

畜産大賞：研究開発部門

# 黒毛和種牛における遺伝性疾患の病態解析および 遺伝子診断法の確立による発病抑制技術の開発

黒毛和種牛遺伝性疾患研究開発グループ代表 小川 博 之  
黒毛和種の抗病性育種研究チーム代表 杉 本 喜 憲

## 1. 技術開発の背景

肉用牛黒毛和種（和牛）は脂肪交雑などの肉質に優れているという特徴を持つわが国独特の肉用牛品種である。耕種農業との結びつきも強く、特に中山間地農業の活性化に重要な役割を果たしている。

近年、肉質の高品質化を目指した産地間競争の激化に伴い、地域によっては供用される種雄牛が、能力が優れていると評価された特定の系統に偏る傾向がみられる。その結果として近親交配が行われる頻度が高まり、遺伝性疾患が顕在化しやすい状況にある。遺伝性疾患の発生は生産者に多大な経済的損失をもたらすことから、生産現場からはこの発生を抑制する技術の開発が強く求められていた。

一般に牛でみられる遺伝性疾患のほとんどは劣性遺伝であるため、疾患原因因子をホモに持った牛のみが発症し、ヘテロに持つ牛（保因牛、キャリア）は正常牛と何ら変わるところはない。そのため従来は、血統情報から不良因子のキャリアの疑いのある個体は、遺伝的能力が高い場合であっても不良因子の拡散を防ぐために淘汰したり、種雄牛としての選抜対象としなかった経緯がある。このことは黒毛和種集団から優良な遺伝子を失わせることになり、将来の育種改良のための遺伝的ポテンシャルを低下

させる恐れがあった。

不良因子のキャリアの正確な診断が可能になれば、遺伝的疾患の発症を抑制する交配が可能となり、また、遺伝的疾患を発症した家系からも正常な種畜を選抜することが可能となる。このため、不良因子のキャリアを診断する手法の開発は、わが国肉牛産業にとってきわめて重要な課題であった。

## 2. 技術開発の概要

2つのグループは、生産現場で問題になっていたいくつかの疾患について、疾患病態の詳細な解析と家系調査によって遺伝性疾患としてとらえたうえで、その原因となる因子（遺伝子異常）を明らかにするという手順で研究を進めてきた。遺伝子異常を明らかにした後に、この情報に基づいて簡便、正確、安価な診断法（遺伝子診断法）を開発した。これらの2グループは、これまで



畜産大賞を受賞された黒毛和種牛遺伝性疾患研究グループ、黒毛和種の抗病性育種研究チームのみなさん

に黒毛和種で認められた計5種の遺伝性疾患について、病態解析、原因となる遺伝子異常の解明、遺伝子診断法の開発を成し遂げている。これらの遺伝性疾患を、遺伝子診断法が開発された順に示すと以下のとおりである。

### 棒 遺伝性バンド3欠損症

発症した生後約1週齢までの幼牛は重篤な溶血性貧血症状を示す。1歳齢以降は明確な臨床症状は示さないが発育は不良である。病態解析と家系調査により遺伝性球状赤血球症であることを明らかにし(1992年)更に分子病態を解析してこれが主要赤血球膜蛋白質であるバンド3の欠損によることを突止め、原因となる遺伝子異常を解明して遺伝子診断法を確立した(1996年)。

### 放 第Ⅱ因子欠損症

生後数日の幼牛に多発した臍部のソーセージ様腫脹を示す症例を調べて、これが臍帯動脈からの持続的出血によるものであり、この原因が血液凝固に不可欠なフィブリンを安定化させる作用をもつ第Ⅱ因子の欠損によるものであることを明らかにした。生後1年以内に約80%は死亡する。家系調査に基づいて遺伝性疾患としてとらえ、1996年に第Ⅱ因子遺伝子の異常を明らかにし、遺伝子診断法を確立した。

