

合成系統豚トウキョウ X の遺伝学的研究

2020 年

田原 岳

目次

第1章 緒論.....	1
第1節 養豚史.....	1
第2節 トウキョウ X とは.....	5
第3節 背景および目的.....	7
第2章 トウキョウ X の遺伝的多様性および集団構造の評価.....	8
第1節 諸言.....	8
第2節 材料および方法.....	10
第3節 結果.....	15
第4節 考察.....	30
第5節 小括.....	33
第3章 合祖理論に基づくトウキョウ X の系統遺伝学的特性.....	34
第1節 諸言.....	34
第2節 材料および方法.....	36
第3節 結果.....	44
第4節 考察.....	60
第5節 小括.....	62
第4章 小規模の閉鎖群により維持されているトウキョウ X の遺伝的特性の年次推移 ...	63
第1節 諸言.....	63
第2節 材料および方法.....	65
第3節 結果.....	68
第4節 考察.....	92
第5節 小括.....	96
第5章 総括.....	98
Summary	101
謝辞.....	104
引用文献	105

第1章 緒論

第1節 養豚史

豚 (pig; swine; hog) は、イノシシが家畜化されたものである。豚とイノシシは哺乳動物綱 (Mammalia) , 鯨偶蹄目 (Cetartiodactyla) , イノシシ亜目 (Suiformes) , イノシシ科 (Suidae) , イノシシ属 (*Sus*) に属している。イノシシ科には、イノシシ (*Sus*) , イボイノシシ (*Phacochoerus*) , カワイノシシ (*Potamochoerus*) , モリイノシシ (*Hylochoerus*) およびバビルサ (*Babryrousa*) の5属がある。イノシシ属にはイノシシ (*Sus scrofa*) , コビトイノシシ (*S. salvanius*) , ヒゲイノシシ (*S. barbatus*) , スンダイボイノシシ (*S. verrucosus*) の4種があり、イノシシは更に、ヨーロッパイノシシ, アジアイノシシ, ニホンイノシシ, リュウキュウイノシシなどの亜種に細分化されるが、ヨーロッパイノシシとアジアイノシシがそれぞれの地域の豚の野生原種と考えられている (古川, 2001)。

イノシシの家畜化には人間側の要因と動物側の要因とが関わっていると考えられる。人間にとってイノシシはシカとともに狩猟の獲物として重要な動物であった。また、イノシシは雑食性の動物であり、人間が栽培する作物や食料の残りを求めて人間の住居地域に出没した。このような中でイノシシの仔が人間に飼われるようになり、馴致性, 多産性, 雑食性, 肉の食味性などが人間の要求と合致して家畜化されたものと考えられる (古川, 2001)。

ヨーロッパとアジアの豚の起源は異なり、ミトコンドリア (mt) DNA を指標に用いた豚の起源や系統史の研究によれば、豚の mtDNA はヨーロッパ型とアジア型に分離し、両者間の分岐年代は50万年 (30~100万年) 前後と推定されている (Ursing and Arnason, 1998; Giuffra *et al.*, 2000; Okumura *et al.*, 2001)。イノシシの家畜化の歴史がわずか1万年程度であることから、イノシシの家畜化は、ヨーロッパ型ハプロタイプを保有している野生集団と、アジア型ハプロタイプを保有する野生集団から、それぞれ独立して始まったことは間違いないと考えられる。家畜化の起源地域としては、メソポタミアやアナトリアの古代遺跡から豚の存在が示されていることから、ヨーロッパ型 mtDNA ハプロタイプを保有する豚は中東で家畜化された後、ヨーロッパ世界に広がったという考え方が一般的であった (Epstein and Bichard, 1984)。しかし、Larson *et al.* (2005) は、世界各地のイノシシの mtDNA を解析し、現在の中東地域に分布するイノシシが保有する mtDNA は、家畜豚のヨーロッパ型ハプロタイプとは異なることを明らかにした。ヨーロッパ中央部のイノシシ (*S. s. scrofa*) が豚のヨーロッパ型ハプロタイプを保有していることから、現在の豚につながる家畜化はヨーロッパ世界で行われたことが明らかである。アジア型ハプロタイプを持つイノシシの家畜化の中心が中国の古代文明であることは、8,000年前頃の中国各地の遺跡から大量の豚の骨が発見されていることから異論はないとされている (黒澤ら, 2009)。

一方、大ヨークシャー種やデュロック種のような欧米型改良品種は、ヨーロッパもしくは米国で近代育種によって作出されたものであるが、ヨーロッパの在来豚を唯一の起源と

して改良されたものではない。18 世紀以降、ヨーロッパには中国から多くの豚が輸入され、ヨーロッパの在来の集団と交配され、特に繁殖能力の改良に貢献している。この結果として、今や世界中に導入され、グローバル品種とでも呼ぶべき大ヨークシャー種、ランドレース種、およびデュロック種など改良品種は平均すると 3 割程度の個体がアジア型の mtDNA を保有している。言い換えれば、企業的養豚に用いられる豚の多くが中国系豚とヨーロッパ系豚の交雑を起源として改良された集団である。つまり、豚の mtDNA はアジア型とヨーロッパ型に容易に分類することができるが、mtDNA 型に基づいて現在の欧米系品種とアジアの豚を分離することはできないのである。このことは、中国系豚を用いて改良された改良豚の拡がりによって、現在、世界中の養豚は支えられているということであるが、それ以前のヨーロッパ在来豚の姿を残す豚はほとんど残っていないということである（黒澤ら、2009）。

日本に近い中国は、前述したように世界で家畜家禽を最も早く馴化した国の一つである。20 世紀に入って考古学者は、中国各地の古代文化遺跡の中から多くの豚の遺骸を発掘している。1921 年、河南省滎池県仰韶村の新石器時代の文化遺跡の中から、最初に多くの豚の骨格が発掘されたことから、紀元前約 3000 年、即ち今から約 5,000 年前の当時から既に養豚が盛んに行われていたことが確認された。その後、1973 年と 1976 年に浙江省余姚県河姆渡遺跡から、1980 年に浙江省桐郷県羅家角遺跡から多くの動物骨格が発掘されたが、その大部分はイノシシではなく豚であり、陶豚の出土も確認されている。このことから、中国の養豚の歴史は紀元前 5,000 年、即ち今から約 7,000 年前に遡ることが実証された。その後も、中国華南地区の広東省や広西省（現在の中国）の遺跡から発掘された出土文物から、6,000 年~10,000 年以前に、中国南北各地で農業生産の発展に伴い、早くもイノシシを徐々に馴化して家豚にしていったことが証明されている。数千年来中国農民は、生産実績の中で豊富な養豚経験を累積し、豚の選抜と飼育に対して独特かつ伝統的な方法を備えるに至ったとされている。即ち、豚の外形や動きから良し悪しを鑑別し、また、祖先、子孫およびその近親の生産能力によって選抜、特に、母系に重点を置いた選抜がされてきた。選抜と飼養環境条件の改善により、中国の大多数の品種は、多産かつ早熟で、太り易く、粗放管理に耐え、肉質良好なものとして世の中に知られるようになっていった（李、1986）。

中国系品種の優良な特性は早くから外国の注目を浴びており、中国華南の広東省は、漢唐以来から早熟で太り易く、繁殖能力が高いことで国内外に名を知られていた。古代ローマ（紀元 27~395 年）時代、ローマ帝国内の豚は晩熟で、成長が遅く、肉質が悪いため、需要を満たすことができなかった。このため、中国華南の豚を導入するとともに、広く在来豚の改良に用い、後にローマ豚を作出した。ローマ豚は、近代ヨーロッパの有名品種の成立に関して非常に大きな役割を果たしている。また、18 世紀初めには、英国は広東種の導入を開始し、本国品種と交配し、その後次第にヨークシャーやバークシャーが形成されていった。1818 年、英国では、ヨークシャーは大中国豚（Big China）と呼ばれていたほどである。また、バークシャーの形成過程では、明らかに中国豚の影響が更に強く及ぼされている。多くの説では、バークシャーが古いタイプの英国豚と中国豚、シャム豚の交雑によって形成さ

れたものであると考え、初期のバークシャーの改良過程では、明らかに中国豚はシャム豚に比べて、より多く用いられたと述べている。近代アメリカの一部の品種についても、多くの中国豚の血液が導入されている。このようなことから、世界の有名品種のほとんどは、中国豚の影響を受けていると考えられ、ダーウィンは、中国豚がヨーロッパ品種の中で高度な価値を具えていると説いているほどである（李, 1986）。

沖縄では、14世紀頃に中国から豚が導入されたとされ、島豚と呼ばれていた。1843年、琉球近海で遭難した英国船を救助したことから、翌年に謝礼として牛、水牛、緬羊、豚が英国から琉球に寄贈された。この豚は雌2頭、雄1頭であり、黒白斑と伝えられており、島豚に対して唐豚と呼ばれ、これらが沖縄の在来種を構成し、琉球豚と称された。明治時代に入り、在来種を改良するためにバークシャーと中ヨークシャーが用いられたが、白色の中ヨークシャーは好まれなかったため、バークシャーとの交雑が進められた。大正時代には、まだ島豚が見られたが、1935年鹿児島県から大量のバークシャー種が導入されるとともに太平洋戦争により養豚は壊滅状態となったため、純粋な在来種はほとんど見られなくなった。現在、琉球豚についてはバークシャーによって改良された豚はアグーと呼ばれ、白色班のある豚はアヨーと呼ばれて維持されている（高田ら, 2018）。

日本にも過去、沖縄と同様に大陸から養豚技術は伝わったが、中国の豚便所に象徴される多目的多利用型豚文化は成立しなかったとしており、その要因の一つとして、糞尿に対する消極的な文化的態度があげられる。即ち、当時の日本では豚便所が受け入れられずに琉球列島とは異なる、日本独自で発展させた豚飼養文化を持っていたと考えられる（黒澤ら, 2009）。

日本の養豚は中国などの大陸から養豚技術が伝わっていたようになり古くから行われていたが、正式に養豚が国の事業として積極的に推進されていったのは明治以降のことである。正式の頭数として記録されているのは明治20年で41,904頭となっている。その後、政府の積極的な普及政策と急速な国民生活の西欧化に伴う豚肉需要の拡大による養豚業の進展により日本の豚の飼養頭数も明治末には約30万頭までに至った。その後は、大正、昭和と順調に発展してきた日本の養豚も日華事変の勃発による戦局の進展に伴う飼料事情の悪化により次第に減少していった。そして、第二次世界大戦の終了時には実に20余万頭にまで減少した。この飼養頭数は明治31年の頭数にまで後退し、この後退は年数で数えると45年も元に戻ったのである。戦後の養豚はこの頭数から再出発したが、昭和21年には終戦直後の飼料事情の悪化から88,082頭にまで落ち込んだ。しかし、その後の飼料事情の好転と相まって順調に飼養頭数は増加し、昭和31年にはすでに戦前の最高水準を突破した。その後、国民生活の向上による豚肉消費の増大に伴って順調に飼養頭数も増大し、昭和53年には総頭数8,780,000頭に増加した。この間には豚肉価格の上昇に刺激されて豚の頭数の増加、それを受けての豚肉価格の下落、所謂“ピッグ・サイクル”を幾度も繰り返してきた。しかしながら、このような激しい変動を繰り返しながらも全体として拡大の方向を辿ったのは増大する豚肉消費を基本として豚の改良の促進と“交雑種利用”の急速なる進展および養

豚技術の進歩によるものであった（吉岡, 1971）。

現在、日本における一般的な豚肉は上述した“交雑種利用”を用いた三元交雑（**three-way cross**）によるものである。これによりランドレース種、大ヨークシャー種、デュロック種の3品種の豚を掛け合わせることで豚肉を生産している。豚肉生産における交雑利用の目的は、繁殖性や発育性における母系および直接の雑種強勢効果と、品種の特性を組み合わせる補完効果にある。ランドレース種と大ヨークシャー種はともに優れた大型種であり、それらの一代雑種（F1）には一腹産子数や哺育能力などに母性雑種強勢の直接効果が発現する。そのため、F1の一腹産子数は両親の平均よりも増加し、子豚の離乳時体重や1日平均増体重も純粋種より大きくなる。また、肉豚には1日平均増体重の増加とともにデュロック種の肉量と肉質が加味されるため、この3品種による三元交雑は繁殖性、発育性、枝肉の経済性において効率的な生産形態と言える（古川, 2001）。

しかし、品種内においても遺伝的な変異が大きいため、このような品種を基礎豚とした交雑ではF1母豚の能力や三元交雑種の肉豚の能力におけるバラツキが生じて斉一性のある生産を得ることが困難である。このため、交雑に用いる品種において小集団で閉鎖群育種による系統造成を行うことで遺伝的斉一性を高めるとともに、生産能力を向上させた系統豚が造成されている。このように交雑により改良を図ろうとする育種を交雑育種（**cross breeding**）といい、異なる特性を持つ複数の系統（品種）を交雑することにより、それぞれの遺伝子を1つの集団に集積することで新しい変異を生じさせ、変異性の高い集団を得ることが出来る。交雑により新しい変異を作出し、そこから新しい系統（品種）を造成する。このようにして造成され、品種として認知されたものを合成品種（**synthetic breed**）と呼び、系統として認知されたものを合成系統（**synthetic strain**）と呼ぶ。豚では“ミネソタ1号”や“ラムコ種”などは合成品種であり、種豚企業が作出したハイブリッド豚（**hybrid pig**）の原々種系統や“トウキョウ X”などは合成系統と呼ばれている（古川, 2001）。また、系統豚やハイブリッド豚を素材に、品種構成や飼育環境に特徴を持たせた差別化商品として銘柄豚（**branded pork**）が生産されており、中ヨークシャー種から生まれた“富士幻豚”や天然ハーブを加えた純植物性飼料を給餌して育てた“ハーブ豚”や沖縄県の“今帰仁アグー”など独自の色を持たせることが現在の主流となっている。

第2節 トウキョウ X とは

前述したように、現在の豚肉は、3つの品種の豚を掛け合わせた“三元交配豚”或いは“三元交雑”と呼ばれる豚から生産されている。そして、この大半が LWD、つまりランドレース種 (L) の雌と大ヨークシャー種 (W) の雄を交配し、そこから生まれた雑種第一代の雌 (LW) とデュロック種 (D) の雄を交配して生まれた LWD が肉豚として出荷されている。その目的としては雑種強勢を利用して、生産性が高く、美味しい豚肉を生産するためである。一方で、同じ品種であっても発育速度や大きさの違いなど個体の能力のバラツキにより、生産される肉豚にもバラツキが生じてしまう。肉豚には生産性や定時・定質・定量の出荷が求められることから、品種内での個体の能力のバラツキをなくす必要がある (阿部, 1987; 植村, 2018)。このため、交雑に用いる品種において小集団で閉鎖群育種による“系統造成”を行うことで、遺伝的斉一性を高めると共に、生産能力を向上させた系統豚が造成されている。このような系統豚を用いた体系的な交雑により、斉一性の高い肉豚を生産することが行われている。一方、品種と言う概念にとらわれず、繁殖性あるいは産肉性など特化した改良目標に対して複数品種の交雑種から造成した系統を合成系統 (synthetic line) と呼び、トウキョウ X はこの手法により造成された豚である (古川, 2001)。

トウキョウ X を語る上で忘れてはならないのが系統豚“エド”である。1978年に東京都畜産試験場 (現在の東京都農林水産振興財団青梅畜産センター) で40頭規模の閉鎖集団のランドレース種での系統造成試験に取り組み、8年の研究の結果、1986年系統豚“エド”を完成させた。その中で、改良効果を高める選抜方法の改善策として、選抜差を大きくするため相似交配を行うなど改良に力を注いでいた。そして、系統豚“エド”は当時、ヨーロッパのハイブリッド豚と比較しても変わらない産肉能力を示し、都の養豚農家にも受け入れられたが、豚肉の消費の停滞や牛肉の輸入自由化などが豚価を押し下げ、価格競争に勝てる規模拡大が出来ず、品質価値を価格に反映することが出来ないなど、銘柄豚の有用性を発揮することが出来なかったことから、市場から姿を消すことになってしまった (兵頭, 2001)。

そこで、東京都の中小規模でも養豚経営が確立できるような付加価値を持つ高品質豚の造成が望まれるようになった。その上、できるだけ早く造成することが求められた。従来、豚の改良は産肉能力の改良や飼料効率の向上など、いわゆる経済効率に主眼を置かれて豚肉の品質、特に肉の美味しさなどの改良についてはこれまで実施されて来なかった。その理由としては改良方法が困難であったことと、美味しさの定義が難しいとされていたこと、そして改良形質を絞れない点であった。しかしながら、兵頭らはこれまでの豚の系統間の組み合わせ検定試験から、豚の肉質に影響を与えているのは、品種特性が最も大きいことを実証していたため、美味しい豚肉作りには優れた肉質の品種を集めることであると考えた。そのため、先ず“美味しい豚肉”と言われている品種を集め、第二に肉質が優れているかどうか測定して確認する。第三に交配組み合わせにより、肉質などがどのように変化するか検

討する。最後にそれらの形質の遺伝パラメータを調べ、形質を固定して新系統を造成するという手順で行った。その際に、当時として最新の選抜方法の利用すなわち、BLUP (Best Linear Unbiased Prediction; 最良線型不偏予測) 法を豚改良のために採用したのである。日本においてこれまで、複数の豚品種の交雑による合成系統育種や、直接、豚肉の食味の向上を目的とした改良の例はないため、これは新たな試みでもあった。

このようにして、トウキョウ X は 1990 年に東京都畜産試験場でデュロック種、パークシャー種 (鹿児島系・英国系)、北京黒豚の 3 品種・4 系統を基礎豚として系統造成が開始され、7 年間の歳月と 5 世代の選抜を経た後に、1997 年に社団法人日本種豚登録協会 (現在の一般社団法人日本養豚協会) から系統認定された日本初の合成系統豚である (兵頭, 1998)。基礎豚として用いられたデュロック種とパークシャー種は肉質がよいとされる品種である。パークシャー種は筋繊維が細かく、肉が柔らかくて主に純粋種で利用されており、デュロック種は筋肉内脂肪含量が高く、発育が早いことから三元交雑の止め雄として利用されている。このような特性を併せ持ち、更に両品種を越える食味性の高い系統を作出することを目的に交雑育種が行われた。また、肉質について更に変異性を高めるために、脂肪の質の良い北京黒豚も導入され、3 品種間の交雑により選抜の基礎集団が構築された。これを基礎世代として、筋肉内脂肪含量と 1 日平均増体重量を高め、背脂肪厚を薄くする選抜を 5 世代に渡り繰り返した結果、選抜形質の改良が進み、系統として認定されたものである。そのため、毛色や耳の形などについて選抜の対象とされておらず、集団内に多様な変異が見られるのもトウキョウ X の特徴である (古川, 2001)。

第3節 背景および目的

これまで述べたように、トウキョウ X は 1990 年に東京都畜産試験場でデュロック種、パークシャー種（鹿児島系・英国系）、北京黒豚の 3 品種・4 系統を基礎豚として系統造成が開始され、7 年間の歳月と 5 世代の選抜を経た後に、1997 年に社団法人日本種豚登録協会（現在の一般社団法人日本養豚協会）から系統認定された日本初の合成系統豚である（兵頭、1998）。2019 年にはトウキョウ X は造成を開始してから 30 年、維持に移行してから 22 年が経過した。この間、認定集団の遺伝構成を維持すると共に近交係数の上昇を抑制するために、個体間の血縁係数が低い組み合わせで交配を実施している。しかし、閉鎖群により飼育されているため、近交度の蓄積による遺伝的多様性の低下が危惧されている。遺伝的多様性の低下が引き起こす近交度の上昇に伴う近交退化により、トウキョウ X を維持していく上で生産性の低下をもたらす可能性が考えられる。

これまでトウキョウ X では、兵頭（2001）による系統開発に関する育種学的研究や永井ら（2016）による血統情報の解析による近交係数の推移と近交退化との関係に関する統計学的研究は行われてきたが、DNA レベルでの遺伝学的研究は行われておらず、遺伝的多様性および集団構造は明らかになっていない。トウキョウ X のような系統造成された集団において、血統管理による遺伝的斉一性を高めていっている反面、小規模集団による閉鎖群育種を行っているために、遺伝的多様性の低下による近交退化が必然のように付きまとう。そのため、遺伝的斉一性を高めながらも遺伝的多様性を維持していかななくてはならないという矛盾を抱えながらも、血統管理だけに基づく系統の維持が行われている。それ故に、血統情報のみならず DNA レベルでの調査が必要と考えた。

そこで、本研究ではまずトウキョウ X における遺伝学的な基礎情報を得るために DNA 多型を解析し、トウキョウ X の遺伝的多様性および集団構造を評価した。続いて、後述することになるが、遺伝的多様性および集団構造を評価していく中ではトウキョウ X のゲノムに中国豚からの寄与の痕跡を確認することが出来なかった。しかしながら、トウキョウ X には基礎豚として北京黒豚が用いられていることから、中国豚がトウキョウ X のゲノムに遺伝的にどの程度寄与したのか、北京黒豚とはどんなゲノム構成をしていたのかを明らかにした。最後に、認定集団からの遺伝的多様性および遺伝的構成の変化は、血統情報に基づく統計遺伝学的解析によっても評価は可能であるが、正確な遺伝的多様性および遺伝的構成が世代を通して閉鎖群小集団においてどのように変化したのかを評価することは困難である。そこで、トウキョウ X の遺伝的多様性および遺伝的構成の年次推移を DNA 多型情報から推定することで、血統情報に基づく統計遺伝学的解析の効率性を評価した。これらの調査により、トウキョウ X の畜産学的形質に関する遺伝的な基盤を理解し、トウキョウ X の遺伝学的な基礎情報を解明することで、他品種・系統との遺伝的類縁関係や遺伝学的構成を明らかにした。

第2章 トウキョウ X の遺伝的多様性および集団構造の評価

第1節 諸言

日本では、一般的に豚肉生産において三元交雑が行われており、交雑に用いる品種において小集団で閉鎖群育種を行うことにより、遺伝的斉一性を高めるとともに、生産能力を向上させることを目的として系統造成が行われている（阿部, 1987）。また、品種という概念にとらわれず、産肉性など特化した改良目的に対して特徴のある系統を造成するために複数の品種を用いて造成した系統は合成系統と呼ばれている（古川, 2001）。

トウキョウ X は、1990 年に東京都畜産試験場（現青梅畜産センター）でデュロック種、鹿兒島バークシャー種、英国バークシャー種、北京黒豚の 4 品種・系統を基礎豚として系統造成が開始され、1997 年に日本種豚登録協会（現日本養豚協会）から系統認定された日本初の合成系統豚である（兵頭, 1998）。2019 年にはトウキョウ X は造成を開始してから 30 年、維持に移行してから 22 年を経過した。この間、認定集団の遺伝構成を維持するとともに近交係数の上昇を抑制するために、個体間の血縁係数を抑制する組み合わせで交配を実施している。しかし、閉鎖群により飼育されているため、近交度の蓄積による遺伝的多様性の低下が危惧されている。近交度の上昇に伴う近交退化により、トウキョウ X を維持していく上で生産性の低下をもたらす可能性があり（永井ら, 2016）、トウキョウ X の遺伝的多様性とこれまで実施されてきた血統管理の有効性を評価することは必要不可欠である。

また、トウキョウ X を用いた今後のさらなる系統の造成のためには、他の豚の品種や系統との遺伝的類縁性を理解する必要がある。トウキョウ X の基礎豚のひとつとなった北京黒豚は中国系の豚だが、中国在来豚（Dingxian, Shenxian, Zhouxian）とバークシャーおよび大ヨークシャーとの合成品種である（Porter, 2002）。北京黒豚は分子遺伝学的研究が進んでおらず、しかも現在日本国内では維持されていない。そのため、トウキョウ X のゲノムにどれだけ中国在来豚の遺伝子が寄与しているか解っていない。

トウキョウ X では血液型および蛋白多型による遺伝的分析（大石ら, 1992）、PCR-RFLP 法を用いた識別法の開発（Suzuki *et al.*, 2012）や血統解析および近交度が繁殖能力に及ぼす影響の検討（永井ら, 2016）は行われてきたものの、DNA レベルでどのような遺伝的多様性および構造を示すのかについて明らかではない。希少品種や在来種の遺伝的多様性および集団構造を明らかにするためにマイクロサテライト DNA 多型が用いられている（Martinez *et al.*, 2000; Thuy *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2009; Pham *et al.*, 2013; Michailidou *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Revidatti *et al.*, 2014; Montenegro *et al.*, 2015）。また、このマイクロサテライト DNA 多型は豚だけではなく、野生動物や希少動物における小規模集団の遺伝的多様性や系統遺伝学的解析にも用いられており、その有用性が示されている（Su *et al.*, 2007; 川根ら, 2015; Yaripour *et al.*, 2017; Senokuchi *et al.*, 2018; Zeng *et al.*, 2019; 田原ら, 印刷中）。

そこで、本研究ではトウキョウ X を持続的に活用することを目指して、トウキョウ X における遺伝的多様性、集団の遺伝的構造そして他系統との遺伝的類縁関係を明らかにすることを目的として、マイクロサテライト DNA を用いた集団遺伝学的解析を行った。

第2節 材料および方法

供試動物

トウキョウ X は、青梅畜産センターにおいてのみ維持が行われている。本研究では 2014 年のトウキョウ X の繁殖豚 72 頭から血液を採取した。これは 2014 年におけるトウキョウ X の繁殖豚全頭である。また、トウキョウ X の 2014 年の平均近交係数は 11.8%であった(永井ら, 2016)。

対照集団として、ヨーロッパ系のランドレース種 (60 頭) , 大ヨークシャー種 (60 頭) , 中ヨークシャー種 (30 頭) , デュロック種 (60 頭) , バークシャー種 (23 頭) と中国系の金華豚 (9 頭) , 梅山豚 (60 頭) の DNA を実験に供試した。これらのサンプルの内、ランドレース種, 大ヨークシャー種, デュロック種, バークシャー種, 梅山豚は異なる 2 つの農場からサンプリングされ、中ヨークシャー種および金華豚は 1 つの農場からサンプリングされた (表 1)。

金華豚および梅山豚は中国系豚の中では太湖系品種に属する一方で、トウキョウ X の基礎豚となった北京黒豚は北部中国系品種から作出された合成品種である。Ai *et al.* (2014) のゲノムワイドの SNP 解析によると中国系豚は大きく揚子江中下流域以北に分布する系統と中国南部・南西部に分布する系統の二大系統に分かれる。太湖系品種および北部中国系品種は前者の系統に含まれ、中でも太湖系品種は北部中国系品種から直接派生している。本研究では北部中国系品種は供試されていないが、以上の理由からトウキョウ X のゲノムに中国系品種が遺伝的にどれだけ寄与しているかを調べるうえで太湖系品種を用いることは妥当と考えられる。

マイクロサテライト多型解析

DNA は、採血された全血を血清と血餅に遠心分離した血餅から行った。まず、サンプル (血餅) を細断し、そのサンプルを 15mL チューブに入れた後、全量 5mL になるように 2 × Lysis Buffer で調整したものに Proteinase K (20mg/mL; 和光純薬工業) を 20μL 添加し、SOFT INCUBATOR SLI-600 (EYELA) にて約 60°C で 24 時間保温した。次に、Proteinase K により分解されたタンパク質を除去するために、フェノールによる処理を以下の手順に従って行った。

- 1) フェノールをサンプル溶液と等量である 5mL 添加した後、ローテーターである RT-50 (TAITEC) にて 10 分間転倒混和した。
- 2) 遠心機である himac CT6D (HITACHI) にて 2500rpm で 5 分間の条件下で遠心分離を行った。
- 3) 2 層に分離した上清液を新しく用意した 15mL チューブに回収し、そこにフェノール・クロロホルムをサンプル溶液と等量である 5mL 添加した後、ローテーターにて 30 分間転倒混和した。
- 4) 遠心機にて 2500rpm で 5 分間の条件下で遠心分離を行った。
- 5) 上清液を新しく用意した 15mL チューブに回収し、残留したフェノールを除去するために、CIAA (クロロホルム:3 メチル-1 ブタノール=24:1) を

サンプル溶液と等量である 5mL 添加した後、ローテーターにて 1 時間転倒混和した。6) 遠心機にて 2500rpm で 5 分間の条件下で遠心分離を行った。7) 上清液を新しく用意した 15mL チューブに回収し、溶液から溶質である DNA を精製するために 99.5%エタノールをサンプル溶液の 2 倍量である 10mL 添加した後、転倒混和した。8) 99.5%エタノールを添加したサンプル溶液を-80°Cで 2 時間冷却した後、遠心機にて 3000rpm で 15 分間の条件下で遠心分離を行った。9) デカンテーションを行い、エタノールを除去した。10) 沈殿した溶質中に含まれる余分な塩類を除去するために 70%エタノールを 5mL 添加した後、転倒混和した。11) 3000rpm で 15 分間の条件下で遠心分離を行った。12) デカンテーションを行い、エタノールを除去した。13) 残留したエタノールを確実に除去するために SOFT INCUBATOR SLI-600 にて約 60°Cでおよそ 30 分間保温した。14) Tris-EDTA Buffer を沈殿した DNA サンプルに 200 μ L 加え、一晚静置し溶解させた。以上の工程により得られた DNA サンプルを 25ng/ μ L に希釈したものを実験に用いた。

抽出した DNA は国際動物遺伝学会議および国際連合食糧農業機関により推奨されているマイクロサテライトマーカー 30 座位(表 2)を用いて Polymerase Chain Reaction (PCR) により目的領域を増幅した。PCR 反応は、Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) を用いて、予備変性 94°Cを 5 分間後、熱変性 94°Cを 30 秒、アニーリングを 30 秒、伸長反応 72°Cを 45 秒で 26 サイクル行い、次いで最終伸長反応 72°Cを 7 分間とした。目的領域の増幅後、オートキャピラリーシークエンサー ABI PRISM® 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて解析を行い、GeneMapper® Software 4.0 (Applied Biosystems) により遺伝子型を決定した。

集団遺伝学的解析

品種・系統内の遺伝的多様性については、GenAlEx 6.503 (Peakall and Smouse, 2012) を用いて平均アレル数 (MNA), 有効アレル数 (ENA), 平均プライベートアレル数 (AP), ヘテロ接合度の期待値 (HE) および観測値 (HO), F-統計量の F_{IS} 値の算出および主座標分析 (Principal Coordinate Analysis; PCoA: Gower, 1966) を行った。PCoA は多数の座位マーカー情報を 2, 3 次元に集約して視覚化する手法である。 F_{IS} 値は現実の交配が任意交配からどの程度ずれているか、すなわちノンランダム交配の程度を示す尺度であり、完全な任意交配下では F_{IS} 値は 0 になる。 $F_{IS} > 0$ のときは、高い血縁係数を持つ個体間の交配が平均よりも高頻度で行われていることを示し、集団が更に小さな分集団化していることを示している。 $F_{IS} < 0$ のときは、分集団内で近親交配を回避するような交配 (近交回避), すなわち遺伝的に離れている個体間での交配が積極的に行われていることを示している (野村, 2001)。また、FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002) を用いてアレリックリッチネス (AR) および F-統計量の F_{ST} 値を算出した。AR とは複数集団間で遺伝的多様性を比較・評価する場合において、各集団から同じ数だけサンプルを得たと仮定し、そのサンプルに含まれる対立遺伝子数の期待値を表す指標である (井鷲と陶山, 2013)。 F_{ST} 値は固定指数 (index of

fixation) と呼ばれ、この値が 1 に近いほど、機会的遺伝浮動による分集団間の遺伝的分化あるいは分集団の有限性による近交度の蓄積が進んでいることを示している(野村, 2001)。品種・系統間の遺伝的関連性については, Populations 1.2.31 (Langella, 1999) を用いて個体間の D_{AS} 遺伝距離 (shared allele distance: Chakraborty and Jin, 1993 ; Jin and Chakraborty, 1994) および集団間の D_A 遺伝距離 (Nei *et al.*, 1983) の算出を行い, MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013) を用いて NJ 法 (近隣結合法: Saitou and Nei, 1987) により系統樹を推定した。

遺伝的集団構造については, Structure 2.3 (Pritchard *et al.*, 2000) を用いた。Structure はベイジアンクラスタリング法を用いて、個体ごとに想定される集団に由来する座位の割合を推定するものである。集団数 $K=1-10$ を想定して各 K について 50,000 世代の Burn-in 後, 50,000 世代をサンプリングする Markov chain Monte Carlo (MCMC) 法を独立に 20 回試行した。妥当な集団数は対数周辺尤度の大きさを基準とする方法と K の増加に伴う対数周辺尤度の変化量である ΔK を基準とする方法がある (Evanno *et al.*, 2005)。本研究では Structure Harvester 0.6 (Earl and Vonholdt, 2012) を用いて対数周辺尤度の平均値および ΔK を算出し, Evanno *et al.* (2005) に従い最も妥当な集団数を推定した。また, トウキョウ X の血統記録 (1990 年から 2014 年) をもとにプログラム GRC (永井ら, 2015) を用いて実験に供試した 72 個体における遺伝的寄与率を算出した。加えて, トウキョウ X のみを用いて Structure 解析を行い, 最も妥当な集団数を推定することで GRC において算出した遺伝的寄与率の結果と比較を行った。

