

氏 名	たけ だ はる こ 竹 田 晴 子
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2473 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	褐毛和牛における軟骨異形成性矮小体軀症の原因遺伝子同定と DNA 診断法の確立に関する研究

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

論 文 内 容 の 要 旨

褐毛和牛における軟骨異形成性矮小体軀症は、四肢長骨の短小、骨端の変形、それに伴う歩行異常や発育不全を特徴とする劣性遺伝病である。当該疾病の罹患牛は過去10年で100頭を越えており、保因牛の早期発見と計画交配による発症の防除は、褐毛和牛の生産において極めて重要である。本研究は、ポジショナル候補遺伝子アプローチとよばれる手法を用いて当該疾病の原因遺伝子変異を明らかにし、DNA 診断法を確立することを目的としたものである。本論文の内容は以下のように要約される。

第一章では、ポジショナル候補遺伝子アプローチの概要と当該疾病に関する遺伝学的研究の現状について述べ、家畜生産における本研究の位置づけを明確にした。

第二章では、当該疾病の責任染色体領域の単離を試みた。まず、ウシ YAC ライブラリーとそのスクリーニングシステムを構築し、このシステムがウシゲノム DNA のクローニングに有用であることを示した。次に、ウシ 6 番染色体 q21 領域に位置する STS (sequence tagged site) マーカーを用いて、ウシ YAC ライブラリーと市販のウシ BAC ライブラリーから、当該疾病の責任染色体領域 DNA を含むウシ YAC および BAC クローンを単離した。

第三章では、責任染色体領域をより詳細に解析するために、まず YAC および BAC クローンからマイクロサテライトマーカーを迅速に単離するための磁気ビーズ単離法を開発した。次に、当該疾病の責任染色体領域を含む YAC および BAC クローンから、マイクロサテライトマーカーおよびクローン末端をターゲットとした STS マーカーを開発し、これらを用いてクローンコンテグからなる高密度物理地図を作製した。また、これらのマイクロサテライトマーカーを用いて、疾病家系個体のハプロタイプを再構成し、交差解析によって当該疾病の責任染色体領域を特定した。

第四章では、当該疾病の原因となる遺伝子変異を明らかにするとともに、その遺伝子変異に基づいた DNA 診断法について検討した。特定した責任染色体領域内に位置し、当該疾病の発症部位であるウシ長骨骨端で発現が認められる新規遺伝子 *LIMBIN* を同定した。次に、当該疾病をもたらす遺伝子変異として、*LIMBIN* 遺伝子内に 1 型と 2 型の 2 種類の変異型を見出した。また、対立遺伝子特異的 PCR 法と GenScan 検出システムによる DNA 診断法を確立し、このシステムが *LIMBIN* 遺伝子変異が原因でおこる軟骨異形成性矮小体軀症のキャリアー牛の検出に有効であることを示した。

第五章では、上記の結果を踏まえ、DNA 診断による当該疾病のキャリアー牛の早期発見と計画交配による発症の防除が、褐色和牛の生産と育種において有用であることを述べている。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

軟骨異形成性矮小体軀症は、四肢長骨の短小や骨端の変形によって、歩行異常や発育不全を呈する劣性遺伝病である。褐毛和牛では、当該疾病の罹患牛が過去10年間で100頭を超えており、疾病の早期発見と発症防除は和牛生産にとって不可欠な課題となっている。本研究は、ポジショナル候補遺伝子アプローチ法を用いて、当該疾病の責任遺伝子を特定し、疾病の原因となる変異を同定するとともに、疾病に対する DNA 診断法を確立することを目的として行っている。本研究によって

得られた成果は、以下のように要約できる。

1. ウシ YAC ライブラリーのスクリーニングシステムを構築し、そこで得られた YAC ライブラリーと既存のウシ BAC ライブラリーから、当該疾病の責任染色体ゲノム領域を含むウシ YAC および BAC クローンを単離した。
2. 当該疾病の責任染色体領域をより詳細に解析するために、YAC および BAC クローンからマイクロサテライトマーカを迅速に単離する方法を開発し、103種類の新規マイクロサテライトマーカを単離し、責任染色体領域の高密度物理地図を作成した。
3. 高密度物理地図とマイクロサテライトマーカを利用して、疾病家系のハプロタイプの再構成と交差解析によって、責任染色体領域内に当該疾病の原因遺伝子の位置を特定した。この領域には、当該疾病の発症部位である長骨骨端で発現が認められる新規遺伝子の存在が明らかとなり、この遺伝子を当該疾病の原因となる候補遺伝子として *LIMBIN* と命名した。
4. 当該疾病の原因変異として、*LIMBIN* 遺伝子内に点突然変異と塩基置換をとまう 2 種類の変異型遺伝子を見出した。これらの変異に基づき、対立遺伝子特異的 PCR 法と GenScan 検出システムにより、当該疾患遺伝子の DNA 診断法を確立した。

以上のように、本論文は、家畜の改良と生産の過程で散見され、劣性遺伝病の一種として知られる、軟骨異形成性矮小体軀症の原因となる新規の遺伝子を同定するとともに、その DNA 診断技術を確立している。この成果は、家畜生産における不良遺伝子の的確な発見と防除について明確な指針を与えるものであり、家畜遺伝学、家畜繁殖学、家畜育種学、臨床獣医学などの発展に寄与するところが大い。

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1月16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。