

令和元年5月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05016

研究課題名(和文) 黒毛和種における遺伝性疾患の原因遺伝子解明と遺伝子診断法の確立

研究課題名(英文) Genetic investigation of a hereditary disorder in Japanese Black cattle

研究代表者

国枝 哲夫(Kunieda, Tetsuo)

岡山大学・環境生命科学研究所・教授

研究者番号：80178011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,060,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、黒毛和種に発生する下顎短小・腎低形成症の原因遺伝子の同定と遺伝子診断法の確立を目的としている。発症個体を含む家系の連鎖解析により原因遺伝子の染色体上の位置を特定し、原因となる可能性のある候補遺伝子を特定した。この遺伝子の正確な構造、塩基配列は明らかとなっていなかったため、次にその正確な塩基配列を明らかにした。これらに基づいて原因変異が存在するかについて探索したが、遺伝子機能に大きな影響を与える突然変異はエキソン上には存在していなかった。そこで、当該遺伝子のイントロン等に原因となる変異が存在しているかを調べたところ、発症個体に特異的と考えられるいくつかの塩基置換が同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

黒毛和種は我が国の主要な肉用牛であり、その優れた肉質から国際的にも評価は高く、我が国の農畜産業にとって貴重な動物遺伝資源である。このような黒毛和種に発生する遺伝性疾患は家畜生産における大きな経済的損失につながる。そこで本研究は、黒毛和種に発生する遺伝性の下顎短小・腎低形成症の原因遺伝子を解明し、その予防のための遺伝子診断法を開発しようとするものであり、我が国の畜産における意義は大きく、また、特定の疾患の原因を解明することによる学術的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to identify the causative gene for micrognathia and renal hypoplasia that occurs in Japanese Black cattle and to establish a genetic diagnostic method. The chromosomal localization of the causative gene was determined by linkage analysis using a pedigree including affected animals, and consequently a candidate gene was identified. Since the exact structure and nucleotide sequence of this gene were not clarified, we determined the nucleotide sequence of this gene. Based on these information, we investigated whether there was a causative mutation, but we could not identify the mutation that could affect the function of gene on the exons. Then, we investigated other regions of this gene including introns and finally found several nucleotide substitutions that could be specific to the affected animals

研究分野：動物遺伝学

キーワード：黒毛和種 遺伝性疾患 遺伝子診断法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

従来、家畜の育種改良は肉質や枝肉重量などの生産形質を向上させることを主な目的として行われてきており、肉牛では脂肪交雑を含む肉質の改良および増体の改良が主な改良目標であった。一方で疾患や繁殖障害などの家畜の生産性にマイナスの影響を与える遺伝的要因を集団より除去することも、育種改良による家畜の生産性向上にとって重要な課題である。すなわち、これらの疾患や異常の発生は生産性に影響を与えると共に、生産者に大きな経済的損失をもたらすことになる。そこで、研究代表者らは、このような家畜生産性にマイナスの影響を与える遺伝的要因の除去のために、長年にわたって黒毛和種および褐毛和種を中心とする和牛の遺伝性疾患の原因遺伝子の同定と遺伝子診断法の確立に取り組んできた。その結果、多くの遺伝性疾患の原因遺伝子を同定し、診断法も確立している。現在、これらの遺伝子診断法等の技術は和牛の育種上の不可欠な検査として全国的に実施され、その結果これら疾患の発生頻度は劇的に減少し、集団中のこれらの遺伝子の頻度も徐々に減少してきている。しかし、依然として黒毛和種牛には原因が解明されていないいくつかの遺伝性疾患の発生が報告され、畜産業に経済的損失を引き起こしていることも事実であり、その中でも比較的影響の大きいのが、本研究計画の対象とする黒毛和種牛に発生する下顎短小・腎低形成症である。

2. 研究の目的

下顎短小・腎低形成症は、黒毛和種の特定の基幹的種雄牛の家系で多くの発生が報告され、これまでの解析から常染色体劣性の遺伝性疾患であることが推測されている。本疾患の発症個体は、腎臓の重度の低形成を呈し、その結果として胎膜内における胎児の発生に異常をきたし、下顎が正常牛より顕著に短くなる。発症個体の多くは死産または生後早期に重度の腎機能不全により死亡することから、本疾患の発生が畜産農家に与える被害は多大である。しかし、その原因遺伝子は不明であり、未だ遺伝子診断法は確立されていないことから、本疾患の発生を確実に防止することは困難である。そこで本研究では、遺伝学的手法により本疾患の原因遺伝子の染色体上の位置を特定し、さらにその領域に存在する遺伝子の塩基配列を解析することで、疾患の原因となる遺伝子上の変異を同定し、その変異を検出することで、疾患原因遺伝子を保有する保因個体を同定する遺伝子診断法を確立することを目的とする。遺伝子診断法を確立することで、保因個体同士の交配をさけ疾患の発生を予防することが可能となると共に、種雄牛等から保因個体を排除することで集団内の疾患原因遺伝子の遺伝子頻度を減少させることが可能となると期待される。

