

黒毛和種におけるChediak-Higashi症候群の遺伝子変異と診断(2)

誌名	鹿児島県肉用牛改良研究所研究報告
ISSN	13419064
著者名	山口,浩 溝下,和則 窪田,力 林,史弘 轟木,淳一
発行元	鹿児島県肉用牛改良研究所
巻/号	7号
掲載ページ	p. 26-28
発行年月	2002年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



黒毛和種における Chediak - Higashi 症候群の遺伝子変異と診断 (第2報)

山口浩、溝下和則、窪田力、林史弘、轟木淳一

緒 言

Chediak - Higashi 症候群 (CHS) は、 δ -ストレージプール病 (血小板機能異常症の一疾患) の一つに分類され、止血不全 (出血傾向の増加)・血腫・感染に対する抵抗性の減少・体毛の白色化・赤目・好酸球の異常顆粒などを主症状とする常染色体性劣性遺伝病と考えられており、ヒト、マウス、牛、猫、ミンクなどいくつかの哺乳動物種で報告されている¹⁾。

ウシに於いては、ヘレフォード²⁾、ブランガス³⁾、黒毛和種⁴⁾で報告されているが、和牛の症状は、ヘレフォードに比較して軽度である。しかし、何世代もかけて選抜された優秀な系統に CHS が確認されており、本県でも十数年前より発生が認められている⁵⁾。

我々は比較遺伝学的アプローチにより CHS の原因遺伝子 (CHS1) とその変異を特定し、この変異を迅速かつ正確に検出することでキャリアーを識別する DNA 診断法を確立したことを報告している^{6) 7)}。

本報では、より多くの検体を同時に診断するために、新しいプライマーを設計するとともに、当研究所で得られた DNA サンプルを使いその遺伝子頻度を調査したので、その結果を報告する。

研究方法

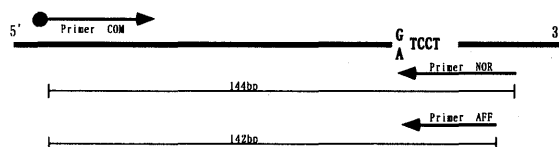
1) Allele-specific PCR (ASPCR) の条件設定

Ugozzoli & Wallace⁸⁾ の方法により Allele specific PCR 法を実施した。CHS1 遺伝子のコンセンサスシーケンスより ASPCR のために用いる3つのプライマーセットを設計し、それぞれの PCR 産物を ABI377 sequencer で同時に検出するために、各セットの共通プライマー (Primer COM) の5'末端を蛍光色素6-FAM、TET、HEX で標識した。(図1)

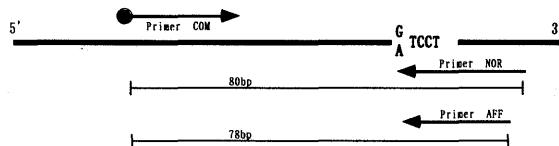
また、同時にそれぞれのプライマーセットを使ったPCRが行えるようにPCRの条件を検討した。

図1. プライマーの設計

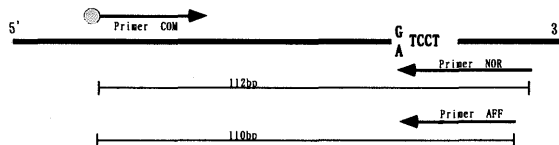
Primer SET1 (FAM)



Primer SET2 (TET)



Primer SET3 (HEX)



2) 遺伝子診断

種雄牛439頭、繁殖牛323頭、直接検定(候補)牛257頭、子牛91頭、肥育牛199頭(計1309頭)について、定法⁹⁾により全血及び凍結精液よりDNAを抽出し、遺伝子診断を実施した。

結 果

1) ASPCR 条件の設定

Primer SET1 : 0.12 μ M each of Primer COM and Primer AFF, 0.04 μ M of Primer NOR, 2% formamide .

