

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月18日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580388

研究課題名（和文）発育不良牛の原因遺伝子の解明および遺伝子診断法の確立

研究課題名（英文）The analysis of the cause gene in cattle with growth retardation and establishment of the gene diagnostic method

研究代表者

大場 恵典（OHBA YASUNORI）

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：20377691

研究成果の概要（和文）：

マイクロサテライト DNA マーカーを用いた解析から、本疾患の原因は一つの遺伝子に起因するのではなく、複数の遺伝子が関与することが示唆された。また、マイクロアレイ解析およびリアルタイム PCR の結果、脂質代謝、コレステロール代謝、ステロイド代謝に関連する遺伝子において、正常牛に比べて発育不良牛で2倍以上有意に発現量が上昇していた。この結果、発育不良の発症にはこれらの遺伝子が関わっていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：It was suggested by analysis using the microsatellite DNA marker that the cause gene of growth retardation in cattle was, not only one, plural genes. As a result of micro-array analysis and real-time PCR, genetic expression to be related to lipid metabolism, cholesterol metabolism, and steroid metabolism significantly rose more than double in cattle with growth retardation in comparison with a normal. It was suggested that growth retardation in cattle is related with these genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：牛・発育不良・遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 国内・国外の研究動向および位置づけ
遺伝性疾患における原因遺伝子の解明は国内・国外とも多数の研究者が従事しており、多くの遺伝性疾患の原因遺伝子が同定されつつある。牛においても多数の遺伝病が明らかとなっており、諸外国では30種以上、日本の黒毛和種では現在6種の遺伝病について原因遺伝子が同定されている。この研究の対

象となる発育不良の原因遺伝子が同定されれば、新規遺伝病となる。黒毛和種牛は国内のみで飼育されているため、黒毛和種牛の遺伝病の研究は、日本でのみ遂行することが可能な研究である。

(2) 着想に至った経緯

我々はこれまでに黒毛和種牛の遺伝性疾患であるクローディン-16 欠損症を解明した経

験がある。この遺伝性疾患は、常染色体性劣性の遺伝性疾患であり、一つの原因遺伝子が起因する遺伝病であった。発育不良の原因遺伝子が一つの場合、これまでの遺伝病研究の経験から、その探索は比較的容易であると考えられる。黒毛和種の発育不良の病態については、これまでの研究で、肝臓のエネルギー代謝が低下していることが明らかとなった。このため、肝臓のエネルギー代謝に関わる遺伝子に絞って検索すれば、黒毛和種牛の発育不良牛の原因を解明できる可能性が高い。肝臓などの臓器試料は既に集積されており、この研究が実施されれば、目的に到達する可能性が高い。

(3) 発展させる内容

原因遺伝子の同定方法として、大きく分けて、ファンクショナルクロニングとポジショナルクロニングの2つに分けられる。前者は病態を詳細に解析して疾患に関わる機能的遺伝子を列挙し、その候補遺伝子の検証から原因遺伝子を同定する。後者は病態の解析が進まず、候補となる機能的遺伝子が列挙できず、正常個体と疾患個体の遺伝子の比較から原因遺伝子の染色体上の位置を割り出し、その付近に位置する機能的遺伝子を検証して原因遺伝子を同定する。本疾患の場合、病態から関連する機能的遺伝子が列挙できないため、後者のポジショナルクロニング法を選択する。しかしながら、このポジショナルクロニング法は、一つの原因遺伝子に起因する場合にしか使えない。これまでに同定されている牛の遺伝病の場合、それらの原因遺伝子は一つの原因遺伝子だけに起因する遺伝病だけに限られていた。本研究の牛の発育不良の原因遺伝子は一つでなく、複数の遺伝子が関わっている可能性もある。そこで、従来通りのマイクロサテライトDNAマーカーを用いた連鎖解析を実施して原因遺伝子を検索する方法と、近年急速に発展しているマイクロアレイ法を用いた解析方法の2つの方法で原因遺伝子を検索・同定する。

2. 研究の目的

黒毛和種牛の発育不良の原因は、慢性的な肺炎や下痢、先天的な遺伝性疾患、飼育環境など様々である。我々が研究対象としている地域では、発育不良の発生が高く、産子の2-3%、一部の地域では5%にも及ぶため、農家は多大な経済的損失を被る。最近、この地域で頻用されている特定の種雄牛の産子に7%以上の高頻度で発育不良牛が発生していることが明らかとなった。特定家系に発育不良が頻発することから、先天的な遺伝性疾患が示唆された。そこで本研究は、黒毛和種牛の発育不良のうち、対象を特定の種雄牛の家系に発生する発育不良に絞り、遺伝子解析し、原

