

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 12 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380166

研究課題名(和文) 和牛の遺伝的改良を目的とした血液凝固第XI因子欠乏症の生産性に与える影響の解明

研究課題名(英文) Investigation for effects of blood coagulation factor XI deficiency on productivity to the genetic improvement of Japanese beef cattle

研究代表者

国枝 哲夫(KUNIEDA, Tetsuo)

岡山大学・その他の研究科・教授

研究者番号：80178011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円、(間接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：血液凝固第XI因子欠乏症は黒毛和種牛に見られる出血性の遺伝性疾患である。本疾患の出血傾向自体は軽微であるが、その遺伝子頻度はきわめて高く、もし本疾患が肉牛の生産性に影響を与えるなら、経済的損失は多大となる。そこで本研究では、第XI因子欠乏症と異常産や肉の形質との関連について大規模な調査を行った。その結果、第XI因子欠乏症では流産等の異常産の発生頻度が高い傾向があるが、新生仔の異常やの瑕疵等の枝肉形質には顕著な影響は与えないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Blood coagulation factor XI deficiency is a hereditary disorder observed in Japanese Black cattle. While the clinical condition of this disorder is mild, the economical impact of this disorder is apprehended to be serious because of the remarkably high allelic frequency of the mutant allele in the population of Japanese Black cattle. We, therefore, investigated the effect of the factor XI deficiency on defects in pregnancy and delivery and carcass traits using large samples of Japanese Black cattle. As a result, we found that affected animals of factor XI deficiency have a tendencies for increased frequencies of abortion and stillborn, but no effect on the condition of calf and carcass traits. These findings will be useful to future breeding of Japanese Black cattle.

研究分野：農学

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 遺伝性疾患 和牛 血液凝固異常症

1. 研究開始当初の背景

疾患や繁殖障害など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は、家畜の育種にとって重要な課題である。研究代表者らは、この目的のために和牛の遺伝性疾患の原因遺伝子の同定と遺伝子検査法の確立に取り組み、多くの遺伝性疾患の原因遺伝子を同定し、検査法も確立している。現在、これらは和牛の育種上の不可欠な検査として実施され、これら疾患の発生頻度は劇的に減少している。しかし、唯一の例外は血液凝固第 XI 因子欠乏症であり、この疾患では多くの発症個体が集団中に存在するにも関わらず、下記の理由から育種上の有効な処置をとることができず、今後の深刻な問題となることが危惧されている。

第 XI 因子欠乏症は出血性の遺伝性疾患であり、その原因となる第 XI 因子 (F11) 遺伝子の突然変異も同定されているが、本疾患における出血傾向は軽微であると考えられている。しかし、本疾患の集団中における遺伝子頻度はきわめて高く、黒毛和種全体の 10% 近くが第 XI 因子欠乏症を呈していることが推測されている。したがって、本疾患が生産性に何らかの影響を与えるようであれば、和牛生産に与える経済的損失はきわめて大きいことが危惧されている。特に、凝固系は血管新生とも深く関わることから、胎仔の発生異常を引き起こす可能性がある。一方で、このように遺伝子頻度が高い遺伝子の集団からの除去には、遺伝的多様性の減少や、連鎖する経済形質に関わる優良遺伝子の消失等のリスクが伴うことから、除去に対するリスクと利益の関係の正確な評価ができず、本疾患に対する育種上の対応が決定できないのが現状である。

2. 研究の目的

そこで、第 XI 因子欠乏症が胎仔の発生や生殖機能あるいは、枝肉形質等の経済形質に

与える影響を正確に明らかにし、その総合的評価の上で本疾患に対する育種上の対応を決定することは、和牛の遺伝的改良においてきわめて重要な課題である。

したがって、本研究は、黒毛和種集団における第 XI 因子欠乏症が、繁殖異常や枝肉形質に与える影響について大規模な調査を行うとともに、第 XI 因子欠乏症の和牛生産形質に与える影響の総合的評価を行うことで、本疾患が和牛の生産に与える影響を総合的に明らかにすることを目的として行われた。

3. 研究の方法

(1) 第 XI 因子欠乏症と異常産との関連に関する大規模調査

臨床獣医師、大規模牧場等の関係機関の協力により、流産、死産等の異常産を呈した雌牛の血液サンプルを収集した。特に、出産回数の多い高齢の雌牛において複数回の異常産歴がある個体についてサンプリングを行った。これらのサンプルより DNA を抽出し、PCR 法により第 XI 因子欠乏症の原因となる F11 遺伝子における 15 塩基の挿入を検出することで、F11 の遺伝子型を決定した。得られた F11 の遺伝子型と、流産、死産等の発生頻度の関連を調べることで、第 XI 因子の欠損が、異常産や繁殖異常に関与しているか否かを明らかとすることを試みた。