Primer SET2 : 0.32 μ M each of Primer COM and Primer AFF, Primer NOR,

Primer SET3 : 0.32 μ M each of Primer COM and Primer AFF, Primer NOR,

1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 200 μ M of each dNTP, 20 ng of template DNA,

PCR 条件:

Initial denature 94°C 5min
 denature 94°C 1min
 annealing 56°C 1min ×29
 extension 72°C 30sec
 final extension 72°C 10min

3つのプライマーセットのPCR条件を同じくすることができた。また、蛍光色素ラベルをかえることで、同一レーンに3検体のPCR産物を流し、検出する事ができた。(図2) 新しいプライマーセットを開発したことにより、検査処理効率を向上することができた。

2) 遺伝子診断

検査総頭数1309頭中、936頭(71.5%)が正常型であった。

平成13年12月現在でDNA材料の入手可能な本県内の種雄牛の遺伝子頻度は正常型:77.2%、保因型:22.1%、欠損型0.7%であった。繁殖牛に関しては、正常型:98.4%、保因型:29.7%、欠損型:1.9%であった。(表1)

表1. 遺伝子診断結果

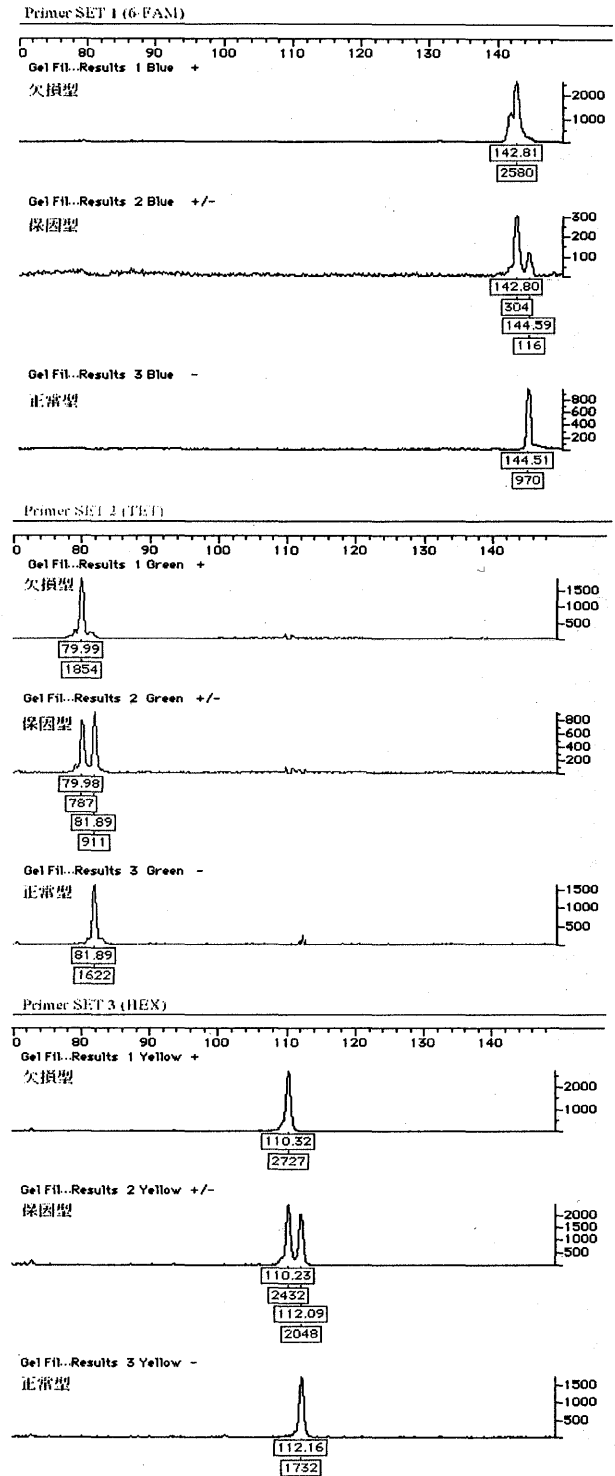
	正常型	保因型	欠損型	頭数 (%)
種雄牛	339 (77.2)	97 (22.1)	3 (0.7)	439
繁殖牛	221 (68.4)	96 (29.7)	6 (1.9)	323
子牛	60 (65.9)	21 (23.1)	10 (11.0)	91
肥育牛	132 (66.3)	62 (31.2)	5 (2.5)	199
直接検定牛 (候補牛)	184 (71.6)	72 (28.0)	1 (0.4)	257
全 計	936 (71.5)	348 (26.6)	25 (1.9)	1309

まとめ

これまで、和牛の牛バンド3欠損症・牛第 XIII 因子欠損症・牛クローニン 16 欠損症については家畜改良事業団により遺伝子診断が全国的に行われてきたが、平成14年2月より新たにCHS及び牛モリブデン補酵素欠損症に関しても遺伝子診断が実施されることになった。