表 1 供試動物

品種名		略号	個体数
トウキョウX	東京都農林水産振興財団青梅畜産センター	X	72
ランドレース	株式会社フリーデン 家畜改良センター茨城牧場	L	30 30
大ヨークシャー	株式会社フリーデン 家畜改良センター茨城牧場	W	30 30
中ヨークシャー	家畜改良センター茨城牧場	Y	60
デュロック	株式会社フリーデン 家畜改良センター茨城牧場	D	30 30
パークシャー	農業・食品産業技術総合研究機構 岩手県農業研究センター畜産研究所	B	3 20
金華豚	静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センター	J	9
梅山豚	農業・食品産業技術総合研究機構 家畜改良センター茨城牧場	M	15 45

表2 マイクロサテライトマーカー30 座位

マーカー名	染色体	プライマー配列(5'→3')		アニーリング 温度 (°C)	ラベル
		Forward	Reverse		
S0026	16	AACCTTCCCTTCCCAATCAC CACAGACTGCTTTTACTCC		55	FAM
S0155	1	TGTTCTCTGTTTCTCCTCTGTTG AAAGTGGAAAGAGTCAATGGCTAT		55	HEX
S0005	5	TCCTTCCCTCCTGGTAACTA GCACTTCCCTGATTCTGGTA		55	NED
Sw2410	8	ATTTGCCCCCAAGGTATTTT CAGGGTGTGGAGGGTAGAAG		50	FAM
Sw830	10	AAGTACCATGGAGAGGAAATG ACATGGTTCCAAAGACCTGTG		50	HEX
S0355	15	TCTGGCTCCTACACTCCTTCTTGATG TTGGGTGGGTGCTGAAAAATAGGA		50	NED
Sw24	17	CTTTGGGTGGAGTGTGTGC ATCCAAATGCTGCAAGCG		55	FAM
Sw632	7	TGGGTTGAAAGATTTCCCAA GGAGTCAGTACTTTGGCTTGA		55	HEX
Swr1941	13	AGAAAGCAATTTGATTTGCATAATC ACAAGGACCTACTGTATAGCACAGG		55	NED
Sw936	15	TCTGGAGCTAGCATAAGTGCC GTGCAAGTACACATGCAGGG		55	FAM
S0218	x	GTGTAGGCTGGCGTTGT CCCTGAAACCTAAAGCAAAG		55	HEX
S0228	6	GGCATAGGCTGGCAGCAACA AGCCACCTCATCTTATCTACACT		55	NED
Sw122	6	TTGTCTTTTTATTTTGTCTTTGG CAAAAAAGGCAAAAGATTGACA		55	FAM
Sw857	14	TGAGAGGTCAGTTACAGAAGACC GATCCTCCTCCAAATCCCAT		55	HEX
S0097	4	GACCTATCTAATGTCATTATAGT TTCCTCCTAGAGTTGACAACTT		55	NED
Sw240	2	AGAAATTAGTGCCTCAAATTGG AAACCATTAAGTCCCTAGCAAA		55	FAM
IGF1	5	GCTTGGATGGACCATGTTG CATATTTTTCTGCATAACTTGAACCT		55	HEX
Sw2406	6	AATGTCACCTTTAAGACGTGGG AATGCGAAACTCCTGAATTAGC		55	NED
Sw72	3	ATCAGAACAGTGGCGCGT TTTGAAAATGGGGTGTTTCC		55	FAM
S0226	2	GCACTTTTAACTTTTCATGACTCC GGTTAACTTTTNCCTCAATACA		55	HEX
S0090	12	CCAAGACTGCCTTGTAGGTGAATA GCTATCAAGTATTGTACCATTAGG		55	NED
Sw2008	11	CAGGCCAGAGTAGCGTGC CAGTCCCTCCAAAAATAACATG		55	FAM
Sw1067	6	TGCTGGCCAGTGA CTCTG CCGGGGGATTAAACAAAAAG		55	HEX
S0101	7	GAATGCAAAGAGTTCAGTGTAGG GTCTCCCTCACACTTACCGCAG		58	NED
Sw1828	1	AATGCATTGTCTTCAATCAACC TTAACCGGGGCATTGTG		55	FAM
S0143	12	ACTCACAGCTTGTCTGGGTGT CAGTCAGCAGGCTGACAAAAAC		55	HEX
S0068	13	AGTGGTCTCTCTCCCTCTTGT CCTTCAACCTTTGAGCAAGAAC		55	NED
S0178	8	TAGCCTGGGAACCTCCACAGCTG GGCACCGGAATCTGCAATCCAGT		60	FAM
Sw911	9	CTCAGTTCTTTGGGACTGAACC CATCTGTGGA AAAAAAAGCC		60	HEX
S0002	3	GAAGCCAAAGAGACA ACTGC GTTCTTTACCCACTGAGCCA		60	NED

第3節 結果

品種・系統内の遺伝的多様性

マイクロサテライトを用いた多様性指数は表 3 に示した。全集団を通してマイクロサテライトマーカー30 座位はすべて多型があり、合計 291 のアレルが検出され、マーカーごとのアレル数は 6 (S0026, S0155, S0143) から 21 (S0005) であった。集団ごとの平均アレル数は、ヨーロッパ系では 3.10 (バークシャー種) から 5.70 (ランドレース種)、中国系では 2.23 (金華豚) から 2.86 (梅山豚) の範囲であったのに対して、トウキョウ X では 4.10 であった。個体数に依存しない有効アレル数は、ヨーロッパ系では 2.19 (バークシャー種) から 3.15 (ランドレース種)、中国系では 1.75 (金華豚) から 1.82 (梅山豚) の範囲であったのに対して、トウキョウ X では 2.76 であった。また、アレル数をサンプル数によって標準化した数値であるアレリックリッチネスは、ヨーロッパ系では 2.75 (バークシャー種) から 4.18 (ランドレース種)、中国系では 2.21 (金華豚) から 2.40 (梅山豚) の範囲であったのに対して、トウキョウ X では 3.41 であった。プライベートアレル数は、ヨーロッパ系では 0.03 (バークシャー種) から 0.57 (ランドレース種)、中国系では 0.37 (金華豚) から 0.53 (梅山豚) の範囲であったのに対して、トウキョウ X では 0.37 であった。

品種・系統間の遺伝的關係

全個体について 30 座位の頻度をもとに PCoA を行うと、第 1 主座標が 30.3%を説明し、第 2 主座標が 8.6%を説明し、第 3 主座標が 5.9%を説明する図 1-1, 図 1-2 の関係が得られた。第 1 主座標により中国系の 2 系統が他の品種から分離し、第 2 主座標では大ヨークシャー種と中ヨークシャー種がその他の集団から分離して、トウキョウ X, デュロック種, バークシャー種をまとまりとするグループが形成された。品種・系統を単位として PCoA を行うと、第 1 主座標が 53.4%を説明し、第 2 主座標が 15.4%を説明する図 2 の関係が得られた。トウキョウ X はランドレース種と最も近縁であり、中国系豚が最も離れていた。また、遺伝的分化の程度を示す F_{ST} 値および D_A 遺伝距離を表 4 に示した。トウキョウ X はデュロック種およびバークシャー種と最も近縁で、中国系豚が最も離れており、 F_{ST} 値および D_A 遺伝距離で調和的な結果が得られた。

個体間の関係を D_{AS} 遺伝距離に基づき推定した系統樹が図 3 である。ヨーロッパ系品種はそれぞれが独自クレードを形成し、全体としてヨーロッパ系の大クレードを形成した。中国系も品種ごとにそれぞれのクレードを形成し、全体として中国系の大クレードを形成した。トウキョウ X はヨーロッパ系大クレードの内部で、デュロック種およびバークシャー種とクレードを形成し、更にその中でトウキョウ X とバークシャー種がクレードを形成した。トウキョウ X は、一部の個体がバークシャー種とクレードを形成しているため、トウキョウ X 自身はクレードを形成しなかった。

品種・系統の系統関係を D_A 遺伝距離に基づき推定した系統樹が図 4 である。ここでもヨ

ヨーロッパ系と中国系の豚がそれぞれ大クレードを形成した。ヨーロッパ系大クレードの内部では、ランドレース種、大ヨークシャー種、中ヨークシャー種がひとつのクレードを形成し、トウキョウ X は、デュロック種およびバークシャー種ともうひとつのクレードを形成した。これらのことからトウキョウ X は中国系よりもヨーロッパ系、特にデュロック種およびバークシャー種の影響を強く受けていることが示された。

全集団を対象にした **Structure** 解析による $K=2, 3$ および 8 における集団の遺伝的構成は図 5 のとおりであった。図の色は集団を示し、縦棒は一本ずつが各々の個体を意味し、縦棒中の色の割合はそれぞれの集団の遺伝的な寄与率を示している。品種・系統ごとに区切り線を記入しており、左からトウキョウ X、ランドレース種、大ヨークシャー種、中ヨークシャー種、デュロック種、バークシャー種、金華豚、梅山豚の並びである。図 6 に示したように、集団数 K が増加するにつれて対数周辺尤度は大きくなる傾向が見られ、 ΔK は $K=2$ のときに最も大きく、ついで $K=3$ のときに大きかった。 $K=2$ においては、トウキョウ X とヨーロッパ系品種が同一の集団に属し、金華豚および梅山豚と異なる集団を構成した。 $K=3$ においては、トウキョウ X、デュロック種、バークシャー種とランドレース種、大ヨークシャー種、中ヨークシャー種と中国系の 3 集団に分離した。 $K=8$ では、すべての品種・系統が独立した集団となった。

トウキョウ X の遺伝的構造

ヘテロ接合度の期待値は (表 3) , ヨーロッパ系では 0.47 (バークシャー種) から 0.63 (ランドレース種) の範囲であるのに対して、トウキョウ X では 0.60 であった。また、ヘテロ接合度の観測値は、ヨーロッパ系では 0.49 (バークシャー種) から 0.61 (大ヨークシャー種) の範囲であるのに対して、トウキョウ X では 0.61 であった。ヘテロ接合度の期待値および観測値から算出される集団の近親交配の程度を示す F_{IS} 値は、ヨーロッパ系では -0.03 (バークシャー種) から 0.07 (ランドレース種) の範囲であるのに対して、トウキョウ X は -0.02 とほぼ 0 を示した。

また、PCoA によるトウキョウ X 集団の解析を行ったところ (図 7) , 特定のまとまりは認められず、上記の F_{IS} の推定値と調和的な結果が得られた。プログラム GRC を用いて血統記録をもとに、実験に供試した 72 個体における基礎品種・系統の寄与率の推定をした。その結果を図 8 に示した。その結果、トウキョウ X において基礎豚が均一に交雑されていることが示された。しかしながら、トウキョウ X のみを用いて **Structure** 解析を行ったところ、 $K=4$ のときに ΔK は最大値を示し (図 9) , **Structure** 解析から得られた個体ごとに想定された寄与率は個体によって大きく異なっていた (図 10)。

表 3 遺伝的多様性の指標

Breed	n	MNA	ENA	A _R	A _P	H _O	H _E	F _{IS}
X	72	4.10	2.76	3.41	0.37	0.61	0.60	-0.02
L	60	5.70	3.15	4.16	0.57	0.59	0.63	0.07
W	60	5.20	2.96	3.87	0.33	0.61	0.61	0.01
Y	30	3.43	2.37	3.12	0.07	0.52	0.51	-0.01
D	60	3.83	2.53	3.27	0.17	0.54	0.55	0.02
B	23	3.10	2.19	2.75	0.03	0.49	0.47	-0.03
J	9	2.23	1.75	2.21	0.37	0.42	0.33	-0.23
M	60	2.87	1.82	2.40	0.53	0.42	0.40	-0.03

品種の記号 X: トウキョウ X, L: ランドレース, W: 大ヨークシャー, Y: 中ヨークシャー, D: デュロック, B: バークシャー, J: 金華豚, M: 梅山豚.

n: 個体数, MNA: 平均アレル数, ENA: 有効アレル数, A_R: アレリックリッチネス, A_P: 平均プライベートアレル数, H_O: 平均ヘテロ接合度の観測値, H_E: 平均ヘテロ接合度の期待値, F_{IS}: F統計量の F_{IS} 値.

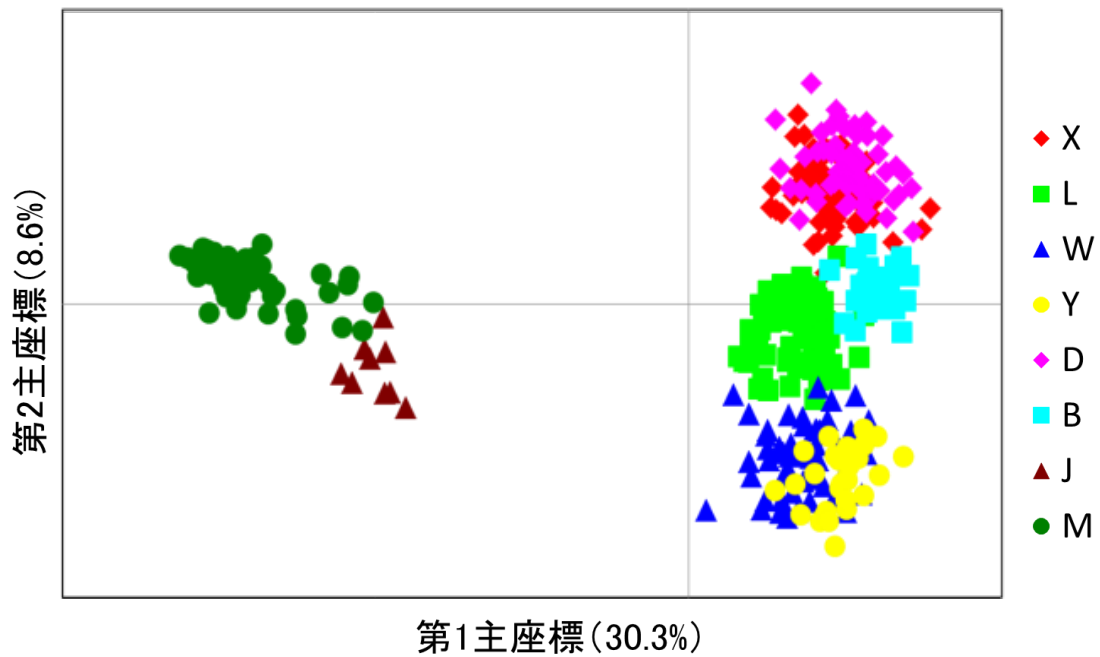


図 1-1 個体間の主座標分析

品種の記号 X: トウキョウ X, L: ランドレース, W: 大ヨークシャー, Y: 中ヨークシャー, D: デュロック, B: バークシャー, J: 金華豚, M: 梅山豚.

また, 横軸は第 1 主座標を示し, 縦軸は第 2 主座標を示している。

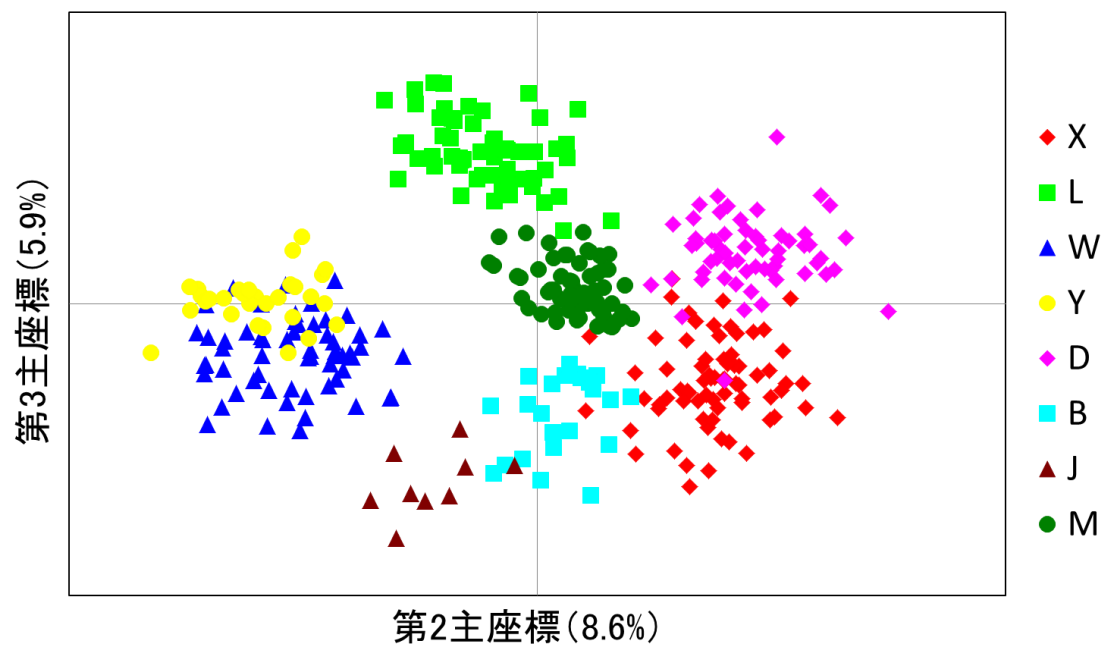


図 1-2 個体間の主座標分析

品種の記号 X: トウキョウ X, L: ランドレース, W: 大ヨークシャー, Y: 中ヨークシャー,
D: デュロック, B: バークシャー, J: 金華豚, M: 梅山豚.

また, 横軸は第 1 主座標を示し, 縦軸は第 2 主座標を示している。

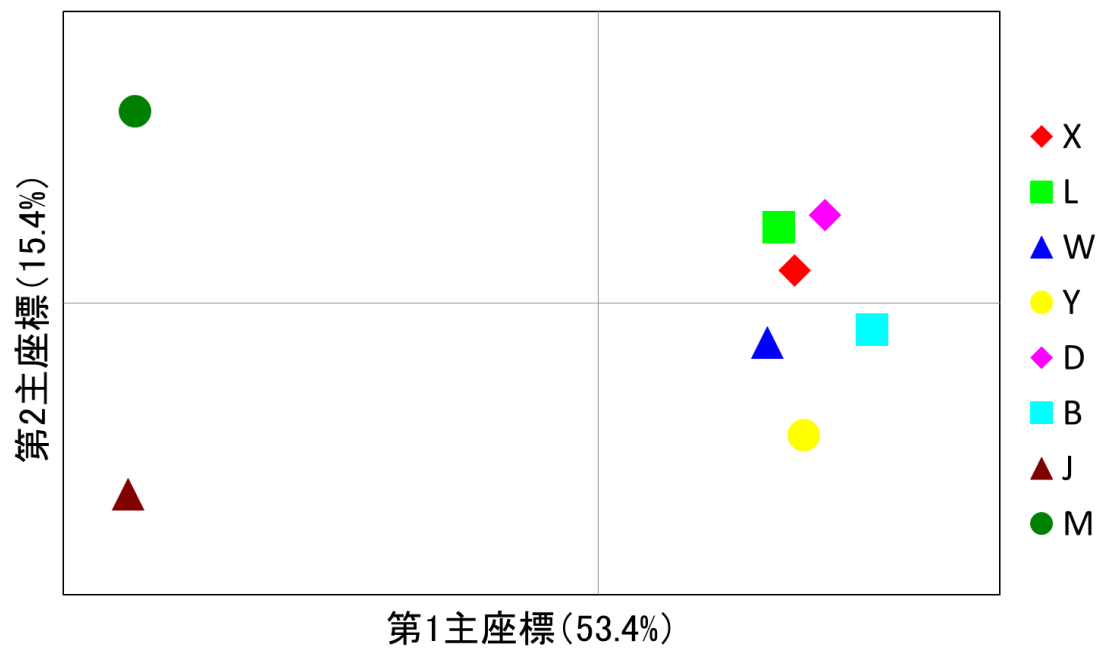


図2 品種・系統間の主座標分析

品種の記号 X: トウキョウ X, L: ランドレース, W: 大ヨークシャー, Y: 中ヨークシャー, D: デュロック, B: バークシャー, J: 金華豚, M: 梅山豚.

また, 横軸は第1主座標を示し, 縦軸は第2主座標を示している。

表 4 品種・系統間の F_{ST} 値 (右上) および D_A 遺伝距離 (左下)

Breed	X	L	W	Y	D	B	J	M
X	–	0.171*	0.197*	0.260*	0.152*	0.169*	0.425*	0.446*
L	0.318	–	0.174*	0.215*	0.196*	0.241*	0.428*	0.424*
W	0.352	0.254	–	0.189*	0.232*	0.242*	0.419*	0.443*
Y	0.445	0.350	0.242	–	0.284*	0.292*	0.485*	0.521*
D	0.230	0.331	0.369	0.439	–	0.275*	0.480*	0.481*
B	0.232	0.378	0.375	0.409	0.402	–	0.536*	0.543*
J	0.778	0.832	0.774	0.772	0.809	0.843	–	0.461*
M	0.776	0.732	0.765	0.839	0.794	0.857	0.502	–

*: $P < 0.01$

品種の記号 X: トウキョウ X, L: ランドレース, W: 大ヨークシャー, Y: 中ヨークシャー,
D: デュロック, B: バークシャー, J: 金華豚, M: 梅山豚.

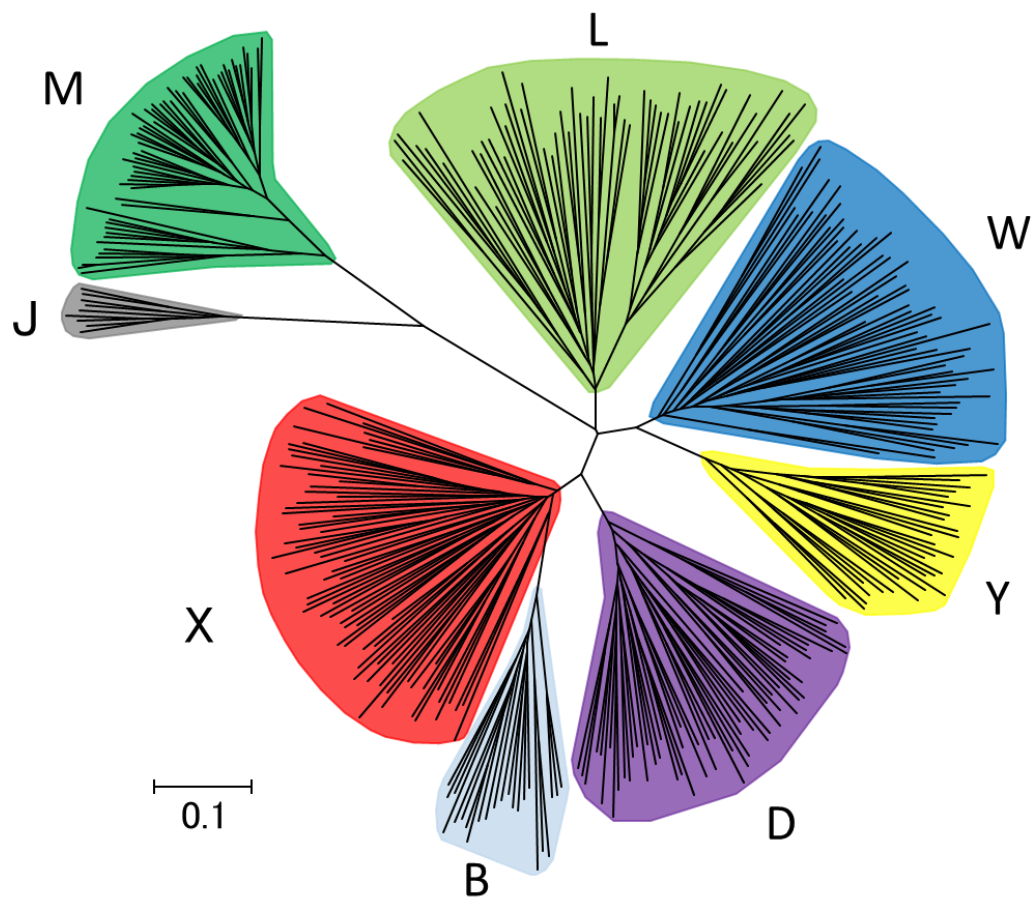


図3 近隣結合 (NJ) 法によって推定した個体間の D_{As} 遺伝距離に基づく系統樹
 品種の記号 X: トウキョウ X, L: ランドレース, W: 大ヨークシャー, Y: 中ヨークシャー,
 D: デュロック, B: バークシャー, J: 金華豚, M: 梅山豚.
 枝の長さは遺伝距離に比例しており, 図中のスケールバーは遺伝距離を示している。

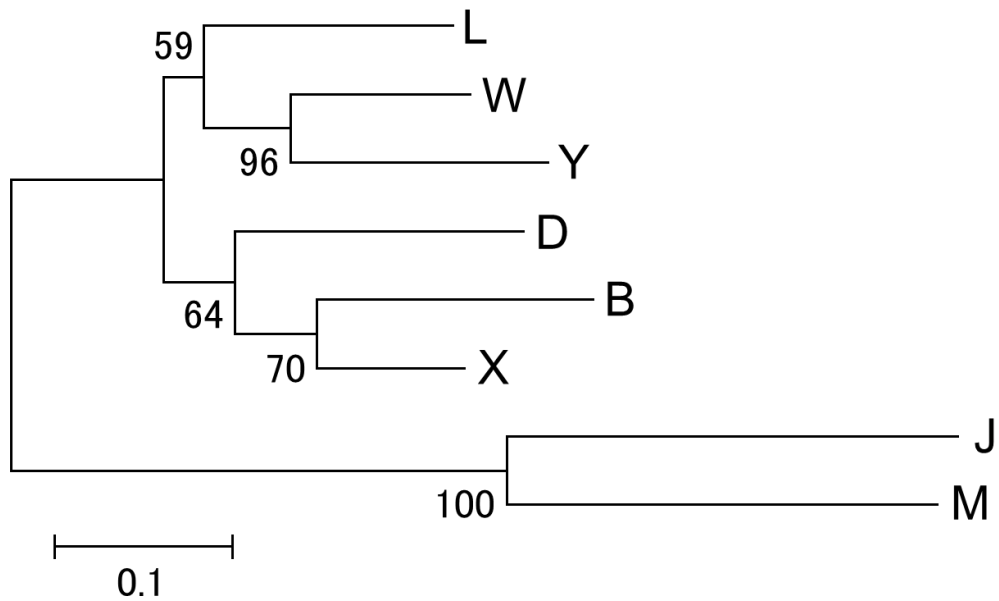


図4 近隣結合 (NJ) 法によって推定された品種・系統間の D_A 遺伝距離に基づく系統樹
 品種の記号 X: トウキョウ X, L: ランドレース, W: 大ヨークシャー, Y: 中ヨークシャー,
 D: デュロック, B: バークシャー, J: 金華豚, M: 梅山豚.
 枝の長さは遺伝距離に比例しており、図中のスケールバーは遺伝距離を、樹上の数値はブ
 ートストラップ値 (%) を示している。

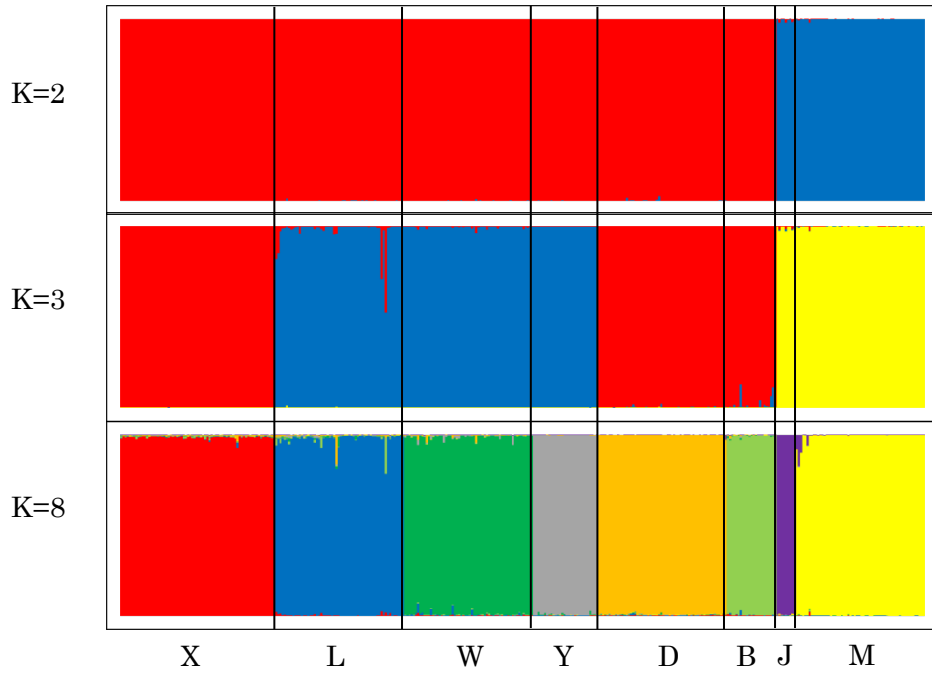


図5 Structure 解析による品種・系統の集団構造

各色は仮定された集団を意味し, K は仮定された集団数を意味する。横軸は各個体を品種ごとに並べたものであり, 縦軸はそれぞれの個体がどの集団に属するかを示している。

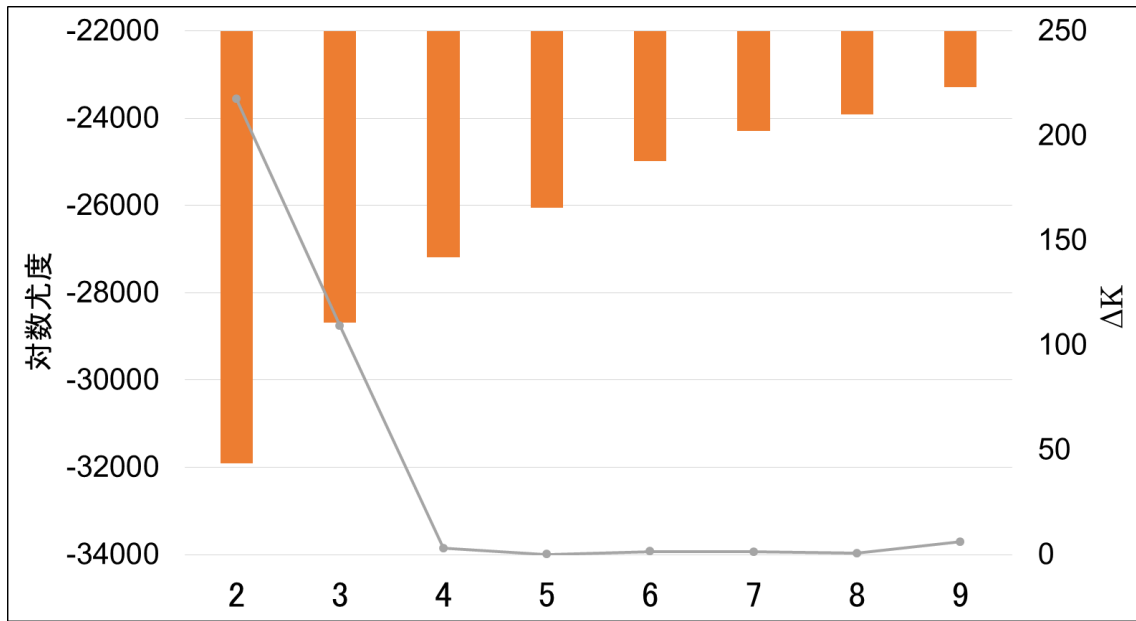


図6 Structure Harvester により算出された ΔK

左縦軸は対数尤度，右縦軸は ΔK を，横軸は仮定された集団数 K を示している。

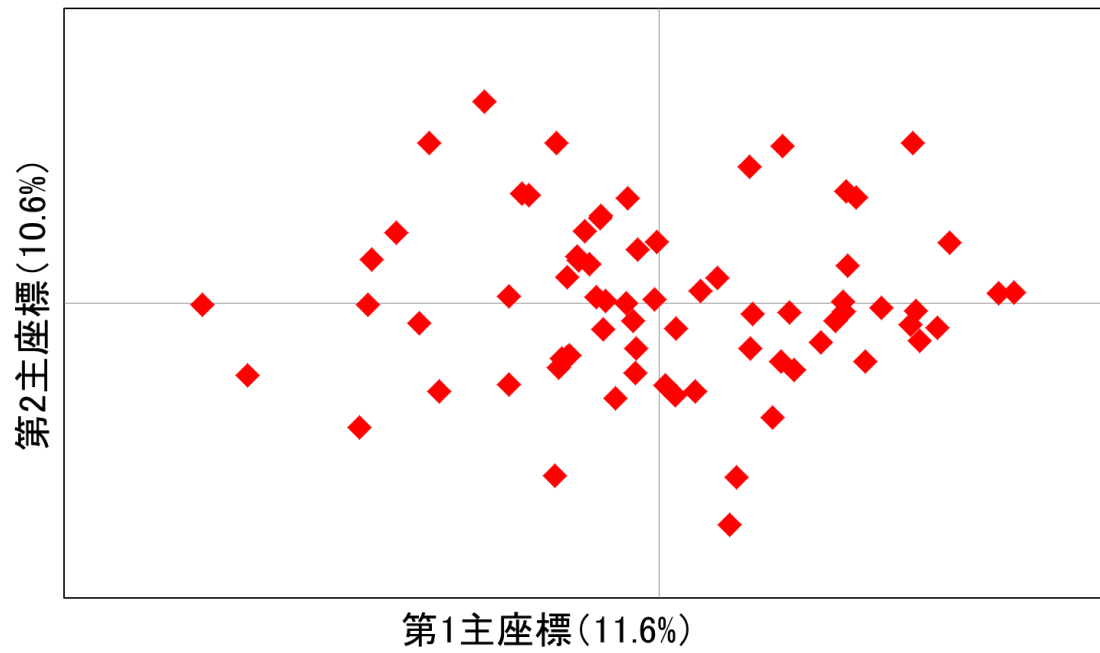


図7 トウキョウ Xにおける主座標分析

横軸は第1主座標を示し、縦軸は第2主座標を示している。



図8 血統情報をもとに算出されたトウキョウXにおける始祖集団の遺伝的寄与率
 横軸は各個体をサンプル番号順に並べたものであり、縦軸は各個体のゲノム中におけるそれぞれの基礎豚の寄与率の期待値を示している。青色はデュロック、赤色は英国バークシャー、灰色は鹿児島バークシャー、黄色是北京黒豚の寄与率を示している。

