

－農林水産省委託プロジェクト研究－

生産システム革新のための研究開発

DNA マーカー育種の高度化のための技術開発

平成 28 年度 最終年度報告書

平成 29 年 3 月

国立研究開発法人
農業・食品産業技術総合研究機構

<別紙様式3. 平成28年度の最終年度報告書>

I-1. 年次計画

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	24	25	26	27	28	機関	研究室
1. 生産病に対する感受性を支配するゲノム領域の探索 (1) 抗病性関連形質とゲノム領域の相関の解析						農業生物資源研究所 畜産草地研究所 宮城県畜産試験場 岐阜県畜産研究所 東北大学大学院農学研究科 農林水産・食品産業技術振興協会 日本ハム株式会社	家畜ゲノム研究ユニット／動物生体防御研究ユニット 家畜育種研究ユニット 種豚家さん部 養豚・養鶏研究部 動物遺伝育種学講座／家畜生産機能開発学講座 農林水産先端技術研究所畜産研究部 中央研究所
(2) 抗病性関連ゲノム領域の比較と多型検索とDNAマーカー候補の抽出						農業生物資源研究所 農林水産・食品産業技術振興協会	家畜ゲノム研究ユニット／動物生体防御研究ユニット 農林水産先端技術研究所畜産研究部
(3) 抗病性DNAマーカー候補の評価						農業生物資源研究所 (H28より農研機構生物機能利用研究部門)	家畜ゲノム研究ユニット／動物生体防御研究ユニット (H28より動物

						畜産草地研究所 （H28より農研機構畜産研究部門） 宮城県畜産試験場 岐阜県畜産研究所 東北大学大学院農学研究科 農林水産・食品産業技術振興協会 日本ハム株式会社	生体防御ユニット） 家畜育種研究ユニット（H28より家畜育種ユニット） 種豚家さん部 養豚・養鶏研究部 動物遺伝育種学講座／家畜生産機能開発学講座 農林水産先端技術研究所畜産研究部 中央研究所
2. 免疫系遺伝子の多様性と抗病性との関連の解明 （1）免疫関連遺伝子の機能と遺伝的多様性の解明	←		→			農業生物資源研究所 農林水産・食品産業技術振興協会 畜産草地研究所	家畜ゲノム研究ユニット／動物生体防御研究ユニット 農林水産先端技術研究所畜産研究部 家畜飼養技術研究領域／家畜整理栄養研究領域
（2）免疫関連遺伝子の多型のDNAマーカーとしての可能性の検討		←		→		農業生物資源研究所 畜産草地研究所	家畜ゲノム研究ユニット／動物生体防御研究ユニット 家畜飼養技術研究領域／家

(3) 抗病性向上のためのDNAマーカー候補の評価抗病性DNAマーカー候補の評価						農業生物資源研究所 (H28 より農研機構生物機能利用研究部門) 農林水産・食品産業技術振興協会 動物衛生研究所 (H28 より農研機構動物衛生研究部門) 畜産草地研究所 静岡県畜産技術研究所	畜整理栄養研究領域 家畜ゲノム研究ユニット／動物生体防御研究ユニット (H28 より動物生体防御ユニット) 農林水産先端技術研究所畜産研究部 病態研究領域／細菌・寄生虫研究領域 (H28 より繁殖障害ユニット／腸管病原菌ユニット／病理ユニット／細胞内寄生菌ユニット) 家畜飼養技術研究領域／家畜整理栄養研究領域 (H28 より飼料調製ユニット) 中小家畜研究センター・養豚・養鶏科
---	--	--	--	--	--	---	--

3. ウイルス受容体分子の探索、多様性解析と抗病性との関連の解明 1) ブタロタウイルスの受容体分子の探索、多様性解析と抗病性との関連の解明 (1) 受容体分子の探索					動物衛生研究所	ウイルス・疫学研究領域
					農業生物資源研究所	家畜ゲノム研究ユニット／動物生体防御研究ユニット
					農林水産先端技術研究所	畜産研究部
(2) ウイルス構造タンパク質の発現ベクターの構築					動物衛生研究所	ウイルス・疫学研究領域
					農業生物資源研究所	家畜ゲノム研究ユニット／動物生体防御研究ユニット
					農林水産先端技術研究所	畜産研究部
(3) 受容体分子の遺伝子多型とウイルス結合能の関連の解明					動物衛生研究所（H28より農研機構動物衛生研究部門）	ウイルス・疫学研究領域（H28より発病制御ユニット）
					農業生物資源研究所（H28より農研機構生物機能利用研究部門）	家畜ゲノム研究ユニット／動物生体防御研究ユニット（H28より動物生体防御ユニット）
					農林水産先端技術研究所	畜産研究部

2) PRRSウイルスの受容体分子の探索、多様性解析と抗病性との関連の解明 (1) CD163分子の多型解析および感染豚における発現解析					動物衛生研究所 農業生物資源研究所 農林水産先端技術研究所	ウイルス・疫学研究領域 家畜ゲノム研究ユニット／動物生体防御研究ユニット 畜産研究部
(2) ウイルス構造タンパク質の発現ベクターの構築					動物衛生研究所 農業生物資源研究所 農林水産先端技術研究所	ウイルス・疫学研究領域 家畜ゲノム研究ユニット／動物生体防御研究ユニット 畜産研究部
(3) 受容体分子の遺伝子多型とウイルス結合能の関連の解明					動物衛生研究所 (H28より農研機構動物衛生研究部門) 農業生物資源研究所 (H28より農研機構生物機能利用研究部門) 農林水産先端技術研究所	ウイルス・疫学研究領域 (H28より豚ウイルスユニット) 家畜ゲノム研究ユニット／動物生体防御研究ユニット (H28より動物生体防御ユニット) 畜産研究部

4. 抗病性遺伝子機能解析のための解析システムの構築とその利用 (1) ブタ肝細胞の混合培養系の作出とマクロファージの増殖・単離・特性解析 (2) ブタ腎臓細胞の混合培養系の作出とマクロファージの増殖・単離・特性解析 (3) ブタ腎臓上皮系細胞を用いたブタ末梢血由来マクロファージ増殖系の作出	↔	↔	↔	↔	農業生物資源研究所 農業生物資源研究所 農業生物資源研究所	動物生体防御研究ユニット／家畜ゲノム研究ユニット 動物生体防御研究ユニット／家畜ゲノム研究ユニット 動物生体防御研究ユニット／家畜ゲノム研究ユニット
5. ブタの一腹当たり産子数に関連するゲノム領域の探索とDNAマーカーの開発 (1) ランドレース種の形質データおよびDNAサンプルの収集 (2) 大ヨークシャー種の形質データの収集 (3) ゲノムワイド相関解析 ①有用ゲノム領域の単離 ②DNAマーカーの開発 ③他集団での検証 (4) 繁殖性関連遺伝子からのDNAマーカーの開発 ①改良センターでの検証 ②民間での検証	↔ ↔ ↔ ↔ ↔	↔ ↔ ↔ ↔ ↔	↔ ↔ ↔ ↔ ↔	↔ ↔ ↔ ↔ ↔	JA 全農飼料畜産中央研究所 全農畜産サービス 東北大学 農研機構・畜産研究部門 東北大学 農研機構・畜産研究部門 JATAFF 研 家畜改良センター	上士幌種豚育種研究室 東日本原種豚場 動物遺伝育種学有用遺伝子ユニット 動物遺伝育種学家畜ゲノム・有用遺伝子ユニット 畜産研究部 技術改良課

6. ブタの飼料利用性に関する遺伝解析とDNAマーカーの開発						
1) 産肉・飼料利用性データ集積	←			→	全農畜産サービス(株) 全農飼料畜産中央研究所 静岡県畜産技術研究所	
2) 産肉・飼料利用性形質に関する遺伝的パラメータ推定	←			→	全農畜産サービス(株) 全農飼料畜産中央研究所 農研機構畜産研究部門	家畜ゲノムユニット
3) ランドレース集団における飼料利用性形質に関連するゲノム領域の探索		←		→	農研機構畜産研究部門	家畜ゲノムユニット
4) 数学的手法を用いた欠損値の補正法の検討			←	→	全農飼料畜産中央研究所	
5) デュロック集団における飼料利用性形質に関連するゲノム領域の探索			←	→	全農飼料畜産中央研究所	
6) 検証集団を用いたSNPマーカーの効果の検証				↔	静岡県畜産技術研究所	

7. ブタの離乳時産子総体重等に関連するQTLの探索とDNAマーカーの開発 (1) 離乳時産子総体重に関する形質データの収集 (2) 大ヨークシャー種での増体に関するデータの収集 (3) ゲノムワイド相関解析 ①有用ゲノム領域の単離 ②DNAマーカーの開発 ③他集団での検証 (4) デュロック種での成長関連形質の収集と組織サンプルの収集 (5) デュロック種でのマイクロアレイ解析 (6) ブタ筋芽細胞株の確立						千葉県畜産総合研究センター	養豚養鶏研究室
	←					徳島県立農林水産総合技術支援センター	畜産研究課
						農研機構・畜産研究部門	家畜ゲノムユニット
	←			←	→		
					→		
	←					岐阜県畜産研究所	養豚研究部
						農研機構・畜産研究部門	家畜ゲノム・食肉品質ユニット
	←					農研機構・畜産研究部門	食肉品質ユニット
8. ウシの繁殖性に関連するゲノム領域の探索とDNAマーカーの開発	←					農業・食品産業技術総合研究機構	畜産研究部門 家畜育種繁殖研究領域 有用遺伝子ユニット
						家畜改良センター	企画調整部 改良技術課
						神戸大学	大学院農学研究科
						農林水産先端技術研究所	畜産研究部

I－2．実施体制

課題 番号	研究項目	担当研究機関・研究室			研究担当者
		機関		研究室	
AGB 1001	研究開発責任者	農研機構 畜産研究部門	家畜育種繁殖研究領域	家畜ゲノムユニット	◎ 谷口 雅章
	生産病に対する感受性を支配するゲノム領域の探索	農研機構 生物機能利用研究部門	動物機能利用研究領域	動物生体防御ユニット	○ 上西 博英
		農林水産先端技術研究所	畜産研究部		両角 岳哉
		農林水産先端技術研究所	畜産研究部		鈴木 恒平
		農林水産先端技術研究所	畜産研究部		土岐 大輔
		東北大学	大学院農学研究科 資源生物科学専攻	家畜生産機能開発学講座	鈴木 啓一
		宮城県畜産試験場	種豚家きん部	原種豚チーム	吉野 淳良
		宮城県畜産試験場	種豚家きん部		高橋 伸和
		宮城県畜産試験場	種豚家きん部	原種豚チーム	佐久間 晶子
		農研機構 畜産研究部門	家畜育種繁殖研究領域	家畜育種ユニット	岡村 俊宏
		農研機構 畜産研究部門	家畜育種繁殖研究領域	家畜育種ユニット	西尾 元秀

AGB 1002	免疫系遺伝子の多様性と抗病性との関連の解明	日本ハム株式会社	中央研究所		高萩 陽一
		日本ハム株式会社	中央研究所		藤村 達也
		岐阜県畜産研究所	養豚・養鶏研究部		吉岡 豪
		岐阜県畜産研究所	養豚・養鶏研究部		鈴木 香澄
		農研機構 生物機能利用研究部門	動物機能利用研究領域	動物生体防御ユニット	新開 浩樹
		東北大学	大学院農学研究科 資源生物科学専攻	動物遺伝育種学	佐藤 正寛
		農研機構 生物機能利用研究部門	動物機能利用研究領域	動物生体防御ユニット	○ 上西 博英
		農研機構 生物機能利用研究部門	動物機能利用研究領域	動物生体防御ユニット	竹之内 敬人
		農林水産先端技術研究所	畜産研究部		両角 岳哉
		農林水産先端技術研究所	畜産研究部		土岐 大輔
		農研機構 動物衛生研究部門	病態研究領域	繁殖障害ユニット	吉岡 耕治
		農研機構 畜産研究部門	飼養管理技術研究領域		遠野 雅徳

AGB 1003	ウイルス受容体分子の探索、多様性解析と抗病性との関連の解明	静岡県畜産技術研究所	中小家畜研究センター	養豚・養鶏科	柴田 昌利
		静岡県畜産技術研究所	中小家畜研究センター	養豚・養鶏科	寺田 圭
		静岡県畜産技術研究所	中小家畜研究センター	養豚・養鶏科	塩谷 聡子
		静岡県畜産技術研究所	中小家畜研究センター	養豚・養鶏科	大竹 正剛
		農研機構 生物機能利用研究部門	動物機能利用研究領域	動物生体防御ユニット	新開 浩樹
		農研機構 動物衛生研究部門	細菌・寄生虫研究領域	腸管病原菌ユニット	秋庭 正人
		農研機構 動物衛生研究部門	病態研究領域	病理ユニット	芝原 友幸
		農研機構 動物衛生研究部門	細菌・寄生虫研究領域	細胞内寄生菌ユニット	江口 正浩
		農研機構 動物衛生研究部門	ウイルス・疫学研究領域	発病制御ユニット	○ 大橋 誠一
		農研機構 動物衛生研究部門	ウイルス・疫学研究領域	豚ウイルスユニット	高木 道浩
		農研機構 動物衛生研究部門	ウイルス・疫学研究領域	疾病防除基盤ユニット	井関 博

AGB 1004	抗病性遺伝子機能解析 のための解析システムの 構築とその利用	農林水産先端 技術研究所	畜産研究部		両角 岳哉
		農林水産先端 技術研究所	畜産研究部		鈴木 恒平
		農林水産先端 技術研究所	畜産研究部		土岐 大輔
		日本ハム株式 会社	中央研究所		高萩 陽一
		日本ハム株式 会社	中央研究所		藤村 達也
		農研機構 生 物機能利用研 究部門	動物機能利用 研究領域	動物生体防御 ユニット	上西 博英
		農研機構 生 物機能利用研 究部門	動物機能利用 研究領域	動物生体防御 ユニット	新開 浩樹
		農業生物資源 研究所	動物科学研究 領域	動物生体防御 研究ユニット	○ 木谷 裕
		農業生物資源 研究所	動物科学研究 領域	動物生体防御 研究ユニット	竹之内 敬人
		農業生物資源 研究所	動物科学研究 領域	動物生体防御 研究ユニット	佐藤 充
		農業生物資源 研究所	農業生物先端 ゲノム研究セ ンター 兼 動 物科学研究領 域	家畜ゲノム研 究ユニット 兼 動物生体 防御研究ユニ ット	上西 博英
		農業生物資源 研究所	動物科学研究 領域	動物生体防御 研究ユニット	新開 浩樹

AGB 2001	ブタの一腹当たり産子数に関連するゲノム領域の探索とDNAマーカーの開発	農研機構 畜産研究部門	家畜育種繁殖研究領域	家畜ゲノムユニット	○ 谷口 雅章
		農研機構 畜産研究部門	家畜育種繁殖研究領域	家畜ゲノムユニット	荒川 愛作
		全農畜産サービス株式会社	東日本原種豚場	AIセンター・品質管理課	廣瀬 健右
		全国農業協同組合連合会	飼料畜産中央研究所	上士幌種豚育種研究室	普川 一雄
		全国農業協同組合連合会	飼料畜産中央研究所	上士幌種豚育種研究室	伊藤 哲也
		全農畜産サービス株式会社	ブリーディング事業部	技術課	二階堂 聡
		農林水産先端技術研究所	畜産研究部		両角 岳哉
		農林水産先端技術研究所	畜産研究部		鈴木 恒平
		農林水産先端技術研究所	畜産研究部		美川 亜弓
		家畜改良センター	企画調整部	改良技術課	佐藤 周史
		農研機構 畜産研究部門	家畜育種繁殖研究領域	有用遺伝子ユニット	小林 栄治
		東北大学	大学院農学研究科 資源生物科学専攻	家畜生産機能開発学講座	鈴木 啓一

AGB 2002	ブタの飼料利用性に関する遺伝解析とDNAマーカーの開発	東北大学	大学院農学研究科 資源生物科学専攻	動物遺伝育種学	佐藤 正寛
		農研機構 畜産研究部門	家畜育種繁殖研究領域	家畜育種ユニット	岡村 俊宏
		農研機構 畜産研究部門	家畜育種繁殖研究領域	家畜育種ユニット	西尾 元秀
		全国農業協同組合連合会	飼料畜産中央研究所	上士幌種豚育種研究室	上川 舞
		全農畜産サービス株式会社	東日本原種豚場	AIセンター・品質管理課	○ 廣瀬 健右
		全国農業協同組合連合会	飼料畜産中央研究所	上士幌種豚育種研究室	普川 一雄
		全国農業協同組合連合会	飼料畜産中央研究所	上士幌種豚育種研究室	伊藤 哲也
		全農畜産サービス株式会社	ブリーディング事業部	技術課	二階堂 聡
		静岡県畜産技術研究所	中小家畜研究センター	養豚・養鶏科	柴田 昌利
		静岡県畜産技術研究所	中小家畜研究センター	養豚・養鶏科	寺田 圭
		農研機構 畜産研究部門	家畜育種繁殖研究領域	家畜ゲノムユニット	谷口 雅章
		農研機構 畜産研究部門	家畜育種繁殖研究領域	家畜ゲノムユニット	荒川 愛作
		静岡県畜産技術研究所	中小家畜研究センター	養豚・養鶏科	寒川 彰久

AGB 2003	ブタの離乳時産子総体重等に関連するQTLの探索とDNAマーカーの開発	全国農業協同組合連合会	飼料畜産中央研究所	上土幌種豚育種研究室	上川 舞
		農研機構 畜産研究部門	家畜育種繁殖研究領域	家畜ゲノムユニット	○ 谷口 雅章
		農研機構 畜産研究部門	家畜育種繁殖研究領域	家畜ゲノムユニット	荒川 愛作
		農研機構 畜産研究部門	畜産物研究領域	食肉品質ユニット	中島 郁世
		千葉県畜産総合研究センター	養豚養鶏研究室		松本 千明
		徳島県立農林水産総合技術支援センター	畜産研究課	養豚担当	新居 雅宏
		岐阜県畜産研究所	養豚・養鶏研究部		吉岡 豪
AGB 2004	ウシの繁殖性に関連するゲノム領域の探索とDNAマーカーの開発	農研機構 畜産研究部門	家畜育種繁殖研究領域	有用遺伝子ユニット	○ 小林 栄治
		家畜改良センター	企画調整部	改良技術課	小島 孝敏
		農研機構 畜産研究部門	家畜育種繁殖研究領域	家畜育種ユニット	西尾 元秀
		神戸大学	大学院農学研究科	資源生命科学専攻 応用動物学講座	万年 英之
		神戸大学	大学院農学研究科	食資源教育研究センター	大山 憲二

		農林水産先端 技術研究所	畜産研究部		両角 岳哉
		農林水産先端 技術研究所	畜産研究部		鈴木 恒平
		農林水産先端 技術研究所	畜産研究部		美川 亜弓

(注1) 研究開発責任者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。

中課題番号	11105377	研究期間	平成24～28年度
大課題名	生産システム革新のための研究開発		
中課題名	DNAマーカー育種の高度化のための技術開発		
代表機関・研究開発責任者名	農業食品産業技術総合研究機構・谷口雅章		

I-1. 研究目的

厳しい国際情勢の中、飼料価格の高騰などにより国内の畜産経営は著しく不安定な状態となっている。その経営安定化のためには、畜産物の高品質化による輸入製品との差別化とともに、家畜の生産性の向上が必須である。家畜の生産性向上のための課題としては、家畜の繁殖能力の向上、飼料利用性の向上、そして日和見感染などによる損耗率を低減することが重要である。一方、これまでの家畜ゲノム解析研究により、遺伝病・成長形質などについて様々な知見が得られている。さらに近年においては、全ゲノム解読情報に由来する詳細なSNP情報等を活用したゲノム育種手法の高度化が可能となっている。本プロジェクトでは、家畜のゲノム情報を活用し、家畜の生産効率に深く関連する抗病性、繁殖性、飼料利用性に関して、育種改良に有効なDNAマーカーを開発することを目的とする。

1. 生産病に対する感受性を支配するゲノム領域の探索
2. 免疫系遺伝子の多様性と抗病性との関連の解明
3. ウイルス受容体分子の探索、多様性解析と抗病性との関連の解明
4. 抗病性遺伝子機能解析のための解析システムの構築とその利用
5. ブタの一腹当たり産子数に関連するゲノム領域の探索とDNAマーカーの開発
6. ブタの飼料利用性に関する遺伝解析とDNAマーカーの開発
7. ブタの離乳時産子総体重等に関連するQTLの探索とDNAマーカーの開発
8. ウシの繁殖性に関連するゲノム領域の探索とDNAマーカーの開発

抗病性については、QTL解析により感染症に対する抵抗性に関わるゲノム領域の検出を行う。またパターン認識受容体等の病原体の認識に関わる分子群や、ブタ繁殖・呼吸障害症候群ウイルス等に対する感染受容体をコードする遺伝子の多様性を解明する。さらにブタにおける抗病性研究の基盤となる細胞株を利用した解析ツール群の整備を行い、抗病性関連因子の評価を行う。繁殖性については、ブタの一腹当たり産子数、ほ育能力の指標となる離乳時産子総体重、ウシにおいては、ホルスタイン種の受胎率、黒毛和種の子牛生産指数を対象とする。飼料利用性については、ブタにおいて個体レベルの飼料利用性を解析対象とする。これらの形質データを用いて、SNPアレイを用いたゲノムワイド相関解析等により、各種形質に関連するゲノム領域を単離し、有意に関連する多型部位の抽出を行う。

以上の解析から得られた情報を元に育種改良に有効なDNAマーカーを開発することにより、ゲノム育種手法の高度化を図り、家畜の育種改良を効果的かつ迅速化することによって我が国畜産の振興に資する。

I-2. 研究結果

豚の抗病性と関連するゲノム領域の探索に関しては、PMWSに関して、岐阜県で飼養されているデュロック種集団（系統名：アイリスナガラ）において、PMWSによると見られる斃死の記録から遺伝的要因（育種価）を推定し、育種価とゲノム領域の相関の解析を行ったところ、第7染色体と第13染色体上に高い相関を示すSNPを検出した。また、日本ハムで飼養されている大ヨークシャー種集団についてもPMWSによる斃死とゲノム領域その相関について検討を行い、第2染色体p腕及び第7染色体q腕上に相関を示す領域を検出した。さらに、宮城県で飼養されているデュロック種集団（系統名：しもふりレッド）においても、第7染色体q腕末端及び第13染色体q腕末端付近にMPS発症と高い相関を示すゲノム領域を検出した。

それぞれの集団で検出された領域中に存在するSNPについて、形質値との関連性、SNPどうしの連鎖不平衡の状態、SNP遺伝型の集団中での頻度について詳細に検討し、形質値と最も高い関連性を示すSNPハプロタイプブロックを検出し、その集団間での比較を行ったところ、第7染色体上のPMWSとの関連性を示す領域については、PMWSによる斃死に関する育種価と最も高い相関を示すSNPハプロタイプブロックが、大ヨークシャー種集団（日本ハム）とデュロック種集団（岐阜県アイリスナガラ）で同一であることが明らかとなり、異なる品種でPMWSに対する感受性が同一の因子によって規定されていることが強く示唆された。

また、抗病性を改善した系統の後代に与える影響について解析するために、MPS病変面積を少なくする方向に改良したランドレース種系統豚（ミヤギノL2）について、他品種との交雑個体を、非選抜ランドレース種を用いた交雑個体と比較したところ、ミヤギノL2を用いた場合に有意にMPSスコアが低くなる結果を得た。さらに、肺病変以外の養豚経営において重要とみられる経済形質に与える影響について調査を行ったところ、ミヤギノL2の後代で、単価に関わる「格付け等級」が向上する傾向がみられ、さらに内臓代に関わる内臓疾病罹患率も低下する傾向がみられた。このことから、抗病性の改善により、衛生コストの低減に加えて、その他の要因についても経営改善が図れる可能性が示唆された。

免疫系遺伝子中の多型の抗病性向上のためのDNAマーカー化についての取り組みにおいては、ブタのTLR5遺伝子について解析を行った。TLR5遺伝子のコード領域中に、TLR5のリガンド（鞭毛タンパク質であるフラジェリン）の認識能を低下させる変異（C1205T；C：通常型／T：感受型）がランドレース種で広範囲に分布している。*Salmonella Typhimurium* (ST) の経口感染を行い、感染後の病態の変化等の検討を行ったところ、排菌量でCT型とTT型においてCC型に比べて有意に高い値を示した。また平均下痢スコアについてもCT型とTT型においてCC型に比べて高い値を示し、TLR5中のSNPが下痢症状を改善させるためのDNAマーカーとして極めて有用であること、また機能欠損遺伝型がヘテロ型でも下痢症状で不利であることも示し、交雑種においても改良目標となることを示した。

また、ワクチン中のアジュバントの効果と関連していることが知られるNLRP3について、豚でNLRP3をコードする遺伝子の多型の検索を行い、アミノ酸置換を伴う多型の分子機能に与える影響を検討したところ、A2906GのSNPがNLRP3のIL-1 β 活性化能を昂進させることが明らかとなった。機能昂進型のNLRP3遺伝子を保有する個体は、*Actinobacillus pleuropneumoniae* 及び *Haemophilus parasuis* の不活化ワクチンに対する抗体応答が向上していることが明らかとなり、NLRP3遺伝子に注目したワクチン応答を向上させる品種改良の可能性が示唆された。

さらに、細菌細胞壁のペプチドグリカンの構成要素を認識するNOD1や、真菌由来の β -グルカン認識し、食細胞活性等の宿主の免疫応答を誘導するDectin-1について、分子認識に影響を与える多型の検出を行った。

ウイルス受容体に関する解析では、ブタロタウイルスの培養細胞感染系を用いて、他の哺乳動物由来ロタウイルスと同様に、インテグリン ($\alpha 2 \beta 1$ 、 $\alpha 4 \beta 1$) が本ウイルスの受容体分子として機能していることを明らかにした。またPRRSウイルスの受容体であるCD163分子において21箇所の非同義置換を明らかにした。

ブタの繁殖性については、民間種豚場の大ヨークシャー種集団を用いたゲノムワイド相関解析により同定したSNPとその周辺のゲノム領域の詳細な構造解析により得られた多型情報より、総産子数に関して第7、第14、および第15染色体上にDNAマーカーを開発した。これらDNAマーカーの組み合わせの効果も検討し、総産子数の育種価平均値に対して増加型あるいは減少型が判別可能となった。また第7染色体においてGCM1遺伝子を特定し、マウスを用いた発現解析により胎盤形成に関与することが認められ、総産子数に関する有力な候補遺伝子である可能性を示した。全農系列のランドレース種については個々の効果は小さいものの、生存産子数および死産数に関連する複数のSNPを同定し、DNAマーカーのセットとしての利用可能性を示した。さらに現在、生産現場での改良が期待される母豚の連産性および長命性に関しても、ゲノムワイド相関解析の結果、第4および第7染色体に関連領域を同定した。

全農系列のランドレース種およびデュロック種について、飼料摂取量・体重自動記録装置を用いた個体別の飼料摂取量および増体量の測定値をもとに、飼料利用性形質の遺伝的パラメータを求め、ゲノムワイド相関解析を行った。飼料摂取量・体重自動記録装置から得られる測定データには欠失値が多く含まれるため、遺伝的パラメータが正確に推定できないことが問題となった。そこで、欠失値の補正方法を開発し、補正飼料摂取量を算出した。これを用いて飼料利用性形質に関するゲノムワイド相関解析を行った結果、ランドレース種については100個程度のQTLが検出されたことから、ポリジーンの関与が高く、各領域の効果は微細であることが推定された。一方、デュロック種については飼料要求率に関連するSNPは第2、第11、および第12染色体に合計6カ所検出された。また飼料摂取量に関連するSNPは第6、第10、および第11染色体に合計7カ所検出された。特に飼料摂取量について第6染色体に同定した5カ所のSNPのうち4カ所は連鎖していることが示唆された。この領域のSNPの効果を、静岡県デュロック種集団で検証したところ、同様の傾向が認められたため、DNAマーカーとして有用である可能性が示唆された。

千葉県ランドレース種の系統造成豚を用いた産子の体重に関するゲノムワイド相関解析の結果、生時平均体重について第13染色体、2週齢時平均体重について第10および第14染色体に関連するSNPを同定した。これらについては、系統造成中であった基礎豚からG6世代までと、維持豚（G7世代）でのSNPの効果が一致することを明らかにした。これらのSNPはランドレース集団の育種改良にDNAマーカーとして活用するとともに、組み合わせ検定などの交雑種での効果を検証する際にも活用の可能性が期待される。また岐阜県デュロック種の子豚の増体性ならびに産肉性に関する遺伝子発現量解析により、QTL領域内に見出された形質と関連することが示唆されるいくつかの機能遺伝子が同定された。

