〔レビュー〕

和牛遺伝性疾患の分子遺伝学的解析

国枝哲夫

岡山大学大学院自然科学研究科、岡山市津島中 1 - 1 - 1 (〒700-8530)

Molecular approach for hereditary diseases of Japanese beef cattle

Tetsuo Kunieda

Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University , Tsushima-naka, Okayama, 700-8530, Japan

1. はじめに

近年家畜、特に和牛の遺伝性疾患が大きな問題としてクローズアップされ、この問題の解決がわが国の畜産業の発展にとって無視できない問題となっている。常染色体単一劣性の遺伝様式を取る遺伝性疾患の解決のための最も有効な方法は、疾患原因遺伝子とその変異を同定し、キャリア個体を検出するための遺伝子診断法を確立することであろう。近年のヒトをはじめとする哺乳類の分子遺伝学的发展は、遺伝性疾患の原因遺伝子とその変異を分子レベルで明らかとすることを可能としている。ヒトにおいては血友病等多くの遺伝病で塩基配列上の変異が同定され、最近では高血圧や糖尿病といった従来の概念では遺伝性疾患とはいえない疾患に関与する遺伝子の解析も進められている。特に近年のヒトゲノムプロジェクトの進展のより、ヒトの疾患に関与する遺伝子は急速に解明されつつある。家畜の分野では、疾患の分子遺伝学的解析はまだ端緒についたばかりであるが、これまでに乳牛の白血球粘着不全症やブタのストレス症候群 (PSS) 等いくつかの遺伝性疾患の原因遺伝子が同定され、キャリア個体の検出が可能となっている。

和牛では、これまでに公にされているだけでもいくつかの遺伝性疾患の発生が知られている。表1に、常染色体単一劣性の遺伝子に支配されていることが既に

明らかとされているものを中心にその一部を示したが、これ以外にも遺伝性であることが疑われる疾患が数多く報告されている。これらの常染色体劣性の遺伝子に支配される遺伝性疾患では、見かけ上正常のキャリア同士の交配により発症個体が出現するため、キャリアー個体を効率よく検出し集団より除去することが疾患の発生防止のためにきわめて重要となる。一般には常染色体劣性の遺伝子がホモとなって発症個体が現れた時には、その集団の中にはかなりの数のキャリア個体が蔓延していると考えられるが、特に人工受精により多数の個体が単一の種雄牛に由来し、かつ近交係数が比較的高くなるような交配様式が取られる傾向のある和牛ではその影響は深刻である。また、疾患の発生が顕在化したときには既に集団中には原因遺伝子が広く拡散している状態となっているため、キャリア個体を効率良く同定しない限り、集団よりの原因遺伝子の除去は非常に困難である。そこで本稿では、最近遺伝子診断法によるキャリア個体の効率的な検出法が確立されたチェディアックヒガシ症候群 (Kunieda ら, 1999; Kunieda ら, 2000; Yamakuchi ら, 2000) と尿細管形成不全症 (Ohba ら, 2000a; Ohba ら, 2000b; Kobayashi ら, 2000; Hirano ら, 2000) の二つの和牛の遺伝性疾患について、原因遺伝子の同定と遺伝子診断法の確立の過程を紹介したい。

表1 和牛の遺伝性疾患

病 名	症 状	原因遺伝子
第 XIII 因子欠損症	止血不良	F13A (第 XIII 因子)
球状赤血球症	溶血性貧血、黄疸	FPB3 (バンド 3)
Chediak-Higashi 症候群	淡色化、止血不良	LYST
軟骨形成不全症	四肢短小、関節異常	?
尿細管形成不全症	腎不全、過長蹄	PCLN1 (paracellin-1)

2. チェディアックヒガシ症候群

黒毛和種の特定の集団においては、毛色の淡色化をともなう出血性の遺伝性疾患が報告されている。本疾患は去勢時に出血が止まりにくい牛がいることから、宮崎大学農学部の小川らにより、出血生の遺伝性疾患であることが明らかとされ、さらにその臨床所見等がヒトの遺伝性疾患であるチェディアックヒガシ症候群 (Chediak-Higasi Syndrome: 以下、CHS) と類似しているため、ウシ CHS と診断された (Ogawa ら, 1997)。発症個体は血小板凝集能の低下による止血時間の延長、白血球における異常顆粒の出現、血小板濃染顆粒の減少、部分的色素減少等の特徴的な表現型を呈し、その遺伝様式は常染色体劣性である。リソゾーム、メラノゾーム、血小板濃染顆粒等の細胞内小胞の異常による巨大顆粒の出現がこれらの細胞の機能異常の原因と考えられ、巨大顆粒の出現は細胞における小胞を介したタンパク質の貯蔵、輸送機能の不全によるものと考えられている。