(2) 第 XI 因子欠乏症と枝肉形質の関連に関する調査

各県の畜産関係機関の協力により、食肉市場より枝肉のサンプルを大規模に収集し、DNA を抽出するとともに、枝肉重量などの枝肉形質に関するデータを収集した。また、牛トレーサビリティ制度により全国的に収集された牛肉のサンプルより DNA を得るとともに、血液凝固異常と関わる可能性のある肉の瑕疵として筋肉内点状出血に関するデータを収集した。これらのサンプルについて

F11 の遺伝子型を決定し、上記の枝肉形質関連するデータとの関連を調べることで、第 XI 因子の欠損が、各種枝肉形質に関連しているか否か、また筋肉内点状出血に関連しているか否かを明らかとすることを試みた。

(3) 第 XI 因子欠乏症と新生仔異常との関連に関する調査

これまでに、黒毛和種に多発する仔牛虚弱症候群などの新生仔異常が第 XI 因子欠乏症と関連していること、特に母子ともに第 XI 因子欠乏症である場合に新生仔異常と関連する可能性が指摘されていることから、各県より新生仔異常を呈した仔牛およびその母牛の血液サンプルを収集するとともに、正常な仔牛とその母親の血液サンプルについても大規模な収集を行った。これらのサンプルについて F11 の遺伝子型を決定し、新生仔の異常、特に母子とも第 XI 因子欠乏症であった場合との関連を調べることで、第 XI 因子の欠損が、新生仔の異常の発生に関連しているか否かを明らかとすることを試みた。

(4) 第 XI 因子欠乏症変異遺伝子の由来に関する調査

これまでに、黒毛和種における第 XI 因子欠乏症の変異遺伝子と同じ変異は褐毛和種にも存在することが明らかにされ、この変異遺伝子の由来については種々の可能性が考えられていた。そこで、日本の在来牛の影響を強く残している口之島牛、見島牛のサンプルについて、F11 の遺伝子型を決定することで、これら品種に黒毛和種と同じ F11 変異型遺伝子が存在するか否かについて調べた。

(5) 第 XI 因子欠乏症変異遺伝子の遺伝子型の新たな判定法の確立

これまで第 XI 因子欠乏症変異遺伝子の遺伝子型判定は、F11 遺伝子における 15 塩基の挿入を挟む領域を PCR 法により増幅し、電気泳動により増幅断片の長さの違いを検

出することで行われてきた。しかし、この方法では、多量のサンプルを用いた大規模なスクリーニングには困難がともなった。そこで、簡便に大規模サンプルの解析が可能な、新たな F11 遺伝子型の判別法を開発すること試みた。具体的には PCR 産物の融解曲線を得ることで F11 遺伝子の増幅配列中の 15 塩基の挿入の有無を検出することを試みた。

4. 研究成果 研究成果

(1) 第 XI 因子欠乏症と流産、死産等の異常産との関連に関する調査

全国より収集した、流産、死産等の異常産を呈した雌牛のサンプルについて、F11 の遺伝子型を調べたところ、地域集団によっては有意な関連が認められない場合もあったが、いくつかの地域集団では、F11 の遺伝子型が変異型のホモである個体において有意に異常産の頻度が高いことが明らかとなった。したがって、黒毛和種の集団において第 XI 因子欠乏症は、実際に異常産や繁殖異常に関連していることが強く示唆された。これらの成果はすでに論文として公表されている(緒方ら、2013年)。

(2) 第 XI 因子欠乏症と枝肉形質の関連に関する調査

各県の食肉市場において屠畜された黒毛和種の枝肉より収集した千数百のサンプルについて F11 の遺伝子型を調べ、これら枝肉重量、ロース芯面積、皮下脂肪厚などの枝肉形質に関するデータとの関連を調べたところ、いずれの形質についても F11 の遺伝子型と有意な関連は認められなかった。したがって、F11 の変異遺伝子はこれらの形質に影響を与えることはないことが明らかになった。特に F11 の変異遺伝子はこれらの枝肉形質に正の効果を持つこともないことから、黒毛和種の集団において、F11 の変異遺伝子