ウシの繁殖性に関しては、乳用牛ではホルスタイン種雌集団および種雄牛集団それぞれを用いたゲノムワイド相関解析から、受胎率に関連する有効な6個のDNAマーカーを開発した。それぞれのDNAマーカー近傍の遺伝子の機能解析を行うことにより、繁殖性への関与を説明することが可能な責任遺伝子を特定した。さらに難産率に関するDNAマーカーを開発するとともに、責任遺伝子を特定した。一方、肉用牛については、黒毛和種の分娩間隔に関連するDNAマーカーを特定し、他の集団においても利用可能な当該DNAマーカーの簡易判定法を開発した。

I-3. 今後の課題

ブタの抗病性については、疾病と関連するゲノム領域について、集団への導入等を通じて、抗病性のみならず繁殖性・成長性等の生産性や、肉質等についても改善効果が見られることを実際の飼養集団で示すことで、抗病性を指標にした豚の育種改良の重要性がより強く認識されるものと考えられる。また、複数の品種・形質で検出された疾病と関連するゲノム領域について、その構造を詳細に明らかにして、共通なSNPマーカーを抽出することにより、より汎用性の高い抗病性改良マーカーを作出することができると想定される。ブタの感染症については、新たなもの、あるいは強毒化したものが毎年のように出現しており、これらに対して、総合的に免疫能を向上させることによる抗病性の改善についても検討する必要があると考えられ、そのような観点からの免疫系遺伝子の多型の活用についても考慮することが望ましい。免疫能を向上させることにより広く抵抗性を有する育種が可能かどうかについても今後検討していく必要がある。ゲノムDNA、家系情報と、疾患関連形質の収集を系統立てて行い、免疫系遺伝子の多型やSNPマーカーとの関連について調査を行うことで、これまでに開発した抗病性マーカーの有用性の実証や、新たな改良指標の策定が期待される。

ブタの繁殖性については、大ヨークシャー種の特定の集団において、ゲノムワイド相関解析に基づく有用ゲノム領域の検出ならびに候補遺伝子の同定を通じて、育種に有用と考えられるDNAマーカーを開発することができた。しかしながら、すべての集団に共通する効果を持つSNPは同定されていない。個々の集団の構造化が影響したことが一因と考えられるが、複数集団を統合した解析を行う際の補正方法の開発が期待される。飼料利用性についてはデュロック種の飼料摂取量に関して全農集団で同定したSNPが、静岡県集団でも同様の効果を示す傾向が認められたが統計学的な有意差は確認できていない。対象個体数を増やした今後の解析が必要である。千葉県ランドレース種系統豚の離乳時産子総体重および岐阜県デュロック種の子豚期における増体性については、それぞれ関連するSNPの同定、および機能遺伝子の検出まで到達したが、DNAマーカーとしての有用性の確認のためには他の集団における効果の検証を進める必要がある。

本研究で同定したDNAマーカーを他の集団での育種に適用する場合には、集団構造の問題など考慮したうえで、あらかじめ効果を検討することが重要である。またDNAマーカーの利用普及のためには複数種類のDNAマーカーを安価で判別できる検査方法、ならびに試薬キット類の開発などが期待される。

平成 28 年度 「DNA マーカー育種の高度化のための技術開発」 最終年度報告書

中課題番号: 11105377

研究期間: 平成 24～28 年度

中課題名: DNA マーカー育種の高度化のための技術開発 (AGB)

小課題番号: AGB1001

研究期間: 平成 24～28 年度

小課題名: 生産病に対する感受性を支配するゲノム領域の探索

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農研機構 生物機能利用研究部門・動物機能利用研究領域・動物生体防御ユニット・上西博英

共同研究機関・研究室・研究者名等: 農林水産先端技術研究所・畜産研究部・両角岳哉、農林水産先端技術研究所・畜産研究部・鈴木恒平、農林水産先端技術研究所・畜産研究部・土岐大輔、東北大学・大学院農学研究科 資源生物科学専攻・家畜生産機能開発学講座・鈴木啓一、宮城県畜産試験場・種豚家きん部・原種豚チーム・吉野淳良、宮城県畜産試験場・種豚家きん部・高橋伸和、宮城県畜産試験場・種豚家きん部・原種豚チーム・佐久間晶子、農研機構 畜産研究部門・家畜育種繁殖研究領域・家畜育種ユニット・岡村俊宏、農研機構 畜産研究部門・家畜育種繁殖研究領域・家畜育種ユニット・西尾元秀、日本ハム株式会社・中央研究所・高萩陽一、日本ハム株式会社・中央研究所・藤村達也、岐阜県畜産研究所・養豚・養鶏研究部・吉岡豪、岐阜県畜産研究所・養豚・養鶏研究部・鈴木香澄、農研機構 生物機能利用研究部門・動物機能利用研究領域・動物生体防御ユニット・新開浩樹、東北大学・大学院農学研究科 資源生物科学専攻・動物遺伝育種学・佐藤正寛

1) 研究目的

高度に効率化して生産性を極限まで高めた近代の養豚業においては、その密飼等の飼養環境の悪化により様々な疾病、いわゆる生産病が発生しており、疾病対策等の衛生関連経費の上昇を招いている。生産病には通常では重篤な疾病を引き起こさない様な細菌、ウイルスによる日和見感染症が多く含まれ、養豚における最大のコスト上昇要因となっていると言っても過言ではない。

これらの感染症を引き起こす病原体としては、豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) や離乳後多臓器性発育不良症候群 (PMWS) 等のウイルスや、さらにはマイコプラズマ、サルモネラ菌等の細菌があるが、これらの病原体の複合感染により、肺炎や下痢、成長阻害等の症状の重篤化が引き起こされている。また、サルモネラ菌等一部の病原体についてはいわゆる人獣共通感染症の原因ともなり、ヒトの公衆衛生上も重要な問題となっている。これらの感染症を防止するために抗生物質を多用することは、ブタ個体に感染する細菌だけでなく、環境中においても薬剤耐性菌が出現する原因になることが懸念されており、こちらも畜産業のみならず公衆衛生上の問題が大きい。一方、ワクチンによる疾病の制御についても長年試みられてきたが、病原体遺伝子の急速な変異等によりその効果は不十分なものとどまり、多くの感染症において完全な制圧には至っていない状況であった。

そこで、これまでの病原体に着目した疾病制御の研究だけではなく、宿主であるブタの遺伝的要因に着目して抗病性の向上を図る研究開発を行う必要があると考えられる。これらの感染症を中心とした生産病の発症、重篤化には個体差があり、遺伝的改良による抗病性の向上が期待される。抗病性を支配する遺伝的要因は、直接的に免疫系に関与する遺伝子であることも想定されるが、それ以外の生体内の様々な生理学的反応に関与する遺伝子が関係していると考えられ、ゲノムワイドな視点からのこれらの遺伝子の探索も不可欠である。本課題においては、疾病や免疫能についての形質測定値を有する豚商用品種集団を用いて、ゲノム全体に配置した DNA マーカーを用いたジェノタイピングによりこれらの形質と相関を有するゲノム領域の特定を行うとともに、その領域から抗病性を向上させる DNA マーカーを開発するための細胞・個体レベルでの抗病性評価、責任遺伝子の探索を行うこととした。また、免疫能の向上と関連するゲノム領域を抗病性向上のための DNA マーカー開発に利用するために、その免疫形質の向上と抗病性の改善との関連についての検証も行うこととした。

具体的には、マイコプラズマ性肺炎に対する抵抗性、ワクチン接種後の抗体応答等の免疫能を選抜により向上させたブタの集団 (肺炎抵抗性による選抜：宮城県畜産試験場・ランドレース種系統豚

ミヤギノ L2；免疫能による選抜：日本ハム大ヨークシャー種集団）等を用いて、免疫能に影響を与えていると考えられるゲノム領域の多様性解析を行うとともに、高肺炎抵抗性・高免疫能群の豚について、相互、あるいは一般豚との交配を行い、抗病性や免疫能とゲノム領域との関係や、免疫能の肺炎・下痢等の疾病や各種病原体に対する応答との関連についての解析を *in vitro*・*in vivo* の両者で行った。また、肺炎や免疫能に関する形質値を有するデュロック種及びランドレース種系統のブタ集団や、離乳後多臓器性発育不良症候群（PMWS）による斃死したと考えられる個体群と対照群を用いて連関解析を行うことにより、これらの抗病性や免疫能を向上させる DNA マーカーの探索を行った。これらにより、実際に抗病性を向上させたブタ集団を作出する方法の開発を目指した。

2) 研究成果

A) 抗病性に関する形質の品種内連関解析（PMWS）

岐阜畜研で飼養されているデュロック種集団（系統名：アイリスナガラ）において、約 1,600 頭の集団における PMWS によると見られる斃死の記録から遺伝的要因（育種価）を推定した。これまでに育種価の高低それぞれ 332 頭、330 頭（合計 662 頭）について PorcineSNP60 BeadChip（以下 SNP チップ）を用いたジェノタイピングを行い、育種価とゲノム領域の相関の解析を行ったところ、第 7 染色体と第 13 染色体上に高い相関を示す SNP が検出された（図 1）。

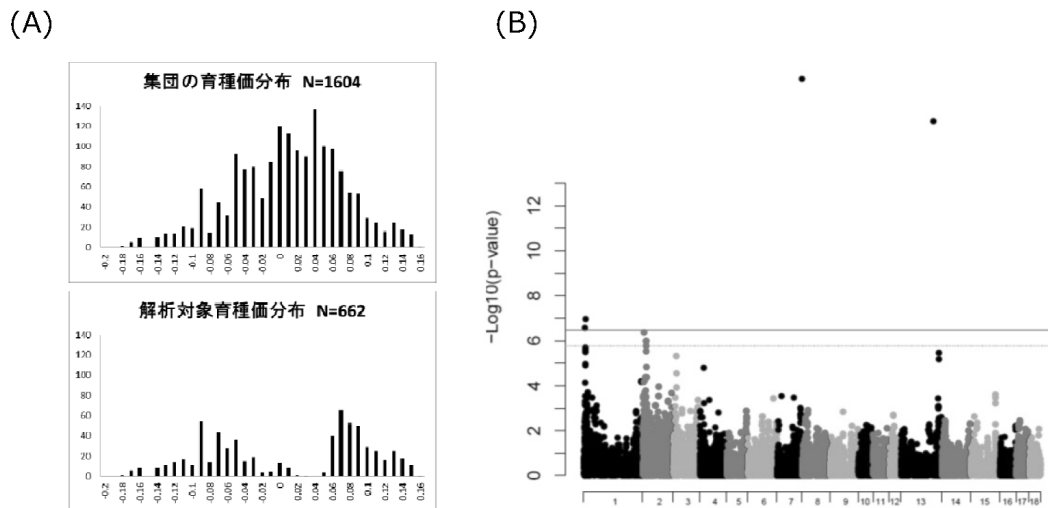


図1. デュロック種集団（アイリスナガラ）におけるPMWSによる斃死とゲノム領域の連関解析。（A）アイリスナガラ集団のPMWS斃死に関する罹病度を育種価に変換した値の分布。集団全体とジェノタイピングに供した個体のそれぞれの分布を示す。

（B）連関解析結果のマンハッタンプロット。第7及び第13染色体に高い相関を示す SNP を検出したが、第13染色体（q腕末端付近）は多くのSNPが集中しており、信頼性が高いものと考えられる。解析にはGEMMAプログラムを用いた。Bonferroni補正後の5%（破線）、1%水準（実線）の境界値も示す。

B) 抗病性に関する形質の品種内連関解析（MPS）

宮城県で飼養されているデュロック種集団（系統名：しもふりレッド）において、これまでに MPS 病変の有無を 602 頭について調査しており、病変を有していたものは 288 頭であった。さらに調査豚以外も含めて合計 796 頭の血統情報から罹病度（疾病のかかりやすさ）の育種価を年・性・季節を母数効果として考慮した上で推定を行った。この内 357 頭について SNP チップを用いたジェノタイプ

ングを行い、罹病度育種価とゲノム領域の連関解析を行ったところ、第13染色体q腕末端付近に高い相関を示すゲノム領域を検出した（図2）。また、日本ハムで飼養されている大ヨークシャー種集団についてもPMWSによる斃死とゲノム領域その相関について検討を行った。752頭の形質記録の存在する個体群の内、133頭で斃死が見られた。斃死個体全頭を含む314頭についてSNPチップでジェノタイピングを行い、形質記録を持つ個体を含む1,068頭の血縁情報も解析において考慮し、斃死に関する育種価とゲノム領域の相関を検討したところ、第2染色体p腕及び第7染色体q腕上に相関を示す領域を検出した。

(A)

出荷豚内訳						
出荷年	H23	H24	H25	H26	H27	計
頭数	165	108	141	146	42	602

ジェノタイピング個体						
出荷年	H23	H24	H25	H26	H27	計
頭数	66	80	55	90	66	357

(B)

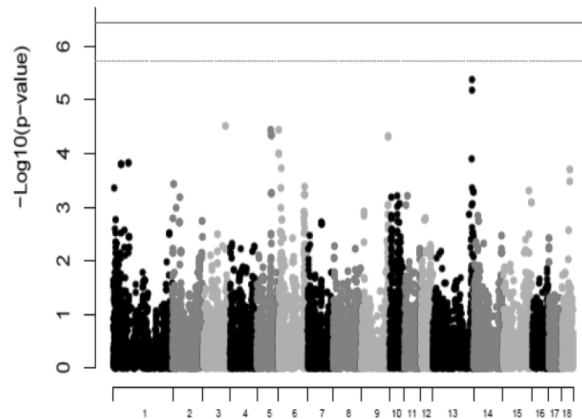


図2. デュロック種集団（しもふりレッド）におけるMPS罹患とゲノム領域の連関解析。（A）しもふりレッド集団の内訳。出荷豚とジェノタイピングを行った頭数をそれぞれ示す。（B）連関解析結果のマンハッタンプロット。第13染色体に比較的高い相関を示すSNPを検出した。解析にはGEMMAプログラムを用いた。Bonferroni補正後の5%（破線）、1%水準（実線）の境界値も示す。

C) 複数の集団で検出された抗病性関連形質と相関を有するゲノム領域の検討

上記のように、PMWS による斃死に関してはデュロック種集団（アイリスナガラ）では第7染色体及び第13染色体上のそれぞれq腕末端付近に相関を有するゲノム領域が検出されたが、第7染色体上の領域については大ヨークシャー種集団（日本ハム）で同様にPMWSによる斃死と相関を示した領域の近傍であった。また、第13染色体上の領域に関しては、別のデュロック種集団（宮城県・しもふりレッド）でMPS病変の有無と相関を示したゲノム領域の近傍である。さらには、大ヨークシャー種（日本ハム）ではPMWSによる斃死と強い相関を示す領域が第2染色体上に検出されているが、これはランドレース種（宮城畜試・ミヤギノL2）でMPS肺炎病変の面積と相関を示す領域（Okamura et al. *Anim. Genet.* 43:721-729, 2012）の近傍である（表1）。

これらの領域において、それぞれの集団で検出された領域中に存在するSNPについて、形質値との関連性、SNPどうしの連鎖不平衡の状態、SNP遺伝型の集団中での頻度について詳細に検討し、形質値と最も高い関連性を示すSNPハプロタイプブロックを検出し、その集団間での比較を行ったところ、第7染色体上のPMWSとの関連性を示す領域については、PMWSによる斃死に関する育種価と最も高い相関を示すSNPハプロタイプブロックが、大ヨークシャー種集団（日本ハム）とデュロック種集団（岐阜県アイリスナガラ）で同一であることが明らかとなり、異なる品種でPMWSに対する感受性が同一の因子によって規定されていることが強く示唆された（表2）。

表1. GWASによりPMWS及びMPSに対する感受性と関連性を示す領域の豚集団間での比較。

染色体	SSC2p	SSC7q	SSC13q
デュロック（宮城）			MPS
デュロック（岐阜）		PMWS	PMWS
大ヨークシャー（日本ハム）	PMWS	PMWS	
ランドレース（宮城）	MPS		

表2. 日本ハム大ヨークシャー種集団と岐阜デュロック種（アイリスナガラ）集団における第7染色体上の有意な共通領域のSNPハプロタイプとその効果。

	アレル数	相加的効果*	S.E.	ハプロタイプ	
				INRA0029066	ALGA0045917
日本ハム	55	-0.0435	0.0139	C	A
	272	0.027	0.0055	C	G
	285	0.0388	0.0049	A	G
	20	-0.055	0.0229	A	A
岐阜県	708	0.039	0.0022	A	G
	616	-0.0381	0.0025	C	G

*相加的遺伝子効果：閾値形質モデルによって推定された育種価に対する相加的効果。日本ハム集団では低い方が生存側（望ましい効果）、岐阜県では高い方が生存側（望ましい効果）になっている。

D) MPS に関する QTL 領域の遺伝子発現に与える影響

ランドレース種集団で検出された、マイコプラズマ肺炎に起因する肝変化病変スコア（面積）に関する第2染色体上のQTL領域の遺伝型（抵抗型・感受型）をヘテロに持つ個体を掛け合わせて得た産子の腎臓からマクロファージを単離し、*Mycoplasma hyopneumoniae* 死菌（ 1×10^5 ccu/mL）による刺激前と刺激後1及び4時間後の遺伝子発現の変化をマイクロアレイ（ブタ完全長cDNA配列及びNCBI RefSeqに基づき作製）を用いて検討したところ、QTL領域を抵抗型・感受型それぞれのホモ型で保有する個体群間では、刺激前で15個、刺激後1、4時間後でそれぞれ27、52個の遺伝子で3倍以上の発現差が確認された。感受型をホモ型で保有する個体は、インターフェロン応答と関連する分子や、白血球誘導に関与する分子をコードする遺伝子の発現が上昇する傾向が見られた（図3）。

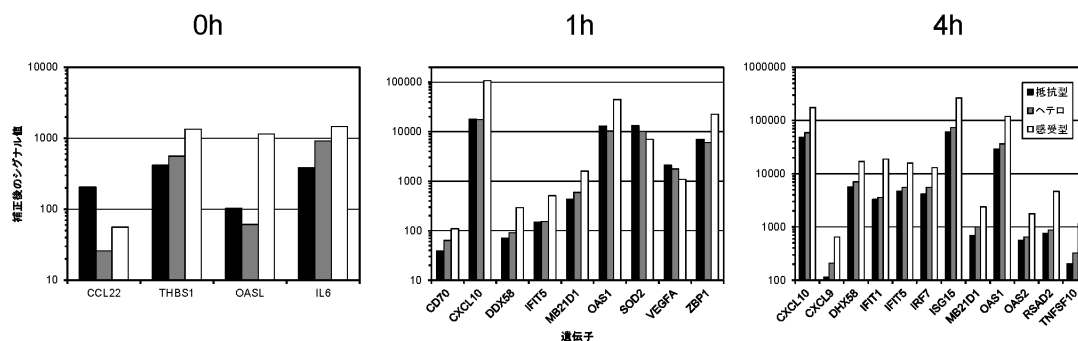


図3. 肺炎QTLの抵抗型・感受型間で腎臓マクロファージの遺伝子発現に3倍以上の差が見られた遺伝子。Mhp刺激前、1・4時間後の細胞でGene Ontologyで免疫応答に関連しているとされた遺伝子 (GO:0002376) のみを示す。

E) MPS スコアを指標に選抜を行った豚集団の交配による後代の肺炎抵抗性改善

MPS 病変面積を少なくする方向に改良したランドレース種系統豚（ミヤギノ L2）について、他品種との交雑個体を、非選抜ランドレース種を用いた交雑個体と比較したところ、ミヤギノ L2 を用いた場合に有意に MPS スコアが低くなる結果を得た。さらに、肺病変以外の養豚経営において重要とみられる経済形質に与える影響について調査を行ったところ、ミヤギノ L2 の後代で、単価に関わる「格付け等級」が向上する傾向がみられ、さらに内臓代に関わる内臓疾病罹患率も低下する傾向がみられた（表 3）。このことから、抗病性の改善により衛生コストの低減以外の要因も含めた経営改善が図れる可能性が示唆された。

表3. 宮城県畜産試験場の豚群及び一般農家からの出荷豚の格付け等級及び内臓検査のミヤギノL2導入前との比較結果。宮城畜産試験場内の結果についてはMPSによる肝変化病変を示さなかったものについて示す。*印は有意差 ($P<0.05$) を示したものの、それ以外は傾向を示したものを表す。D：デュロック種；W：大ヨークシャー種 複数の記号は交雑を示す。

	宮城県畜産試験場				一般農家
	ミヤギノL2 (La)	LaD	LaDD	LaW	LaWD
格付け等級	↑ *	↑		↑	↑
肺		↓ *			
内臓検査 肝	↓ *				↓ *
腸	↓ *				↓ *

3) 成果活用における留意点

本課題においては、PMWS 及びマイコプラズマ性肺炎（MPS）に関して感受性と関連を有するゲノム領域を複数の品種において検出することができた。これらのゲノム領域中の SNP について、抗病性改善のためのマーカーとしての活用が期待される。複数の品種、あるいは複数の形質（PMWS 及び MPS）で共通に関連性が検出された領域については、汎用性の高い抗病性改良マーカーとしての活用が期待されるが、集団・形質を超えて共通な特定の SNP が利用可能かどうかについては、さらなる検証が必要になると考えられる。

抗病性の改善については、当該集団での疾病に対する抵抗性の向上にとどまらず、他品種・他集団と交配して生産した後代においても抗病性の向上が観察されている。さらに、抗病性の向上が、生産性・肉質等の向上にもつながることが明らかになってきており、抗病性改良 DNA マーカーが、単なる疾病対策コストの低減にとどまらない効果を持つことを示していることは非常に重要である。

4) 今後の課題

疾病と関連するゲノム領域について、集団への導入等を通じて、抗病性のみならず繁殖性・成長性等の生産性や、肉質等についても改善効果が見られることを実際の飼養集団で示すことで、抗病性を指標にした豚の育種改良の重要性がより強く認識されるものと考えられる。また、複数の品種・形質で検出された疾病と関連するゲノム領域について、その構造を詳細に明らかにして、共通な SNP マーカーを抽出することにより、より汎用性の高い抗病性改良マーカーを作出することができると想定される。さらに、豚の感染症については新たなもの、あるいは強毒化したものが毎年のように出現しており、これらに対して、免疫能を向上させることにより広く抵抗性を有する育種が可能かどうかについても今後検討していく必要がある。

平成 28 年度 「DNA マーカー育種の高度化のための技術開発」 最終年度報告書

中課題番号: 11105377

研究期間: 平成 24～28 年度

中課題名: DNA マーカー育種の高度化のための技術開発 (AGB)

小課題番号: AGB1002

研究期間: 平成 24～28 年度

小課題名: 免疫系遺伝子の多様性と抗病性との関連の解明

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農研機構 生物機能利用研究部門・動物機能利用研究領域・動物生体防御ユニット・上西博英

共同研究機関・研究室・研究者名等: 農研機構 生物機能利用研究部門・動物機能利用研究領域・動物生体防御ユニット・竹之内敬人、農林水産先端技術研究所・畜産研究部・両角岳哉、農林水産先端技術研究所・畜産研究部・土岐大輔、農研機構 動物衛生研究部門・病態研究領域・繁殖障害ユニット・吉岡耕治、農研機構 畜産研究部門・飼養管理技術研究領域・飼料調製ユニット・遠野雅徳、静岡県畜産技術研究所・中小家畜研究センター・養豚・養鶏科・柴田昌利、静岡県畜産技術研究所・中小家畜研究センター・養豚・養鶏科・寺田圭、静岡県畜産技術研究所・中小家畜研究センター・養豚・養鶏科・塩谷聡子、静岡県畜産技術研究所・中小家畜研究センター・養豚・養鶏科・大竹正剛、農研機構 生物機能利用研究部門・動物機能利用研究領域・動物生体防御ユニット・新開浩樹、農研機構 動物衛生研究部門・細菌・寄生虫研究領域・腸管病原菌ユニット・秋庭正人、農研機構 動物衛生研究部門・病態研究領域・病理ユニット・芝原友幸、農研機構 動物衛生研究部門・細菌・寄生虫研究領域・細胞内寄生菌ユニット・江口正浩

1) 研究目的

免疫系遺伝子の多型性は、各種の感染症を引き起こす病原体を認識し免疫応答を誘導する能力に直接影響を与えるとともに、ストレス負荷時の生理学的応答も左右し、家畜の生産性に大きな影響を与える。本課題では、これらの抗病性やストレス応答に深い関係を有する免疫系遺伝子として、パターン認識受容体やそのシグナル伝達分子、また炎症性サイトカイン等の液性因子、さらにそれらの転写調節に関わる因子をコードする遺伝子に着目して、その遺伝的多様性と抗病性等との関連についての研究を行った。

病原体は、一般的には、細菌やウイルスにコードされたタンパク質の断片（ペプチド）が宿主の T 細胞に提示され、抗原特異的な免疫反応を誘導している。しかしながら、実際には細菌細胞膜に由来する物質、あるいは細菌ゲノム DNA や、ウイルスゲノムに由来する RNA、DNA 等の病原体に由来する分子が、T 細胞応答を含む効率のよい免疫反応の誘導に必要であることが知られていた。この実態については長らく不明であったが、近年の研究により、自然免疫系、特にパターン認識受容体（PRR）と呼ばれる一群の分子による、これら病原体に由来する物質の分子パターン（PAMP）の認識と、それに伴う免疫反応の誘導がその実態であることが明らかになってきている。さらに、PRR やそのシグナル伝達分子の多型性が、疾病に対する感受性に大きな影響を与えることがヒトやマウスの研究で明らかとなっている。PRR 及び PRR からのシグナルを伝達する分子には豚の集団中에서도高い多型性が残存しており、感染症に対する抵抗性がこれに左右されることが考えられる。これらの多型性を利用することにより、抗病性の高い個体の育種が可能であると考えられた。また、炎症性サイトカイン等の遺伝子のコード領域やプロモータ領域の多様性も、高度に効率性が追求された現代の飼養環境下におけるストレスに対する応答の個体差を規定していることが想定されていた。

そこで、本課題では、病原体由来分子パターン（PAMP）を認識するパターン認識受容体やそのシグナル伝達分子、MHC 等の抗原提示分子、またサイトカイン等のストレス関連分子や転写調節因子等について、コード領域、発現調節領域での多型性を明らかにし、検出された多型の病原体認識能等の機能や発現量等に与える影響を *in vitro* で検証するとともに、感染試験、ストレス負荷試験により、生産性を向上させるための遺伝子マーカーの開発を目指した。

2) 研究成果

A) TLR5 多型の下痢抵抗性育種マーカーとしての効果

ブタの *TLR5* 遺伝子コード領域中に、*TLR5* のリガンド（鞭毛タンパク質であるフラジェリン）の認識能を低下させる変異（C1205T；C：通常型／T：感受型）がランドレース種で広範囲に分布している（Shinkai et al., *Mol. Immunol.* 48:1114-1120, 2011）。

そこで、SPF 離乳子豚個体に *Salmonella* Typhimurium (ST) (L-3569 株) の経口感染を行い、感染後の病態の変化等の検討を行った。発熱の期間は TT 型で最も長く持続し、直腸スワブ中の ST の生菌数は CT 型と TT 型において CC 型に比べて有意に多くなった（図 1）。試験期間中の平均下痢スコアについても CT 型と TT 型において CC 型に比べて高い値を示した（図 2）。炎症マーカーである血清中のハプトグロビン濃度についても感染後 1 週間まで増加し、増加の程度は $CC < CT < TT$ の傾向であった（図 3）。さらに、試験期間中及び 1 日あたり増体重は感染群で低下し、中でも TT 型で最も低かった（表 1）。これらの結果から、*TLR5* 遺伝子中の多型（C1205T）がサルモネラ菌感染に対する感受性を改善するためのマーカーとして利用可能であることが明確に示された。C1205T 多型はランドレース種にのみ観察されるが、例えばヘテロ型であっても排菌量等で不利であることも明らかとなり、交雑種であることが多い肉豚の抗病性を改善するためにも有用であると考えられる。