3. 研究の方法

本研究では以下の研究計画のもとで研究を実施した。1. まず、当該疾患の発症個体を含む家系の DNA サンプルを用いて、染色体上の DNA マーカーによる連鎖解析を実施し、疾患原因遺伝子が存在する染色体上の領域を正確に特定する。次に、ゲノムデータベースよりウシ染色体の当該領域に存在する遺伝子を明らかとする。2. 次に発症個体の病理学的な解析やヒトにおける類似した遺伝性の腎疾患との比較等により、下顎短小・腎低形成症に関わる可能性のある遺伝子の機能を明らかにする。3. これらの結果から、ウシの当該染色体上に存在し、機能的にも腎形成に関わる可能性ある遺伝子を本疾患の候補遺伝子として特定し、ウシの正常個体と発症個体との間で、これら遺伝子の塩基配列を解析し比較することで、疾患の原因となる塩基配列上の変異を特定する。もしこれらの遺伝子に疾患の原因となる変異が特定されない場合には、さらに当該領域のより広い範囲で塩基配列の解析をおこなうことで、疾患の原因となる変異あるいは疾患と強く関連する塩基配列上の多型を同定する。4. 当該遺伝子が実際に疾患の原因であることを確認するとともに、疾患の発生に関わる当該遺伝子の機能を解明する。5. 以上により疾患原因遺伝子と変異が確定できたなら、PCR-RFLP 法等により、黒毛和種の集団中で実際に保因個体を同定するために、その変異を簡便かつ正確に検出する遺伝子診断法を確立する。

4. 研究成果

下顎短小・腎低形成症の発症個体および血縁関係にある多数の個体について、当該領域に存在する SNPs 等のマーカーをタイピングすることで、疾患原因遺伝子の染色体上の位置をより正確に特定した。さらに、その染色体上の領域に存在する遺伝子について、これまでに明らかにされている塩基置換等の変異が本疾患に関連しているかどうかについて調べた。具体的には発症牛を含む黒毛和種の家系から採取された DNA サンプルを用いて、これまでに明らかにされている変異のうち、遺伝子の機能に大きな影響を与えていると考えられる 10 遺伝子の変異の解析を行った。その結果、これらの遺伝子の変異では多くの個体で表現型から予想された遺伝子型と実際の遺伝子型が一致せず、したがって、これらの遺伝子の変異は本疾患の原因ではないと判断された。

次に、下顎短小・腎低形成症の原因遺伝子が存在する染色体上の位置に存在する遺伝子の中で、ヒトの遺伝性疾患に関する情報および発生過程での腎形成に関わる機能に関する情報から、本疾患の原因となる可能性のある遺伝子を検索したところ、本疾患に関わる可能性のある一つの候補遺伝子を特定された。しかしこの遺伝子の塩基配列にはきわめて GC

含量の高い領域が存在しているため、その塩基配列の解析は困難であり、またウシゲノムデータベース上での当該遺伝子の塩基配列の情報も正確ではなく、いくつかの塩基配列の不明な部分が存在することが明らかとなった。そこで、GC 含量の高い領域の増幅するためのいくつかの方法を用いて、この遺伝子の正確な塩基配列を試みたところ、全エキソンの塩基配列が明らかになり、その結果、当該遺伝子にはこれまでにデータベース上の配列では報告されていない新たなエキソンが存在すること、これまでに報告されている転写物とは異なる短い転写物が存在することが明らかとなった。これらの情報に基づいて、発症個体と正常個体の間で全エキソンの塩基配列を比較し、発症個体に特異的な変異が存在するかについて探索した。その結果、ナンセンス変異等の遺伝子の機能に大きな影響を与える可能性のある突然変異はエキソン上には存在しないことが明らかになった。

そこで、次に当該遺伝子のエキソン以外のプロモーター領域、イントロン等に疾患の原因となる変異が存在しているかを明らかにすることを試みた。当該遺伝子のイントロンには多数の反復配列が存在するため、これらの配列を含む領域の塩基配列の解析は困難であったため、これらの領域を除いた領域について発症個体と正常個体の間で、その塩基配列を比較した。その結果、発症個体に特異的と考えられる塩基配列上の変異が複数特定された。今後、黒毛和種の多数の個体についてこれら変異の分布を調べることで、発症個体に特異的な変異が特定され、その変異を検出することで下顎短小・腎低形成症の遺伝子診断法が確立されることが期待される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)