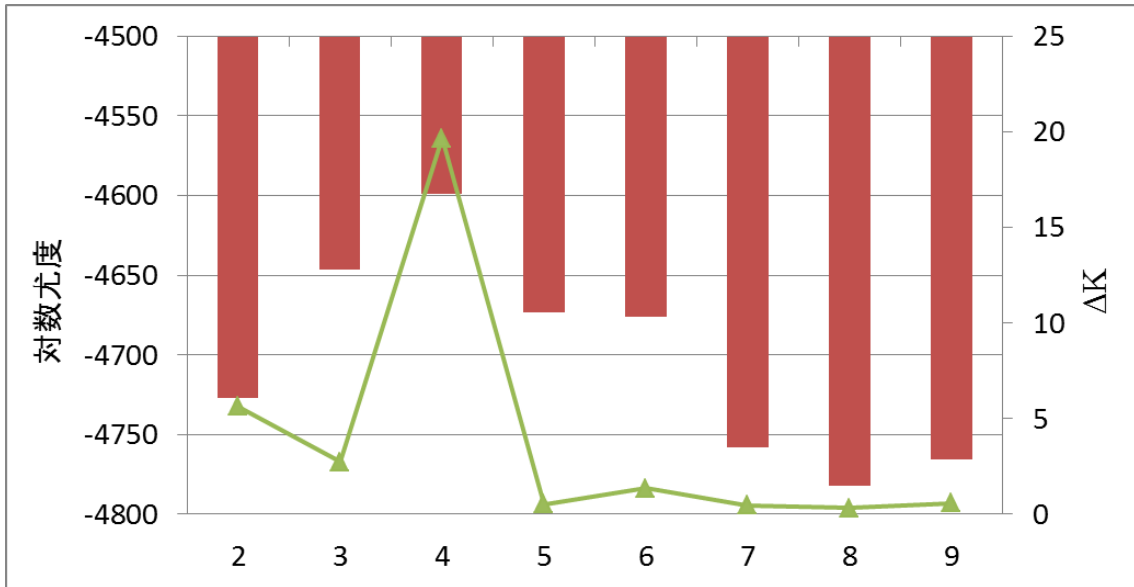


図9 Structure Harvester により算出された ΔK

左縦軸は対数尤度, 右縦軸は ΔK を, 横軸は仮定された集団数 K を示している。

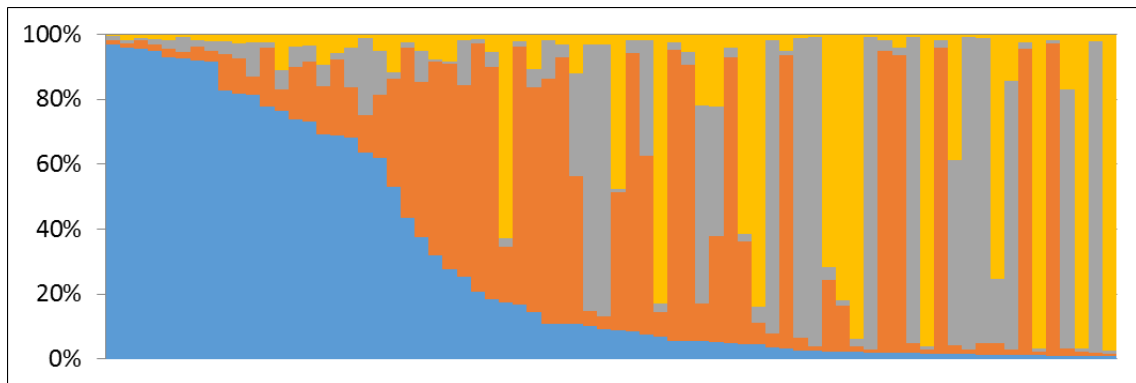


図 10 ΔK が最も高い値を示した $K=4$ におけるトウキョウ X の集団構造
 各色は仮定された集団を意味し, K は仮定された集団数を意味する。横軸は 1 本が 1 個体を示しており, 各個体が血統情報をもとに算出されたトウキョウ X における始祖集団の遺伝的寄与率と対応させており, サンプル番号順に並べたものである。

第4節 考察

遺伝的多様性

トウキョウ X における多様性 (表 3) は, ヨーロッパ系品種と同程度の値を示し, 中国系品種である金華豚および梅山豚よりも高かった。しかし, アリル数が示す多様性はイベリコ豚 (Martinez *et al.*, 2000), ベトナム在来豚 (Pham *et al.*, 2013), 中国在来豚 (Fang *et al.*, 2009), アメリカ大陸におけるクリオロ豚 (Revidatti *et al.*, 2014), ウルグアイ豚 (Montenegro *et al.*, 2015) の指数, 中国豚 (Li *et al.*, 2014), ベトナム在来豚 (Thuy *et al.*, 2006) の有効数およびギリシャにおける黒豚 (Michailidou *et al.*, 2014) のアレリックリッチネスよりも低かった。また, 1990 年から造成が開始されたトウキョウ X と, 1990 年に導入されたマンクス・ロフタンとで同種の家畜品種とで遺伝的多様性を比較したところ (田原ら, 2019), マンクス・ロフタンでは同種の家畜品種より遺伝的多様性が極端に低いことが示され, トウキョウ X と同種の家畜品種を比較した結果と大きく差が生まれる結果となった。これは, マンクス・ロフタンが 1990 年に英国から日本に導入された始祖羊数が雄 5 頭, 雌 15 頭と小規模集団から始まり, 現在まで維持しているのに対して, トウキョウ X がデュロック種 20 頭, 鹿児島バークシャー種 11 頭, 英国バークシャー種 10 頭, 北京黒豚 7 頭の 4 品種・系統の計 48 頭を基礎豚として系統造成が開始され, 系統造成後は系統内交配により維持されているためだと考えられる。

他品種との遺伝的類縁関係

品種・系統間の関係を, 非階層型クラスタリングである PCoA および Structure 解析, 階層型クラスタリングである系統解析によって推定した後, 総合的な評価を行った。

PCoA および系統解析に関しては, 各個体を OTU (操作的分類単位) とする場合と, 各品種を OTU とする場合と, 二通りの解析を行った。操作的分類単位とは, 系統樹などで含まれる操作単位 (生物や遺伝子) のことを示し, 各個体を OTU とする場合, 各々の個体の持つ情報をそのまま用いることが出来るため情報量の損失が少ない反面, 各個体の二倍体のゲノムを構成する遺伝子がすべて同じ系図を持つという仮定を置く必要がある。本研究で用いた供試動物は, 表 3 に示すように各品種の F_{IS} 値は金華豚を除くといずれも 0 に近く, 品種内では任意交配に近い様式で繁殖していると考えられる。そのため, 品種内では遺伝子ごとに系図が大きく異なると考えられる。その一方で, 各品種を OTU とする解析では品種内の各個体の情報は平均化されてしまうため情報量の損失が大きいが, 個体間の関係は考慮しないため品種内での遺伝子の系図の違いは問題にならない。本研究で用いた供試動物のように, 品種間では統計的に有意な遺伝的分化があるが品種内では任意交配に近い様式で繁殖が行われている場合, このような解析は有効な手法と考えられる。以上のようにどちらの解析も一長一短があり, 全体的な傾向から品種・系統間の関係を考察した。

個体間において PCoA を行った結果は図 1 の通りであり, トウキョウ X は第 1 主座標に

においてヨーロッパ系と同一のまとまりを形成し、金華豚および梅山豚とは異なる集団であることが明らかになった。更に第 2 主座標において、トウキョウ X はデュロック種およびバークシャー種と同一のまとまりを形成した。これは、デュロック種およびバークシャー種がトウキョウ X の系統造成に関与したデュロック種、鹿児島バークシャー種、英国バークシャー種と同じ品種特性を有しているが、金華豚および梅山豚は中国系ではあるものの北京黒豚とは異なる品種特性を有していたためと考えられた。また、品種間において PCoA を行った結果が図 2 である。集団間の分析でもトウキョウ X はヨーロッパ系と同一のまとまりを形成し、中国系は遺伝的に最も離れた集団であることが明らかになった。その一方で、ヨーロッパ系内部の関係に関しては、トウキョウ X はランドレース種と最も近縁であり、大石ら (1992) が 20 座位の血液型および蛋白多型から計算したトウキョウ X の遺伝距離はランドレース種と最も近く、桃園種は最も遠いという結果と一致していた。

D_{AS} 遺伝距離に基づく個体間の系統樹 (図 3) でも、 D_A 遺伝距離に基づく集団間の系統樹 (図 4) においても、豚はヨーロッパ系大クレードと中国系の大クレードに分類される。トウキョウ X はヨーロッパ系、とりわけデュロック種およびバークシャー種と同一のクレードに位置し、中国系豚とは異なるクレードを形成している。

Structure を用いた遺伝的集団構造解析では (図 5, 図 6) , ΔK を基準とすると最も妥当な集団数は $K=2$ のときで、この解析結果からも 8 品種・系統は大きくヨーロッパ系豚と中国系豚に分類され、トウキョウ X はヨーロッパ系を祖先とすると推定された。集団数を 3 と想定すると、トウキョウ X, デュロック種およびバークシャー種が同一の集団を形成し、ランドレース種、大ヨークシャー種および中ヨークシャー種の集団と中国系に分離した。集団数を 8 と想定するとすべての品種・系統が独立した集団を推定された。このことから、トウキョウ X はデュロック種およびバークシャー種と遺伝的に近縁であるものの、この中でも特有の遺伝構造に有することが示唆された。これは、トウキョウ X の造成の際に北京黒豚が使用されたことと、造成後の集団内での遺伝的浮動による遺伝子構成の変化が要因であると考えられる。

これまで見てきたように、トウキョウ X は、ヨーロッパ系豚の系統に位置づけられ、中国系豚との遺伝的類縁性は低い。ヨーロッパ系豚内部におけるトウキョウ X の位置づけに関しては、品種を OTU とした PCoA 以外の結果は、すべてトウキョウ X とデュロック種+バークシャー種との近縁性を支持している。このように、トウキョウ X ゲノムの大部分はヨーロッパ系豚、とりわけデュロック種およびバークシャー種に由来していることが示唆された。

トウキョウ X の遺伝的斉一性

トウキョウ X のみを対象に PCoA を行った結果 (図 7) , 特定のまとまりは認められなかったが、これは系統造成および維持において分集団化を回避するように交配が行われたためと考えられた。この結果は F_{IS} の推定値と調和的である。次に、血統情報に基づく基礎品

種・系統の寄与率は図 8 のように、どの個体もほとんど同じ寄与を受けていた。血統情報をもとに算出された遺伝的寄与率は両親のアリルの $1/2$ が寄与するという遺伝様式に基づいて計算された期待値である。また血統情報をもとにした遺伝的寄与率では遺伝的斉一性が向上していることが示唆された。しかしながら、血統情報をもとに推定された現集団の各個体に対する基礎豚の寄与率はほぼ一定であったのに対して、**Structure** 解析から想定された寄与率は個体によって大きく異なっていた。このことから、血統情報をもとにした遺伝的寄与率では遺伝的斉一性が向上しているが、遺伝子型をもとにした集団構造解析では個体によって祖先の寄与が異なることが示唆された。

こうした事実は、現在の血統管理の様式が、遺伝的な斉一性を保持しながら、遺伝的な多様性を維持していくという難しい問題に対して有効に機能していることを示している。その一方で、これらの交配様式がどのように有効であっても、閉鎖群による飼育下では近交係数の上昇は不可避である。近交退化を防ぐためには、本研究で得られた遺伝子型情報をもとに、遺伝的に出来るだけ離れた個体間での交配を積極的に行い、出来るだけヘテロ接合度が高くなる交配様式で血統管理を行うことが重要と考えられる。

第5節 小括

トウキョウ X は、1990年にデュロック種、鹿児島パークシャー種、英国パークシャー種、北京黒豚の4品種・系統を基礎豚として系統造成が開始され、1997年に日本種豚登録協会から系統認定された日本初の合成系統豚である。トウキョウ X は、維持に移行してから20年が経過しており、この間、認定集団の遺伝構成を維持するとともに近交係数を抑制する組み合わせで交配を実施しているが、閉鎖群により飼育されているため、近交度の蓄積による遺伝的多様性の低下が危惧されている。加えて、トウキョウ X の基礎豚となった北京黒豚自体が合成系統であるため、豚の品種間におけるトウキョウ X の系統的な特性ははっきりと解っていない。

そこで、本研究ではトウキョウ X の系統的な位置づけと遺伝的多様性、集団構造を明らかにすることを目的として、マイクロサテライト DNA に基づく解析を行った。

品種・系統間の遺伝的關係では、主座標分析、系統解析、**Structure** を用いた遺伝的集団構造の解析のいずれも、トウキョウ X はヨーロッパ系群を構成し、中国系群とは遺伝的に離れていること、ヨーロッパ系群のなかではデュロック種およびパークシャー種の影響を強く受けていることが示された。

トウキョウ X における遺伝的多様性指標は、ヨーロッパ系豚と同程度の値を示し、中国系豚よりも高い水準であった。また、トウキョウ X 集団内における F_{IS} 値はほぼ0であり、トウキョウ X は分集団化が回避されていることが示唆された。血統情報をもとに推定した基礎豚の遺伝的寄与率でも遺伝的斉一性が向上していることが示唆されている。

これらのことは近交係数の上昇を抑制する組み合わせで実施している交配様式が遺伝的多様性を維持する上でも有効に機能していることを示している。その一方で、閉鎖群による飼育下では近交係数の上昇は不可避であるため、近交退化を防ぐために本研究で得られた遺伝子型情報をもとに出来るだけヘテロ接合度が高くなる交配様式で血統管理を行うことが重要と考えられる。

第3章 合祖理論に基づくトウキョウ X の系統遺伝学的特性

第1節 諸言

合成系統とは、肉質などに特化した改良を目的として複数の品種を用いて交配することによって造成された家畜系統である（古川, 2001）。トウキョウ X は, 1990 年に東京都畜産試験場（現青梅畜産センター）でデュロック種, バークシャー種（英国系と鹿児島系）, 北京黒豚の3品種, 4系統を基礎豚として系統造成が開始され, 1997年に日本種豚登録協会（現日本養豚協会）から系統認定された日本初の合成系統豚である（兵頭, 1998）。

トウキョウ X は, 他の豚品種では滅多に見ることのできない「さし」の入ったロース肉, 脂肪のうま味が何よりの特徴である（三枝と河野, 1998）。そのため, トウキョウ X の豚肉の品質は官能検査によって非常に高い評価を受けている（高崎ら, 2005; 小嶋, 2015）。

これまでに認定されたトウキョウ X 維持群における基礎豚の遺伝的寄与率は, デュロック種 40.7%, 英国系バークシャー種 14.3%, 鹿児島系バークシャー種 18.6%, 北京黒豚 26.4%と推定されている（田原ら, 2018）。しかし, Porter（2002）によれば, 北京黒豚は中国原産の豚ではあるが, 中国在来豚（Dingxian, Shenxian, Zhouxian）とバークシャーおよび大ヨークシャーとの交雑によって造成された合成品種である。その上, 北京黒豚の分子遺伝学的研究はほとんど行われておらず（Oishi *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2008）, この品種は現在では日本で飼育・維持されていないことから, 中国在来豚のゲノムがトウキョウ X にどの程度貢献しているかについての解明を困難にしている。

Darwin（1868）の先駆的な研究から始まって, 現在までに豚の家畜化の起源はヨーロッパおよび中国の在来豚から独立して起こったことが複数の研究から示唆されている（Giuffra *et al.*, 2000; Okumura *et al.*, 2001; Larson *et al.*, 2005）。ヨーロッパおよび中国の在来豚は遺伝的に非常に多様であり（Giuffra *et al.*, 2000; Okumura *et al.*, 2001）, トウキョウ X のゲノムに対するヨーロッパおよび中国の在来豚の遺伝的寄与率を推定することは重要な課題である。トウキョウ X の更なる改良, または基礎豚としてトウキョウ X を用いて新たな系統の造成の際には, トウキョウ X の遺伝的構成, 特には合成系統豚の系統遺伝学的特徴を理解することが必要不可欠である。

トウキョウ X では, 血液型および蛋白多型による遺伝的分析（大石ら, 1992）, PCR-RFLP法を用いた識別法の開発（Suzuki *et al.*, 2012）やマイクロサテライト領域を用いた分析（田原ら, 2018）が系統発生的知見を得るために行われてきた。そこでは, トウキョウ X とヨーロッパ系品種が遺伝的に類縁であること示されている。しかしながら, トウキョウ X に対する中国在来豚の詳細な遺伝的寄与率は明らかにされていない。加えて, 第2章の図4で示しているように, 中国系である北京黒豚を使用しているにも関わらず系統樹からは中国系品種から大きく明確に分離して, その痕跡を発見することが出来なかった。

そこで, 本研究は合祖理論に基づいて中国在来豚がトウキョウ X のゲノムに遺伝的にど

の程度寄与したかを明らかにすることを目的として、母系と父系の遺伝的寄与率の違いを考慮するために常染色体（マイクロサテライト 30 座位, *MC1R* 遺伝子）, ミトコンドリア（mt）DNA（D-loop 領域）, および Y 染色体（*SRY* 遺伝子 CDS 領域, *UTY* 遺伝子 Intron1 領域）の DNA マーカーを用いて集団遺伝学的分析を行った。

第2節 材料および方法

供試動物

本研究では、2014年および2017年のトウキョウXの繁殖豚120頭から血液を採取した。これは2014年および2017年におけるトウキョウXの繁殖豚全頭である。

対照集団として、ヨーロッパ系のランドレース種（60頭）、大ヨークシャー種（60頭）、中ヨークシャー種（30頭）、デュロック種（60頭）、バークシャー種（59頭）と中国系の金華豚（9頭）、梅山豚（60頭）のDNAを実験に供試した。これらのサンプルの内、ランドレース種、大ヨークシャー種、デュロック種、バークシャー種、梅山豚は異なる2つの農場からサンプリングされ、中ヨークシャー種および金華豚は1つの農場からサンプリングされた（表5）。DNAは、全血からプロテナーゼKにより抽出し、一般的なフェノール・クロロホルム法により精製した。詳細なサンプリングの手順は、2章にて記載されている。

マイクロサテライト多型解析

抽出されたDNAは、国際動物遺伝学会議および国際連合食糧農業機関により推奨されているマイクロサテライトマーカー30座位（2章の表2）を用いて Polymerase Chain Reaction (PCR) により目的領域を増幅した。PCR反応は、Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) を用いて、予備変性 94°Cを5分間後、熱変性 94°Cを30秒、アニーリングを30秒、伸長反応 72°Cを45秒で26サイクル行い、次いで最終伸長反応 72°Cを7分間とした。目的領域の増幅後、オートキャピラリーシークエンサー ABI PRISM® 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて解析を行い、GeneMapper® Software 4.0 (Applied Biosystems) により遺伝子型を決定した。

品種・系統間の遺伝的関連性については、Populations 1.2.31 (Langella, 1999) を用いて個体間の D_{AS} 遺伝距離 (shared allele distance: Chakraborty and Jin, 1993; Jin and Chakraborty, 1994) および集団間の D_A 遺伝距離 (Nei *et al.*, 1983) の算出を行った。ネットワーク図は、Splits Tree4 (Huson and Bryant, 2006) を用いて NeighborNet 法 (Bryant and Moulton, 2004) によって推定した。また、系統樹は、MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013) を用いて NJ 法 (近隣結合法: Saitou and Nei, 1987) により推定した。

ミトコンドリア DNA 多型解析

抽出したDNAからPCR法にてmtDNAのD-loop領域を増幅した。プライマーには、高橋ら (2010) から mitl12 (5'-GCGCACAAACATACAAATATGCG-3') と mitl214 (5'-ACGCACGTTATGTCCCGTA-3') を使用して 576bp を増幅した (表6)。PCR条件は、予備変性 94°Cを5分間後、熱変性 94°Cを30秒、アニーリング 55°Cを30秒、伸長反応 72°Cを30秒で40サイクル行い、次いで最終伸長反応 72°Cを10分間とした。PCR産物中の過剰なプライマーを ExoSAP-IT® (Affymetrix) を用いて除去した。その後、ダイレクトシー

クエンス法により塩基配列を決定した。決定した塩基配列をもとにハプロタイプ間の相互関係を明らかにするために、NETWORK 4.6 (Bandelt *et al.*, 1999) を用いて median joining (MJ) 法によりネットワーク図を作成した。品種・系統間の関係については、品種・系統間の遺伝的距離行列に基づいて Splits Tree4 を用いて NeighborNet 法によりネットワーク図を作成して推定した。これらの分析に用いられた遺伝距離は、MEGA 6.06 を使用して算出した Net 距離である。分析の中で Net 距離が負の値を示した場合は、すべてゼロとして記載した。

各品種・系統の遺伝的変異性の指標として、ハプロタイプ多様度、塩基多様度を Arlequin 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) を用いて求めた。また、品種・系統間の遺伝的分化の程度を推定するために、Arlequin を用いてペアワイズ F_{ST} 値の算出を行った。

MC1R 遺伝子多型解析

抽出した DNA から PCR 法にて MC1R 遺伝子を増幅した。プライマーには、MC1 (5' - ACCTCTGGGAGCCATGAGCTGAGCA - 3') と MC2 (5' - AGGACGGCACCACCTGCCCTCA - 3') を使用して MC1R 遺伝子の 965bp を増幅した (表 7)。PCR 条件は、予備変性 94°C を 5 分間後、熱変性 94°C を 30 秒、アニーリング 65°C を 30 秒、伸長反応 72°C を 1 分で 40 サイクル行い、次いで最終伸長反応 72°C を 10 分間とした。PCR 産物中の過剰なプライマーを ExoSAP-IT® を用いて除去した。その後、ダイレクトシークエンス法により塩基配列を決定した。決定した塩基配列をもとにハプロタイプ間の相互関係を明らかにするために、NETWORK 4.6 を用いて MJ 法によりネットワーク図を作成した。

Y 染色体遺伝子多型解析

抽出した DNA の雄個体のみを PCR 法にて SRY 遺伝子 CDS 領域および UTY 遺伝子 Intron1 領域を増幅した。プライマーには、SryF (5' - GGTGCAGTCATATGCTTCTGC - 3') と SryR (5' - TGAATAGGCCCTCTGTTCGC - 3') を使用して SRY 遺伝子の 650bp を増幅し、Ramirez *et al.* (2009) から UTYexo1 (5' - AGCTGTTTTTCGGTGATGAGG - 3') と UTYexo2 (5' - TGCCCAACAGAGTTTTAGTCC - 3') を使用して UTY 遺伝子の 330bp を増幅した (表 8)。PCR 条件は、予備変性 94°C を 5 分間後、熱変性 94°C を 30 秒、アニーリング SRY 遺伝子では 60°C、UTY 遺伝子では 65°C を 30 秒、伸長反応 72°C を SRY 遺伝子では 45 秒、UTY 遺伝子では 30 秒で 40 サイクル行い、次いで最終伸長反応 72°C を 10 分間とした。PCR 産物中の過剰なプライマーを ExoSAP-IT® を用いて除去した。その後、ダイレクトシークエンス法により塩基配列を決定した。決定した塩基配列をもとに Ramirez *et al.* (2009) と Cliffe *et al.* (2010) により報告されているタイプに基づき分類した。

進化シナリオと進化パラメータの推定

系統樹は集団の分岐のみを仮定し、集団の融合を考慮しない進化モデルである。交配によ

る品種間の交雑は農業並びに畜産の育種において基礎技術であるため、系統樹では交雑種の系統発生的特徴付けを十分に解明することはできない。従って、そのためコアレスセント理論に基づき、集団の分岐のみを考慮した進化シナリオと集団の融合を考慮した進化シナリオの比較は、品種の系統発生的特徴を評価するために必要不可欠である。そこで本研究では近似ベイズ計算 (ABC) を用いていくつかの進化シナリオを比較した。今回用いた ABC による進化シナリオのモデル選択の有用性については、Leuenberger and Wegmann (2010) において示されており、これらの論文に従って進化シナリオを選択した。

先ず、マイクロサテライト 30 座位に基づく系統樹に従って、EU1 (ランドレース種+大ヨークシャー種+中ヨークシャー種グループ)、EU2 (デュロック種+バークシャー種グループ)、Asia (金華豚+梅山豚グループ)、X (トウキョウ X) をそれぞれ OTU (操作的分類単位) と見做した。次に、系統樹から導き出された X の起源に焦点を当てた以下の 4 つの進化シナリオを想定した (図 11)。

- ・シナリオ 1: X が EU2 と Asia の交雑によって造成されたと仮定
- ・シナリオ 2: X は EU2 から直接的に派生したものと仮定
- ・シナリオ 3: X は Asia から直接的に派生したものと仮定
- ・シナリオ 4: X は EU1 と EU2 の交雑によって造成されたと仮定

これらの解析では、EU1, EU2, Asia, X のそれぞれ有効な集団サイズが異なり、系統の分岐もしくは融合の度に有効な集団サイズが変化することを仮定した。ただし、X が EU2 から分岐により直接派生するシナリオでは、X の分岐の前後で EU2 の有効な集団サイズは変わらないことを仮定した。これらの計算は、DIYABC 2.1.0 (Cornuet *et al.*, 2014) を用いた。それぞれの有効な集団サイズの事前分布は 10 頭から 10000 頭の範囲での均一分布を仮定した。分岐もしくは融合の時期の事前分布は正規分布を仮定し、EU2 と X の分岐もしくは、EU2 と Asia の融合により X が生じる時期を 100 ± 100 年前、EU1 と EU2 の分岐を $1,000 \pm 1,000$ 年前、ヨーロッパ系とアジア系の分岐を $1,000,000 \pm 1,000,000$ 年前と仮定した。マイクロサテライトの進化速度については、ガンマ分布を仮定し、平均的進化速度は Yue *et al.*に基づき 7.52×10^{-5} /座位/世代と仮定した。 10^{-6} /座位/世代を下限値、 10^{-3} /座位/世代を上限値と仮定した。各々のマイクロサテライト座位の進化速度も同様の値とした。mtDNA のヌクレオチド置換モデルには、HKY+I+ Γ モデル (Hasegawa *et al.*, 1985) を用いた。ミトコンドリアの進化速度については、一般的な事前分布を仮定し、下限および上限をそれぞれ 10^{-9} /座位/世代と 10^{-6} /座位/世代に仮定した。MC1R 遺伝子のヌクレオチド置換モデルには、HKY+I+ Γ モデルを用いた。MC1R 遺伝子の進化速度については、mtDNA についてと同様の分布を仮定した。野生のイノシシと家畜の豚とでは性的な成熟の時期が異なるが、本研究では家畜豚の解析に重点を置いているため、1 世代を 1 年と仮定した。ABC による近似ベイズ計算では、各データセットに対して 2,000,000 回のシミュレーションを行った。また、SNP データの確認バイアスが高いために、Y 染色体領域においては ABC を適用しなかった。

表 5 供試動物

品種名		略号	個体数
トウキョウX	東京都農林水産振興財団青梅畜産センター	X	120
ランドレース	株式会社フリーデン	L	30
	家畜改良センター茨城牧場		30
大ヨークシャー	株式会社フリーデン	W	30
	家畜改良センター茨城牧場		30
中ヨークシャー	家畜改良センター茨城牧場	Y	30
デュロック	株式会社フリーデン	D	30
	家畜改良センター茨城牧場		30
パークシャー	農業・食品産業技術総合研究機構	B	3
	岩手県農業研究センター畜産研究所		20
	埼玉県農業技術研究センター		36
金華豚	静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センター	J	9
梅山豚	農業・食品産業技術総合研究機構	M	15
	家畜改良センター茨城牧場		45

表 6 ミトコンドリア DNA D-loop 領域に用いたプライマー

プライマー名	プライマー配列 (5'→3')		アニーリング 温度 (°C)
	Forward		
	Reverse		
mitl12	GCGCACAAACATACAAATATGCG		55
mitl214	ACGCACGTTATGTCCCGTA		

表 7 *MC1R* 遺伝子に用いたプライマー

プライマー名	プライマー配列 (5'→3')	アニーリング 温度 (°C)
	Forward Reverse	
MC1	ACCTCTGGGAGCCATGAGCTGAGCA	65
MC2	AGGACGGCACCCTGACCCTCA	

表 8 Y 染色体遺伝子 *SRY* 遺伝子 CDS 領域および *UTY* 遺伝子 Intron1 領域に用いたプライマー

プライマー名	プライマー配列 (5'→3')		アニーリング 温度 (°C)
	Forward	Reverse	
SryF	GGTGCAGTCATATGCTTCTGC		60
SryR	TGAATAGGCCCTCTGTTCGC		
UTYexo1	AGCTGTTTTCGGTGATGAGG		65
UTYexo2	TGCCCAACAGAGTTTTAGTCC		

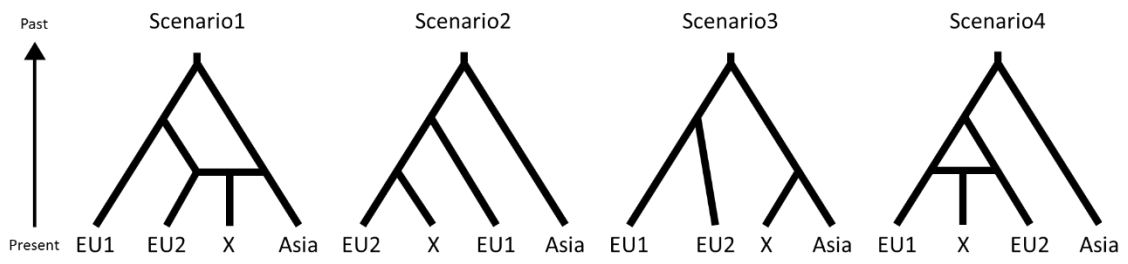


図 11 DIYABC に用いた 4 つの集団遺伝学的進化シナリオ

第3節 結果

マイクロサテライト多型解析

D_{AS} 遺伝距離に基づく NJ 法によって推定された個体間の系統樹を図 12 に示した。ヨーロッパの各品種はそれぞれ独自のクレードを形成し、更にそれらは全体としてヨーロッパの大クレードを形成した。中国の各品種・系統もそれぞれ独自のクレードを形成し、更に全体として大クレードを形成した。また、トウキョウ X も他の品種・系統と同じく独自のクレードを形成した。しかしながら、系統合成の過程で中国系の北京黒豚が用いられたという経歴にも関わらず、トウキョウ X はヨーロッパ系大クレード内の、更にはデュロック種とバークシャー種の近縁にクレードを形成した。

D_A 遺伝距離に基づいて NeighborNet 法によって推定したネットワーク図を図 13 に示した。これにおいても、ヨーロッパ系と中国系はそれぞれが独自のクレードを形成した。また、ヨーロッパ系の大クレード内では、ランドレース種、大ヨークシャー種、中ヨークシャー種がクレードを形成し、トウキョウ X はデュロック種とバークシャー種と同一のクレードを形成した。更には、トウキョウ X はこのネットワーク図においてデュロック種とバークシャー種から直接的に派生したことが示された。これらの結果から、トウキョウ X が中国系の品種よりもヨーロッパ系の品種、特にデュロック種とバークシャー種の影響を強く受けていることが示唆された。

DIYABC によって分析された 4 つの進化シナリオを比較したところ (図 11, 表 9), トウキョウ X が直接的に EU2 (デュロック種+バークシャー種) から派生したと考える進化シナリオ 2 (事後確率: 0.9997, 95%CI: 0.9994-1.0000) は、トウキョウ X が EU2 (デュロック種+バークシャー種) と Asia (金華豚+梅山豚) の交雑によって生じたと考える進化シナリオ 1 (事後確率: 0.0002, 95%CI: 0.0000-0.0004) よりも有意に支持される結果となった。また、後者の進化シナリオにおいて、中国系豚からトウキョウ X への直接的な遺伝的寄与率は僅か 2.00%であると推定された。

トウキョウ X と EU2 の間でのより詳細な関係性を解明するために、6 つの異なる進化シナリオ (図 14) を新たに比較したところ、トウキョウ X がデュロック種とバークシャー種の 2 品種の交雑によって造成されたとするシナリオが最適であるシナリオとして推定された (事後確率: 1.0000, 95%CI: 1.0000-1.0000)。

