

被災雄牛における継世代影響解析の試み



山城 秀昭
新潟大学農学部

生殖器官・生殖細胞および継世代影響



警戒区域内家畜
(牛・豚)



雌雄生殖器官



研究の概要

2011-2012年

- ① 被災家畜精子の保存
- ② 生殖器官と生殖細胞の解析

2013年

- ③ 保存精子を用いた産子作出

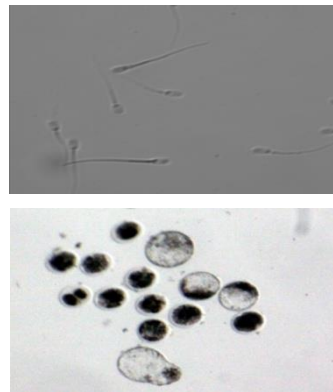
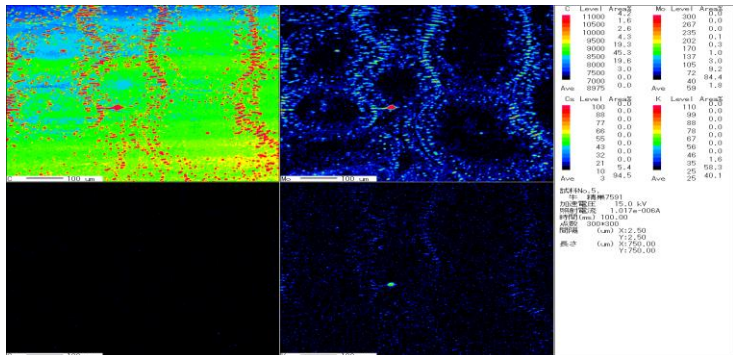
2014年～現在

- ④ 継世代影響の解析中

生殖巣

生殖細胞

- ・沈着核種の同定・計測
- ・組織学的解析
- ・電子線マイクロアナライザー解析



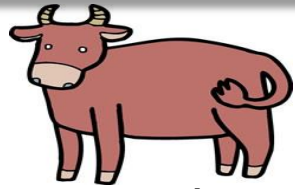
受精能の判定

人工授精
胚移植



・継世代影響解析

継世代影響解析に用いた牛群とDNAの概要



グループ1

× はなこ

父牛

(精子、尾根部の毛)



被災牛1(H23年9月27日採材)

(精子、筋肉)

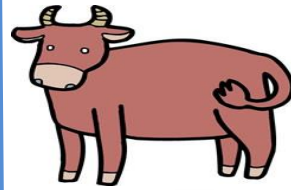


と場由来卵子に体外受精
仮親に受精卵移植



筋肉

♂1, 27kg H25年11月3日生
♀2, 37kg H25年11月3日生



グループ2

× ゆきこ

父牛(精子)



父方半兄弟牛(精子)

母牛
「もも」
血液

×

人工授精



♂4, 30kg H26年9月26日生



筋肉

グループ3



母牛
「さくら」
血液

×

被災牛2

(H25年2月27日採材)

(精子)



人工授精

♀3, 30kg H26年6月26日生

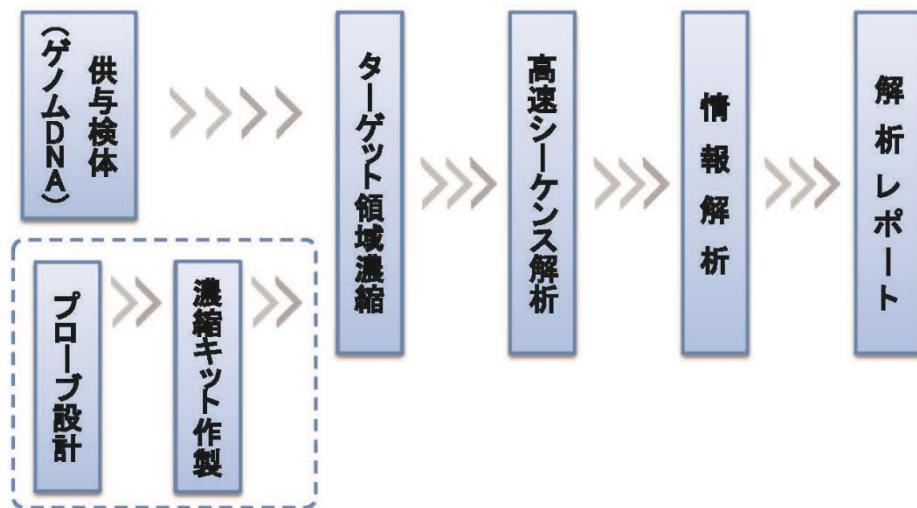


筋肉

DNA濃縮技術を用いたターゲット領域の塩基配列解析

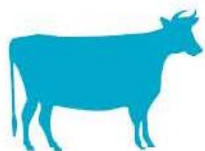
概要

ヒトやマウスなど、参照配列が公開されている生物種について、ゲノム上の特定領域を濃縮、シーケンスすることで、その領域に絞り込んだ変異解析を行うことができます。濃縮は目的領域に相補的に設計された核酸プローブと、断片化されたゲノムDNAを相互作用させることで行います。解析対象を特定領域に絞り込むことで、少ないシーケンス量で十分なdepth(冗長度)を得ることができ、全ゲノムのリシーケンスと比較して低コストで解析を実施できます。特に、タンパク質のコーディング領域(エクソン領域)を網羅的にシーケンス・変異解析を行うExome解析は、遺伝病等の疾患遺伝子の探索に有効で、現在盛んに研究が行われています。



All Exon Bovine:

64Mb design. The library is based on University of Maryland build 3.1 against NCBI exons as well as predicted exons, UTRs, and miRNAs. Worked with USDA on design.



