

論文の内容の要旨

論文題目 Development of a high-density bovine genetic map and linkage studies on hereditary diseases in Japanese Black cattle

(ウシ高密度連鎖地図の作製と和牛における遺伝性疾患の連鎖解析)

氏 名 井原 尚也

高品質な畜産物の供給には、育種選抜による経済形質の優れた個体の作出と遺伝的不良形質の制御が課題となる。従来の表現型値に基づいた個体選抜に比べ、分子生物学的手法に基づくマーカーアシスト選抜（MAS）は、経済形質や遺伝的不良形質の責任遺伝子や原因遺伝子、それらの遺伝子に連鎖した分子マーカーを同定し、それらを指標として個体選抜を行うため、選抜精度と遺伝的改良の加速が大いに期待されている。ウシでは、優れた個体を作成するために特定の個体が限られた集団内で交配に多用され、遺伝的不良形質の発生がしばしば深刻となっているが、分子生物学的手法による原因遺伝子の同定により、既にいくつかの遺伝性疾患例で MAS を用いた早期診断が行われている。しかし、経済形質など一部の形質については、未だそれらの責任遺伝子を対象とした MAS はほとんど行われていないのが現状である。その背景には、環境や複数の遺伝子の寄与という量的形質（QTL）本来の複雑な特性に加え、現在のウシゲノム地図情報の乏しさが根底にあり、精度の高い遺伝子マッピングや、比較地図を利用した候補遺伝子の同定に限界があるからである。これを解消するためには、遺伝子のマッピングに必要なゲノム地図の整備、詳細化が極めて重要となる。特に生物種間の比較ゲノム情報を付加できる物理地図の開発は急務であるが、何よりも連鎖地図上のマーカーの高密度化が優先すべき課題である。なぜなら連鎖地図上に正確に配置された高密度なマーカーの順序が物理地図の基本骨格となるからである。そこで本研究で

は、肉質などの経済形質や遺伝的不良形質の責任遺伝子同定に必須であるウシ高密度連鎖地図を作製し、それを用いた遺伝性疾患（盲目症とキサントニン尿症）の解析を行った。

第一章では、ウシゲノム DNA マイクロサテライト(MS)濃縮ライブラリーから採取した 57,600 クローンに対し、コロニーハイブリダイゼーションにより 5,750 個の(AC/GT)_n 含有 MS を単離した。繰り返し数 $n \geq 9$ の条件でプライマーを設計した 2,382 個に対し、1,969 個において適切な PCR 産物を得た。それらの多型度を米国農務省肉畜センター (USDA MARC) ウシマッピング家系の親 28 頭で調べたところ 1,750 個が多型を示した。多型を示した MS の平均のヘテロ接合率は 0.51、平均のアレル数は 6 であり、遺伝形質のマッピングに有用な多型性に富んだマーカーになり得るが判明した。

第二章では、特定の遺伝子近傍からの MS マーカーの開発を試みた。仮に、肉質 QTL 解析によりマップされた染色体領域内にこれらの特定遺伝子マーカーが存在すれば、これらの遺伝子が肉質 QTL の有力な候補遺伝子となり得るため、この手法も連鎖地図を充実させる上で重要な役割を果たすと考えた。CEBPA (CCAAT/enhancer-binding protein α)、PPARG (peroxisome proliferator-activated receptor γ)、CEBPD (CCAAT/enhancer-binding protein δ) 遺伝子を解析対象とした。これら 3 つの遺伝子はウシにおいて未だマッピングされておらず、これらの遺伝子産物は、マウスにおいて脂肪細胞分化時に重要な役割を果たす転写因子として知られているため肉質への影響が想定された。まず、既報告の cDNA 配列を基にこれらの遺伝子を含有する BAC あるいは YAC クローンをスクリーニングし、FISH (fluorescence *in situ* hybridization) による物理的マッピングを行った。また、それらのクローンから単離した MS, DIK114 (CEBPA), DIK115 (PPARG), DIK121 (CEBPD) の連鎖マッピングを行った。これら二法によるマッピング結果は一致し、ウシ CEBPA, PPARG, CEBPD 遺伝子はそれぞれ BTA18q24 (ウシ 18 番染色体), BTA22q24, BTA14q15-17 の座位に存在することが判明した。近年、複数の研究グループが肉質に関わる QTL を CEBPD 近傍のマーカー周辺で検出しており、また、和牛においても、鹿児島県と動物遺伝研究所が 14 番染色体に複数の産肉形質の QTL を同定していることから、本研究で着目した CEBPD が興味深い候補遺伝子となり、DIK114 が MAS の有益なマーカーとなる可能性が期待される。