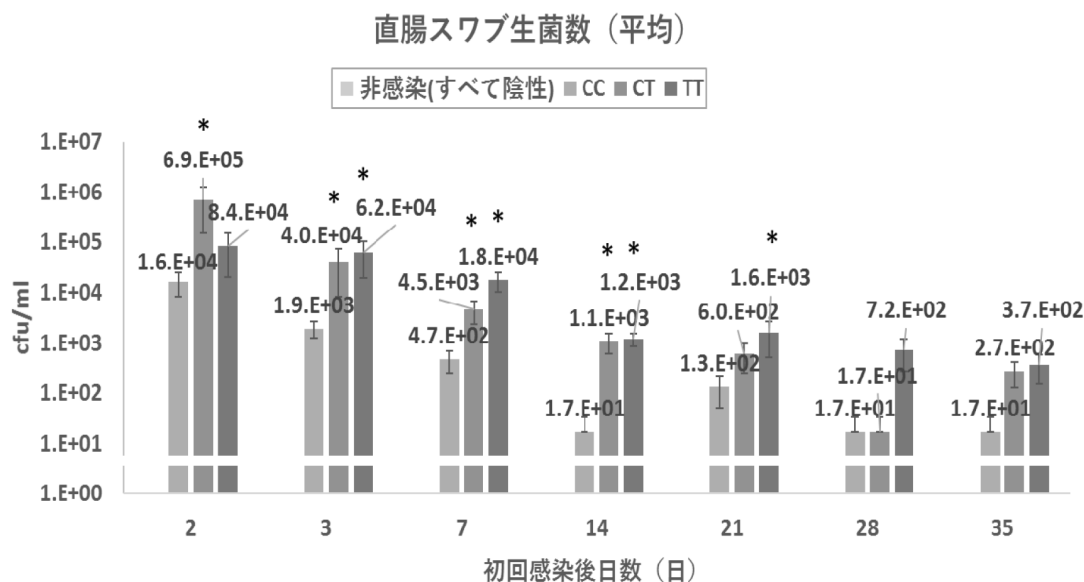


図1. 感染後の直腸スワブ中のST生菌数の推移。*は通常型（CC）と比較して有意差を示すものである（ $P < 0.05$ ）。

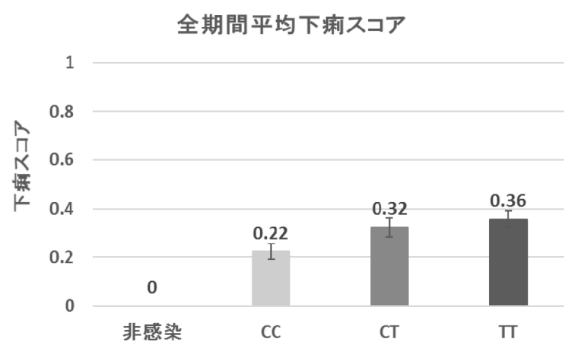


図2. 試験期間中の各豚群の下痢スコア。
0：通常便、1：軟便、2：下痢便、3：水様性
下痢とし、各群の平均値を示す。

表1. 各試験群の豚の体重データ。

試験群	入荷時 体重 (kg)	解剖時 体重 (kg)	試験期間 増体重 (kg)	一日あたり 増体重(g)
非感染	9.3±1.2	24.9±2.6	15.6±1.5	380.5±61.4
CC	8.2±0.9	21.0±2.0	12.8±1.1	312.6±67.7
CT	8.9±1.2	21.6±2.4	12.8±1.3	311.0±75.9
TT	9.9±1.1	21.6±1.8	11.6±1.2	283.7±71.2

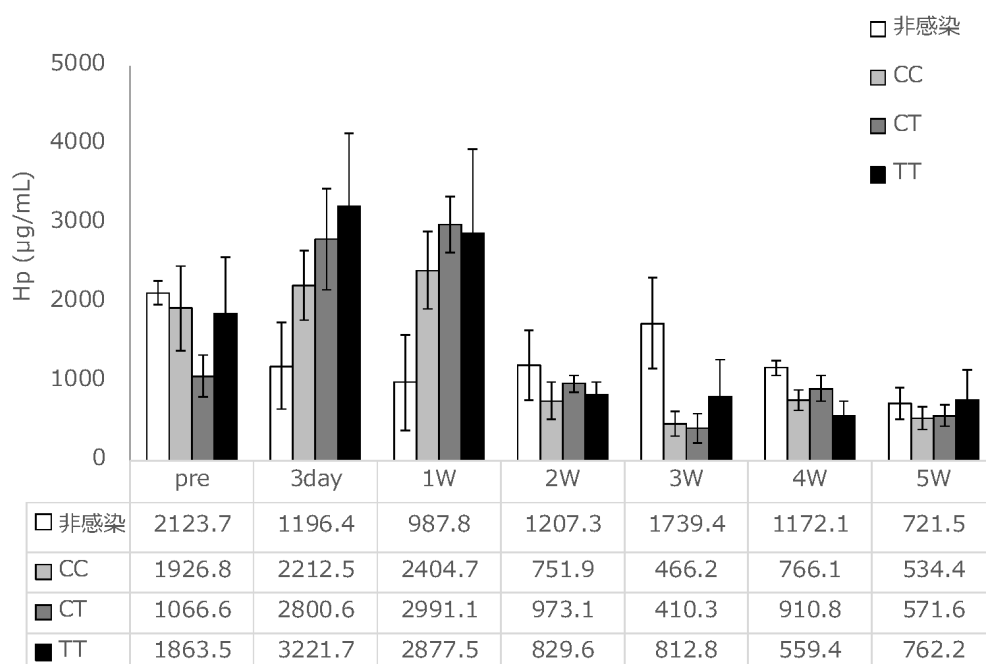


図3. 各感染試験豚群の血清中ハプトグロビン濃度の推移。ヘモグロビンバインディング
アッセイにより測定した値を示す。

B) NLRP3 多型のワクチン効果増進マーカーとしての効果

NLRP3 はインフラマソームと呼ばれる細胞内で炎症反応に関与することで知られる分子集合体の構成要素であり、ATP や結晶等、様々な外界由来の刺激に対する応答を惹起し、アジュバントによる免疫系の賦活化等を通じてワクチンの有効性にも関与することが知られている。国内で供用されている主要 4 品種（ランドレース・大ヨークシャー・デュロック・バークシャー）及び東洋品種（金華豚）、ニホンイノシシそれぞれ 16 頭ずつを用いて多型解析を行ったところ、*NLRP3* 遺伝子コード領域中でアミノ酸配列に影響を与える SNP は 6 個であった。これらの内 A2906G（アミノ酸では Q969R）の変異が機能を昂進させることを明らかにした（図 4）。さらに、大ヨークシャー種集団で *Actinobacillus pleuropneumoniae*（APP）による豚胸膜肺炎及び *Haemophilus parasuis*（HPS）に

よるグレーサー病の不活化ワクチン接種時の血清中抗体量を測定したデータ及び *NLRP3* の遺伝型との相関の検討を行ったところ、APP 血清型 2 型、及び HPS 血清型 2 型及び 5 型での抗体応答が、*NLRP3* の機能昂進型（2906G）において有意に上昇することが確認された（図 5）。このことから、*NLRP3* 遺伝子に注目したワクチン応答を向上させる品種改良の可能性が示唆された。

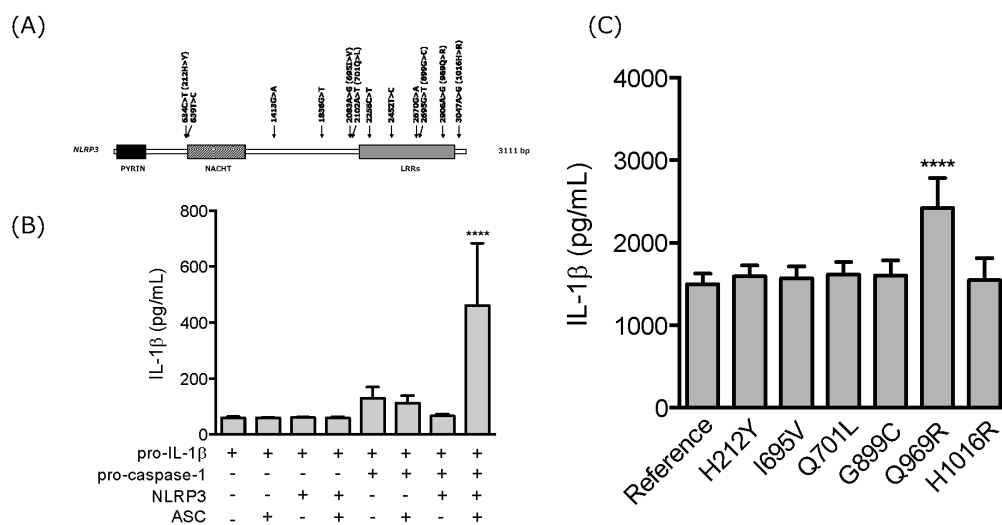


図4. ブタでNLRP3で検出されたアミノ酸置換を伴う多型の機能に与える影響。(A) ブタNLRP3遺伝子で検出された多型。東洋品種（金華豚）、ニホンイノシシを含む48頭で11箇所の変異が検出され、うち6箇所がアミノ酸置換を伴うものであった。(B) NLRP3の機能検証を行う解析系の構築。ヒトHEK293細胞にNLRP3及びNLRP3を含むインフラマソームの構成分子、さらにIL-1βの前駆体をコードする遺伝子を共導入することによりNLRP3の機能を検証する解析系の構築を行った。(C) ブタNLRP3で見られたアミノ酸置換の機能に与える影響。すべてのアミノ酸置換を伴うNLRP3の多型を導入した発現ベクターを設計し、(B)で構築した解析系により多型の機能に与える影響を検討したところ、Q969Rの変異のみが有意に機能を昂進させることが明らかとなった。（****, $P < 0.0001$ ）

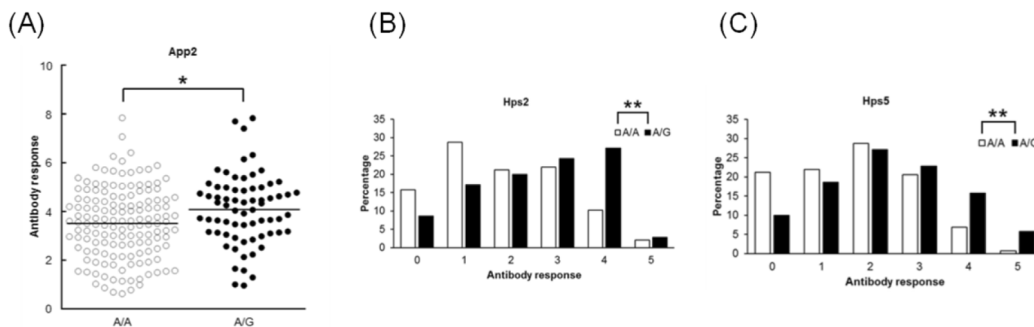


図5. *NLRP3*の機能昂進型（2906G）をヘテロ型で有する個体と、それ以外のものとのワクチン接種時の抗体応答の比較。APP血清型2型（A）、HPS血清型2（B）・5型（C）について2906G型を保有する場合に抗体応答の有意な上昇が確認された。

C) MX1 多型と PRRS ウイルス増殖との関連

ブタの抗ウイルス遺伝子である MX1 には、コード領域の 3' 末端に 11-bp の欠損を有する遺伝型 (*MX1^c*) が存在し、マウスの細胞に導入した際に、一般的な遺伝型（通常型：*MX1^a*）と比較して

インフルエンザウイルス増殖抑制能が著しく低下することが既に明らかになっている (Nakajima et al., *Biochem. Genet.* 45:11-24, 2007)。MX1^a・MX1^c をヘテロ型で有する個体どうしの交配から作出した子豚の腎臓からマクロファージを調製して PRRS ウイルスを感染させ、細胞内及び培養上清中のウイルス量の検討を行ったところ、MX1^{a/a} の遺伝型のマクロファージでは細胞内及び上清中のウイルス量が低減する傾向を示した (図 6)。

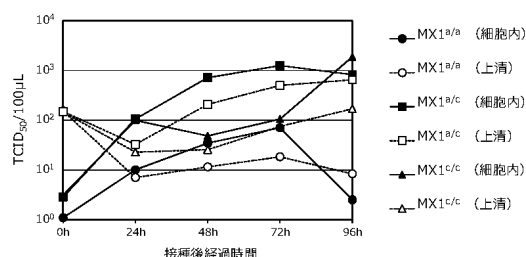


図6. MX1の遺伝型が異なる個体由来のマクロファージにPRRSウイルスを感染させた際の細胞内及び培養上清中のウイルス量。1×10⁵ TCID₅₀/100μLのEDRD1を細胞に感染させ、細胞内及び上清中のウイルス量を定量PCRにより測定した。

D) その他のパターン認識受容体多型と病原体等の認識能との関連

ペプチドグリカンの構成要素を認識し、全身の免疫に影響を与えることが想定されている NOD1 をコードする遺伝子のブタにおけるアミノ酸置換を伴う多型と、そのリガンド認識に与える影響について解析を行い、NOD1 分子の G641E、D918N (塩基配列では G1922A、G2752A) の 2 つのアミノ酸多型がリガンド認識を顕著に低下させることを明らかにした (図 7)。また、真菌の認識、特に真菌由来の β-グルカンを認識し、食細胞活性等の宿主の免疫応答を誘導する Dectin-1 をコードする遺伝子 (*CLEC7A*) について、その多型が分子機能に与える影響について検討を行ったところ、一つの多型 (L138S; 塩基配列では T413C) が有意に認識を昂進させることが判明した (図8)。

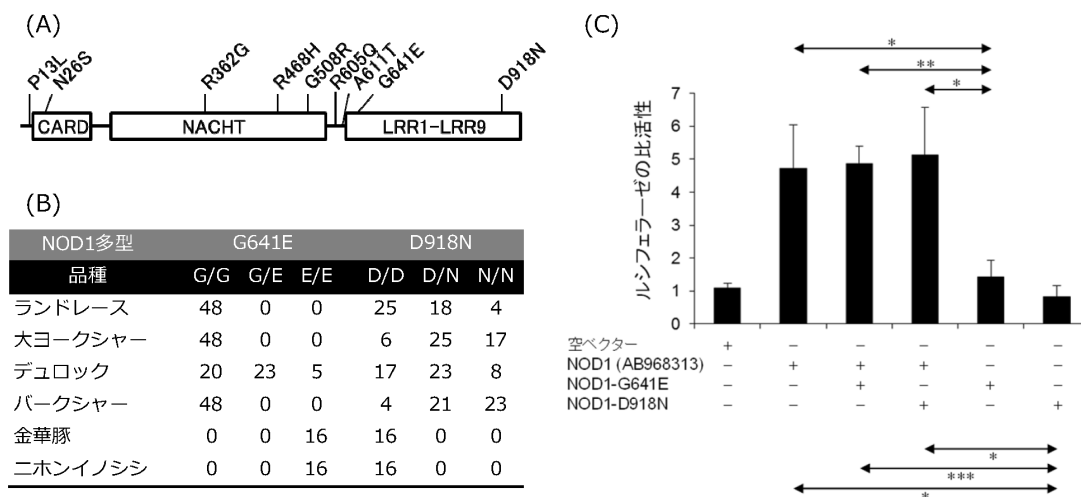


図7. リガンド認識に影響を与えるブタNOD1アミノ酸多型の効果。(A) ブタNOD1で検出されたアミノ酸多型。ロイシンリッチリピート (LRR) に存在する2つの多型がリガンド認識を有意に低下させることが明らかとなった。(B) リガンド認識に影響を与える多型のブタ各品種及びニホンイノシシにおける分布。(C) ブタNOD1の正常型 (最も広く見られる遺伝型)、機能欠損型 (G641EあるいはD918N) をコードする発現ベクターをHEK293細胞に共導入し、正常型との差をレポーターアッセイで検証した。共導入する際は発現ベクター量を半量とした。(*, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$)

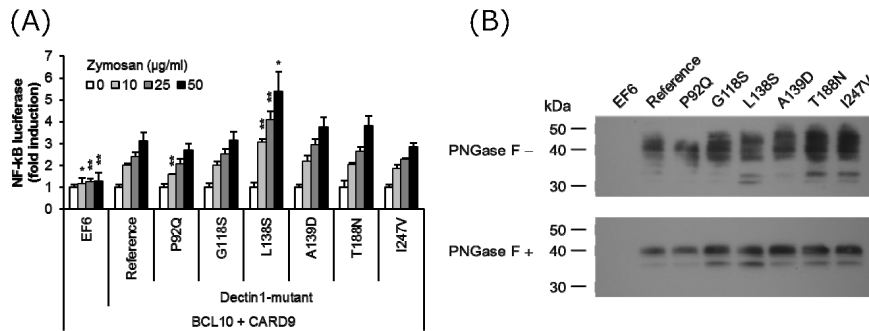


図8. Dectin-1 (*CLEC7A*) の多型がβ-グルカンの認識に与える影響。(A) 多型を含む*CLEC7A*発現ベクターの、HEK293細胞へのCARD9、*BCL10*遺伝子との共導入によるレポーターアッセイで多型の影響を検討した。L138Sの多型がβ-グルカンによる刺激後のNF-κB誘導を昂進させることが判明した。(B) 各*CLEC7A*発現ベクターによるタンパク質の発現。多型そのものはタンパク質発現に大きな影響を与えないものと考えられた。糖鎖を分解処理しなかったもの (PNGase F-)、したもの (PNGase F+) を示す。

3) 成果活用における留意点

免疫系遺伝子の病原体認識という観点から抗病性マーカーを探索する試みについて、個体レベルで明確な効果を示すものを複数提示することができた。下痢等のサルモネラ感染に影響を与える TLR5 については、ランドレース種でのみ多様性のある多型であるものの、ヘテロ型においても抗病性に影響を与えることが示されており、交雑種として生産されることの多い肉豚においても意義の大きなものと考えられる。サルモネラ菌以外の鞭毛を有する細菌の感染にも影響を与える可能性があり、応用性についても期待が大きい。一方、ワクチン効果に影響を与えることが示された NLRP3 については、広く西洋品種で多様性が確認されており、品種を問わない有効性が期待される。

上記の他に、病原体認識や応答に影響を与える豚の免疫系遺伝子多型がいくつか確認されており、今後も免疫系遺伝子の多型に着目した抗病性マーカーの開発が期待されるところである。

4) 今後の課題

TLR5 多型等の抗病性マーカーについて、多型の与える影響を、実際の飼養集団において、サルモネラ菌感染による下痢等だけでなく、他の鞭毛を有する細菌の感染症に対する効果や、生産性や肉質等、経済的な側面からの成績向上に与える影響も含めて検討を行うことで、抗病性マーカーの養豚経営改善効果を検証することが重要である。また、総合的に免疫能を向上させることによる抗病性の改善についても検討する必要があると考えられ、そのような観点からの免疫系遺伝子の多型の活用についても考慮することが望ましい。また、純系の品種よりも複数の品種間での交雑豚の方が一般に抗病性は高い傾向にあり、そのような一種の雑種強勢についても今後の検討対象となり得ると思われる。いずれにしても、ゲノム DNA、家系情報と、疾患関連のみならず他の生産性・肉質等の経済形質をシステムティックに収集し、免疫系遺伝子の多型や SNP マーカーとの関連について調査を行うことで、これまでに開発した抗病性マーカーの有用性を実証するとともに、新たな改良指標の作出も期待されるものと考えられる。

平成 28 年度 「DNA マーカー育種の高度化のための技術開発」 最終年度報告書

中課題番号: 11105377

研究期間: 平成 24～28 年度

中課題名: DNA マーカー育種の高度化のための技術開発 (AGB)

小課題番号: AGB1003

研究期間: 平成 24～28 年度

小課題名: ウイルス受容体分子の探索、多様性解析と抗病性との関連の解明

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農研機構 動物衛生研究部門・ウイルス・疫学研究領域・発病制御ユニット・大橋誠一

共同研究機関・研究室・研究者名等: 農研機構 動物衛生研究部門・ウイルス・疫学研究領域・豚ウイルスユニット・高木道浩、農研機構 動物衛生研究部門・ウイルス・疫学研究領域・疾病防除基盤ユニット・井関博、農林水産先端技術研究所・畜産研究部・両角岳哉、農林水産先端技術研究所・畜産研究部・鈴木恒平、農林水産先端技術研究所・畜産研究部・土岐大輔、日本ハム株式会社・中央研究所・高萩陽一、日本ハム株式会社・中央研究所・藤村達也、農研機構 生物機能利用研究部門・動物機能利用研究領域・動物生体防御ユニット・上西博英、農研機構 生物機能利用研究部門・動物機能利用研究領域・動物生体防御ユニット・新開浩樹

1) 研究目的

養豚農場の大規模化が急速に進む一方、ウイルス性消化器病や呼吸器病による病傷事故件数が急激に増大しており、その経済的被害は甚大である。しかしながら、まだこれらの疾病に対する有効な制御法はほとんどない。近年、ブタゲノム情報の蓄積や遺伝学的解析ツールの整備・充実に伴い、育種・改良に応用できる有用形質遺伝子の機能解析が可能となった。そこで、豚の下痢あるいは肺炎ウイルスに対する抗病性に優れた家畜を育種・改良することを目標に、現在農場内で問題となっているブタロタウイルスあるいは豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) ウイルスについてそれぞれの受容体分子を探索し、それら受容体における遺伝子多型とウイルス結合能との関連性を解析して、それぞれの疾病における抗病性有用マーカー遺伝子を見出す。

2) 研究成果

ブタロタウイルスの培養細胞感染系を用いて、他の哺乳動物由来ロタウイルスと同様に、インテグリン ($\alpha 2 \beta 1$ 、 $\alpha 4 \beta 1$) が本ウイルスの受容体分子の一つとして機能していることを明らかにした。これらインテグリンサブユニット ($\alpha 2$ 、 $\alpha 4$ 、 $\beta 1$) 遺伝子について、次世代シーケンサーを用いて、ブタ主要 4 品種間 (ランドレース、大ヨーク、デュロック、バークシャー種) における遺伝子多型を検索した結果、 $\alpha 2$ サブユニットではエクソン内に 9 箇所の非同義置換、 $\alpha 4$ サブユニットではエクソン内に 2 箇所の非同義置換が検出されたが、 β サブユニットでは非同義置換は検出されなかった。インテグリンサブユニット ($\alpha 2$ 、 $\alpha 4$) について、野生型および変異型 (非同義置換を有する) タンパク質を発現するベクターを構築し、それぞれのタンパク質を哺乳細胞で強制的に発現させたのちにブタロタウイルスを感染させ、ウイルスの結合能 (感染効率の相違) を蛍光免疫法で比較・解析した。その結果、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 4$ サブユニット共に、ブタ主要品種間の遺伝子多型に伴うアミノ酸の変異はブタロタウイルスの結合能にほとんど影響を及ぼさなかった。したがって、ブタロタウイルスの受容体分子の一つであるインテグリンはウイルス抗病性育種のためのマーカー遺伝子として有用でないことが示唆された。

PRRS ウイルスの受容体である CD163 分子において 21 箇所の非同義置換を明らかとした。これらの内、PRRS ウイルスとの結合に重要とみられる 11 箇所について発現ベクターを構築し、細胞での発現を確認できた。しかし、豚由来株化細胞 (豚腎臓由来 CPK、PK15) においても発現は確認されたが、PRRS ウイルスは細胞内で増殖しなかった。さらに、他の受容体 SIGLEC-1 の多型数は、ランドレースが 22 箇所、大ヨークが 10 箇所、デュロックが 21 箇所、バークシャーが 22 箇所であった。また、PRRS ウイルス感染初期にウイルスおよび CD163 mRNA の発現は増加したが、単球数や

CD163 陽性細胞数の減少、その後は、ウイルス株間によって違いが見られた。

3) 成果活用における留意点

特になし。

4) 今後の課題

通常、ウイルスの受容体分子は一つでないことが多いことから、インテグリン以外のブタロタウイルス受容体分子を探索し、同様にその有用性について検討する。場合によっては、それら受容体分子に対して同時に変異を導入し、相互作用に伴うウイルス結合能を評価して、有用性を検討する。ウイルス受容体分子の変異に伴う侵入の阻害ではなく、自然免疫や免疫細胞の活性化など体内に侵入した後のウイルスの増殖制御を視野に入れた抗病性有用性マーカーの探索に取り組む。ウイルス構造タンパク質における受容体分子結合領域、受容体分子におけるウイルスタンパク質結合領域を決定し、それらの領域を制御あるいは阻害する方法を模索・検討する。

PRRS ウイルス構造タンパク質の発現に時間を費やしたが、発現が確認されたことから CD163 変異体との結合部位、結合能について解析を続けていく予定である。また、ウイルス感染初期に CD163 mRNA の発現が増加したことからウイルスが何らかの制御に関与していることが示唆されるため、今後解析をする必要がある。

平成 28 年度 「DNA マーカー育種の高度化のための技術開発」 最終年度報告書

中課題番号: 11105377

研究期間: 平成 24～28 年度

中課題名: DNA マーカー育種の高度化のための技術開発 (AGB-S)

小課題番号: AGB-S1004

研究期間: 平成 24～26 年度

小課題名: 抗病性遺伝子機能解析のための解析システムの構築とその利用

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農業生物資源研究所・動物科学研究領域・動物生体防御研究ユニット・木谷裕

共同研究機関・研究室・研究者名等: 農業生物資源研究所・動物科学研究領域・動物生体防御研究ユニット・竹之内敬人、農業生物資源研究所・動物科学研究領域・動物生体防御研究ユニット・佐藤充、農業生物資源研究所・農業生物先端ゲノム研究センター 兼 動物科学研究領域・家畜ゲノム研究ユニット 兼 動物生体防御研究ユニット・上西博英、農業生物資源研究所・動物科学研究領域・動物生体防御研究ユニット・新開浩樹

1) 研究目的

急速に解明されつつある家畜ゲノム情報を活用して、感染初期に発動される自然免疫系の分子機構を解明することは、優れた抗病性を持つ品種の育成や宿主の免疫応答能を考慮した効果的なワクチン開発などにつながる。これまでに明らかにされたブタゲノム塩基配列情報を利用して、抗病性関連遺伝子におけるゲノム多様性が検索され、培養細胞系を用いた機能解析も精力的に行われている。ところが、対象となる動物種（ブタ）において抗病性遺伝子の機能解析に利用可能な培養細胞系は、まだほとんど開発されていない。本研究においては、対象動物種であるブタに由来する初代培養細胞及びその不死化細胞株などの細胞生物学的ツール開発を目指した。

2) 研究成果

A) ブタ肝細胞の混合培養系の作出とマクロファージの増殖・単離・特性解析

新生豚（生後 1～2 日目）の肝臓全体を取り出し、ラットで用いられる手法に準じてコラゲナーゼ溶液の灌流・細胞分散を行い、低速遠心により肝実質細胞分画を得た。細胞は 10% ウシ胎児血清（FCS）を含む DMEM 培地に懸濁し、培養フラスコへ播種した。培養開始 1 週間後には肝細胞は線維芽様細胞へと形態変化してシート状となり、その上でマクロファージが活発に増殖する混合培養系が形成された。培養フラスコを振とうして細胞を浮遊させた後、ディッシュへの強い付着性を利用してマクロファージを選択的に回収した。フラスコには新しい培地を添加して混合培養を継続した。

ブタ肝細胞の混合培養系において、約 2～3 週間にわたり、同じ培養フラスコからマクロファージ様細胞を繰り返して採取できた（図 1）。単離された細胞は培養マクロファージの形態を示し、ほぼ全ての細胞がマクロファージ特異的抗体（CD172a, Iba-1, KT022）により染色された。一方、サイトケラチン 18（CK18）や平滑筋アクチン（SMA）、デスミン（DES）に陽性の細胞はほとんど見出せず、肝実質細胞や間葉系細胞などの混入は極めて少ないと判断された（図 2）。FITC 蛍光色素標識マイクロビーズの貪食（図 3）、LPS 刺激による炎症性サイトカインの産生・放出（図 4）など肝臓マクロファージの特性が確認された。以上の結果から、ブタ肝実質細胞の混合培養を用いて高純度の肝臓マクロファージを簡便に効率よく、繰り返して単離することができた。

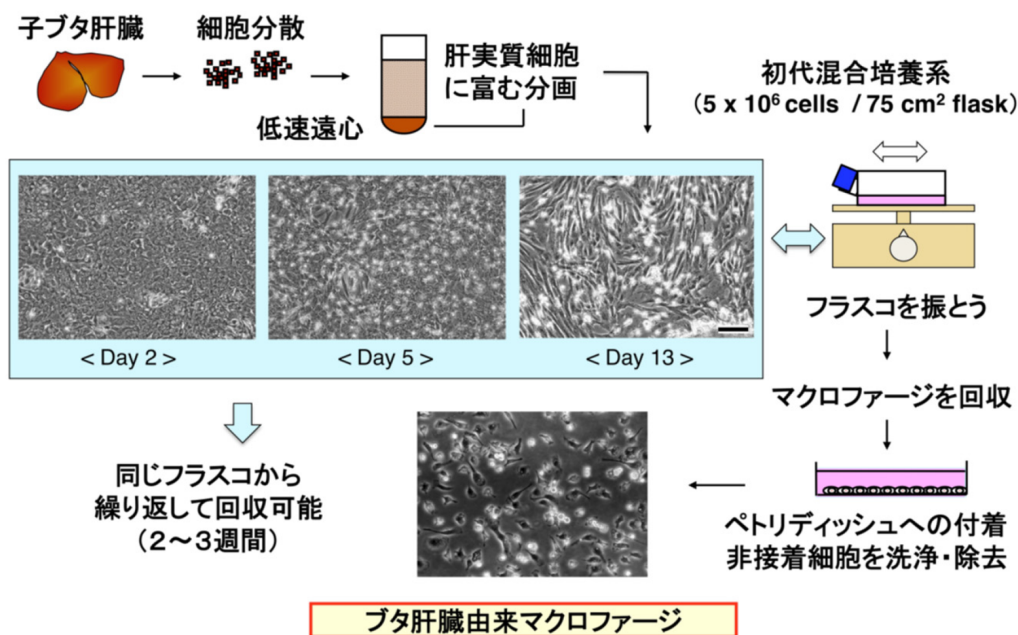


図1. ブタ肝細胞の混合培養系の作出とマクロファージの増殖並びに単離

培養開始1週間後には肝細胞は線維芽様細胞へと形態変化してシート状となり、その上でマクロファージが活発に増殖する混合培養系が形成された。培養フラスコを振とうして細胞を浮遊させた後、ディッシュへの強い付着性を利用してマクロファージを選択的に回収した。フラスコには新しい培地を添加して混合培養を継続した。

