

大分県黒毛和種における複数の半きょうだい家系を用いた  
複数 QTL マッピング法の開発

渡邊直人 藤田達男 伊藤雅之<sup>1)</sup>

京都大学、(社)畜産技術協会附属動物遺伝研究所

1) 豊後大野家畜保健衛生所

**【要 旨】**

種雄牛はこれまで遺伝的産肉能力(育種価)を推定し造成してきたが、最近では量的形質遺伝子座(QTL)の検出を目的とした QTL マッピング法を種雄牛造成に活用していくことも試みられている。しかしながら現行の QTL マッピング法では単一の半きょうだい家系しか解析出来ないなどの課題も多い。

そこで京都大学と佐々木らが 2004 年に開発した 2QTL 間エピスタシス効果を取り込んだ Multiple QTL with Epistasis Mapping 法をさらに改良し、複数の半きょうだい家系を用いた複数 QTL マッピング法を開発し、大分県で蓄積されている DNA のデータ解析を行い、育種改良に応用していくことである。

用意した半きょうだい家系は「糸福」の後代牛 192 頭、「大船 7」150 頭、「糸藤」373 頭。これらの形質情報、血統情報、DNA マーカー由来、DNA マップ情報の 4 点を準備した。また今回は解析に先立って、枝肉の生データ以外に BLUP 法による補正データ、育種価データの 2 つも用意した。

「糸福」と「大船 7」の家系を用いた複数家系の解析では、それぞれ一つの家系では検出力の弱かった部分が、二つの家系が合わさることにより検出力が上がった。よって複数家系解析が可能になったと言える。

このことにより、後代数が少ない家系でも他の家系と組み合わせることで解析を行うことにより QTL 検出頻度を高めることが可能となった。

また「糸藤」の解析では、BMS に関与するエピスタシス効果が 5 番染色体と 23 番染色体の組み合わせで検出された。

本研究の最終目的はプログラムの作成ではなく、肉用牛の育種改良に利用することであるから、研究期間終了後も永続的にデータ収集および解析を実施し、最新情報を利用した育種改良に取り組んでいく。

(キーワード：複数家系、エピスタシス効果)

**【背景及び目的】**

大分県では黒毛和種の産肉能力を改良するために種牛の遺伝的産肉能力(育種価)を推定し、これをもとに多くの高能力種雄牛を産出してきた。しかしながら育種価を用いて後代の能力を推定すると全きょうだいは同じ能力と推定され、個体選抜における限界も指摘されている。

最近では遺伝的能力の把握のために、量的形質遺伝子座(QTL)の検出を目的とした QTL マッピング法が試みられている。しかし、現行の QTL マッピング法は、異なる家系間での利用が難しいことと、後代頭数の少ない家系では QTL 検出精度が低くなることから若い種雄牛の判定は難しい。また単一の

QTL の解析であることから、QTL 間の相互作用(エピスタシス)も検出することができないため、QTL の組み合わせ効果の判定ができないなどが大きな課題として残されている。

**【試験方法】**

1. 材料

用意した半きょうだい家系は「糸福」の後代 192 頭、「大船 7」150 頭、「糸藤」373 頭の DNA サンプルと、これらの枝肉形質情報(今回の分析では枝肉重量と BMS ナンバーのみ使用)、血統由来情報。

事前に(社)畜産技術協会附属動物遺伝研究所の協力を得て DNA サンプルに PCR 及びシーケンス

操作を実施し、それぞれの個体について DNA マーカー由来情報と DNA マップ情報を得た。

## 2. プログラム

京都大学の佐々木らは 2004 年に 2QTL 間エピスタシス効果を取り込んだ Multiple QTL with Epistasis Mapping 法を開発した。翌年、同大学の三宅らが複数の半きょうだい家系の記録を同時に解析出来るように改良を施し、さらに 2007 年にはプログラムの高速化に成功している。

複数の QTL マッピングおよび相互作用を考慮できる MQEM 法を応用して複数の半きょうだい家系の分析を実施し、大分県内で蓄積されている複数の半きょうだい家系の記録を同時に用いた複数 QTL マッピングを行い、産肉性形質を支配する QTL およびエピスタシスを検出する。

