

枝肉形質に及ぼす性の効果を考慮し 複数形質を対象とした QTL 解析

中村亮一 長谷川清寿 澤香代子 岡崎尚之

要約 今回、黒毛和種における QTL 解析において、表現型値の性差の標準化による補正と QTL 領域の真偽性を検定する方法を用いることにより、一度に複数形質を対象とする解析が可能かどうかについて、「第 7 福桜」号を父とする半きょうだい家系（母集団）を対象に QTL 解析を試みた。さらに得られたハプロタイプについては、各ハプロタイプを母数効果とした分散分析を実施し、表現型値に及ぼす効果を確認した。

解析対象家系の肥育産子 227 頭（去勢 160 頭、雌 67 頭）に対して、複数の枝肉形質を対象とした QTL 解析（一次スクリーニング）を行い、得られた領域のうち、枝肉重量または BMS No. に関する領域について、肥育産子 393 頭（去勢 301 頭、雌 92 頭）を対象とした詳細な解析（二次スクリーニング）を行った。なお、解析対象個体の表現型値は性ごとに標準化し、解析に用いた。その結果、BTA6 では枝肉重量に関して有意な領域 ($P < 0.0001$) が、BTA15 および BTA25 では BMS No. に関して有意な領域 (BTA15 : $P < 0.01$, BTA25 : $P < 0.0001$) が検出された。一次スクリーニングで得られた QTL 領域の偽陽性混入率は 0 から 0.15 であった。これらの QTL 領域の枝肉重量または BMS No. に対するハプロタイプ置換効果は、BTA6 では 27.7kg、BTA15 では 0.6、BTA25 では 0.9 であった。

QTL 解析で得られた枝肉重量および BMS No. に関するハプロタイプの組み合わせが各形質に及ぼす効果を検討した結果、枝肉重量については、去勢では Q6 群が q6 群と比べて、有意に大きかった ($P < 0.0001$) が、雌では両群間で、有意な差はなかった。BMS No. については、去勢、雌ともに、BTA15 と BTA25 のハプロタイプの組み合わせは有意な母数効果となった。多重検定の結果、去勢では、Q15Q25 群は q15q25 群および Q15q25 群と比べて、有意に高かった (Q15Q25 vs q15q25 : $P < 0.001$, Q15Q25 vs Q15q25 : $P < 0.05$)。雌においても、Q15Q25 群は q15q25 群および q15Q25 群と比べて、有意に高かった ($P < 0.01$)。

これらのことから、去勢および雌が混在した状態でも、性ごとにデータを標準化して補正することにより、複数の枝肉形質を対象とする QTL 解析が行え、各形質について有意な染色体領域を推定できることが明らかになった。さらに、本手法は、複数の形質に関して一度に解析できること、母集団を構成する個体数が少なくてもよいことから QTL 解析の効率化を図るために有効であると考えられた。

キーワード：ウシ 枝肉形質 QTL 解析 DNA マーカー データ標準化 偽陽性混入率

本県ではこれまでに、「しまね和牛」の育種改良に利用可能な DNA マーカーの開発を目的とした県基幹黒毛和種雄牛の QTL 解析に取り組み、その結果、「茂重桜」号において 3 本の染色体上に脂肪交雑に關与する QTL 領域を推定した^{1,2)}。

家畜における QTL 解析において、信頼性の高い解析結果を得るためには、大きな母集団、つまり特定種畜由来の産子の DNA および表現型値を相当数収集する必要があるが、また、収集した全個体の解析に膨大な労力・コストを要する。そのため、「茂重桜」号の解析においては、解析個体数が少なくても単一形質を対象とした選択的ジェノタイピング

(解析対象母集団において表現型値が上位および下位の個体のみを用いる手法) による QTL 解析を試みた。しかし、この選択的ジェノタイピングにおいても、表現型値の上位および下位の個体情報を得るために、相当数の DNA および表現型値を収集しなければならない、つまり解析対象となる母集団の大きさは変わらないこと、さらに解析対象形質ごとに新たに解析を行わなければならないことが課題として挙げられた。

