

平成23年 4月26日現在

機関番号：15301
研究種目：基盤研究（A）
研究期間：2008～2010
課題番号：20248029
研究課題名（和文）黒毛和種牛の遺伝的改良を目的とした遺伝性疾患原因遺伝子の解明と機能解析
研究課題名（英文）Genetic investigation of the genes responsible for hereditary disorders of Japanese Black cattle and its functional analysis

研究代表者
国枝 哲夫（KUNIEDA TETSUO）
岡山大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号：80178011

研究成果の概要（和文）：本研究では黒毛和種に発生している遺伝性疾患の原因遺伝子を同定し、遺伝子診断法を確立することを試みた。その結果、前肢帯筋異常症では、GFRA1 遺伝子における突然変異が原因であることが明らかになり、PCR-RFLP 法による遺伝子診断法を確立した。下顎短小・腎低形成症を含む他の遺伝性疾患についても、発症個体のサンプリングと連鎖解析を行った。その結果、下顎短小・腎低形成症については原因遺伝子の染色体上の位置が特定され、今後、遺伝子診断法の確立が可能となると期待された。

研究成果の概要（英文）：We have attempted to identify the gene responsible for hereditary disorders of Japanese Black cattle and develop the genetic diagnosis systems to detect the mutations. Consequently, we have revealed that a nonsense mutation of the GFRA1 gene is responsible for forelimb-girdle muscular anomaly and developed the genetic diagnosis systems for this disorder by PCR-RFLP method. For other disorders including short mandible and renal agenesis, we have collected samples of affected animals and performed linkage analysis using these samples. As a result, the locus for short mandible and renal agenesis was mapped on a particular region of bovine chromosome. These finding can be used to develop genetic diagnosis system for this disorder.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	16,900,000	5,070,000	21,970,000
2009年度	11,600,000	3,480,000	15,080,000
2010年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
総計	36,700,000	11,010,000	47,710,000

研究分野：動物遺伝学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 応用動物科学

キーワード：育種、和牛、遺伝性疾患、遺伝子診断

1. 研究開始当初の背景
家畜の育種・改良では肉質などの生産形質を

向上させるだけでなく、疾患や繁殖障害などの生産性に負の影響を与える遺伝的な要因

を集団より除去することも重要な課題である。我が国の主要な肉用種である黒毛和種においては、これまでに多くの遺伝性疾患が発生し、家畜生産上大きな問題となっている。しかし、これらの遺伝性疾患では、その原因遺伝子を明らかにすることで遺伝子診断によるキャリアの同定が可能となり、疾患の発生を効果的に予防することが可能となる。したがって、今後の黒毛和種の育種改良のためには、個々の遺伝性疾患についてその原因となる遺伝子と突然変異を同定し、キャリア個体を同定するための遺伝子診断法を確立することが必要とされる。

2. 研究の目的

本研究は黒毛和種において高頻度で発生し、畜産業上も重大な影響を与えているいくつかの遺伝性疾患について、その原因遺伝子をポジショナルクローニング法により同定し、疾患の発生予防のための遺伝子診断法を確立することを目的とする。本研究の成果は疾患遺伝子の除去による黒毛和種集団の遺伝的改良に貢献するとともに、関連したヒト疾患の原因解明などにも貢献することが期待される。本研究では具体的には現在黒毛和種に発生している前肢帯筋異常症、下顎短小・腎低形成症および血液凝固異常症等の遺伝性疾患の原因遺伝子を同定し、その遺伝子診断法を確立するとともに、当該遺伝子の機能の解析を行うことを試みた。

3. 研究の方法

本研究では上記の黒毛和種の遺伝性疾患を対象として、それぞれ以下の研究方法により研究を実施する。

(1) 臨床獣医師、県の畜産関係者の協力により、当該遺伝性疾患の発症個体を含む家系から発症個体、キャリア個体、正常個体の血液、精液等のサンプリングを行い、それらのサンプルからDNAを抽出する。これらのDNAを用いて、ウシの全染色体を網羅するマイクロサテライトマーカーのタイピングを行い、そのデータを用いた連鎖解析により、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。特定された領域についてウシゲノム配列から当該領域に存在する遺伝子を特定する。

