

平成21年 6月25日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2008
課題番号：19580329
研究課題名 (和文) アジア広域における牛属プリオン遺伝子の分子および集団遺伝学的研究
研究課題名 (英文) Molecular and Population genetic studies on prion gene of cattle in Asia
研究代表者
前田 芳實 (MAEDA YOSHIKAZANE)
鹿児島大学・農学部・教授
研究者番号：50041661

研究成果の概要：

本研究は、日本及びアジアの在来牛について、プリオン遺伝子の多様性解析を行い、プリオン遺伝子頻度の各品種及び地域集団の特徴を分析した。また、プリオン遺伝子のハプロタイプ解析を行い、その集団間の違いと延髄におけるプリオン遺伝子の発現量の際について解析をおこなった。その結果、日本及びアジアの在来牛のプリオン遺伝子のDNA多型の頻度は集団間で異なり、延髄におけるプリオン遺伝子の発現量は品種間で異なることが判明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度			
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：畜産学

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：プリオン遺伝子、BSE、アジア在来牛、黒毛和種、褐毛和種

1. 研究開始当初の背景

2001年9月、我が国でも牛の狂牛病の発生が確認され、国内における牛の生産農家、飼料製造関連産業、食品流通産業界に甚大な影響が及んでいる。また、消費者の畜産食品に対する不安感が広がり、社会問題となりつつある。わが国でも、いち早くBSEの監視体制がとられ更なる発生の防止対策が採られている。2008年10月現在で、日本国内では35例目の個体が発見され、しかもこれまでの予想に反して、1歳6ヶ月という若齢牛に発生した。BSEの発生は国民の食の安全安心の面から、肉用牛の消費動向に大きな影

響を及ぼすことから、原因遺伝子であるプリオン遺伝子の構造と発現の面からの研究も進める必要がある。当研究室では、これまでに、アジア各地の在来牛および牛属のDNAサンプルを収集してきた。これらのDNAサンプルは、BSEを発症しない畜牛の育種に必要な情報を提供するものと思われる。

2. 研究の目的

本研究は、広域アジアにおける在来牛及び近縁家畜牛のプリオン遺伝子に関する分子及び集団遺伝学的研究を展開し、プリオン遺伝子から見た広域アジアの在来牛の遺伝的特性を明らかにし、さらにプリオン遺伝子情

報から、BSE非感染牛作出のための基礎的分子情報を導き出す。

1) 構造領域ならびにプロモーター領域の変異性やRFLPを解析し、種々の牛品種やアジア広域の在来牛及び近縁家畜牛集団のプリオン遺伝子の構造の多様性を解析する。遺伝子頻度を計算し、プリオン遺伝子からアジア全域の牛の類縁関係を明らかにする。

2) 6か所のSNPに基づき、黒毛和種、褐毛和種、ホルスタイン種集団のハプロタイプ解析を行う。3) ハプロタイプとPrp遺伝子発現量との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

材料には、日本における黒毛和種、褐毛和種、ホルスタイン及び7カ国のアジア在来牛のDNAを用いた。集団の遺伝子頻度及びハプロタイプ解析には、①Promoter領域の12bp挿入欠失の多型、②8ペプチド反復、③ORF領域のSNP、④Intron 1の12bp挿入欠失の多型、⑤3' UTRの14bp挿入欠失を用いた。プリオン遺伝子の発現量は延髄組織を採取し、リアルタイムPCR法で定量した。延髄は特定危険部位であるために、サンプル採取に当たっては鹿児島県及び熊本県知事の許可を得て実施された。

遺伝子発現量に及ぼす要因は、下記の数学モデルにより、SASプログラムで分析した。

数学モデル

$$X_{ijkl} = (\text{breed})_i + (\text{phenotype})_j + (\text{age})_k + (\text{breed}) \times (\text{Phenotype}) \times (\text{age}) + (\text{breed}) \times ((\text{phenotype})_{ij} + (\text{phenotype}) \times (\text{age})_{jk} + (\text{breed}) \times (\text{age})_{ik} + e_{ijkl})$$