近年、特定種雄牛の父方半きょうだい家系を用いた QTL 解析を行う場合に必要とされる産子数は、シミュレーションにより産子数 200 頭で有意な

QTL 領域を検出できることを Takasuga ら³⁾ は報告している。また、統計処理方法として、表現型値の性差を標準化により補正する手法^{4,5)} や偽陽性混入率 (FDR) により得られた QTL 領域の真偽性を検定する方法⁶⁾ が報告されている。そして、これら手法を QTL 解析で得られた領域の信頼性を高める手段として活用することが提案されている^{4,6)}。

そこで今回、表現型値の性差の標準化による補正および QTL 領域の真偽性を検定する方法を解析に取り入れることが、QTL 解析の対象となる母集団の頭数構成規模および複数形質を対象とした解析に影響を及ぼすかどうかについて、「第7福桜」号を父とする半きょうだい家系 (母集団) を対象に QTL 解析を試みた。さらに得られたハプロタイプについては、各ハプロタイプを母数効果として分散分析を実施し、表現型値に及ぼす効果を確認した。

材料および方法

解析対象家系

解析対象個体は、「第7福桜」号を父とする肥育産子 393 頭 (去勢 301 頭、雌 92 頭) とした。枝肉成績は、(社)日本食肉格付協会の格付結果を用いた。

DNA 調製

各個体のゲノム DNA は、飼養管理中に採材した血液または食肉処理後に採材した腎臓周囲脂肪から Easy-DNA™ Kit (Invitrogen) または FastDNA® Kit (Q-BIOgene) を用いて分離・調製した。

QTL 解析

(1) 一次スクリーニング

一次スクリーニングは「第7福桜」号の肥育産子 227 頭 (去勢 160 頭、雌 67 頭) を用いて、枝肉重量、ロース芯面積、バラ厚、皮下脂肪厚、歩留基準値および BMS No. について QTL 解析を行った。これらの形質の表現型値については、性の効果を考慮して性ごとに標準化 ((表現型値 - 性別の平均値) / 性別の標準偏差)^{4,5)} した。QTL の検出は、各個体の DNA サンプルについて常染色体に配置した 252 個のマイクロサテライト (MS) マーカーを既報⁷⁾ に基づいて型判定した後、解析プログラム glissado を用いて行った。

QTL の有無を検定するための統計量は、F 値を用い、検定の有意水準は、インターバルを 2cM として 10,000 回のパーミュテーションテストにより求めた。なお、得られた QTL 領域の偽陽性につい

ては、偽陽性の混入率 (False Discovery Rate; FDR)⁶⁾ を算出し、真偽性を検定した。

(2) 二次スクリーニング

二次スクリーニングでは、「第7福桜」号の肥育産子 393 頭 (去勢 301 頭、雌 92 頭) を用い、一次スクリーニングにおいて枝肉重量または BMS No. について有意であった 3 本の染色体 (BTA6, BTA15 および BTA25) を解析対象とした。2つの形質の表現型値は一次スクリーニングと同様に性ごとに標準化した。MS マーカーは、これら 3 本の染色体に 34 個 (BTA6: 12 個、BTA15: 11 個、BTA25: 11 個) を配置し、各個体の DNA サンプルについて型判定を行った。

QTL の検出は、一次スクリーニングと同様に行ったが、有意水準は、100,000 回のパーミュテーションテストにより算出した。

QTL 領域のハプロタイプと解析形質との関連性調査

「第7福桜」の肥育産子 (393 頭) を性により区分した後、二次スクリーニングにより得られた QTL 領域において、枝肉重量あるいは BMS No. に対してプラスの効果を持つハプロタイプをラージ Q (Q)、効果のないものをスモール q (q) とし、各 QTL 領域のハプロタイプが特定できた個体を、ハプロタイプの組み合わせ別あるいはタイプ別に分類した。そして、各形質についてハプロタイプを母数効果として分散分析を用いて検定した。なお多重検定には Scheffe を用いた。