1997年に、ヒトおよびマウスで LYST と名付けられた膜タンパク質をコードする遺伝子が CHS の原因遺伝子としてクローニングされた (Barbosa ら, 1996; Perou ら, 1996; Nagle ら, 1996)。この遺伝子は 3801 アミノ酸よりなるタンパク質をコードし、細胞内での小胞輸送に参与するタンパク質と相同性のある機能的な

ドメインを持つことから、細胞内のタンパク質輸送の制御に関連する機能を持った膜タンパク質であろうと考えられている。したがって、ウシにおいても CHS の原因がヒトやマウスと同様に LYST 遺伝子上の変異である可能性が考えられたため、ウシの LYST 遺伝子をクローニングし、発症個体に特異的な変異の同定を試みた。また、一方で連鎖解析によりウシ CHS の原因遺伝子の染色体上の位置を特定し、LYST 遺伝子と同一の位置に存在するか否かを明らかにすることによりウシ CHS と LYST 遺伝子の関係を染色体上の位置から明らかとすることを試みた。

2頭の特定の種雄牛に由来する父方半兄弟2家系の発症個体47頭、正常個体49頭を用いた連鎖解析によりウシ CHS の原因遺伝子の染色体マッピングを行った結果、本疾患の原因遺伝子はウシ第28染色体の近位端に存在するマーカーと強く連鎖していることが明らかとなった (Kunieda ら, 2000)。したがって、本疾患の原因遺伝子はこれらマーカーの近傍に位置づけられた (図1)。さらに、ウシ/マウス体細胞雑種パネルを用いてウシ LYST 遺伝子の染色体上の位置を調べたところ、やはり第28染色体上に存在することが明らかとされた。ウシ CHS の原因遺伝子と LYST 遺伝子の染色体上の位置が同一であることから、ウシにおいても LYST 遺伝子の突然変異により CHS が引き起こされていることが強く示唆された。

そこで、LYST 遺伝子の突然変異を同定することを目的としてウシ脳 cDNA ライブラリーよりウシ LYST 遺伝子をクローニングし、黒毛和種の正常個体と CHS 発症個体との間でその塩基配列を比較することにより、疾患の原因となる変異を同定することを試みた。その結果、3801 アミノ酸をコードする LYST 遺伝子の約 12kb の翻訳領域の中で、6065 番目の塩基に 2015 番目のアミノ酸においてヒスチジンからアルギニンへの置換を引き起こす A から G への塩基置換が存在することが明らかとなった (Kunieda ら, 1999; Yamakuchi ら, 2000)。この塩基置換は黒毛和種の集団の中で CHS の発症と完全に対応していること、および LYST 遺伝子の中で種間で強く保存されているアミノ酸の変異であることから、疾患の原因となる突然変異であると結論づけられた。

以上のような過程により、ウシの CHS の原因となる塩基配列上の変異が同定された。そこで、次に必要とされることは、この変異を簡便に検出することによりキャリア個体を同定するための遺伝子診断法を確立することである。この塩基置換は制限酵素 *FokI* 認識

図1 チェディアックヒガシ症候群原因遺伝子 (CHS) のウシ第28染色体上での位置。各マーカーの位置は Kappes ら (1997) による。

部位にあるため、図2に示すように、この塩基置換を含む領域をPCR法により増幅し、*FokI*で消化することにより、塩基置換を検出することが可能である(Kuniedaら, 1999)。

また、この塩基置換部位を3'端に持つプライマーを用いたAS-PCR (Allele-Specific PCR) 法によっても塩基置換を検出可能であり(Nakagiriら, 1999)、これらの方法を用いることにより、集団内でキャリア個体を容易に同定することが可能となる。

3. 尿細管形成不全症

黒毛和種の尿細管形成不全症は腎不全、発育不良を主な特徴とする常染色体劣性の遺伝性疾患である。発症個体は血中の尿素窒素、クレアチニン値の上昇、下痢、過長蹄等の特徴的な表現型を呈する。組織学的な検索により若齢の発症個体では腎臓の尿細管上皮の形