ミトコンドリア DNA 多型解析

mtDNA D-loop 領域の塩基配列を 488 個体すべてにおいて決定した。その結果、17 種類のハプロタイプが検出された (表 10)。これら 17 種類のハプロタイプ間の関係を MJ 法によって推定したネットワーク図を図 15 に示した。17 種類のハプロタイプのうち、8 つが西洋系の大クレード、9 つは中国系の大クレードとして分類された。中国系豚からは中国系の大クレードに含まれるハプロタイプのみ検出されたのに対して、ランドレース種を除く、

すべての品種において西洋系と中国系の両方のハプロタイプが検出された。また、トウキョウ X に関しては、8 種類のハプロタイプが検出され、解析に用いられた個体の 12.5% (4 種類のハプロタイプ) が西洋系の大クレードに属し、87.5% (4 種類のハプロタイプ) が中国系の大クレードに属した。次に、品種間の関係性を Net 距離に基づいて NeighborNet 法によって推定したネットワーク図を図 16 に示した。ハプロタイプ間のネットワーク図(図 15)とは対照的に、西洋系も中国系もそれぞれの大クレードを形成することはなかった。中国系のハプロタイプが高頻度で検出される大ヨークシャー種、中ヨークシャー種およびバークシャー種は(表 10)、中国系品種・系統とクレードを形成した。また、トウキョウ X も同一の中国系が含まれるクレードに属した。この結果は、 F_{ST} 値に基づくネットワーク図と概ね一致するものであった(図 17)。

DIYABC によって分析された 4 つの進化シナリオを比較したところ(図 11, 表 9)、トウキョウ X が EU2 (デュロック種+バークシャー種) から直接派生したとする進化シナリオ 2 が最も高い事後確率 (1.0000; 95%CI: 1.0000-1.0000) により支持された。また、西洋系品種における高頻度の中国系ハプロタイプを考慮して(表 10)、現存する西洋系品種が初期の過程で純粋な西洋系品種(サンプルなし)と中国系品種との間で交雑したとするより複雑な進化シナリオを用いて解析を行った(図 18)。その結果、トウキョウ X が EU2 (デュロック種+バークシャー種) に由来するという進化シナリオが最も支持された(事後確率: 1.0000, 95%CI: 1.0000-1.0000)。

MC1R 遺伝子多型解析

MC1R 遺伝子の塩基配列を 488 個体すべてにおいて決定した。本研究においては、Fang *et al.* (2009) によって定義された 0201, 0401 および 0501 の 3 つのハプロタイプが検出された(表 11)。これら 3 つのハプロタイプを用いて MJ 法によって推定したネットワーク図を図 18 に示した。これにより、Fang *et al.* によって示されている西洋系ハプロタイプ (0401 と 0501) と中国系ハプロタイプ (0201) が明確に区別された。また、トウキョウ X に関しては、解析に用いられた個体の 11.3% が西洋系の 0401 を、73.7% が西洋系の 0501 を、15.0% が中国系の 0201 を保有することが明らかになった。

DIYABC によって分析された 4 つの進化シナリオを比較したところ(図 11, 表 9)、MS と mtDNA とは対照的に、トウキョウ X は、EU2 (デュロック種+バークシャー種) と Asia (金華豚+梅山豚) の交雑によって造成されたとする進化シナリオ 1 が支持された(事後確率: 1.0000, 95%CI: 1.0000-1.0000)。

Y 染色体遺伝子多型解析

Y 染色体 *SRY* 遺伝子 CDS 領域および *UTY* 遺伝子 Intron1 領域の塩基配列を雄個体である 201 個体について決定した。本研究においては、*SRY* 遺伝子において 122 および 221, *UTY* 遺伝子において HY1 および HY3 の 2 種類のハプロタイプがそれぞれ検出された(表

12-1, 12-2)。これらのハプロタイプのうち、ハプロタイプ **HY1/122** は西洋系品種でのみ検出され、ハプロタイプ **HY3/221** は中国系品種・系統でのみ検出された。また、トウキョウ X に関してはハプロタイプ **HY1/122** が検出された (表 12-1, 12-2)。

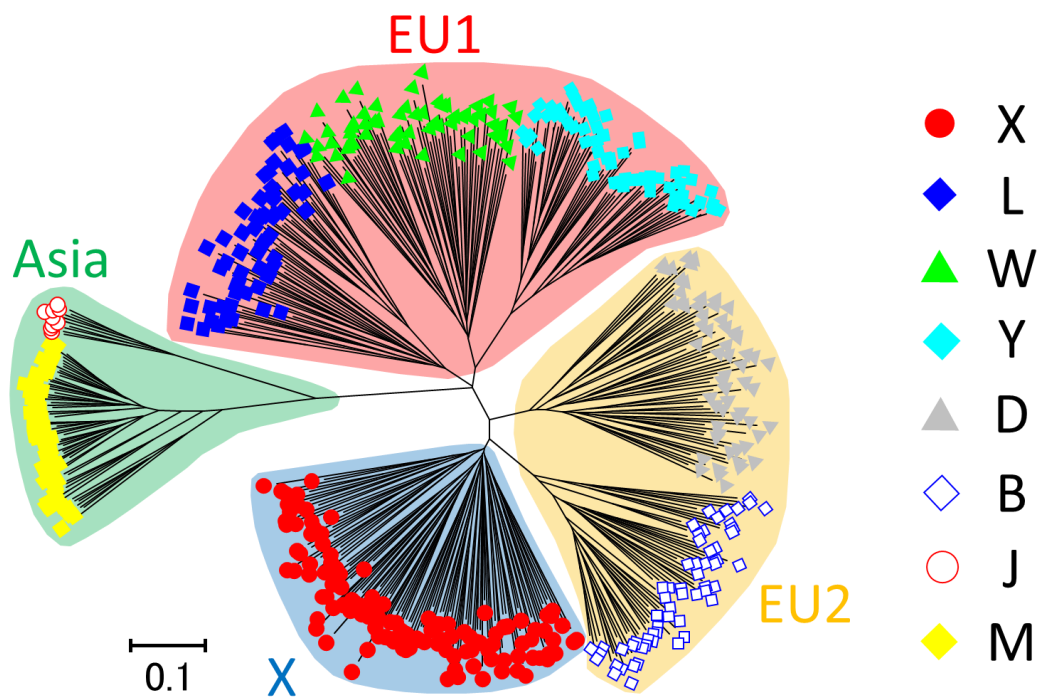


図 12 近隣結合 (NJ) 法によって推定した MS30 座位の個体間の D_{AS} 遺伝距離に基づく系統樹

品種の記号 X: トウキョウ X, L: ランドレース, W: 大ヨークシャー, Y: 中ヨークシャー, D: デュロック, B: バークシャー, J: 金華豚, M: 梅山豚.

枝の長さは遺伝距離に比例しており, 図中のスケールバーは遺伝距離を示している。

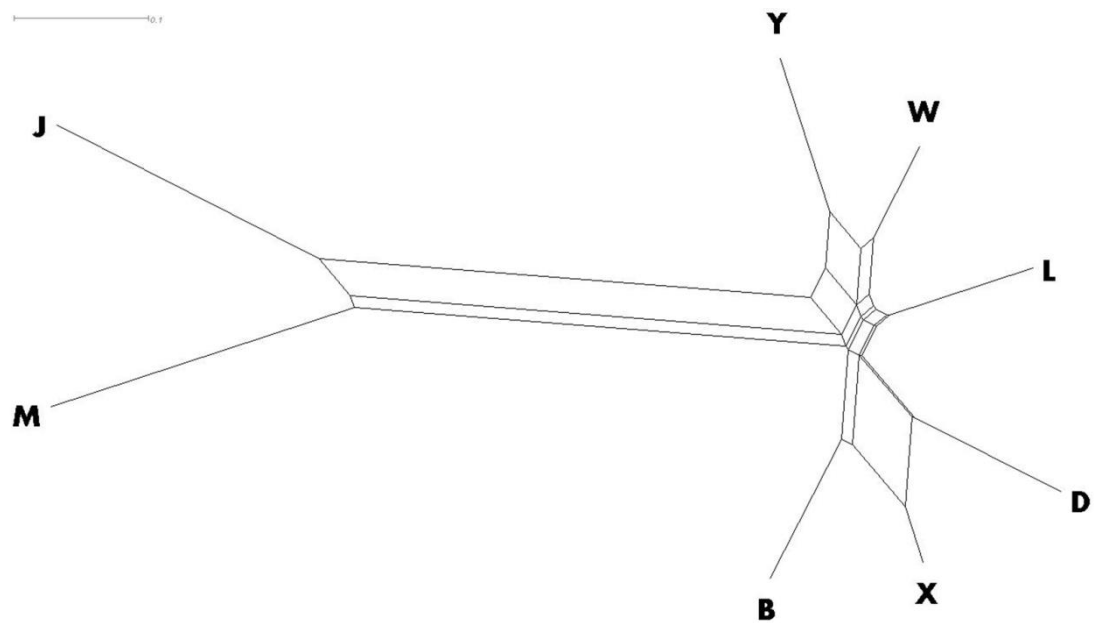


図 13 median joining (MJ) 法によって推定した MS30 座位の集団間の D_A 遺伝距離に基づくネットワーク図

品種の記号 X: トウキョウ X, L: ランドレース, W: 大ヨークシャー, Y: 中ヨークシャー, D: デュロック, B: バークシャー, J: 金華豚, M: 梅山豚.

枝の長さは遺伝距離に比例しており, 図中のスケールバーは遺伝距離を示している。

表 9 近似ベイズ計算によって推定された 4 つの進化シナリオの事後確率

	Scenario			
	1	2	3	4
MS	0.0002	0.9997	0.0000	0.0000
mtDNA	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000
<i>MC1R</i>	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000

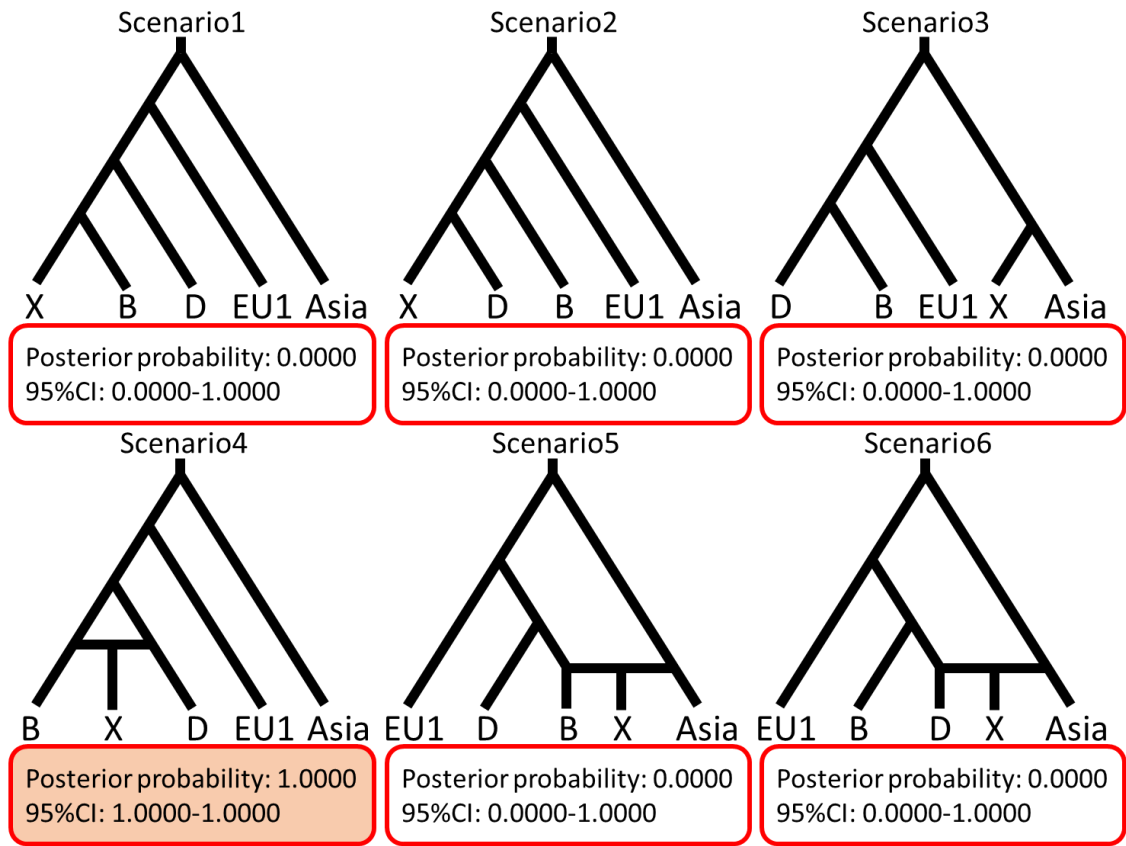


図 14 MS30 座位における DIYABC に用いた 6 つの集団遺伝学的進化シナリオと事後確率
Posterior probability は事後確率を, 95%CI は 95%信頼区間を示している。

表 10 品種・系統に認められた mtDNA D-loop 領域のハプロタイプ数

No.	Accession No.	X	L	W	Y	D	B	J	M
1	AY232880	-	10	-	-	-	-	-	-
2	AM040620	3	20	-	-	15	-	-	-
3	AB188578	-	9	-	-	-	-	-	-
4	AY230822	-	21	-	7	30	12	-	-
5	AB041493	3	-	6	-	-	-	-	-
6	AB041492	7	-	20	-	-	-	-	-
7	AY232865	-	-	2	-	-	-	-	-
8	AB041484	2	-	-	-	11	-	-	-
9	AY884823	3	-	9	-	-	18	-	-
10	AB041490	-	-	15	-	-	-	-	54
11	AB911710	-	-	4	-	-	-	-	-
12	AY232882	35	-	4	-	-	-	-	-
13	AY463073	9	-	-	54	-	12	-	-
14	AB041487	-	-	-	-	4	8	-	-
15	AF276932	58	-	-	-	-	9	-	-
16	KJ737418	-	-	-	-	-	-	-	6
17	AB041475	-	-	-	-	-	-	9	-
Total		120	60	60	61	60	59	9	60

品種の記号 X: トウキョウ X, L: ランドレース, W: 大ヨークシャー, Y: 中ヨークシャー,
D: デュロック, B: バークシャー, J: 金華豚, M: 梅山豚.

Accession No.は、NCBI の GenBank に記載されているものを用いた。

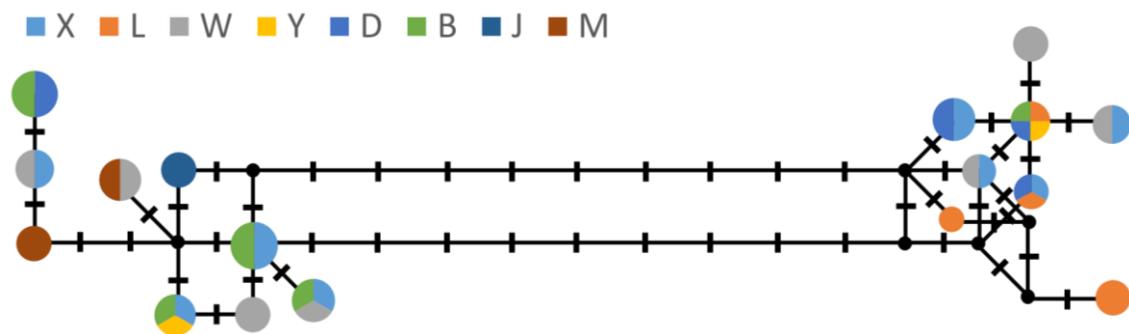


図 15 median joining (MJ) 法によって推定した mtDNA D-loop 領域のハプロタイプに基づくネットワーク図

品種の記号 X: トウキョウ X, L: ランドレース, W: 大ヨークシャー, Y: 中ヨークシャー, D: デュロック, B: バークシャー, J: 金華豚, M: 梅山豚.

点または線が, 1 塩基の置換を示している。また, 円の中はそのハプロタイプを持つ品種・系統を示している。

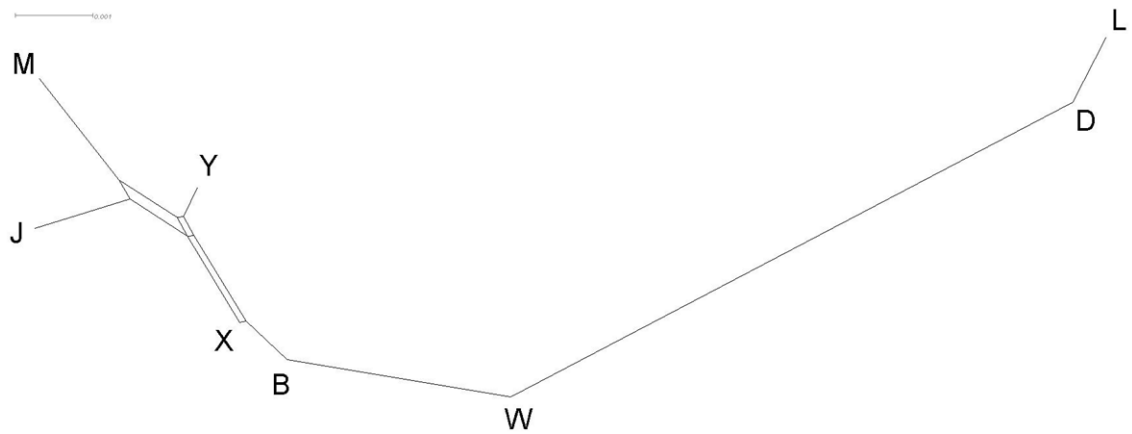


図 16 NeighborNet 法によって推定した mtDNA D-loop 領域の Net 距離に基づくネットワーク図

品種の記号 X: トウキョウ X, L: ランドレース, W: 大ヨークシャー, Y: 中ヨークシャー, D: デュロック, B: バークシャー, J: 金華豚, M: 梅山豚.

枝の長さは遺伝距離に比例しており, 図中のスケールバーは遺伝距離を示している。

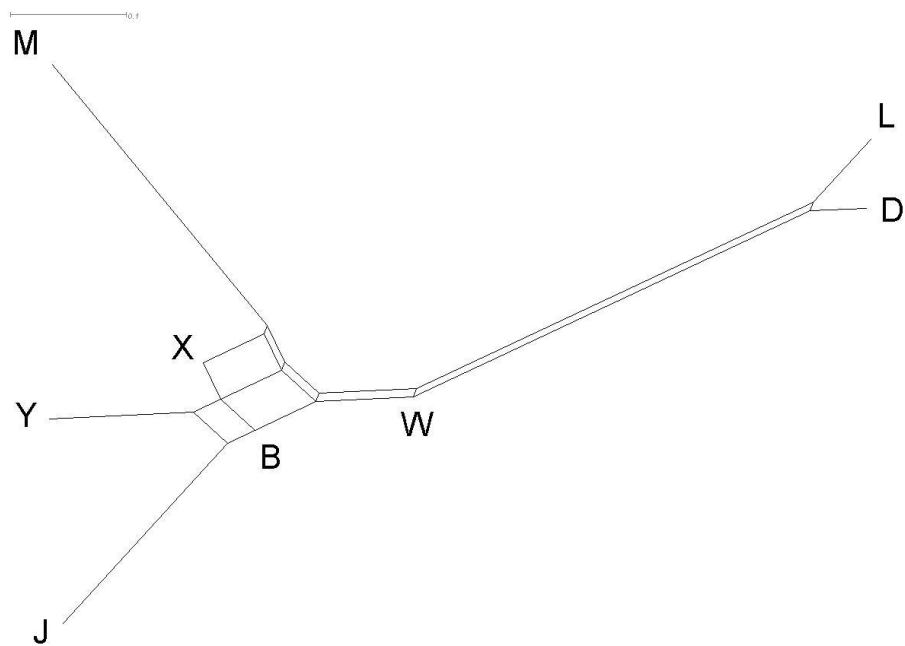


図17 NeighborNet 法によって推定した mtDNA D-loop 領域の F_{ST} 値に基づくネットワーク図

品種の記号 X: トウキョウ X, L: ランドレース, W: 大ヨークシャー, Y: 中ヨークシャー, D: デュロック, B: バークシャー, J: 金華豚, M: 梅山豚.

枝の長さは遺伝距離に比例しており, 図中のスケールバーは遺伝距離を示している。

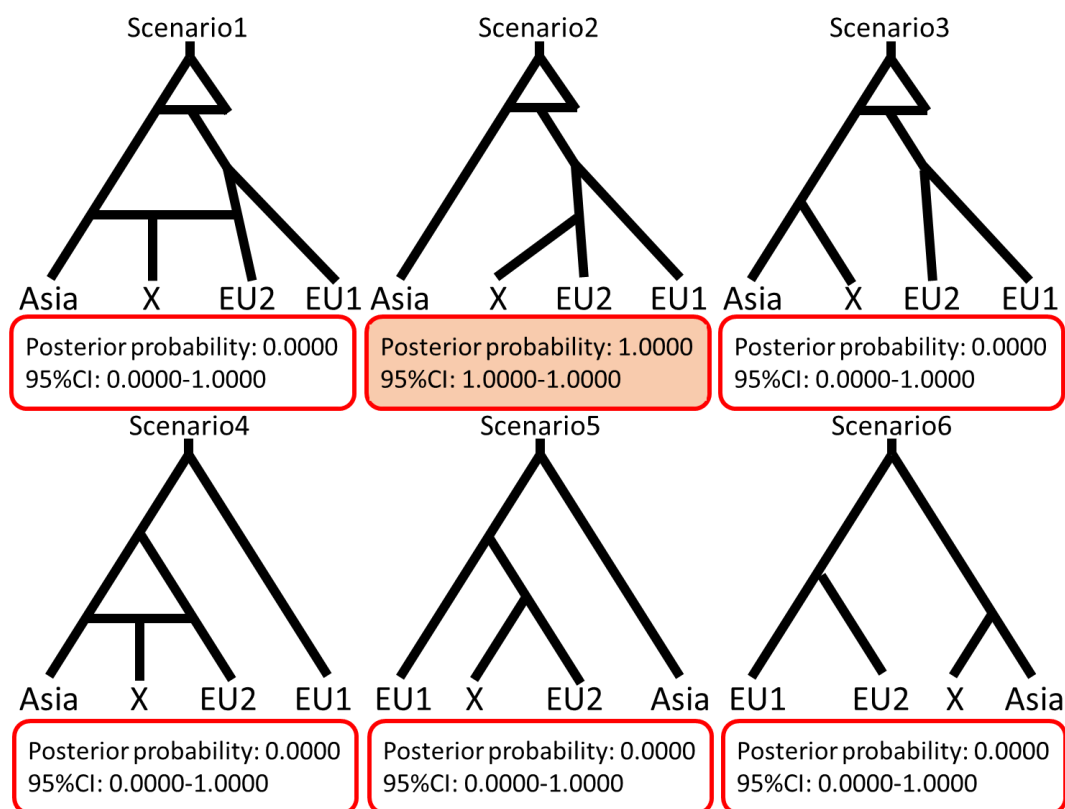


図 18 mtDNA D-loop 領域における DIYABC に用いた 6 つの集団遺伝学的進化シナリオと事後確率

Posterior probability は事後確率を, 95%CI は 95%信頼区間を示している。

表 11 品種・系統に認められた *MC1R* 遺伝子のハプロタイプ頻度

Haplotype	Haplotype frequency							
	X(120)	L(60)	W(60)	Y(60)	D(60)	B(59)	J(9)	M(60)
0201/ <i>E^{Dl}</i>	0.150	0	0	0	0	0	1.000	0.975
0401/ <i>e</i>	0.112	0	0	0	1.000	0	0	0
0501/ <i>E^P</i>	0.738	1.000	1.000	1.000	0	1.000	0	0.025

品種の記号 X: トウキョウ X, L: ランドレース, W: 大ヨークシャー, Y: 中ヨークシャー,
D: デュロック, B: バークシャー, J: 金華豚, M: 梅山豚.

Fang *et al.* (2009) によって報告されているタイプに基づき分類した。

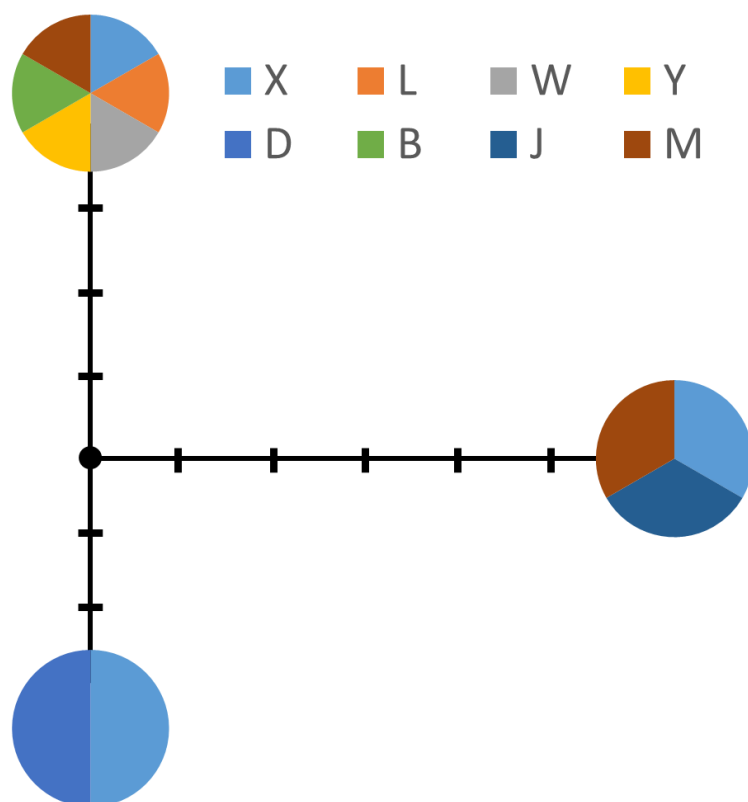


図 19 median joining (MJ) 法によって推定した *MC1R* 遺伝子のハプロタイプに基づくネットワーク図

品種の記号 X: トウキョウ X, L: ランドレース, W: 大ヨークシャー, Y: 中ヨークシャー, D: デュロック, B: バークシャー, J: 金華豚, M: 梅山豚.

点または線が、1塩基の置換を示している。また、円の中はそのハプロタイプを持つ品種・系統を示している。

表 12-1 品種・系統に認められた Y 染色体遺伝子 *SRY* 遺伝子 CDS 領域のハプロタイプ頻度

Haplotype	<i>SRY</i> CDS		Haplotype frequency							
	135	637	X	L	W	Y	D	B	J	M
122	C	G	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0	0
221	G	C	0	0	0	0	0	0	1.00	1.00

品種の記号 X: トウキョウ X, L: ランドレース, W: 大ヨークシャー, Y: 中ヨークシャー, D: デュロック, B: バークシャー, J: 金華豚, M: 梅山豚.

Cliffe *et al.* (2010) によって報告されているタイプに基づき分類した。

表 12-2 品種・系統に認められた Y 染色体遺伝子 *UTY* 遺伝子 Intron1 領域のハプロタイプ頻度

Haplotype	<i>UTY</i> Intron1			Haplotype frequency							
	110	203	256	X(36)	L(32)	W(33)	Y(29)	D(28)	B(20)	J(3)	M(20)
HY1	G	T	C	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0	0
HY3	C	C	G	0	0	0	0	0	0	1.00	1.00

品種の記号 X: トウキョウ X, L: ランドレース, W: 大ヨークシャー, Y: 中ヨークシャー, D: デュロック, B: バークシャー, J: 金華豚, M: 梅山豚.

Ramirez *et al.* (2009) によって報告されているタイプに基づき分類した。

第4節 考察

MC1R 遺伝子を除いて、すべての常染色体遺伝子（マイクロサテライト 30 座位）、母系遺伝子領域（mtDNA D-loop 領域）および父系遺伝子領域（Y 染色体遺伝子）においてトウキョウ X は西洋系豚、特にデュロック種+バークシャー種（EU2）から直接的に派生したとする進化シナリオを強く支持し、中国系豚からの遺伝的寄与は検出されなかった（表 10）。トウキョウ X の基礎豚となっている北京黒豚は中国の豚品種であると考えられているため、血統情報に基づく北京黒豚のトウキョウ X への遺伝的寄与率は 26.4%と推定されているので、今回得られたこの新たな知見はトウキョウ X の繁殖歴と矛盾するように思える。

この矛盾の尤もらしい解釈としては、トウキョウ X の基礎豚系統として用いられた日本に持ち込まれた北京黒豚のゲノムが、ほぼすべて西洋系の豚ゲノムに置き換えられていた可能性が考えられる。北京黒豚は、中国在来豚（Dingxian, Shenxian, Zhouxian）とヨーロッパ系の豚（バークシャー種と大ヨークシャー種）が造成の過程で用いられ、交雑することで造成されたとされている（Porter, 2002）。大石ら（1992）は、血液型と生化学的な多型を用いた主座標分析により、北京黒豚は中国系品種ではなく西洋系品種との間に遺伝的親和性を示している。大石ら（1992）の分析に用いられている北京黒豚集団は、トウキョウ X の基礎豚系統として直接用いられたものである。このことから、北京黒豚のゲノムは西洋系豚のゲノムによってほぼ完全に置き換えられていたことを示唆している。

上述したように、マイクロサテライト、mtDNA および Y 染色体遺伝子座において中国在来豚からトウキョウ X への遺伝的寄与は検出されなかった。しかしながら、毛色に関連する *MC1R* 遺伝子においては、中国在来豚の遺伝子もトウキョウ X の造成に遺伝的に関与しているとする進化シナリオを支持した。更には、*MC1R* 遺伝子においては他の遺伝子座において支持されていた進化シナリオ 2 を支持しなかった。そのため、*MC1R* 遺伝子を除いて、トウキョウ X は中国在来豚から如何なる遺伝的寄与なしに EU2 から直接的に造成されたことが支持されている（表 9）。このような *MC1R* 遺伝子と他の遺伝子座との間の明らかな矛盾は、遺伝的浮動というよりも選抜によって引き起こされている可能性が高いと考えられる。動物の家畜化の過程で *MC1R* 遺伝子に見られる正の選択の存在を考慮すると（Fang *et al.*, 2009; Ludwig *et al.*, 2009）、近年の繁殖過程においても *MC1R* 遺伝子に人為的な選抜が起こった可能性は十分に考えられる。

トウキョウ X の基礎豚の繁殖歴を考慮すると、トウキョウ X において見られる *MC1R* 遺伝子の中国系のハプロタイプには 2 つの理由が考えられる。まず考えられる理由としては、北京黒豚である。前述したように、北京黒豚は中国在来豚をバークシャー種のような西洋系品種と交雑することによって造成された。バークシャー種は毛色に特徴があり、一般的にバークシャー種の毛色は「六白」と呼ばれ、黒地に 6 箇所（6箇所）の白毛を持つ（Porter *et al.*, 2016）。対して北京黒豚は、バークシャー種特有の「六白」を元来保有していない。正田（2006）によると、1961年から1982年にかけて北京黒豚を造成する過程で、20年以上に渡って黒色

の毛色が人為的に選抜されているとされている。この過程において、中国系の *MC1R* 遺伝子のハプロタイプが積極的に選抜されたため、北京黒豚の毛色が中国系の黒の毛色で固定された可能性が考えられる。

次に考えられる理由としては、トウキョウ X の基礎豚系統である鹿児島パークシャー種である。宮路 (1999) によると、鹿児島パークシャー種は明治時代 (1868-1912) に英国から導入されたパークシャー種を鹿児島県で飼育されていた在来豚を交雑させることによって造成された。鹿児島地方で飼育されていた在来豚は、元々中国から導入された沖縄の在来豚を 14 世紀に導入したものである (宮路, 1999; 高田ら, 2018)。それ故に、鹿児島パークシャー種が中国系の *MC1R* 遺伝子のハプロタイプを持っている可能性は十分に考えられる。

本研究において常染色体マイクロサテライト 30 座位, mtDNA D-loop 領域および Y 染色体遺伝子を用いた解析で実証されたように、トウキョウ X のゲノムは基本的には西洋系豚品種、特にデュロック種およびパークシャー種から形成されている。しかしながら、*MC1R* 遺伝子が他の遺伝子座と著しく異なる系統遺伝学的歴史も示された。このような特定の遺伝子座の系統遺伝学的歴史が他の遺伝子座と有意に異なる場合、これは、選抜の証であると考えることが出来る (Vitti *et al.*, 2013)。従って、そのような遺伝子座はその品種において特徴的な改良に関連している可能性が考えられる。実際にトウキョウ X の繁殖方針では毛色が選抜されていないため、現段階においてトウキョウ X は、*MC1R* 遺伝子で人為的な選抜が行われているとは言い切れない。

基礎豚の特異的な改良に関連する重要な遺伝子の検出は、トウキョウ X の品質の更なる向上のために重要な情報を提供する可能性を秘めていると考えられる。本研究において実証されているように、系統関係の変動に焦点を当てて詳細な集団遺伝学的解析を行うことによって、より専門的な改善に関連する候補遺伝子の探索に貢献出来ると考えている。