4. 研究成果

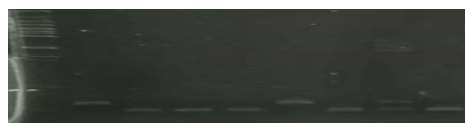
(1) prion 遺伝子の牛品種間の変異性

牛 prion 遺伝子内の分子多型 6 site (23-bp, 12-bp, 14-bp, Octa, K3T および S154N) について、ホルスタイン種、日本短角種、褐毛和種、見島牛およびロノ島野生化牛の集団を分析した (図 1)。6 site のうち、K3T および S154N の 2 つの site においては、すべての品種において monomorphic であった。品種間でみると、ロノ島野生化牛はすべての site で monomorphic を示した。ホルスタイン種、日本短角種及び褐毛和種では、4 つの site で多型性を示した。

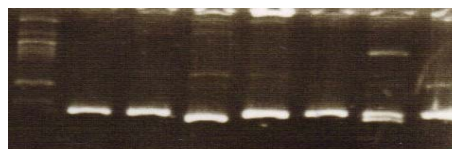
(2) ハプロタイプからみた集団解析

Prion 遺伝子の多型を示した 4 site の組み合わせによるハプロタイプは 12 種類が予測され、このうち、ハプロタイプ型 23-12-K5S14+ の出現が見られなかった。最も多いハプロタイプ型が出現した品種はホルスタイン種で、次いで褐毛和種であった。ロノ島野生化牛はすべての個体が 23-12-K6S14+ タイプを示した。

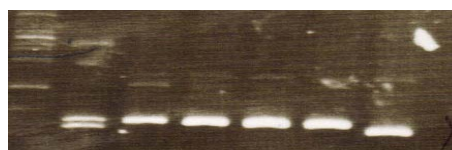
(a) 23-bp indel



(b) 12-bp indel



(c) Octapeptide repeat alleles



(d) K3T lysine to threonine



(e) S154N Serine to asparagine



(f) 14-bp indel (Hills et al. 2001)



図 1 牛 prion 遺伝子 6 site の遺伝的多様性

表 1 Promoter 23bp-indel の遺伝子頻度

breed	n	+	-
Japanese Holstain	65	0.45	0.55
Japanese short horn	1	0.50	0.50
Japanese Brown	58	0.29	0.71
Mishima	2	0.00	1.00
Kuchinoshima	52	0.00	1.00

表2 Intron 12bp-indel の遺伝子頻度

breed	n	+	-
Japanese Holstain	65	0.58	0.42
Japanese short horn	1	0.50	0.50
Japanese Brown	58	0.33	0.67
Mishima	2	0.50	0.50
Kuchinoshima	52	0.00	1.00

表3 3'UTR 14bp-indel の遺伝子頻度

breed	n	+	-
Japanese Holstain	65	0.79	0.21
Japanese short horn	1	1.00	0.00
Japanese Brown	58	0.58	0.42
Mishima	2	0.50	0.50
Kuchinoshima	52	1.00	0.00

表4 Octarepeat unit の遺伝子頻度

breed	n	6	5
Japanese Holstain	65	0.94	0.05
Japanese short horn	1	1.00	0.00
Japanese Brown	58	1.00	0.00
Mishima	2	1.00	0.00
Kuchinoshima	52	1.00	0.00

表5 K3T 塩基置換の遺伝子頻度

breed	n	K	T
Japanese Holstain	65	1.00	0.00
Japanese short horn	1	1.00	0.00
Japanese Brown	58	1.00	0.00
Mishima	2	1.00	0.00
Kuchinoshima	52	1.00	0.00

表6 S154N 塩基置換の遺伝子頻度

breed	n	S	N
Japanese Holstain	65	1.00	0.00
Japanese short horn	1	1.00	0.00
Japanese Brown	58	1.00	0.00
Mishima	2	1.00	0.00
Kuchinoshima	52	1.00	0.00