成不全が、月齢の進んだ個体では腎臓の間質の高度の線維化と正常糸球体の減少が見られ、尿細管上皮の形成不全が本疾患の第一義的な異常であることから、本疾患はウシ尿細管形成不全症(RTD: Renal Tubular Dysplasia)と名付けられている(Ohbaら, in press)。本疾患は1990年頃から顕在化し近年その発生は増加しつつあり、わが国における肉牛生産にも大きな影響をおよぼしているため、計画的な交配による発生の予防と、集団内での遺伝子頻度の減少が必要とされている。家畜の遺伝性疾患では前述のCHSのように、ヒトや実験動物においてすでに類似した表現型を示す疾患が知られており、しかもその原因遺伝子が明らかとされている場合が多い。この場合は家畜においても同じ遺伝子をクローニングしその変異を調べればよいので、解析は比較的容易である。しかしRTDの場合、ヒトの遺伝性疾患やミュータントマウスでは類似した表現型を示すものはみあたらず、表現型から原因遺伝子を推定することは困難であった。そこで、発症個体を含む家系を用いた連鎖解析により本疾患の原因遺伝子の染色体マッピングを行うことにより、原因遺伝子を推定することを試みた。まず、同一種雄牛に由来する父方半兄弟の間でのマイクロサテライトマーカーの分離からマーカーと疾患の発生との間の連鎖を調べた結果、本疾患の原因遺伝子はウシ第1染色体のマーカーと強く連鎖していることが明らかとなった(Ohbaら, 2000a; Kobayashiら, 2000)。半兄弟を用いた連鎖解析からだけでは、疾患原因遺伝子の位置をより正確に

図2 ウシCHSの遺伝子診断法。

Aに示すように疾患に特異的な塩基置換は制限酵素*FokI*の認識部位(CATCC)部位に存在し、塩基置換の結果、変異型遺伝子では認識部位が消失している。したがって、この部分を挟むプライマー(矢印)を用いて増幅し、*FokI*で消化することにより、Bに示すように発症個体では108bpの単一のバンドが、キャリア個体では108bp, 66bp, 42bpの3本のバンドが、正常個体では66bpと42bpの2本のバンドが検出され、キャリア個体を診断することが可能となる。

図3 尿細管形成不全症原因遺伝子(RTD)のウシ第1染色体上での位置。各マーカーの位置はKappesら(1997)による。

特定することは困難であったため、次にホモ接合性マッピングと呼ばれる方法を用いて、本疾患の原因遺伝子が存在する領域を4cMの範囲に特定した(図3)。ホモ接合性マッピングとは、同一の祖先に由来する血縁関係ある個体同士の交配により劣性の遺伝性疾患が発生した場合、染色体上の疾患原因遺伝子の周辺のかなりの領域は同一の祖先に由来してホモ接合となっていることから、逆に、各マーカーがホモとなっている領域を特定することにより、原因遺伝子の位置を特定する方法である。さらに、この領域に存在するマイクロサテライトマーカーBMS4009について調べたところ、非発症個体では特異的なバンドが検出されるのに対し、発症個体ではまったくバンドが検出されずいわゆるヌル対立遺伝子となっていることが判明した。このように特定のマーカーで、特異的なバンドが検出できない場合には、このマーカーを含む染色体上の領域が欠失

している可能性が考えられる。さらに、このヌル対立遺伝子は発症と完全に対応していることから、BMS4009を含むウシ第1染色体の特定の領域が発症個体では欠失し、この欠失が疾患の原因であることが示唆された。そこで欠失領域を特定するためにこの周辺100kb以上の領域をカバーする4つのBACクローンよりなる整列地図を作成し、その塩基配列を決定したところ、BMS4009を含むゲノム上の約37Kbの領域が欠失していることが確認された(図4)。

最近 paracellin-1 という遺伝子が、ヒトの家族性低マグネシウム血症の原因遺伝子であることが明らかとされている(Simonら, 1999)。paracellin-1 遺伝子は細胞のタイトジャンクションに参与する claudin 遺伝子と相同性の高い配列を持つ、尿細管上皮の膜タンパク質の遺伝子である。この疾患の主な臨床症状は血液中のマグネシウム濃度の低下と、尿中へ過剰な排泄であ