第 5 節 小括

トウキョウ X とは東京都畜産試験場にて造成された日本初の合成系統豚であり、この合成系統を生産するために基礎豚としてデュロック種、バークシャー種、北京黒豚の 3 品種を用いられた。トウキョウ X の更なる改良のためには、品種の系統遺伝学的特徴をより深く理解する必要がある。しかしながら、基礎豚のひとつとなった北京黒豚は北部中国系品種から作出された合成品種であるために、中国在来豚がトウキョウ X のゲノムにどの程度寄与したかは分っていない。

そこで、本研究ではトウキョウ X に寄与した北京黒豚のゲノムを探索すべく、常染色体、Y 染色体およびミトコンドリアの DNA マーカーを用いて集団遺伝学的解析を行った。

MS30 座位について集団遺伝学的解析を行ったところ、トウキョウ X がヨーロッパ系豚、特にデュロック種+バークシャー種に由来することが明らかになった。また、トウキョウ X において中国在来豚からの遺伝的貢献を示した証拠は検出されなかった。このことは、トウキョウ X が造成された繁殖歴と矛盾するかもしれないが、この解釈として、北京黒豚のゲノムが中国において何世代にも渡って改良されることにより、ヨーロッパ系豚のゲノム、特にバークシャー種によってほぼ完全に置き換えられていた可能性が考えられる。しかしながら、毛色の多様性を制御している *MC1R* 遺伝子においては中国在来豚からトウキョウ X への直接的な遺伝的寄与を示唆する進化シナリオを支持する結果となった。これは、北京黒豚の改良過程でバークシャー種にほぼ置き換えられていったが、見た目で判断が可能である毛色においてはアジアのハプロタイプである黒の毛色を積極的に固定されていった可能性が考えられる。今回検出された基礎豚に行われた特徴的な改良に関連する重要な遺伝子は、今後、トウキョウ X の品質の更なる向上のために重要な情報を提供する可能性を秘めていると考えられる。

第4章 小規模の閉鎖群により維持されているトウキョウ X の遺伝的特性の年次推移

第1節 諸言

保全生物学的に閉鎖群集団を維持していくためには、世代を通して遺伝的多様性および遺伝的構成（例えば、対立遺伝子頻度や集団構造など）を維持していくことが重要な課題となる。集団の大きさは、その保全状況や、ブランド戦略のためにも維持する必要があるが、通常、遺伝的浮動の影響は集団が小さければ小さいほど顕著なため、遺伝的多様性は急速に減少し、遺伝的構成は劇的に変化していくことが予想出来る (Hartle and Clark, 2007)。従って、遺伝的多様性および遺伝的構成を維持することを目標として、近交係数を抑制するための適切な繁殖計画は動物保護 (Farquharson *et al.*, 2017; Miller *et al.*, 2017; Jansson and Laikre, 2018) および家畜管理 (徳永ら, 2011; 永井ら, 2016) の分野において必要不可欠な条件である。そのため、育種計画において一般的には、近交係数などの血統解析に基づいて評価が行われている (古川ら, 1987; 田島ら, 2003; 長渕ら, 2011; 山内ら, 2013; 永井ら, 2016; Marques *et al.* 2017)。しかしながら、血統情報に基づく統計遺伝学的解析では、遺伝的浮動の影響を考慮していないために遺伝的多様性および遺伝的特徴が世代を通してある特定の閉鎖群小集団においてどのように変化するかを正確に評価することは困難である。従って、分子遺伝学的マーカーを用いて遺伝的多様性および遺伝的構成の年次推移に関する詳細な分析を行うことによって、小規模な閉鎖群集団の繁殖計画を評価する必要があると考える。

本研究においては、遺伝的多様性および遺伝的構成が年々どのように維持されているか、または変化しているのかを示すために DNA マーカーを用いて合成系統豚トウキョウ X の出生年ごとの年次別のコホートに分類して分析を行い、DNA マーカーを用いた集団遺伝学的解析と血統情報に基づく統計遺伝学的解析を比較することで統計遺伝学的解析の効率性を実証することである。トウキョウ X は、他の豚品種では滅多に見ることのできない「さし」の入ったロース肉、脂肪のうま味が何よりの特徴である (三枝と河野, 1998)。そのため、トウキョウ X の豚肉の品質は官能検査によって非常に高い評価を受けており (高崎ら, 2005; 小嶋, 2015)、東京都においても最も重要なブランディング農産物および畜産物の 1 つとして宣伝されている。トウキョウ X は、1990 年に東京都畜産試験場 (現青梅畜産センター) でデュロック種、鹿児島パークシャー種、英国パークシャー種、北京黒豚の 4 品種・系統を基礎豚として系統造成が開始され、1997 年に日本種豚登録協会 (現日本養豚協会) から系統認定された日本初の合成系統豚である (兵頭, 1998)。認定以降、認定集団の遺伝構成を維持するとともに近交係数の上昇を抑制するために、個体間の血縁係数を抑制する組み合わせで交配を実施している。

現在、適切な交配計画によって近交係数は共祖係数と比較して抑制されてはいるが、トウキョウ X は 20 年もの間、小規模の閉鎖群により維持されているため、近交係数、血縁係

数および共祖係数のすべてが年々上昇傾向である（永井ら，2016）。そのため，近交度の蓄積による遺伝的多様性の低下が危惧されている。現在，トウキョウ X だけではなく家畜の遺伝的多様性および遺伝的構成の年次推移は，統計解析に基づいて間接的な評価が行われている。そこで，本研究の目的は，DNA マーカーを用いて合成系統豚トウキョウ X の遺伝的多様性および遺伝的構成の年次推移を直接的に推定し，血統情報に基づく統計遺伝学的解析の効率性を評価することである。

これまで述べたように家畜の飼育においては，各世代の遺伝形質の推移を詳細に調べることが重要である。近年，Doekes *et al.* (2018) は，ゲノムの広範囲の SNP データを用いて有効な集団の大きさと近交係数に焦点を絞って，近交係数の蓄積による対立遺伝子頻度の年次推移を評価している。しかしながら，これらの結果は強い選抜の掛かった繁殖集団であり，また，これは開放群についてのものであるため，何世代にも渡って集団が変化することなく形質を維持していくために繁殖を行っている小規模の閉鎖群についてはほとんど研究が行われていない。本研究で得られる知見は，家畜品種・系統の管理のみならず，絶滅の危機に瀕している野生種の保護にも有益な情報を提供することになると考えている。

第2節 材料および方法

供試動物

本研究では、青梅畜産センターで飼育されていた2014年および2017年のトウキョウXの繁殖豚120頭の血液と、家畜改良事業団に保管されていたところの2001年から2016年までに青梅畜産センターで飼育されていた254頭の肥育豚の毛根サンプルから、トウキョウXのDNAを抽出して精製した。これら374個体は生年ごとに年次別のコホートに分類したが、2001年、2002年および2016年からサンプリングされた個体数は限定的だったため、2001年、2002年および2003年に生まれた個体を1つのコホート(X3)に、2015年および2016年に生まれた個体を1つのコホート(X15)にまとめて解析を行った(表13)。血液を採取した120頭のDNAは、全血からプロテナーゼKにより抽出し、一般的なフェノール・クロロホルム法により精製した。詳細なサンプリングの手順は、2章にて記載されている。更に、毛根からのDNAはDNA Extractor® FM Kitを用いて抽出した。

マイクロサテライト多型解析

抽出されたDNAは、国際動物遺伝学会議および国際連合食糧農業機関により推奨されているマイクロサテライトマーカー30座位(2章の表2)を用いてPolymerase Chain Reaction (PCR)により目的領域を増幅した。PCR反応は、Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems)を用いて、予備変性94°Cを5分間後、熱変性94°Cを30秒、アニーリングを30秒、伸長反応72°Cを45秒で26サイクル行い、次いで最終伸長反応72°Cを7分間とした。目的領域の増幅後、オートキャピラリーシーケンサーABI PRISM® 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いて解析を行い、GeneMapper® Software 4.0 (Applied Biosystems)により遺伝子型を決定した。

生年ごとに年次別の遺伝的多様性を評価するために、平均アレル数、有効アレル数、ヘテロ接合度の期待値および観測値をGenAlEx 6.503 (Peakall and Smouse, 2012)で、アレリックリッチネスをFSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002)を用いて算出した。また、GenAlEx 6.503はすべての個体間および年次別のコホート間での主座標分析(Principal Coordinate Analysis; PCoA: Gower, 1966)にも使用した。個体間および年次別のコホート間の遺伝的関連性について明らかにするために、Populations 1.2.31 (Langella, 1999)を用いて D_A 遺伝距離 (Nei *et al.*, 1983) および D_{AS} 遺伝距離 (shared allele distance: Chakraborty and Jin, 1993; Jin and Chakraborty, 1994) を、GenAlEx 6.503を用いて F_{ST} 値を算出した。 F_{ST} 値においても遺伝的差異を評価することは可能ではあるが、 F_{ST} 値は対立遺伝子頻度、言い換えればヘテロ接合度に基づいて集団間の遺伝的差異を評価しており、個々の対立遺伝子間について、それぞれ定量的な評価はされておらず、突然変異率の影響も受けやすい。これに対してAMOVA (analysis of molecular variance) による Φ_{st} 値は、ハプロタイプや遺伝子型間の遺伝的な差異も評価しつつ、遺伝的多様性の大きさを集団内と集団間に階

層的に分割して解析することで、全体を通して相対的に遺伝的差異や系統的差異を評価しているため、より遺伝子情報を活用して解析することができる (Excoffier, 2007)。そこで、GenAlEx 6.503 を用いて AMOVA を行い、座位ごとにおける Φ_{st} 値を算出した。ネットワーク図は、Splits Tree4 (Huson and Bryant, 2006) を用いて NeighborNet 法 (Bryant and Moulton, 2004) によって推定した。

ミトコンドリア DNA 多型解析

抽出した DNA から PCR 法にてミトコンドリア (mt) DNA の D-loop 領域を増幅した。プライマーには、高橋ら (2010) から mitl12 と mitl214 を使用して 576bp を増幅した (3章の表 6)。PCR 条件は、予備変性 94°C を 5 分間後、熱変性 94°C を 30 秒、アニーリング 55°C を 30 秒、伸長反応 72°C を 30 秒で 40 サイクル行い、次いで最終伸長反応 72°C を 10 分間とした。PCR 産物中の過剰なプライマーを ExoSAP-IT® (Affymetrix) を用いて除去した。その後、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。生年ごとに年次別の遺伝的多様性を評価するために、ハプロタイプ多様度、塩基多様度、 Φ_{st} 値を生年ごとに Arlequin 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) を用いて求めた。また、年次別の関係については、年次別のコホート間の遺伝的距離行列に基づいて Splits Tree4 を用いて NeighborNet 法によりネットワーク図を作成して推定した。これらの分析に用いられた遺伝距離は、MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013) を使用して算出した Net 距離である。分析の中で Net 距離が負の値を示した場合は、すべてゼロとして記載した。

MC1R 遺伝子多型解析

抽出した DNA から PCR 法にて MC1R 遺伝子を増幅した。プライマーには、MC1 と MC2 を使用して MC1R 遺伝子の 965bp を増幅した (3章の表 7)。PCR 条件は、予備変性 94°C を 5 分間後、熱変性 94°C を 30 秒、アニーリング 65°C を 30 秒、伸長反応 72°C を 1 分で 40 サイクル行い、次いで最終伸長反応 72°C を 10 分間とした。PCR 産物中の過剰なプライマーを ExoSAP-IT® を用いて除去した。その後、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。生年ごとに年次別の遺伝的多様性を評価するために、ハプロタイプ多様度、塩基多様度、 Φ_{st} 値を生年ごとに Arlequin 3.5 を用いて求めた。また、生年ごとに年次別の関係については、年次別のコホート間の遺伝的距離行列に基づいて Splits Tree4 を用いて NeighborNet 法によりネットワーク図を作成して推定した。これらの分析に用いられた遺伝距離は、MEGA 6.06 を使用して算出した Net 距離である。分析の中で Net 距離が負の値を示した場合は、すべてゼロとして記載した。

表 13 供試動物

品種	出生年	略号	個体数
トウキョウX	2001~2003	X3	12
	2004	X4	16
	2005	X5	10
	2006	X6	23
	2007	X7	17
	2008	X8	29
	2009	X9	38
	2010	X10	30
	2011	X11	47
	2012	X12	24
	2013	X13	47
	2014	X14	46
	2015~2016	X15	35

第3節 結果

遺伝的多様性の年次推移

マイクロサテライトにおける遺伝的多様性の年次推移を評価するために、コホートごとに有効アレル数、アレリックリッチネス、ヘテロ接合度の期待値および観測値を算出した結果を図 20, 21 に示した。ヘテロ接合度の期待値および観測値において (図 20), コホートごとに減少することなく推移していることから遺伝的多様性が維持されていることが示された。また、マイクロサテライト 30 座位それぞれにおいて平均アレル数およびヘテロ接合度の期待値を算出したところ (図 22-1, 2, 3), 座位ごとにバラツキはあるもののコホートごとでの遺伝的多様性と同様に維持されていることが示された。しかしながら、コホートごとの有効アレル数およびアレリックリッチネスにおいて維持されてきたが、X9 以降徐々にではあるが年々減少傾向であることが確認された (図 21)。また、マイクロサテライト 30 座位それぞれにおいて遺伝子型頻度を算出したところ (図 23-1, 2, 3), マイナーなアレルも消滅はしてはいないものの、年々頻度が変化している座位が確認された。

また、mtDNA および *MC1R* 遺伝子においても遺伝的多様性の年次推移を評価するために、コホートごとにハプロタイプ多様度および塩基多様度を算出したところ (図 24, 25), これら 2 つにおいては年々変動してはいるものの世代を通して遺伝的多様性が維持されていることが確認された。

集団構成の年次推移

マイクロサテライト 30 座位を用いて全個体を対象に D_{AS} 遺伝距離に基づき系統樹を推定した (図 26-a)。また、全個体について 30 座位の頻度をもとに PCoA を行ったところ、第 1 主座標が 7.61% を説明し、第 2 主座標が 6.32% を説明する図 26-b の関係が得られた。これらの結果からは、それぞれ個体が散在して特定のコホートをまとまりとする関係を確認することは出来なかった。

年次別のコホート間の関係を D_A 遺伝距離に基づき推定したネットワーク図が図 27 である。また、コホートを単位として PCoA を行ったところ、第 1 主座標が 41.9% を説明し、第 2 主座標が 27.5% を説明する図 28 の関係が得られた。これらの結果から、年次別に徐々にではあるが、トウキョウ X の遺伝的構成が変化していることが示された。

認定集団からの構成の変化を推定するために、コホートごとに認定集団との遺伝的差異を D_A 遺伝距離および F_{ST} 値によって評価した (図 29)。その結果、初期の段階で大きく変化した後、緩やかではあるが徐々に分化していることが示された。また、これらの結果を永井ら (2016) が算出した遺伝的寄与率変動係数と比較した (図 30)。その結果、永井らが算出した遺伝的寄与率変動係数と今回算出した D_A 遺伝距離および F_{ST} 値から確認された認定集団からの遺伝的構成の変化との間に相関関係にあることが示された。また、マイクロサテライト 30 座位それぞれにおいて認定集団との遺伝的差異を D_A 遺伝距離および F_{ST} 値にお

いて評価したところ（図 31-1, 2, 3）, コホートごとと同様に推移している座位が多く見られる中で, 変化の見られない座位もいくつか確認された。

座位ごとに認定集団と現存集団間の遺伝的差異を検出するために Φ_{st} 値を算出した（表 14）。また, それらをボックスプロットとして図 32 に示した。その結果, mtDNA, *MC1R* 遺伝子において有意な差異が見られないのに対して, マイクロサテライト 30 座位の内, Sw2406 および Sw1067 の 2 座位で有意に大きな遺伝的差異が確認された。この 2 つの遺伝子座においては遺伝子型頻度でも X3 から X15 で大きな遺伝子型頻度の差異が見られた（図 23-1, 2, 3）。

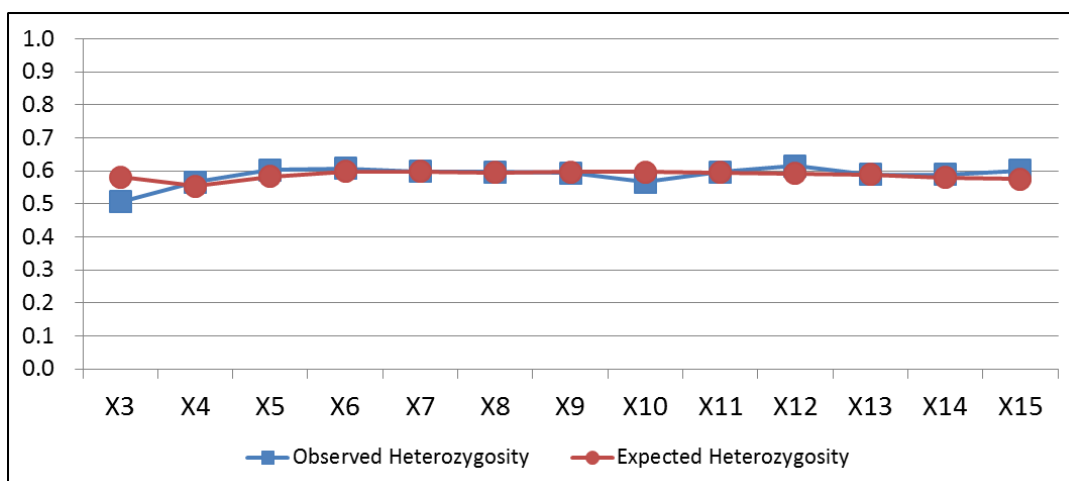


図20 マイクロサテライトマーカー30座位におけるヘテロ接合度の観測値および期待値の年次推移

トウキョウ X の生年別のコホートの分類は、次の通りである: X3 (2001 + 2002 + 2003), X4 (2004), X5 (2005), X6 (2006), X7 (2007), X8 (2008), X9 (2009), X10 (2010), X11 (2011), X12 (2012), X13 (2013), X14 (2014), X15 (2015 + 2016).

また、縦軸はヘテロ接合度の観測値および期待値を示し、横軸は生年別のコホートを示している。

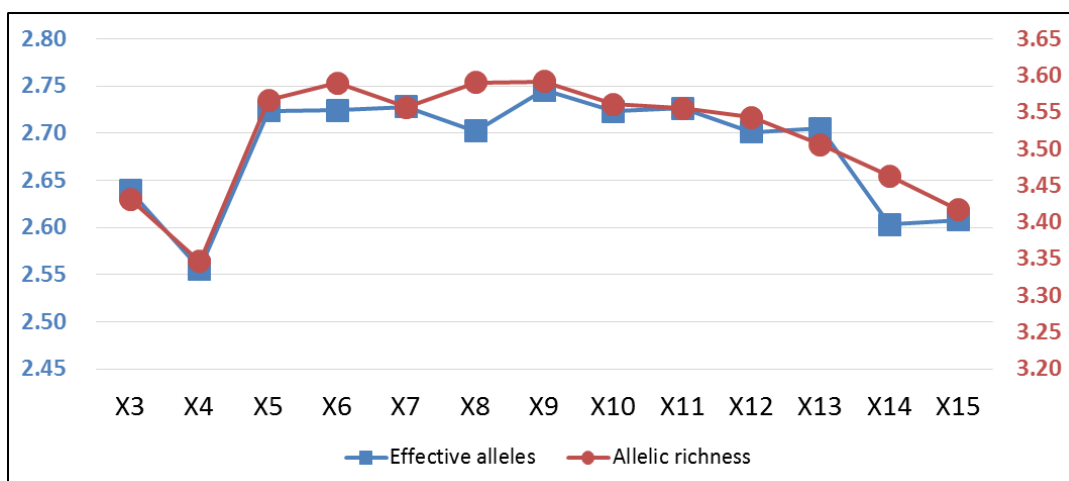
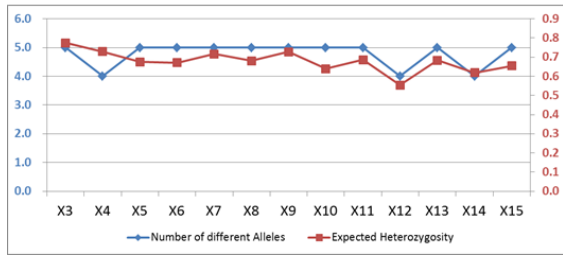


図21 マイクロサテライトマーカー30座位における有効対立遺伝子数およびアレリックリッチネスの年次推移

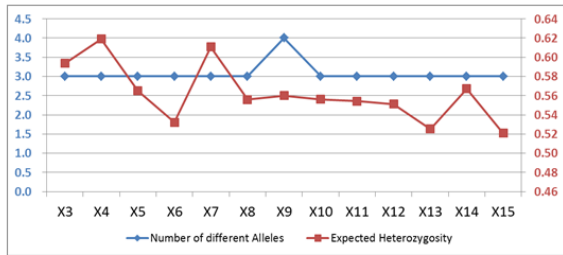
トウキョウ X の生年別のコホートの分類は、次の通りである: X3 (2001 + 2002 + 2003), X4 (2004), X5 (2005), X6 (2006), X7 (2007), X8 (2008), X9 (2009), X10 (2010), X11 (2011), X12 (2012), X13 (2013), X14 (2014), X15 (2015 + 2016).

また、左縦軸は有効対立遺伝子数を示し、右縦軸はアレリックリッチネスを示し、横軸は生年別のコホートを示している。

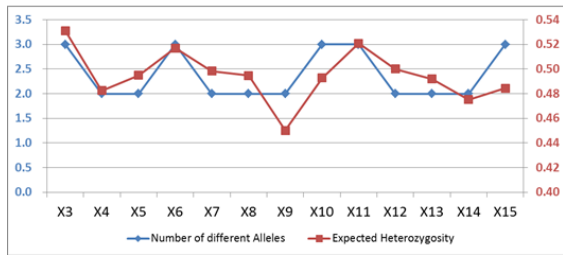
S0026)



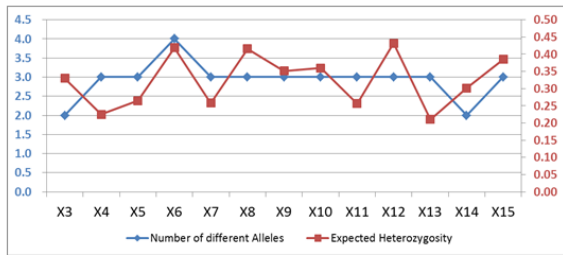
S0355)



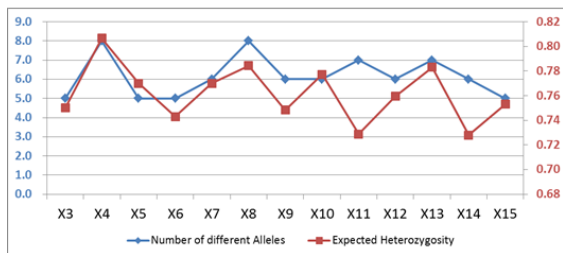
S0155)



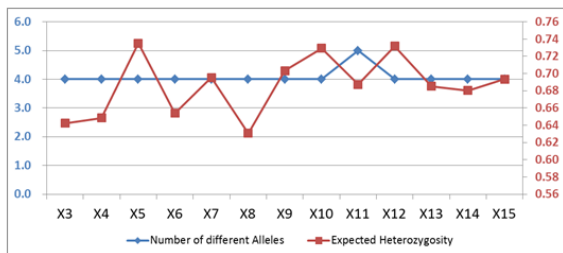
Sw24)



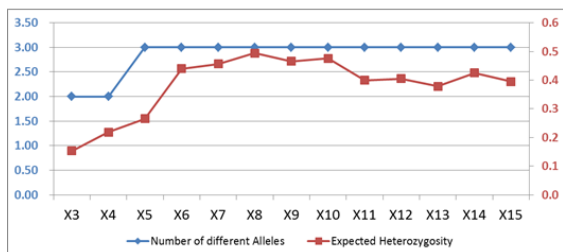
S0005)



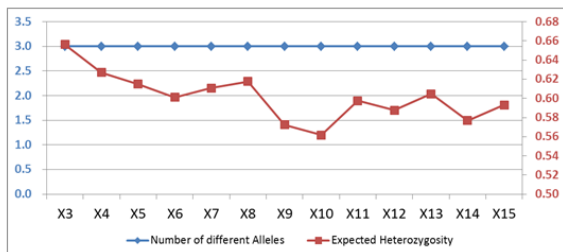
Sw632)



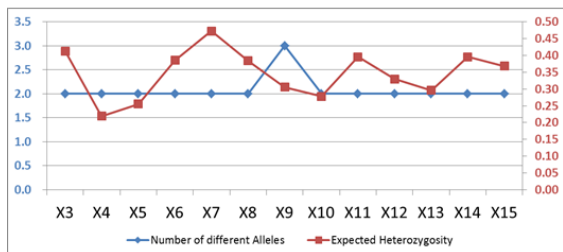
Sw2410)



Swr1941)



Sw830)



Sw936)

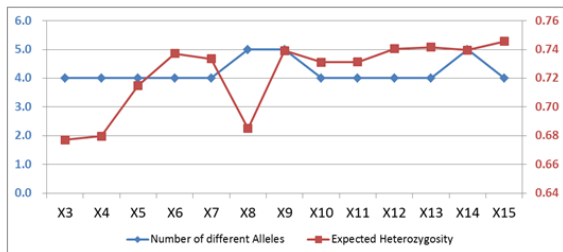


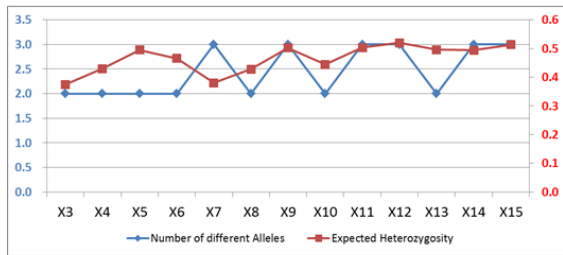
図 22-1 マイクロサテライトマーカー30 座位における座位ごとの対立遺伝子数およびヘテロ接合度の期待値の年次推移

トウキョウ X の生年別のコホートの分類は、次の通りである: X3 (2001 + 2002 + 2003), X4 (2004), X5 (2005), X6 (2006), X7 (2007), X8 (2008), X9 (2009), X10 (2010), X11 (2011),

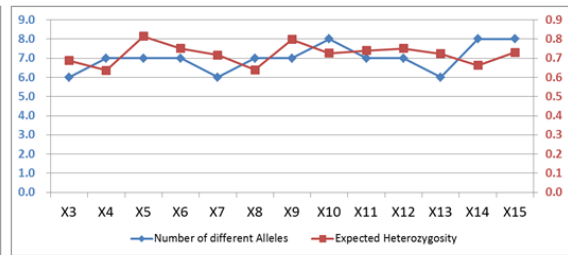
X12 (2012), X13 (2013), X14 (2014), X15 (2015 + 2016).

また、左縦軸は対立遺伝子数を示し、右縦軸はヘテロ接合度の期待値を示し、横軸は生年別のコホートを示している。

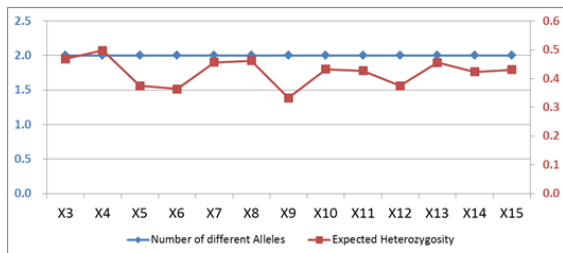
S0218)



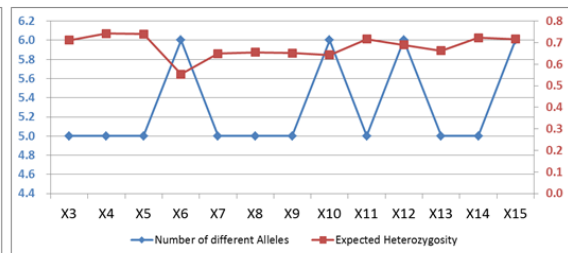
Sw240)



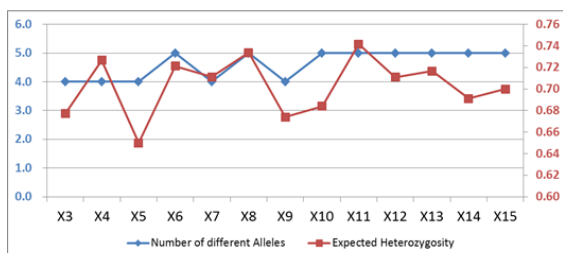
S0228)



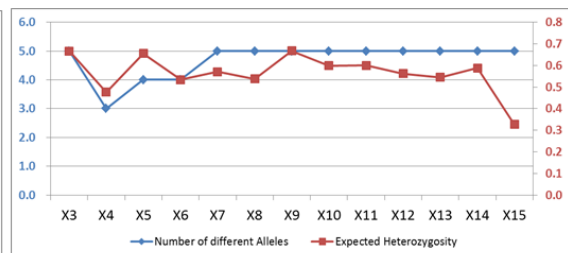
IGF1)



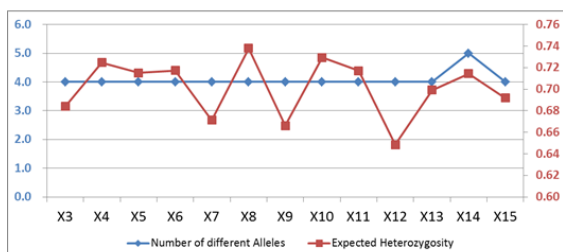
Sw122)



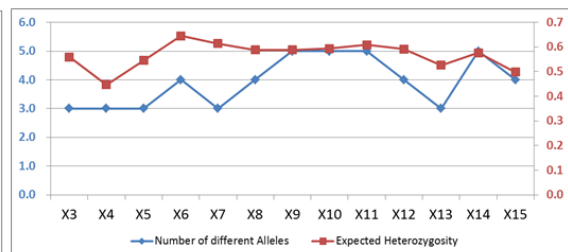
Sw2406)



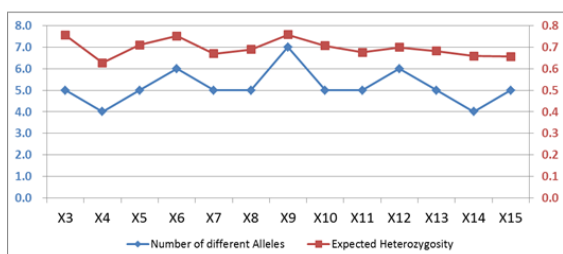
Sw857)



Sw72)



S0097)



S0226)

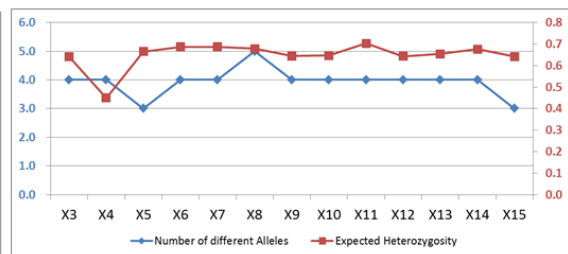
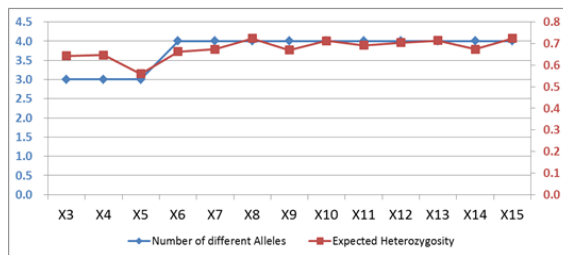


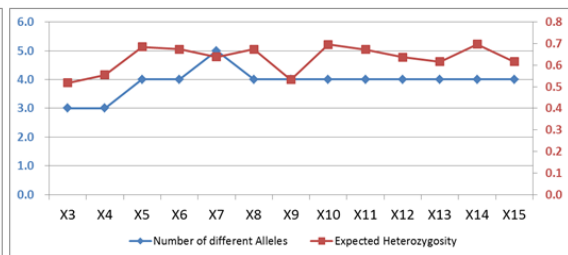
図 22-2 マイクロサテライトマーカー30座位における座位ごとの対立遺伝子数およびヘテロ接合度の期待値の年次推移

左縦軸は対立遺伝子数を示し、右縦軸はヘテロ接合度の期待値を示し、横軸は生年別のコホートを示している。

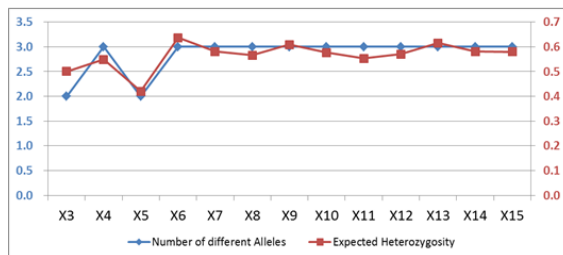
S0090)



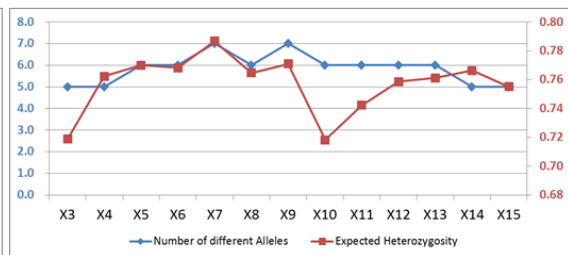
S0143)



