

## トピック

## DNA マーカーを用いた豚の育種改良研究について

藤村達也、両角岳哉、高萩陽一（日本ハム(株)中央研究所）

Fujimura, T., Morozumi, T. and Takahagi, Y. (2017). DNA marker assisted breeding to improve disease resistance in pig.  
*Proc. Jpn. Pig Vet. Soc.* 70, 19-24.

キーワード：抗病性育種、PRRS ウイルス、ゲノム編集

## 1. はじめに

ニッポンハムグループは、食肉、食肉加工品、デリ食品、水産品、乳製品などの13の領域で事業を行っている食品企業である。グループ全体の売上額は、約1兆2400億円（平成28年3月）であるが、その社名にもなっているハム・ソーセージなどの食肉加工品の売上比率は10数%に過ぎず、売上げの50%以上を食肉の販売が占めている。企業方針として掲げているパーティカルインテグレーションシステムは、家畜の生産から処理加工、販売までのバリューチェーンを自社で行う一貫生産であり、その川上にある生産事業は、当社の基幹事業の1つである。牛の生産拠点は海外が中心であるが、豚と肉用鶏の生産拠点は大部分が国内に存在している。その中で養豚農場は北海道、東北、南九州の3か所を拠点とし、年間約60万頭の肉用豚を出荷している。弊社の農場は大規模化・集約化が進んでおり、最も飼養頭数（年間出荷頭数）が多い農場においては、年間約7万頭に達している。

国内養豚業全体においても大規模化・集約化が進んでいる。畜産統計によると、平成28年度は全国で9,313,000頭の豚が飼育されているが、ここ30年で飼養頭数にそれほど大きな変化はない。一方、飼養戸数は74,200戸から4,830戸まで大幅に減少しているため、1戸当たりの飼養頭数が149.1頭から1928.2頭と13倍近くにまで増加している。このような大規模化・集約化は、低コスト生産や生産効率の向上を目的としたものであるが、一方で、家畜へのストレス増加、微生物やウイルスの農場への蓄積、さらには豚繁殖・呼吸障害症候群（porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS）や豚流行性下痢（porcine epidemic diarrhea, PED）などの過去には存在しなかったウイルス

感染などによる疾病の増加、または、日和見感染症や複合感染といった新たな問題が発生してきている。特に大きな問題となっているのが、様々な感染症の発生による事故率の増加である。

感染症は、ウイルス、細菌、原虫あるいは真菌などの病原微生物が豚に感染し、体内で増殖して発症する疾病であり、これらの発生を最小限に抑制することが、感染症に対する抵抗性が未熟な哺乳豚や離乳後の子豚の事故率低減のために重要である。

養豚現場の疾病対策は大きく分けて、3種類に分類される。1つ目は、ワクチンや抗生剤などの薬剤投与による予防・治療である。2つ目としては、豚舎の構造などを改善したり、清掃や消毒を徹底して行ったりといった環境面からの対策である。しかしながら、これらの対策には、新たな設備投資が必要になったり、労力やコストがかかったりするため、必ずしも万全な対策が講じられないことも多い。

3つ目の対策として、遺伝子情報を活用した育種改良があげられる。病原菌やウイルスの侵入に対する免疫応答力は、遺伝的要素も強く影響する。しかしながら、遺伝子情報を活用した育種は産仔数や飼料効率の向上などを指標とした改良には積極的に活用されているが、病気への抵抗性に関してはこれまで積極的に活用されていない。その理由として、産仔数や増体重などの明確な指標と異なり、抗病性を評価する手法が固まっていない点があげられる。そこで今回我々は、3つの抗病性指標を用いて育種選抜に活用した<sup>7)</sup>。これらの結果と合わせて、近年の技術革新を活用した将来展望についても紹介したい。

## 2. 抗病性育種による個体選抜と遺伝子マーカーの探索

まず我々は、大ヨークシャー種において抗病性育種を試みた。理由として、大ヨークシャー種は、国内で

圧倒的なシェアを持つ交雑肉用種の母豚集団を形成する主要な品種であるため、大ヨークシャー種の抗病性を高めることは、肉用種の子豚の事故率低下に大きな影響を与えると考えられるからである。