### 方 チェディアック・ヒガシ症候群

ある地域で多発した出血性疾患の症例のなかから、ヒトやマウスで既に報告されているチェディアック・ヒガシ症候群と類似の病態を示す集団をみいだした。死亡率は低いものの、血液凝固機能が低下し、皮下に血腫を生じ、重い貧血症状が主症状である。ヒトにおけるこの疾患の原因遺伝子が

所在するヒト染色体上の領域に相当する牛染色体領域に、黒毛和種のこの疾患の原因遺伝子が存在することを突止め、遺伝子の異常を明らかにして遺伝子診断法を確立した(1998年)。

### 朋 クローディン - 16欠損症

腎機能不全で死亡した約120例の病理学的検索と家系調査から、遺伝性腎尿管形成不全症と診断された疾患である。大部分は腎機能障害を伴う発育不良として子牛の時に症状がみられ、生後1年程度までに死亡するものが多い。ゲノム解析の手法で原因遺伝子を単離・同定し、新規の遺伝子クローディン - 16(パラセリン - 1)の欠損が原因であることを明らかにして、遺伝子診断法を確立した(1999年)。

### 法 モリブデン補酵素欠損症

生後1~6ヵ月齢の子牛に多発し、プリン塩基の一種であるキサンチンの血中および尿中の濃度が正常より高くなるのが主徴である。腎、輸尿管、膀胱にキサンチンを主成分とする結石を生じ死に至る。家系調査から30年以上も前に既に劣性遺伝性疾患であると認識されていたが、キャリアの診断法が開発されなかったため、周期的な発生を繰返してきた。1999年にゲノム解析の手法で原因となる遺伝子(哺乳動物では新規の遺伝子モリブデン補酵素硫化酵素)の異常を特定し、遺伝子診断法を確立した。

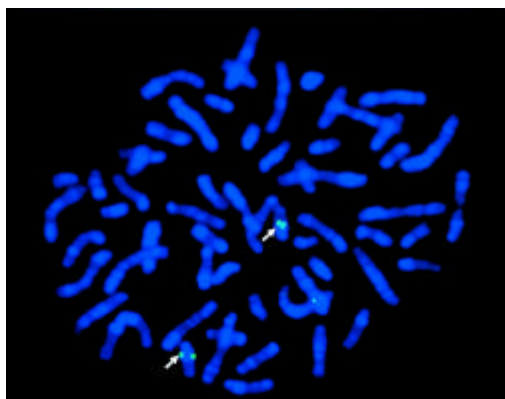
## 3. 技術開発の学術的評価

技術開発に関わる論文はいずれも権威ある国際的な学術雑誌に掲載されている。このことは技術開発成果の学術的評価が高いことを示している。

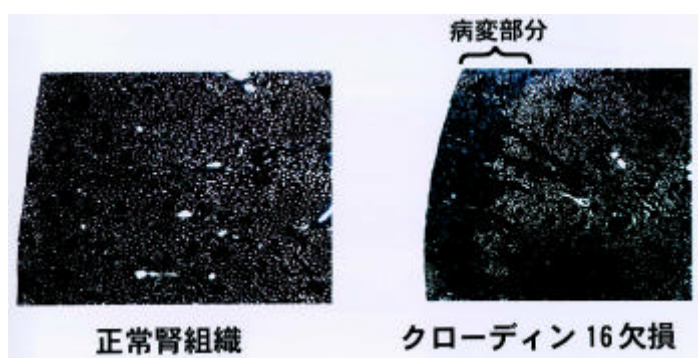
なかでも、クローディン - 16欠損症の場



クローディン-16欠損症を発症している黒毛和種牛、約6ヵ月齢。背湾姿勢をとり、蹄が長く伸びているのがわかる



ウシ・モリブデン補酵素硫化酵素遺伝子 MCSU が位置する染色体を調べた顕微鏡写真。蛍光色素で標識された MCSU の DNA 断片がウシ染色体24番に接着した(矢印)。DNA マーカーを使った連鎖解析でもモリブデン補酵素欠損症原因遺伝子は染色体24番中央に位置することがわかっていたので、MCSU が疾病原因遺伝子である可能性が考えられた