また、(社)畜産技術協会附属動物遺伝研究所が開発した現行の QTL 解析ソフト「Glissado」との比較も行う。

### データの編集

解析に用いるデータは試験方法で紹介した「枝肉形質情報」、「血統由来情報」、「DNA マーカー由来情報」、「DNA マップ情報」の 4 点。

このうち「枝肉形質情報」と「血統由来情報」は京都大学の佐々木が開発した「PRETRT」というプログラムを用いて前処理を行った。

この「PRETRT」というプログラムは、諸種のデータについて分散分析を行ったり、種牛評価を行ったりする場合に、前もって素データについてエラーチェックを行ったり、選別・加工などを施したり、また基本となる統計量を計算するためのソフトである。

まずはこれまで大分県で蓄積されている枝肉データ 75766 件の平均値と標準偏差を求め、枝肉 6 形質について度数分布表を作成した。

その結果、著しく観測値が分布領域から外れている個体については分析用データから削除した。

また血統由来情報については各個体の 2 世代前ま

で調査し、血統が不明な個体については調査し補完した。

補完後、世代毎にソートをかけて解析用データを作成した。

写真 1：枝肉 6 形質の平均及び標準偏差

NO	NAME	KAZU	HEIKIN	BUNSAN	SD
1	FAIE	74044	881.7361	4525.3957	65.77124
2	KIJAN	74044	599.3719	3785.8357	61.52911
3	DMT	74044	419.0689	2712.3313	52.08304
4	RIB	74044	49.5591	53.3929	7.31924
5	BARA	74044	70.2984	71.4995	8.45384
6	SLBF	74044	28.0907	57.1922	9.33771
7	BMS	74044	5.3039	4.5022	2.12194

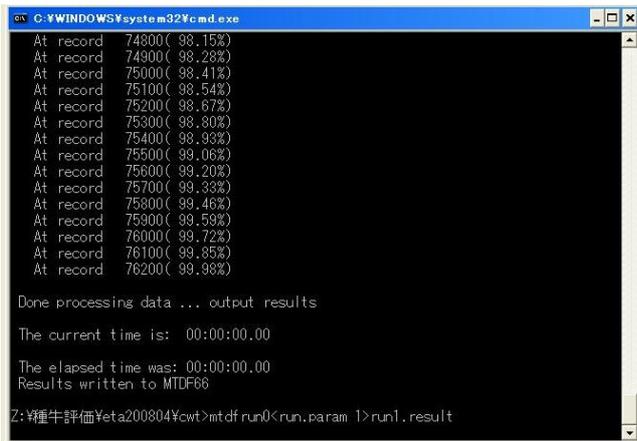
写真 2：年度毎と畜数度数分布。

NO	YEAR	DOBU	年	1	10	20	30	40	50
1	1988	878	1.2	*****					
2	1989	1301	1.5	*****					
3	1990	1983	2.3	*****					
4	1991	2470	3.3	*****					
5	1992	2505	3.4	*****					
6	1993	3501	4.7	*****					
7	1994	3324	4.5	*****					
8	1995	3143	4.2	*****					
9	1996	3055	5.2	*****					
10	1997	4599	6.2	*****					
11	1998	4883	6.7	*****					
12	1999	5197	7.0	*****					
13	2000	5224	7.1	*****					
14	2001	5045	7.2	*****					
15	2002	5761	7.3	*****					
16	2003	4194	5.7	*****					
17	2004	3898	5.3	*****					
18	2005	4951	6.7	*****					
19	2006	5038	6.9	*****					
20	2007	1974	2.5	*****					
TOTAL NO=74044		KAWU * MA 116 KAI O SHIMESU							

その後、「MTDFREML」という血統データのインシャライズ化と枝肉データから環境要因を排除した補正データの作成を行うためのプログラムを実行した。次に「GLMTEST」という検定プログラムを行った。この検定は MTDFREML で作成した補正データの母数効果について、帰無仮説の検定をおこなうプログラムである。

この検定を行い、仮説が棄却された場合、補正データが有意であることが示され、解析プログラムに用いることが可能となる。

写真 3：GLMTEST



これらの結果を用いて枝肉の観測データから補正データを作成する。

実際に枝肉成績として観測された観測データは

観測データ = (年度、性別、市場、農家などの環境要因) + (遺伝的資質) + (残差)

$$y_i = \mu + \sum_{j=1}^m a_j(2p_{ij}-1) + \sum_{K=1}^n \left\{ \sum_{l=1}^2 a_{kl}(2p_{ikl}-1) + aa_k(4p_{ik1}p_{ik2}-2p_{ik1}-2p_{ik2}+1) \right\} + \mu_i + e_i$$