実験では、当社グループの種豚農場において、大ヨークシャー種の雄22頭、雌53頭の小規模閉鎖集団を基礎集団として3種類の免疫形質を指標とした育種選抜を行った。免疫形質には、白血球貪食能、補体代替経路活性、豚丹毒ワクチンに対する抗体産生能の3つを使用した。白血球貪食能は、体内にある異物排除能力の指標として、ザイモザン貪食時の活性酸素類による発光をルミノールで増幅した化学発光を測定した。補体代替経路活性は、自然免疫能力の指標として、ウサギ赤血球感作後の赤血球破壊率を測定した。豚丹毒ワクチンに対する抗体産生能は、獲得免疫能力の指標として、豚丹毒ワクチン接種後の特異的抗体 (IgG) 産生量を測定した。各能力値の合計を免疫総合育種価とした。育種選抜は、免疫総合育種価の高い集団 (高免疫能群) から約15頭の雄と約50頭の雌を、近親交配が高まり過ぎないように調整したうえで選抜し、交配させ産仔を獲得し、第1世代とした。すべての産仔で3種類の免疫形質の測定と免疫総合育種価の算出を行い、同様に高免疫能群を選抜し第2世代とした。育種選抜は、第6世代まで実施し、各世代の産子の免疫形質の測定と育種価による選抜効果の評価を行った。いずれの免疫形質の育種価についても第6世代までほぼ直線的な上昇がみられた (図1)。選抜指標に用いた免疫形質の遺伝率はそれぞれ0.2以上であるのに対し、各形質の遺伝相関は弱いことから、各形質ともに選抜による改良が同時に可能であることが示唆された。

育種選抜の結果、3つの指標それぞれの育種価が高

まることが分かったので、次に免疫能の違いが実際の農場でどのぐらいの効果を発揮するかを調べるために、第3世代、第4世代それぞれの後代を用いて検討した。各世代で免疫総合育種価が高い群 (高免疫能群) と低い群 (低免疫能群) それぞれをマイコプラズマ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) 陽性農場に導入し、効果を比較した。第3世代、第4世代それぞれの後代について、高免疫能群・低免疫能群の種豚を掛け合わせて後代を生産し、それぞれを別々の農場 (第3世代後代はA農場、第4世代後代はB農場) で出荷まで飼養し、生産性に関与する形質 (事故率、1日増体重、MPS病変、肉質等級) を比較した (表1)。事故率は出荷までの死亡個体数と総個体数の比で算出し、1日増体重は日齢あたりの枝肉重量で算出した。また、MPS病変は屠畜場における目視によるスコアで評価した。肉質等級は屠畜場による格付け値を使用した。

事故率は両農場とも改善傾向が見られた。統計的に

#### ➤A農場

	母豚数	産子数	子豚推定平均免疫総合育種価
高免疫群	6	67	3.85
低免疫群	4	39	0.69

#### ➤B農場

	母豚数	産子数	子豚推定平均免疫総合育種価
高免疫群	3	22	4.52
低免疫群	4	40	1.50

表1：第3世代 (A農場) と第4世代 (B農場) の高免疫群および低免疫群の育種価<sup>7)</sup>

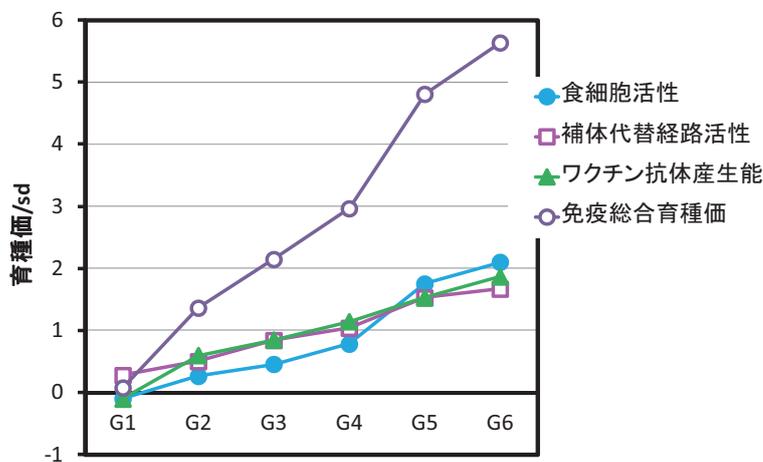
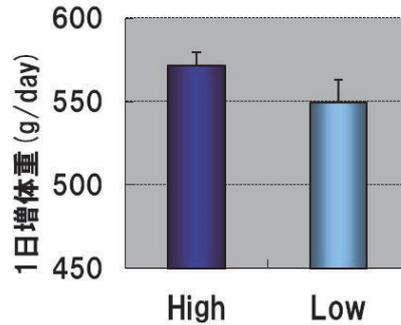
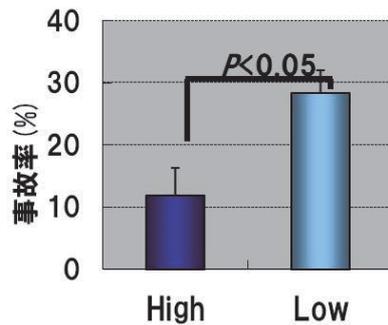