(2) 発症個体の病理学的な解析、および上記領域の遺伝子の発現解析により、発症に関わる可能性のある遺伝子を特定し、その遺伝子の発現部位等の機能を明らかにする。

(3) (1) および (2) の結果から疾患の原因となる可能性の高い候補遺伝子を特定し、その遺伝子についてPCR法により増幅し、発症個体と正常個体の間で塩基配列を比較することで疾患の原因となる変異を同定する。これらの方法で変異が同定されない場合

には、さらに当該領域の全塩基配列の解析をおこなうことで、疾患の原因となる遺伝子を同定する。

(4) 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法等を用いてその変異を正確かつ簡便に検出する方法を確立し、キャリア個体同定のための遺伝子診断法として現場へ応用する。

4. 研究成果

(1) 前肢帯筋異常症

黒毛和種牛に発生する前肢帯筋異常症は、常染色体劣性の遺伝様式をとり、発症個体では出生直後から起立困難や振戦が顕著であり、外観上は特徴的な肩甲部の著明な突出や耳介の下垂等が認められる。これらの発症個体では広背筋の形成に顕著な異常を呈し、重度のものでは広背筋が痕跡的にしか認められないものもある。本疾患は特定地域の基幹的な種雄牛の家系に集中して発生していることから、当該地域における変異遺伝子の遺伝子頻度は高いものと考えられる。

本研究ではまず、26個体の発症個体を含む本疾患の家系における全染色体を網羅したマイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析により、本疾患の原因遺伝子をウシ第26染色体の中央部の領域に存在することが明らかとした。また、キャリア種雄牛の全ゲノム配列から当該領域に存在する一塩基多型 (SNPs) およびマイクロサテライトDNAも明らかとした。そこで、次にこれらのSNPおよびマイクロサテライトマーカーを用いて疾患原因遺伝子の存在する領域をさらに狭めることで原因遺伝子の特定を試みた。その結果、本疾患の原因遺伝子の存在

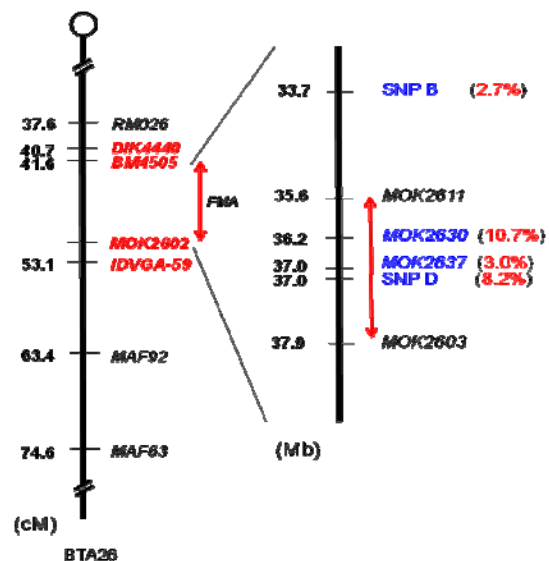


図1. 前肢帯筋異常症原因遺伝子 (FMA) のウシ第26染色体上での位置

する領域は第26染色体の近位端より35.6Mbから37.9Mbの約2.3Mbの領域に存在することが判明した(図1)。この領域には18の機能的遺伝子が存在することから、そのうちのいずれかが本疾患の原因遺伝子であると考えられた。