因遺伝子を同定することと、さらに遺伝子診断法を確立して、原因遺伝子の遺伝子頻度などを調査する疫学調査およびその後の発育不良牛の発症頻度を抑えるための繁殖計画に役立たせることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 原因遺伝子が存在する染色体を選抜

①疫学調査：発生状況・血統の調査、家系図の作成。

②遺伝様式の決定。

③血液および臓器（肝臓）の採材。

④核酸抽出。

⑤マイクロサテライトDNAマーカーを用いたタイピング：染色体上に存在する200以上のマイクロサテライトDNAマーカーを用いて、正常牛、発育不良牛の対立遺伝子をタイピングする。

⑥原因遺伝子とマイクロサテライトDNAマーカーとの連鎖解析：原因遺伝子と連鎖するマイクロサテライトDNAマーカーを検索する。連鎖解析にはロッドスコア、組換え率を計算する。

⑦原因遺伝子が存在する染色体の検索：ロッドスコアが高く、組換え率の少ないマイクロサテライトDNAマーカーが多く存在する染色体を選抜する。

(2) 原因遺伝子の染色体上のおよその位置を決定

①原因遺伝子のおよその位置を推定：選抜されたマイクロサテライトDNAマーカーについて、発育不良牛、その血縁牛、および正常牛のハプロタイプを用いた家系図を作成する。ホモ接合性マッピング法で原因遺伝子と近接するマイクロサテライトDNAマーカーを決定する。

②BAC クロームを用いた原因遺伝子付近の物理的地図の作成：原因遺伝子を含むクロームをBACライブラリーから検索する。原因遺伝子に近いと考えられるマイクロサテライトDNAマーカーを用いて、BACライブラリーをスクリーニングし、原因遺伝子を含むクロームを単離する。マイクロサテライトDNAマーカーを基準に単離されたクロームの位置関係を整理し、原因遺伝子を含んだ領域のBACコンティグマップを作製する。

(3) 原因遺伝子の同定

①原因遺伝子を含んだ領域の塩基配列の決定：原因遺伝子を含む単離されたすべてのBACクロームをシークエンスし、塩基配列を決定する。作製された原因遺伝子を含んだ領域のBACコンティグマップを利用し、BACクロームの塩基配列の結果を順番に整理して、原因遺伝子を含んだ領域の全塩基配列を決定する。

②候補遺伝子の検索：原因遺伝子を含んだ領域の全塩基配列の遺伝子情報をもとに、ヒト、マウスなどの染色体地図と相同性の高い染色体を検索する。BLASTなどを用い、GenBankから塩基配列およびアミノ酸配列のホモロジーの高い候補遺伝子を検索する。

③原因遺伝子および原因物質の同定：原因遺伝子を含む全領域の塩基配列決定と候補遺伝子検索結果および病態を検討し、原因遺伝子を同定する。原因遺伝子がコードする物質を特定する。

(4)マイクロアレイを用いた原因遺伝子の同定

①正常牛、発育不良牛をそれぞれ異なる蛍光色素でラベルし、ハイブリダイゼーションする。共通の遺伝子以外について解析し、およそ43,000の遺伝子から、正常牛と発育不良牛とで、各RNAの発現量を比較して、候補遺伝子を絞り込む。

②候補遺伝子をさらにリアルタイムPCR法を用いて検証し、候補遺伝子を絞り込む。

③絞り込んだ候補遺伝子の塩基配列について、cDNAを用いて1つずつ正常牛と発育不良牛との間で比較し、発育不良牛の塩基配列に変異があるか否か検証する。

④検証を解析し、本研究の牛の発育不良の原因遺伝子を同定する

(5)遺伝子診断法の確立と疫学調査

遺伝子診断法の確立：同定された原因遺伝子の遺伝情報をもとに簡便な遺伝子診断システムを確立する。

⑤診断法による疫学調査：確立された診断法を用いて、繁殖牛の保因状況の把握、遺伝子頻度および将来の発育不良牛の発生率を推測する。

4. 研究成果

(1)マイクロサテライトDNAマーカーを用いた原因遺伝子の解析

本疾患の原因遺伝子が存在する染色体を検索し、さらにその染色体上のどの付近に位置するかを確定するために、210の牛のマイクロサテライトDNAマーカーと、発育不良牛15頭、正常牛15頭の核酸を用いた。マイクロサテライトDNAマーカーと発育不良牛との間で連鎖解析して、ロッドスコアを算出した。牛の30本の染色体上のマイクロサテライトDNAマーカーごとに算出されたロッドスコアを検証したが、どのマイクロサテライトDNAマーカーのロッドスコアからも有意に高い数値は出ず、原因遺伝子が存在する染色体を検索するには至らなかった。この検索法は、本疾患が一つの原因遺伝子のみ起因する場合にしか検索できない。このため、発育不良には、複数の遺伝子が関わっている可能

