

「アグーブランド豚」識別法の確立

(2) アグー識別技術における一塩基多型解析の有利性

當眞嗣平 島袋宏俊 知念司 我那覇紀子
渡部翔之 野中克治 奥村直彦*

I 要 約

一塩基多型 (SNP) を用いた琉球在来豚アグー (アグー) と他品種との識別を検討するため沖縄県アグーブランド協議会 (協議会) で登録認定されたアグーと他品種であるランドレース種, 大ヨークシャー種, デュロック種およびバークシャー種について系統解析を行った結果, 以下のとおりであった。

1. Illumina 社の Porcine SNP60 Genotyping Bead Chip に搭載されている 54466SNP マーカーを用いてアグーと他品種との識別は可能であった。
2. 識別にかかる分析コストを低減するため識別に必要な SNP マーカーを絞り込んだところ 144SNP でアグーと他品種の識別が可能であった。
3. 絞り込んだ 144SNP では, 絞り込む前と比べ約 26%のコストで分析でき, マイクロサテライト (MS) と比べても約 75%のコストで分析が可能である。

以上のことから, 144 の SNP マーカーを用いることにより低コストでアグーの識別が可能である。

II 緒 言

沖縄県ではアグーを活用したアグーブランド豚を作出して全国的に高い注目を集めている。現在, 協議会では登録にかかるアグーとそれ以外の品種の識別は, 大城ら¹⁾と島袋ら²⁾が検討した MS により行なっている。MS マーカーは PCR によって増幅することが可能なため, DNA が断片化した DNA でも解析が可能であること, 多型性に優れていることから DNA マーカーとして重用されてきた。しかし, PCR 増幅の過程でマーカーにより様々なタイプの偽バンド断片が生じる。そのためマーカー毎に波形バンドを把握しなければならず, 遺伝子型を判定するのに熟練を要する³⁾。判定者の波形バンドの捉え方によっては対立遺伝子が異なることがある。さらに解析に時間と労力が係る等の問題がある⁴⁾。いっぽう, SNP は遺伝子型の決定を分析器が自動的に迅速に行うため, 判定するために労力を必要とせず, 誰が行っても同じ結果が得られる。また, プタの全染色体上に高密度に配置された DNA チップが開発されたことから, MS に比べ情報量が多く, 全ゲノム DNA を網羅するため, DNA マーカーとして近年注目されている。そこで本研究では, SNP を用いて琉球在来豚アグーの効率的な識別法を検討した。

III 材料および方法

1. MS マーカーのジェノタイピング

DNA は協議会で登録認定されたアグー72頭, 県内で飼養されているランドレース種12頭, 大ヨークシャー種12頭, デュロック種8頭およびバークシャー種6頭の計110頭の耳組織から抽出した。採材した耳組織を, プロティナーゼ K (10mg/ml: 和光純薬工業株式会社製) を含んだ DNA 抽出バッファー (1.2%SDS, 12.0mM EDTA, 100mM Tris-HCl [pH8.5], 0.5%NP-40) で溶解後, フェノールクロロホルム処理にて精製し, エタノール沈殿により全ゲノム DNA を抽出した。

MS マーカーは島袋ら²⁾が選抜した 14 マーカーを用いた。PCR の反応液は, AmpliTaq Gold & 10×PCR Gold Buffer with dNTP (Applied Biosystems 社製), ゲノム DNA 16.0ng, フォワードおよびリバースプライマー各 5.0pmol を使用した。PCR は, GeneAmp™ PCR System 9700 を用い, 94°C 9 分の熱変成後, 94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 30 秒を 40 サイクルとした。PCR 産物を希釈し, 3130x1DNA アナライザー (Applied Biosystems 社製) を用いて電気泳動した。

GeneMapper ソフトウェア (Applied Biosystems 社製) を用いて, PCR 産物の断片長のフラグメント解析を行った。DNA アナライザーによって検出された各マーカーのバンドパターンを決定し, アリルがある場合

* (社) 農林水産・食品産業技術振興協会 農林水産先端技術研究所 (JATAFF 研)

を1, ない場合を0で表記しデータセットを作成した。

2. SNP マーカーのジェノタイピング

DNAは協議会で登録認定されたアグー72頭, 県内外から収集されたランドレース種48頭, 大ヨークシャー種48頭, デュロック種48頭およびパークシャー種47頭の計263頭の耳組織から抽出した。

Illumina社のPorcine SNP60 Genotyping BeadChipを用い, SNPのジェノタイプを業者に委託した。Genomestudio(Illumina社製)を用いて62163個のSNPからcall rateが95%未満のSNPを除外し, 最終的に54466個のSNPを解析に用いた。