(3) prion 遺伝子の発現量の分析

黒毛和種と褐毛和種の延髄を採取して、延髄における、prion 遺伝子の発現量について、性、月齢、diplotype 遺伝子型および品種間の違いについて解析した。その結果、prion 遺伝子の発現量は性、月齢、diplotype 型間では、有意差が見られなかった。しかし、品種間（黒毛和種：褐毛和種）では有意な差異が認められ、褐毛和種は黒毛和種に比べて prion 遺伝子の発現量が高かった（表7）。

表8 prion 遺伝子発現量の分散分析

SoV	df	SS	MS	F	Pr>F
Sex	1	0.0025	0.0025	0.73	0.3991

Age	2	0.0031	0.0015	0.46	0.6374
Diplotype	1	0.0153	0.0153	4.53*	0.0413
Breed	1	0.2178	0.2178	64.66**	<0.0001
G×B	1	0.0038	0.0038	1.13	0.2951

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 7 件）

- 1) George, M., Shimogiri, T., Okamoto, S., Kawabe, K., Minezawa, M., Namikawa, T. Maeda, Y. Gene and haplotypes polymorphisms of the prion gene (PRNP) in Japanese Brown, Japanese native and Holstain cattle. *Animal Science Journal*, (in press) 査読有
- 2) 金 鐘福、築城 努、高 鐘泰、下桐 猛、河邊弘太郎、岡本 新、橋口 勉、前田 芳實、鹿児島県における黒毛和種肥育牛の産肉成績の年次推移、*鹿大農学術報告* 59号、1-12, 2009. 査読無
- 3) Hla Hla Moe, T.Shimogiri, Kotaro, Kawabe, Shin Okamoto, Tsutomu Hashiguchi, Yoshizane Maeda. Genotypic frequency in Asian native chicken populations and gene expression using insukline-like growth factor 1 (*IGF1*) gene promoter polymorphism, *Japanese Poult. Sci.*, 46, 1-5 (2009). 査読有
- 4) 前田 芳實、アジアおよび西南日本の家畜遺伝資源、*熱帯農業*, 第1巻 26-31 (2008) 査読有
- 5) Kurachi, M., Ba-Loc Chau, Vu-Binh Dang, Tash Dorji, Yamamoto, Y., Maung Maung Nyunt, Maeda, Y., Loan Chhum-Phith, Namikawa, T. and Yamagata, T.. Population structure of wild Musk Shrews (*Suncus murinus*) in Asia Based on Mitochondrial DNA variation, with research in Cambodia and Bhutan. *Biochemical Genetics* Vol.45, Nos 3/4, 165-183, April 2007, 査

読有

研究者番号：40315403

- 6) H.H.Moe, Shimogiri, T., Okamoto, S.,
Minvielle F., Maeda, Y. Analysis of
polymorphisms in the inslin-like
growth factor 1 receptor(IGF1R) gene
from Japanese quail selected for body
weight. Animal Sci. 38, 659-661 (2007) .
査読有

(3) 連携研究者

- 7) Tanaka, K., Iwaki, Y., Takizawa, Y., ,
Murakami, T., Mannen, H., Maeda, Y.,
Kurosawa, Y., Vu-Binh, D., Phith
Chhum, L., Bouahom, B., Yamamoto, Y.,
Than Daing, Namikawa, T. The novel
polymorphism of the beta 3-adrenargic
receptor and its distribution in
domestic pigs and wild boars in Asia.
Animal Science Journal 78: 243-250
(2007) 査読有

[学会発表] (計 2件)

- 1) Si Lhyam Mint, 下桐 猛、河邊弘太郎、
岡本 新、前田芳實、日本在来鶏及び
アジア在来鶏の卵白タンパク質の集団遺
伝学的分析、第 59 回西日本畜産学会、
2008 年 10 月、佐賀市
- 2) 前田芳實 熱帯・亜熱帯の動物遺伝資源
—保存と活用、日本熱帯農業学会 2007
年 10 月宮崎市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 芳實 (MAEDA YOSHIKANE)
鹿児島大学・農学部・教授
研究者番号：50041661

(2) 研究分担者

岡本 新 (OKAMOTO SHIN)
鹿児島大学・農学部・教授
研究者番号：70158814

下桐 猛 (SHIMOGIRI TAKESHI)
鹿児島大学・農学部・助教