ここで  $y_i$  : 個体  $i$  の BMS No.における測定値 (環境要因を補正した値)  $\mu$  : 全平均、 $\mu_i$  : 個体  $i$  のポリジーン効果 ( $\mu_i \sim N(0, A^{-1})$ 、ただし、 $A$  は分子血縁係数行列)、 $m$  : 主効果のみを示す QTL 数、 $n$  : エピスタシス効果を示す QTL のペア数、 $p_{ij}$  : 個体  $i$  が QTL $_j$  について父親から測定値を高める側のアリルを受け継いだ確率、 $a_j$  : QTL $_j$  の相加的遺伝子効果、 $p_{ikl}$  : 個体  $i$  が QTL ペア  $k$  内の QTL $_l$  について父親から測定値を高める側のアリルを受け継いだ確率、 $a_{kl}$  : QTL ペア  $k$  内の QTL $_l$  の相加的遺伝子効果、 $aa_k$  : QTL ペア  $k$  のエピスタシス (Additive-additive) 効果、 $e_i$  : 残差 である。

#### モデル内 QTL 数採択確率関数

モデル内メイン効果を持つ QTL 数、エピスタシス効果を持つ QTL ペア数の採択確率関数を以下のように設定した。

という計算式で表されるので、肥育農家による技術力の差や市場での評価の差などの環境要因を排除した遺伝的資質のみで検定を行いたい場合は上式を変形し、

遺伝的資質 = (観測データ) - (年度、性別、市場、農家などの環境要因) - (残差)  
とすればよい。

#### 数学モデル

Narita (2004) が開発した、半きょうだい家系のデータに適用できる MQEM-HS 法を用いて QTL マッピングを行った。

本法では以下の数学モデルを想定した。

$$\min \left\{ 1, \frac{p(y|\theta^*)}{p(y|\theta)} \cdot \frac{\mu_N}{(N+1)} \cdot \frac{p(\delta^*)}{p(\delta^*|y, \theta, W^*)} \cdot \frac{P_d}{P_a} \right\}$$

この関数は Jannink と Fernando(2004)が Sillanpaa と Arjas(1998)の関数を訂正したものを Yi and Xu (2002)の関数へ応用した採択確率関数を用いている。また、モデルにメイン効果を持つ QTL を加えるトライアル、エピスタシス効果を持つ QTL ペアを加えるトライアル、モデルからメイン効果を持つ QTL を除くトライアル、エピスタシス効果を持つ QTL ペアを除くトライアル、現状維持とそれぞれ等確率でランダムに行われる。

また、乱数発生プログラムを使って一連の確率変数を事後分布として生成するマルコフ・モンテカル口連鎖 (MCMC) 法のサイクル数は 4000 万回に設定した。

**【結果および考察】**

**複数の半きょうだい家系を同時に解析**

「糸福」の後代牛 192 頭と「大船 7」の後代牛 150 頭を用いて BMS ナンバー形質の解析を行った。

事前に「糸福」および「大船 7」の各半きょうだい家系について、それぞれ別々に MQEM-HS 法による解析を行った（図 1）。

図 1 左図に示すように糸福の後代 192 頭だけの解析では染色体上に BMS ナンバーに関する QTL が存在するかも知れないが、鮮明に現れていないので判断が付きにくい。

図 1 中央図の大船 7 の後代 150 頭の解析についても同様である。解析に用いることが出来た個体数が少なかったため、BMS ナンバーに関する QTL が存在しているかも知れないが、鮮明には現れていない。