3. 系統樹の作成

識別のための系統樹は, 統計ソフトRを用いて, 非加重結合法(Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean, UPGMA法)⁵⁾により作成した。遺伝的類似度はJaccard's係数⁶⁾を用いた。さらに500反復のマルチスケールブートストラップ解析⁷⁾を行い, 作成した系統樹の信頼性の検証を行った。

4. 識別に有効なSNPマーカーの絞込み

アグーの識別に係る分析コストを低減するため, アグー識別に有効なマーカーの絞込みを行い少数SNP(48, 96, 144, 192及び384SNP)のカスタマイズが可能なIllumina社のGoldenGate™アッセイ法⁸⁾の導入を検討した。アグーをケース, 他品種をコントロールとするケース・コントロール関連解析を行い, 54466個のSNPから遺伝子頻度の差が高度に有意な上位48, 96, 144, 192及び384SNPを選抜しその識別能力を検討した。

IV 結果および考察

1. 系統解析によるアグーの識別

14個のMSと54466個のSNPを用いてUPGMA法により作成した系統樹を図1に示す。いずれのマーカーを用いてもアグーとランドレース種, 大ヨークシャー種, デュロック種およびパークシャー種を明確に識別することができた。系統樹の妥当性を検討するにはブートストラップ法が用いられる。ブートストラップ法は, 解析に用いた集団から重複を許してサンプリングを繰り返しながら系統樹を作成しX回作成した中で何%その系統樹が支持されたかを表す方法である。ブートストラップ値をみると他品種間の識別においてはSNPマーカーによる識別の精度が高かった。

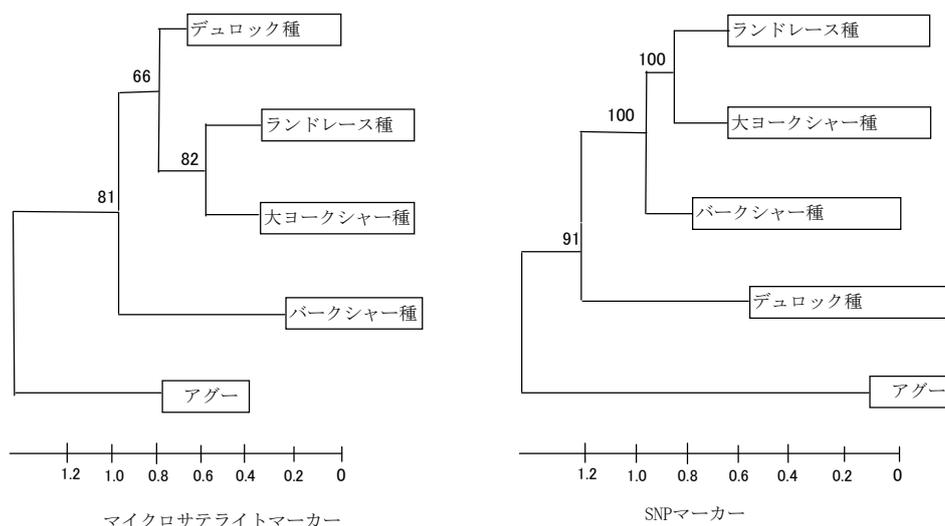


図1 マイクロサテライトマーカーおよびSNPマーカーで作成した系統樹

注1) 枝上の数値は500反復のブートストラップ値を示し, 500反復中何%がその樹形図を支持したかを表す

2. アグー識別にかかるSNPマーカーの絞込み

約54000のSNPマーカーを使ってアグーの識別が可能であることが明らかになった。しかし, 分析にか

かる1頭当たりのコストはMSと比べて高額であるため、SNPマーカーを絞込分析に係るコストを低減する必要がある。Illumina社が開発したGoldenGate™アッセイ法⁸⁾は、数万単位SNPを用いたゲノムワイドな網羅的解析後に絞り込みをかけ、2次スクリーニングなどに用いられる方法である。それぞれ48、96、144、192及び384SNPのカスタマイズが可能であるため、識別コスト低減の有効な方法であると考えられる。そこで、アグーと他品種で遺伝子頻度が有意に異なるSNPマーカー約25000の中から、高度に有意なSNPを48、96、144、192および384個選びその識別能力を検討した。48SNPと96SNPを用いた解析では同じ系統樹が作成され、少数ではあるが、他品種のクラスターに含まれるアグーが存在した（図2）。マーカーを144に増やすことでアグーと他品種を明確に識別することが可能になった（図2）。他品種においてはランドレース種、大ヨークシャー種、デュロック種およびバークシャー種が混在して1つの大きなクラスターを形成し、マーカーを384まで増やしてもそれらを識別することはできなかった。しかし、アグーを識別するという目的においては144SNPで識別が十分可能であると考えられる。