結 果

「第7福桜」号の QTL 解析

一次スクリーニングおよび二次スクリーニングに用いた個体の枝肉成績の基本的統計量は表 1 および表 2 に示すとおりで、性を母数効果とした分散分析を行った結果、枝肉重量および皮下脂肪厚において有意差を認めた。

一次スクリーニングにおいて、染色体ワイズ 1% 水準で有意な領域が検出された染色体は、枝肉重量では BTA6、ロース芯面積では BTA2 および BTA28、バラ厚では BTA14、皮下脂肪厚では BTA16 および BTA26、歩留基準値では BTA2 および BTA12、BMS No. では BTA15 および BTA25 であった (表 3)。また、各 QTL 領域の FDR は 0 から 0.15 であった。

一次スクリーニングにおいて枝肉重量または

枝肉形質に及ぼす性の効果を考慮し複数形質を対象としたQTL解析

表1 一次スクリーニング対象集団の枝肉形質表現型値の基本的統計量

区 分	例数	平均	標準偏差	標準誤差	最小値	最大値	
枝 肉 重 量 *	去勢	160	464.36	40.78	3.224	348.2	602.5
	雌	67	419.62	40.00	4.886	336	537
	全体	227	451.16	45.34	3.009	336	602.5
ロース芯面積	去勢	160	54.97	7.13	0.564	40	74
	雌	67	53.60	7.42	0.907	41	74
	全体	227	54.56	7.23	0.480	40	74
バ ラ 厚	去勢	160	7.61	0.87	0.068	5	9.6
	雌	67	7.42	0.80	0.097	6	9.5
	全体	227	7.55	0.85	0.056	5	9.6
皮下脂肪厚 *	去勢	160	1.81	0.58	0.046	0.5	3.6
	雌	67	2.10	0.65	0.080	1	4.1
	全体	227	1.90	0.62	0.041	0.5	4.1
歩留基準値	去勢	160	74.18	1.22	0.096	70.9	76.9
	雌	67	74.18	1.29	0.157	71.3	77.7
	全体	227	74.18	1.24	0.082	70.9	77.7
BMS No.	去勢	160	4.42	1.85	0.146	2	10
	雌	67	4.16	1.62	0.198	2	9
	全体	227	4.34	1.78	0.118	2	10

注) *:性を母数効果として有意差あり ($P < 0.0001$)

表2 二次スクリーニング対象集団の枝肉形質表現型値の基本的統計量

区 分	例数	平均	標準偏差	標準誤差	最小値	最大値	
枝 肉 重 量 *	去勢	301	469.23	41.70	2.403	348.2	602.5
	雌	92	421.99	46.17	4.814	298.8	537
	全体	393	458.17	47.19	2.380	298.8	602.5
ロース芯面積	去勢	301	54.02	6.88	0.397	38	74
	雌	92	52.90	7.28	0.759	40	74
	全体	393	53.76	6.99	0.352	38	74
バ ラ 厚	去勢	301	7.54	0.82	0.047	5	9.6
	雌	92	7.40	0.81	0.084	4.9	9.5
	全体	393	7.51	0.82	0.041	4.9	9.6
皮下脂肪厚 *	去勢	301	1.82	0.58	0.033	0.5	4
	雌	92	2.14	0.68	0.071	1	4.1
	全体	393	1.89	0.62	0.031	0.5	4.1
歩留基準値	去勢	301	73.96	1.17	0.067	70.1	76.9
	雌	92	74.02	1.25	0.130	71.3	77.7
	全体	393	73.97	1.19	0.060	70.1	77.7
BMS No.	去勢	301	4.13	1.73	0.100	2	10
	雌	92	3.91	1.52	0.159	2	9
	全体	393	4.08	1.68	0.085	2	10

注) *:性を母数効果として有意差あり ($P < 0.0001$)

BMS No. について有意であった3本の染色体 (BTA6、BTA15およびBTA25) を対象に二次スクリーニング解析を行った結果、染色体ワイズでBTA6では枝肉重量に関して有意な領域 ($P < 0.0001$) が、BTA15およびBTA25ではBMS No. に関して有意な領域 (BTA15: $P < 0.01$ 、BTA25: $P < 0.0001$) が検出された (表4および図1)。こ