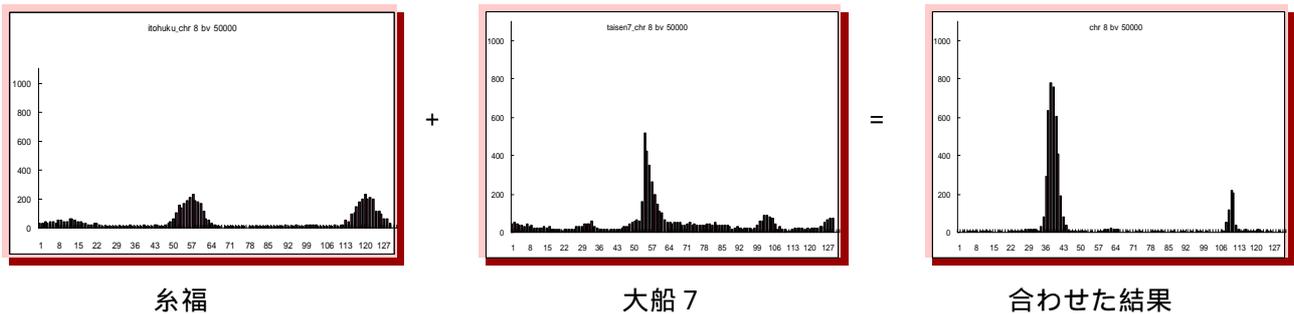
QTL 解析で推奨される後代頭数は概ね 200 頭以上であるが、今回の 2 家系はそれぞれ 192 頭と 150 頭で 200 頭を下回る頭数であったため、それぞれの家系で個別に解析を行ってもピークが鮮明に現れなかった。

そのため、この二つの家系を合わせた解析を行い、比較検討した。

その結果、「糸福」「大船 7」それぞれの家系では検出力が低かった領域でより鮮明なピークが検出された。（図 1 右図）

糸福、大船 7 の 2 家系単独では鮮明でなかったピークが鮮明になり、またそれ以外の領域の採択回数は減り、より QTL が存在するであろう領域が鮮明に現れた。

図 1：糸福、大船 7 および糸福と大船 7 の結果を組み合わせさせた解析結果



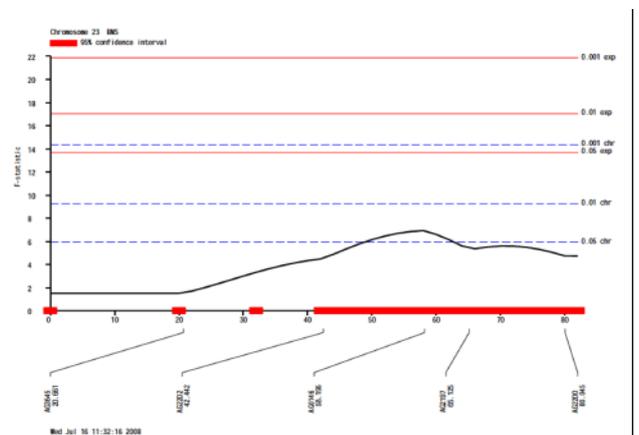
**MQEM-HS 法と Glissado 法の解析比較**

前述の（社）畜産技術協会附属動物遺伝研究所が開発した解析ソフト「Glissado」を用いた場合の結果を示す。（図 2）

Glissado は大分県と同様、動物遺伝研究所と共同で黒毛和種の DNA 解析を行っている道県で広く使われている現行では QTL 解析にもっとも適した解析ソフトであり、その信頼性も高い。

Glissado の解析では BMS ナンバーに関する QTL が 23 番染色体上のおよそ 50 ~ 62cM の領域で危険率 5% 以下の確率で有意に差が見られた。

図 2：第 23 番染色体、BMS ナンバーの Glissado での解析結果



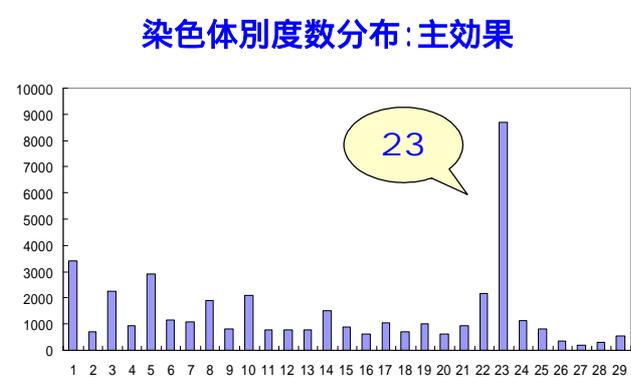
続いて MQEM-HS 法の解析結果を図 3 に示す。  
これは第 1 番から第 29 番染色体までの牛の常染色体全体の解析結果である。