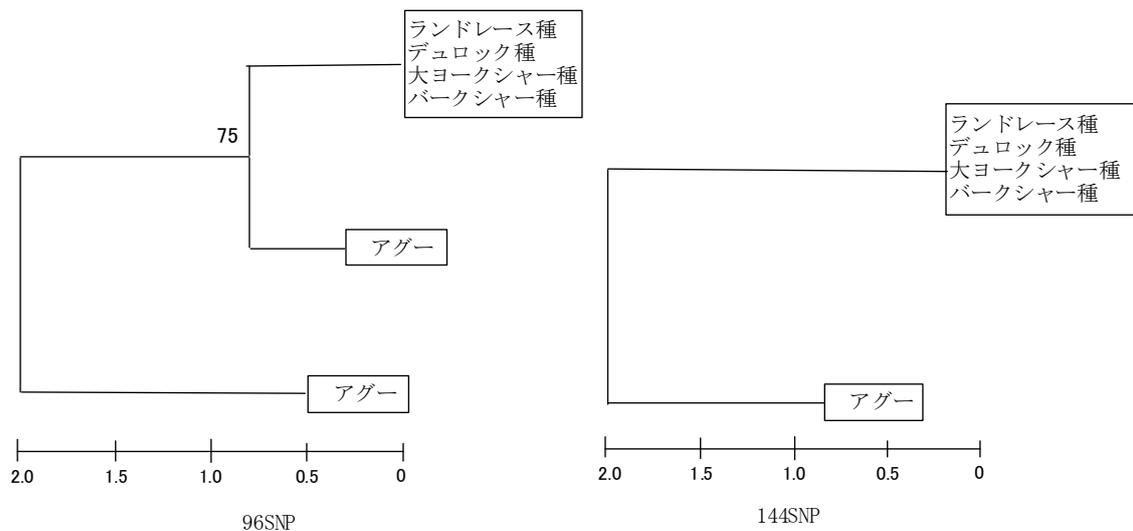


図2 96SNP および 144SNP で作成した系統樹

注1) 枝上の数値は500反復のブートストラップ値を示し、500反復中何%がその樹形図を支持したかを表す

2) 48SNPと96SNPの系統樹はほぼ同じであったため図には96SNPの系統樹を表記

3) 144、192及び384SNPの系統樹はほぼ同じであったため図には144SNPの系統樹を表記

3. 分析コストの検討

島袋ら²⁾が選抜した14個のマイクロサテライトマーカーによる人件費、試薬代を含めた分析コストは表1に示すとおり1頭当たり10,211円である。それに対し、Porcine SNP60 Genotyping BeadChipの分析を業者に委託した場合の費用は、1頭当たり3万円と高額である。アグーの識別に必要なマーカーの絞り込みを行った結果、54466マーカーから144まで絞り込むことができた。144マーカーで識別した場合のコストは、1検体あたり7,665円でマーカーを絞り込む前の約26%のコストになる。また、MSと比べても約75%のコストで識別が可能である。

表1 各分析法の1頭当たりの分析コスト

マーカー	マーカー数	価格 (円)
SNP	48	4,630
	96	5,507
	144	7,665
	192	10,169
	384	16,968
MS	14	10,211

V 引用文献

- 1) 大城まどか・稲嶺修・仲村敏・佐藤正寛・石井和雄・蝦名真澄 (2006) 琉球在来豚 (アグー) の近交退化を緩和するための育種技術の確立 (1), 沖縄畜研研報, **44**, 39-42
- 2) 島袋宏俊・稲嶺修・仲村敏・宮城正男・佐藤正寛・石井和雄 (2009) 琉球在来豚 (アグー) の近交退化を緩和するための育種技術の確立 (4), 沖縄畜研研報, **47**, 29-36
- 3) 安江博 (2009) 家畜・家禽におけるゲノム解析の軌跡, 畜産技術, 9月号, **651**, 22-25
- 4) 鎌谷直之 (2007) 遺伝統計学入門, 178-179, 岩波書店
- 5) 山田亮 (2007) 遺伝統計学の基礎, オーム社
- 6) 下平英寿 (2002) ブートストラップ法によるクラスタ分析のバラツキ評価, 統計数理, **50**(1), 33-44
- 7) Sneath P. H. A, Sokal R. R (1994) 数理分類学, 153, 内田老鶴圃
- 8) 関根光雄 (2010) 新しい DNA チップの科学と応用, 94, 講談社

研究補助：照屋剛, 照屋忠敏