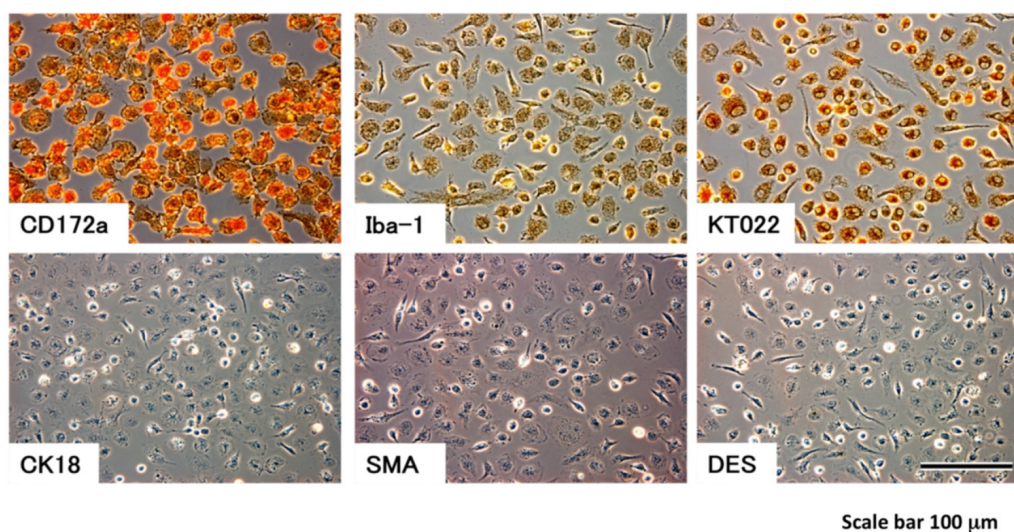


図2. ブタ肝臓由来マクロファージの免疫染色

ブタ肝細胞の混合培養系から単離された細胞は培養マクロファージの形態を示し、ほぼ全ての細胞がマクロファージ特異的抗体 (CD172a, Iba-1, KT022) で染色された。一方、サイトケラチン18 (CK18) や平滑筋アクチン (SMA)、あるいはデスミン (DES) に陽性の細胞はほとんど見出せず、肝実質細胞や間葉系細胞の混入は極めて少ないと判断された。Kitani, H. et al. (2014) *Results Immunol.* 4: 1-7より改変して引用。

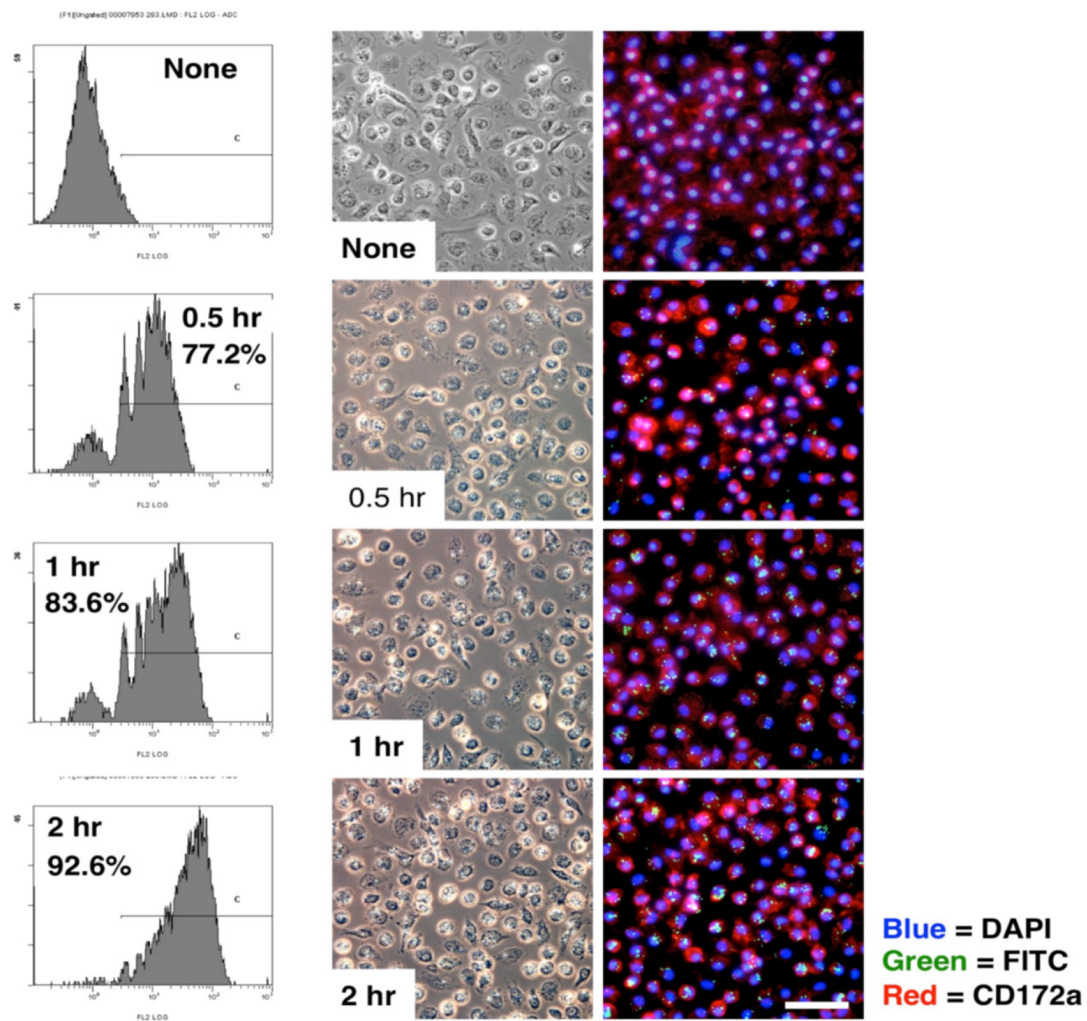


図3. ブタ肝臓由来マクロファージによるFITC標識マイクロビーズの取込
Kitani, H. et al. (2014) *Results Immunol.* 4: 1-7より引用。

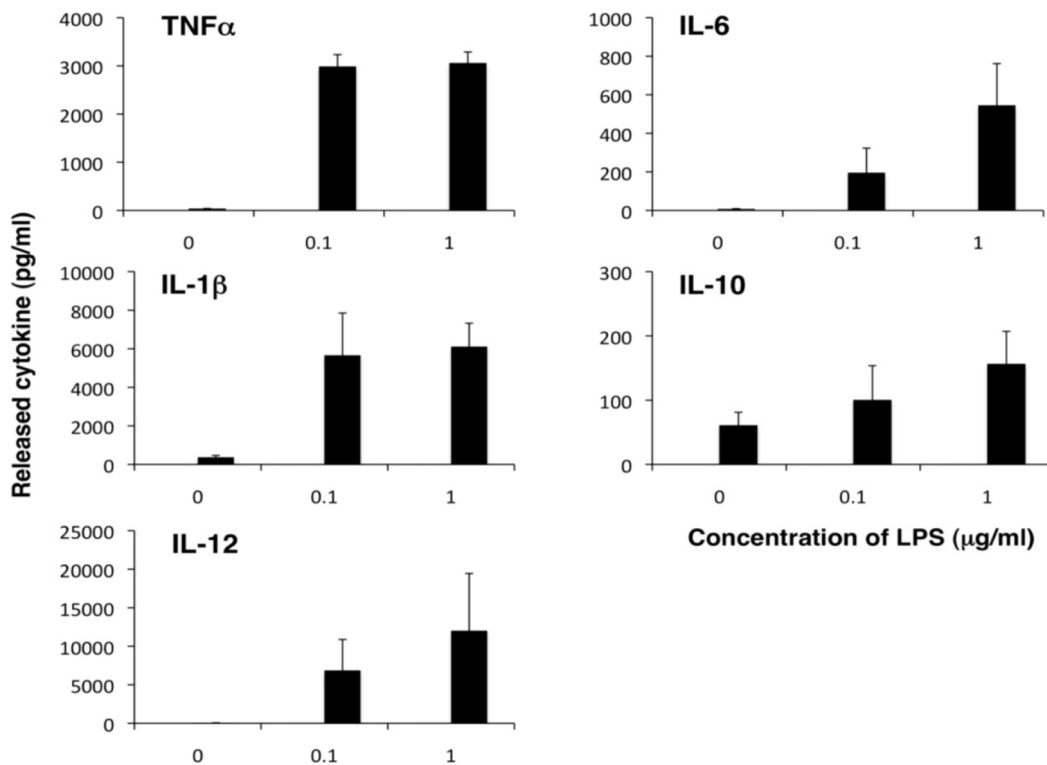


図4. リポポリサッカライド（LPS）で刺激したブタ肝臓由来マクロファージによる炎症性サイトカインの産生・放出

ブタ肝臓由来マクロファージをLPSで刺激し、24時間後に培養上清を回収して5種類のサイトカイン（TNFα、IL-6、IL-1β、IL-10、IL-12）の濃度をELISA法により定量した。Kitani, H. et al. (2014) *Results Immunol.* 4: 1-7より引用。

B) ブタ腎臓細胞の混合培養系の作出とマクロファージの増殖・単離・特性解析

新生豚（生後1～4日目）の腎臓組織を細切し、コラゲナーゼ・ディスペラーゼ溶液による消化と細胞分散を行い、低速遠心により腎系球体と尿細管からなる分画を得た。腎組織は10%FCSを含むDMEM培地に懸濁して、培養フラスコへ播種した。培養開始1日後には、上皮様の形態を示す腎組織細胞がフラスコ表面に広がり、線維芽様細胞とともに活発に増殖して一層の細胞シートを形成した。培養12日後には、その上でマクロファージが活発に増殖する混合培養系が形成された。培養フラスコを緩やかに振とうして細胞を浮遊させ、上記のようにマクロファージを選択的に回収した後、フラスコに新しい培地を添加して混合培養を継続した。

ブタ腎臓細胞の混合培養系において、約4～6週間にわたり、同じ培養フラスコからマクロファージ様細胞を繰り返して採取できた（図5）。肝臓に比べて、腎組織細胞の混合培養系はより安定的に維持され、マクロファージもより長期間にわたって採取可能であった。単離されたマクロファージはマクロファージ特異的抗体により染色されたが、CK18やSMAに陽性の細胞はほとんど見出せず、肝実質細胞や間葉系細胞などの混入は極めて少ないと判断された。また、FITC蛍光色素標識マイクロビーズの貪食、LPS刺激による炎症性サイトカインの産生・放出などマクロファージの特性も確認された。以上の結果から、ブタ腎臓組織細胞の混合培養を用いて、高純度の腎臓由来マクロファージを簡便に効率よく、また肝臓の場合に比べて、より長期間にわたり繰り返して単離することができた。

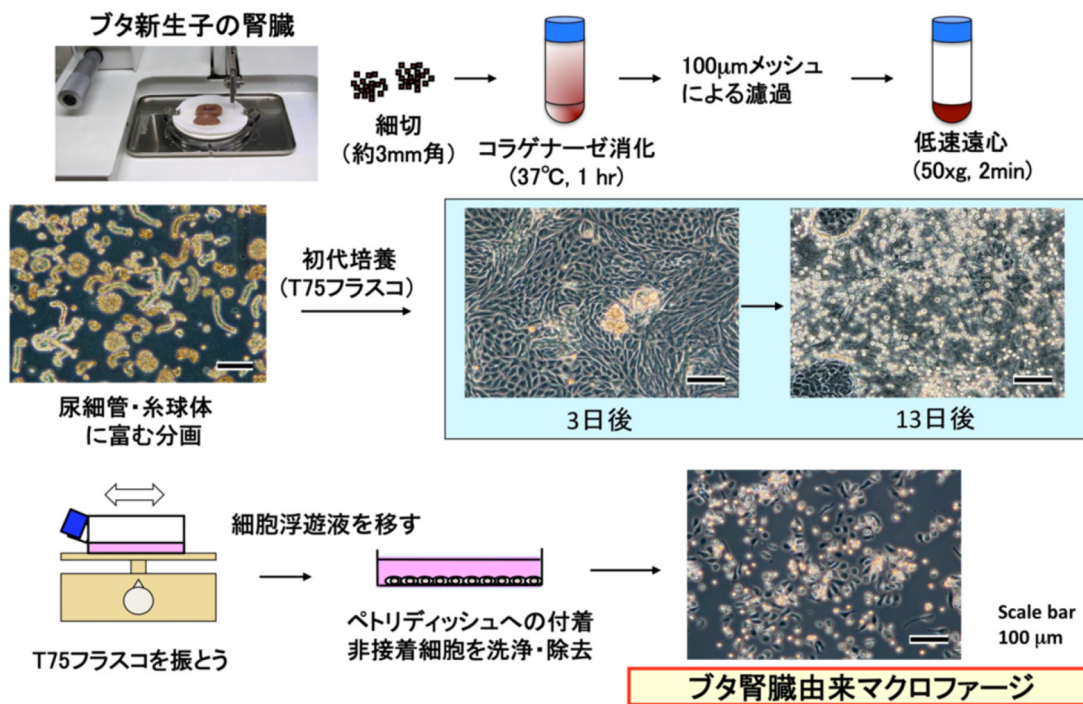


図5. ブタ腎臓細胞の混合培養系の作出とマクロファージの増殖並びに単離

新生豚の腎臓組織から腎糸球体と尿細管からなる分画を得て、培養フラスコへ播種・培養した。上皮様の形態を示す腎組織細胞がフラスコ表面に広がり、線維芽様細胞とともに活発に増殖して一層の細胞シートを形成した。培養12日後には、その上でマクロファージが活発に増殖する混合培養系が形成された。培養フラスコを緩やかに振とうして細胞を浮遊させ、マクロファージを選択的に回収した後、フラスコに新しい培地を添加して混合培養を継続した。

C) ブタ腎臓上皮系細胞を用いたブタ末梢血由来マクロファージ増殖系の作出

新生豚（生後4日目）の腎臓組織の初代培養系に対して、リポフェクション法でSV40T遺伝子を導入し、増殖性の高い上皮系細胞株（GL-9）を得た。GL-9細胞を播種した組織培養フラスコに成体ブタの末梢血を添加し、翌日に培養フラスコをリン酸緩衝生理食塩水で2～3回洗浄した後、培養を継続した。培養7～10日後には、GL-9細胞上でマクロファージが活発に増殖する混合培養系が形成された。培養上清中に浮遊しているマクロファージを回収し、上記のようにマクロファージを選択的に単離した。フラスコには新しい培地を添加して培養を継続し、増殖してくるマクロファージを2～4日おきに回収し、細胞学的特性を解析した。

ブタ腎臓上皮系細胞を支持細胞として用いた培養系において、約2ヶ月間にわたり、同じ培養フラスコから末梢血由来マクロファージを繰り返して採取できた（図6）。単離された末梢血由来マクロファージはマクロファージ特異的抗体により染色された一方で、CK18やSMAに陽性の細胞はほとんど見出せず、支持細胞として用いたGL-9細胞の混入は極めて少ないと判断された。単離された細胞はFITC蛍光色素標識マイクロビーズを貪食し、マクロファージの特性が確認された。以上の結果から、ブタ腎臓組織由来のGL-9細胞を支持細胞とした混合培養系を用いて、高純度の末梢血由来マクロファージを簡便に効率よく、また肝臓や腎臓などの場合に比べて、より長期間にわたり繰り返して単離することができた。

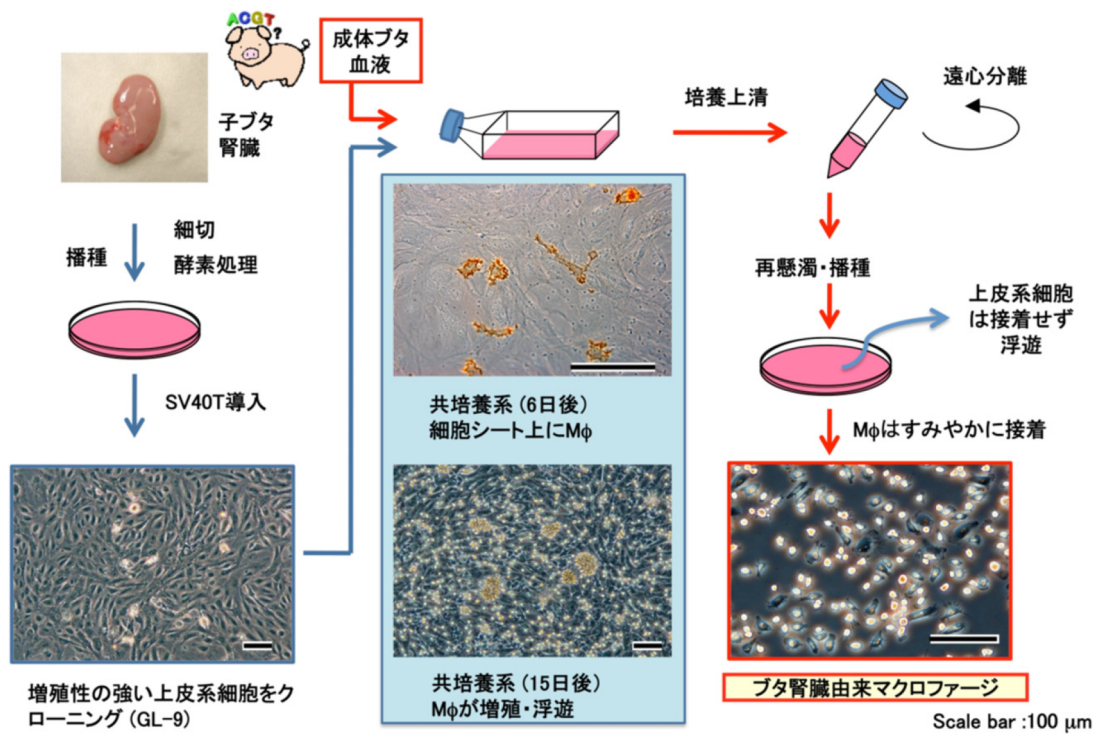


図6. ブタ腎臓上皮細胞を用いた血液由来マクロファージの増殖系の構築

SV40T遺伝子を導入したブタ腎臓上皮系細胞株（GL-9）を播種した組織培養フラスコに成体ブタの末梢血0.5mlを添加し、翌日にフラスコをリン酸緩衝生理食塩水で2～3回洗浄した後、培養を継続した。培養7～10日後には、GL-9細胞上でマクロファージが活発に増殖する混合培養系が形成された。培養上清中に浮遊してくるマクロファージを回収し、ディッシュへの強い付着性を利用してマクロファージのみを選択的に単離した。フラスコには新しい培地を添加して培養を継続した。

3）成果活用における留意点

担当者らはこれまでにラットあるいはウシの肝臓細胞の初代培養系において、上皮系あるいは間充細胞系細胞からなるシートの上にマクロファージが活発に増殖し、それらをプラスチックディッシュへの付着性の違いを利用して、簡便に効率良く単離できることを報告した。本研究課題においては、ブタの抗病性遺伝子の機能解析に利用可能なブタの培養細胞系の確立を目指して、これらの手法がブタ組織に適用できないかを検討した。その結果、ブタの肝臓や腎臓の細胞を材料とした混合培養系において、それぞれに高純度の肝臓由来、あるいは腎臓由来のマクロファージを簡便に、かつ繰り返して単離することができた。さらに、ブタ腎臓由来の不活化上皮細胞株を支持細胞として用いて、成豚の末梢血をごく少量培養したところ、この混合培養系において末梢血由来マクロファージが選択的に増殖してくることを見出した。肝臓や腎臓マクロファージの混合培養・増殖系に比較して、より長期間（約2ヶ月間）にわたり、末梢血由来マクロファージを繰り返し採取できた。末梢血を用いる場合には、対象とするブタを殺すことなく比較的容易に採取できる点が大きな利点といえよう。すなわち、抗病性に関わる遺伝子型が異なるブタから、この手法を用いてマクロファージを大量に増殖・単離し、それらの機能を細胞レベルで評価できるため、ブタの抗病性機能解析系として有用であると期待される。

4) 今後の課題

本研究課題において確立されたブタの組織マクロファージの効率的な増殖システムを利用して、抗病性に関わる遺伝子型が異なるブタからマクロファージを単離して、それらの機能を細胞レベルで評価する必要があるが、本プロジェクトにおいて AGB1002 で実際に活用された。またレンチウイルスベクターなどを用いた不死化遺伝子の導入により、ブタ組織マクロファージの不死化細胞株樹立を検討する必要があると考えられた。

平成 28 年度 「DNA マーカー育種の高度化のための技術開発」 最終年度報告書

中課題番号: 11105377

研究期間: 平成 24～28 年度

中課題名: DNA マーカー育種の高度化のための技術開発 (AGB)

小課題番号: AGB2001

研究期間: 平成 24～28 年度

小課題名: ブタの一腹当たり産子数に関連するゲノム領域の探索と DNA マーカーの開発

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農研機構 畜産研究部門・家畜育種繁殖研究領域・家畜ゲノムユニット・谷口雅章

共同研究機関・研究室・研究者名等: 農研機構 畜産研究部門・家畜育種繁殖研究領域・家畜ゲノムユニット・荒川愛作、全農畜産サービス株式会社・東日本原種豚場・AI センター・品質管理課・廣瀬健右、全国農業協同組合連合会・飼料畜産中央研究所・上士幌種豚育種研究室・普川一雄、全国農業協同組合連合会・飼料畜産中央研究所・上士幌種豚育種研究室・伊藤哲也、全農畜産サービス株式会社・ブリーディング事業部・技術課・二階堂聡、農林水産先端技術研究所・畜産研究部・両角岳哉、農林水産先端技術研究所・畜産研究部・鈴木恒平、農林水産先端技術研究所・畜産研究部・美川亜弓、家畜改良センター・企画調整部・改良技術課・佐藤周史、農研機構 畜産研究部門・家畜育種繁殖研究領域・有用遺伝子ユニット・小林栄治、東北大学・大学院農学研究科 資源生物科学専攻・家畜生産機能開発学講座・鈴木啓一、東北大学・大学院農学研究科 資源生物科学専攻・動物遺伝育種学・佐藤正寛、農研機構 畜産研究部門・家畜育種繁殖研究領域・家畜育種ユニット・岡村俊宏、農研機構 畜産研究部門・家畜育種繁殖研究領域・家畜育種ユニット・西尾元秀、全国農業協同組合連合会・飼料畜産中央研究所・上士幌種豚育種研究室・上川舞

1) 研究目的

ブタにおいては、一腹当たりの産子数は年間の育成頭数、生産頭数に大きく影響する形質であり、生産性向上において、その能力向上が必須である。現在の一腹当たりの育成頭数は、ランドレース (9.9 頭)、大ヨークシャー (10.0 頭)、デュロック種 (8.9 頭) であり、これを改良すべく家畜改良増殖目標においては、それぞれ平成 32 年までに 10.8 頭、10.9 頭、9.4 頭とすべく数値目標が掲げられている。しかしながら国内においては遺伝率がそれほど大きくないこともあり、改良の程度はランドレース種においてこの 20 年間で +0.6 頭と微増である。この間、海外においては大きな育種集団を用いることによって成果を出しているところもあり、育種改良は可能であると考えられる。そこで全国農業協同組合連合会 (JA 全農) 系列のランドレース種集団、および系統豚や民間種豚場の大ヨークシャー種集団から得られた産子数データを用い、ゲノムワイド相関解析等により、一腹当たり産子数に関連するゲノム領域の探索を行い、育種に有効な DNA マーカーを開発する。

2) 研究成果

東北地方を中心とした民間種豚場 4 社から、合計で 1 万を超える大ヨークシャー種母豚の繁殖成績および血縁情報を収集し、遺伝的能力の評価およびゲノムワイド相関解析のためのサンプル選択に活用した (表 1)。

表1 民間種豚場の大ヨークシャー種のサンプル数と産子数平均値

	A社	B社	C社	D社
個体数	3,296	5,202	1,470	974
SNPタイピング数	474	553	323	157
農場数	2	6	1	1
年月	18	16	15	20
産次	11	16	8	12
総産子数	11.34	11.32	11.84	11.16
生存産子数	10.09	9.5	9.52	9.98

このうち 1507 頭について SNP アレイを用いたジェノタイピングを行った。ゲノムワイド相関解析は、産次を考慮した反復率アニマルモデル、産次ごとのアニマルモデルで育種価を対象とした解析を行い、成績の産次の違いに関与する領域を検討した。A 社の大ヨークシャー種集団を用いたゲノムワイド相関解析により、総産子数および生存産子数に関して第 15 番染色体 (22~23.5Mb)、ならびに、第 7 染色体 (134.5~134.6Mb、51.4~53.2Mb) に高いピークを検出した (図 1A、図 1B)。これらの領域では対立遺伝子型の違いで、1.5 1.6 頭程度の総産子数育種価平均値の違いが認められた (図 1C)。また、B 社では総産子数に関して第 8 染色体 (77.7Mb)、生存産子数に関しても第 8 染色体 (77.7~77.9Mb) および第 13 染色体 (188.6~188.9Mb) に相対的に高いピークを検出した。C 社では総産子数に関して第 13 染色体 (202Mb) および第 9 染色体 (26.9~27.0Mb)、生存産子数に関して第 3 染色体 (93.2~95.4Mb) に高いピークが検出された。D 社では総産子数および生存産子数に関して第 6 染色体 (64.1Mb、5.0~6.0Mb) および第 13 染色体 (47.4~47.7Mb) に連続したピークが検出された。A 社の大ヨークシャー種集団の総産子数に関して第 7 染色体に同定した 51Mb および 134Mb の 2 領域において、連鎖解析および物理地図解析によりゲノム構造を詳細に検討した。その結果、2 領域は実際には連続した一つの領域であることを明らかにした。総産子数の育種価平均値の増加効果が高い SNP 近傍に存在する *GCM1* (Glial Cells Missing 1) 遺伝子は、マウスを用いた遺伝子発現量解析により、胎盤および子宮内膜での発現上昇が受精卵着床の抑制因子と考えられる *CD9* 発現量の低下と関連することが明らかとなった (図 2)。このことから、*GCM1* 遺伝子は胎盤形成に重要な役割を持つため総産子数に関する有力な候補遺伝子であることが示された。

