迅の活躍をしました。同じ遺伝子に2種類の変異を見付け、竹田はこの新規の遺伝子をLimbinと命名しました。褐毛和種の主な2系統のLimbinにそれぞれ異なった変異があったのです。Limbinの隣にヒトの低身長などの症状を示すEllis-van Creveld syndromeの原因遺伝子EVCがありました。数年後にヒトでEVC様の遺伝病の原因としてLimbinが同定され、LimbinはEVC2と名前が変えられたのは残念なことでした。

県にとって大学は不良因子をあからさまに宣伝する困った存在でしたが、動物遺伝研は県の意向を尊重してくれるという違いがありました。しかしながら、難題に立ち向かうには大学と協力した方が良いに決まっています。Limbinの研究はその模範例になりました。2001年1月に、それまでの和牛の不良因

子解明の功績が認められ、私たちは、NOSAI山形・東京大学・岡山大学などと2000年度の畜産大賞を頂きました。

表2にその後も含め、和牛の不良因子診断法をまとめています。ホルスタイン種の横隔膜筋症も入れました。ほとんどは劣性変異ですが、マルファン症候群は優性変異、受胎障害はANXA10の寄与が大きい量的形質(QTL)でした。

マルファン症候群以降は、次世代シーケンサーやSNPチップが活用され、解析技術が大きく改善されました。また、県の不良因子に対する姿勢も変化が見られます。最近のパーター症候群タイプ1（胎膜水腫として発見）では、鳥根県の行政・農協・NOSAIの組織的な協力を得て、症例発覚から2年も立たないうちに診断法が完成してサーベイでき、発症予防の体制を整えました。

宮崎県の前肢帯筋異常症（FMA）は大分県のキサランチン尿症と似た経緯を辿っており、2回の交配調整で克服できず、ゲノム解析となりました。岡山大学大学院生の秋山君が15塩基対というとても短いエクソンを見逃すこと無く変異を発見しました。現在、指定遺伝的的不良形質に指定され、発症予防の取り組みがおこなわれています。

5. 2012年からの試み：SNP型情報から不良因子を検出

全ゲノム配列の解読、大量のSNP型判定システムの確立、エクソーム解析というタンパク質をコードする部分だけを濃縮して解読する技術などゲノム解析のツールは急速に改善されてきました。しかしながら、ヒト遺伝病においても解明されるのは3割程度に留まっています。同じ有害な変異が個体によって異なった影響を与えること、および、同じよう

(表2) 和牛の不良遺伝子診断法

◆ 不良因子 (ほとんど劣性)	◆ 原因遺伝子 (ほとんどエクソンの変異)
バンド3欠損症	SLC4A1 (稲葉ら, 1996)
第13因子欠損症	F13A (小川ら, 未発表)
チェディアック・ヒガン症候群 クローディング16欠損症 (タイプ1&2)	CHS1 (Agabaら, 2000) CL16 (平野ら, 2000 & 2002)
モリブデン補酵素欠損症	MCSU (渡邊ら, 2000)
軟骨異形成性矮小軀体症	LIMBIN (竹田ら, 2002)
横隔膜筋症	HSP70 (杉本ら, 2003)
眼球形成不全症	WFDC1 (国枝ら, 2009)
マルファン症候群 (優性)	FBN1 (平野ら, 2012)
前肢帯筋異常症 (FMA)	GFRA1 (国枝ら, 2012) IARS
IARS異常症	(平野ら, 2013) FGD3 (高須賀ら, 2015) SLC12A1
骨格粗大症 = CW-3	(佐々木ら, 2016) ANXA10
パーター症候群タイプ1 (BAS1) 受胎障害 (QTL)	(佐々木ら, 2016)

困んだ12種の不良因子の解明に動物遺伝研は関わりました。原因遺伝子の次の括弧は論文の先頭著者名と発行年です。前肢帯筋異常症の論文は投稿予定です。

な疾病が異なる遺伝子の変異で起こるという2つの問題があります。ヒトの場合と比べ、ウシの診断情報は貧弱なため解明できる確率はもっと低いでしょう。また、ヒトでもウシでも胚や胎児(胎子)の時期に流産するケースでは、解析のためのDNAサンプルが入手できないので全く無力です。

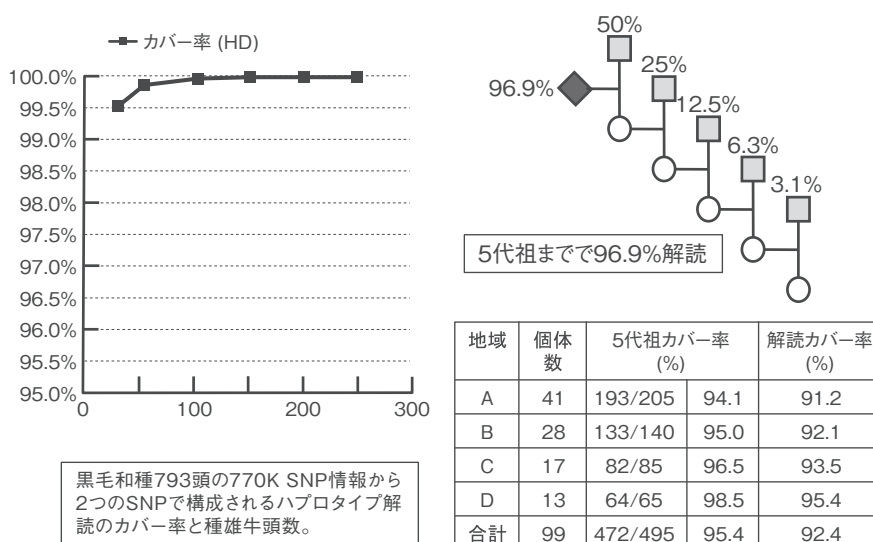
2012年にUSDA-ARSのDr. VanRadenらは、ホルスタイン種などの乳用種約10万頭のSNP型情報を使って、有害な変異の検出を報告しました。SNP型情報でハプロタイプを再構成し、健常牛集団にホモ接合体がない場合、そのハプロタイプは有害な変異を含むという解析です。HH 1・HH 2など5種の致死性変異を検出しました。HH1は胚死滅を引き起こすAPAF1の変異でした。佐々木研究員は、同様な手法で黒毛和種について解析しました。黒毛和種の健常集団4,843頭のSNP型情報を使って**表3**に示すように7つの有害変異領域を見つけました。