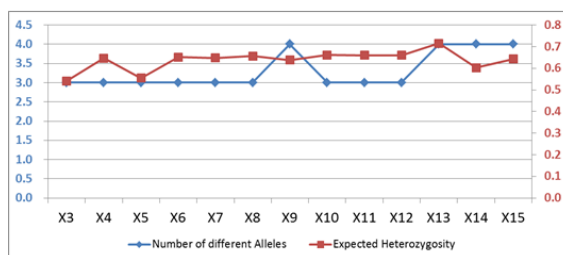
Sw2008)



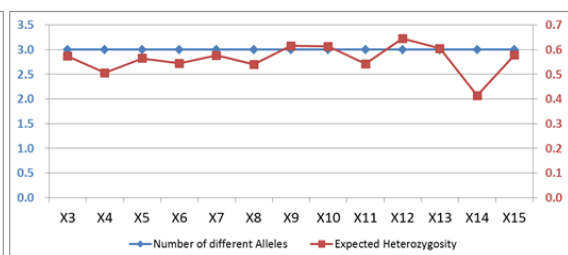
S0068)



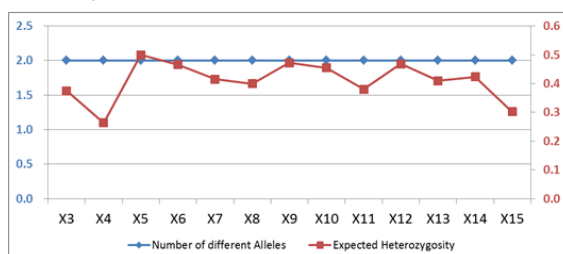
Sw1067)



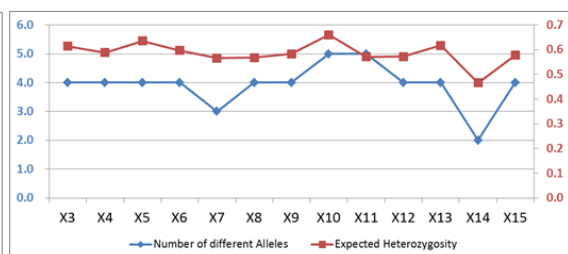
S0178)



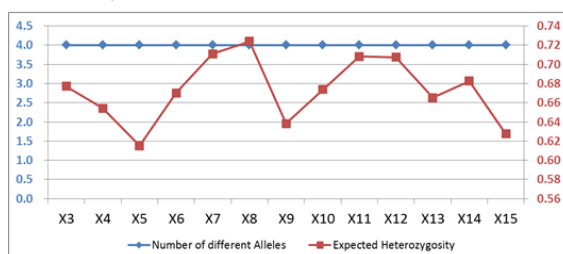
S0101)



Sw911)



Sw1828)



S0002)

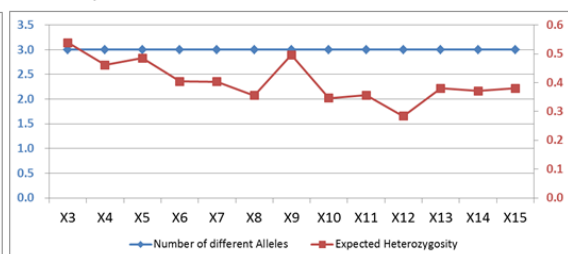
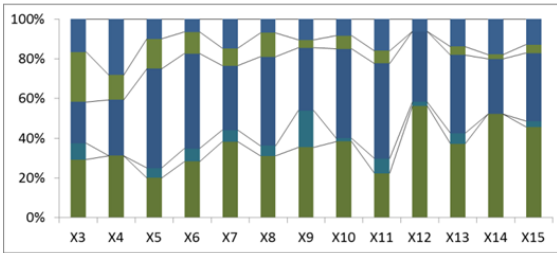


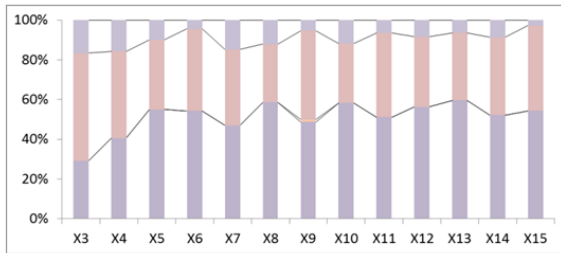
図 22-3 マイクロサテライトマーカー30 座位における座位ごとの対立遺伝子数およびヘテロ接合度の期待値の年次推移

左縦軸は対立遺伝子数を示し，右縦軸はヘテロ接合度の期待値を示し，横軸は生年別のコホートを示している。

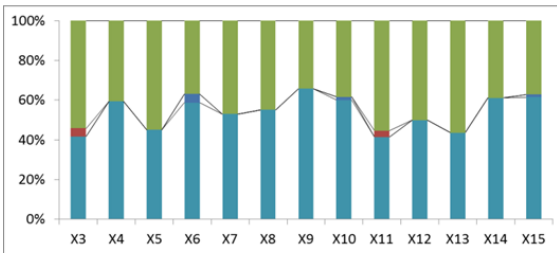
S0026)



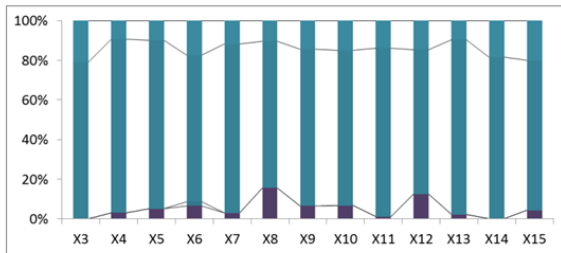
S0355)



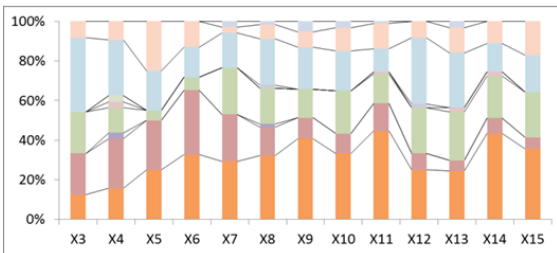
S0155)



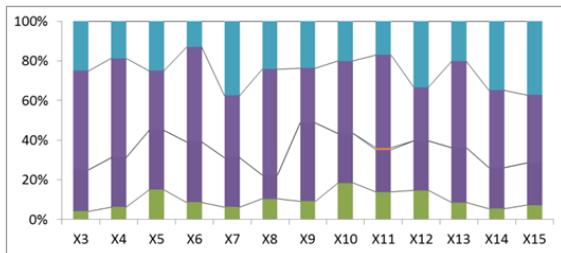
Sw24)



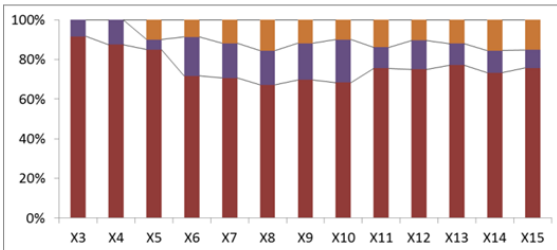
S0005)



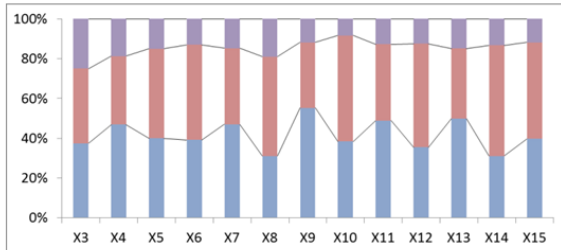
Sw632)



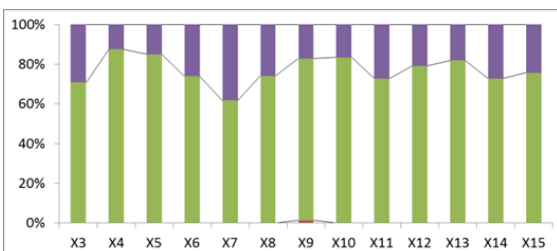
Sw2410)



Swr1941)



Sw830)



Sw936)

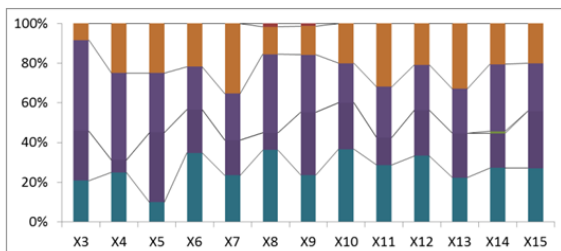
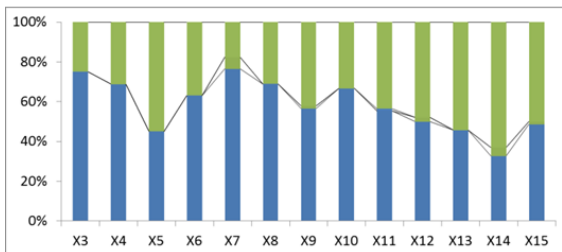


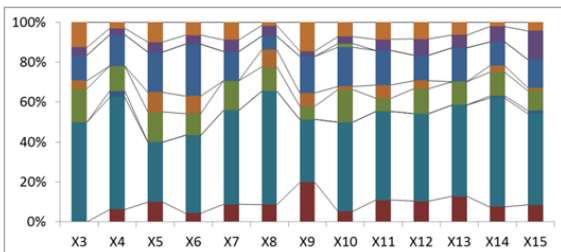
図 23-1 マイクロサテライトマーカー30座位における座位ごとの遺伝子型頻度の年次推移
 トウキョウ X の生年別のコホートの分類は、次の通りである: X3 (2001 + 2002 + 2003), X4
 (2004), X5 (2005), X6 (2006), X7 (2007), X8 (2008), X9 (2009), X10 (2010), X11 (2011),
 X12 (2012), X13 (2013), X14 (2014), X15 (2015 + 2016).

また、縦軸は座位ごとの遺伝子型頻度を示しており、横軸は生年別のコホートを示している。

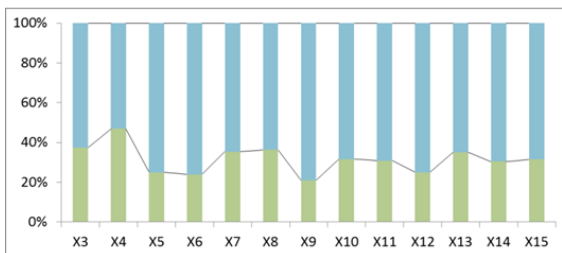
S0218)



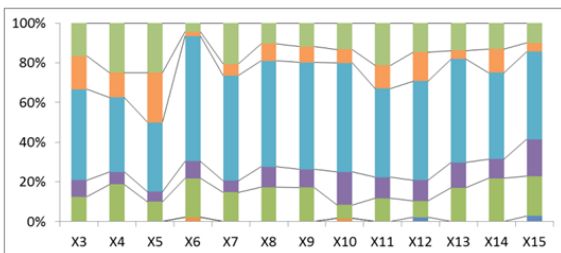
Sw240)



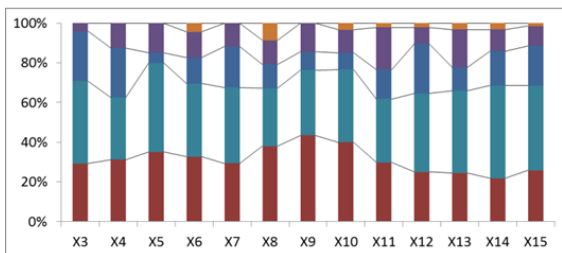
S0228)



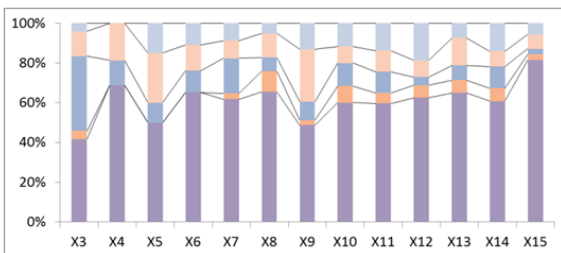
IGF1)



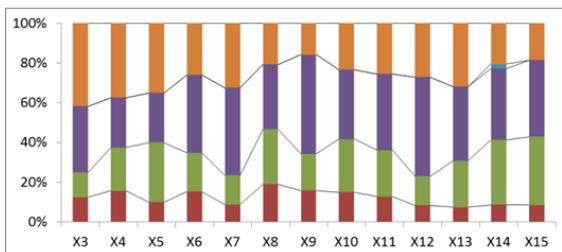
Sw122)



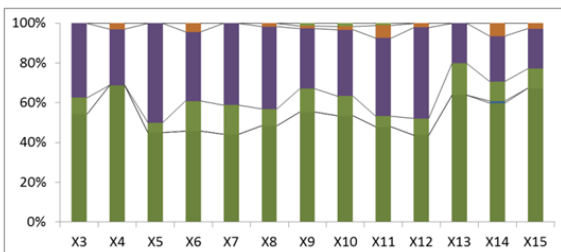
Sw2406)



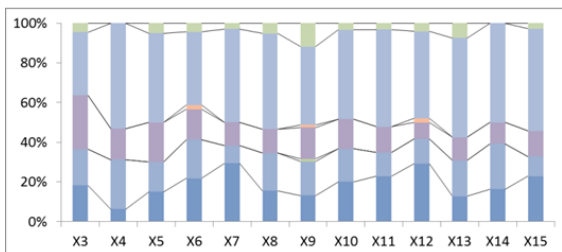
Sw857)



Sw72)



S0097)



S0226)

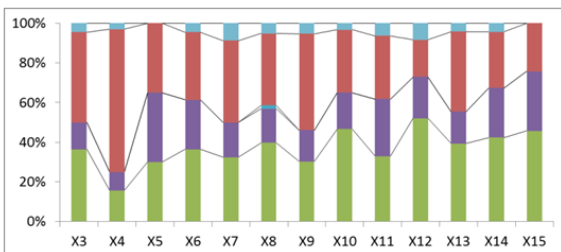
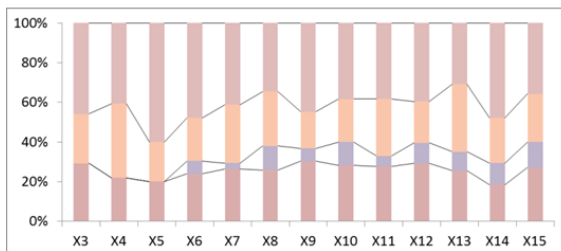
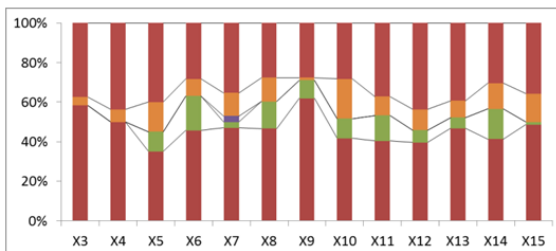


図 23-2 マイクロサテライトマーカー30座位における座位ごとの遺伝子型頻度の年次推移
縦軸は座位ごとの遺伝子型頻度を示しており、横軸は生年別のコホートを示している。

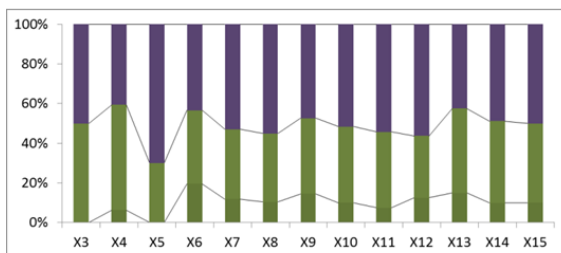
S0090)



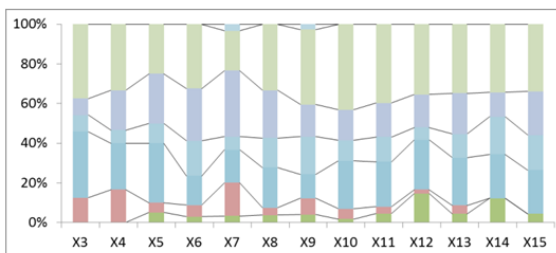
S0143)



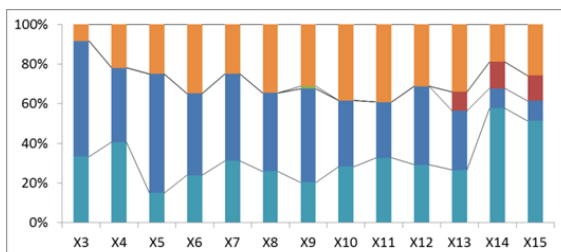
Sw2008)



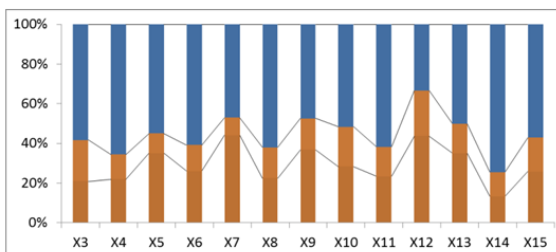
S0068)



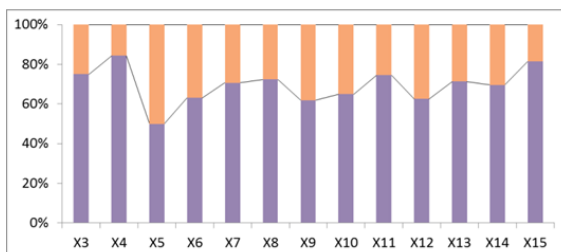
Sw1067)



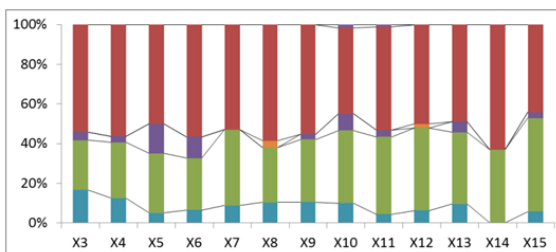
S0178)



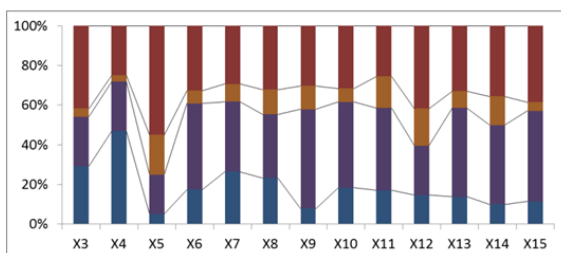
S0101)



Sw911)



Sw1828)



S0002)

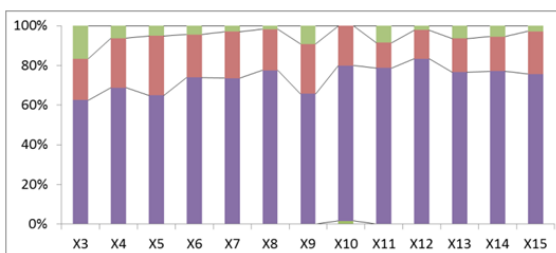


図 23-3 マイクロサテライトマーカー30座位における座位ごとの遺伝子型頻度の年次推移
縦軸は座位ごとの遺伝子型頻度を示しており、横軸は生年別のコホートを示している。

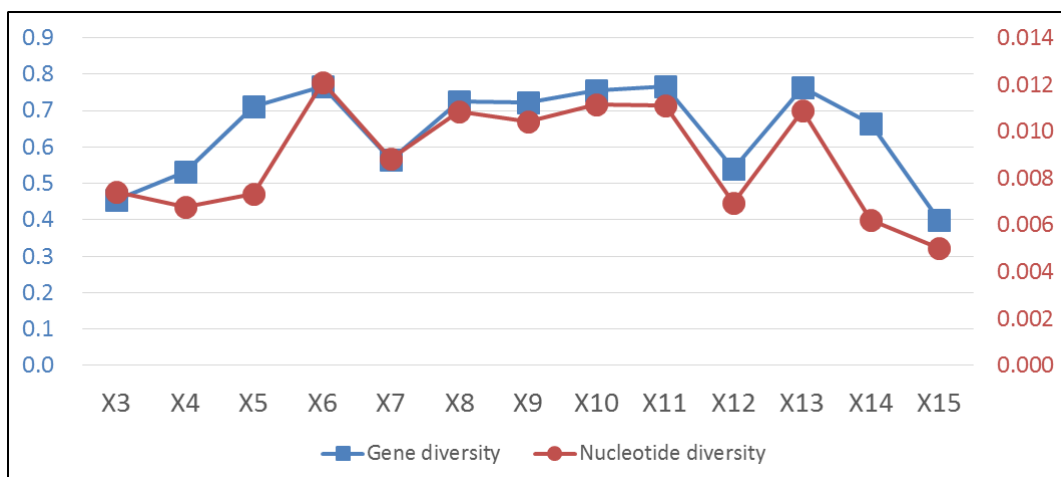


図 24 mtDNA D-loop 領域を用いたハプロタイプ多様度および塩基多様度の年次推移
 トウキョウ X の生年別のコホートの分類は、次の通りである: X3 (2001 + 2002 + 2003), X4 (2004), X5 (2005), X6 (2006), X7 (2007), X8 (2008), X9 (2009), X10 (2010), X11 (2011), X12 (2012), X13 (2013), X14 (2014), X15 (2015 + 2016).

また、左縦軸はハプロタイプ多様度を示し、右縦軸は塩基多様度を示し、横軸は生年別のコホートを示している。

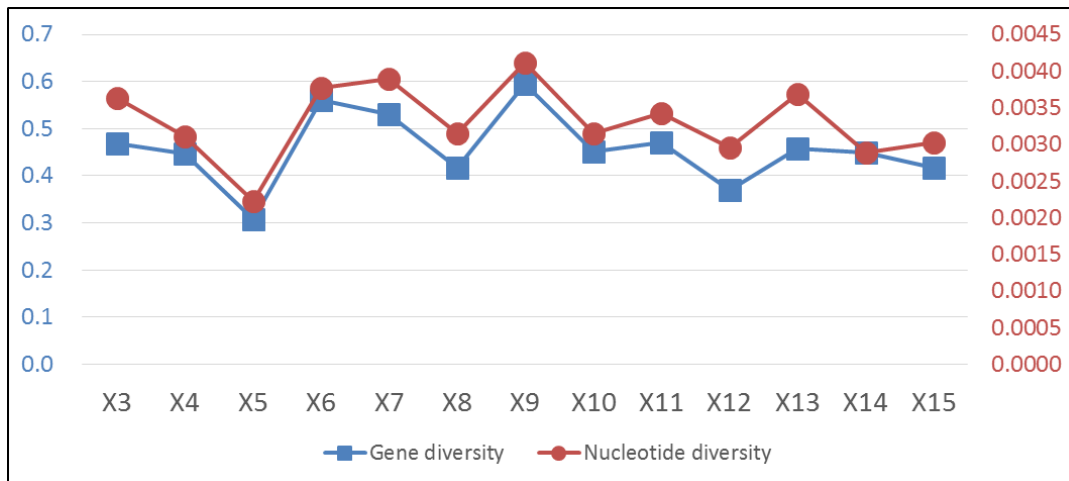


図 25 *MC1R* 遺伝子を用いたハプロタイプ多様度および塩基多様度の年次推移

トウキョウ X の生年別のコホートの分類は、次の通りである: X3 (2001 + 2002 + 2003), X4 (2004), X5 (2005), X6 (2006), X7 (2007), X8 (2008), X9 (2009), X10 (2010), X11 (2011), X12 (2012), X13 (2013), X14 (2014), X15 (2015 + 2016).

また、左縦軸はハプロタイプ多様度を示し、右縦軸は塩基多様度を示し、横軸は生年別のコホートを示している。

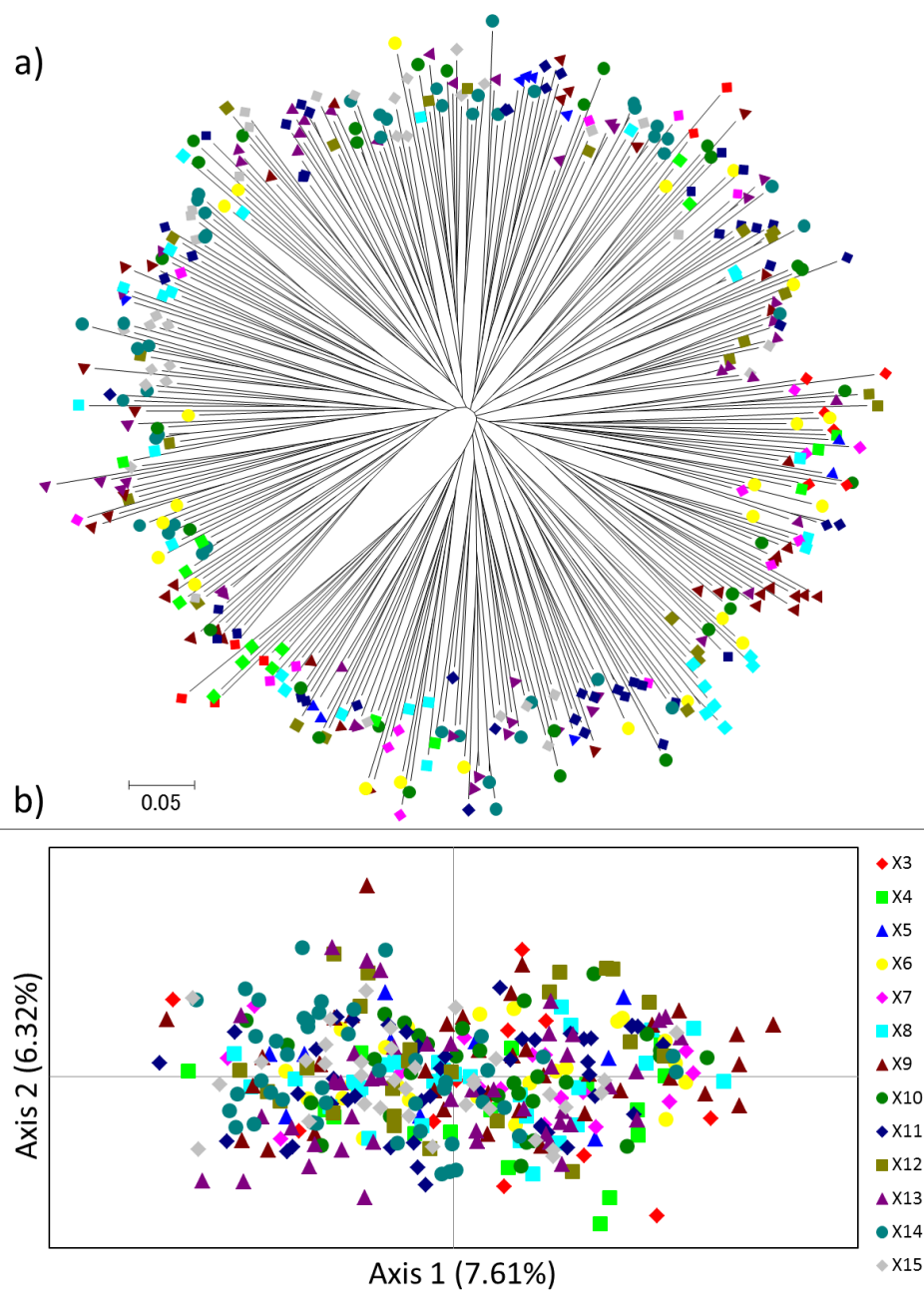


図 26 マイクロサテライトマーカー30 座位における個体間の系統関係

(a) 近隣結合 (NJ) 法によって推定した個体間の D_{AS} 遺伝距離に基づく系統樹

(b) 個体間の主座標分析

トウキョウ X の生年別のコホートの分類は、次の通りである: X3 (2001 + 2002 + 2003), X4 (2004), X5 (2005), X6 (2006), X7 (2007), X8 (2008), X9 (2009), X10 (2010), X11 (2011), X12 (2012), X13 (2013), X14 (2014), X15 (2015 + 2016). また、主座標分析で示した色に NJ 系統樹も対応している。主座標分析では横軸は第 1 主座標を示し、縦軸は第 2 主座標を示している。

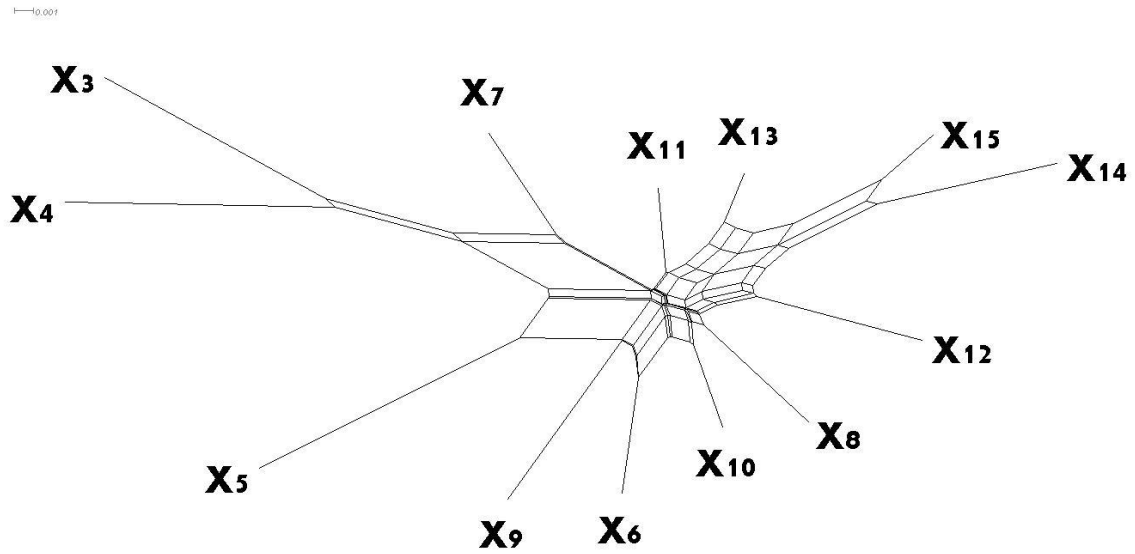


図 27 median joining (MJ) 法によって推定した D_A 遺伝距離に基づくコホート間のネットワーク図

トウキョウ X の生年別のコホートの分類は、次の通りである: X3 (2001 + 2002 + 2003), X4 (2004), X5 (2005), X6 (2006), X7 (2007), X8 (2008), X9 (2009), X10 (2010), X11 (2011), X12 (2012), X13 (2013), X14 (2014), X15 (2015 + 2016).

枝の長さは遺伝距離に比例しており、図中のスケールバーは遺伝距離を示している。

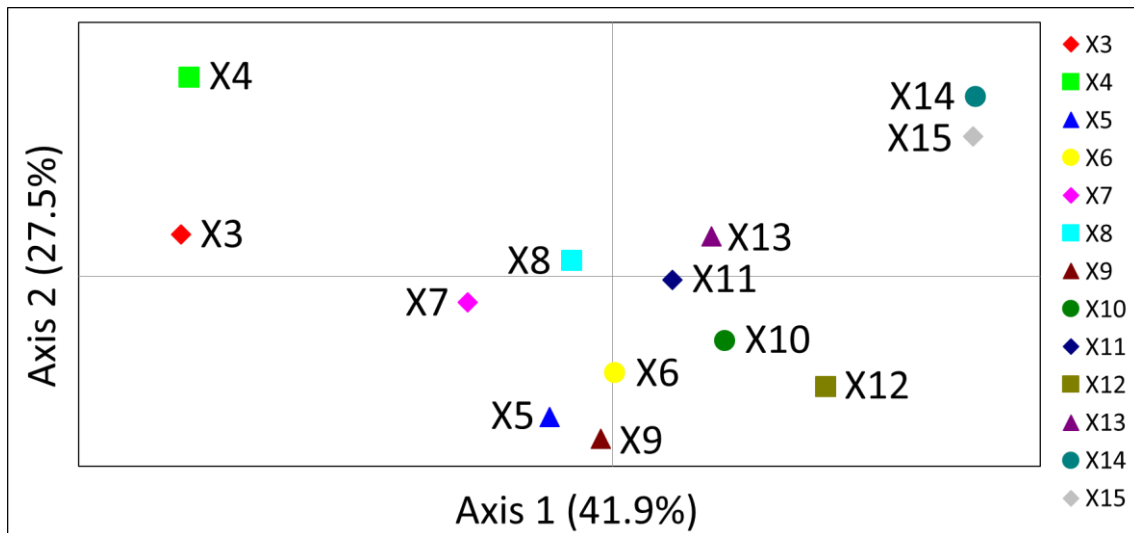


図 28 コホート間の主座標分析

トウキョウ X の生年別のコホートの分類は、次の通りである: X3 (2001 + 2002 + 2003), X4 (2004), X5 (2005), X6 (2006), X7 (2007), X8 (2008), X9 (2009), X10 (2010), X11 (2011), X12 (2012), X13 (2013), X14 (2014), X15 (2015 + 2016).