表3 一次スクリーニングの結果

BTA	形 質	位置 (cM)	F 値	ハプロタイプ置換効果	染色体ワイズ有意水準	ゲムワイズ有意水準	FDR
6	枝 肉 重 量	24	11.5	22.8 kg	< 0.01		0.10
2	ロース芯面積	126	12.2	3.9 cm ²	< 0.01		0.12
28	ロース芯面積	58	12.6	4.3 cm ²	< 0.01		0.15
14	バ ラ 厚	8	11.9	0.4 cm	< 0.01		0.13
16	皮下脂肪厚	50	20.1	0.4 cm	< 0.001	< 0.01	0.00
26	皮下脂肪厚	36	10.0	0.3 cm	< 0.01		0.13
2	歩留基準値	122	13.2	0.7	< 0.01		0.11
12	歩留基準値	28	11.1	0.6	< 0.01		0.14
15	BMS No.	60	10.9	0.9	< 0.01		0.12
25	BMS No.	36	12.4	1.0	< 0.01		0.12

注) 染色体ワイズ1%有意水準で有意なものを示す。

表4 二次スクリーニングの結果

BTA	形 質	位置 (cM)	F 値	ハプロタイプ置換効果	寄与率 (%)	染色体ワイズ有意水準
6	枝 肉 重 量	40	41.2	27.7 kg	9.3	< 0.0001
15	BMS No.	42	12.2	0.6	2.8	< 0.01
25	BMS No.	42	26.3	0.9	6.1	< 0.0001

これらのQTL領域の枝肉重量またはBMS No. に対するハプロタイプ置換効果は、BTA6では27.7kg、BTA15では0.6、BTA25では0.9であった。

QTL領域のハプロタイプと解析形質との関連性調査

「第7福桜」号の肥育産子の枝肉成績について、ハプロタイプ別に分類した各グループにおける枝肉重量またはBMS No. の基本的統計量を表5に示した。また、分散分析および多重検定の結果を表6および表7に示した。

枝肉重量については (表6)、去勢ではBTA6においてQ6群がq6群と比べて、枝肉重量の平均値が有意に大きかった ($P < 0.0001$)。雌ではQ6群とq6群の間で、枝肉重量の平均値に有意な差は認められなかったが同様の傾向を認めた。

BMS No. については (表7)、去勢ではハプロタイプの組み合わせは有意な母数効果となった。多重検定の結果、BTA15およびBTA25の両方にQを持つQ15Q25群は、両方ともqを持つq15q25群およびBTA15にのみQを持つQ15q25群と比べて、BMS No. の平均値が有意に高かった (Q15Q25 vs q15q25: $P < 0.001$ 、Q15Q25 vs Q15q25: $P < 0.05$)。また、雌においてもBMS No. のハプロタイプの組み合わせは有意な母数効果となり、多重検定の結果、Q15Q25群は、q15q25群およびq15Q25群と比べて、BMS No. の平均値が有意に高かった