図1：後代ごとの免疫指標の育種価と免疫総合育種価の推移<sup>7)</sup>

➤A農場



➤B農場

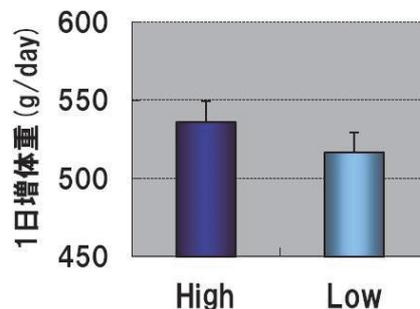
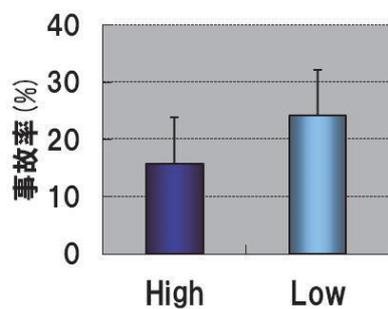


図2：A, B農場それぞれにおける高免疫群 (High) と低免疫群 (Low) 後代の事故率と1日増体量の比較。<sup>7)</sup>

は第3世代を用いた農場でのみ有意差が見られた。1日増体重に関しては、両農場とも有意な差は見られなかったが、増加傾向は見られた(図2)。MPS病変率や肉質等級はほぼ変化は見られなかった。

第3～4世代の上位下位合計568頭について、豚ゲノム上に配置された6万個のSNPの遺伝子型を同時判定できるPorcineSNP60 BeadChip (60Kチップ)でジェノタイピングを行い、各免疫能の育種価との相関を解析した。食細胞活性は第2染色体、補体代替経路活性は第2および第4染色体、豚丹毒ワクチン特異的抗体産生能は第4および第14染色体に有意な相関が検出された。

豚ゲノム情報を用いて有意となった領域中の遺伝子検索を行い、食細胞活性については第2染色体138.1-139.1Mb領域のHINT1、LYRM7、CDC42SE2、RAPGEF6の4遺伝子が、補体代替経路活性については第2染色体19.5-22.0Mb領域のEXT2、ACCS、ALKBH3、TTC17、API5の5遺伝子と第4染色体の22.6-23.9Mb領域のSLC30A8、RAD21、UTP23、EIF3Hの4遺伝子が、豚丹毒ワクチン応答については第4染色体の39.9-42.5Mb領域のRGS22、VPS13B、OSR2、STK3、STK4、KCNS2、NIPAL2、POP1、RPL