クローディン-16欠損症を発症しているウシの腎臓写真(右)。皮質部分(病変部分、右写真左部)の繊維化した領域が青く染まっている。一方、正常な腎臓の皮質部分(左写真左部)と比べて著しい違いがわかる

合のように、これまで知られていなかった蛋白をコードする新規の遺伝子の異常(欠損)が疾患の原因であることを明らかにしたり、あるいはモリブデン補酵素欠損症の場合では、ショウジョウバエでは類似の機能の遺伝子が報告されていたが、哺乳動物では知られていなかった新規の遺伝子の異常が原因であることを明らかにしたことなどは高く評価されている。

#### 4. 技術開発の産業への貢献

##### 捧 遺伝性疾患の発生の抑制および黒毛和種集団における不良因子の頻度の低下

ある疾患が集団的に発生し、病態解析、家系調査によってそれが遺伝性疾患として認識される場合、多くの例で、能力評価の高い、あるいは高かった、種雄牛が共通祖先(始祖牛)として浮かびあがる。能力が高いために、その子孫が種雄牛、繁殖牛として多く供用され、結果として近親交配を招きやすい状況が生ずる。不幸にしてその種雄牛が遺伝性疾患の原因遺伝子のキャリアであった場合は、遺伝性疾患が表面化する。遺伝性疾患が現れた家系は能力の高い家系であることが多いのはこのためである。

また、この家系の能力評価が極めて高い場合には、遺伝性疾患のキャリアと認識される前に、原因遺伝子は地域にとどまらず、精液として、あるいはその子が種畜として広く拡散される場合もある。

キャリアの確実な診断法が重要なのは、不安にかられたいたずらな淘汰を避け、その家系の持つ遺伝的



遺伝病原因遺伝子を同定するために駆使した DNA 塩基配列のデータ。画面上で塩基配列は、緑（アデニン：A）、黒（グアニン：G）、赤（チミン：T）、青（シトシン：C）の4色で表される

能力を活用しつつ、疾患の発生を未然に防ぎ、かつ黒毛和種集団から不良因子（異常遺伝子）の頻度を低下させる手段を与えることにある。

#### 遺伝性疾患の発生の抑制

種雄牛が遺伝性疾患原因因子のキャリアであっても、血統情報等からキャリアでない繁殖牛に交配すればよい。ヘテロのキャリアが生まれても発症はしない。更に、次に述べるようにしてキャリアでない種雄牛を選抜すれば、交配対象の繁殖牛がキャリアであっても疾患は発症しない。

#### 黒毛和種集団からの不良因子の頻度の低下

劣性遺伝の形質では、キャリア同士の交配でも25%の確率で、また、キャリアとキャリアでないものの交配では50%の確率でキャリアでない正常なものが生まれるので、能力の高い種雄牛がキャリアであったとしても、種雄牛候補を生産するための交配を4倍、あるいは2倍にすれば、通常の場合と同じ選抜強度を維持しながらキャリアでない能力の高い種雄牛を選抜できる。つまり、当該家系の能力の高い遺伝子を利用し

つつ、望ましくない遺伝子は排除できることになり、長期的には黒毛和種における当該因子の頻度を低下させることができる。

#### 放 技術開発の成果の利用の現状

社団法人家畜改良事業団では開発された診断技術を用い、依頼を受けていくつかの遺伝性疾患について遺伝子診断を行っている。このうち黒毛和種について行っているのは表1に示す3種の遺伝性疾患についてである。血統的にキャリアの懸念のあるものの検査、あるいは念のため正常であることを確認するための検査など、検査の背景にはいろいろなものがあるが、懸念のあるものを検査するケースが多いとみられ、表1に示した保因の割合は、わが国の黒毛和種集団における当該遺伝性疾患原因遺伝子の頻度より高いものと推測される。この検査は疾患の発生を抑制するための交配指針のための情報として、あるいはキャリアでない正常な種雄牛を選抜するための情報として用いられている。