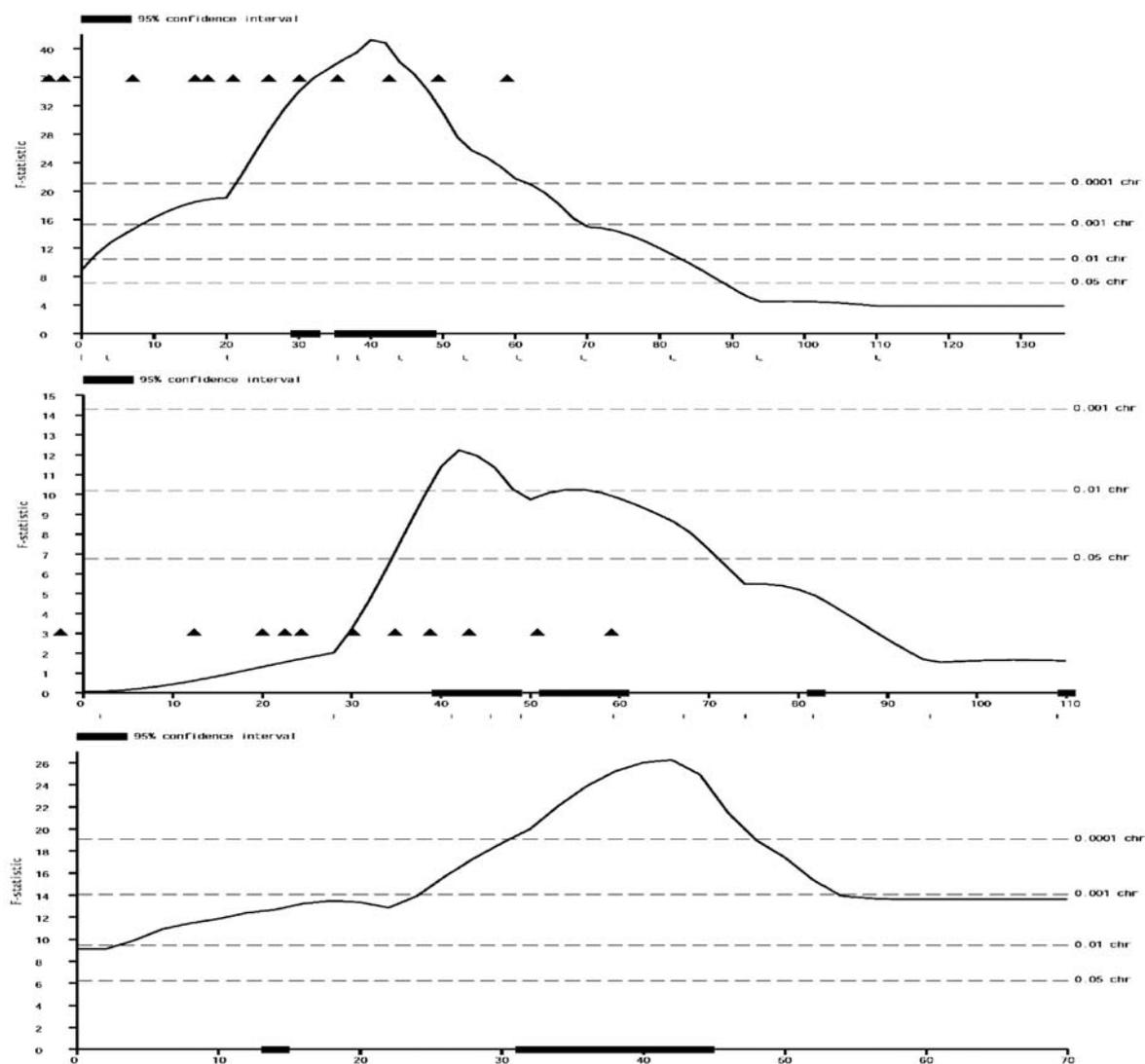


図1 BTA6、BTA15 および BTA25 の解析結果
 ▲は配置したマーカー位置、縦軸はF値、横軸はcM
 ■は95% confidence Intervalを表す。

表5 QTL領域のハプロタイプおよびその組み合わせによる解析形質の基本的統計量

形質	性	区分	例数	平均	標準偏差	標準誤差		
枝肉重量	去勢	BTA6	Q6	149	483.11	40.43	3.312	
			q6	134	453.72	36.30	3.136	
		雌	BTA6	Q6	40	429.37	51.87	8.201
				q6	44	412.36	39.16	5.904
BMS No.	去勢	BTA15	Q15	156	4.36	1.79	0.143	
			q15	134	3.92	1.67	0.144	
			BTA25	Q25	127	4.55	1.82	0.162
				q25	163	3.77	1.56	0.122
		BTA15および BTA25の組み合わせ	Q15Q25	68	4.75	1.88	0.228	
			Q15q25	83	3.95	1.58	0.174	
			q15Q25	55	4.36	1.78	0.240	
			q15q25	74	3.58	1.54	0.179	
		雌	BTA15	Q15	43	4.37	1.69	0.258
				q15	44	3.36	0.97	0.146
			BTA25	Q25	47	4.28	1.75	0.256
				q25	39	3.54	1.10	0.176
BTA15および BTA25の組み合わせ	Q15Q25		20	5.00	1.84	0.410		
	Q15q25		18	3.89	1.32	0.312		
	q15Q25		24	3.50	1.10	0.225		
	q15q25		19	3.21	0.79	0.181		

