

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 井原 尚也

---

家畜の改良には、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である。分子生物学的手法に基づくマーカーアシスト選抜 (MAS) は、従来の表現型値に基づいた個体選抜に比べ、選抜精度と遺伝的改良の加速が期待されている。ウシでは、特定の種雄牛が限られた集団内の交配に多用されるため、しばしば、遺伝的不良形質が発生する。しかし、責任遺伝子を対象とした MAS はほとんど行われていない。その理由は、量的形質 (QTL) には環境や複数の遺伝子が関与し、また、現在ウシゲノム地図情報が乏しいためである。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、それを用いて遺伝性疾患である盲目症とキサントリ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、5,750 個の (AC/GT)<sub>n</sub> 含有 MS を単離した。多型度を米国農務省肉畜センター (USDA) 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。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ことを明らかにした。

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。肉質 QTL の有力な候補遺伝子と想定される *CEBPA* (CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$ )、*PPARG* (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ )、*CEBPD* (CCAAT/enhancer-binding protein  $\delta$ ) 遺伝子を解析対象とした。まず、BAC あるいは YAC クローンをスクリーニングし、FISH 法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 の連鎖マッピングを行った。その結果、ウシ *CEBPA*、*PPARG*、*CEBPD* 遺伝子は BTA18q24、BTA22q24、BTA14q15-17 の座位に存在することが判明した。和牛の 14 番染色体に複数の産肉形質の QTL が同定されていることから、*CEBPD* が候補遺伝子と推定され、*DIK114* が MAS の有益なマーカーとなる可能性が期待された。

第三章では、ウシゲノム連鎖地図をより高密度化する目的で、第一章で単離した MS 1,750 個と、第二章で単離した MS 196 個を連鎖地図上にマップした。さらに、USDA の連鎖地図上に未だマップされていない 424 個を加えた計 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た。新しい連鎖地図は、平均のマーカー間隔が 1.4 cM となり、地図上に多数存在していたギャップは消失した。以上、遺伝形質のマッピングおよび物理地図の作製に有用な高密度なウシ連鎖地図が作製できた。

第四章では、黒毛和種集団で確認された盲目症およびキサントリン尿症の二疾患について、MAS を用いた連鎖解析を行った。盲目症の解析では、共通祖先を有する 16 頭の発症個体サンプルを採集した。7 頭の父方半兄弟発症個体家系に対し、連鎖解析プログラム (GENEHUNTER)

を用いて解析した結果, 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* と命名した. 追加マーカーによる詳細なハプロタイプ解析や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. 発症個体 16 頭において *bod1* および *bod2* 領域を詳細に調べ, 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 に, *bod2* が *DIK5411-INRA038* の 7 cM に限定された. つぎに, キサンチン尿症の解析では, 常染色体劣性遺伝様式が示唆されたので, 共通祖先を有する 21 頭の発症個体からサンプルを採集した. 連鎖解析では, 本疾病と BTA24 が有意に連鎖した. ヒトのキサンチン尿症に関連する酵素活性を患畜で調べたところ, キサンチン脱水素酵素およびアルデヒド酸化酵素活性の欠損が認められた. さらに, モリブドプテリン補酵素 (MCSU) 欠損の可能性を考え, ウシ orthologue の単離を試みた. 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. そこで, MCSU を原因遺伝子と想定し, 発症牛と健常牛の cDNA 配列を比較した. 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, 本研究で開発したウシ高密度連鎖地図は, 遺伝形質の高精度マッピング, さらに種々の物理地図の作製および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. また, MAS の導入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, 高品質な畜産物の効率的な生産に寄与することが期待される.

よって審査委員一同は, 本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた.