

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15387

研究課題名(和文)全ゲノム関連解析による牛の黄色ブドウ球菌性乳房炎の感受性遺伝子の同定とリスク予測

研究課題名(英文) Genome wide association study to identify the susceptibility of staphylococcus aureus-induced mastitis in Holstein cattle and to estimate the risk

研究代表者

福永 航也 (Fukunaga, Koya)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：50506722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本課題は、ゲノムワイド関連解析(GWAS)というゲノム上のほぼすべての一塩基多型の関連解析を行う手法で、牛の黄色ブドウ球菌性乳房炎の慢性化機転に関連するBTA7およびBTA26上のゲノムバイオマーカーを同定した。このゲノムバイオマーカーは長鎖脂肪酸に特異的なアシルCoA合成酵素であるACSL5に関連している可能性を示唆した。また、GWASでは調べることが困難であった牛のMHCクラス2の6遺伝子のジェノタイピング法を次世代シーケンサーを用いて構築し、BoLA-DRB3*011:01アリルが黄色ブドウ球菌性乳房炎の感受性に関連している可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同定したゲノムバイオマーカーを用いたゲノム選抜を行うことで牛の黄色ブドウ球菌性乳房炎に耐性のもつ牛を選定することが可能となり、乳製品の生産性の向上が期待される。さらに同定された遺伝子は既存の乳房炎のメカニズムにはない新規知見であり、乳房炎の治療撲滅の一助となるだろう。また、GWASでは調べることができないBoLA領域の6遺伝子の網羅的なジェノタイピング法を構築したことは今後、他の感染症のゲノムバイオマーカーの同定のための貴重なツールである。

研究成果の概要(英文)：The objective was to identify the susceptibility of staphylococcus aureus-induced mastitis in Holstein cattle and to estimate the risk using genome wide association study (GWAS). As a result, the association of the loci on the BTA7 and BTA26 with chronicity of staphylococcus aureus-induced mastitis was found. In BTA26 region, ACSL5, which was the long-chain fatty-acid-coenzyme A, might associate with the chronicity. Using GWAS, we could not identify the alleles of six genes in major histocompatibility complex (MHC), class II. Therefore, the genotyping method to identify all alleles of six genes containing copy number variation using the next generation sequencer were developed. Using this method, the weak association of BoLA-DRB3*011:01 with the susceptibility of staphylococcus aureus-induced mastitis were clarified. In the future, this method to genotype the BoLA alleles could be a gold standard to identify the genomic biomarker associated with the other contagious diseases.

研究分野：ゲノミクス

キーワード：乳房炎 牛 MHC GWAS BoLA 黄色ブドウ球菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌性乳房炎は、生乳の廃棄はもちろん、牛肉の廃棄とも一部関連し、我が国の食料自給率を減少させるため、克服が急務の疾患である。特に慢性化した場合、根治が困難であり淘汰の対象となる可能性が高く農家の損失は大きい。しかしながら、黄色ブドウ球菌性乳房炎感染牛であっても、適切な治療にも関わらず慢性移行牛と非慢性移行牛があり、そのメカニズムの全体像はいまだ解明されていない。

2. 研究の目的

本課題は、全ゲノム関連解析を用いて黄色ブドウ球菌性乳房炎における感受性遺伝子をホルスタイン種において同定することを目的としている。また全ゲノム SNP 解析でカバーできない MHC 領域のアリルを網羅するシーケンシング方法を NGS を用いて構築し、黄色ブドウ球菌性乳房炎との関連も精査する。

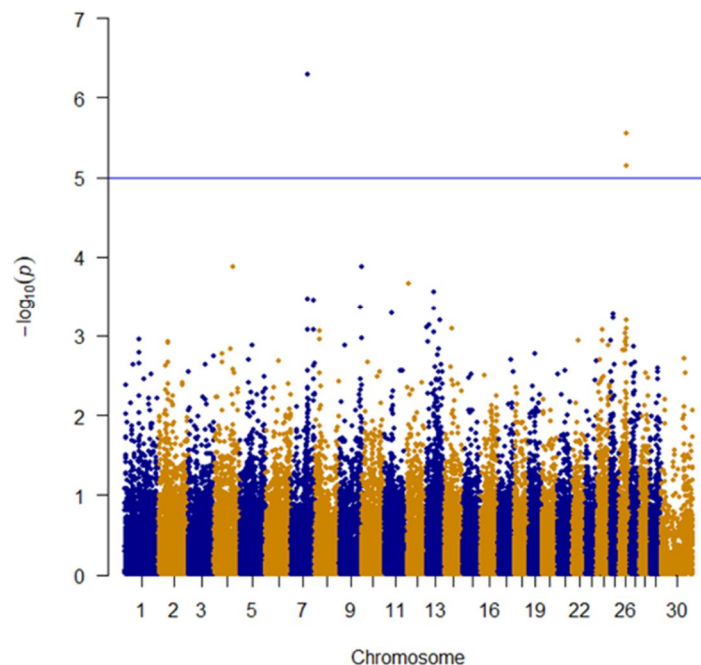
3. 研究の方法

黄色ブドウ球菌性乳房炎における感受性遺伝子をホルスタイン種において同定するために、全ゲノム SNP 解析を用いる。また全ゲノム SNP 解析でカバーできない MHC 領域のアリルを網羅するシーケンシング方法を NGS を用いたターゲットシーケンシング法で構築する。

4. 研究成果

(1) 本課題は、全ゲノム SNP 解析を用いて黄色ブドウ球菌性乳房炎における感受性遺伝子をホルスタイン種において同定することを目的としている。罹患歴のある牛 120 頭からゲノム DNA と乳汁を採取した。乳汁を羊血液寒天培地に塗布し黄色ブドウ球菌の慢性感染群、検出されなかった牛を治癒群と判定した。牛の SNP アレイを用いてこれらのゲノム DNA の 53,417SNPs をジェノタイプした。全ゲノム関連解析を施行したところ BTA7 および BTA26 上の SNP が有意に関連していることを明らかにした。特に BTA26 上のバリエーションは長鎖脂肪酸に特異的なアシル CoA 合成酵素である ACSL5 の 3' 非翻訳領域上のバリエーションであり ACSL5 の mRNA の発現量を調整している可能性が示唆された。同定された 2 つの変異を用いてリスク予測モデルを構築したところ一定数の慢性感染のリスクを予測することができた。これらの結果から黄色ブドウ球菌感染の慢性化には ACSL5 を介した脂質代謝異常を誘発し易感染を誘発していることが明らかになった。

図 1 牛の黄色ブドウ球菌の慢性感染におけるゲノムワイド関連解析の結果



(2) 黄色ブドウ球菌の慢性感染は治療薬であるラクタム系抗生物質の効果が高い可能性があるため前述の 120 頭のゲノム DNA を用いてラクタム系抗生物質の輸送に関わる PEPT1 の SLC15A1 遺伝子のエクソン領域のターゲットシーケンシングを行った。シーケンシングの結果から野生型と 2 つのアリルが検出された。野生型のリコンビナントタンパク質を強制発現させた培養細胞系を構築し 10 種類のラクタム系抗生物質の輸送活性を測定したところ 1 つの薬剤以外はほとんど輸送されなかった。

(3) WAS では調べることが困難であった牛の MHC クラス 2 の 6 遺伝子のジェノタイピング法を次世代シーケンサーを用いて構築した。この方法を用いて、BoLA-DQA2 (DQA2)、BoLA-DQB (DQB2)、BoLA-DQA5 (DQA5)、BoLA-DQB (DQB1)、LOC100848815 (DQA1) および BoLA-DRB3 (DRB3) におけるコピー数とアリルを組み合わせることで完全な MHC クラス アリルを同定し、そのハプロタイプ構造を推定した (図 2)。BoLA クラス II の 6 遺伝子中 3 遺伝子には CNV が存在し、新規 15 アリルが認められた (図 3)。遺伝子ごとのハプロタイプ構造を明らかにした。関連解析の結果 BoLA-DRB3*011:01 アリルが黄色ブドウ球菌性乳房炎の感受性に関連している可能性を示唆した。