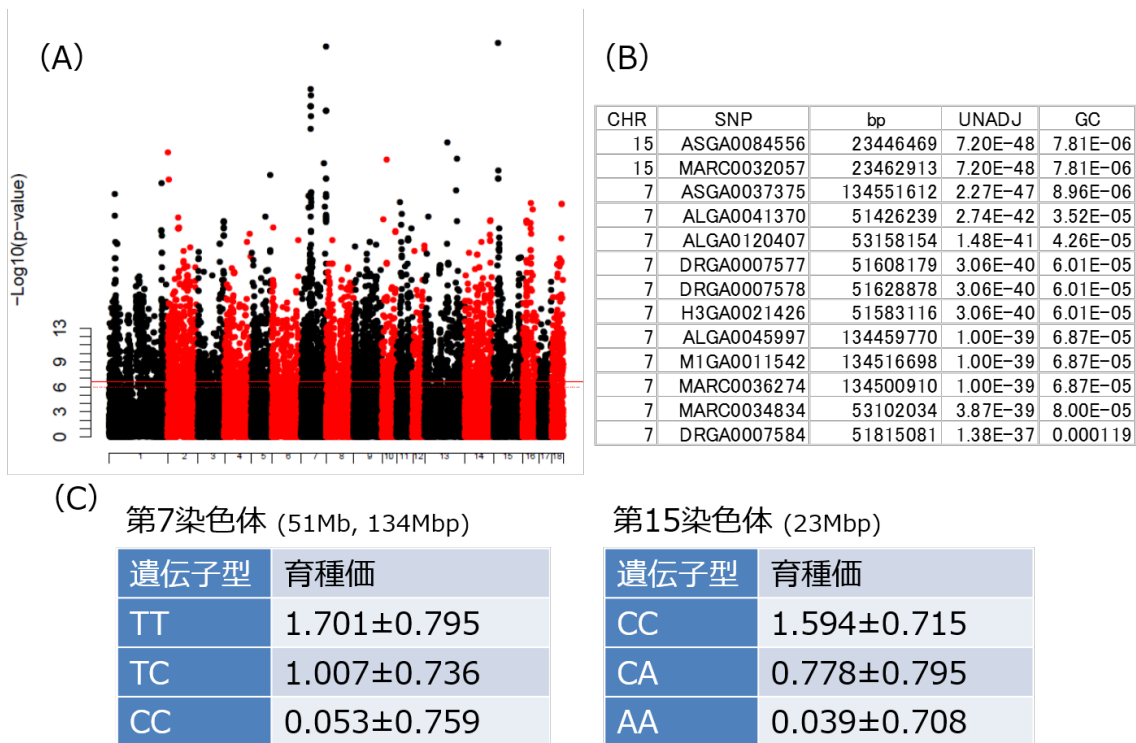


図1 A農場の総産子数に関するDNAマーカーの探索

(A) ゲノムワイド相関解析 (B) 有意SNPマーカーの座位

(C) 第7および15染色体上のSNPマーカー候補の効果

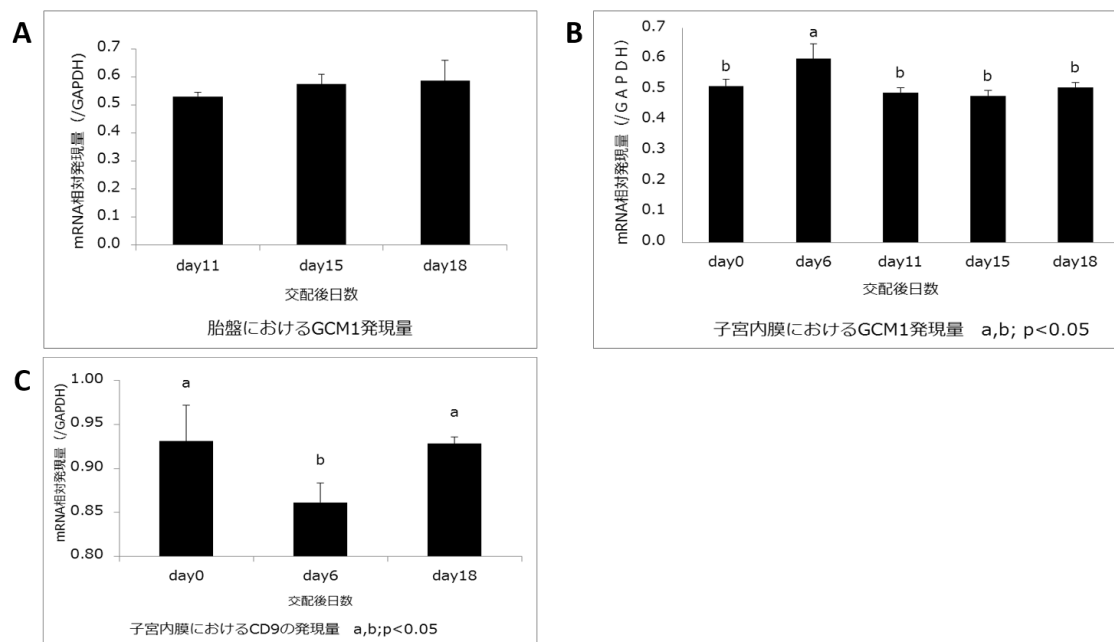


図2 マウスを用いた総産子数の候補遺伝子GCM1の機能解析

(A) 胎盤において着床以降の胎盤形成時 (day11) から強く発現。(B) 母体の子宮内膜上皮において着床時 (day6) に有意に発現量が上昇。(C) 子宮内膜上皮におけるCD9 (細胞接着因子。特にT細胞の細胞膜上で発現し異物性の認識に関与) 発現量が有意に低下。

A社では第7および第15染色体に加え、第14染色体においても総産子数に関連するSNPが同定されたため、各領域のハプロタイプを解析し、総産子数育種価に対する効果を検討した。その結果、それぞれの染色体において形成したハプロタイプのうち、増加型の4型が総産子数の育種価平均値を約1.5頭分増加させることが明らかとなった (表2)。さらに、これらの組み合わせの効果も検証したところ、各染色体において増加型の4型を持つ場合、育種価平均値を1.847頭分増加させる効果があるが、減少型である1型の場合は0.010であった (表3)。また遺伝子型頻度から、増加型および減少型は、それぞれ全体の17%および43%を占めることが明らかとなり、このDNAマーカーを活用して増加型の選抜、あるいは、減少型の淘汰の両面で総産子数の育種価平均値を改良する可能性が考えられる。

表2 総産子数に関する各染色体のDNAマーカー候補と遺伝型の効果

形質に対する影響	染色体	遺伝型	育種価平均値	頭数	最大値	最小値
増加型	7	44	1.448	32	2.713	-0.218
増加型	7	34	1.724	15	2.841	0.593
増加型	7	24	1.138	51	2.270	-1.135
減少型	7	23	0.667	9	1.956	-0.133
減少型	7	22	0.717	5	1.504	-0.206
不明	7	14	1.068	121	2.354	-0.713
減少型	7	13	0.656	33	1.991	-0.130
減少型	7	12	0.262	43	1.921	-1.305
減少型	7	11	0.124	72	1.169	-1.328
増加型	15	44	1.528	96	2.841	-0.503
平均型	15	24	1.045	19	1.956	0.275
不明	15	14	0.830	161	2.270	-0.713
減少型	15	12	0.398	26	1.546	-0.705
減少型	15	11	0.035	84	1.183	-1.328
増加型	14	4	1.448	79	2.841	-0.218
-	14	*	0.642	283	2.422	-1.328

いずれの染色体上のマーカー候補においても4型が増加型であった。

表3 各染色体上のDNAマーカーの相互作用

(A) 増加型（全体の17%）

遺伝型 (染色体)			育種価 平均値	頭数	最大値	最小値
7	15	14				
44	44	4	1.847	11	2.713	0.344
44	44	*	1.808	6	2.422	0.916
44	44	-	1.717	2	2.479	0.955
44	24	*	1.328	2	1.472	1.185
34	44	4	2.299	6	2.841	1.722
34	44	*	1.501	5	2.006	1.138
34	14	*	1.325	3	1.711	0.878
24	44	4	1.813	2	2.156	1.469
24	44	*	1.430	10	2.229	0.358
24	24	*	1.080	2	1.102	1.058
24	24	*	1.445	2	1.501	1.388
24	12	4	1.546	1	1.546	1.546

(B) 減少型（全体の43%）

遺伝型 (染色体)			育種価 平均値	頭数	最大値	最小値
7	15	14				
13	24	*	0.700	1	0.700	0.700
13	14	*	0.552	11	1.071	0.277
13	12	*	0.501	5	0.805	0.118
13	11	*	0.330	11	0.924	-0.130
12	44	*	0.508	2	0.515	0.501
12	14	*	0.151	12	0.981	-0.498
12	12	*	0.174	4	0.353	-0.035
12	11	*	-0.129	18	1.183	-1.305
11	24	*	0.578	2	0.595	0.590
11	14	*	0.270	25	1.169	-0.672
11	12	*	0.150	4	0.659	-0.466
11	11	*	0.010	41	1.110	-1.328

各染色体において（A）4型を組み合わせて持つと総産子数の育種価平均値を増加させる。

（B）一方、1型を組み合わせて持つと、総産子数の育種価平均値を減少させる効果が示された。

*：4型以外、-：型不明

ブタの繁殖性に関連することが論文等で報告されている 80 カ所の DNA 多型について、民間種豚場および家畜改良センターの大ヨークシャー種集団を用いて効果の検証を行った（表 4）。80 カ所の DNA 多型のうち、7 遺伝子については、初産および 2 産目の産子数との関連性が示された。さらに、*FUT1* および *GYS1* 遺伝子に関しては、複数の集団間で同様の効果を示した（図 3）。

表4 ブタの繁殖性に関連する遺伝的多型の効果の検証

遺伝子 シンボル	初産次産子数					2産次産子数				
	個体数	アリル 数	LRT	P 値	寄与率	個体数	アリル 数	LRT	P 値	寄与率
<i>ACE</i>	343	2	0.3	0.572		343	2	6.4	0.011	0.025
<i>EGF</i>	345	8	3.4	0.842		345	8	15.5	0.030	0.055
<i>MBL2</i>	345	2	11.3	0.001	0.042	345	2	2.7	0.103	
<i>BF</i>	345	2	7.5	0.006	0.032	345	2	2.1	0.149	
<i>SLC22A5</i>	345	2	0	0.953		345	2	6.0	0.014	0.030
<i>KCNC2</i>	340	4	3.6	0.306		340	4	9.2	0.027	0.027
<i>PRKAG3</i>	342	3	0.8	0.658		342	3	4.0	0.137	

LRT：尤度比検定統計量。 Sato et al. Anim. Sci. J. (2016)

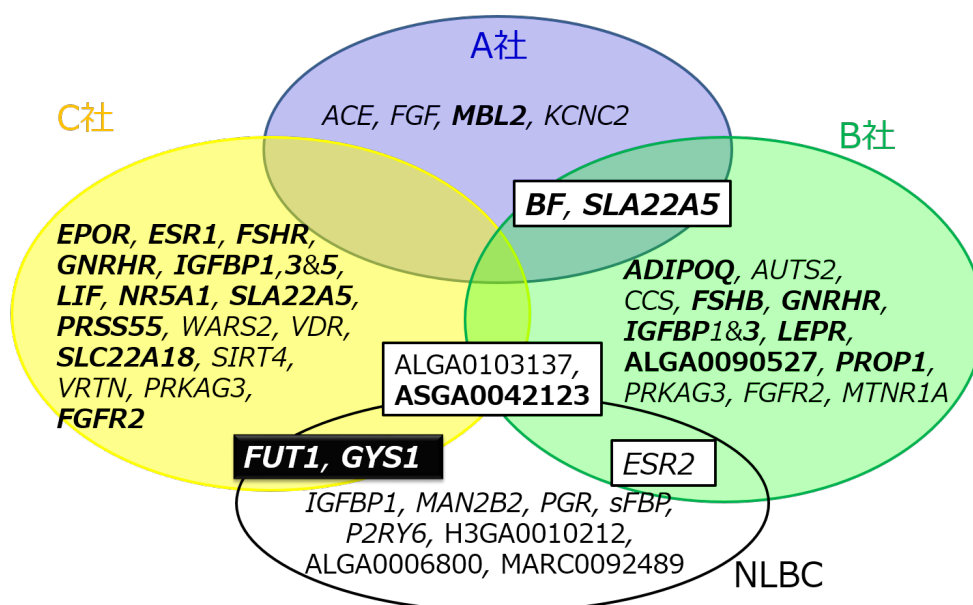


図3 繁殖性関連遺伝子のうち農場間で共通効果を示すもの

太字：1%水準で有意差あり。2集団で共通アリル効果が認められた遺伝子（■）、認められなかった遺伝子（□）。

宮崎県の大ヨークシャー種系統豚を用いた産子数に関するゲノムワイド相関解析の結果、有意な SNP は同定できなかったものの、有意性の高い7カ所の SNP について、効果を検討した（図4）。これら SNP について PCR-RFLP に基づく簡易検査法を開発し、他の大ヨークシャー種集団で効果の検証を行ったところ、富山県の大ヨークシャー種系統豚において、2個の SNP（INRA0043947 および ALGA0090532）が産子数に対して同様の効果を持つことが示された（図5）。

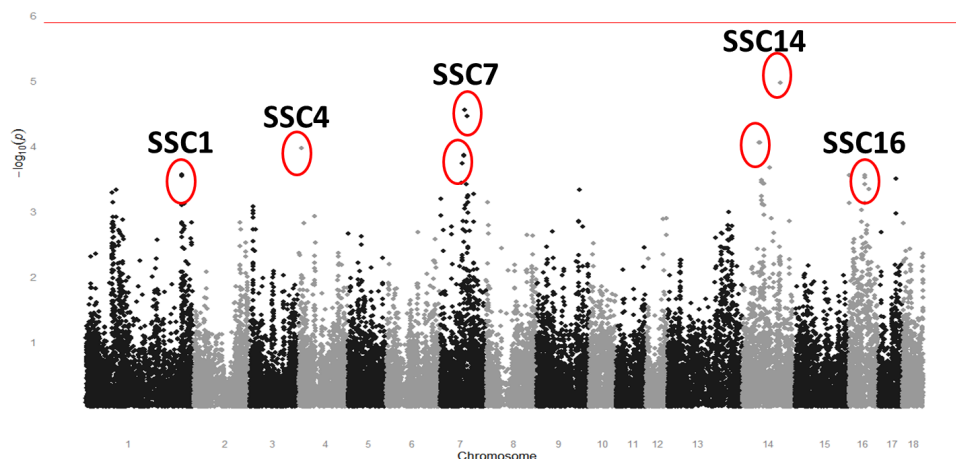


図4 宮崎県大ヨークシャー種系統豚における産子数のゲノムワイド相関解析

7カ所のSNPについて、PCR-RFLP法による遺伝子型判定法を開発した。主要商用品種での遺伝子頻度および形質に対する効果を検討。

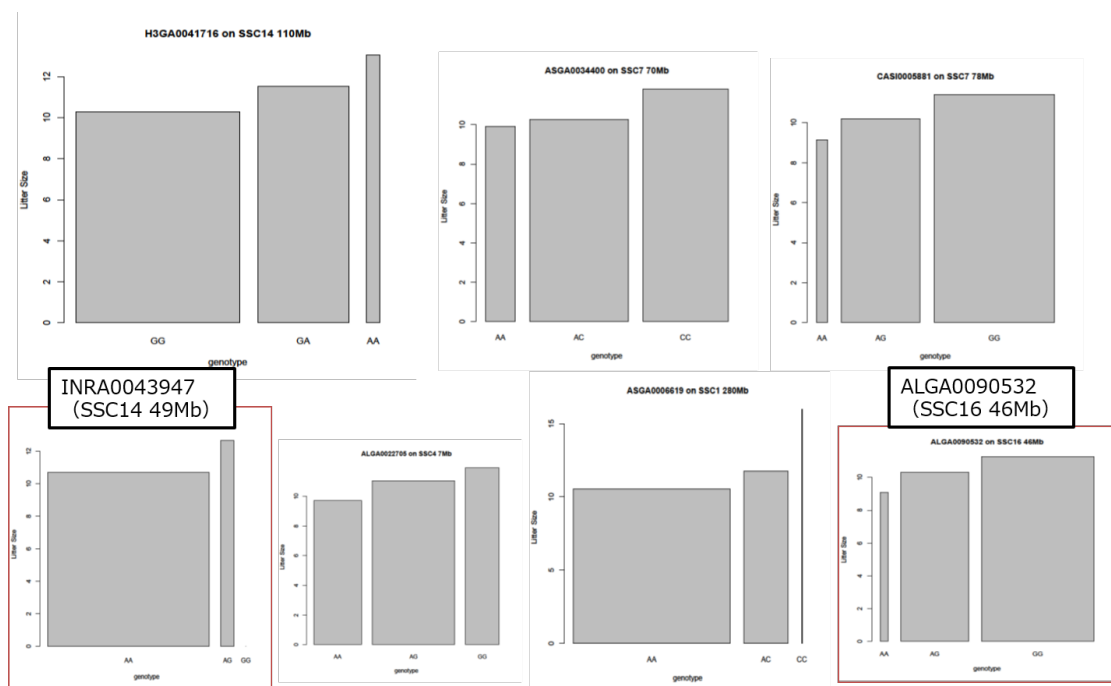


図5 上位7SNPマーカーの遺伝子頻度と効果

7カ所のSNPのうち、ALGA0090532 (SSC16 46Mb) およびINRA0043947 (SSC14 49Mb) は富山県の大ヨークシャー種系統豚でも同様の効果を示した。

全農系列のランドレース種の繁殖性に関して、総産子数、生存産子数および死産数等の繁殖成績をのべ約 3700 腹から収集した。そのうち 437 個体の母豚の DNA を用いた SNP アレイによるジェノタイプングに基づき生存産子数および死産数に関するゲノムワイド相関解析を行った (表 5)。この集団における生存産子数および死産数の遺伝率は、それぞれ 0.122 と 0.0988 と低かったが、多数の SNP が同定された。そこで、SNP タイピングの結果から主成分分析を行い、ゲノム構造を考慮して形質

にかかわる染色体領域の絞り込みを行ったところ、生存産子数および死産数に関連する SNP が、それぞれ 19 カ所および 23 カ所検出された（図 6）。

表5 全農ランドレース種の繁殖性に関するゲノムワイド相関解析に用いるデータの概要

(A) 繁殖形質記録数とSNPタイピング個体数

形質		一産次	二産次	三産次	四産次
生存産子数	記録数	3,714	3,236	2,785	2,330
	SNP	440	353	292	215
死産数	記録数	3,706	3,227	2,774	2,318
	SNP	437	352	290	214

(B) 繁殖形質の遺伝的パラメータ

	総産子数	生存産子数	死産数
総産子数	0.137	1.135	0.3718
生存産子数	6.609	0.122	0.1727
死産数	1.854	-0.028	0.0988

対角：遺伝率、右上：遺伝分散共分散、左下：環境分散共分散

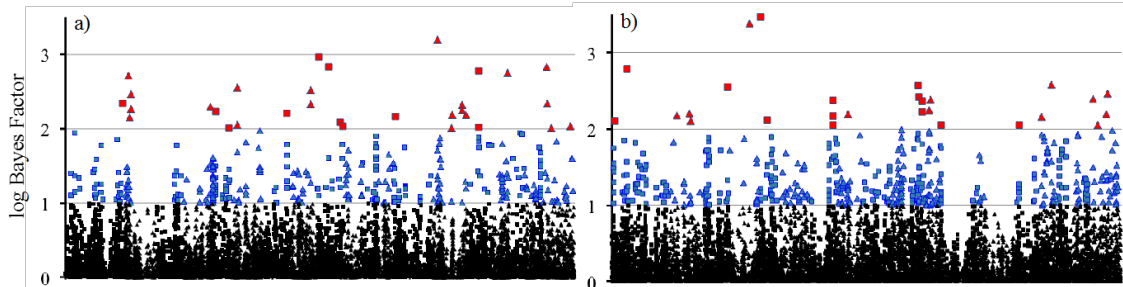


図6 ゲノムワイド相関解析の結果

a)生存産子数、b)死産数

対数バイズファクターが2以上の場合、形質との関連性が高い。

さらに同集団の母豚の繁殖形質データから生涯生産性に関連する長命性および最終産次について検討したところ、それぞれ遺伝率が、0.216 および 0.232 であるため選抜による改良が可能であることが示唆された。そこで、ゲノムワイド相関解析を実施した結果、いずれの形質についても第 4 および第 7 染色体に有意な SNP を観察した（図 7）。

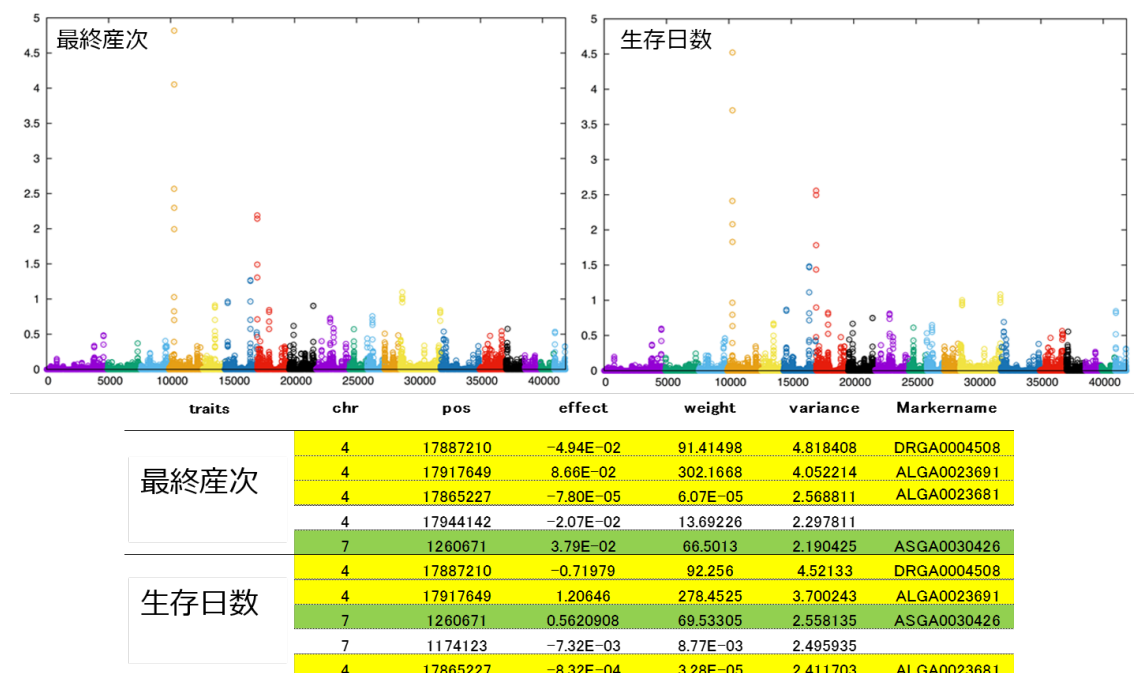


図7 期待最終産次および推定生存日数のゲノムワイド相関解析
いずれの形質も第4および7染色体にSNPピークを検出した。

3) 成果活用における留意点

民間種豚場の大ヨークシャー種で同定した DNA マーカーは、特定の集団のみで効果が認められたが、その他の集団または全集団を統合したゲノムワイド相関解析では、同様の効果が認められなかった。そこで、集団の構造化を補正する方法を適用したところ、一部集団において構造化の問題に改善が見られたところもあったが、全集団を統合した場合には依然として共通した SNP の検出には至っていない。そのため、本研究課題で開発した DNA マーカーを他の集団に適応する際には、あらかじめ効果の検証が必要である。

4) 今後の課題

産子数に関連するゲノム領域の同定ならびに SNP マーカーの検出が完了した。さらにいくつかの候補遺伝子を同定した。今後、DNA マーカーの利用性を高めるために、複数の DNA マーカーを一度に簡便に検出できる DNA 型判定試薬キットの開発が期待される。

平成 28 年度 「DNA マーカー育種の高度化のための技術開発」 最終年度報告書

中課題番号: 11105377

研究期間: 平成 24～28 年度

中課題名: DNA マーカー育種の高度化のための技術開発 (AGB)

小課題番号: AGB2002

研究期間: 平成 24～28 年度

小課題名: ブタの飼料利用性に関する遺伝解析と DNA マーカーの開発

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 全農畜産サービス株式会社・東日本原種豚場・AI センター・品質管理課・廣瀬健右

共同研究機関・研究室・研究者名等: 全国農業協同組合連合会・飼料畜産中央研究所・上士幌種豚育種研究室・普川一雄、全国農業協同組合連合会・飼料畜産中央研究所・上士幌種豚育種研究室・伊藤哲也、全農畜産サービス株式会社・ブリーディング事業部・技術課・二階堂聡、静岡県畜産技術研究所・中小家畜研究センター・養豚・養鶏科・柴田昌利、静岡県畜産技術研究所・中小家畜研究センター・養豚・養鶏科・寺田圭、農研機構 畜産研究部門・家畜育種繁殖研究領域・家畜ゲノムユニット・谷口雅章、農研機構 畜産研究部門・家畜育種繁殖研究領域・家畜ゲノムユニット・荒川愛作、静岡県畜産技術研究所・中小家畜研究センター・養豚・養鶏科・寒川彰久、全国農業協同組合連合会・飼料畜産中央研究所・上士幌種豚育種研究室・上川舞

1) 研究目的

豚枝肉生産においては、飼料に関わる費用が全体の 70 % を占めており、また今後も飼料価格は上昇すると予想されることから、効率的に飼料を生産物にすること、つまり飼料利用性が高い豚を造成することが生産性向上においては必須である。現在の飼料要求率（飼料摂取量/増体量）の国内平均は、ランドレース（3.0）、大ヨークシャー（3.0）、デュロック種（3.1）であり、これを改良すべく家畜改良増殖目標においては、それぞれ平成 32 年までに 2.9、2.9、2.9 とすべく数値目標が掲げられている。これまで、豚においては飼養頭数が多く、コスト面からも群管理が主流であり、一頭当たりの飼料摂取量の測定が困難であったが、近年、飼料摂取量・体重自動記録装置の導入により、個体別の飼料摂取量の測定が可能となり、大規模集団での要求率等の飼料利用性形質の算出が可能となった。本研究では SNP アレイによるゲノムワイド相関解析等を行うことにより、飼料利用性に関連するゲノム領域の探索を行い、育種改良に有効な DNA マーカーの開発を行う。

2) 研究成果

1. 遺伝的パラメータの推定

全農系列のデュロック集団およびランドレース集団を対象にゲノム関係行列を用いて飼料利用性形質・産肉形質の遺伝的パラメータを推定した。一日平均増体重 (ADG)、背脂肪厚 (BFT)、ロース面積 (EMA) の遺伝率はデュロック種とランドレース種で同等の値を示しいずれも中程度の遺伝率であったが飼料要求率 (FCR) の遺伝率はこれら 2 品種間で大きく異なっていた。したがって品種によって飼料要求率に関する遺伝子の効果は大きく異なる可能性があり、育種マーカーの有効性は品種毎に検証する必要があることが示唆された。

2. 補正飼料摂取量を用いた ssGWAS 法による飼料利用性形質関連マーカーの探索

全農デュロック集団について局所重み付け回帰平滑化 (Loess) 法を用いて補正した飼料摂取量を用いて推定した FCR を用いて ssGWAS 法による遺伝子マーカー探索を実施した。平均飼料摂取量 (ADFI) に対し、全遺伝分散に対する寄与率が 2.5 % 以上を示した SNP が第 6,10,11 番染色体において検出された。このうち 6 番染色体上では 5 個の SNP が検出され、個体におけるアレルの一致率から、少なくとも 4 つは連鎖不平衡状態にあると推定された。ADFI との関連が検出された SNP について両親の血統情報を考慮した GeneticModel で産肉形質に対する効果推定したところ、ADG および BFT と有意な相関が見られた (図 1)。飼料要求率 (FCR) に対し 2.5% 以上の寄与率を示した SNP

は第 2,11,12 番染色体上に検出された。2 番染色体上で検出された SNP は ADG との有意な相関、11 番染色体上の SNP は IMF との有意な相関があった (図 2)。

図1. 6 番染色体に検出されたSNPと形質(飼料摂取量(ADFI), 一日平均増体重(ADG), 背脂肪厚(BFT) の関連

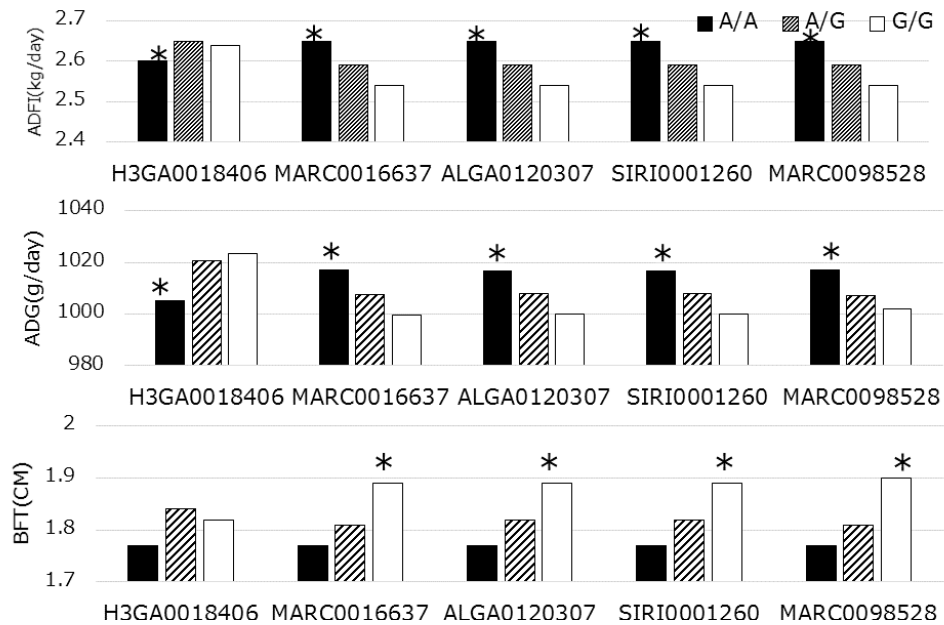
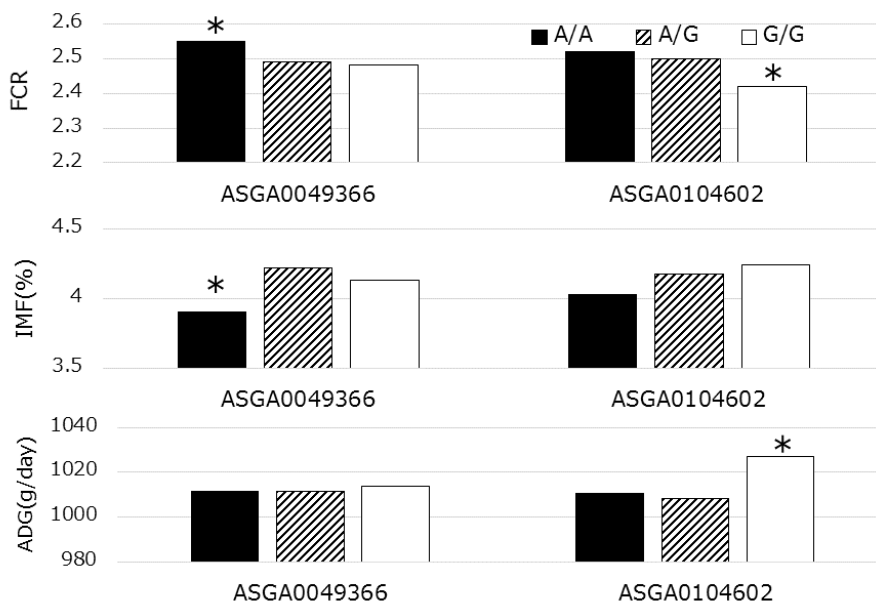