表6 枝肉重量におけるハプロタイプを効果とした分散分析表

去勢	自由度	平方和	平均平方	F 値	P 値
BTA6	1	60932.12	60932.12	41.044	<.0001
残差	281	417160.3	1484.556		

雌

	自由度	平方和	平均平方	F 値	P 値
BTA6	1	6068.035	6068.035	2.912	0.0917
残差	82	170876.6	2083.861		

Scheffe: CW

効果: BTA6

判定 S: 有意差を認める

去勢

区 分	平均値の差	棄却値	P 値	判定
Q6 vs q6	29.388	9.03	<.0001	S

雌

区 分	平均値の差	棄却値	P 値	判定
Q6 vs q6	17.018	19.839	0.0917	

表7 BMS No.におけるハプロタイプを効果とした分散分析表

去勢	自由度	平方和	平均平方	F 値	P 値
BTA15&25	3	54.073	18.024	6.319	0.0004
残差	276	787.298	2.853		

雌

	自由度	平方和	平均平方	F 値	P 値
BTA15&25	3	37.064	12.355	7.156	0.0003
残差	77	132.936	1.726		

多重検定 (Scheffe)

効果: BTA15&25

判定 S: 有意差を認める

去勢

区 分	平均値の差	棄却値	P 値	判定
Q15Q25 vs Q15q25	0.798	0.777	0.0413	S
Q15Q25 vs q15Q25	0.386	0.862	0.6618	
Q15Q25 vs q15q25	1.169	0.798	0.0009	S
Q15q25 vs q15Q25	-0.412	0.826	0.58	
Q15q25 vs q15q25	0.371	0.76	0.5973	
q15Q25 vs q15q25	0.783	0.846	0.082	

雌

区 分	平均値の差	棄却値	P 値	判定
Q15Q25 vs Q15q25	1.111	1.22	0.0883	
Q15Q25 vs q15Q25	1.5	1.137	0.0044	S
Q15Q25 vs q15q25	1.789	1.203	0.001	S
Q15q25 vs q15Q25	0.389	1.171	0.825	
Q15q25 vs q15q25	0.678	1.235	0.4861	
q15Q25 vs q15q25	0.289	1.153	0.9153	

(Q15Q25 vs q15q25: $P < 0.01$, Q15Q25 vs q15Q25: $P < 0.01$)。

考 察

近年、育種改良への応用を目的として、DNA マーカーと表現型値との連鎖解析により、家畜の経済形質に關与する遺伝子が存在する染色体領域、すなわち、QTL の同定が進められている。黒毛和種に關しては、枝肉重量や脂肪交雜といった枝肉形質に關する QTL 解析が行われ、これまでに多くの QTL が報告されている^{1-5,8,9)}。一般に、枝肉形質に關与する一つ一つの QTL の表現型値に対する効果は小さく³⁾、QTL を検出するためには、通常は可能な限り多数の個体の DNA および表現型のデータを収集することが必須である。そして、この場合には全個体を解析対象とするため膨大な労力・コストがかかることから、将来的には解析に供する個体数ある程度の大きさに抑える必要があると考えられる。

そこで、安部ら^{1,2)}は、「茂重桜」号の解析において、少ない解析個体数で QTL が検出可能な選択的ジェノタイピングによる QTL 解析を試みた。対象形質は BMS No. とし、対象個体 527 頭のうち上位と下位の 161 頭を抽出して解析を行った結果、3本の染色体上に有意な QTL 領域を検出した。ただし、この解析手法では、ターゲットとした特定の形質に關する QTL 情報に限定され、他の形質を解析対象とした場合には個体抽出からの解析作業を新たに追加する必要がある。さらに、信頼度の高い QTL 領域を検出するためには、より大きな母集団、すなわち、対象の種雄牛由来の産子サンプルおよび表現型値を相当数加えなければならない、つまり、解析対象となる母集団の構成頭数の規模は従来の方法と比べて変わらないという問題点が挙げられた。