を排除したとしても、黒毛和種集団における枝肉形質には影響を与える可能性は少ないことが明らかとなった(Nishimaki et al., 投稿準備中)。また、F11 の遺伝子の変異が屠殺時の筋肉内点状出血を引き起こす可能性について、牛トレーサビリティ制度により収集されたサンプルのうち、生産者の同意を得られた一部のサンプルを用いて F11 の遺伝子型を調べ、筋肉内点状出血の記録と比較した。その結果、F11 の遺伝子型と筋肉内点状出血の間に有意な関連は認められなかった。しかし、牛トレーサビリティサンプルのうち、今回利用可能となったものはごく一部であり、今後、サンプル数を増やして解析することが必要と考えられた。

(3) 第 XI 因子欠乏症と新生仔異常との関連に関する調査

近年、黒毛和種の集団に仔牛虚弱症候群といわれる新生仔における、成長不良等の異常を呈する疾患の発生例が数多く報告されている。そこで、新生仔異常を呈した仔牛およびその母牛の血液サンプルを各県より収集し、これらサンプルについて F11 の遺伝子型を調べ、新生仔異常との関連を調べた。その結果、母親または仔牛の F11 の遺伝子型と新生仔異常との間に有意な関連は認められなかったが、新生仔異常を呈する個体では、母子ともに第 XI 因子欠乏症を呈している例が多く認められた。そこで、母子と第 XI 因子欠乏症である場合に新生仔異常の発生頻度が高くなる可能性があるかを明らかにするために、正常な仔牛とその母親の血液サンプルについても大規模な収集を行った。現在、約 800 組の母子の血液サンプルを収集し、F11 の遺伝子型の解析を継続中である。

(4) 第 XI 因子欠乏症変異遺伝子の由来に関する調査

これまでに黒毛和種の集団中での F11 の

変異遺伝子の頻度は、0.2 - 03 ときわめて高いことが報告されている。したがって、このように高い頻度で存在する F11 変異遺伝子が、黒毛和種の品種成立の過程で関わった牛のどの品種あるいは集団に由来しているかを明らかにすることは、今後の肉用牛の育種においても重要な知見となる。これまでに F11 変異遺伝子は褐毛和種の集団にも存在することが明らかにされている。そこで、日本の在来牛の影響を強く残している鹿児島県口之島に野生化牛として生息する口之島牛、山口県見島で閉鎖集団として維持されている見島牛のサンプルについて、F11 の遺伝子型を調べた。その結果、これら品種に黒毛和種と同じ F11 変異型遺伝子は存在しないことが明らかになった。したがって、F11 変異型遺伝子は黒毛和種成立の基となった日本の在来牛に由来するのではなく、黒毛和種の成立の過程で、明治以降に日本の在来牛と交配された海外品種に由来している可能性が示唆された(斯琴図雅ら、投稿中)。

(5) 第 XI 因子欠乏症変異遺伝子の遺伝子型の新たな判定法の確立

第 XI 因子欠乏症の大規模スクリーニングでは、数千のサンプルを用いて F11 遺伝子の遺伝子型を判別し、各種形質との関連を調べることが必要であり、そのためには従来の方法に比べて簡便で自動化された遺伝子型の判定法が必要とされる。また、今後の黒毛和種の育種において F11 変異遺伝子を集団から排除するためにも大規模サンプルの迅速な遺伝子型判定が必要とされる。そこで、これまでの F11 遺伝子を PCR 法により増幅し、電気泳動により増幅断片の長さの違いを検出する方法に替えて、リアルタイム PCR 法により PCR 産物の融解曲線を測定し、この融解曲線の違いにより遺伝子型を判別する方法の開発を試みた。この方法では、電気泳

動を行うことを必要とされず、PCR 反応後自動的に遺伝子型が判定されることから、短時間で多量のサンプルの解析が可能となる。

以上、本研究では、血液凝固第XI因子欠乏症発症個体では流産等の発生頻度が高いが、新生仔死と間には顕著な関連はないこと、第XI因子欠乏症は黒毛和種の筋肉内点状出血および、その他の枝肉形質に顕著な影響を与えないこと、母子がともに第XI因子欠乏症である場合には新生仔異常となる可能性があることを明らかにし、F11変異遺伝子は黒毛和種の成立の過程で交配された海外の品種に由来している可能性を明らかにするとともに、新たなF11遺伝子の検出法を確立している。さらに現在、第XI因子欠乏症を含む肉牛における特定の遺伝性疾患が発生することにより生じる生産者の経済的損失等のリスクと、これらの遺伝性疾患の発生を予防することにかかるコストを算出し、それらのリスクとコストを考慮した遺伝性疾患が肉牛生産に与える経済的影響に関するシミュレーション法の確立を試みている。本研究により得られた第XI因子欠乏症と黒毛和種の各種形質との関連に関するデータについてこのシミュレーション法を用いて解析することで、第XI因子欠乏症が肉牛生産に与える経済的影響について総合的に評価し、本疾患に対する今後の育種上の対応を決定することが可能となると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 16 件)

黒毛和種牛における内因系凝固異常と胎子死の関連性 緒方良彦, 斯琴図雅, 森友靖生, 大場恵典, 国枝哲夫, 北川均 日本獣医師会雑誌, 67 (1) 54-58., 2014.