SureSelect Bovine All Exonキャプチャライブラリのプローブ

Assembly

[Advanced](#) [Browse by organism](#)

Assembly information by organism

Show only latest assemblies Show all assemblies

Organism	Name	Submitter	Date	Genome representation	Assembly level	Version status	Representative status
Bos taurus	Btau_4.6.1 UCSC Name: bosTau7	Cattle Genome Sequencing International Consortium	2011/11/02	full	Chromosome	latest	
Bos taurus	Bos taurus UMD 3.1	Center for Bioinformatics and Computational Biology, University of Maryland	2009/12/01	full	Chromosome	latest	species representative

Organism name: [Bos taurus](#)

Submitter:

Center for Bioinformatics and Computational Biology, University of Maryland

Date: 2009/12/01

Assembly level: Chromosome

Genome representation: full

Global statistics

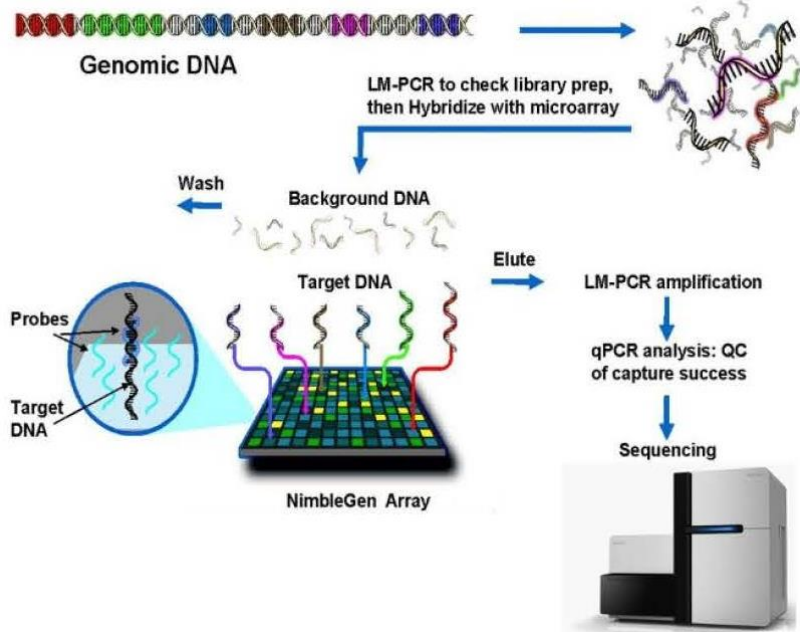
Total sequence length	2,670,422,299
Total assembly gap length	20,737,263
Gaps between scaffolds	3,193
Number of scaffolds	6,510
Scaffold N50	6,380,747
Number of contigs	75,771
Contig N50	96,955
Total number of chromosomes and plasmids	31

Bos taurus UMD 3.1バージョンの
Referenceゲノム配列に基づいて設計

Chromosome 1-29, and Xの全エクソン解析

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/organism/9913/#/latest-assemblies>

目的



次世代シーケンスデータから変異箇所抽出

1 シーケンスデータの品質チェック(QC)

FASTX-Toolkit (バージョン0.0.6)を使用して、信頼性の低い配列を除いた。さらに、片側のみの配列を除いた。

2 配列のマッピング(アライメント)

リファレンス配列(UMD3.1)に対して、bwa(バージョン0.7.10)でアライメントした。

3 変異箇所の解析

Genome Analysis Toolkit(バージョン3.3-0)のHaplotypeCallerを使用し、リファレンス配列に対する変異箇所を解析した。
カバレッジ30X以上を抽出した。

DNA濃縮技術と次世代シーケンサーを用いて、被災牛1・血統情報から得られた父牛・2頭仔牛(グループ1)、半兄弟牛・父牛・1頭仔牛(グループ2:コントロール)、被災牛2・1頭仔牛(グループ3)に渡るタンパク質をコーディングする 1-29番とX染色体エクソン領域におけるスニップとインデル(挿入・欠損部位)の頻度と位置から

1. 次世代の産子にどれくらい変異が入るのか？
2. 特定の塩基に変異が入るのか、あるいはランダムに入るのか？
3. 生殖細胞で起こった変異がある共通の候補遺伝子は検出されるのか？

継世代への影響について解析する。

現段階では、放射線の影響との関連性を認めることはできていない。
今後は、さらに次世代への影響を解析する方法の検討を行わなければならない。