図4 ウシRTDにおけるPCLN1(paracellin-1)遺伝子の欠失。

ホモ接合性マッピングにより疾患原因遺伝子と強く連鎖していることが明らかとなった3マーカー(INRA049, BM9019, BMS4009)を含む4つのBACクローンよりなるコンテグを作成した。塩基配列の解析により、BMS4009を含む約37kbの領域が欠失していること、さらに、この欠失領域中にはPCLN1遺伝子のエクソン1から4までが含まれていることが明らかとなった。矢印はPCR法により欠失を検出することによる遺伝子診断法のためのプライマーの位置を示す。プライマーaあるいはa'とbにより正常な対立遺伝子が検出され、プライマーaあるいはa'とcにより、欠失を持つ対立遺伝子が検出される。

り、ウシの尿細管形成不全症の臨床症状とはかなり異なっているが、その第一義的な病因はウシの疾患と同様に尿細管上皮の異常である。さらに本遺伝子のヒト染色体上の位置は、ウシの第1染色体上の尿細管形成不全症の原因遺伝子が存在する位置と対応しているため、本遺伝子がウシRTDの有力な候補遺伝子と考えられた。そこで、欠失領域の塩基配列を調べたところ、paracellin-1 遺伝子のエキソン1から4に対応する配列が発症個体では欠失していることが明らかとされた(図4)。さらにparacellin-1 遺伝子の欠失と疾患の発症は完全に対応していることから、本遺伝子の欠失がウシRTDの原因であることが結論づけられた(Ohbaら, 2000b)。なお、本疾患はクローディン16欠損症ともよばれている(Hiranoら, 2000)。

本疾患では、その原因がゲノム中の広範な領域の欠失であるため、この欠失を検出することにより、遺伝子診断は可能である。図4に示すようにこの欠失領域を挟む形でプライマーを設定し、PCR法により増幅することにより、欠失の存在は検出可能となるはずである。しかし、本疾患の場合は、非常にGCに富んだPCRでの増幅が困難な配列が、欠失領域に近接しているためこの方法を用いた遺伝子診断は必ずしも効率的かつ正確とはいえない結果となった。このような場合には、図4のa'のように欠失の境界をまたぐ形でプライマーを設定することによっても遺伝子診断は可能である(Hiranoら, 2000)。

4. おわりに

以上のように、和牛の遺伝性疾患のうち、CHSと尿細管形成不全症については、最近その原因遺伝子が明らかとされ、遺伝子診断法が確立された。また、やはり和牛の遺伝性疾患である第XIII因子欠損症と、球状赤血球症についてもすでに原因遺伝子と変異が明らかとされ、遺伝子診断法が確立されている(Inabaら, 1996)。和牛は肉質などの経済形質に非常にすぐれた特質を持つ品種であるが、人工授精の普及などにより集団の遺伝学的な大きさが非常に小さくなっているため、一度遺伝性の疾患が発生すると、きわめて容易に集団中に拡散すると思われる。また、一度集団の中に原因遺伝子が拡散した後は、経済形質にすぐれた特定の種雄牛が多用されるため、その除去は容易ではない。したがって、和牛の遺伝性疾患においては、遺伝子診断によるキャリア個体の効率的な同定が不可欠であろう。キャリア個体の正確な同定が可能となれば、集団よりの原因遺伝子の除去も可能となるであろう

し、除去されない間でもキャリア同士の交配による発症個体の出現を予防することが可能となると思われる。近年のヒトのゲノム解析を中心とする哺乳類の分子遺伝学の進展により家畜においても従来に比べてはるかに容易に、特定の遺伝形質を支配する遺伝子の同定が可能となっている。現時点でまだ原因遺伝子が同定されていない、あるいは遺伝性疾患であること自体が明確となっていない疾患についても、今後CHSやRTDと同様に原因遺伝子の同定と遺伝子診断法の確立が順次可能となるであろう。これらの過程を通じて、和牛の集団より遺伝性疾患の原因となる遺伝子の頻度を暫時減少させることにより、遺伝的「不良」形質の除去という意味での和牛の遺伝的改良が遂行できるものと思われる。