第三章では、1997 年以来ウシゲノム地図の標準である USDA の連鎖地図 (Kappes et al. 1997) をより高密度化することを意図し、第一章で単離した MS 1,750 個と、第二章の MS など染色体特定領域から単離した MS 196 個を連鎖地図上にマップした。さらに、既報告の MS であるが USDA の連鎖地図上には未だマップされていない 424 個も加え、計 2,370 個のマッピングを行った。その結果 2,293 個が正確にマップされ、新しい連鎖地図は、性平均総ゲノム長 3160 cM、3,802 個の MS を含む 3,960 個のマーカーで構成されるものとなった。平均のマーカー間隔は 1.4 cM となり、1997 年の地図上に多数存在していた 10 cM を越えるギャップは消失した。全ゲノム長の 51%が 2 cM 未満の間隔で、91%が 5 cM 未満の

間隔でカバーされ、遺伝形質の正確なマッピング、および詳細な物理地図の作製に十分耐える非常に高密度なウシ連鎖地図が作製できた。

第四章では、ウシにおける MAS を用いた遺伝的改良形質の制御システムの開発を意図し、遺伝形質のマッピングに必要不可欠である連鎖地図を用いた連鎖解析を行った。解析対象となった遺伝性疾患は、特定の黒毛和種集団で発症が確認された盲目症、およびキサントリン尿症の二疾患である。盲目症の解析では、常染色体劣性発症様式を確認するために、共通祖先を有する 16 頭の発症固体サンプルが集められた。7 頭の父方半きょうだい発症個体家系に対し、常染色体上において父が多型を示すマーカー 180 個（平均 16 cM 間隔）が型判定された。連鎖解析プログラムは GENEHUNTER を用いた。その結果、劣性遺伝様式として BTA5（ウシ 5 番染色体）に疾病との連鎖が認められ、この座位を *bod1* (*bovine ocular disorder1*) と命名した。追加マーカーにより詳細なハプロタイプを調べると、3 頭はヘテロ接合体であることがわかった。そこでこの 3 頭に対し全常染色体の連鎖解析を行った結果、BTA18 に疾病と連鎖する領域が認められ、これを *bod2* と命名した。集められた発症個体 16 頭において *bod1* および *bod2* 領域を詳細に調べると、12 頭が *bod1* のホモ接合体、3 頭が *bod2* のホモ接合体、1 頭が *bod1* および *bod2* のホモ接合体であることが判明した。疾病と連鎖するそれぞれの染色体領域は、*bod1* が DIK5237-DIK5210 の 25 cM ($Z_{\max} = 17.0$, $\text{LOD}_{\max} = 11.8$) に、*bod2* が DIK5411-INRA038 の 7 cM ($Z_{\max} = 13.0$, $\text{LOD}_{\max} = 4.0$) に限定された。以上の結果から、本疾患が本質的に臨床診断では識別不能な遺伝的異質性であることが連鎖解析により明らかとなった。キサントリン尿症の解析では、発症様式や経歴などから常染色体劣性遺伝様式が示唆され、共通祖先を有する 21 頭の発症個体サンプルが集められた。これら発症個体の連鎖解析では、本疾病と BTA24 が有意に連鎖した。ヒトにおいて本疾患は、キサントリン脱水素酵素 (XDH)、アルデヒド酸化酵素 (AO)、イオウ酸化酵素 (SO) 活性の有無により、3 つのタイプに分類されている。XDH 活性のみが欠損する I 型、XDH および AO が欠損する II 型、すべての酵素が欠損するモリブデン補酵素欠損症である。そこで、これらの酵素活性を患畜で調べると、XDH、および AO 活性の欠損が認められ、II 型であることが示唆された。一方、モリブドプテリン補酵素硫化酵素 (MoCo sulfurase) の欠損が原因の *Drosophila ma-1* 変異は II 型同様、XDH および AO 活性を欠くことから、ウシ MoCo sulfurase gene (*MCSU*) が II 型の機能的候補遺伝子と考え、ウシ orthologue の単離を試みた。Finnerty 教授 (Emory 大学) から提供を受けた Ma-1 アミノ酸配列を基にデータベース検索 (tblastn) を行いホモロジーの高いマウス EST 断片を得た。それをもとに設計したプライマーにより得られたウシ YAC クローンの物理的マッピングが、連鎖解析の結果と BTA24q13.1-13.3 座位で一致したことから *MCSU* を原因遺伝子と想定し、発症牛と健常牛の cDNA 配列を同定し、比較を行った。その結果、すべての発症牛において 257 番目のチロシン残基の欠失変異が確認され、この変異を指標とした効率的な遺伝子診断が可能となった。

以上,本研究で開発されたウシ高密度連鎖地図は,遺伝形質の高精度マッピング,さらに種々の詳細な物理地図の作製,および近年着手されたウシゲノムシーケンス解読に大きく貢献するものである. これにより,経済形質や遺伝性疾患の責任遺伝子や原因遺伝子の同定が加速され,高い選抜精度を与える MAS の導入の結果として,高品質な畜産物をより効率的に生産することが可能になると期待される.