また、横軸は第 1 主座標を示し、縦軸は第 2 主座標を示している。

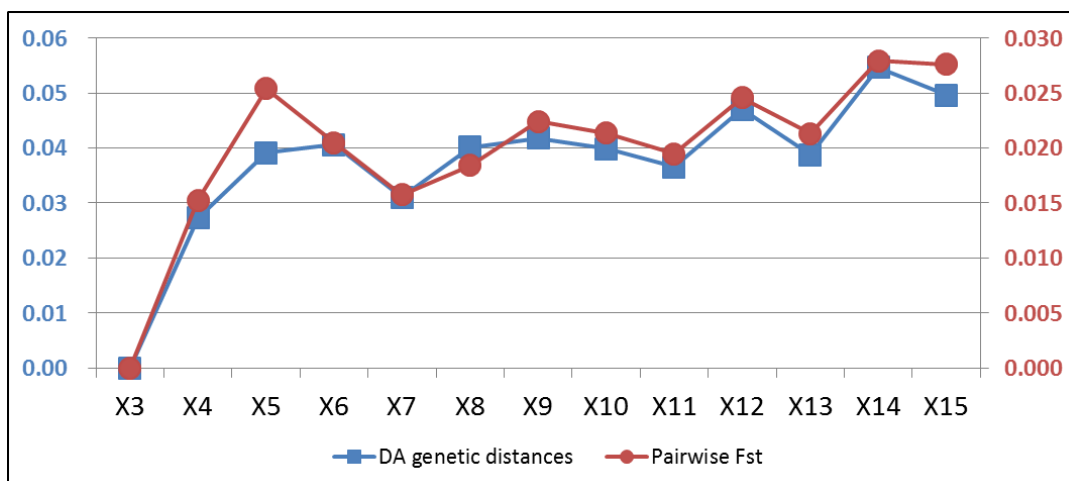


図 29 マイクロサテライトマーカー30 座位を用いた D_A 遺伝距離および F_{ST} 値における認定集団からの年次推移

トウキョウ X の生年別のコホートの分類は、次の通りである: X3 (2001 + 2002 + 2003), X4 (2004), X5 (2005), X6 (2006), X7 (2007), X8 (2008), X9 (2009), X10 (2010), X11 (2011), X12 (2012), X13 (2013), X14 (2014), X15 (2015 + 2016).

また、左縦軸は D_A 遺伝距離を示し、右縦軸は F_{ST} 値を示し、横軸は生年別のコホートを示している。

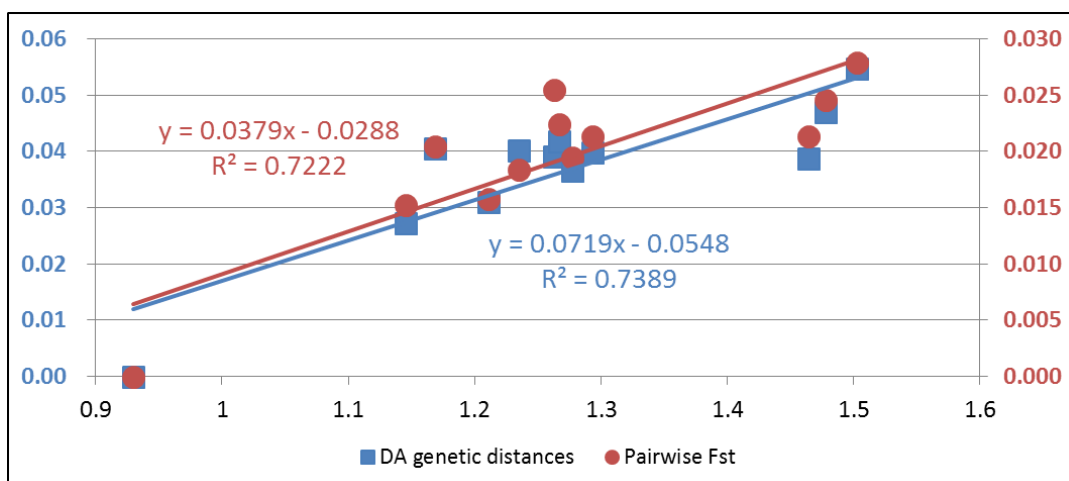


図 30 マイクロサテライトマーカー30 座位を用いた D_A 遺伝距離および F_{ST} 値における年次推移と血統情報に基づく遺伝的寄与率変動係数の年次推移との関係

左縦軸は D_A 遺伝距離を示し、右縦軸は F_{ST} 値を示し、横軸は遺伝的寄与率変動係数を示している。青色の直線と式が D_A 遺伝距離と遺伝的寄与率変動係数との回帰直線と決定係数を示しており、赤色の直線と式が F_{ST} 値と遺伝的寄与率変動係数との回帰直線と決定係数を示している。

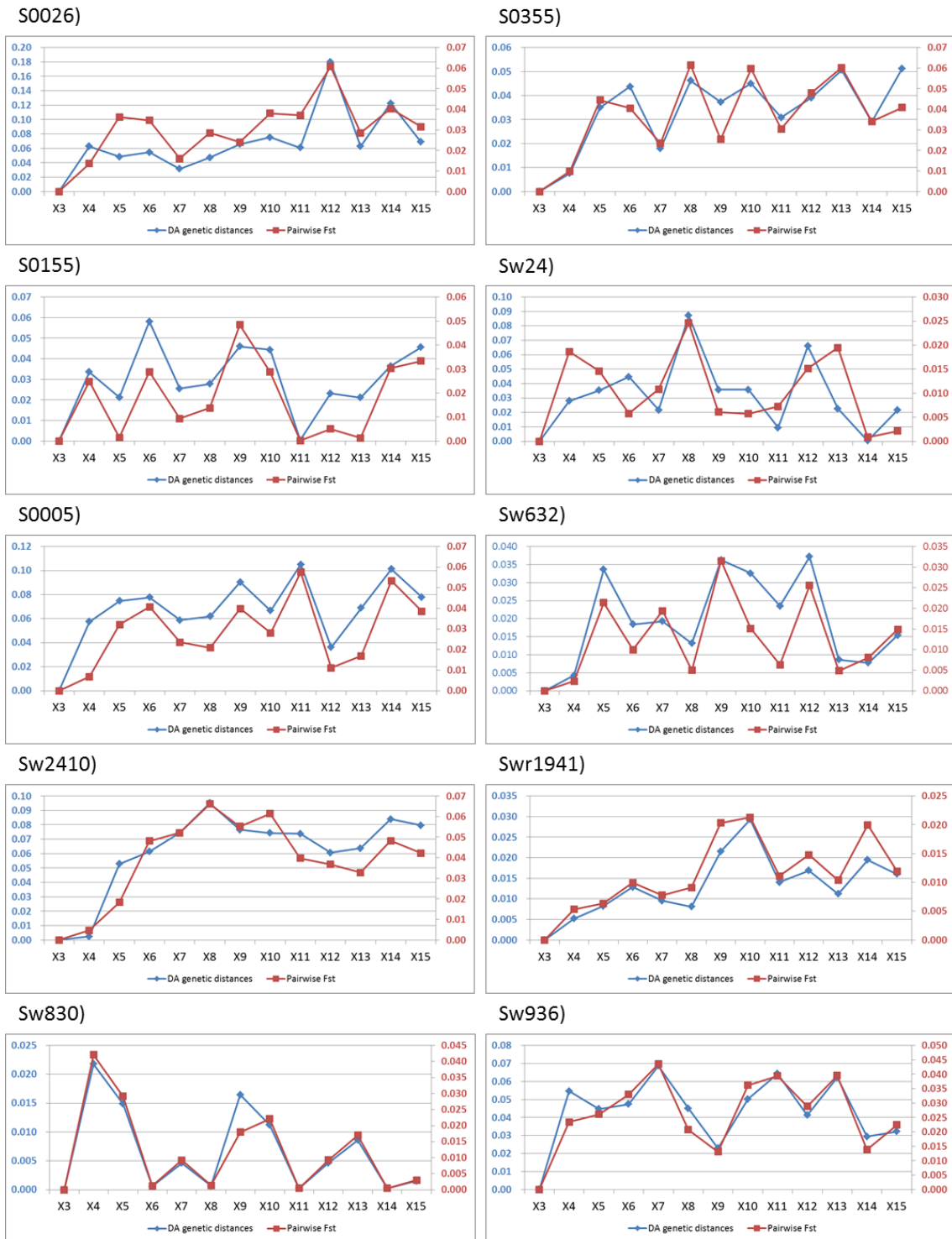
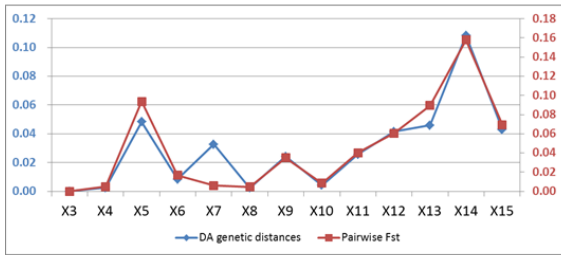


図 31-1 マイクロサテライトマーカー30 座位における座位ごとの D_A 遺伝距離および F_{ST} 値における認定集団からの年次推移

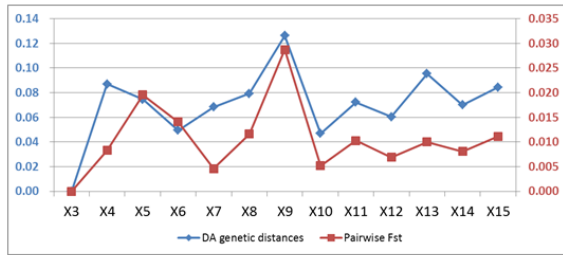
トウキョウ X の生年別のコホートの分類は、次の通りである: X3 (2001 + 2002 + 2003), X4 (2004), X5 (2005), X6 (2006), X7 (2007), X8 (2008), X9 (2009), X10 (2010), X11 (2011), X12 (2012), X13 (2013), X14 (2014), X15 (2015 + 2016).

また、左縦軸は D_A 遺伝距離を示し、右縦軸は F_{ST} 値を示し、横軸は生年別のコホートを示している。

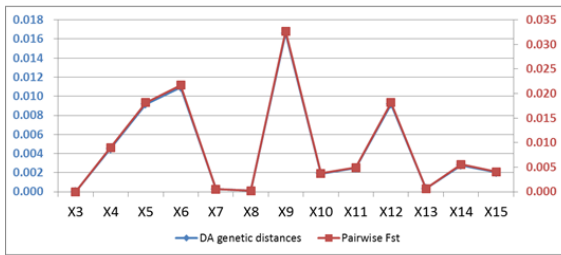
S0218)



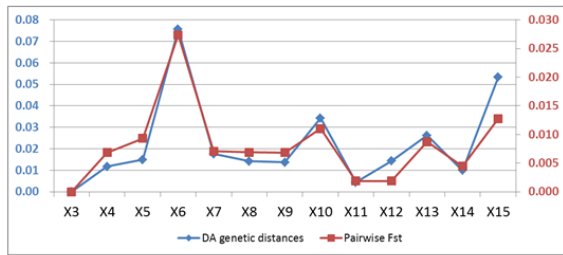
Sw240)



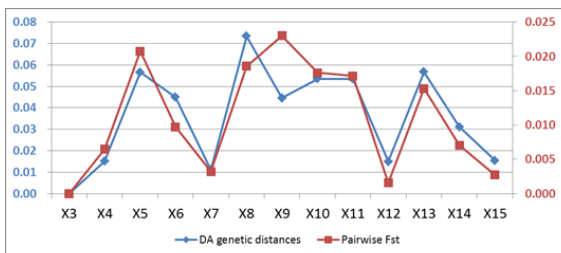
S0228)



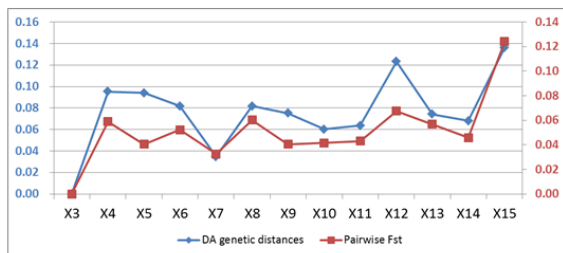
IGF1)



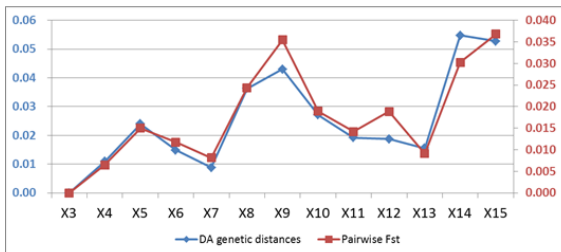
Sw122)



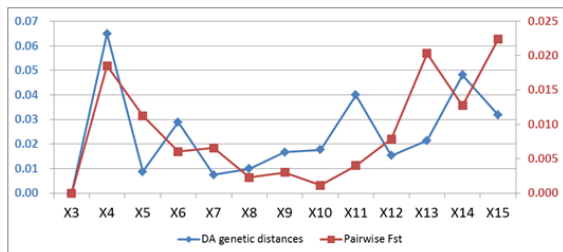
Sw2406)



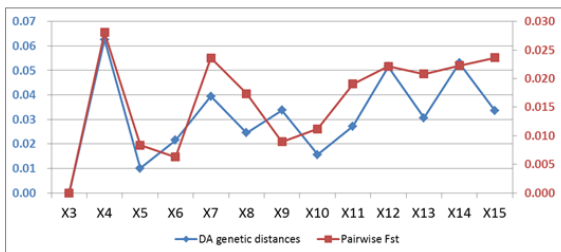
Sw857)



Sw72)



S0097)



S0226)

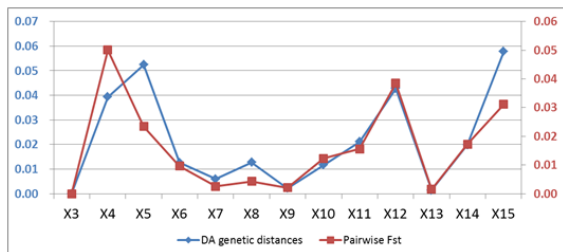
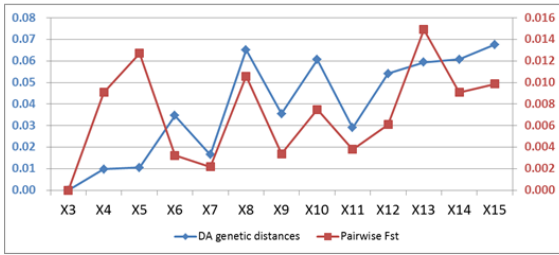
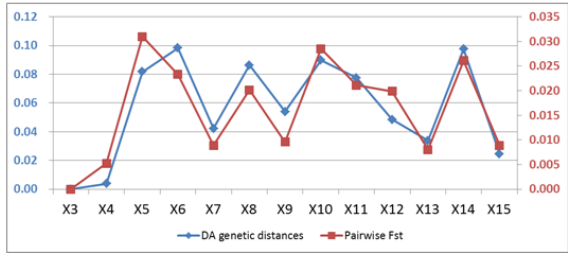


図 31-2 マイクロサテライトマーカー30 座位における座位ごとの D_A 遺伝距離および F_{ST} 値における認定集団からの年次推移
 左縦軸は D_A 遺伝距離を示し、右縦軸は F_{ST} 値を示し、横軸は生年別のコホートを示している。

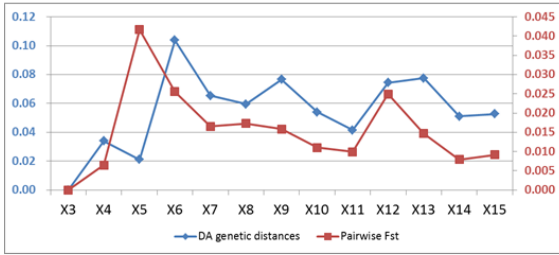
S0090)



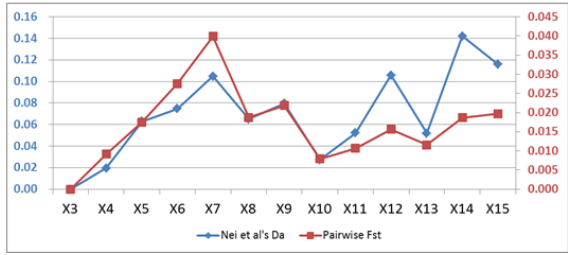
S0143)



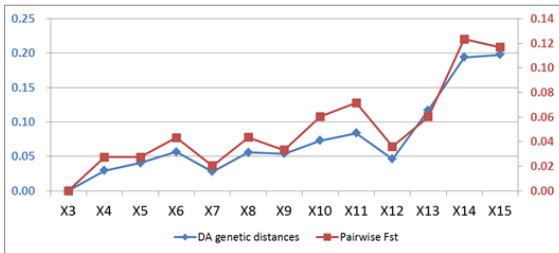
Sw2008)



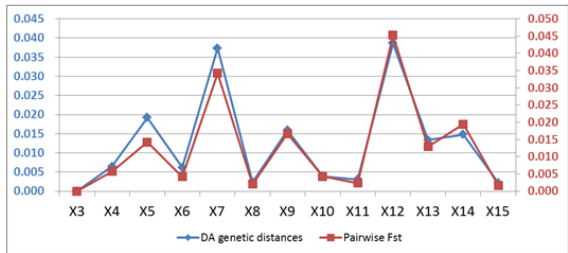
S0068)



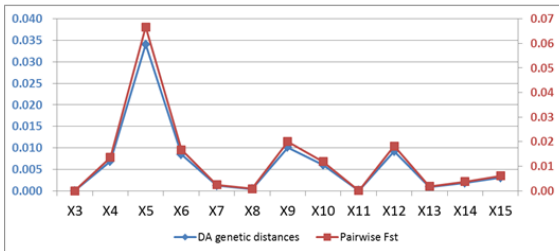
Sw1067)



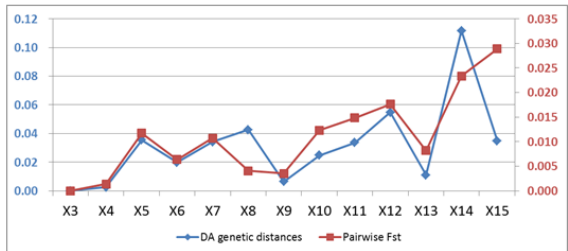
S0178)



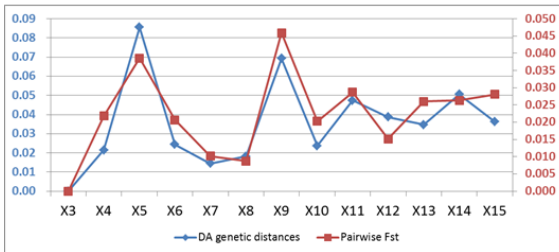
S0101)



Sw911)



Sw1828)



S0002)

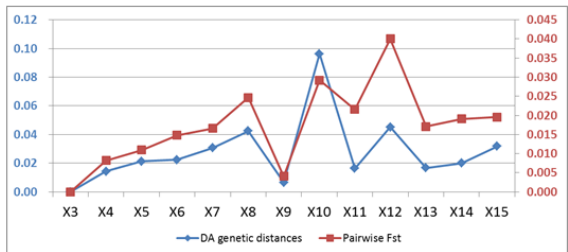


図 31-3 マイクロサテライトマーカー30 座位における座位ごとの D_A 遺伝距離および F_{ST} 値における認定集団からの年次推移

左縦軸は D_A 遺伝距離を示し、右縦軸は F_{ST} 値を示し、横軸は生年別のコホートを示している。

表 14 各遺伝子座における X3 と X15 間の Φ_{st} 値

X3vsX15	Φ_{st}
MS_All	0.027507
S0026	0.038724
S0155	0.038408
S0005	0.048802
Sw2410	0.045830
Sw830	-0.022675
S0355	0.048748
Sw2410	-0.025840
Sw632	-0.001341
Swr1941	-0.007600
Sw936	0.014042
S0218	0.079157
S0228	-0.023249
Sw122	-0.022659
Sw857	0.041054
S0097	0.027676
Sw240	-0.003399
IGF1	0.001236
Sw2406	0.231672
Sw72	0.014838
S0226	0.032968
S0090	-0.007989
Sw2008	-0.008253
Sw1067	0.181615
S0101	-0.016414
Sw1828	0.026258
S0143	-0.010634
S0068	0.011825
S0178	-0.021706
Sw911	0.032044
S0002	0.014114
MC1R	-0.019750
mtDNA	-0.033930

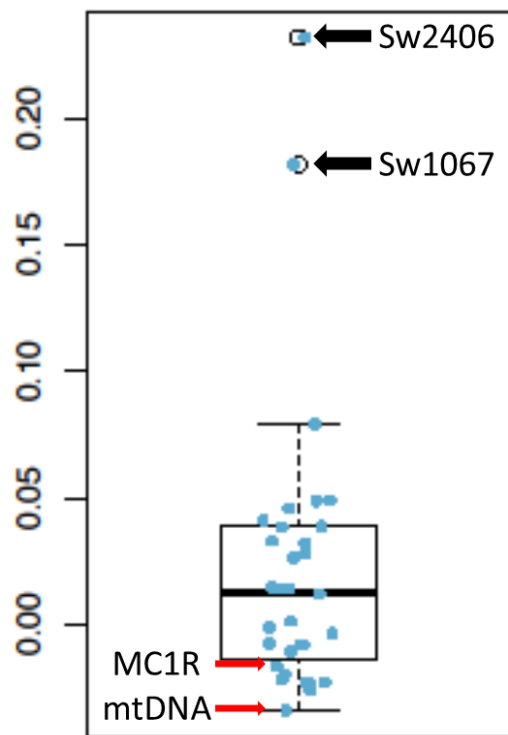


図 32 マイクロサテライトマーカー30 座位, mtDNA および *MC1R* 遺伝子から算出した X3 と X15 間の Φ_{st} 値から作成したボックスプロット
 縦軸はそれぞれの遺伝子座の Φ_{st} 値を, グラフ内の矢印は mtDNA, *MC1R* 遺伝子および有意に大きな遺伝的差異がある遺伝子座を示している。

第4節 考察

トウキョウ X は、基礎豚として雄 10 頭と雌 32 頭から造成が開始された。その後、繁殖豚の数は約 100 頭に増加したが、それらがまだ小規模の集団であることは明らかである。遺伝的多様性は、小規模集団において遺伝的浮動の影響によって急速に減少する。集団が小規模の創始者から始まる場合、遺伝的多様性の消失はより顕著であり、それこそが創始者効果である。それにも関わらず、ヘテロ接合度の期待値および観測値は、トウキョウ X においてこれら維持に移行してから 20 年の間に減少する傾向なしに遺伝的多様性が維持されていることが示された (図 20)。しかしながら、有効アレル数およびアレリックリッチネスにおいては、異なる傾向が見られ、年々徐々にではあるが減少する傾向が示された (図 21)。これら 2 つの結果は矛盾しているようにも見えるが、これはヘテロ接合度に影響を与えないマイナーなアレルの遺伝子頻度の減少によるものだと考えられる。従って、トウキョウ X の遺伝的多様性は、対立遺伝子数の観点からは年々減少している傾向にあるが、それは主要な頻度の対立遺伝子を維持することによって最小限に保たれていると言える。これらのことから、血統情報に基づく繁殖計画が近親交配を避けるように適切に行われていることが示された。

続いて、遺伝的構成の推移の程度を評価するために、PCoA および系統遺伝学的解析を行った。 D_{AS} 遺伝距離に基づく系統樹および PCoA は図 26 に示している。PCoA、系統樹において異なるコホートの個体がそれぞれ混在することでまとまりは形成されず、明確な年次別に遺伝的分化は確認することは出来なかった。恐らく、年次別のコホートの遺伝的多様性が、それぞれのコホート間で見られる遺伝距離より大きいため、コホート間の遺伝的差異は各コホートの遺伝的多様性の誤差によって隠れている可能性が考えられる。従って、年次別のコホートの遺伝的分化をより詳細に、明確な傾向を評価するために、年次別のコホート集団に分類して PCoA および系統遺伝学的解析を行った。PCoA においてコホートの位置関係を確認すると、年次順におおよそ第 1 座標に沿う形を示した (図 28)。また、系統遺伝学的解析であるネットワーク図においても (図 27)、年次順にコホートが一方方向に推移していることが確認された。これらのことから、トウキョウ X の遺伝的多様性は、この 20 年間維持されてきているが、遺伝的構成は徐々にではあるが変化してきていることが示された。

そのため、トウキョウ X の遺伝的分化はどの程度、そして、どのように進行してきているのか、という疑問が生じる。そこで、トウキョウ X における進化の速度と程度を、年次別のコホートの D_A 遺伝距離および F_{ST} 値をグラフ化することによって評価した (図 29)。これらの解析によって、遺伝的分化は 2003 年から 2005 年にかけて大きく進行し、その後緩やかではあるが、確実に分化していく傾向に進行していることが示された。

永井ら (2016) は、西田ら (2005) による下記の式を用いてトウキョウ X の血統情報に基づき基礎豚の遺伝的寄与率変動係数を推定した。

$$k = \sum_{i=1}^N [(f_i - \varphi_i)^2 / \varphi_i]$$

ここでは、N が認定集団における雌雄合わせた繁殖豚の頭数、 f_i が第*i*番目の認定豚の認定集団における遺伝的寄与率、そして、 φ_i が第*i*番目の認定豚の認定集団における遺伝的寄与率を示している。

これは減数分裂の間の配偶子の染色体分離の確率を考慮に入れていないため、この推定は、単純に生き残っている系統の傾向によって引き起こされる理論的な遺伝的分化の指標と解釈することが出来る。この式によって示されたトウキョウ X の遺伝的寄与率変動係数の推移は、血統情報を用いた系統造成された後の認定集団からの変化の程度が、 D_A 遺伝距離および F_{ST} 値に基づく遺伝的分化の傾向と一致することが示された。また、遺伝的寄与率変動係数とこれら遺伝的解析からの推定値は有意に相関することも示された (図 30)。このことから、血統情報が利用可能である場合には、小規模の閉鎖群集団の遺伝的分化を評価する際には、遺伝的寄与率変動係数が有効な手段になり得ることが示された。これにより、絶滅の危機に瀕している集団であっても血統管理が行われている場合、遺伝的寄与率変動係数が利用可能であり、血統管理が行われていない野生種の場合は、DNA レベルでの分析を行うことで血統情報と同等の情報が得ることが可能であることが示された。

今回、遺伝的分化の指標を使用することによって特定の遺伝子座で機能する選抜の証拠を検出することが出来た。Biswas and Akey (2006) によれば、“中立下では、 F_{ST} 値の大きさは主に遺伝的浮動や流動によって決定されるが、局所的なものであるなら、特定の遺伝子座における集団分化に左右される”と報告している。このように、特定の遺伝子座における遺伝的分化が他のゲノム中の遺伝子座の平均的な遺伝的分化と有意に異なる場合、それは選択圧の証拠となり得る。一方、平均的な遺伝的分化と比較して有意に小さな場合、対立遺伝子頻度を維持するための選抜があったと解釈することも出来る。今回、トウキョウ X の維持において起こったであろう選抜を検出するために世代を通した遺伝的分化を推定した。 F_{ST} 値は突然変異率に依存するため、突然変異率の影響を受けにくい Φ_{st} 値を用いてマイクロサテライト 30 座位、mtDNA、*MC1R* における遺伝的差異を比較した (表 13, 図 32)。マイクロサテライト 30 座位の内、2 つの遺伝子座において他の遺伝子座より有意に大きく、これら 2 つは共に 6 番染色体上に位置することが確認された。これは、これら 2 つのある 6 番染色体の何らかの遺伝子が、20 年もの間、選抜下にあったこと示している。ここで、造成に関与した兵頭博士によると、トウキョウ X では“2014 年から 6 番染色体上にある *RYR1* 遺伝子による淘汰を行った”とされている。リアノジン受容体 1 (Ryanodine receptor 1; *RYR1*) 遺伝子は正常型ではシトシン (C) を有するのに対して、点突然変異を起こした場合にはチミン (T) を有し、点突然変異である T をホモ接合で持つ場合、豚ストレス症候群 (PSS) を呈し、むれ肉が発生しやすくなるとされている。PSS 遺伝子は、*RYR1* によって遺伝子診断が可能になるまでは、ハロセン麻酔に対する反応によって診断され、陽性を示す個体は PSS 遺伝がホモ型と判定されていた。そのためハロセン陰性豚には *RYR1* がヘテ

ロ接合の個体も含まれていた。トウキョウ X においては造成中にはハロセン陽性個体は 1 頭も発生しなかったのにも関わらず、維持から 10 年以上経過した後、PSE (Pale Soft Exudative) 肉と思われる肉が発生したことから、維持群の *RYR1* 遺伝子を調査したところ、雄 4 頭、雌 1 頭から C/T 型のヘテロ接合が検出され、2014 年以降に淘汰を行った。このことから 6 番染色体において近年、淘汰が行われ、このことが今回の結果にも表れた可能性が考えられる。しかしながら、遺伝距離は *RYR1* 遺伝子と 2 つの遺伝子座でそれぞれ約 7.3Mbp, 39.1Mbp とかなり距離が離れて位置していることが確認された。ここで、*RYR1* 遺伝子と 2 つの遺伝子座間の組換え価は、1cM 離れるごとに 1% で分離するとされており、1cM は 1,000,000 塩基対に相当するため、*RYR1* 遺伝子と Sw2406, Sw1067 間の組換え価はそれぞれ約 7% と約 39% である。そのため、この 2 つの遺伝子座が *RYR1* 遺伝子と直接的に連鎖しているとは言えないが、*RYR1* 遺伝子の淘汰による影響の可能性は十分に考えられる。また、*MC1R* 遺伝子もまた 6 番染色体上に位置し、Sw2406 と組換え価が約 8% である。しかしながら、トウキョウ X において *MC1R* 遺伝子では淘汰・選抜は行っておらず、距離的にも直接的に連鎖しているとは考えにくいが何らかの影響があった可能性も考えられる。確かに、6 番染色体上の *RYR1* 遺伝子が選抜下にあり、*RYR1* 遺伝子の淘汰の影響により 2 つの遺伝子座が他の遺伝子座より有意に大きい Φ_{st} 値を示したと考えられるが、*RYR1* 遺伝子のみによる影響によるものなのかを知ることは不可能である。その理由として、今回扱ったマイクロサテライトデータでは正確な遺伝子座を特定するには、疎ら過ぎるためである。これ以上、詳細に選抜下にあった遺伝子座の位置および機能をより正確に特定するためにはゲノムワイド関連解析 (GWAS) が必要になると考えられる。

マイクロサテライト 30 座位における遺伝子座において特定の遺伝子座で大きな差異が確認されたのに対して、mtDNA および *MC1R* 遺伝子において平均的な遺伝的分化よりも小さな値を示した (表 13)。毛色に関しては、トウキョウ X を系統造成するために 10 世代にも渡る繁殖計画は主に肉質に焦点を当てて行われていたため、この系統では毛色は固定されていない。毛色は豚の繁殖能力や肉質とは関係がないため、トウキョウ X は時間とコストの観点から毛色を選抜して固定することなく、東京都の方針のもと維持されている。しかしながら、毛色は通常家畜においては非常に強い人為的な選抜の下にあるため (Ludwig *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2009) , トウキョウ X の毛色においても無意識での人為的な選抜が行われた可能性がある。そのため、毛色に関連する *MC1R* 遺伝子について詳細な検討を行った。

MC1R 遺伝子における遺伝的多様性は年々変動しているが、遺伝的多様性は世代を通して系統内で維持されていることが示された (図 25)。一方で、選抜や固定を行っていないければ Φ_{st} においてバラツキが生じ、 Φ_{st} は高い値を示すと考えられるが、*MC1R* において Φ_{st} が小さいことにより、毛色の多型を維持するように意図せずに人為的な選抜が起こっていた可能性が考えられる。また、有意ではないものの、mtDNA の Φ_{st} は全ての遺伝子座の中で最も小さい値を示しました。このことは、トウキョウ X は遺伝的多様性の維持と近交係数の抑制という方針のもとで交配が行われてきた努力によって、世代を通して mtDNA の遺

伝的分化は小さくなっている可能性が考えられる。

これらのことにより、合成系統豚トウキョウ X におけるこれまでの交配方法は、適切に行われてきたと言える。そのため、維持されてきた遺伝的多様性も存在しているが、失われてきた対立遺伝子も数多くあることが確認された。更には、遺伝的解析および血統情報を基づく統計解析の比較により、閉鎖群集団における遺伝的浮動の顕著な実証がもたらされた。この問題は、将来の系統造成および系統維持において重要な知見になり得る。また、系統造成や系統維持のために年々遺伝的多様性が減少し、集団内の構成の変化は避けられないと考えられる。従って、将来的には維持集団の遺伝的多様性の変化や認定集団からの構成の逸脱を抑制するために、現在行われている血統情報だけでなく DNA マーカーの情報も考慮して交配計画を立てていく必要があると提言する。

第5節 小括

遺伝的多様性および遺伝的構成を維持することは重要な目標であるが、血統情報に基づく統計遺伝学的解析だけでは、遺伝的浮動の影響を考慮していないために遺伝的多様性および遺伝的構成が世代を通して閉鎖群小集団においてどのように変化するかを正確に評価することは困難である。