つぎに、本疾患のキャリア個体の当該の約2.3Mbの領域の全ゲノム配列を得て、その配列についてデータベース上の配列および多数の黒毛和種の正常個体の配列と比較し、疾患の原因となる変異である可能性のあるキャリア個体に特異的な変異を特定することを試みた。その結果、キャリア個体の当該領域には1,226個はキャリア個体に特異的な塩基置換であることが明らかとなった。さらにそのうちの4個は当該領域に存在する17個の機能的遺伝子のうちの4遺伝子のエクソンあるいはプロモーター領域に存在し、これら遺伝子の機能に関与していることが考えられた。すなわち、*GFRA1* 遺伝子の第4エクソンにおけるCからTへの置換、*VAX2* 遺伝子の第2エクソンにおけるGからAへの置換、*KCNK18* 遺伝子のプロモーター領域と予想される部位におけるGからAへの置換、機能的な遺伝子であることが予測されている配列である *LOC530353* のプロモーター領域と予想される部位におけるAからCへの置換である。したがって、これらの変異のいずれかが前肢帯筋異常症の原因となる変異である可能性が高いものと考えられ、これらの変異を検出するPCR-RFLP法により、本疾患の家系における発症個体、キャリア、正常個体、および本疾患とは関係のない黒毛和種の他の集団の個体のスクリーニングを行った。その結果、上記の塩基置換のうち *VAX2*、*KCNK18*、*LOC530353* の3遺伝子における塩基置換は発症個体およびキャリアに特異的ではなく、一般の黒毛和種の集団中にも一定の頻度で検出されたことから、黒毛和種の集団に一般に存在する多型であり、本疾患の原因となる変異ではないものと考えられた。一方、*GFRA1* 遺伝子の塩基置換は上記の家系の中で発症個体およびキャリアにのみ検出され、正常個体では検出されな

GFRA1

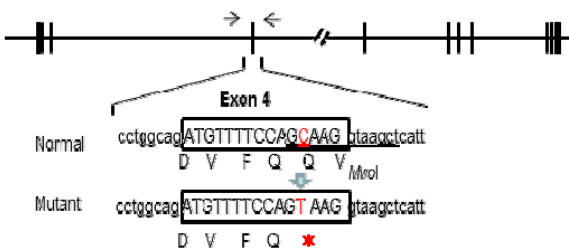
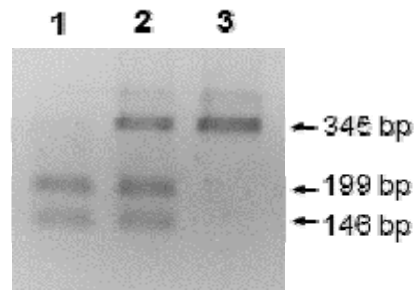


図2 *GFRA1* 遺伝子の第4エクソンに同定されたナンセンス変異を引き起こす塩基置換



1. Normal, 2. Carrier, 3. Affected

図3 *GFRA1* 遺伝子の突然変異を検出する制限酵素 *MwoI* を用いたPCR-RFLP法

かった。さらに一般の黒毛和種の集団中にはこの塩基置換は検出されず、本塩基置換は発症個体およびキャリアに特異的であることが明らかとなった(図2)。以上のことから、*GFRA1* 遺伝子の第4エクソンにおけるCからTへの塩基置換が、前肢帯筋異常症の原因となる変異であると考えられた。なお、この *GFRA1* 遺伝子の第4エクソンにおけるCからTへの置換は、制限酵素 *MwoI* を用いたPCR-RFLP法により遺伝子型の判別が可能であり、この方法を用いてキャリア個体の同定が可能となった(図3)。

GFRA1 (GDNF family receptor alpha 1) 遺伝子は運動ニューロンを中心とする神経細胞の成長と分化に関わる成長因子であるGDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) の受容体の遺伝子であり、癌遺伝子RETと協調してGDNFのシグナルを細胞内に伝達する機能を持ち、神経細胞の成長と分化に重要な役割を果たすことが知られている。発症個体において同定されたGからAへの塩基置換は第144番目のコドン(グルタミン)から終止コドン(ナンセンス)に変異であり(図2)、本遺伝子の機能に大きな影響を与える変異であると考えられるが、一方、*GFRA1* 遺伝子では、選択的スプライシングによりこの塩基置換が存在する第4エクソンを含まないmRNAも存在することがヒトにおいて報告されていることから、このエクソンにおけるナンセンス変異は、遺伝子の機能を完全に欠損させるものではなく部分的機能欠損のみを引き起こしていることも推測される。本疾患は広背筋の形成不全を主な特徴とするが、一方で振戦や起立不能などの神経系の異常に起因すると考えられる顕著な症状も呈している。また、筋の形成異常が筋組織へのニューロンの分布の不全に起因する二次的な異常である可能性も考えられ、*GFRA1* 遺伝子におけるナンセンス変異が広背筋の形成異常や振戦などの本疾患の症状を引き起こしている可能性が考えられる。