横軸が染色体番号、縦軸が QTL 数採択回数である。

この数が多いほど BMS ナンバーと関連性がある QTL が存在する可能性が高いことになる。

この結果でも Glissado での解析結果と同様に第 23 番染色体に BMS ナンバーに關与する QTL が存在することが示唆された。(図 3)

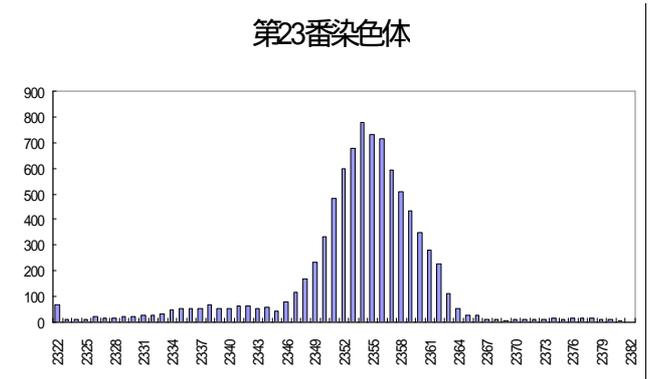
図 3：MQEM-HS 法による BMS ナンバーの染色体全体の解析結果



続いて MQEM-HS 法による第 23 番染色体上での QTL 解析結果を示す。

グラフ横軸の始点と終点が、Glissado は染色体の先端から末尾までであるが、MQEM-HS 法は DNA マーカーがそれぞれ始点と終点になるため、ピークの若干が異なるように見えるが、マーカーの一方から判断すると位置は一致している。(図 4)

図 4：MQEM-HS 法での第 23 番染色体の結果

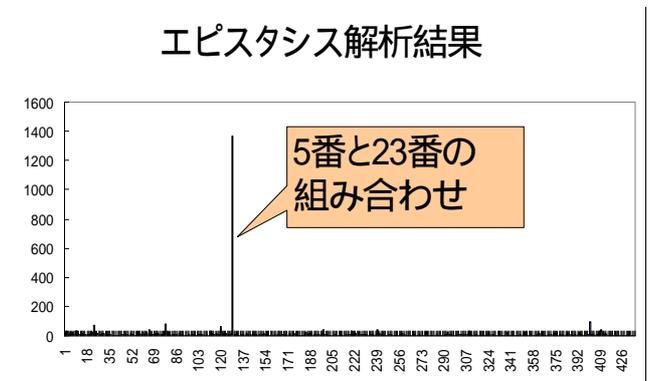


また、Glissado では検証できないエピスタシス効果についても検証を行った。

第 1 番染色体から第 29 番染色体までをそれぞれ組み合わせ 435 組の染色体同士のペアを作成し、それぞれが組み合わせられた時に BMS ナンバーに効果を示すかどうかの検証を行った。

その結果、第 5 番染色体と第 23 番染色体の組み合わせでエピスタシス効果が見られた。(図 5)

図 5：エピスタシス効果の検証



第 5 番染色体は単独では BMS ナンバーに効果を示さないが、第 23 番染色体と組み合わせることで効果を示している。

また第 23 番染色体は単独でも効果を示し、かつ第 5 番染色体と合わさることでエピスタシス効果も示すことが判明した。

第 5 番染色体および第 23 番染色体のそれぞれの染色体上でのエピスタシス効果を示す QTL の分布を図 6,7 に示す。

図 6：第 5 番染色体上でのエピスタシス効果領域

第5番染色体上でのエピスタシス  
効果領域

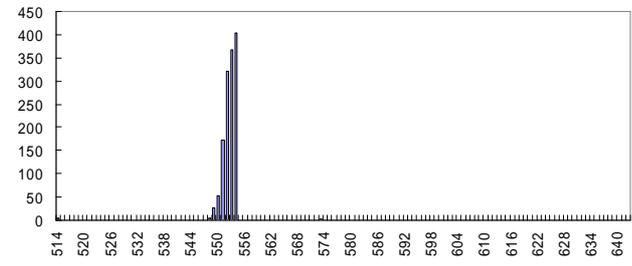
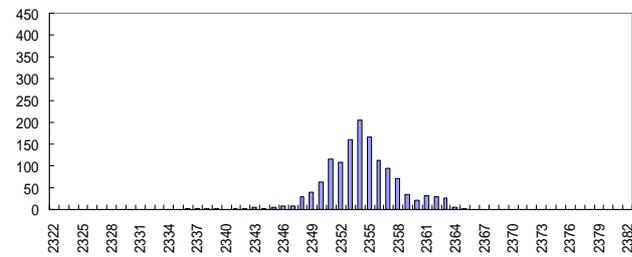