そこで、DNA マーカーを用いて閉鎖群により維持・管理されてきた合成系統豚トウキョウ X の遺伝的多様性および遺伝的構成の年次推移をゲノムから推定し、血統情報に基づく統計遺伝学的解析の効率性を評価することを目的とした。

遺伝的多様性指標を算出したところ、維持に移行してからも遺伝的多様性を維持していることが確認された。このことから、血統情報に基づく繁殖計画が近親交配を避けるように適切に行われていることが示された。次に、遺伝的構成の推移を評価するために系統遺伝学的解析を行ったところ、年次順にコホートが一方向に推移していることが確認され、遺伝的構成が年々、徐々にではあるが変化してきていることが示された。また、このような遺伝的分化がどの程度、どのように推移しているのかを年次別のコホートの D_A 遺伝距離および F_{ST} 値によって評価したところ、遺伝的分化は初期段階で大きく進行し、その後緩やかではあるが、確実に認定集団から分化していることが示された。また、これらの結果と永井らが算出したトウキョウ X の血統情報に基づく基礎豚の遺伝的寄与率変動係数を比較したところ、有意に相関があることが示された。このことから、血統情報が利用可能である場合には、小規模の閉鎖群集団の遺伝的分化を評価する際には、遺伝的寄与率変動係数が有効な手段であることが示された。また、トウキョウ X の維持において起こったであろう選抜を遺伝子座ごとに検出するために遺伝的分化の指標である Φ_{st} 値を算出した。その結果、マイクロサテライト 30 座位の内、2 つの遺伝子座において他の遺伝子座より有意に大きい Φ_{st} 値が算出され、これら 2 つは共に 6 番染色体上に位置することが確認された。トウキョウ X では、6 番染色体上に存在する *RYRI* 遺伝子において過去に淘汰・選抜を行っており、そのことによる影響の可能性は十分に考えられる。また、今回マイクロサテライトにおいて特定の遺伝子座で大きな差異が確認されたのに対して、mtDNA および *MC1R* 遺伝子において遺伝的分化は小さい値を示した。毛色において、トウキョウ X は選抜や固定をしていないとされているが、今回検出された小さな遺伝的分化から無意識での人為的な選抜が行われていた可能性が示された。また、mtDNA においては全ての遺伝子座の中で最も小さな値を示したことから、トウキョウ X は遺伝的多様性の維持と近交係数の抑制という方針のもとで交配が行われてきた努力によって、世代を通して mtDNA の遺伝的分化は小さくなっている可能性が考えられる。

これらのことにより、合成系統豚トウキョウ X におけるこれまでの交配方法は、適切に行われてきたと言えるが、系統造成や系統維持のために年々遺伝的多様性が減少し、集団内の構成の変化は避けられないと考えられる。従って、将来的には維持集団の遺伝的多様性

の変化や認定集団からの構成の逸脱を抑制するために、現在行われている血統情報だけでなく DNA マーカーの情報も考慮して交配計画を立てていく必要があると提言する。

第5章 総括

トウキョウ X はデュロック種, 鹿児島バークシャー種, 英国バークシャー種, 北京黒豚の4品種・系統を基礎豚として系統造成された日本初の合成系統豚である。系統造成された集団において, 血統管理による遺伝的斉一性を高めていっている反面, 小規模集団による閉鎖群育種を行っているために, 遺伝的多様性の低下による近交退化が必然のように付きまとう。そのため, 遺伝的斉一性を高めながらも遺伝的多様性を維持していかなくてはならないという矛盾を抱えながらも, 血統管理による系統の維持が行われている。しかし, 血統情報からは遺伝的浮動を評価することができないことから, DNA レベルでの調査が必要である。

そこで, 本研究ではまずトウキョウ X の遺伝的多様性および集団構造を評価した。次に, トウキョウ X において基礎豚として北京黒豚が用いられているが, 中国豚がトウキョウ X のゲノムにどの程度寄与したのかを明らかにした。さらに, トウキョウ X の遺伝的多様性および遺伝的構成の年次推移を DNA レベルで推定することで, 血統情報に基づく統計遺伝学的解析の効率性を評価した。これらの調査により, トウキョウ X の遺伝学的な基礎情報を解明することで, 他品種・系統との遺伝的類縁関係や遺伝学的構成を明らかにした。

まず, トウキョウ X の系統的な位置づけと遺伝的多様性, 集団構造を明らかにすることを目的として, マイクロサテライト DNA に基づく解析を行った。品種・系統間の遺伝的関係および遺伝的集団構造の解析のいずれにおいても, トウキョウ X はヨーロッパ系群の一つの集団を構成し, 中国系群とは遺伝的に離れていること, ヨーロッパ系群のなかではデュロック種およびバークシャー種の影響を強く受けていることが示された。トウキョウ X における遺伝的多様性指標は, ヨーロッパ系豚と同程度の値を示し, 中国系豚よりも高い水準であった。また, トウキョウ X 集団内における F_{IS} 値はほぼ 0 であり, トウキョウ X は分集団化が回避されていることが示唆された。更に, 血統情報をもとに推定した基礎豚の遺伝的寄与率でも遺伝的斉一性が向上していることが示唆されている。

前述したように, トウキョウ X は系統遺伝学的解析からヨーロッパ系群に含まれており, ヨーロッパ系群のなかでもデュロック種およびバークシャー種の影響を強く受けていることが示された。系統遺伝学的解析では, 中国豚からの痕跡を発見することが出来なかったが, トウキョウ X の基礎集団には北京黒豚が使用されており, 中国在来豚のゲノムが寄与していると考えられた。そこで, トウキョウ X に寄与した中国在来豚のゲノムを探索すべく, 常染色体, Y 染色体およびミトコンドリアの DNA マーカーを用いて DIYABC による集団遺伝学的解析を行った。その結果, トウキョウ X はヨーロッパ系豚, 特にデュロック種およびバークシャー種に由来することが明らかになった。また, トウキョウ X において中国在来豚からの遺伝的貢献を示した証拠は検出されなかった。このことは, トウキョウ X が造成された繁殖歴と矛盾するよう見えるが, 北京黒豚の造成にバークシャー種が深く関わっており, 北京黒豚が何世代にも渡って改良されることにより, 北京黒豚のゲノムがヨーロッパ系豚の

ゲノム、特にパークシャー種によってほぼ完全に置き換えられていた可能性が考えられる。一方では、毛色の多様性を制御している *MC1R* 遺伝子において中国在来豚からトウキョウ X への直接的な遺伝的寄与を示唆する進化シナリオを支持する結果となった。これは、北京黒豚の改良過程でアジアのハプロタイプである黒の毛色を固定するために積極的に選抜された可能性が考えられる。

トウキョウ X は 22 年間維持されており、認定集団から遺伝的多様性および遺伝的構成が変化している可能性が考えられる。これまで、血統情報に基づく統計遺伝学的解析が行われてきたが、遺伝的浮動の影響を考慮していないために正確な遺伝的多様性および遺伝的構成が世代を通して閉鎖群小集団においてどのように変化するかを評価することは困難である。そこで、トウキョウ X の遺伝的多様性および遺伝的構成の年次推移をゲノムから推定し、血統情報に基づく統計遺伝学的解析の効率性を評価した。マイクロサテライト DNA を用いて年次ごとに遺伝的多様性指標を算出したところ、維持に移行してからも遺伝的多様性を維持していることが確認された。次に、遺伝的構成の推移を評価するために系統遺伝学的解析を行ったところ、年次順にコホートが一方向に推移していることが確認され、遺伝的構成が年々、徐々にではあるが変化してきていることが示された。また、このような遺伝的分化がどの程度、どのように推移しているのかを年次別のコホートによって評価したところ、遺伝的分化は初期段階で大きく進行し、その後緩やかではあるが、確実に認定集団から分化していることが示された。また、これらの結果と血統情報に基づく基礎豚の遺伝的寄与率変動係数を比較したところ、有意に相関があることが示された。このことから、血統情報が利用可能である場合には、小規模の閉鎖群集団の遺伝的分化を評価する際には、遺伝的寄与率変動係数が有効な手段であることが示された。また、トウキョウ X の維持において起こった淘汰・選抜を検出するために遺伝的分化を算出した。その結果、マイクロサテライト 30 座位の内、2 つの遺伝子座において他の遺伝子座より有意に大きい値が算出され、これら 2 つは共に 6 番染色体上に位置することが確認された。トウキョウ X では、6 番染色体上に存在する *RYR1* 遺伝子において過去に淘汰を行っており、そのことによる影響の可能性は十分に考えられる。また、今回マイクロサテライトにおいて特定の遺伝子座で大きな差異が確認されたのに対して、ミトコンドリア DNA および *MC1R* 遺伝子において遺伝的分化は小さい値を示した。毛色において、トウキョウ X は選抜や固定を行っていないとされている。仮に、選抜や固定を行っていなければ遺伝的分化においてバラツキが生じ、遺伝的分化は高い値を示すと考えられるが、今回検出された遺伝的分化は小さな値で維持されていることから無意識での人為的な選抜が行われていた可能性が示された。また、ミトコンドリア DNA においては全ての遺伝子座の中で最も小さな値を示したことから、トウキョウ X は遺伝的多様性の維持と近交係数の抑制という方針のもとで交配が行われてきた努力によって、世代を通してミトコンドリア DNA の遺伝的分化は小さくなっている可能性が考えられる。

これらのことにより、合成系統豚トウキョウ X において行われている近交係数の上昇を抑制する組み合わせで実施している交配様式が有効に機能していると言えるが、系統造成

や系統維持のために年々遺伝的多様性が減少し、集団内の構成の変化は避けられないと考えられる。従って、将来的には維持集団の遺伝的多様性の変化や認定集団からの構成の逸脱を抑制するために、現在行われている血統情報だけでなく DNA マーカーの情報も考慮して交配計画を立てていく必要があると提言する。

Summary

Studies on genetics of the synthetic pig strain Tokyo X

Gaku Tahara

Laboratory of Animal Genetics and Breeding,
Division of Animal Science, Graduate School of Agriculture,
Tokyo University of Agriculture.

Tokyo X is the first Japanese synthetic pig strain that was developed in Tokyo using Duroc, Berkshire (Kagoshima strain and UK strain), and Beijing Black breeds as the foundation for this synthetic strain. Because this is a relatively small artificially-bred group, inbreeding and its resulting decline of genetic diversity is a major concern. One of the solutions to this problem is to use pedigree management to maintain the strains, which increases genetic homogeneity. This management strategy appears to be contradictory because increased homogeneity is the definition of low genetic diversity. However, as genetic drift cannot be evaluated from pedigree information, research at the DNA level is necessary. In this study, we first evaluated the genetic diversity and population structure of the Tokyo X pig strain. Although the Beijing Black breed is used as a foundation strain in Tokyo X, we also clarified how much Chinese pigs contributed to the Tokyo X genome. Furthermore, we estimated the genetic diversity and genetic composition of Tokyo X at the DNA level and evaluated the efficiency of statistical genetic analysis based on pedigree information. Through these surveys, we elucidated the basic genetic information of Tokyo X and clarified the genetic relationships and genetic composition with other varieties and strains.

To clarify the systematic positioning, genetic diversity, and population structure of the Tokyo X strain, we first conducted an analysis based on microsatellite DNA. Tokyo X is composed of one European group and is genetically separate from the Chinese group, both in the genetic relationship between the breeds and strains and in the analysis of the genetic population structure. Among European group, we observed that strains were strongly influenced by the Duroc and Berkshire breeds. The genetic diversity index in Tokyo X was similar to that of European pigs but was higher than that of Chinese pigs. Additionally, the FIS value in the Tokyo X population was almost 0, suggesting that this strain avoids subpopulation. It was also suggested that genetic homogeneity increased in the genetic contribution rate of foundation pigs estimated

based on pedigree information.

A phylogenetic analysis revealed that Tokyo X was closely associated with the European group, with a particularly strong influence by the Duroc and Berkshire breeds. The analysis did not find any genetic footprint from Chinese pigs; however, the Beijing Black breed is also used as the foundation pig for Tokyo X, and it is believed that the genomes of Chinese native pigs contribute to that of the synthetic strain. Therefore, for identifying the genetic contribution of Chinese native pigs to Tokyo X, a population genetic analysis was performed by DIYABC using autosomal, Y-chromosomal and mitochondrial DNA markers. The results remained unchanged, showing the genetic contribution of the Duroc and Berkshire breeds from the European group, without any influence of the Chinese native pigs. This again appears to contradict the breeding history of Tokyo X; however, there is one possible explanation for this: the Berkshire breeds were originally used to create the Beijing Black breed, which has since been improved for generations. It is therefore possible that the genome of Beijing Black breed was almost completely replaced by those of European pigs, especially the Berkshire breed. In contrast, the MC1R gene, which controls the diversity of coat color, supports the evolutionary scenario suggesting a direct genetic contribution from the Chinese native pigs to Tokyo X. This may be the result of positive selection in order to artificially select the black color of Asian haplotypes during the selective breeding of the Beijing Black breed.

The Tokyo X strain has been maintained for 22 years, and it is possible that its genetic diversity and genetic composition changed from the certified population. Until now, researchers had performed statistical genetic analysis based on pedigree information, but as this method does not take into account the effects of genetic drift, the exact genetic diversity and genetic composition of the It is difficult to assess how the exact genetic diversity and genetic composition changes in a closed group subpopulation across generations. We therefore started by estimating the genetic diversity and genetic composition of the Tokyo X genome and evaluated the efficiency of statistical genetic analysis, based on pedigree information. Every year, we calculated the genetic diversity index from microsatellite DNA, confirming that genetic diversity was maintained even after the transition to maintenance. Next, we performed a phylogenetic analysis to evaluate the transition of genetic composition. Our results confirmed that the cohort was unidirectionally changing over time, indicating that the genetic composition was gradually changing year by year. Additionally, we evaluated the extent of genetic differentiation and how it changes by cohort and by year. The results show that genetic differentiation considerably progressed in the initial stages, then gradually. However,

our results clearly showed that the current Tokyo X strain had undergone a considerable genetic drift compared with the certified population. Moreover, when these results were compared with the coefficient of variation of genetic contribution rate (GRC) of foundation pigs based on pedigree information, it was shown that there was a significant correlation between them. This result suggests that GRC is an effective way for assessing the genetic differentiation of small, closed group populations when pedigree information is available. Additionally, genetic differentiation was calculated to detect selection that occurred in the maintenance of the Tokyo X strain. Our results showed that two of the 30 microsatellite loci were significantly larger than the others, both located on chromosome 6. In the Tokyo X strain, the *RYR1* gene on chromosome 6 has been culled in the past, and the possibility of this culling is suspected. Additionally, genetic differentiation was small in the mitochondrial DNA and in the *MC1R* gene. In color, Tokyo X is not selected or fixed. If selection and fixation are not performed, there will be variations in genetic differentiation, and the genetic differentiation will be high. However, the genetic differentiation detected this time was small, suggesting that unintentional artificial selection was performed. The mitochondrial DNA showed the smallest value among all loci. Tokyo X has been bred under the policy of maintaining genetic diversity and reducing inbreeding coefficients. This effort may lead to small genetic differentiation of mitochondrial DNA throughout generations.

Based on these facts, we can conclude that the breeding implemented suppresses the increase of inbreeding coefficient in the synthetic pig strain Tokyo X. However, genetic diversity is decreasing over time because of strain construction and maintenance, and changes in the composition within the population are inevitable. Therefore, in order to suppress changes in the genetic diversity of the maintenance population and deviation of the genetic composition from the certified group, it is necessary to elaborate a breeding plan considering not only the current pedigree information but also the DNA marker information.

謝辞

本論文を作成するのにあたり、懇切丁寧なるご指導を受け賜りましたヤマザキ動物看護大学の古川力教授、東京農業大学の小林栄治客員教授、野村こう教授、米澤隆弘准教授、高橋幸水助教に厚く御礼申し上げます。また、研究の遂行にあたり多くのご指摘およびご助言を頂きました東京農業大学の半澤恵教授に心より感謝申し上げます。

トウキョウ X のサンプルおよびデータのご提供を始め、諸々のご協力をして頂いた公益財団法人東京都農林水産振興財団青梅畜産センター様および兵頭勲様に深謝致します。その他の品種のサンプルをご提供して頂いた株式会社フリーデン様、農業・食品産業技術総合研究機構様、岩手県農業研究センター畜産研究所様、静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センター様、家畜改良センター茨城牧場様、家畜改良事業団様に深謝致します。また、本研究の一部は公益財団法人伊藤記念財団様の助成を受けました。ここに謝意を表します。

最後に、本論文の作成にあたり、多くのお力添えを頂いた当研究室卒業生永井健一様を始め、後輩の皆様方に重ねて御礼申し上げます。

引用文献

1. 阿部猛夫. 1987. わが国豚系統の造成とその利用. 日本畜産学会報. 58: 545-562.
2. Ai H., Yang B., Li J., Xie X., Chen H. and Ren J. 2014. Population history and genomic signatures for high-altitude adaptation in Tibetan pigs. *BMC Genomics*. 15: 834.
3. Bandelt H.J., Forster P. and Rohl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 16: 37-48.
4. Biswas S. and Akey J.M. 2006. Genomic insights into positive selection. *Trends in Genetics*. 22: 437-446.
5. Bryant D. and Moulton V. 2004. Neighbor-Net: An Agglomerative Method for the Construction of Phylogenetic Networks. *Molecular Biology and Evolution*. 21: 255-265.
6. Chakraborty R. and Jin L. 1993. Determination of relatedness between individuals using DNA fingerprinting. *Hum Biol*. 65: 875-895.
7. Cliffe K.M., Day A.E., Bagga M., Siggins K., Quilter C.R., Lowden S., Finlayson H.A., Palgrave C.J., Li N., Huang L., Blott S.C. and Sargent C.A. 2010. Analysis of the non-recombining Y chromosome defines polymorphisms in domestic pig breeds: ancestral bases identified by comparative sequencing. *Animal Genetics*. 41: 619-629.
8. Cornuet J.M., Pudlo P., Veyssier J., Dehne-Garcia A., Gautier M., Leblois R., Marin J.M. and Estoup A. 2014. DIYABC v2.0: a software to make approximate Bayesian computation inferences about population history using single nucleotide polymorphism, DNA sequence and microsatellite data. *Bioinformatics*. 30: 1187-1189.
9. Doekes H.P., Veerkamp R.F., Bijma P., Hiemstra S.J. and Windig J.J. 2018. Trends in genome-wide and region-specific genetic diversity in the Dutch-Flemish Holstein-Friesian breeding program from 1986 to 2015. *Genetics Selection*

Evolution. 50: 15.

10. Earl D.A. and Vonholdt B.M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources. 4: 359-361.
11. Epstein J. and Bichard M. 1984. Evolution of Domesicated Animals. Mason I.L. (ed), pp.145-162. Longman, London and New York.
12. Evanno G., Regnaut S. and Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. Molecular Ecology. 14: 2611-2620.
13. Excoffier L. 2007. Handbook of Statistical Genetics. Analysis of population subdivision. In Handbook of Statistical Genetics, Balding DJ, Bishop M, Cannings C (eds), pp. 980-1020. Chichester, UK, Wiley.
14. Excoffier L. and Lischer H.E. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Mol. Ecol. Resour. 10: 564-657.
15. Fang M., Hu X., Jin W., Li N. and Wu C. 2009. Genetic uniqueness of Chinese village pig populations inferred from microsatellite markers. J. Anim. Sci. 87: 3445-3450.
16. Fang M., Larson G., Ribeiro H.S., Li N. and Andersson L. 2009. Contrasting Mode of Evolution at a Coat Color Locus in Wild and Domestic Pigs. PLOS Genetics 5, e1000341.
17. Farquharson K.A., Hogg C.J., Grueber C.E. 2017. Pedigree analysis reveals a generational decline in reproductive success of captive Tasmanian devil (*Sarcophilus harrisi*): implications for captive management of threatened species. Journal of Heredity. 108: 488-495.
18. 古川力・吉田力・下弘明. 1987. 系統豚維持集団における近交係数の予測. 東北農林研究. 40: 235-236.

19. 古川力. 2001. 動物遺伝育種学辞典, 普及版. ブタ. pp.494-499. 動物遺伝育種学事典編集委員会. 東京.
20. 古川力. 2001. 動物遺伝育種学辞典, 普及版. 交雑. pp.206-208. 動物遺伝育種学事典編集委員会. 東京.
21. Giuffra E., Kijas J.M., Amarger V., Carlborg O., Jeon J.T. and Andersson L. 2000. The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics*. 154: 1785-1791.
22. Goudet J. 2002. FSTAT. <https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
23. Gower J.C. 1966. Some Distance Properties of Latent Root and Vector Methods Used in Multivariate Analysis. *Biometrika*. 53: 325-338.
24. Hartle D.L. and Clark A.G. 2007. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts.
25. Hasegawa H., Kishino H. and Yano T. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*. 22: 160-174.
26. 兵頭勲. 1998. 良い豚肉をつくるための生産現場からの提言 - トウキョウ X の造成を例として -. *日豚会誌*. 35: 56-58.
27. 兵頭勲. 2001. Tokyo-X 豚の開発に関する遺伝育種学的研究. 東京農業大学博士論文.
28. Huson D.H. and Bryant D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*. 23: 254-267.
29. 井鷲裕司・陶山佳久. 2013. 生態学者が書いた DNA の本 メンデルの法則から遺伝情報の読み方まで. アレリックリッチネス. pp.112. 文一総合出版. 東京.
30. Jansson M. and Laikre L. 2018. Pedigree data indicate rapid inbreeding and loss of genetic diversity within populations of native, traditional dog breeds of conservation concern. *PLoS One*. 13: e0202849.

31. Jin L. and Chakraborty R. 1994. Estimation of Genetic Distance and Coefficient of Gene Diversity form Single-Probe Multilocus DNA Fingerprinting Data. *Mol. Biol. Evol.* 11: 120-127.
32. 川根昌子・和田恵次. 2015. 汽水性希少カニ類タイワンヒライソモドキ *Ptychognathus ishii* Sakai, 1939 (モクズガニ科) の日本沿岸における遺伝的集団構造. *日本ベントス学会誌*. 70: 13-20.
33. 小嶋禎夫. 2015. トウキョウ X におけるロース肉の筋繊維特性と官能評価. *東京農総研研報*. 10: 25-32.
34. 黒澤弥悦・田中和明・田中一栄. 2009. アジアの在来家畜. pp.215-251. 在来家畜研究会. 名古屋.
35. Langella O. 1999. Populations 1.2.3. <http://bioinformatics.org/populations/>.
36. Larson G., Dobney K., Albarella U., Fang M., Matisoo-Smith E., Robins J., Lowden S., Finlayson H., Brand T., Willerslev E., Rowley-Conwy P., Andersson L. and Cooper A. 2005. Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science*. 307: 1618-1621.
37. Leuenberger C. and Wegmann D. 2010. Bayesian Computation and Model Selection Without Likelihoods. *Genetics*. 184: 243-252.
38. Li Y.H., Chu H.P., Jiang Y.N., Lin C.Y., Li S.H., Li K.T., Weng G.J., Cheng C.C., Lu D.J. and Ju Y.T. 2014. Empirical Selection of Informative Microsatellite Markers within Co-ancestry Pig Populations Is Required for Improving the Individual Assignment Efficiency. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 27: 616-627.
39. Ludwig A., Pruvost M., Reissmann M., Benecke N., Brockmann G.A., Castaños P., Cieslak M., Lippold S., Llorente L., Malaspinas A.S., Slatkin M. and Hofreiter M. 2009. Coat color variation at the beginning of horse domestication. *Science*. 324: 485.
40. Marques D.B.D., Lopes M.S., Broekhuijse M.L.W.J., Guimarães S.E.F., Knol E.F.,

- Bastiaansen J.W.M, Silva F.F. and Lopes P.S. 2017. Genetic parameters for semen quality and quantity traits in five pig lines. 95: 4251-4259.
41. Martinez A.M., Delgado J.V., Rodero A. and Vega-Pla J.L. 2000. Genetic structure of the Iberian pig breed using microsatellites. *Anim. Genet.* 31: 295-301.
 42. Michailidou S., Kalivas A., Ganopoulous I., Stea E., Michailidis G., Tsaftaris A. and Argiriou A. 2014. A multi-farm assessment of Greek black pig genetic diversity using microsatellite molecular markers. *Genet. Mol. Res.* 13: 2752-2765.
 43. Miller M.P., Haig S.M., Ballou J.D. and Steel E.A. 2017. Estimating Inbreeding Rates in Natural Populations: Addressing the Problem of Incomplete Pedigrees. *Journal of Heredity.* 108: 574-582.
 44. 宮路直人. 1999. かがしま黒豚物語. 南日本新聞社. 鹿児島.
 45. Montenegro M., Llambi S., Castro G., Barlocco N., Vadell A., Landi V., Delgado J.V. and Martinez A. 2015. Genetic characterization of Uruguayan Pampa Rocha pigs with microsatellite markers. *Genet. Mol. Biol.* 38: 48-54.
 46. 長渕政広・山本るみ子・河野建夫・上田淳一. 2011. 繁殖形質の改良を主としたランドレース種系統豚の造成. *愛知農総試研報.* 43: 79-88.
 47. 永井健一・高橋幸水・野村こう・古川力. 2015. 表計算ソフトを用いた近交・血縁係数及び遺伝的寄与率の計算. *日豚会誌.* 52: 29-36.
 48. 永井健一・兵頭勲・小嶋貞夫・宇杉央・野村こう・高橋幸水・古川力. 2016. 合成系統豚維持群の血統解析および繁殖形質における近交退化と遺伝的パラメータの推定. *日豚会誌.* 53: 95-104.
 49. Nei M., Tajima F. and Tateno Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *J. Mol. Evol.*, 19: 153-170.
 50. 西田 朗・篠原 久・大友 由紀子・鈴木 啓一. 2005. 豚系統の維持集団における遺伝的構成の変化の評価法について. *日豚会誌.* 42: 34-36.

51. 野村哲郎. 2001. 動物遺伝育種学辞典. 普及版. F-統計量. pp.103-104. 動物遺伝育種学事典編集委員会. 東京.
52. Oishi T., Amano T. and Tanaka K. 1993. Phylogenetic Relationship among Seventeen Pig Breeds Analysed by Principal Component Analysis Based on Blood Groups and Biochemical Polymorphisms. *The Journal of Animal Genetics*. 21: 29-31.
53. Okumura N., Kurosawa Y., Kobayashi E., Watanobe T., Ishiguro N., Yasue H. and Mitsuhashi T. 2001. Genetic relationship amongst the major non-coding regions of mitochondrial DNAs in wild boars and several breeds of domesticated pigs. *Animal Genetics*. 32: 139-147.
54. 大石孝雄・兵頭勲・小嶋禎夫・田中一栄. 1992. 血液型および蛋白多型による合成系統基礎豚の遺伝的分析. *日豚会誌*. 29: 7-15.
55. Peakall R. and Smouse P.E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*. 28: 2537-2539.
56. Pham L.D., Do D.N., Nam L.Q., Van-Ba N., Minh L.T.A., Hoan T.X., Cuong V.C. and Kadarmideen H.N. 2013. Molecular genetic diversity and genetic structure of Vietnamese indigenous pig populations. *J. Anim. Breed. Genet*. 131: 379-386.
57. Porter V. 2002. *Mason's World Dictionary of Livestock Breeds, Types and Varieties*, 5th Edition. 214. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK.
58. Porter V., Alderson L., Hall S. and Sponenberg D.P. 2016. *Mason's World Encyclopedia of Livestock Breeds and Breeding: 2 Volume Pack*. pp. 629. Wallingford (UK): CABI Publishing.
59. Pritchard J.K., Stephens M. and Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155: 945-959.
60. Ramírez O., Ojeda A., Tomàs A., Gallardo D., Huang L.S., Folch J.M., Clop A., Sánchez A., Badaoui B., Hanotte O., Galman-Omitogun O., Makuza S.M., Soto H.,

- Cadillo J., Kelly L., Cho I.C., Yeghoyan S., Pérez-Enciso M. and Amills M. 2009. Integrating Y-chromosome, mitochondrial, and autosomal data to analyze the origin of pig breeds. *Molecular Biology and Evolution*. 26: 2061-2072.
61. Revidatti M.A., Delegado-Bermejo J.V., Gama L.T., Landi-Periati V., Ginja C., Alvarez L.A., Vega-Pla J.L., Martines A.M. and BioPig Consortium. 2014. Genetic characterization of local Criollo pig breeds from the Americas using microsatellite markers. *J. Anim. Sci.* 92: 4823-4832.
62. 李箕康. 1986. 中国豚品種誌. 全国養豚協会. 東京.
63. 三枝弘育・河野興一郎. 1998. 高品質系統豚（トウキョウ x）の加工適性. 東京都立食品技術センター研究報告. 7: 15-20.
64. Saitou N. and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
65. Senokuchi A., Ishikawa S., Tozaki T., Takasu M., Kakoi H., Misumi K. and Hobo S. 2018. Genetic analyses for conservation of the traditional Tokara horse using 31 microsatellite markers. *J. Equine. Sci.* 29: 97-104.
66. 正田陽一. 2006. 世界家畜品種事典. 畜産技術協会. 東洋書林. 東京.
67. Suzuki A., Okumura N, Uehara Y., Uenishi H. and Awata T. 2012. An Identification Method for the Tokyo X Strain; The Pig Brand of the Tokyo Metropolitan Agriculture and Forestry Research Center. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 11: 4236-4245.
68. Su Y., Long R., Chen G., Wu X., Xie K. and Wan J. 2007. Genetic analysis of six endangered local duck populations in China based on microsatellite markers. *J. Genet. Genomics*. 34: 1010-1018.
69. 田原岳・永井健一・兵頭勲・小嶋禎夫・宇杉 央・田中大也・小林栄治・米澤隆弘・野村こう・高橋幸水・古川力. 2018. 合成系統豚トウキョウ X の遺伝的多様性および集団構造. *日豚会誌*. 55: 142-153.

70. 田原岳・山口隼・高橋幸水・野村こう・米澤隆弘・古川力. 2019. 日本における希少品種マックス・ロフトンの遺伝的特性および遺伝的構成の評価. 日本緬羊研究会誌. 56: 1-11.
71. 田島茂行・栗田隆之・安藤康紀・平山鉄夫. 2003. 豚の系統造成における繁殖形質の改良と遺伝的評価. 愛知農総試研報. 35: 161-166.
72. 高田勝・田原岳・天野卓・野村こう・高橋幸水・古川力・秋篠宮文仁. 2018. マイクロサテライトを用いた琉球豚の遺伝的多様性と遺伝的構造. 日豚会誌. 55: 12-20.
73. 高橋遼平・石黒直隆・姉崎智子・本郷一美. 2010. 群馬県に生息するニホンイノシシの mtDNA D-loop 領域および GPII 遺伝子の多型解析. 群馬県立自然史博物館研究報告. 14: 37-44.
74. 高崎禎子・飯塚佳子・鈴木亜由美・伊藤米人. 2005. トウキョウ X 豚肉の化学的, 物理的特性ならびに咀嚼特性. 日本調理科学会誌. 38: 404-409.
75. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
76. Thuy N.T.D., Melchinger-Wild E., Kuss A.W., Cuong N.V., Bartenschlager H. and Geldermann H. 2006. Comparison of Vietnamese and European pig breeds using microsatellites. *J. Anim. Sci.* 84: 2601-2608.
77. 徳永忠昭・下村麻衣・石田孝史・原田 宏. 2011. 黒毛和種繁殖雌牛集団における近交係数の年次推移と超音波測定による産肉形質の遺伝的趨勢. 日本暖地畜産学会報. 54: 23-31.
78. 植村光一郎. 2018. 東京発の美味しい豚肉 畜産物の販売戦略とブランディング. TOKYO X-Association 事務局. 東京都.
79. Ursing B.M. and Arnason U. 1998. The complete mitochondrial DNA sequence of the pig (*Sus scrofa*). *J Mol Evol.* 47: 302-306.
80. Vitti J.J., Grossman S.R. and Sabeti P.C. 2013. Detecting natural selection in

genomic data. *Annual Review of Genetics*. 47: 97-120.

81. Wang X.P., Wang L.X., Luo-Reng Z.M. and Sun S.D. 2008. Analysis of PRLR and BF Genotypes Associated with Litter Size in Beijing Black Pig Population. *Agricultural Sciences in China*. 7: 1374-1378.
82. 山内和律・小泉徹・梶野清二・岩上弦太郎. 2013. 大ヨークシャー系統豚「ハマナスW2」の造成. *北海道立総合研究機構農試集報*. 97: 29-37.
83. Yaripour S., Esmaeili H.R., Gholamhosseini A., Rezaei M. and Sadeghi S. 2017. Assessment of genetic diversity of an endangered tooth-carp, *Aphanius farsicus* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Cyprinodontidae) using microsatellite markers. *Mol. Biol. Res. Commun*. 6: 153-160.
84. 吉岡勝. 1971. 新養豚全書. 全国養豚協会. 東京.
85. Yue G.H., Beeckmann P. and Geldermann H. 2002. Mutation rate at swine microsatellite loci. *Genetica*. 114: 113-119.
86. Zeng L., Chen N., Yao Y., Dang R., Chen H. and Lei C. 2019. Analysis of Genetic Diversity and Structure of Guanzhong Horse Using Microsatellite Markers. *Anim. Biotechnol*. 30: 95-98.