30、HRSP12、MATN2、LAPTM4B、MTDHの13遺伝子と第14染色体の99.6-110.0Mb領域のTMEM72、CXCL12、ZNF239、ZNF32、RPL37A、PCDH15、DKK1、PRKG1、CSTF2T、A1CF、ASAH2、SGMS1、MINPPI、PAPSS2、ATAD1、PTEN、LIPK、LIPN、LIPM、ANKRD22、STAMBPL1の21遺伝子が存在し、これらが候補遺伝子と考えられた。さらに、高免疫能群と無選抜群の血液由来マクロファージにおけるlipid A及びpolyI:C刺激に対する遺伝子発現の違いをマイクロアレイで解析し、豚群間で発現変化に差が検出された免疫系遺伝子を抽出した。これらの免疫系遺伝子のプロモーター領域について次世代シーケンサーを用いた多型検索を行い、TRIM21、STAT3、TMEM150C、RNASEL、SAMHD1に豚群間で有意に分布パターンの異なるSNPを検出した。これらの候補遺伝子プロモーター領域では、高免疫能群には親から子に染色体が受け継がれた特徴的な保存領域の存在が予想される。組換えが起こらずに同じような遺伝様式を示す染色体上のひとまとまりのSNPの組み合わせ(ハプロタイプ)を推定し、高免疫能群に特徴的なハプロタイプを抽出した。

### 3. PRRS ウイルス感染を防御する遺伝子マーカーの探索

養豚現場で最も経済損失の大きい疾病は PRRS であると言われている。その年間経済損失は、米国で 6 億 6,400 万ドル、日本で 280 億円<sup>10)</sup>と報告されている。PRRS は 1987 年に初めて米国で見つかり、その後急激に世界に拡大した豚の新興感染症である。子豚では慢性間質性肺炎、発育不全などを起こし、妊娠豚の早産、死産や虚弱子分娩などの繁殖障害、成豚で呼吸困難など肺炎の症状を起こすが、病原体である PRRS ウイルス (PRRSV) の伝播力が強くマクロファージで増殖するので、個体全体の免疫力が低下し、他の疾病との複合感染を起こしやすいことが特徴である。PRRSV はアルテリウイルスに属するゲノムサイズ約 15kb のプラス鎖の 1 本鎖 RNA ウイルスで、11 個の ORF が確認されている<sup>1)</sup>。PRRSV は遺伝子変異の頻度が非常に高いウイルスで、特に ORF5 遺伝子は遺伝的多様性が最も高く、感染防御上重要と考えられているため、この遺伝子の塩基配列を基に野外分離株の分子系統樹解析が行われている。

PRRSV のマクロファージへの感染には、マクロファージの膜上に存在する CD151、CD163、CD169、CD209、ヘパラン硫酸、ビメンチンなどが関わっていることが分かっている。ヘパラン硫酸は細胞表面でウイルスが結合する際の受容体となり、CD169 はウイルスが細胞内に取り込まれる際の受容体と考えられている。CD163 は、細胞内侵入とカプシドを脱ぎ捨てる際に必要な因子である<sup>11)</sup>。

このうち、CD163 と CD169 遺伝子について、それぞ

れ国内に存在する 15 の品種の豚 192 頭と、主要商用 4 品種各 6 頭ずつ計 24 頭の DNA を用いて多型を解析したところ、両遺伝子ともに複数の領域に遺伝子多型が存在することが明らかとなった (図 3、両角ら、論文未発表データ)。もしこれらの多型のうち、PRRSV 感染に重要な領域が欠損するなどの変化をおこして感染回避に寄与する遺伝子型が存在するのであれば、非常に有益だと考えられる。しかしながら、PRRS は複合感染をもたらし、症状が複雑化しているため、個体別の所見と遺伝子変異を単純に比較するのは困難である。

### 4. ゲノム編集技術の活用

ゲノム編集技術は、遺伝子の狙った領域に切り込みを入れ、そこに外来遺伝子を導入したり、数～数 10 塩基の欠失を誘起したりすることのできる技術である。これまでも遺伝子を組み換えたりする方法は存在したが、ゲノム編集技術はその確実性と効率性が格段に向上したため、農業や医療などの分野で飛躍的に発展してきている。畜産業界においても、この技術を活用して家畜の生産性や病気への耐性向上に役立てる研究が進められている。

豚に対するゲノム編集技術の利用も進んでおり、養豚産業的にも重要な研究成果が報告されている。1 つ目の研究成果として、PRRSV 感染の最も重要な因子の解明が行われた。まず PRRSV の受容体である CD169 遺伝子のノックアウト豚が作出された<sup>3)</sup>。しかしながら、CD169 ノックアウト豚は、PRRSV 感染を回避できなかった。次に CD163 遺伝子をノックアウトした豚が作出された<sup>9)</sup>。CD163 遺伝子ノックアウト子