図 2 6 BoLA 遺伝子間の連鎖不平衡の評価

図 3 BoLA-DRB3 アリルの配列のアライメント結果

DRB3*Reference	GGTTAGGGCTAGTCCTAGCGGCCCAACTGAGCCTGGGCGTCCCGCATTGGTGGGTGTCG	60
DRB3*001:01	-----	60
DRB3*002:01	-----	60
DRB3*009:02	-----C-----	60
DRB3*010:01	-----	60
DRB3*011:01	-----T-----	59
DRB3*012:01	-----	60
DRB3*014:01:01	-----T-----	59
DRB3*015:01	-----A-----	60
Novel14	-----	60
DRB3*017:01	-----A-----	60
DRB3*018:01	-----	60
DRB3*027:03	-----	60
Novel15	-----	60
DRB3*Reference	CCCC-GCCCTCCATTCTCATTAGCCTCTCCCCAGCAGTCCGCTCCTGTGACCAGATCTA	119
DRB3*001:01	---T-----G-A-----	120
DRB3*002:01	---T-----A-----G-A-----	120
DRB3*009:02	---T-----G-A-----C-----	119
DRB3*010:01	---T-----CCT-----G-A-----C---	120
DRB3*011:01	---T-----C-----G-A-----A-----	119
DRB3*012:01	---T-----C-----G-A-----	119
DRB3*014:01:01	---T-----C-----G-A-----A-----	119
DRB3*015:01	---T-----G-A-----	120
Novel14	---T-----G-A-----	119
DRB3*017:01	---T-----G-A-----	120
DRB3*018:01	---T-----G-----	119
DRB3*027:03	---T-----G-----	120
Novel15	---T-----G-----	119
DRB3*Reference	TCCTCTCTGCGACACATTTCTGGAGTATTATAAGAGAGAGTGCATTTCTTCAACGG	179
DRB3*001:01	-----C-----C-----	180
DRB3*002:01	-----C-C-C-----	180
DRB3*009:02	-----C-----C-----	179
DRB3*010:01	-----C-----C-----	180
DRB3*011:01	---G-----C---C---G-C-----	179
DRB3*012:01	-----ACC---A-----	179
DRB3*014:01:01	---G-----C---C---G-C-----	179
DRB3*015:01	-----C-C-C-----	180
Novel14	-----ACC---A-----	179
DRB3*017:01	-----GC-C-C-----	180
DRB3*018:01	-----GC-C-C-----	179
DRB3*027:03	-----ACC---A-----	180
Novel15	-----ACC---A-----	179

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Suvichapanich Supharat, Wattanapokayakit Sukanya, Mushiroda Taisei, Fukunaga Koya, Omae Yosuke, Tokunaga Katsushi etc.	4. 巻 63
2. 論文標題 Genomewide Association Study Confirming the Association of NAT2 with Susceptibility to Antituberculosis Drug-Induced Liver Injury in Thai Patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 2692-2718
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AAC.02692-18	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Lo Chieh-Wen, Borjigin Liushiqi, Saito Susumu, Fukunaga Koya, Saitou Etsuko, Okazaki Katsunori, Mizutani Tetsuya, Wada Satoshi, Takeshima Shin-nosuke, Aida Yoko	4. 巻 12
2. 論文標題 BoLA-DRB3 Polymorphism is Associated with Differential Susceptibility to Bovine Leukemia Virus-Induced Lymphoma and Proviral Load	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 352 ~ 352
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v12030352	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshihama T, Fukunaga K, Hirasawa A, Nomura H, Akahane T, Kataoka F, Yamagami W, Aoki D, Mushiroda T.	4. 巻 9(51)
2. 論文標題 GSTP1 rs1695 is associated with both hematological toxicity and prognosis of ovarian cancer treated with paclitaxel plus carboplatin combination chemotherapy: a comprehensive analysis using targeted resequencing of 100 pharmacogenes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 29789-29800
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.25712	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福永航也、山下祐輔、八木沢拓也
2. 発表標題 ウシMHCクラス 6遺伝子のコピー数とNGS解析を組み合わせた新規アリル同定およびそのハプロタイプ構造の推定
3. 学会等名 第29回日本組織適合性学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 薬物動態関連遺伝子の網羅的配列解析法とそれに使用されるプライマーセット	発明者 蒔田泰誠、福永航也	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-001821	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----