以上のことから、*GFR1* 遺伝子の第4エクソンにおけるCからTへの塩基置換が黒毛和種における前肢帯筋異常症の原因となる突然変異であり、本変異を検出する *Mwol* を用いた PCR-RFLP 法は本疾患のキャリア個体を同定するために遺伝子診断法と有用であると結論づけられた。今後、この遺伝子診断法を用いてキャリア個体を同定することで本疾患の発生の予防と集団中からの疾患原因遺伝子の除去が可能となるものと思われる。

(2) 下顎短小・腎低形成症

黒毛和種牛における下顎短小・腎低形成症は、東北地方で発生が報告されている常染色体劣性の遺伝性疾患である。本疾患の発症個体は、出生時に下顎が正常牛より3~7cm短く、腎臓の重度の低形成を呈する。そして、発症個体の多くは死産または出生後の腎機能不全により死亡することから、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。そこで本研究では、本疾患の原因遺伝子を同定することを目的として、連鎖解析により原因となる遺伝子座の染色体上の位置を特定することを試みた。

まず、これまでの全染色体を網羅した連鎖解析のデータを再検討し、強く連鎖をしている可能性のある染色体及び領域の探索を行ったところウシの特定の染色体上に連鎖している可能性が示されたため、その領域において、新たにマイクロサテライトマーカー用プライマーを作成し、それらを用いたタイピングにより原因遺伝子の詳細な染色体マッピングを行った。その結果、ウシの染色体の約2.3Mbの領域に、本疾患の原因遺伝子が存在する可能性が示された。この領域内には、ヒトやマウスにおいて腎臓の形成異常の原因となる遺伝子や腎臓での発現が確認されている遺伝子が含まれており、これらの遺伝子が候補遺伝子として考えられた。今後、これらの遺伝子の塩基配列を解析することで本疾患の原因となる遺伝子を同定し、キャリア個体同定のための遺伝子診断法は確立されることが期待される。

(3) その他の遺伝性疾患

上記の前肢帯筋異常症、下顎短小・腎低形成症以外にも、本研究では黒毛和種に発生する骨過形成、血液凝固異常症についても原因遺伝子の同定と遺伝子診断法の確立に向けた研究に取り組んだ。いずれも臨床獣医師との連携により、連鎖解析による遺伝子の同定、あるいは病理的、生化学的な解析に候補遺伝子の特定を試みたが、必ずしも十分な数の症例が得られていないことから、今後、継

続した発症個体のサンプリングと解析が必要と考えられた。

(4) まとめ

以上、本研究では、前肢帯筋異常症の原因遺伝子を明らかとし、遺伝子診断法を確立するとともに、下顎短小・腎低形成症については原因遺伝子の染色体上の位置を明らかとした。これらの結果は以下の点で重要な意義を持つものと考えられる。

① 疾患の発生の予防：

多くの劣性遺伝性疾患では、見かけ上正常なキャリア個体を同定することが疾患の発生予防のために不可欠であり、キャリア同定のための最も効果的な方法は直接の変異を検出する遺伝子診断法である。したがって本研究の成果は遺伝性疾患の発生を予防し、経済的損失を避けるために大きく貢献することが期待される。

② 黒毛和種集団の育種：

従来、家畜の育種では生産形質を改良することに重点が置かれているが、一方で遺伝性疾患等の経済的損失を引き起こす遺伝的要因を、集団から将来にわたって除去することも重要な課題である。したがって、本研究の成果は黒毛和種の集団中に拡散している遺伝性疾患の原因遺伝子を除去する方法を確立することで、黒毛和種の遺伝的改良に貢献するものである。

③ ヒト疾患の原因と遺伝子機能の解明：

家畜の遺伝性疾患の研究は類似した病態を示すヒトの疾患の原因を解明する上でも重要となる。例えば前肢帯筋異常症と病態がきわめて類似するヒト疾患であるLGMDの原因遺伝子はまだ明らかとされていないが、本研究の成果によりその原因遺伝子が解明されることも期待される。さらに、本研究により同定された疾患に関わる遺伝子の生理機能をノックアウトマウス等を用いて解析することにより、疾患発生に関わるこれらの遺伝子の新たな分子機構が解明されることも期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計22件)