Takasuga ら³⁾は、特定種雄牛の産子からなる父方半きょうだい家系を用いた QTL 解析において、QTL を検出するためにはどのくらいの産子数が必要とされるか、シミュレーションを行った。その結果、産子 200 頭を用いて染色体ワイズ 5% 有意水準で QTL を検出するとき、一つの表現型に対する効果が比較的大きい QTL についてはほぼ全てが検出され、効果の小さい QTL については 6 から 7 割が検出されると予測した。

今回我々は、この報告をもとに、「第 7 福桜」号の肥育産子集団に対して、枝肉成績に關する 6 形質

について解析を行った。ただし、この集団は去勢と雌の混在する集団であることから、性による表現型値の違いを補正した。その結果、それぞれの形質に対して、染色体ワイズ 1% 有意水準で 1 から 2 か所、合計 10 か所の QTL 領域を得ることができた。また、複数の形質に関して解析を行う場合、複数の形質と多数の染色体との組合せについての多重検定を行うことになるため、しばしば多くの陽性結果が得られ、それらの中には偽陽性であるものが混入していると想定される^{6,10)}。そのため、今回は偽陽性 QTL の混入を防ぐ目的で、FDR を算出した。「第7福桜」号の一次スクリーニングで検出された 10 か所の QTL の FDR は 0 ~ 0.15 と、低い値を示しており、得られた QTL 領域が偽陽性である可能性は低いことが推察された。

次に、「第7福桜」号の QTL 解析で得られた枝肉重量および BMS.No に関するハプロタイプの組み合わせが各形質に及ぼす効果を検討した結果、表現型にプラスの効果を持つハプロタイプである Q を有す固体は、効果のない q を有す固体に比べ、枝肉重量では Q を有する固体が有意に重く、BMS.No では二つの領域において Q を有する固体が他のタイプに比べ、高くなることが確認できた。このことは、表現型値の性差を標準化により補正する手法^{4,5)}と FDR により得られた QTL 領域の真偽性を検定する方法⁶⁾を組み合わせで解析し、得られた領域は、枝肉形質などの表現型値に影響を及ぼす領域であることを示唆している。

以上のことから、ウシの肉質等に関する QTL 解析を行う場合、表現型値の性差を標準化により補正する方法や得られた QTL 領域の真偽性を検定

する方法を解析手法に組み込むことにより、解析対象となる母集団の規模を縮小することができ、さらに複数形質を一度に解析することが可能であることが示唆された。よって、今回試みた方法は、これまでの QTL 解析を行う上での課題を解決し、効率化を図ることができる手法であり、性差だけでなく、それ以外の環境に影響を及ぼす要因の標準化に活用すれば、より信頼性の高い領域を検出することが出来ることが推察された。

参 考 文 献

- 1) 安部亜津子ら．島根県立畜産試験場研究報告，38：9-13, 2005.
- 2) 安部亜津子ら．島根県立畜産技術センター研究報告，39：7-11, 2006.
- 3) Takasuga A., et al. *Mammalian Genome*, 18 (2) : 125-136, 2007.
- 4) 片淵直人ら．平成 16 年度佐賀県畜産試験場試験研究成績書，41：1-4, 2004.
- 5) 小林直彦ら．岐阜県畜産研究所研究報告，6：1-9, 2006.
- 6) Weller J. I., et al. *Genetics*, 150 : 1699-1706, 1998.
- 7) Ihara N., et al. *Genome Research*, 14 : 1987-1998, 2004.
- 8) 瀬戸口浩二ら．日本畜産学会第 106 回大会講演要旨，IV29-05, 2006.
- 9) 瀬戸口浩二ら．日本動物遺伝育種学会第 7 回大会講演要旨，I-02, 2006.
- 10) Lander E. S. and Botstein D. *Genetics*, 121 : 185-199, 1989.