

研究種目：基盤研究(A)
研究期間：2006 年 ~ 2009 年
課題番号：18255013
研究課題名(和文) アメリカ大陸における疾患感受性を規定するウシ主要組織適合遺伝子の検出技術の実用化
研究課題名(英文) Clinical application of diagnosis method of bovine major histocompatibility complex genes associated with resistance and susceptibility to bovine leukemia virus-induced lymphoma in South American
研究代表者： 間 陽子
独立行政法人理化学研究所・分子ウイルス学特別研究ユニット・ユニットリーダー
研究者番号：50182994

研究分野：農学

科研費の分科・細目：基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：ウシ MHC(BoLA)、アメリカ大陸、BoLA クラス II 対立遺伝子、PCR-SBT 法、牛白血病

1. 研究計画の概要

乳牛と肉牛の生産では世界の 25%~40% を占めるアメリカ大陸の主要な畜産国を対象にして、牛白血病の発症に対して抵抗性と感受性を規定する BoLA クラス II 対立遺伝子を PCR-SBT 法を用いて同定する事が目的である。

2. 研究の進捗状況

ペルー・ボリビア・パラグアイ・アルゼンチンおよびアメリカ合衆国よりウシ血液を採材し、DNA 抽出を行った。アメリカ合衆国・ワシントン州およびアイダホ州より乳用ホルスタイン(14 頭)、アルゼンチンより Angus (3 牧場、714 頭) およびホルスタイン種(3 牧場、341 頭)、ペルーでは乳用ホルスタイン(105 頭)、海拔約 3300m の高地で飼育されているホルスタイン(29 頭)、ペルー北部のアマゾン地域の肉用交雑種(Nelole x Brahman)(195 頭)、ボリビア・サンタクルス周辺の乳用ホルスタイン(2 牧場 159 頭)、肉用種として Gir 種および Nelole 種(213 頭)、乳肉兼用種(4 牧場 113 頭) および種雄牛(26 頭)、そしてパラグアイより乳用ホルスタイン(5 牧場 139 頭)を採血した。さらに、各国における BLV 感染率を BLV プロウイルスの PCR による検出したところ、パラグアイは 69.7%、ボリビアは 18.8%~67.0%、ペルーでは低地ホルスタインで 58.7%、高地ホルス

タイン種は 7.1%、アマゾン地域では 42% であった。

一方、従来の PCR-SBT 法を改良し、タイピングの速度およびコストを大幅に減少させた。この方法を用いて、各国から収集した牛サンプルの *BoLA-DRB3* のタイピングを行い、アレル頻度を計算した。品種や飼育地域の違いがアレル頻度に与える影響を調べるため、アメリカ大陸の各国のウシ集団および日本各地で収集した集団の DRB3 アレル頻度を比較したところ、ホルスタインのアレル頻度は飼育地域に関わらず非常に似通っていること、ホルスタイン、黒毛和種、日本短角、ジャージーなどのタウルス系のウシと Nelole、Brahman、Gir などのコブウシではアレル頻度が大きく異なることなどが明らかとなった。

また、収集したゲノム DNA より BLV の感染細胞数を定量可能なリアルタイム PCR 法の構築に成功した。この方法を用いて、抵抗性および感受性アレルを更に多角的に解析する事が可能となった。

3. 現在までの達成度

おおむね順調に進んでいる。
南米で予想以上に多くの品種のサンプリングが出来た。

4. 今後の研究の推進方策

これらの結果を基に、BLV の感染率と BoLA-DRB3 の遺伝子頻度の相関性を解析し、続いて感受性アリルおよび抵抗性アリルの検出法を開発する予定である。

5. 代表的な研究成果

〔雑誌論文〕(計 45 件)

Shin-nosuke Takeshima, Yoshinori Sarai, Naruya Saitou, Yoko Aida. 2009. MHC class II DR classification based on antigen-binding groove natural selection. *Biochem Biophys Res Commun.* in press

Shin-nosuke Takeshima, Jing Chen, Akimi Miki, Mayu Kado, and Yoko Aida. 2008. Distribution and origin of bovine major histocompatibility complex class II DQA1 genes in Japan. *Tissue Antigens* 72(3):195-205.

Shin-nosuke Takeshima, Yuki Matsumoto, Jing Chen, Tatsuya Yoshida, Harutaka Mukoyama, and Yoko Aida. 2008. Evidence for cattle major histocompatibility complex (BoLA) class II DQA1 gene heterozygote advantage against clinical mastitis caused by Streptococci and Escherichia species. *Tissue Antigens* 72(6):525-531.

Shin-nosuke Takeshima, Yuki Matsumoto, and Yoko Aida. 2008. Establishment of a new PCR sequence-based typing method for genotyping cattle major histocompatibility complex cattle MHC class II DRB3. *J Dairy Sci*, in press.

Shin-nosuke Takeshima, Akimi Miki, Mayu Kado, and Yoko Aida. 2007. Establishment of a sequence-based typing system for BoLA-DQA1 exon 2. *Tissue Antigens* 69(2):189-199.

間 陽子、竹嶋伸之輔 2007. 白血病と乳房炎感受性とウシ主要組織適合遺伝子複合体 (BoLA) の遺伝的多様性 獣医畜産新報 1

〔学会発表〕(計 59 件)

Shin-nosuke Takeshima, Yuki Matsumoto, Jing Chen, Tatsuyuki Yoshida, Harutaka Mukoyama, and Yoko Aida (2008): Evidence for cattle major histocompatibility complex (BoLA) class II DQA1 gene heterozygote advantage against clinical mastitis caused by Streptococcus and Escherichia species., 31th International Society For Animal Genetics, Amsterdam,

The Netherlands, July

Yoko Aida, Kzunori Inabe. (2007) Syncytium-forming Ability and Expression on the Cell Surface of Bovine Leukemia Virus Envelope Glycoprotein Are Regulated by YXXL Motif of Transmembrane subunit, 13th International Conference on Human Retrovirology, Hakone, Japan, May

Yoko Aida, Chen Jing, Shin-nosuke Takeshima (2006) Relationship between polymorphism of BoLA class IIa region and susceptibility or resistance for development of mastitis and bovine leukemia virus (BLV)-induced lymphoma", 30th International Conference on Animal Genetics (ISAG 2006), Porto Seguro, Brazil, August 20-25.

間 陽子 (2009) 『牛白血病ウイルスによる白血病発症機構の解明とその制御方法』平成 20 年度産業動物獣医講習会、2 月、大分

間 陽子 (2008) MHC をマーカーにした牛白血病抵抗性牛作出に向けた育種戦略、第 14 回動物遺伝育種シンポジウム、11 月、岡山

〔図書〕(計 1 件)

間 陽子: “インテグリンファミリー”、“HLA”、“エピトープ”、“MHC クラス I 抗原”、“MHC クラス II 抗原”、“MHC 拘束性”、“獲得抵抗性”、“蛍光顕微鏡”、“酵素免疫測定法”、“固層酵素抗体法”、“形質細胞”、“コンカナバリン A”、“組織適合性抗原”、“T 細胞胸腺外分化”、“T 細胞レセプター”、“同種免疫”、“非自己”、“LAK 細胞”、新明解 獣医学事典 (山根義久、土井邦夫監修)、チクサン出版社、2006

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

「ウシ乳房炎の発症抵抗性と感受性の判定方法」

発明者: (間 陽子、陳晶、竹嶋伸之輔)

権利者: 独立行政法人理化学研究所

特許 特願 2006-126559 2006/4/28 国内