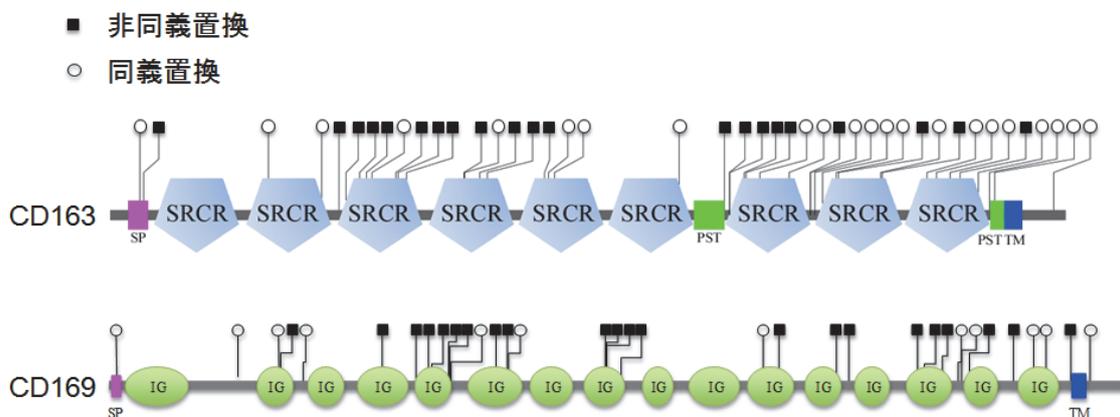


図 3 : 豚の CD163 と CD169 のドメイン構造模式図。同義置換を白抜き丸、非同義置換を黒塗りの四角で示した。ドメイン構造は SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) を用いて推定した。SP: signal peptide, SRCR: scavenger receptor cysteine rich, PST: proline, serine threonine rich region, TM: transmembrane, IG: immunoglobulin.

豚3頭を7頭の正常な子豚と同じ豚舎内で約10万感染単位のPRRSVを接種したところ、5日目に正常豚は発熱し発病したが、CD163遺伝子をノックアウトした豚は35日の観察期間中、発病は見られなかった。またウイルス抗体は産生されなかった。これらの結果より、PRRSVへの感染には、CD163が必須の因子であることが明らかとなってきた。

2つ目の研究成果として、ミオスタチン遺伝子のノックアウトによるダブルマッスル豚の作出が試みられた。ミオスタチンはTGFβスーパーファミリーに属するタンパク質で、発生の段階で筋芽細胞の増殖と筋管細胞への分化を制御すると考えられており、その遺伝子欠損型は、極端な筋肥大をもたらすことが分かっている。牛では、ミオスタチン遺伝子に複数の突然変異で現れた多型があり、これらが筋肥大をもたらしていることが分かっているが、豚では発見されていなかった。その後いくつかのグループにおいて、ゲノム編集技術を用いて、ミオスタチン遺伝子のノックアウト豚作出に成功した<sup>4,5,8)</sup>。牛ほど劇的な変化ではなかったが、牛と同様の筋肥大が見られた(図4)。

ゲノム編集技術は、対象領域に1塩基置換を誘発す

ることも可能である。これまでに、TALEN法を用いてヒト大腸がん細胞で1塩基置換を成功させた例<sup>9)</sup>や、CRISPR/Cas9を用いて、マウスで1塩基置換を成功させた例<sup>6)</sup>などが存在するが、豚ではまだ成功事例が存在しない。

おわりに

ここ10年ぐらいのうちに、欧米の種豚メーカーは、ゲノム育種の手法を積極的に取り入れて品種改良を加速させており、特に、1日増体重や離乳時産仔数などは飛躍的に向上している。一方、抗病性や肉質を指標とした育種改良はまだ積極的に進められていない。今回我々は、白血球貪食能、補体活性、抗体産生能の3つの指標を用いることで、抗病性育種選抜が可能であることを示し、遺伝子マーカーの候補を選抜することに成功した。今後はこれらの遺伝子マーカー候補が、抗病性育種選抜の指標として機能するかどうか検証する必要がある。しかしながら、マーカー候補の数が増えれば増えるほど、検証には多数の母集団が必要となり、時間もコストもかかることになる。