1. Genetic characterization of Vietnamese Yellow cattle using mitochondrial DNA and Y-chromosomal haplotypes and genes associated with economical traits. Le TNA, Vu HV, Okuda Y, Duong HT, Nguyen TB, Nguyen VH, Le PD, Kunieda T. Anim Sci J. 2018 89(12):1641-1647. doi: 10.1111/asj.13099 (査読有り)
2. Genetic characterization of Indonesian Pesisir cattle using mitochondrial DNA and Y-chromosomal haplotypes and loci associated with economical traits and coat color. Putra, D. E, Paul, R. C., Le, T. N. A., Okuda, Y., Yurnalis, Ibi, T., Kunieda, T. J. Anim. Genet., 46, 17-23, 2018 (査読有り)
3. Genetic characterization of Laotian native cattle using mtDNA haplotype and loci associated with economical traits, coat color, and a hereditary disorder. Okuda Y, Kani T, Yamamoto Y, Kounnavongsa B, Keonouchanh S, Bouahom B, Kunieda T. J Anim. Genet.45, 43-48, 2017. (査読有り)
4. Genotype distribution and allele frequencies of the genes associated with body composition and locomotion traits in Myanmar native horse. Okuda Y, Moe HH, Moe KK, Shimizu Y, Nishioka K, Shimogiri T, Mannen H, Kanemaki M, Kunieda T. Anim. Sci. J. 2017 88(8):1198-1203. doi: 10.1111/asj.12756 (査読有り)
5. Low mitochondrial DNA diversity of Japanese Polled and Kuchinoshima feral cattle. Mannen H, Yonesaka R, Noda A, Shimogiri T, Oshima I, Katahira K, Kanemaki M, Kunieda T. Inayoshi Y, Mukai F, Sasazaki S. Anim. Sci. J. 2017 88(5):739-744. doi: 10.1111/asj.12716. (査読有り)
6. 高密度 SNP アレイを用いた口之島野生化牛の全常染色体及び各染色体に対する遺伝的多様性の評価 齊藤祐也、笹崎晋史、下桐猛、印牧美佐生、国枝哲夫、万年英之 日本畜産学会報 87, 219-226. 2016. (査読有り)
7. 岡山県固有の黒毛和種希少系統の遺伝学的特徴の解析 米田一裕、奥田ゆう、斯琴凶雅、西牧孝洋、松本大和、宮崎義之、揖斐隆之、辻 岳人、国枝哲夫 日本畜産学会報 87, 1-10, 2016 (査読有り)
8. Allelic frequencies and association with carcass traits of six genes in local subpopulations of Japanese Black cattle. Nishimaki, T., Ibi, T., Siqintuya, Kobayashi, N., Matsunashi, T., Akiyama, T., Yoshida, E., Imai, K., Matsui, M., Uemura, K., Eto, H., Watanabe, N., Fujita, T., Saito, Y., Komatsu, T., Hoshihara, H., Mannen, H., Sasazaki, S., Kunieda, T. Anim. Sci. J. 87. 469-476. 2016 (査読有り)

[学会発表](計 17 件)

1. Kunieda T. Genetic diversity and hereditary disorders of Japanese beef cattle. The 1st International Conference on Animal Production for Food Sustainability. G (2018 10.10-12. Padan, Indonesia,)
2. Kunieda T. Origin and genetic diseases of Japanese Black cattle. The 30th World Buiatrics Congress, Workshop on Characteristics and prospects of Japanese Black cattle. (2018. 8.28-9.1. Sapporo,)
3. Le, N.A.T., Vu, V.H., Okuda, Y., Nguyen, B.T., Le, D.P., Nguyen, H.V. Kunieda, T.

Genetic Characterization of Vietnamese Yellow Cattle using Mitochondrial DNA and Y-chromosomal Haplotypes and Loci Associated with Economical Traits. 18th Asian Australasian Animal Production Congress (AAAP Congress) (2018, 8. 1-5. Kuching, Malaysia)

4. Le Thu・Vu Hai・Le Phung・Nguyen Van・Nguyen Trung・Okuda Yu・国枝 哲夫
Genetic characterization of Vietnamese Yellow cattle 日本畜産学会第124回大会
(2018年3月 厚木)

〔図書〕(計2件)

1. 国枝 哲夫 兵庫の和牛 但馬牛 兵庫県農政環境部農林水産局畜産課 編 2018年丸善プラネット(分担執筆)
2. 国枝 哲夫 動物遺伝育種学 祝前博明、国枝哲夫、野村哲朗、万年英之 2017 朝倉書店(分担執筆)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
該当無し

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：揖斐 隆之

ローマ字氏名： IBI, Takayuki

所属研究機関名：岡山大学

部局名：大学院環境生命科学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁): 70335305

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。