The assessment of genetic diversity within and among the eight subpopulations of Japanese Black cattle using 52 microsatellite markers. Nishimaki, T., Ibi, T. (2 番目), Kunieda, T.

(19 番目) 19 名 Anim. Sci. J.84(8):585-591. 2013

Genetic Relationship of Body Measurement Traits at Early Age with Carcass Traits in Japanese Black Cattle. Munim, T., Oikawa, T., Ibi, T., Kunieda, T. Anim. Sci. J. 84:206-212. 2013.

Genetic Variability of Maternal Effect on Body Measurements and its Intra- and Inter- Genetic Relationship with Direct Effect in Japanese Black Calves, Munim, T., Oikawa, T., Ibi, T., Kunieda, T., Hoque, MA. Anim. Sci. J. 83, 199-206, 2012

〔学会発表〕(計 13 件)

口之島牛における各種遺伝子の対立遺伝子頻度の調査 斯琴図雅、下桐 猛、印牧美佐生、大島一郎、片平清美、万年英之、国枝哲夫 日本動物遺伝育種学会第 14 回大会 (東京海洋大学 2013,10,12-13)

A mutation of the GFRA1 gene is responsible for forelimb-girdle muscular anomaly (FMA) of Japanese Black cattle Akiyama, K., Takashi Hirano, Ali Akbar Masoudi, Kazuyuki Uchida, Takehito Tsuji (6 番目), Tetsuo Kunieda (10 番目) 10 名. Plant and Animal genome conference XXI (San Diego, CA 2013.1.11-16)

黒毛和種における第XI因子欠乏症と異常産、新生仔死との関連 斯琴図雅、緒方良彦、森友靖生、三浦潔、西牧孝洋、揖斐隆之、国枝哲夫、日本動物遺伝育種学会第 13 大会 (仙台 2012.10.5-6)

黒毛和種における各地域集団の遺伝的多様性と類縁関係の解析 西牧孝洋、揖斐隆之(2 番目)、国枝哲夫(19 番目)

19名、日本動物遺伝育種学会第12回大会（東広島 2011.11.19-20）
黒毛和種牛に発生する前肢帯筋異常症の原因遺伝子の同定と遺伝子診断法の確立 秋山耕陽、辻岳人（6番目）国枝哲夫（10番目）10名、日本動物遺伝育種学会第12回大会（東広島 2011.11.19-20）

〔図書〕（計 1件）

国枝哲夫、他 獣医遺伝育種学（国枝哲夫、今川和彦、鈴木勝土編） 朝倉書店 2014

〔産業財産権〕

出願状況（計 1件）

名称：哺乳動物個体における前肢帯筋異常症を診断するためのマーカーおよびそれを用いた検出方法
発明者：国枝哲夫，平野貴
権利者：国立大学法人岡山大学
種類：特許
番号：特願 2011-253314
出願年月日：2011年11月18日
国内外の別： 国内

取得状況（計 1件）

名称：哺乳動物個体における前肢帯筋異常症を診断するためのマーカーおよびそれを用いた検出方法
発明者：国枝哲夫，平野貴
権利者：国立大学法人岡山大学
種類：特許
番号：特許第 05127004号
取得年月日：2012年11月9日
国内外の別： 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

国枝哲夫（KUNIEDA, Tetsuo）
岡山大学大学院環境生命科学研究科・教授
研究者番号：80178011

(2)研究分担者

辻 岳人（Tsuji, Takehito）
岡山大学大学院環境生命科学研究科・准教授
研究者番号：90314682
揖斐隆之（IBI, Takayuki）
岡山大学大学院環境生命科学研究科・准教授

研究者番号：70335305

(3)連携研究者

舟橋弘晃（FUNAHASHI, Hiroaki）
岡山大学大学院環境生命科学研究科・教授
研究者番号：50284089
アコスタ トマス（ACOSTA, Tomas）
岡山大学大学院環境生命科学研究科・准教授
研究者番号：80379718