図 2. 2,11番染色体上の各SNPと形質(飼料要求率(FCR), 筋肉内脂肪割合(IMF), 一日平均増体重(ADG) の関連



3. バイズ法における飼料利用性形質関連マーカーの探索

全農ランドレース集団から得られた飼料摂取量 (FI)、飼料要求率 (FCR)、余剰飼料摂取量 (RFI) について、バイズ C 法による GWAS を実施した。各形質ともに約 100 箇所の QTL 領域が検出されたことから本集団において飼料利用性形質はポリジーンによって支配されていることが示唆された。

4. 検証集団を用いた飼料利用性形質関連マーカーの効果の検証

全農デュロック集団において検出された SNP について静岡県で保有するデュロック集団を用いて、SNP と形質の相関解析を実施した。ADFI、FCR に関する SNP の効果について有意差は得られなかったものの全農集団と同様の傾向を示し、育種マーカーとして有効である可能性が示唆された。ADG においては有意な効果が見られ、全農集団と静岡県の集団で同様の結果が得られたことからこの SNP が育種マーカーとしての有用性が示唆された (図 3,4)。

図3.6番染色体に検出された各SNPと形質(飼料摂取量(ADFI), 一日平均増体重(ADG), 背脂肪厚(BFT) の関連 (静岡)

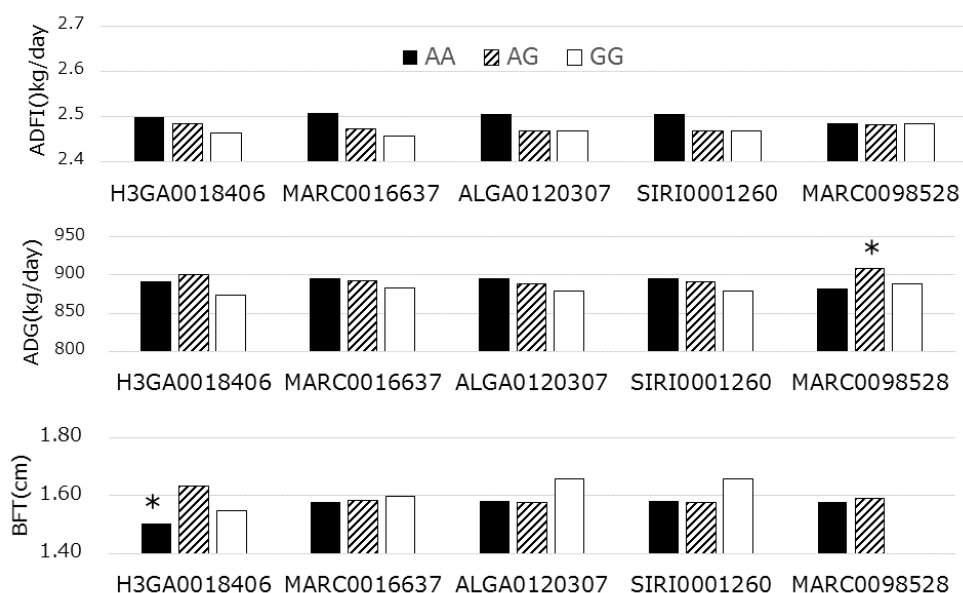
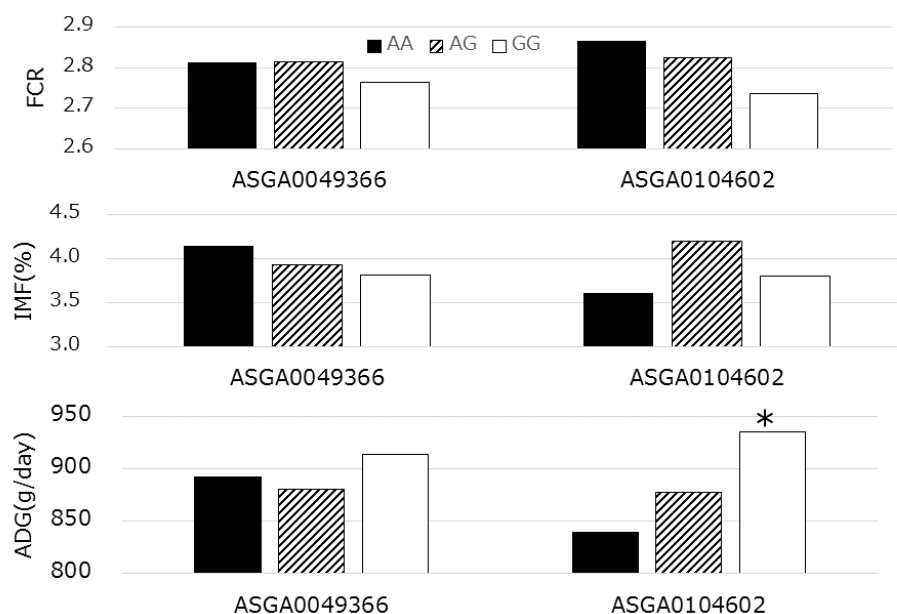


図4. 2,11番染色体上の各SNPと形質(飼料要求率(FCR), 筋肉内脂肪割合(IMF), 一日平均増体重(ADG)の関連(静岡)



3) 成果活用における留意点

本課題で得られた育種マーカーは責任変異ではないため、アレルの効果は集団・品種で大きく異なる可能性がある。したがって予め当該集団における育種マーカーの効果を確認したうえで育種改良に利用する必要がある。

4) 今後の課題

様々な品種・集団で利用可能な育種マーカーを開発するためには、本課題で得られた成果をもとにさらにファインマッピングを実施し、飼料利用性および増体に影響を与える責任変異を同定する必要がある。

ランドレース集団においては育種に利用可能なマーカーを得ることができなかったため、データの補正法、ゲノムワイド関連解析の手法を検証する必要がある。

平成 28 年度 「DNA マーカー育種の高度化のための技術開発」 最終年度報告書

中課題番号: 11105377

研究期間: 平成 24～28 年度

中課題名: DNA マーカー育種の高度化のための技術開発 (AGB)

小課題番号: AGB2003

研究期間: 平成 24～28 年度

小課題名: ブタの離乳時産子総体重等に関連する QTL の探索と DNA マーカーの開発

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農研機構 畜産研究部門・家畜育種繁殖研究領域・家畜ゲノムユニット・谷口雅章

共同研究機関・研究室・研究者名等: 農研機構 畜産研究部門・家畜育種繁殖研究領域・家畜ゲノムユニット・荒川愛作、農研機構 畜産研究部門・畜産物研究領域・食肉品質ユニット・中島郁世、千葉県畜産総合研究センター・養豚養鶏研究室・松本千明、徳島県立農林水産総合技術支援センター・畜産研究課・養豚担当・新居雅宏、岐阜県畜産研究所・養豚・養鶏研究部・吉岡豪

1) 研究目的

ブタにおいては、一腹当たりの産子数とともに、産子の育成率が年間の生産頭数に大きく影響し、生産性向上においてはその両者の能力向上が必須である。育成率には、子豚が一様な体重で生まれること、また母豚が優れたほ育能力を有することが重要である。千葉県におけるランドレース種の系統造成では、ほ育能力の指標となる離乳時産子総体重にバラツキが認められており、改良の可能性が示唆されている。そこで、この集団を用いて連鎖解析等を行うことにより、離乳時産子総体重に関連するゲノム領域の探索を行い、育種に有効な DNA マーカーの開発を行う。また徳島県の大ヨークシャー種系統豚内に増体量 QTL が第 4 染色体に検出されており、そのファインマッピングと責任遺伝子の解明を行う。岐阜県では、DNA マーカー選抜による筋肉内脂肪含量が増大したデュロック種集団（ボーノブラウン）を造成しているが、その素材となった系統豚とは増体量に差が生じている。この二つの集団の比較ゲノム解析、また比較遺伝子発現解析により増体量などに関連するゲノム領域を探索する。また畜産草地研究所では、増体量 QTL 等に関する候補遺伝子の機能解析のために、ブタ骨格筋組織由来の細胞株の樹立を行う。

2) 研究成果

千葉県において系統造成中のランドレース種集団について、基礎世代（G0）から G6 世代まで各世代の母豚から合計 259 頭分の DNA を調製した。また、生存産子数、産子の体重（生時、1 週齢、2 週齢、3 週齢、4 週齢）などのデータを収集した（図 1、図 2）。基礎世代から最終世代にかけて、生存産子数に関しては G6 世代で産子数の少ないものが見られたが、同世代の 2 産目では回復した。一方、3 週齢一腹総体重は世代を追うごとに改良されたことがうかがえる。

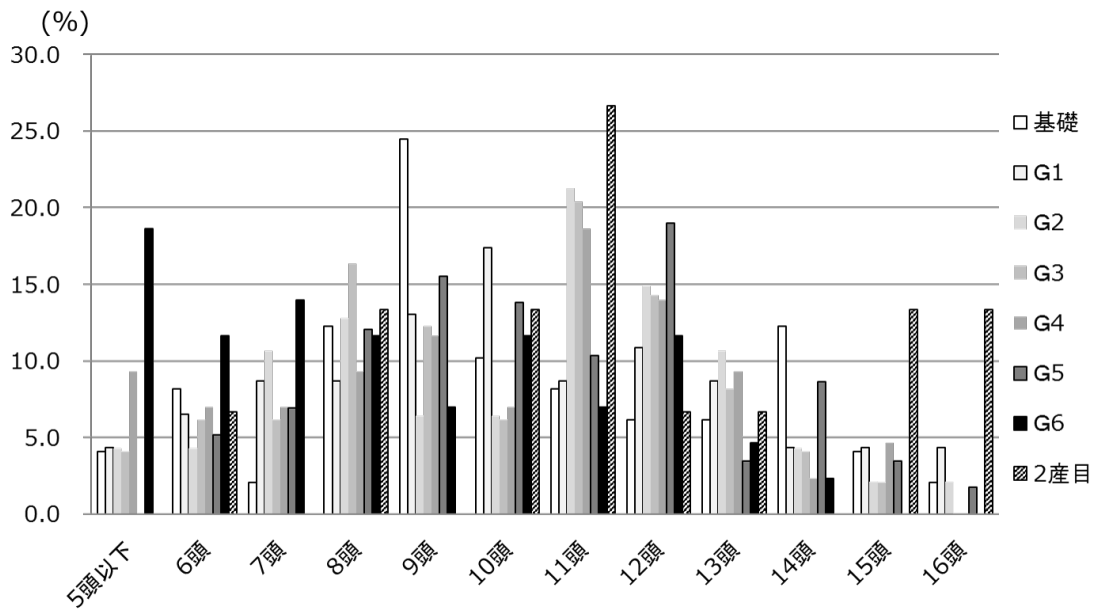


図1 千葉県ランドレース種系統豚の生存産子数の推移

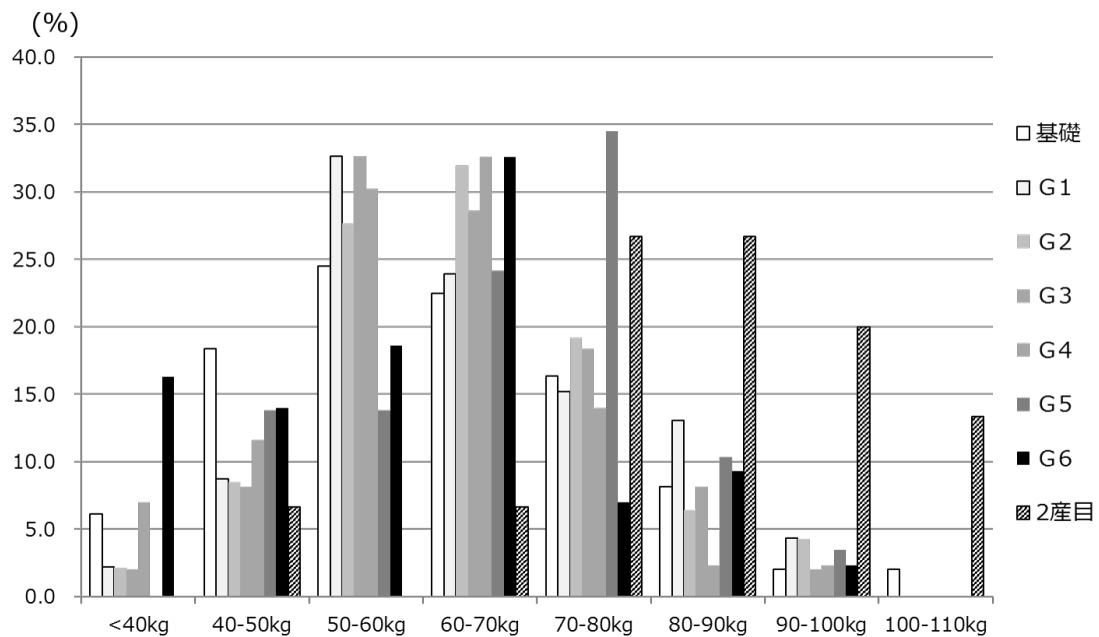


図2 千葉県ランドレース種系統豚の3週齢一腹総体重の推移

また、保育頭数と3週齢一腹総体重の相関が初期世代では低いものの、G3ならびにG6世代では高くなっており、3週齢一腹総体重の改良には子豚一頭当たりの増体とともに保育頭数の増大も関連すると考えられる（図3）。

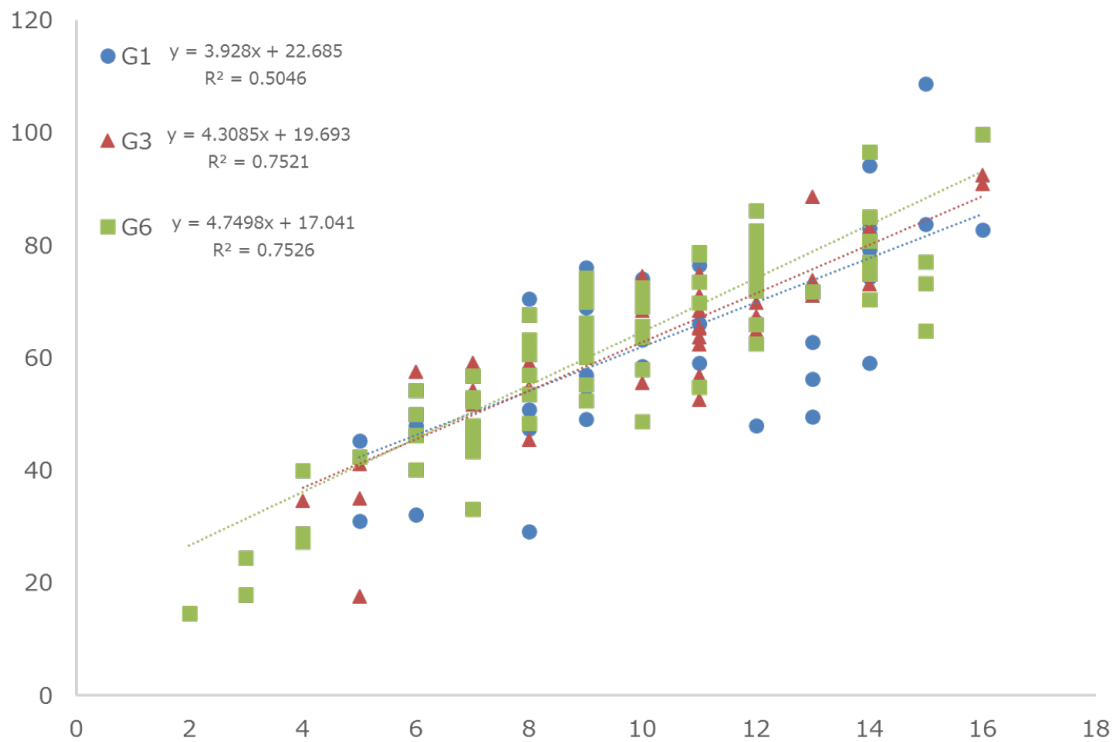


図3 ランドレース種系統豚のほ育頭数と3週齢一腹総体重の関係

本研究課題では世代を分けて、3週齢一腹総体重に関するゲノムワイド相関解析を実施した。まず初期世代（G3）までに行った解析により、第16染色体に有意なSNPを検出した。その後、G5世代までを含めた解析では、第1、第6、第14染色体に新たな有意SNPを検出したが、第16染色体のSNPは消失した。

そこで、生時から3週齢時までの産子平均体重についても検討することとした。これらの遺伝率推定値は、平均体重については生時（0.45）、1週齢（0.34）、2週齢（0.39）、3週齢（0.35）であり中程度の数値を示したのに対し、総体重については生時（0.08）、1週齢（0.25）、2週齢（0.34）、3週齢（0.24）であり、平均体重と比較すると低い値を示した（表1）。

表1 ランドレース種の産子の体重に関する分散性分と遺伝率の推定値

Trait	Week	Residual	Additive	Phenotypic	h ²
平均体重	Live	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.45 ± 0.14
	1w	0.13 ± 0.02	0.06 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.34 ± 0.13
	2w	0.26 ± 0.05	0.17 ± 0.06	0.43 ± 0.04	0.39 ± 0.13
	3w	0.44 ± 0.08	0.24 ± 0.10	0.67 ± 0.06	0.35 ± 0.12
総体重	Birth	9.46 ± 1.16	0.84 ± 0.96	10.30 ± 0.90	0.08 ± 0.09
	1w	27.16 ± 4.20	9.24 ± 4.65	36.40 ± 3.35	0.25 ± 0.12
	2w	61.30 ± 10.28	27.09 ± 12.18	88.39 ± 8.29	0.31 ± 0.12
	3w	117.80 ± 18.32	36.69 ± 20.12	154.49 ± 14.18	0.24 ± 0.12

平成 28 年度に系統造成が完了し、全世代を含めた解析を行ったところ、総体重については有意な SNP が観察されなかった。一方、平均体重について全世代の形質データおよび SNP タイピング結果を用いたゲノムワイド相関解析を行ったところ、3 カ所の有意な SNP を検出した（表 2）。系統造成期間の G0-G6 世代および維持豚（G7 世代）における SNP 型頻度と各形質に対する効果は同様の傾向を示した（図 4）。今後、他のランドレース集団の育種改良に活用するとともに、組み合わせ検定等の形質データを用いて交雑集団における効果の検証にも利用できる可能性がある。

表2 千葉県ランドレース種系統豚の産子平均体重に有意な効果を示したSNP

産子平均体重	SNP	ゲノム領域	p値
生時	MARC0076403	SSC13: 178.0Mb	0.04
2週齢	DRGA0010171	SSC10: 6.0Mb	0.05
2週齢	ALGA0076293	SSC14: 26.6Mb	0.01

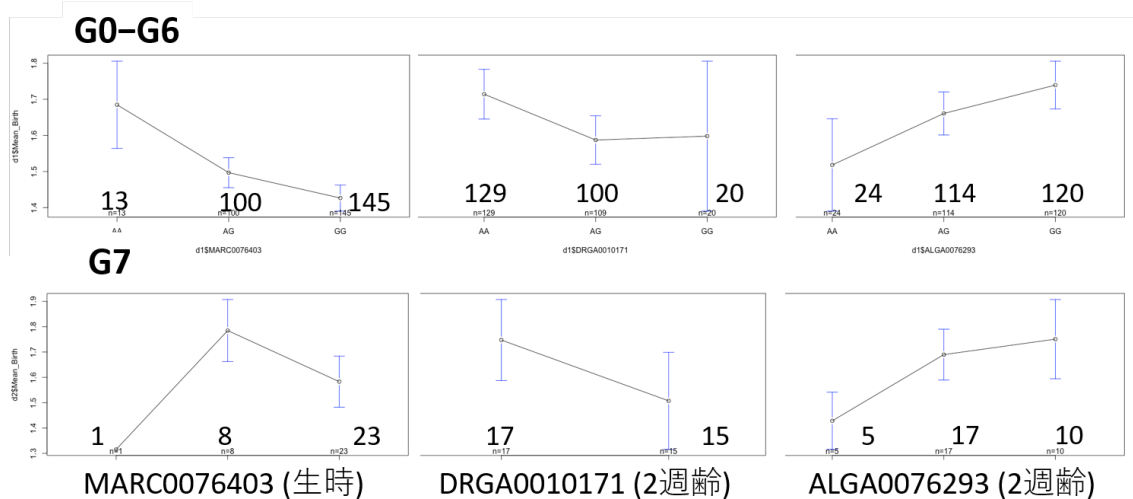


図4 産子平均体重に関連するSNP型の効果

徳島県で供用中の大ヨークシャー種雄豚の DNA を調製し、それらの産子の体重データ（生時、4 日、1 週、2 週、3 週、4 週、60 日、90 日、120 日、150 日、出荷時）を収集した。種雄豚から産子への第 4 染色体の増体量 QTL 領域の伝達は、約 30cM (45Mb) をカバーするマイクロサテライトマーカーを用いて検出した。QTL 型とハプロタイプの組み合わせに矛盾のある領域を除外することで、当初 45Mb であった候補領域内を 6Mb と 9Mb の 2 つの領域を絞り込むことができた（図 5）。この領域に存在する *PLAG1* 遺伝子は、ヒトおよびウシにおいて体長や体重に関連する（Karim et al. Nature Genet. 2013）。そのため増体量 QTL の有力な候補と捉え多型解析を行ったが、主要な商用豚品種では多型性が無いことを確認した。この大ヨークシャー種集団は詳細な体重データを測定していることもあり、他の大ヨークシャー種集団で同定した各種形質に関連した SNP の検証にも用いた。

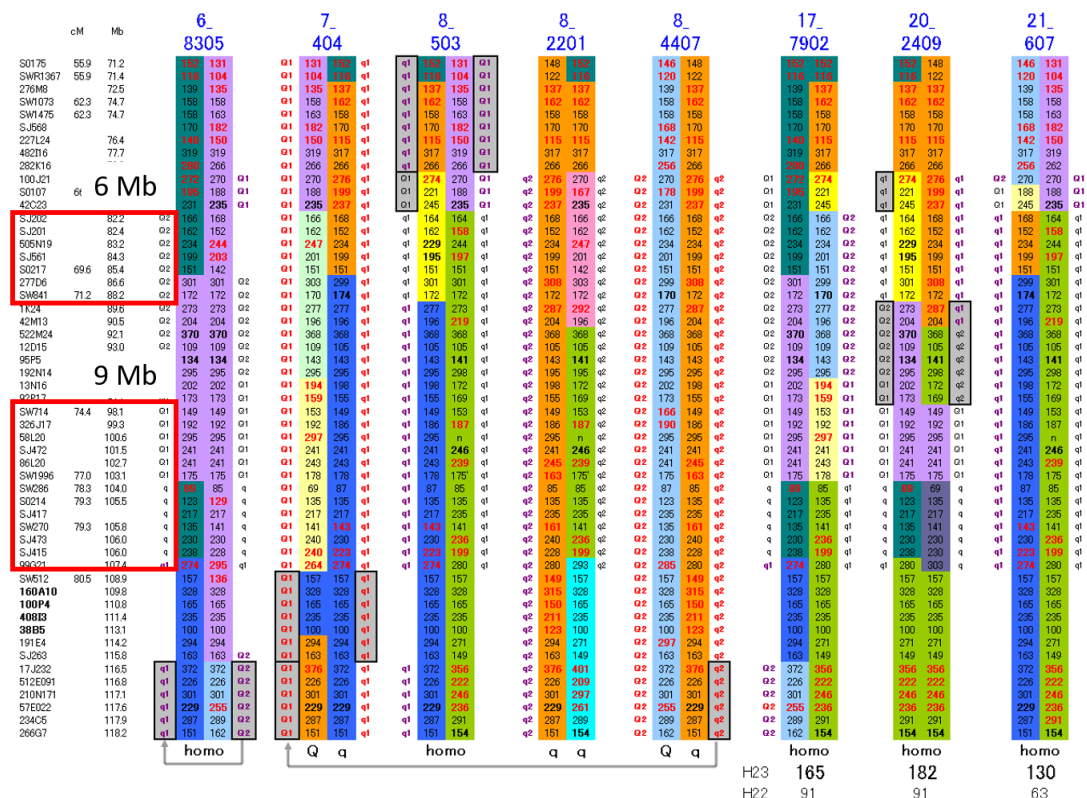


図5 徳島県大ヨークシャー種集団における増体量QTLの絞り込み

岐阜県で造成したデュロック種種豚ポーノブラウンは、筋肉内脂肪含量に関する QTL をアイリスナガラ（増体型）に導入および選抜することで作出された。これら 2 系統のデュロック種は離乳後から 60 日齢までに成長曲線に差が出始め、さらに筋肉内脂肪組織の発達にも差異が認められる（図 6、図 7）。

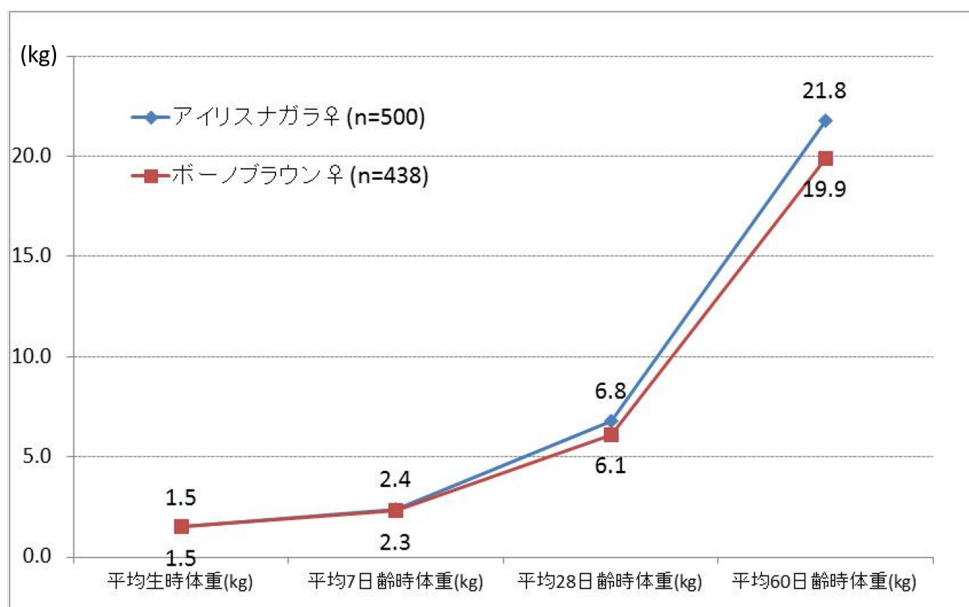


図6 アイリスナガラとポーノブラウンの生時～60日齢時の発育の違い

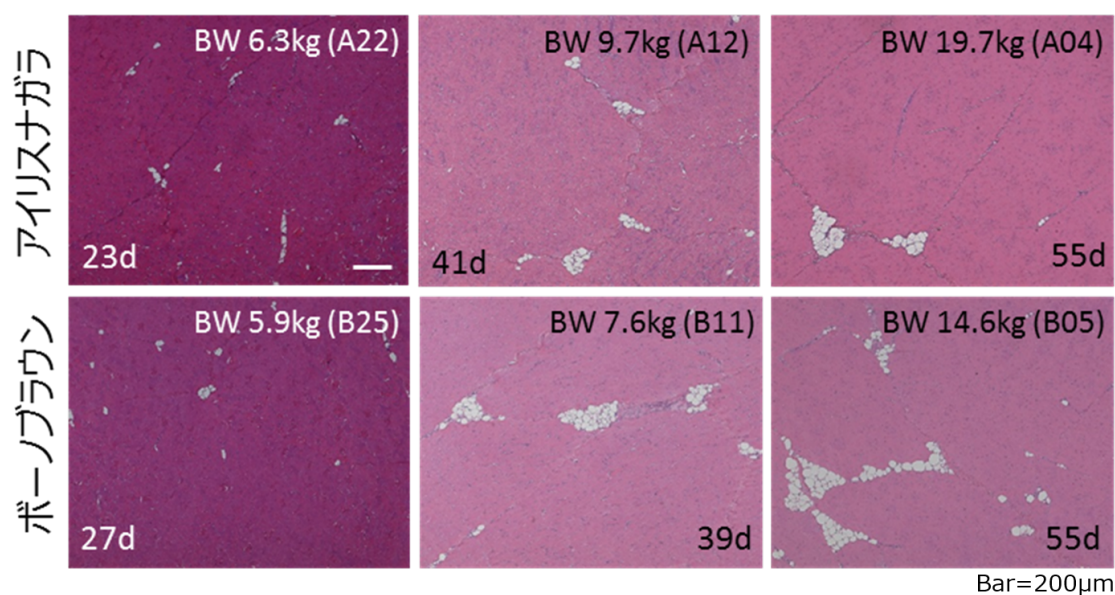


図7 デュロック種2系統間の筋肉内脂肪組織の発達比較
胸最長筋切片のHE染色像

多型解析に基づく QTL 領域のファインマッピングによる候補領域の絞り込みが困難であると判断したため、マイクロアレイ法により主要なエネルギー代謝器官である肝臓、骨格筋、および、脂肪組織における比較遺伝子発現量解析を行うこととした。その結果、脂肪組織ではその他の組織に比べて最も多くの発現変動遺伝子を同定した（表 3）。デュロック種 2 系統間において発現量変動を示した遺伝子のうちいくつかは QTL 領域内に存在することが明らかとなった（図 8）。現在、これら遺伝子の発現量変動と筋肉内脂肪含量あるいは増体性との関連性を検証している。