図 7：第 23 番染色体上でのエピスタシス効果領域

第23番染色体上でのエピスタシス  
効果領域



BMS ナンバーについての結果をまとめると、Glissado で確認されていた QTL が MQEM-HS 法でも確認された。QTL が存在する領域は第 23 番染色体の 58cM 付近が頂点であり、この領域の置換効果は 0.36 になることが判明した。

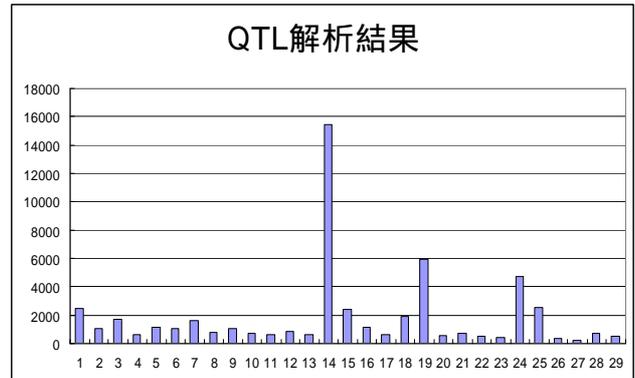
また、第 5 番染色体と第 23 番染色体上にエピスタシス効果がある QTL があることが判明した。それぞれの位置は第 5 番染色体の 45cM 付近と第 23 番染色体の 54cM 付近であった。エピスタシス効果は 0.477 であった。

今回このプログラムを用いて枝肉重量形質に関する解析も行った。

その結果、第 14 番、第 19 番および第 24 番染色体上に枝肉重量に関する QTL が検出され、それぞれの染色体上での位置はおよそ 95cM、およそ 80cM およびおよそ 72cM で、置換効果は 12.0kg、9.0kg および 9.0kg だった。

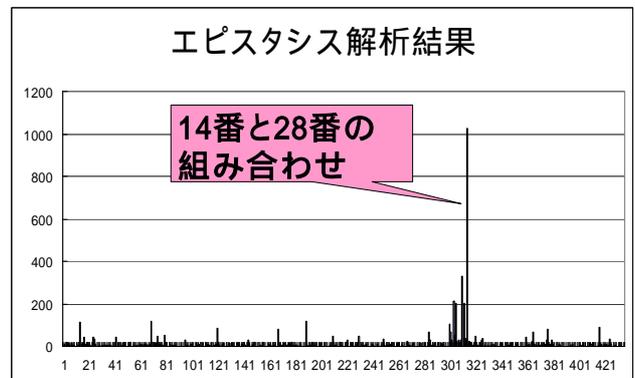
第 14 番染色体では 2004 年に溝下らによって発見された CW-1 という枝肉重量に關与する非常に効果の高い QTL が存在するので、今回検出された QTL もその可能性が高い。(図 8)

図 8:MQEM-HS 法による枝肉重量の解析結果



エピスタシス効果について検索したところ、第 14 番染色体と第 28 番染色体の組み合わせで効果が見られた。(図 9)

図 9：枝肉重量のエピスタシス解析結果



それぞれの位置は第 14 番染色体上のおよそ 42cM と第 28 番染色体上のおよそ 35cM で、エピスタシス効果は 17kg であった。

今回開発した MQEM-HS 法により、後代数が少ない家系でも他の家系と組み合わせで解析を行え、QTL の検出頻度を高めることが可能となった。

また昨年、三宅ら(京都大学)がプログラムの改善を行った結果、前年度に比べてプログラムが高速化し、さらに検出頻度は以前と変わらないようになった。

本研究の最終目的はプログラムの作成ではなく、肉用牛の育種改良に利用することであるから、研究期間終了後も永続的にデータ収集および解析を実施し、最新情報を利用した育種改良に取り組む。