なお、それぞれの遺伝性疾患の発生の中心地であった地域（多くの場合は県）では、独自で検査を行う場合が多く、表1に示すよりはるかに多くの頭数について検査が行われている。例えば、クローディング - 16欠損症発生の中心地であった県では、1999～2000年9月までの間に県内黒毛和種繁殖牛約5600頭について遺伝子型検査を実施し、また、子牛についても1800頭余について検査している。

この表に取上げた3種の遺伝性疾患については、検査開始後の年数も短いため当該疾患の原因遺伝子の黒毛和種集団内での頻度が下がっているかどうかの情報はこの表からは得られないが、（参考）に示した例のように、下がっていくものと考えてよい。

(参考:ホルスタイン種におけるウシ白血球粘着不全症のキャリアの推移)

ウシ白血球粘着不全症(BLAD)はホルスタイン種子牛に重度の白血球機能異常を起こす遺伝性疾患であるが、遺伝子診断法が確立されて発症抑制の措置がとられてからは、この疾患のキャリアも減少している(表2参照)

<特許取得および出願>

- 1) ウシバンド3欠損症の検出法(特許番号 TS-8-013)
- 2) ウシ第乏因子異常症の診断方法(特許番号 TS-8-002)
- 3) ウシの Chediak-Higashi 症候群の遺伝子診断法(特願平10-368649)
- 4) ウシの Claudin-16欠損症の遺伝子診断法(特願平11-084373)
- 5) ウシのモリブデン補酵素欠損症の遺伝子診断法(特願2000-001680)

<その他参考事項>

捧 受 賞

平成5年度産業動物獣医学会学会賞「黒毛和種牛の遺伝性球状赤血球に関する研究」伴頭、他5名  
平成10年度家畜診療等技術全国研究会農林水産大臣賞「赤血球浸透圧脆弱性試験および遺伝子解析による黒毛和種牛のバンド3欠損症の防止対策」伴頭、他4名

放 その他の推薦理由

黒毛和種の改良において、不良因子のコントロールはきわめて重要なことである。今回解析の対象となった不良因子のキャリアには優れた産肉能力を併せ持つ種雄牛が多いことから、これらの不良因子の遺伝子診断技術の早期確立が強く求められていた。

この2つのグループは、黒毛和種における不良因子問題の持つ重要性を認識し、関係者の理解を得ながら研究を進めてきた。一方でウシゲノム解析のためのツールの開発に基礎的な貢献を続け、もう一方で地道なサンプル収集や疾病の遺伝学的な解析をしてきた。この両輪が、ウシゲノム解析研究の飛躍的な発展と相俟って、黒毛和種の5種の遺伝性疾患の遺伝子診断法を確

(表1) 遺伝性疾患遺伝子型検査状況<sup>1)</sup>(家畜改良事業団)

区 分		1997年		1998年		1999年	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌
遺伝性バンド3欠損症	検査頭数	1,273	222	1,016	1,275	1,386	2,370
	正常 <sup>2)</sup>	1,122	193	929	1,081	1,284	2,158
	保因 <sup>2)</sup>	151	29	87	194	102	212
第Ⅻ因子欠損症	検査頭数	1,249	186	986	1,278	1,364	2,310
	正常 <sup>2)</sup>	1,249	186	977	1,263	1,355	2,275
	保因 <sup>2)</sup>	0	0	9	15	9	35
クローデイン-16欠損症	検査頭数					2,644	4,043
	正常 <sup>2)</sup>					2,210	3,204
	保因 <sup>2)</sup>					434	839