領域番号1と2はクローディング16欠損症の変異そのものでした。領域番号4は骨格粗大症の原因変異を含み、領域番号5はIARS異常症の変異でした。IARSの変異は子牛損耗

(表3) SNP型情報による有害変異候補領域

領域番号	染色体	領域 (Mb)	ハプロタイプ長 (kb)	ハプロタイプ構成 SNP数	ハプロタイプ頻度	ホモ接合個体数 (4,843頭中)		原因遺伝子 (疾病名・表現型)
						期待値	観測値	
1	1	72.5-73.0	504	10	4.9%	11.8	1	CL16 (CL16欠損症)
2	1	75.3-76.8	1,548	21	4.9%	11.5	1	?
3	4	70.6-71.4	777	6	4.5%	9.9	0	(子牛損耗)
4	8	68.8-81.3	12,495	157	4.6%	10.2	0	FDG3 (骨格粗大症)
5	8	82.6-88.9	6,286	85	5.2%	13.0	0	IARS (IARS異常症・胚死滅)
6	10	29.7-34.1	4,406	54	5.0%	11.9	0	?
7	17	67.5-74.9	7,460	115	4.5%	9.7	0	(胚死滅) 未発表 (胚死滅)

(図5) エクソーム解析の解読カバー率



だけでなく、授精記録の解析から授精後30-60日で胚の死滅ももたらしていました。領域番号7は新規の胚死滅原因変異でした。領域番号3と6はそれぞれ子牛損耗と胚死滅の原因変異を含んでおり、その解明を進めているところです。

6. エクソーム解析による遺伝子多様体データベースの構築

SNP型情報による有害変異の探求で痛感したのは、SNPのような点の情報だけではなく、線の情報であるDNA塩基配列と変異の頻度情報までレベルアップする必要性でした。人工授精の普及しているウシの集団なら予め要

となる種雄牛のゲノム構造を調べ、すべての有害な変異を網羅することで、流死産や子牛損耗を未然に防ぐことができるかもしれません。ほとんどの有害な変異はタンパク質をコードするエクソン領域に検出されていますので、エクソンすべての1つ1つの塩基配列を解読するエクソーム解析を行い、黒毛和種の変異を網羅した遺伝子多様体を作ることになりました。頻度情報を正確にするにはできるだけ多数の種雄牛のエクソーム解析が必要です。図5にエクソーム解析の解読カバー率の推測を示します。

図5の左側では隣り合った2つのSNP間をすべて解読するのに必要な種雄牛頭数を推測し

ています。100頭程度でほぼ完璧に解読できそうです。右側に菱形の任意の個体の解読率を示しています。任意の個体の配列には、父の配列が50%含まれ、母の父の配列は25%含まれます。父系5代祖まで解読すると任意の個体の96.9%まで分かることとなります。私たち動物遺伝研はコンソーシアムを構成する道県等に歴代の種雄牛の凍結精液の提供をお願いしました。提供して頂いた中から後代数の多いものなどを条件に500頭を選びました。その500頭での5代祖までの解読カバー率を4県の若雄99頭について調べましたところ、92.4%と予測できました（2015年時点）。時が経てば6代祖、7代祖も情報が得られますので、カバー率は上昇するでしょう。

2015年から佐々木は東京大学の鈴木 穰教授らと種雄牛500頭のエクソーム解析を進めています。2016年度中に解読は終わり、2017年度には遺伝子多様体データベースの構築まで進みます。すでに、種雄牛96頭のエクソームデータが得られた段階で、表3の領域番号7の胚死滅の原因となる遺伝子(投稿準備中)の変異が解明できました。これからも、収集しています10,000頭の授精記録や300頭の死亡子牛サンプルを使って有害な変異が明らかになって行くことを期待しています。

7. 最後に

3回の連載を動物遺伝研の年代記にしようと書いてきました。主として黒毛和種で成功裡に終えたことが中心です。連載に含まれていないホルスタイン種の繁殖性や乳房炎抵抗性の研究には、日本ホルスタイン登録協会北海道支局の山下部長らと全農ET研究所の青柳所長から協力を頂きました。また、民主党政権下の事業仕分けで動物遺伝研の存続が難

しくなってきた際、青柳所長を始め心配してくださった方々にこの場をお借りして御礼申し上げます。これを契機に存続を懸けて農林水産技術会議の競争的資金獲得に臨み、そのおかげで研究の集大成ができたと思います。今年度末の動物遺伝研閉鎖については、私自身年も年ですし、所期の目標を何とか達成した上、渡邊・佐々木という良き後継に恵まれ、申し分ありません。残念なことにTPP対策と称して私どもの獲得した基礎研究費は2016年度に一律の削減となり、政権が変わっても依然として険しい将来が待っているようです。引き続き研究を展開していくため皆様のご協力を切に願います。この連載をお読みになり、ウシゲノム研究はこれから何を目指して何を成し遂げようとしているかご理解頂けたら幸いです。