遺伝的改良形質を排除するためには、不良因子を持つ個体を淘

図2 PCR産物の検出

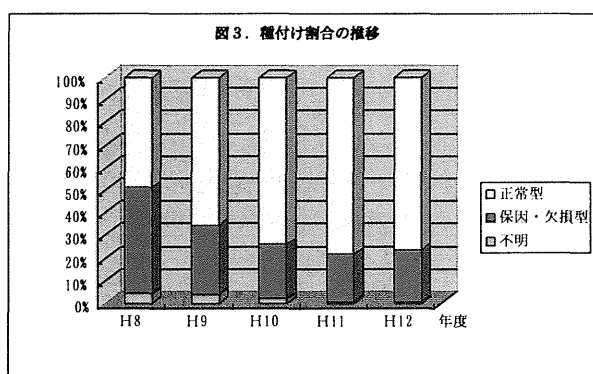


汰することが最も早い方法であるが、経済動物である牛では、その個体の持つ優良形質についても考慮されるべきである。平成13年8月には遺伝性疾患専門委員会より「疾病遺伝子をヘテロの状態で保有している雄牛については、本牛自体は正常であること、

交配する雌牛を選択して後代を生産すれば遺伝性疾患の発生を抑制出来ることから種畜としての利用をすべて排除する必要はない。」という肉牛の遺伝性疾患に対する対応方針がだされている。

県内の種雄牛に関して可能な限り検査した結果、CHSの因子を持つ割合は、保因型・欠損型を合わせて22.8%であった。欠損型を持つ種雄牛に関しては既に廃用及び廃用計画がなされている。また保因型の種雄牛に関しては、その精液の使用割合がCHSの解析に取り組み始めた平成9年以前に比べ約2分の1に減少していることより、CHSの発生頻度及び繁殖基牛の遺伝子頻度は減少しているものと考えられる。(図3)

また、当研究所では平成11年より試験的に直接検定牛の候補



牛選抜の1指標として本診断法を導入しており、これまでに257頭の検査を実施している。その結果、平成12年度以降導入された直接検定牛からは、CHSを排除しながら、種雄牛造成がなされている。また平成13年11月以降は民間種雄牛にも取り入れられており、本県の種雄牛造成に関しては、確実にCHSの清浄化が進んでおり、種雄牛をコントロールすることで、今後、本病の発生は押さえられていくものと考えられる。

参考文献

- 1) Collier L.L., D.J. Prieur and E.J. King. 1984. Ocular melanin pigmentation anomalies in cats, cattle, mink, and mice with Chediak-Higashi syndrome: histologic observations. *Curr. Eye Res.* 3:1241-1251.
- 2) Burns G.L., K.M. Meyers and D.J. Prieur. 1984. Secondary amyloidosis in a bull with Chediak-Higashi syndrome. *Can. J. Comp. Med.* 48:113-114.
- 3) Ayers J.R., H.W. Leipold and G.A. Padgett. 1988. Lesions

in Brangus cattle with Chediak-Higashi syndrome. *Vet. Pathol.* 25:432-436.

4) Ogawa H., C.H. Tu, H. Kagamizono, K. Soki, Y. Inoue, H. Akatsuka, S. Nagata, T. Wada, M. Ikeya, S. Makimura, K. Uchida, R. Yamaguchi and H. Otsuka. 1997. Clinical, morphologic, and biochemical characteristics of Chediak-Higashi syndrome in fifty-six Japanese black cattle. *Am. J. Vet. Res.* 58:1221-1226.

5) 阿久沢正夫・小野和則・森園充・田代哲之・安田宣紘. 1984. 鹿兒島県で発生した牛の血腫に関する臨床血液学的研究. 鹿兒島大学農学部学術報告 第34号

6) 山口浩, M・Agaba, 窪田力, 溝下和則, 轟木淳一, 杉本喜憲, 田原則雄. 2001. 黒毛和種における Chediak - Higashi 症候群の遺伝子変異と診断. 鹿兒島県肉用牛改良研究報告第6号.

7) H. Yamakuchi, M. Agaba, T. Hirano, J. Todoroki, K. Mizoshita, C. Kubota, N. Tabara, Y. Sugimoto. Chediak-Higashi syndrome mutation and genetic testing in Japanese Black Cattle (Wagyu) *Animal Genetics*, 2000, 31, 13-19

8) Ugozzoli L. and R.B. Wallace. 1992. Application of an allele-specific polymerase chain reaction to the direct determination of ABO blood group genotypes. *Genomics* 12:670-674.

9) 溝下和, 窪田力, 轟木淳一, 山口浩, 猪八重悟, 杉本喜憲. 1997. ウシのミトコンドリア DNA の解析. 鹿兒島県肉用牛改良研究報告第2号.