表3 デュロック種2系統間で発現量が異なるプローブ数
B：ボーノブラウン、A：アイリスナガラ

Age	FAT (FC>2, p<0.05)		MUSCLE (FC>1.7, p<0.1)		LIVER (FC>1.7, p<0.1)	
	B>A	B<A	B>A	B<A	B>A	B<A
25d	3,734	4,082	1,072	1,961	573	1,855
40d	2,510	3,020	413	1,906	2,134	949
60d	3,273	4,492	246	1,218	803	3,517

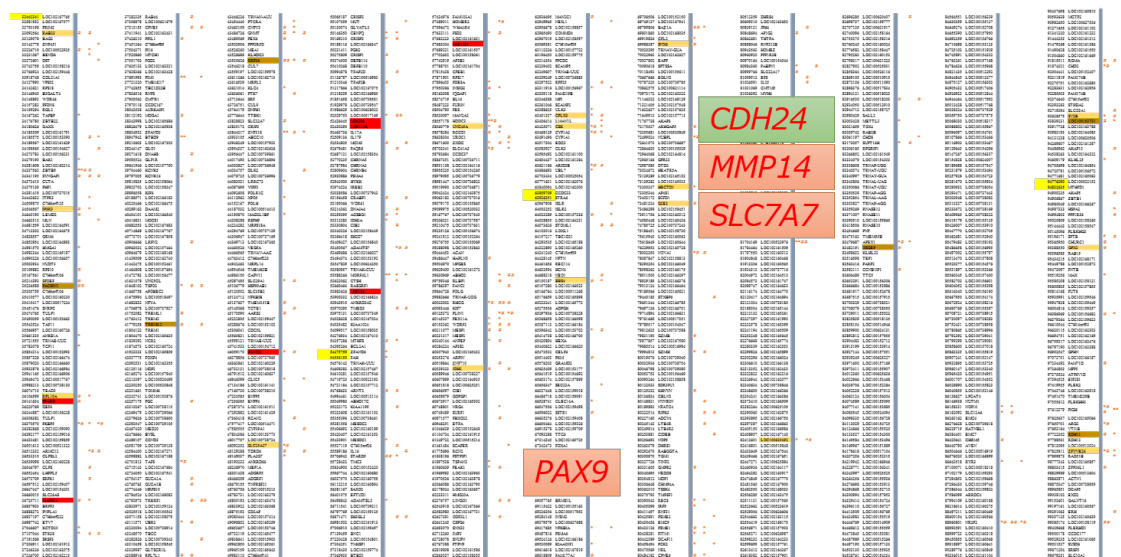


図8 第7染色体のQTL領域内に存在する発現量変動遺伝子

- ・ : 系統間で発現量差のある遺伝子
- : 発現量差が大きく、機能面から形質との関連が示唆される遺伝子

候補遺伝子の機能解析に有用なブタ細胞株を樹立するため、ブタ胎児の骨格筋を用いて、限界希釈法によるクローニングで培養細胞株の確立を試みた。その際、筋組織から効率的に細胞を単離する条件、ならびに無血清あるいは低血清培養法に加えて新たな分化誘導条件の確立を目指した。そこで、培養プレート、基礎培地、血清、およびホルモン・サイトカイン等の培地添加物について、約 500 種類を超える組み合わせを試行し、条件検討を行った（表 4）。いくつかの分化誘導条件により自発的な筋管形成が観察された（図 9）。しかし、安定的に高効率に筋分化する細胞株の樹立には至らなかったため、平成 26 年度までで終了した。

表4 ブタ骨格筋由来の培養細胞株樹立のための条件検討

Plates	Basal Medium	Serum, (%)	Hormones & cytokines Additives			
Non-coated	DMEM-high glucose	Bovine (10,5,2,1,0.5%)	Insulin	GMCSF	TNFα	IL-2
Collagen I-coated	DMEM-low glucose	Horse (2,1,0.5%)	Dexamethasone	Follistatin	IGF-I	pIL-4
Gelatin-coated	Cosmedium	Pig (2,1,0.5%)	Biotin	Activin	IGF-II	pIL-6
Fibronectin-coated		Ultrosor G (2,1,0.5,0.1%)	Pantothenate	pTGF-β1*	EGF	pIL-10
Collagen IV-coated		Muscle extracts (0.1-10%)	Octanoate	SDF-1α	IFN-γ	IL-11
iMatrix511		Serum free (0%)	MIX	pGlucagon	ITS	IL-12
			Ovo-transferrin	GABA	pHGF	IL-15
			Holo-lactoferrin	Bezafibrate	pGH	IL-17
H25 : 111 patterns			Oleate	L-165041	T3	
H26 : 507 patterns			adiponectin	GW501576		
			Chemerin	GW9662		

*p, recombinant porcine

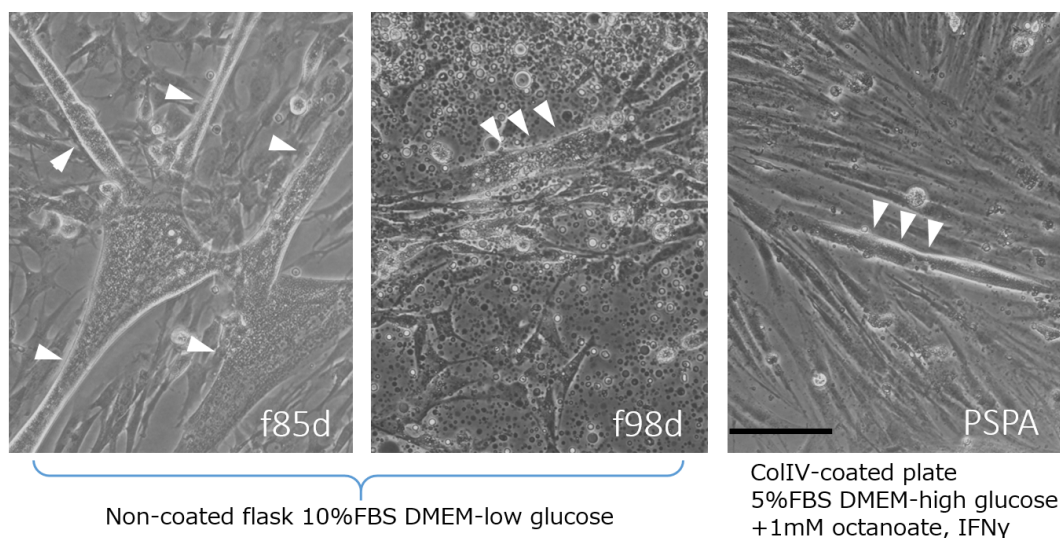


図9 ブタ胎仔胸最長筋由来初代培養中に自発的に形成された筋管
矢印は多核の筋管細胞を示す

3) 成果活用における留意点

ランドレース種の離乳時産子総体重は、母豚のほ育能力に加え子豚の成長能力も含まれることが、母豚の遺伝的能力を示す SNP 検出を困難にする一因となった可能性が考えられる。また離乳時産子総体重は育成頭数とも高い相関性が認められる。そのためか、産子総体重に関する SNP は同定できたのは、生時においてのみであった。一方、産子平均体重を形質値として用いた 2 週齢時において SNP を同定することができた。対象とする形質の特性を十分検討したうえでゲノムワイド相関解析を行うことが重要である。

4) 今後の課題

ランドレース種母豚のほ育能力に関して、有力な SNP を同定したが、周辺領域の多型情報に基づく連鎖不平衡解析ならびに候補遺伝子の探索、さらに他の集団を用いた SNP の効果の検証は現在実施中である。またデュロック種の増体性および産肉性に関する比較遺伝子発現量解析によって同定した候補遺伝子に関しては、遺伝子発現量の差異と形質との関係、また発現量の差異を生む原因となる遺伝的多型の同定は精度の高い DNA マーカーを開発するためには引き続き検討する必要がある。

平成 28 年度 「DNA マーカー育種の高度化のための技術開発」 最終年度報告書

中課題番号: 11105377

研究期間: 平成 24～28 年度

中課題名: DNA マーカー育種の高度化のための技術開発 (AGB)

小課題番号: AGB2004

研究期間: 平成 24～28 年度

小課題名: ウシの繁殖性に関連するゲノム領域の探索と DNA マーカーの開発

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農研機構 畜産研究部門・家畜育種繁殖研究領域・有用遺伝子ユニット・小林栄治

共同研究機関・研究室・研究者名等: 家畜改良センター・企画調整部・改良技術課・小島孝敏、農研機構 畜産研究部門・家畜育種繁殖研究領域・家畜育種ユニット・西尾元秀、神戸大学・大学院農学研究科・資源生命科学専攻 応用動物学講座・万年英之、神戸大学・大学院農学研究科・食資源教育研究センター・大山憲二、農林水産先端技術研究所・畜産研究部・両角岳哉、農林水産先端技術研究所・畜産研究部・鈴木恒平、農林水産先端技術研究所・畜産研究部・美川亜弓

1) 研究目的

乳用牛の乳量及び乳成分や肉用牛の枝肉重量及び脂肪交雑に関しては、統計遺伝学的な手法を用いた育種改良によって、大幅に改良が進みその能力が向上している。一方、乳用牛及び肉用牛いずれにおいてもその繁殖成績は、年々低下する傾向にある。これまで過剰排卵処理への反応性や双子生産率に関してはゲノム解析が行われ、それぞれ関与する遺伝子が特定されたが、受胎率を始めとする繁殖性に関わる遺伝的要因の研究はほとんど進められていない。そこで、本研究プロジェクトでは受胎率や子牛生産頭数等の繁殖性について、ゲノムワイド関連解析手法を用いることにより効果的に染色体領域を絞り込み、効果の確認された DNA マーカーの開発を行う。

2) 研究成果

1) 乳用牛については、ホルスタイン種雌牛について、受胎率育種価が低い群および高い群を選抜し、50K SNP チップを用いてタイピング後ゲノムワイド関連解析を実施した結果、6 か所の受胎率関連 SNP を見つけた。このうち第 3 番染色体上の関連 SNP は *CTTNBP2NL* 遺伝子の 22bp 下流に位置し、第 5 番染色体上は *PKP2* 遺伝子の 988 bp 下流に位置し、第 6 番染色体には *UNC5C* (*Unc-5* homolog C) 遺伝子が存在していることが分かり、それぞれ機能解析を行った。

次に、ホルスタイン種雄牛を用いて、受胎率育種価についてゲノムワイド関連解析を行ったところ、第 29 番染色体の *FLI1* (*Fli-1* proto-oncogene, ETS transcription factor) 遺伝子の 5' UTR の 266 塩基上流に、高受胎率の個体では GA が挿入され、低受胎率の個体では欠損する SNP が最も強く受胎率育種価に関連していることが分かった。これらの結果、最終的に 6 つの遺伝子を特定し、4,165 頭の種雄牛及び 2,682 頭の雌牛を用いてそれらの繁殖性への効果を推定した (表 1)。

表1. 特定した各遺伝子の繁殖性への効果

	<i>PKP2</i>	<i>CTTNBP2NL</i>	<i>SETD6</i>	<i>CACNB2</i>	<i>UNC5C</i>	<i>FLI1</i>
受胎率, %	0.87	0.41	0.94	0.91	0.60	0.44
空胎日数, 日	-1.10	n.s.	-2.06	-2.20	-1.13	-0.71
授精回数, 回	-2.28	-2.37	-3.87	-2.92	-2.34	-1.39
初回受精受胎率, %	0.55	0.48	0.71	0.55	0.48	0.15
70日受胎率, %	0.38	n.s.	0.66	0.70	0.38	n.s.
90日受胎率, %	0.47	n.s.	1.06	0.94	0.60	0.22
110日受胎率, %	0.60	n.s.	1.24	1.11	0.62	0.34

さらに、難産率育種価についてゲノムワイド関連解析を行った結果、第 18 番染色体の *SIGLEC10* (sialic acid binding immunoglobulin like lectin 10) 遺伝子の 268 番目のグルタミンがアルギニンに変わるアミノ酸変異を伴う SNP を特定した。

2) 兵庫県と岐阜県黒毛和種集団に対し、繁殖性指標を推定するための試料・情報収集を行った。兵庫県では 829 頭、岐阜県では 2678 頭の試料・血統情報・繁殖成績を収集した。この情報を基に兵庫県では子牛生産頭数、分娩間隔、初産月齢の育種価を算出した。この 3 形質に対しては、ランダムに抽出した個体によるゲノムワイド関連解析の結果、Bonferroni 補正による Genome wide 5%有意水準を満たす SNP は観察されなかった。有意水準を Chromosome wide 5%の場合では、子牛生産指数において一つの SNP (BTA26)、分娩間隔（全産次の平均分娩間隔）で 2 つの SNP (BTA23) が有意 SNP として検出された。さらに分娩間隔では、1-2 産次の分娩間隔、2-3 産次の分娩間隔、1-2-3 産次の分娩間隔に分類して解析を行ったところ、1-2 産次の分娩間隔で 6 つの SNP (BTA18, 19, 26)、1-2-3 産次の分娩間隔で 1 つの SNP が有意 SNP として検出された。これら候補領域の最も P 値の低い SNP に対して、検証集団を用いた妥当性確認を実施したが、検証集団において同様の効果が認められた SNP は存在しなかった。

一方、岐阜県黒毛和種繁殖集団について初産月齢、分娩間隔、4 歳時子牛生産指数の 3 繁殖形質に対する解析を行うため、各形質に関する上位下位 100 個体を選出した。3 形質の上下個体各 100 頭の DNA をプールした GWAS を実施した。プーリング法による GWAS 解析の結果、初産月齢で 1 SNP (BTA5)、分娩間隔で 4 SNP (BTA9, 12, 20)、子牛生産指数で 1 SNP (BTA8) で、Bonferroni 補正による Genome wide 5%有意水準を満たす SNP が観察された (図 1)。

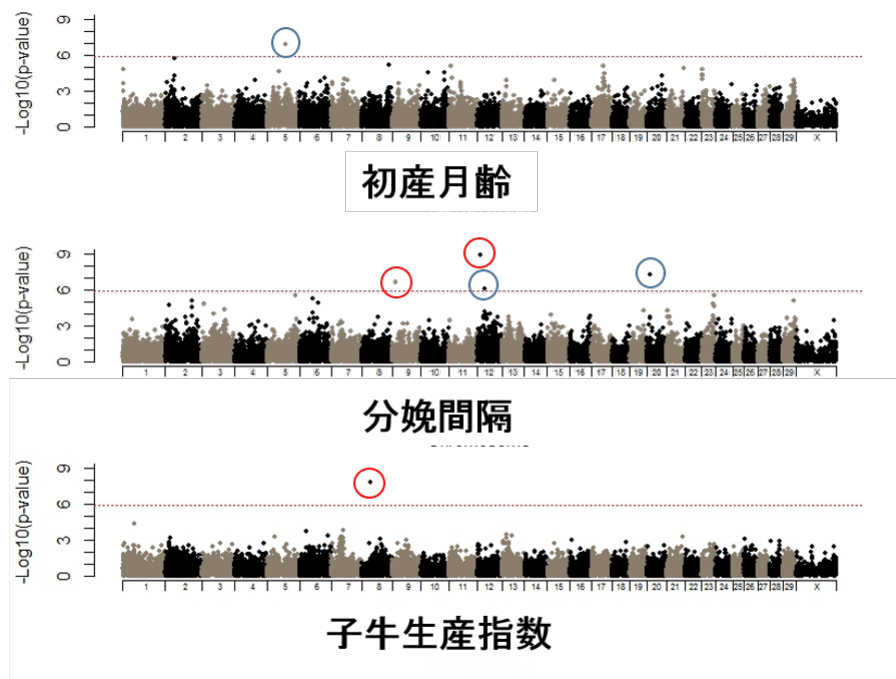


図1. 岐阜県集団のゲノムワイド関連解析結果

この解析はプーリング DNA による GWAS 解析であるため、岐阜県集団の他個体を用いた 50K ア

レイ解析の結果を参照しマーカー品質を確認した結果、3 SNP においては Call rate が極めて低い ($P < 0.50$) SNP であることが判明し、これらの SNP は候補から除外した。次に GWAS 解析個体に対して、PCR-RFLP により No.1 SNP の個体解析を行った結果、2 SNP においてプーリング GWAS による推定頻度と個体別解析による遺伝子頻度に乖離が認められた。これら 3 SNP に対し検証集団 516 頭を用いた妥当性確認を行った結果、初産月齢の 1 SNP (BTA5) と分娩間隔の 1 SNP (BTA 20) では同様の効果は認められなかったが、分娩間隔の 1 SNP (BTA 12) では $P=0.0118$ の有意な効果が認められた。遺伝子型間の効果を解析したところ、AA 型 (451.15 日、212 頭)、AG 型 (439.69 日、252 頭)、GG 型 (427.08 日、52 頭) の遺伝子型分布を示し、AA 型と GG 型の間には有意差 ($P < 0.05$) が認められた。以上より、責任遺伝子、責任変異の同定までは至っていないが、この SNP は優良アリルがマイナーアリルであること、効果が比較的大きいことから有用な DNA マーカーとなることが示唆された。

3) 受胎率、子牛生産頭数、空胎期間等の繁殖形質に関連が予想される候補遺伝子について DNA データベースより配列情報および SNP 情報を抽出した。また、ウシ全ゲノムに対してリシーケンス法により探索された黒毛和種の SNP 情報を入手した。57 個の候補遺伝子では黒毛和種において 7531 個の SNP が見つかった。6 個の遺伝子には SNP が見つからなかった。一方、PGR 遺伝子は 1Kb あたり 71 個の SNP が見つかり、極めて SNP 頻度が高かった。開発した SNP について、48 頭の黒毛和種における遺伝子頻度を調査した。さらに、追加した 64 個の候補遺伝子では、遺伝子領域 4826.0Kb に存在する黒毛和種内に多型のある SNP は 11,869 個であった。それぞれの SNP について、黒毛和種 48 頭における遺伝子頻度を調査したところ、0 (ヘレフォード種の標準配列とは異なる対立遺伝子に固定) から 1.000 (ヘレフォード種の標準配列と同じ対立遺伝子に固定) まで様々な頻度であった。1 遺伝子当たりでは、平均 2.46 個の SNP が検出された。

GWAS により検出されたウシ第 12 番染色体候補領域内に存在する 3 個の候補遺伝子 (*RXFP2*, *KL* 及び *STARD13* 遺伝子) について、遺伝子内に存在するそれぞれ 810、40 及び 293 個の SNP を検出し、マーカー型頻度を調査した。*STARD13* 遺伝子及び *KL* 遺伝子について岐阜県牛繁殖形質上位、下位 4 頭ずつの遺伝子型を決定し、2 個の SNP を確認した。

岐阜県における繁殖形質の GWAS 解析において有意であった SNP:rs29016480 (BTA12:27954424(G/A)) について PCR-SSP 法を用いた DNA マーカーの簡易判定法を開発した (図 2)。

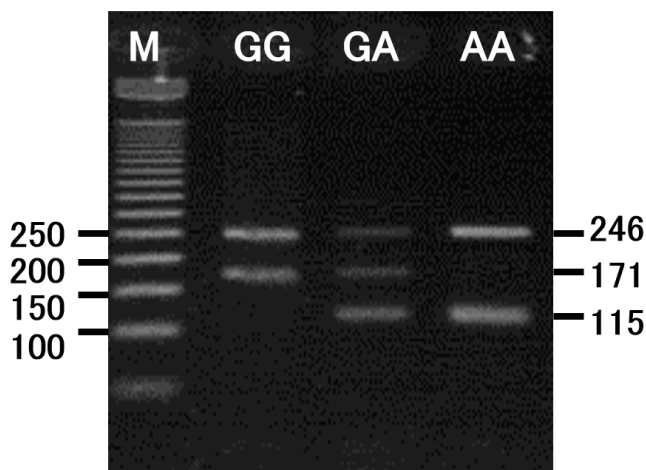


図2. 検出SNPの簡易判別法開発

3) 成果活用における留意点

ウシの繁殖性に関する DNA マーカー及び関連遺伝子の効果は小さいため、単独の利用では明らかな違いを検出することは期待できない。また、黒毛和種の場合、地域集団の間の相違が大きいことから、集団ごとに DNA マーカーの検証を行う必要がある。

4) 今後の課題

乳用牛では、特定した遺伝子の効果を実証する必要がある。肉用牛では、DNA マーカー近傍に存在する候補遺伝子について、遺伝子発現や機能を解析し、関与する機構の明らかな責任遺伝子・責任変異を同定する必要がある。

V これまでの研究実施期間における研究成果(論文発表、特許他)【一般公表可】

課題番号 11105377

成果等の集計数

課題 番号	学術論文		学会等発表(口頭 またはポスター)		出版 図書	国内特許権等		国際特許権等		報道件 数	普及しう る成果	発表会 の主催 (シンポ ジウム・ セミナー)	アウト リーチ活 動
	和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得				
11105377	6	26	38	28	1	1	0	0	0	0	0	1	1

注1)学術論文数は直接本事業の成果を掲載したものに限定してカウントすること。

(1)学術論文

区分: ①原著論文、②その他論文

整理 番号	区分	機関名	タイトル	著者	掲載誌	巻 (号)	掲載 ページ	発行 年	発行 月
1	②	農業生 物資源 研究所	ポストゲノム研究としてのブタ感染症・ワクチンの研究(1)ブタの疾患感受性に影響を与えるゲノム領域の探索	上西博英	動物用ワクチン・ バイオ医薬品研究 会ニュースレター	(5)	6-10	2012	1
2	①	農業生 物資源 研究所	Single-chain variable fragment intrabody impairs LPS-induced inflammatory responses by interfering with the interaction between the WASP N-terminal domain and Btk in macrophages	C. Sakuma, M. Sato, T. Takenouchi, J. Chiba, H. Kitani	Biochem Biophys Res Commun	423(1)	164- 169	2012	6
3	②	農業生 物資源 研究所	ポストゲノム研究としてのブタ感染症・ワクチンの研究(2)ブタの病原体認識機構の研究とワクチン研究	上西博英	動物用ワクチン・ バイオ医薬品研究 会ニュースレター	(6)	22- 26	2012	12
4	①	農業生 物資源 研究所、 他	Analysis of chemokine receptor CCR7 expression on porcine blood T lymphocytes using a CCL19-Fc fusion protein	S. Moreno, B. Alvarez, P. Martinez, H. Uenishi, C. Revilla, A. Ezquerra, F. Alonso, J. Dominguez	Dev Comp Immunol	39(3)	207- 213	2013	3
5	①	農業生 物資源 研究所	Single domain intrabodies against WASP inhibit TCR-induced immune responses in transgenic mice T cells	M. Sato, R. Sawahata, C. Sakuma, T. Takenouchi, H. Kitani	Sci Rep	3	3003	2013	10

6	①	農業生物資源研究所	Characterization of the liver-macrophages isolated from a mixed primary culture of neonatal swine hepatocytes	H. Kitani, M. Yoshioka, T. Takenouchi, M. Sato, N. Yamanaka	Results Immunol	4	1-7	2014	1
7	①	農業生物資源研究所, 農林水産先端技術研究所	A single nucleotide polymorphism of porcine MX2 gene provides antiviral activity against vesicular stomatitis virus	K. Sasaki, P. Tungtrakoolsab, T. Morozumi, H. Uenishi, M. Kawahara, T. Watanabe	Immunogenetics	66(1)	25-32	2014	1
8	②	宮城県畜産試験場, 畜産草地研究所, 東北大学, 日本ハム株式会社, 農業生物資源研究所, 農林水産先端技術研究所	ブタの抗病性育種の取り組みと成果	鈴木啓一, 島津朋之, 陸拾七, 片山雄貴, 加藤和雄, 麻生久, 北澤春樹, 岡村俊宏, 柴田千尋, 佐久間晶子, 中條満, 門脇宏, 柴田智也, 鈴木英作, 高萩陽一, 助川慎, 村上博, 上西博英, 奥村直彦, 松本敏美	日本畜産学会報	85	417-420	2014	1
9	①	動物衛生研究所, 農業生物資源研究所	HPCD子豚へのSalmonella enterica serovar Choleraesuis実験感染; 病態の再現とTLR5-塩基多型(C1205T)の影響検証の試み	溝呂木聖子, 矢ヶ部陽子, 芝原友幸, 秋庭正人, 楠本正博, 佐久間晶子, 中條満, 新開浩樹, 上西博英, 宗田吉広	日本豚病研究会報	(63)	6-11	2014	2
10	①	農業生物資源研究所, 他	Molecular characterization and expression of porcine Siglec-5	Z. Escalona, B. Alvarez, H. Uenishi, D. Toki, M. Yuste, C. Revilla, M. Gomez del Moral, F. Alonso, A. Ezquerro, J. Dominguez	Dev Comp Immunol	44(1)	206-216	2014	5
11	①	農業生物資源研究所	Establishment of c-myc-immortalized Kupffer cell line from a C57BL/6 mouse strain	H. Kitani, C. Sakuma, T. Takenouchi, M. Sato, M. Yoshioka, N. Yamanaka	Results Immunol	4	68-74	2014	8

12	①	農業生物資源研究所	Extracellular ATP does not induce P2X7 receptor-dependent responses in cultured renal- and liver-derived swine macrophages	Takato Takenouchi, Shunichi Suzuki, Hiroki Shinkai, Mitsutoshi Tsukimoto, Mitsuru Sato, Hirohide Uenishi, Hiroshi Kitani	Results in Immunology	4	62-67	2014	8
13	①	農林水産先端技術研究所, 動物衛生研究所, 農業生物資源研究所	Concise and broadly applicable method for determining the genomic sequences of North-American-type porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in various clusters	T. Morozumi, H. Iseki, D. Toki, M. Takagi, H. Tsunemitsu, H. Uenishi	J Vet Med Sci	76(9)	1249-1255	2014	9
14	②	農業生物資源研究所	Inflammasome activation by danger signals: extracellular ATP and pH	Takato Takenouchi, Mitsutoshi Tsukimoto, Makoto Hashimoto, Hiroshi Kitani	Inflammasome	1(1)	76-80	2014	11
15	①	農業生物資源研究所, 他	Molecular characterization of porcine Siglec-10 and analysis of its expression in blood and tissues	Z. Escalona, B. Alvarez, H. Uenishi, D. Toki, M. Yuste, C. Revilla, M. G. del Moral, F. Alonso, A. Ezquerra, J. Dominguez	Dev Comp Immunol	48(1)	116-123	2015	1
16	①	農業生物資源研究所	Specific binding of the WASP N-terminal domain to Btk is critical for TLR2 signaling in macrophages	C. Sakuma, M. Sato, T. Takenouchi, H. Kitani	Mol Immunol	63(2)	328-336	2015	2
17	①	農業生物資源研究所, 農林水産先端技術研究所, 静岡県畜産技術研究所	Porcine NOD1 polymorphisms with impaired ligand recognition and their distribution in pig populations	H. Shinkai, T. Matsumoto, D. Toki, N. Okumura, K. Terada, H. Uenishi	Mol Immunol	63(2)	305-311	2015	2