ゲノム編集技術は、目的の変異を効率的に導入する

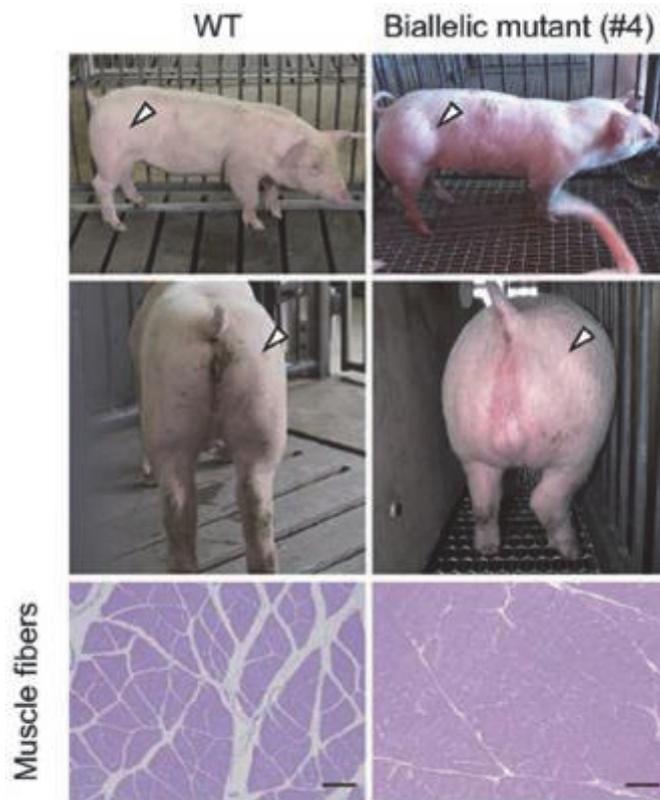


図4：ミオスタチン遺伝子を欠損した豚（Biallelic mutant）と野生型（WT）との比較。最下段は筋線維の断面の比較。Biallelic mutant では筋繊維の過形成が観察される。

ことが可能であり、マーカー候補の効果の検証を迅速かつ効率的に行うツールとなる可能性があり、未だ活用されていない遺伝資源の活用に繋がることも期待される。まだまだ技術的なハードルは高いが、今後ますます注目されていく技術であるのは間違いないだろう。

全ての著者は開示すべき利益相反はない。

#### 引用文献

- 1) Lunney JK, et al. (2016) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): Pathogenesis and interaction with the immune system. *Annu Rev Anim Biosci*, 4:129-154
- 2) Ochiai H, et al. (2014) TALEN-mediated single-base-pair editing identification of an intergenic mutation upstream of BUB1B as causative of PCS (MVA) syndrome. *Pros Natl Acad Sci USA* 111: 1461-1466.
- 3) Prather RS, et al. (2013) An intact sialoadhesin (Sn/SIGLEC1/CD169) is not required for attachment/internalization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol*. 87: 9538-9546.
- 4) Qian L, et al. (2015) Targeted mutations in myostatin by zinc-finger nucleases result in double-muscling phenotype in Meishan pigs. *Sci Rep*. 24; 5:14435.
- 5) Rao S, et al. (2016) Efficient modification of the myostatin gene in porcine somatic cells and generation of knockout piglets. *Mol Reprod Dev*. 83: 61-70.
- 6) Singh P, et al. (2015) The genetics of human infertility by functional interrogation of SNPs in mice. *Pros Natl Acad Sci USA* 112: 10431-10436.
- 7) 高萩陽一ら (2012) 複数の免疫形質を指標とした豚の抗病性育種. 日本畜産学会第115回大会
- 8) Tanihara F, et al. (2016) Somatic cell reprogramming-free generation of genetically modified pigs. *Sci Adv*. 14:e1600803.
- 9) Whitworth KM, et al. (2016) Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Nat Biotechnol* 34: 20-22.
- 10) 山根逸郎 (2010) 日本の豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) による経済的被害の現状. 日獣会誌、63, 413-416.
- 11) Zhang Q, et al. (2015) PRRS virus receptors and their role for pathogenesis. *Vet Microbiol*, 177: 229-241