- ① Linkage mapping of the locus responsible for forelimb-girdle muscular anomaly of Japanese Black cattle on bovine chromosome 26. Masoudi, A. A., Uchida, K., Yokouchi, K., Ohwada, K., Abbasi, A.R., Tsuji, T., Watanabe, T., Hirano, T., Sugimoto, Y., and Kunieda, T. *Anim Genet* 39:46-50. 2008
- ② Clinical and Pathological Aspects of Hemophilia A in Japanese Brown Cattle.

- Moritomo, Y., Shimojo, K., Miyadera, K., Khalaj, M., Asano, Kunieda, T., Ogawa, H. *J Vet Med Sci.* **70**, 293-296, 2008
- ③ Pedigree Analysis of Factor XI Deficiency in Japanese Black Cattle. Ohba, Y., Yakasu, M., Nishii, N., Takeda, E., Maeda, S., Kunieda, T., Kitagawa, H. *J Vet Med Sci.* **70**, 297-299, 2008
- ④ A mutation of the WFDC1 gene is responsible for multiple ocular defects in cattle Abbasi AR, Khalaj M, Tsuji T, Tanahara M., Uchida K., Sugimoto Y, Kunieda T. *Genomics* 94:55-62. 2009
- ⑤ A missense mutation (p.Leu2153His) of the factor VIII gene causes cattle haemophilia A. Khalaj M, Abbasi AR, Shimojo K, Moritomo Y. Yoneda K, Kunieda T. *Anim Genet.* **40**, 763-765. 2009
- ⑥ Exclusion of NEU1 and PPGB from candidate genes for a lysosomal storage disease in Japanese Black cattle. Masoudi, A.A., Yamato, O., Yoneda, K., Tsuji, T., Mikami, O., Kunieda, T. *Anim Sci J* **80**, 611-615. 2009
- ⑦ 見島牛における遺伝性疾患、毛色、経済形質に関わる遺伝子座の対立遺伝子の分布 米田一裕、渡辺望、国枝哲夫 動物遺伝育種学研究 **38**, 13-19, 2010.

[学会発表] (計 24 件)

- ① ウシ疾病関連遺伝子、抗病性関連遺伝子の多様性解析 金田 真、笹崎晋史、国枝哲夫、万年英之 日本畜産学会第 11 1 回大会 (沖縄 2009. 9. 28-29)
- ② 見島牛における和牛の諸形質に関連する遺伝子変異の解析 渡辺 望、辻 岳人、国枝哲夫 日本動物遺伝育種学会第 10 回大会 (前橋 2009. 11. 9-10)
- ③ 黒毛和種における血液凝固第 XI 因子欠乏症 小林直彦、松橋珠子、坂口 慎一、加藤 勉、国枝哲夫 日本動物遺伝育種学会第 10 回大会 (前橋 2009. 11. 9-10)
- ④ 褐毛和種にみられた血液凝固不全症 (血友病 A) における F8 遺伝子の変異 Khalaj Maryam、下城研一、宮寺恵子、Abdol Rahim Abbasi、米田一裕、小川博之、森友靖生、国枝哲夫 日本動物遺伝育種学会第 10 回大会 (前橋 2009. 11. 9-10)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

国枝 哲夫 (KUNIEDA TETSUO)
岡山大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号：80178011

(2) 研究分担者

辻 岳人 (TSUJI TAKEHITO)
岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授
研究者番号：90314682

(3) 連携研究者

内田和幸 (UCHIDA KAZUYUKI)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号：10223554
森友靖生 (MORITOMO YASUO)
東海大学・農学部・教授
研究者番号：70148972
大和 修 (YAMATO OSAMU)
鹿児島大学・農学部・教授
研究者番号：80261337
渡辺大作 (WATANABE DAISAKU)
北里大学・獣医学部・准教授
研究者番号：10406859