文 献

- Barbosa MD, Nguyen QA, Tchernev VT, Ashley JA, Detter JC, Blaydes SM, Brandt SJ, Chotai D, Hodgman C, Solari RC, Lovett M, Kingsmore SF, Identification of the homologous beige and Chediak-Higashi syndrome genes. *Nature*, 382: 262-265. 1996.
- Hirano T, Kobayashi N, Itoh T, Takasugi A, Nakamura T, Hirrotsune S, Sugimoto Y, Null mutation of PCLN-1/Claudin-16 results in bovine chronic interstitial nephritis. *Genome Res.*, 10: 659-663. 2000.
- Inaba M, Yawata A, Koshino I, Sato K, Takeuchi M, Takakuwa Y, Manno S, Yawata Y, Kanzaki A, Sakai J, Ban A, Ono K, Maede Y, Defective anion transport and marked spherocytosis with membrane instability caused by hereditary total deficiency of red cell band 3 in cattle due to a nonsense mutation. *J. Clin. Invest.*, 97: 1804-1817. 1996.
- Kappes SM, Keele JW, Stone RT, McGraw RA, Sonstegard TS, Smith TP, Lopez-Corrales NL, Beattie CW, A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Res.*, 7: 235-249. 1997.
- Kobayashi N, Hirano T, Maruyama S, Matsuno H, Mukoujima K, Morimoto H, Noike H, Tomimatsu H, Hara K, Itoh T, Imakawa K, Nakayama H, Nakamura T, Sugimoto Y, Genetic Mapping of a locus associated with bovine chronic interstitial nephritis to chromosome 1. *Anim. Genet.*, 31: 91-95. 2000.
- Kunieda T, Nakagiri M, Takami M, Ide H, Ogawa H, Cloning of bovine LYST gene and identification of a missense mutation associated with Chediak-Higashi

- syndrome of cattle. *Mamm. Genome*, 10: 1146-1149. 1999.
- Kunieda T, Ide H, Nakagiri M, Yoneda K, Konfortov B, Ogawa H, Localization of the locus responsible for Chediak-Higashi syndrome in cattle to bovine chromosome 28. *Anim. Genet.*, 31: 87-90. 2000.
- Nagle DL, Karim MA, Woolf EA, Holmgren L, Bork P, Misumi DJ, McGrail SH, Dussault BJ Jr, Perou CM, Boissy RE, Duyk GM, Spritz RA, Moore KJ, Identification and mutation analysis of the complete gene for Chediak-Higashi syndrome. *Nat. Genet.*, 14: 307-311. 1996.
- Nakagiri H, Kunieda T, Ide H, Yoneda K, Takami M, Ogawa H, Allele-specific polymerase chain reaction for identifying carriers of Chediak-Higashi syndrome in Japanese black cattle. *Anim. Sci. J.*, 70: 372-374. 1999.
- Ogawa H, Tu CH, Kagamizono H, Soki K, Inoue Y, Akatsuka H, Nagata S, Wada T, Ikeya M, Makimura S, Uchida K, Yamaguchi R, Otsuka H, Clinical, morphologic, and biochemical characteristics of Chediak-Higashi syndrome in fifty-six Japanese black cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 58: 1221-1226. 1996.
- Ohba Y, Kitagawa H, Kitoh K, Asahina S, Nishimori K, Kazuhiro K, Kunieda T, Sasaki Y, Homozygosity mapping of the locus responsible for renal tubular dysplasia of cattle on bovine chromosome 1. *Mamm. Genome*, 11: 316-319. 2000a.
- Ohba Y, Kitagawa H, Kitoh H, Sasaki Y, Takami M, Shinkai Y, Kunieda T, A deletion of the paracellin-1 gene is responsible for renal tubular dysplasia in cattle. *Genomics*, 68: 229-236, 2000b.
- Ohba Y, Kitagawa H, Okura Y, Kitoh K, Sasaki Y. Clinical feature of renal tubular dysplasia, a new hereditary disease in Japanese black cattle. in press.
- Perou CM, Moore KJ, Nagle DL, Misumi DJ, Woolf EA, McGrail SH, Holmgren L, Brody TH, Dussault BJ Jr, Monroe CA, Duyk GM, Pryor RJ, Li L, Justice MJ, Kaplan J, Identification of the murine beige gene by YAC complementation and positional cloning. *Nat. Genet.*, 13: 303-308. 1996.
- Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, and Lifton RP, Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg^{2+} resorption. *Science*, 285: 103-106. 1999.
- Yamakuchi H, Agaba M, Hirano T, Hara K, Todoroki J, Mizosita K, Kubota C, Tabara N, and Sugimoto Y, Chediak-Higashi syndrome mutation and genetic testing in Japanese black cattle (Wagyu). *Anim. Genet.*, 31: 13-19. 2000.