<sup>1)</sup> 遺伝性バンド3欠損症および第Ⅻ因子欠乏症は1997年より、クローデイン-16欠損症は1999年度より検査開始。

<sup>2)</sup> 保因と区分したもののなかにはわずかながらホモの保因牛も含む。

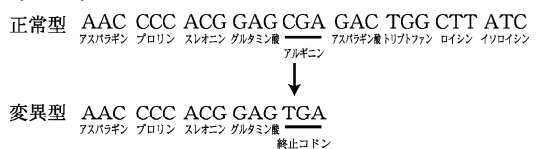
(表2) 遺伝性疾患(BLAD)遺伝子型検査状況(家畜改良事業団)

	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999
検査頭数(雄)	187	354	251	238	147	133	130	153
正常	150	321	223	233	146	131	127	148
保因	37	33	28	5	1	2	3	5

立するという結実をもたらしたと考えられる。不良因子をコントロールする改良を可能にしたという実績は大いに評価されるべきである。

方 付 図

(図1) バンド3欠損症の原因遺伝子異常



バンド3は930個のアミノ酸からなるタンパク質である。その664番目の、本来アルギニンを作る3塩基のうちの一つが突然変異により終止コドンとなっている(ナンセンス変異)ために、バンド3タンパク質の合成がここで停止してしまい、正常なバンド3が作られず疾病が起きる。

第乏因子は、aとb、ふたつのタンパク質サブユニットから構成される。黒毛和種牛の第乏因子欠乏症では、aサブユニットの82番目のアミノ酸を作る3つの塩基

(図2) 第乏因子欠乏症の原因遺伝子異常

正常型 GGA CAG TCT TTC TAC ATT CAG  
グリシン グルタミン セリン フェニルアラニン チロシン イソロイシン グルタミン

↓

変異型 GGA CAG TCT TCC TAC ATT CAG  
グリシン グルタミン セリン セリン チロシン イソロイシン グルタミン

のうちのひとつの突然変異により本来フェニルアラニンである箇所がセリンに置き換わるために疾病が起きる。

(図3) チェディアック・ヒガシ症候群原因遺伝子 CHS 1 の 1 塩基配列置換変異

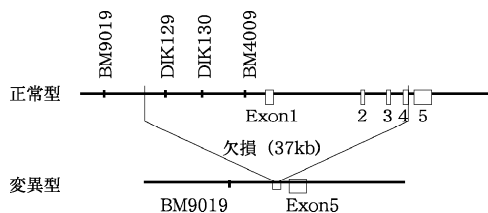
正常型 CTT TTA GCA GTT CAT CCT CCT ACT  
ロイシン ロイシン アラニン バリン ヒスチジン プロリン プロリン スレオニン

↓

変異型 GTT CGT CCT  
アルギニン

CHS 1 はアミノ酸3,081個からなる巨大タンパク質をコードする遺伝子である。このうちの2,051番目のアミノ酸を作る3つの塩基のうち1つが突然変異しているため、本来ヒスチジンになるべき箇所がアルギニンを作るように置き換わっているため疾病が起きる。

(図4) クローニン-16欠損症原因遺伝子 CL16 の欠損遺伝子



CL16は254個のアミノ酸からなるタンパク質をコードしている遺伝子である。異常遺伝子は37Kbの欠損が生じており、このため210個のアミノ酸情報が欠落することにより疾病が起きる。

(図5) モリブデン補酵素欠損症原因遺伝子 MCSU の 3 塩基欠損変異

正常型 AGG AAA ACC TAC TTC GGA GGA  
アルギニン リジン トレオニン チロシン フェニルアラニン グリシン グリシン

↓

変異型 AGG AAA ACC --- TTC GGA GGA  
欠損

MCSUはアミノ酸859個からなるタンパク質をコードしている。このうち257番目のアミノ酸チロシンを作る3塩基が欠損することにより疾病をおこす。