

氏 名	こ ばやし なお ひこ 小 林 直 彦
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2488 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	ウシにおける線維化を伴う慢性間質性腎炎の遺伝育種学的研究

(主 査)
論文調査委員 教 授 佐々木義之 教 授 今 井 裕 教 授 廣 岡 博 之

論 文 内 容 の 要 旨

黒毛和種の特定種雄牛産子に腎臓機能障害を伴う、発育不良牛の発生が多く見られ、遺伝性疾患が疑われた。発育不良牛を生産した特定種雄牛は、脂肪交雑能力に優れており、育種改良を進める上で重要な種雄牛であった。したがって、この発育不良が遺伝性疾患である場合、キャリア牛を識別する遺伝子診断法の確立が急務であった。そこで、黒毛和種に発生がみられた発育不良牛が遺伝性疾患であるか否かを明らかにし、遺伝性疾患であるとすればその原因遺伝子を探索・クローニングし、さらに遺伝子診断法を確立するために本研究を行った。得られた結果の概要は以下の通りである。

1. 発育不良牛では、発育不良、過長蹄を呈し、血中尿素態窒素値、クレアチニン値の上昇がみられた。病理組織検査で線維化を伴うウシ慢性間質性腎炎と診断された。発症牛の性比はおおよそ1:1であった。発症牛の大半が、種雄牛 A の娘牛と息子種雄牛との交配から産まれたものであったことから、種雄牛 A が関係した遺伝性疾患であることが示唆された。そこで、種雄牛 A の娘牛と息子牛の半きょうだい交配産子について調査したところ、慢性間質性腎炎の発生率は11.6%であった。これは、本疾患が常染色体性単純劣性遺伝と仮定した場合の理論度数とよく一致し、本疾患が常染色体性劣性の遺伝性疾患であることを明らかにした。

2. DNA 多型マーカーを用いた連鎖解析により、原因遺伝子座を1番染色体67.5cM付近にマッピングした(Zスコア:12.0)。さらに、発症と最も強く連鎖したマイクロサテライト DNA マーカー BM9019 によるキャリア牛の診断を行ったが、血統情報が十分わかっても27.4%のウシで正常かキャリアかを診断することができなかった。

3. ウシ慢性間質性腎炎遺伝子座領域のコスミドクローンから、DIK129, DIK130 の二つのマイクロサテライト DNA マーカーを分離した。これらのマーカーは、種雄牛 A で単一のアリルを示し、種雄牛 A の息子種雄牛と娘牛には遺伝していない。さらに、これらの産子である発症牛では全く PCR 産物が検出されなかった。このことは、種雄牛 A から疾患に関連したヌルアリルが伝わったことが考えられた。ヌルアリルはコスミドクローンの領域に欠損の存在が示唆され、この欠損がウシ慢性間質性腎炎の原因となる遺伝子の機能消失をもたらす変異に関連していると考えられた。腎臓の cDNA ライブラリーから、2.9-kb の cDNA クローン No.55 を単離した。そのアミノ酸シーケンスはタイトジャンクションのクロードインファミリーに類似しており、*Claudin-16* (CL-16) と名付けられた。発症牛由来の変異型コスミドクローンと、野生型コスミドクローンのシーケンスを比較した結果、変異型では37-kbの欠損がみられた。ノーザンブロット解析で、CL-16は腎臓組織特異的な発現がみられ、発症牛の腎臓では発現はみられなかった。以上、ウシ慢性間質性腎炎の原因遺伝子は、CL-16であり、変異型遺伝子はエクソン1から4が欠損しており、発症牛では CL-16 の発現がみられなかったことから、ウシ慢性間質性腎炎は CL-16 欠損症であることを明らかにした。

4. 野生型遺伝子と突然変異型遺伝子を PCR 増幅するプライマーをデザインし、CL-16 遺伝子診断法を確立した。CL-16 遺伝子型と肥育牛の枝肉形質や繁殖雌牛の枝肉形質に関する予測育種価との関連性を調査した。肥育牛の枝肉形質に影響する種々の環境の補正を行った後でも CL-16 遺伝子型間には有意な差はみられなかった。また、繁殖雌牛の枝肉形質に関する予測育種価についても CL-16 遺伝子型間に有意な差はみられなかった。

論文審査の結果の要旨

肉牛の生産能力に関する遺伝的能力の評価体制が整うにつれて、遺伝的に優れた特定の雄牛に供用が集中するようになった。その結果、劣性遺伝子に支配された遺伝性疾患が顕在化するケースが増えてきた。黒毛和種牛に見られた腎臓機能障害を伴う、発育不良牛もその一つと疑われた。そこで、この黒毛和種に発生がみられた発育不良牛が遺伝性疾患であるか否かについて調査・解析し、遺伝性疾患であったのでその原因遺伝子を探索・クローニングし、さらに遺伝子診断法の確立を図った。得られた成果の主要な点は以下の通りである。

1. 発育不良牛では、発育不良、過長蹄を呈し、血中尿素態窒素値、クレアチニン値の上昇がみられ、病理組織検査でウシ慢性間質性腎炎と診断している。

2. 本症について疫学調査を行った結果、発症牛の大半が種雄牛 A に関係していることを突き止め、ついで種雄牛 A の娘牛と息子牛の半きょうだい交配産子について調査したところ、本症の発生率は11.6%で、本疾患が常染色体性単純劣性遺伝と仮定した場合の理論度数とよく一致し、常染色体性劣性の遺伝性疾患であることを明らかにしている。

3. DNA 多型マーカーを用いた連鎖解析により、原因遺伝子座を 1 番染色体 67.5cM 付近にマッピングした。しかし、発症と最も強く連鎖したマイクロサテライト DNA マーカー BM9019 によっても、キャリア牛の診断において27.4%のウシで正常かキャリアかを診断することができなかったとしている。

4. 慢性間質性腎炎遺伝子座と推定された領域に DNA 欠損があることを突き止め、本症の原因遺伝子が *Claudin-16* (*CL-16*) であり、変異型遺伝子はエクソン 1 から 4 が欠損しており、発症牛では *CL-16* の発現がみられなかったことから、本症がウシ *CL-16* 欠損症であることを明らかにしている。

5. 野生型遺伝子と突然変異型遺伝子を PCR 増幅するプライマーをデザインし、*CL-16* 遺伝子診断法を確立した。*CL-16* 遺伝子型と肥育牛の枝肉形質や繁殖雌牛の枝肉形質に関する予測育種価との関連性を調査し、両者の間に関連がないことを明らかにしている。

以上のように、本研究では黒毛和種に見られた発育不良牛が遺伝性の慢性間質性腎炎であることを突き止め、その原因遺伝子として *CL-16* をクローニングし、さらに疾患の原因となる変異型遺伝子を検出する遺伝子診断法を確立している。さらに、*CL-16* 変異型遺伝子と枝肉形質に関する遺伝的能力との間には関連がないことを明らかにしたものであり、家畜育種学、獣医臨床遺伝学の発展並びに肉牛改良の実際に寄与するところが大きい。

よって、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る。

なお、平成15年2月14日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。