具体的には QTL 解析を行い、枝肉形質に有用な QTL を検出し、父牛からそれを受け継いだ優秀な種雄牛を選抜していく。

また、種雄牛の選抜に付随して基礎雌牛などの整備も行っていけば大分県の改良に大きく貢献することが期待される。

#### 【謝辞】

本試験を行うに際し、ご指導いただいた京都大学大学院農学研究科 動物遺伝育種学研究室 三宅 武先生をはじめ、DNA 解析に協力いただいた(社)畜産技術協会附属動物遺伝研究所の先生方ならびにスタッフの方々に深く感謝致します。

#### 【参考文献】

- 1) 黒沢舞子 . MQEM ( Multiple-QTL-with-Epistasis Mapping ) 法による大分県黒毛和種の脂肪交雑に関する QTL マッピング 2006
- 2) 佐々木義之 . 肉牛における種牛評価システム -前処理のためのコンピュータプログラム「PRETRT」 1990
- 3) 守屋和幸、高柳誠二、佐々木義之 . 混合モデルにおける母数効果の仮説検定プログラム「GLMTEST」 1998
- 4) 高須賀晶子 . 黒毛和種経済形質のゲノム解析 2007
- 5) Y.Sasaki, T.miyake, C.Gaillard, T.Oguni, M.Matsumoto, M.Ito, T.Kurahara, Y.sasae, K.Fjinaka, S.Ohtagaki, and T.Dougo. Comparison of genetic gains per year for carcass traits among breeding programs in the Japanese Brown and the Japanese Black cattle J.Anim.Sci.2006.84:317-323
- 6) T.Miyake, A.Narita, M.Kurosawa, H.Nakaoka, T.Watanabe, K.Yokouchi, Y.Sugimoto, M.Ito, T.Fujita, T.Yamada and Y.Sasaki. Detection of Epistatic QTLs for Beef Marbling by Bayesian MQEM Method in Japanese Black Cattle
- 7) 三宅武、山田宜永、中岡博史、成田暁、佐々木義之 . MCMC 法を用いたベイズ推定法に基づく複数 QTL マッピング法の特徴と有効性。動物遺伝育種研究(2006)34(1)、17-29
- 8) Y.Mizoguchi, T.Watanabe, K.Fujinaka, E.Iwamoto and Y.Sugimoto. Mapping of quantitative trait loci for carcass traits in a Japanese Black(Wagyu) cattle population. Animal Genetics, 37, 51-54

9) L.J.Alexander, M.D.MacNeil, T.W.Geary, W.M.Snelling, D.C.Rule and J.A.Scanga. Quantitative trait loci with additive effects on palatability and fatty acid composition of meat in a Wagyu-Limousin F2 population. *Animal Genetics*, 38, 506-513

10) Akiko Takasuga, Toshio Watanabe, Yasushi Mizoguchi, Takashi Hirano, Naoya Ihara, Atsushi Takano, Kou Yokouchi, Akira Fujikawa, Kazuyoshi Chiba, Naohiko Kobayashi, Ken Tatsuda, Toshiaki Oe, Megumi Furukawa-Kuroiwa, Atsuko Nishimura-Abe, Tatsuo Fujita, Kazuya Inoue, Kazunori Mizoshita, Atsushi Ogino, Yoshikazu Sugimoto. Identification of bovine QTL for growth and carcass traits in Japanese Black cattle by replication and identical-by-descent mapping. Springer Science Business Media, Inc 2007 Volume 18, 125-136

11) K.Mizoshita, T.Watanabe, H.Hayashi, C.Kubota, H.Yamakuchi, J.Todoroki, and Y.Sugimoto. Quantitative trait loci analysis for growth and carcass traits in a half-sib family of purebred Japanese Black(Wagyu) cattle. *J.Anim.Sci.*2004 82:3415-3420

12) Kazunori Mizoshita, Atsushi Takano, Toshio Watanabe, Akiko Takasuga, Yoshikazu Sugimoto. Identification of a 1.1-Mb region for a carcass weight QTL on bovine Chromosome 14. Springer Science Business Media, Inc 2005 Volume 16, 532-537