18	①	農林水産先端技術研究所, 農業生物資源研究所, 他	Wild boars from Sweden, Austria, the Czech Republic and Japan possess intact mannose-binding lectin 2 (MBL2) genes	I. M. Bergman, N. Okumura, H. Uenishi, S. E. Hammer, A. Knoll, I. Edfors, H. R. Juul-Madsen	Int J Immunogenet	42(3)	204-207	2015	6
19	①	家畜改良センター	Molecular Effects of Polymorphism in the 3'UTR of Unc-5 homolog C Associated with Conception Rate in Holsteins	M. Sugimoto, Y. Gotoh, T. Kawahara, Y. Sugimoto	PLoS One	10(7)	e0131283	2015	7
20	①	農業生物資源研究所, 他	Molecular and functional characterization of porcine Siglec-3/CD33 and analysis of its expression in blood and tissues	B. Alvarez, Z. Escalona, H. Uenishi, D. Toki, C. Revilla, M. Yuste, M. G. Del Moral, F. Alonso, A. Ezquerro, J. Dominguez	Dev Comp Immunol	51(2)	238-250	2015	8
21	②	農業生物資源研究所	ブタにおける免疫関連遺伝子のゲノム構造解析の現状と今後の課題について	小川智子, 上西博英	動物遺伝育種研究	43(1-2)	13-23	2015	9
22	①	畜産草地研究所, 畜産草地研究所, 東北大学, 農業生物資源研究所	Correlated responses of respiratory disease and immune capacity traits of Landrace pigs selected for Mycoplasmal pneumonia of swine (MPS) lesion	T. Okamura, K. Maeda, W. Onodera, H. Kadowaki, C. Kojima-Shibata, E. Suzuki, H. Uenishi, M. Satoh, K. Suzuki	Anim Sci J		Epub ahead of print	2015	11
23	②	東北大学大学院農学研究科	豚マイコプラズマ肺炎に対する抗病性育種について	鈴木啓一	All about SWINE	48	2-12	2016	2
24	①	家畜改良センター、農研機構、東北大学	Effect of candidate gene polymorphisms on reproductive traits in a Large White pig population	Shuji Sato, Takashi Kikuchi, Yoshinobu Uemoto, Satoshi Mikawa, Keiichi Suzuki	Anim Sci J	87(12)	1455-1463	2016	3

25	①	畜産草地研究所, 東北大学, 農業生物資源研究所	Correlated response of peripheral blood cytokines with selection for reduced mycoplasma pneumonia of swine lesions in Landrace pigs	T. Sato, T. Okamura, C. Kojima-Shibata, H. Kadowaki, E. Suzuki, H. Uenishi, K. Suzuki	Anim Sci J	87(4)	477-483	2016	4
26	①	農研機構生物機能利用研究部門	Polymorphisms of the immune-modulating receptor dectin-1 in pigs: their functional influence and distribution in pig populations	Shinkai H, Toki D, Okumura N, Takenouchi T, Kitani H, Uenishi H	Immunogenetics	68(4)	275-284	2016	4
27	①	家畜改良センター	Friend Leukaemia Integration 1 is Associated with Conception Rate in Holsteins	Sugimoto M, Baba T, Gotoh Y, Kawahara T, Sugimoto Y	Reproductive Immunology	2(2)	8	2016	7
28	①	家畜改良センター	Family With Sequence Similarity 213, Member A Is Associated With The Fertility Selection Index in Holsteins	Sugimoto M, Gotoh Y, Kawahara T, Sugimoto Y	Journal of Fertility Biomarkers	1(1)		2016	7
29	①	農研機構畜産研究部門	Identification of the Q969R gain-of-function polymorphism in the gene encoding porcine NLRP3 and its distribution in pigs of Asian and European origin	Tohno M, Shinkai H, Toki D, Okumura N, Tajima K, Uenishi H	Immunogenetics	68(9)	693-701	2016	10
30	①	農研機構生物機能利用研究部門, 宮城県畜産試験場, 東北大学, 他	Association of swine leukocyte antigen class II haplotypes and immune-related traits in a swine line selected for resistance to mycoplasmal pneumonia	Asako Ando, Atsuko Shigenari, Chihiro Kojima-Shibata, Mitsuru Nakajoh, Keiichi Suzuki, Hitoshi Kitagawa, Takashi Shiina, Hidetoshi Inoko, Hirohide Uenishi	Comp Immunol Microbiol Infect Dis	48	33-40	2016	10
31	①	農研機構動物衛生研究部門 ウイルス・疫学研究領域	Genomic sequence and virulence evaluation of MN184A-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Japan	Hiroshi Iseki, Takeya Morozumi, Michihiro Takagi, Kenji Kawashima, Tomoyuki Shibahara, Hirohide Uenishi, Hiroshi Tsunemitsu	Microbiol Immunol	60(12)	824-834	2016	12

32	①	農研機構生物機能利用研究部門	Pig lacks functional NLRC4 and NAIP genes	Sakuma C, Toki D, Shinkai H, Takenouchi T, Sato M, Kitani H, Uenishi H	Immunogenetics	69(2)	125-130	2017	2
----	---	----------------	---	--	----------------	-------	---------	------	---

注1)和文、欧文の順で記載。発行年は発行年月(西暦年以下同じ)とする。

注2)区分①の原著論文(受理されたものに限る)は、謝辞等に本事業予算の支援を受けたことが明記されていること。また、論文は直接本事業の成果を掲載したものに限定して記載すること。

注3)機関名は当該成果に関与した代表・共同機関名を記載する。

(2)学会等発表(口頭またはポスター)

整理番号	タイトル	発表者名	機関名	学会等名	発行年	発行月
1	Correlated response of blood concentration of cytokines , with selection for reduced MPS pulmonary lesions in landrace pigs	Sato T, Okamura T, Shibata T, Uenishi H, Suzuki K	畜産草地研究所, 東北大学, 農業生物資源研究所	63rd Annual Meeting of the European Federation of Animal Science	2012	7
2	Current status and future prospect of research in pig breeding aiming at disease resistance in Japan	Takeya Morozumi	農林水産先端技術研究所	Pig Immune and Reproductive Genomics Conference	2012	7
3	Porcine TLR polymorphisms affecting the recognition of Salmonella enterica serovar Choleraesuis	Shinkai H, Suzuki R, Akiba M, Okumura N, Uenishi H	農業生物資源研究所, 農林水産先端技術研究所, 動物衛生研究所	33rd Conference of the International Society of Animal Genetics	2012	7
4	ブタのSLAとTLRの遺伝的多様性が細菌感染症予防ワクチンの効果に及ぼす影響	新開浩樹, 荒川愛作, 松田麻衣子, 奥村華子, 寺田圭, 知久幹夫, 河原崎達雄, 安藤麻子, 上西博英	農業生物資源研究所, 静岡県畜産技術研究所	第154回日本獣医学会学術集会	2012	9

5	Actinobacillus pleuropneumoniae及び豚丹毒ワクチン接種時の抗体応答とSLA及びTLR遺伝子型との関連	新開浩樹, 荒川愛作, 松田麻衣子, 奥村華子, 寺田圭, 知久幹夫, 河原崎達雄, 安藤麻子, 上西博英	農業生物資源研究所, 静岡県畜産技術研究所	日本組織適合性学会大会	2012	9
6	豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスレセプターCD163の多様性	両角岳哉, 佐藤匠, 土岐大輔, 鈴木啓一, 井関 博, 高木道浩, 恒光裕, 上西博英	農林水産先端技術研究所, 動物衛生研究所	第154回日本獣医学会学術集要旨集	2012	9
7	実験感染豚における豚B群ロタウイルス株間での病原性の相違	鈴木 亨, 山田学, 藤本彩子, 久我和史, 宮崎綾子, 山本 佑, 中村菊保, 恒光 裕	動物衛生研究所	第154回日本獣医学会学術集要旨集	2012	9
8	混合培養系を利用したブタ肝臓マクロファージの増殖、単離ならびに特性解析	木谷裕, 吉岡都, 竹之内敬人, 佐藤充, 山中典子	農業生物資源研究所	第154回日本獣医学会学術集要旨集	2012	9
9	ゲノム選抜法におけるタイピング個体の選択が選抜結果に及ぼす影響	西尾元秀, 岡村俊宏, 佐藤正寛	畜産草地研究所	第97回日本養豚学会大会	2012	10
10	繁殖形質に関するゲノムワイド相関解析により検出されたSNPマーカーの多型解析	小林栄治, 岡村俊宏, 佐藤周史, 上本吉伸, 美川亜弓, 金谷奈保恵, 鈴木啓一, 佐藤正寛	畜産草地研究所, 東北大学, 農林水産先端技術研究所, 家畜改良センター	第97回日本養豚学会大会	2012	10

11	背脂肪厚の異なる梅山豚種とランドレース種におけるアディポネクチンと血液成分の違い	中島郁世, 小島美咲, 大江美香, 尾嶋孝一, 室谷進, 柴田昌宏, 千国幸一	農業生物資源研究所	第97回日本養豚学会大会	2012	10
12	ブタ抗病性育種研究の現状と展望	新開浩樹	農業生物資源研究所	NIASシンポジウム「最新アニマルテクノロジー」公開シンポジウム ブタゲノム情報を活用した食と医の新展開 - ゲノム育種技術と医用モデルの開発	2012	11
13	ノトバイオート子ブタを用いたブタB群ロタウイルスの病原性解析	鈴木 亨, 久我和史, 宮崎綾子, 中村菊保, 山本 佑, 山田 学, 恒光 裕	動物衛生研究所	第60回日本ウイルス学会学術集会要旨集	2012	11
14	Molecular characterization of porcine rotavirus B	Tohru Suzuki, Hiroshi Tsunemitsu	動物衛生研究所	11th International Symposium on Double-stranded RNA viruses	2012	11

15	DNAマーカー育種を用いた銘柄豚「瑞浪ポーノパーク」の実用化	吉岡 豪	岐阜県畜産研究所	NIASシンポジウム:「最新アニマルテクノロジー」公開シンポジウム「ブタゲノム情報を活用した食と医の新展開ーゲノム育種技術と医用モデルの開発ー」	2012	11
16	Cortactin binding protein 2 N-terminal-like suppresses implantation by inhibiting gap junction intercellular communication	Mayumi Sugimoto, Shinji Sasaki, Yoshikazu Sugimoto	家畜改良センター	第35回日本分子生物学会年会	2012	12
17	MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ANIMAL ROTAVIRUS C	Tohru Suzuki, Hiroshi Tsunemitsu	動物衛生研究所	32nd ASV	2013	7
18	Porcine immunogenomics – utilization of genomics for research on infectious diseases of pigs	Uenishi H	農業生物資源研究所	10th International Veterinary Immunology Symposium	2013	8
19	Experimental infection of Salmonella enterica serovar Choleraesuis to HPCD or weaned piglets; effect of a TLR5 SNP	Muneta Y, Mizorogi S, Yakabe Y, Shibahara T, Miyoshi H, Akiba M, Kusumoto M, Sakuma A, Nakajo M, Shinkai H, Uenishi H	動物衛生研究所, 農業生物資源研究所	10th International Veterinary Immunology Symposium	2013	8

20	Genetic variability in SLA class II and TLR genes affects immune responses to vaccination for bacterial infections in SPF pigs	Shinkai H, Arakawa A, Tanaka-matsuda M, Ide-okumura H, Terada K, Chikyu M, Kawarasaki T, Ando A, Uenishi H	農業生物資源研究所, 静岡県畜産技術研究所	10th International Veterinary Immunology Symposium	2013	8
21	Amplification and shotgun sequencing of genomic RNA of porcine reproductive and respiratory syndrome virus	Takeya Morozumi, Hiroshi Iseki, Daisuke Toki, Michihiro Takagi, Hiroshi Tsunemitsu, Hirohide Uenishi	農林水産先端技術研究所, 動物衛生研究所, 農業生物資源研究所	10th IVIS	2013	8
22	Identification of reproductive trait loci on chromosomes 7 and 9 of Large White pigs through WGAS	R Otsu, K Watanabe, T Shimazu, T Matsumoto, E Kobayashi, S Mikawa, K. Suzuki	畜産草地研究所, 東北大学, 農業生物資源研究所	EAAP 64th Annual Meeting	2013	8
23	HPCD子豚を用いたSalmonella Choleraesuis感染実験におけるTLR5 SNP (C1205T)の影響の検証	溝呂木聖子, 矢ヶ部陽子, 芝原友幸, 三好洋嗣, 秋庭正人, 楠本正博, 佐久間晶子, 中条満, 新開浩樹, 上西博英, 宗田吉広	動物衛生研究所, 農業生物資源研究所	第156回日本獣医学会学術集会講演要旨集	2013	9

24	Salmonella Choleraesuisの離乳子豚に対する感染試験:TLR5の一塩基多型(C1205T)の影響	宗田吉広, 溝呂木聖子, 矢ヶ部陽子, 芝原友幸, 秋庭正人, 楠本正博, 佐久間晶子, 中條満, 新開浩樹, 上西博英	動物衛生研究所, 農業生物資源研究所	第156回日本獣医学会学術集会講演要旨集	2013	9
25	国内で検出した豚C群ロタウイルスの遺伝学的解析	鈴木 亨, 長谷部文子, 宮崎綾子, 恒光 裕	動物衛生研究所	第156回日本獣医学会学術集会	2013	9
26	豚繁殖呼吸障害症候群ウイルス全長ゲノムの簡便解読法の開発	両角岳哉, 井関博, 土岐大輔, 高木道浩, 恒光裕, 上西博英	農林水産先端技術研究所, 動物衛生研究所, 農業生物資源研究所	第156回日本獣医学会学術集会	2013	9
27	ブタの飼料利用性に関わる形質におけるゲノム解析	谷口雅章ら	農業生物資源研究所	日本畜産学会第117回大会	2013	9
28	サルモネラ認識を低下させる豚TLR5の一塩基多型(C1205T)簡易検出法の開発	宗田吉広	動物衛生研究所	アグリビジネス創出フェア	2013	10
29	GENETIC ANALYSIS ON NONSTRUCTURAL PROTEIN 1 OF PORCINE ROTAVIRUS C	Tohru Suzuki	動物衛生研究所	5th European rotavirus biology meeting	2013	10
30	動物由来C群ロタウイルスの遺伝学的分類	鈴木 亨, 長谷部文子, 宮崎綾子, 恒光 裕	動物衛生研究所	第61回日本ウイルス学会学術集会	2013	11
31	免疫能を指標に選抜を行った大ヨークシャー種豚集団の特徴とゲノムワイド相関解析	上西博英, 高萩陽一, 助川慎, 松本敏美, 奥村直彦, 村上博, 森松文毅, 鈴木啓一	東北大学, 日本ハム株式会社, 農業生物資源研究所, 農林水産先端技術研究所	日本畜産学会第118回大会	2014	3

32	ブタNOD1遺伝子の多型及び機能の解析	新開浩樹, 松本敏美, 土岐大輔, 奥村直彦, 寺田圭, 上西博英	静岡県畜産技術研究所, 農業生物資源研究所	日本畜産学会第118回大会	2014	3
33	Whole-genome characterization of animal rotavirus C.	Suzuki T	動物衛生研究所	International Union of Microbiological Societies Congresses 2014, Book of Abstracts	2014	7
34	Genome wide association study revealed candidate regions for calving interval in Japanese black cattle	Kawasaki Y, Fukazawa K, Fujii T, Uemoto Y, Fukushima M, Akiyama T, Kohama N, Kobayashi E, Oyama K, Sasazaki S, Mannen H	家畜改良センター	34th International Conference on Animal Genetics	2014	7
35	Genetic structure and QTL detection of traits relating with feeding on the developmental phase of Landrace pigs	谷口雅章, 荒川愛作, 廣瀬健右, 二階堂聡, 松本敏美, 石田藍子, 伊藤哲也, 普川一雄, 美川智	農業生物資源研究所, 全国農業協同組合連合会, 全農畜産サービス株式会社	Proceedings, 10th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production	2014	8
36	Analysis of biological pathways associated with immune-capacity traits in pig	Okamura T, Takahagi Y, Matsumoto T, Uenishi H, Suzuki K, Satoh M	畜産草地研究所, 日本ハム株式会社, 農業生物資源研究所, 東北大学	The 10th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production	2014	9

37	豚マイコプラズマ性肺炎に対する抗病性育種の有効性の検証	佐久間晶子, 中 條 満, 斎藤隼人, 國井 洋, 高橋 健, 島津朋之, 北 澤春樹, 麻生久, 加藤和雄, 須田 義人, 鈴木啓一	宮城県畜産試験場, 東北大学	第101回日本養 豚学会大会	2014	10
38	Identification and Comparison of Reproductive Trait Loci by Using Whole-Genome Association Studies of Large White Pigs from Three Breeding Companies in Japan	Ryosuke Otsu, Tomoyuki Shimazu, Toshimi Matsumoto, Eiji Kobayashi, Satoshi Mikawa, Keiichi Suzuki	畜産草地研究所, 東北大学, 農業生物資源研究所	16th Asian- Australasian Association of Animal Production Societies	2014	10
39	大ヨークシャー種の繁殖性に関連するDNAマーカーの検出	佐藤周史, 菊地 隆, 上本吉伸, 美 川 智, 鈴木啓一	家畜改良センター, 東北大学, 農業生物資源研究所	第101回日本養 豚学会大会	2014	10
40	Genome-wide association study of disease caused by Mycoplasma hyopneumoniae in Duroc	Yoneno T, Shimazu T, Borjigin L, Katayama Y, Otsu R, Saito H, Kunii H, Matsumoto T, Okumura T, Uenishi H, Suzuki K	畜産草地研究所, 東北大学, 日本ハム株式会社, 農業生 物資源研究所	16th Asian- Australasian Association of Animal Production Societies Proceeding	2014	11
41	The Molecular Effects of a Polymorphism in the 3' UTR of Unc-5 homolog C that Is Associated with Conception Rate in Holsteins	Sugimoto M, Sugimoto Y	家畜改良センター	第37回日本分子 生物学会年会	2014	11

42	豚の抗病性育種の取り組み	鈴木啓一, 島津朋之, 陸拾七, 片山雄貴, 加藤和雄, 麻生久, 北澤春樹, 岡村俊宏, 柴田千尋, 佐久間晶子, 中條満, 門脇宏, 柴田知也, 鈴木英作, 須田義人, 高萩陽一, 助川慎, 村上博, 上西博英, 奥村直彦, 松本敏美	宮城県畜産試験場, 畜産草地研究所, 東北大学, 日本ハム株式会社, 農業生物資源研究所, 農林水産先端技術研究所	第4回家畜感染症学会学術集会	2014	12
43	マイコプラズマ性肺炎病変スコアのゲノムワイドパスウェイ解析	岡村俊宏, 柴田千尋, 門脇宏, 鈴木英作, 松本敏美, 上西博英, 鈴木啓一, 佐藤正寛	畜産草地研究所, 東北大学, 農業生物資源研究所	日本畜産学会第119回大会講演要旨	2015	3
44	ブタ腎臓および肝臓マクロファージの単離・培養とP2X7受容体機能解析	竹之内敬人, 鈴木俊一, 新開浩樹, 月本光俊, 佐藤充, 上西博英, 木谷裕	農業生物資源研究所	日本農芸化学会2015年度大会	2015	3
45	Phylogenetic evolution of animal rotavirus B	T. Suzuki	動物衛生研究所	6th ERBM, Book of Abstract	2015	5
46	Infection of Salmonella enterica serovar Choleraesuis and Typhimurium to in vitro produced porcine macrophages; Effect of a TLR5 SNP (C1205T)	Muneta Y, Yakabe Y, Eguchi M, Akiba M, Sakuma A, Nakajo M, Shinkai H, Kitani H, Uenishi H	動物衛生研究所, 農業生物資源研究所	The 7th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases	2015	6

47	Method for determining the genomic sequence of North-American-type porcine reproductive and respiratory syndrome viruses.	Morozumi T, Iseki H, Toki D, Matsumoto T, Takagi M, Tsunemitsu H, Uenishi	農林水産先端技術研究所, 日本ハム株式会社, 動物衛生研究所, 農業生物資源研究所	7th ISERPD, Book of Abstracts	2015	6
48	Effect of pathway-based low-density SNP panels in pigs	Okamura T, Takahagi Y, Kojima-Shibata C, Kadowaki H, Suzuki, Nishio M, Matsumoto M, Uenishi H, Suzuki K, Satoh M	畜産草地研究所, 日本ハム株式会社, 農業生物資源研究所, 他	The 66th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science	2015	8
49	Porcine Toll-like receptors: toward the better swine industry	Shinkai H, Muneta Y, Uenishi H	農業生物資源研究所, 動物衛生研究所	TOLL 2015	2015	9
50	ブタの一腹当たりの産子数に関連するゲノム領域の探索	荒川愛作, 谷口雅章, 廣瀬健右, 上川舞, 伊藤哲也, 普川一雄, 二階堂聡, 竹内淳平, 松本敏美, 美川智	農業生物資源研究所, 全国農業協同組合連合会, 全農畜産サービス株式会社	日本畜産学会第120回大会	2015	9
51	ランドレース種の飼料利用性に関わるQTL領域の検討	谷口雅章, 荒川愛作, 石田藍子, 廣瀬健右, 二階堂聡, 竹内淳平, 上川舞, 普川一雄, 伊藤哲也, 松本敏美, 美川智	農業生物資源研究所, 全国農業協同組合連合会, 全農畜産サービス株式会社	日本畜産学会第120回大会	2015	9

52	MPS抗病性育種ランドレース豚および一般ランドレース豚における免疫関連分子の比較	佐久間晶子, 吉野淳良, 氏家哲, 野地智法, 渡邊康一, 麻生久, 北澤春樹, 加藤和雄, 須田義人, 中條満, 國井洋, 高橋健, 島津朋之, 鈴木啓一	宮城県畜産試験場, 東北大学	日本養豚学会第103回大会	2015	10
53	岐阜県黒毛和種の繁殖形質を対象としたゲノムワイド関連解析	田村朋子, 深澤謙治, 尾崎弘樹, 上本吉伸, 西尾元秀, 小林栄治, 松橋珠子, 丸山新, 本多健, 笹崎晋史, 大山憲二, 万年英之	家畜改良センター, 神戸大学, 畜産草地研究所	第16回日本動物遺伝育種学会大会	2015	11
54	豚NLRP3遺伝子の多型がNLRP3インフラマソーム活性に及ぼす影響の解析	遠野雅徳, 新開浩樹, 土岐大輔, 奥村直彦, 田島清, 上西博英	農研機構畜産研究部門	日本畜産学会第121回大会	2016	3
55	子豚の総体重に関するQTL領域の探索	谷口雅章, 荒川愛作, 新垣裕子, 松本千秋, 高橋圭二, 松本敏美, 美川智	農研機構、千葉県畜産総合研究センター	日本畜産学会第121大会	2016	3
56	Identification of SNP associated with fertility trait using pool-based genome-wide association study in Japanese Black cattle	Ozaki H, Tamura T, Fukazawa K, Uemoto Y, Nishio M, Kobayashi E, Matsuhashi T, Maruyama S, Honda T, Oyama K, Sasazaki S, Mannen H	神戸大学	35th International Conference on Animal Genetics	2016	7

57	A genetic association study for the lung lesion scores of mycoplasma pneumonia in pigs	Okamura T, Kadowaki H, Shibata C, Suzuki E, Mikawa A, Matsumoto T, Uenishi H, Sasaki O, Suzuki K, Satoh M	農研機構畜産研究部門	17th Asian- Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science Congress	2016	8
58	Genomic structure of porcine NLRC4 and NAIP genes	Sakuma C, Toki D, Shinkai H, Takenouchi T, Sato M, Kitani H, Uenishi H	農研機構生物機能利用研究 部門	International Veterinary Immunology Symposium	2016	8
59	Different susceptibility between two porcine MX1 genotypes against porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection	Morozumi T, Takagi M, Iseki H, Sakuma A, Nakajo M, Toki D, Mikawa A, Shinkai H, Takenouchi T, Kitani H, Uenishi H	農林水産先端技術研究所	International Veterinary Immunology Symposium	2016	8
60	Identification of reproductive trait loci by GWAS of Large White pigs from four breeding populations	K. Suzuki, R. Otsu, K. Katoh, Y. Suda, T. Matsumoto, E. Kobayashi, S. Mikawa, M. Taniguchi	東北大学、宮城大学、農研 機構	EAAP2016 (67th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science)	2016	8

61	豚マイコプラズマ性肺炎抗病性育種豚の肺抗病性機能に対するワクチンの影響	佐久間晶子, 吉野淳良, 高橋伸和, 氏家哲, 陸拾七, 鈴木啓一, 須田義人, 渡邊康一, 野地智法, 麻生久	宮城県畜産試験場	第105回日本養豚学会大会	2016	11
62	呼吸器疾患が格付けおよび肉質に与える影響	鈴木香澄, 吉岡豪, 道添敏隆, 水谷健士, 酒井喜義, 坂口慎一	岐阜県畜産研究所	第105回日本養豚学会大会	2016	11
63	ゼンノーLの長命性の要因分析と遺伝率の推定	上川舞, 伊藤哲也, 田中元気, 廣瀬健右, 二階堂聡, 小川純輝, 普川一雄	全農飼料畜産中央研究所 全農畜産サービス株式会社	日本養豚学会第105回大会	2016	11
64	Pig immunogenomics: genomic research on immune genes to improve disease resistance of pigs	Hirohide Uenishi	農研機構生物機能利用研究部門	East Asia Agricultural Genome Science Forum 2016	2016	12
65	豚におけるゲノム情報の抗病性改善への活用	上西博英	農研機構生物機能利用研究部門	日本獣医師会獣医学術学会年次大会シンポジウム「ゲノム研究を現場にどう生かすか」	2017	2

66	生時体重形質が離乳時までの事故率に及ぼす影響	上川舞, 伊藤哲也, 田中元気, 廣瀬健右 二階堂聡, 小川純輝, 普川一雄	全農飼料畜産中央研究所 全農畜産サービス株式会社	日本養豚学会第106回大会	2017	3
----	------------------------	--	-----------------------------	---------------	------	---

注1)機関名は当該成果に関与した代表・共同機関名を記載する。

(3)出版図書

区分: ①出版著書、②雑誌(注)(1)学術論文に記載したものを除く、重複記載をしない。)、③年報、④広報誌、⑤その他

整理番号	区分	著書名(タイトル)	著者名	機関名	出版社	発行年	発行月
1	④	豚品種改良の動向と研究成果への期待(シンポジウム「ゲノム情報を活用した豚品種改良の最前線」の概要)	上西博英	農研機構生物機能利用研究部門	畜産技術協会	2017	2

注1)機関名は当該成果に関与した代表・共同機関名を記載する。

注2)複数機関ある場合は著者名の順番と合わせる。

(4)国内特許権等

整理番号	特許権等の名称	発明者	権利者(出願人等)	機関名	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日
1	ウシの受胎率の判定方法	杉本真由美	家畜改良センター	家畜改良センター	特許権	特願2014-183157	2014年9月9日	

注1)「特許権等の種類」には、特許権、実用新案権、意匠権、回路配置利用権及び品種登録を記載する。

注2)複数の機関による共同出願の場合は、主となる出願人の下に行を追加し、共同出願人の情報を記載する。

(5)国際特許権等

整理番号	特許権等の名称	発明者	権利者(出願人等)	機関名	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	出願国
	「該当無し」								

注1)複数の機関による共同出願の場合は、主となる出願人の下に行を追加し、共同出願人の情報を記載する。

(6)報道等

区分:①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映、④その他

区分	記事等の名称	掲載紙・放送社名等	掲載年	掲載月	掲載日	機関名	備 考
	「該当無し」						

注1)機関名は当該成果に関与した代表・共同機関名を記載する。

(7)普及に移しうる成果

区分:①普及に移されたもの、製品化して普及できるもの、②普及のめどがたったもの、製品化して普及のめどがたったもの、③主要成果として外部評価を受けたもの

区分	成果の名称	機関名	普及(製品化) 年月		主な利用場面	普及状況
	「該当無し」					

注1)区分は複数可。

注2)機関名は当該成果に関与した代表・共同機関名を記載する。

(8)発表会の主催の状況

(シンポジウム・セミナー等を記載する。)

整理番号	発表会の名称	年月日			開催場所	参加者数	機関名	備 考
1	ゲノム情報を活用した豚品種改良の最前線～国際競争力の向上を目指して～	2016	10	6	四ッ谷主婦会館プラザエフ	154	農研機構、ほか	

注1)機関名は当該成果に関与した代表・共同機関名を記載する。

(9)アウトリーチ活動の状況

当事業の研究課題におけるアウトリーチ活動の内容は以下のとおり。

区分: ①一般市民向けのシンポジウム、講演会及び公開講座、サイエンスカフェ等、 ②展示会及びフェアへの出展、大学及び研究所等の一般公開への参画、
③その他(子供向け出前授業等)

整理番号	区分	アウトリーチ活動	年月日			開催場所	参加者数	主な参加者	機関名	備考
1	②	アグリビジネス創出フェア(MPS抗病性育種ランドレース種系統豚「ミヤギノL2」)	2016	12	14	東京ビッグサイト			宮城県畜産試験場	

注1)機関名は当該成果に関与した代表・共同機関名を記載する。