性が示唆された。そこで、正常牛と発育不良牛との間の遺伝子発現の違いから、候補遺伝子を検索するマイクロアレイ法を用いた遺伝子解析を実施した。

(2)マイクロアレイを用いた原因遺伝子の解析

マイクロアレイ法を用いて、正常牛と発育不良牛との間の遺伝子発現量の違いを検討した。マイクロアレイについては、正常牛、発育不良牛をそれぞれ異なる蛍光色素でラベルする二色法を採用した。正常牛をCy3でラベルし、発育不良牛をCy5でラベルし、ハイブリダイゼーションした。共通の遺伝子以外について解析し、およそ43,000の遺伝子から、正常牛と発育不良牛とで、各RNAの発現量を比較して、候補遺伝子を絞り込んだ。その結果、正常牛に対して発育不良牛で2倍以上発現が減少していた遺伝子は954遺伝子あり、反対に正常牛に対して発育不良牛で2倍以上発現が上昇していた遺伝子は666遺伝子あった。

発育不良の病態については、これまでの研究で、肝臓のエネルギー代謝が低下していることが明らかとなっている。このため、肝臓のエネルギー代謝に関連する遺伝子をこれら遺伝子群から検索した結果、脂質代謝、コレステロール代謝、ステロイド代謝に関連する遺伝子が複数見つかった。これらの遺伝子は、肝臓のエネルギー代謝関連で絞り込む以前から、発現量が有意に高い遺伝子の上位にランキングされていた。これらの遺伝子は、どの遺伝子も、正常牛と比べて発育不良牛で2倍以上発現量が上昇しており、正常牛に対して有意差に高い遺伝子であった。それぞれの有意差のp値は、脂質代謝で $8E-05$ 、コレステロール代謝で $3E-05$ 、ステロイド代謝で $7E-06$ であった。この結果を別の方法で検証する目的で、これらの遺伝子群のうち、いくつかをリアルタイムPCR法にて遺伝子発現量を確認したところ、マイクロアレイ解析と同様に、正常牛に対して発育不良牛での発現量が多いという結果が示された。

(3)まとめ

これらの結果から、本疾患の原因は一つの遺伝子に起因するのではなく、複数の遺伝子が関与することが示唆された。また、本研究である牛の発育不良の発症には、脂質代謝、コレステロール代謝、ステロイド代謝の遺伝子が関わっていることが示唆された。

しかしながら、発育不良牛で、脂質代謝、コレステロール代謝、ステロイド代謝に関連する遺伝子の発現量が多いということは、これら遺伝子が直接的に発育不良を起こしている可能性と、いっぽうで、これら遺伝子が直接的に発育不良を起こしているのではなく、

これら遺伝子に関わる前後のステップに問題がある可能性も考えられる。この場合、正常牛に対して発育不良牛で2倍以上発現が減少していた954遺伝子についても、再考する必要がある。これらの遺伝子の有意差は全体的に低く、そのp値は、一番高い遺伝子で1E-05であった。また、肝臓のエネルギー代謝に関連する遺伝子は少なかった。

(4) 国内外における位置づけとインパクト
遺伝性疾患における原因遺伝子の解明は国内・国外とも研究が盛んであり、牛においても多数の遺伝病が明らかとなっている。これまでに解明された牛の遺伝病については、その原因遺伝子が一つに起因した遺伝病のみである。本研究の発育不良牛の原因遺伝子の同定については、研究結果から、複数の原因遺伝子が関わっている可能性が示唆された。今後、本研究で原因遺伝子が同定されれば、複数の原因遺伝子が関与する遺伝病としては、初めての報告となる。現在、解析途中ではあるが、候補遺伝子を絞り込む段階に至っている。

(5) 今後の展望

これまでの研究結果から、発育不良牛の原因遺伝子は複数である可能性が高い。現在、複数存在する候補遺伝子から、正常牛と発育不良牛との塩基配列の相違を確認し、原因遺伝子であるか否かの検証を進め、本遺伝性疾患に関わる遺伝子を決定する。また、前述したように、発育不良牛で、脂質代謝、コレステロール代謝、ステロイド代謝に関連する遺伝子の発現量が多いということは、それら遺伝子がそのまま原因遺伝子である場合と、それら遺伝子は原因遺伝子ではなく、それら遺伝子に関わる共通の前後のステップに問題があり、過剰にRNAが発現されている可能性も考えられる。このことも考慮し、脂質代謝、コレステロール代謝、ステロイド代謝に関わる候補遺伝子の前後の代謝経路についても十分に解析し、遺伝子との因果関係を検討する必要であると考えた。

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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大場 恵典 (OHBA YASUNORI)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号：20377691

(2) 研究分担者

北川 均 (KITAGAWA HITOSHI)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：70144003
高須 正規 (TAKASU MASAKI)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号：00503327