

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	Md Shafiqul Islam
審査委員	主査 鹿児島大学 矢吹 映
	副査 山口大学 高木 光博
	副査 山口大学 西垣 一男
	副査 鹿児島大学 小原 恭子
	副査 鹿児島大学 三浦 直樹
審査協力者	印
題 目	Study on genetic markers in the bovine <i>IARS</i> and <i>FOXP3</i> genes associated with reproductive performance in cattle 牛の繁殖成績に関連する牛 <i>IARS</i> および <i>FOXP3</i> 遺伝子の遺伝的マーカーに関する研究
審査の要旨： 申請者の Md Shafiqul Islam 氏は、牛の <i>IARS</i> および <i>FOXP3</i> 遺伝子における遺伝子マーカーのアレル頻度を調査し、それぞれの遺伝子マーカーの各遺伝子型の繁殖成績との関連性を分析し、これら遺伝子マーカーと繁殖成績との関連性を評価した。これらの遺伝子マーカーが牛の繁殖成績の向上に利用できるか否かを検証するために、以下の第 1 章と第 2 章の研究が実施された。 第 1 章：Metabolic profile and reproductive performance of Japanese Black cows associated with bovine isoleucyl-tRNA synthetase ( <i>IARS</i> ) gene mutation (黒毛和種牛におけるイソロイシル-tRNA 合成酵素 ( <i>IARS</i> ) 遺伝子の変異と代謝プロファイル試験および繁殖成績との関連性) 虚弱子牛症候群の主要な原因の一つである牛 <i>IARS</i> 異常症は、黒毛和種 (JB) 牛の <i>IARS</i> 遺伝子におけるミスセンス変異 (c.235G>C) のホモ接合によって生じることが知られている。しかし、鹿児島県の JB 牛群における変異アレル頻度やキャリア率は調査されておらず、さらに保因牛 (キャリア) の臨床状態や繁殖成績は分析・評価されていなかった。本研究では、この変異に対するリアルタイム PCR 法による遺伝子型検査を開発・使用して、鹿児島県の JB 繁殖牛集団 (計 592 頭) におけるキャリア率を決定した。さらに、本変異に関連する野生型ホモ接合体牛群とヘテロ接合体キャリア牛群における代謝プロファイル試験 (MPT) 成績および繁殖成績データが分析・評価された。その結果、2009 年に収集された臨床的に健康な JB 繁殖牛 130 頭と 2018 年に集取された同 462 頭において、キャリア率はそれぞれ 6.9% および 1.5% であった。また、その差は統計学的に有意 ( $P < 0.005$ ) であったため、2009 年から 2018 年にかけて減少したものの依然キャリアは存在することが明らかとなった。また MPT 成績と繁殖成績データは、2018 年に集取された牛群におい	

て4頭のヘテロ接合体キャリアと58頭の野生型牛からなる62頭の飼育条件が同一の牛群について評価した。しかし、両牛群間に統計学的に有意差は認められなかったため、キャリア牛群でも野生型牛と変わらない一定の繁殖能力を有していると考えられた。しかし、キャリア牛ではMPT成績で糖（グルコースの低値）と脂肪（中性脂肪、遊離脂肪酸および総コレステロールの高値）の異常値を示す個体が認められ、野生型牛よりも治療回数が多く治療費が高い傾向を示したため、なんらかの代謝異常の可能性があり、キャリア牛においては疾病率が高い傾向にあることが推測された。このため、同変異を有する繁殖牛は、生産性や繁殖性に影響を及ぼす可能性があるため、繁殖牛群から除いていくことが適切であると考えられた。

第2章：Frequency of an X-linked maternal variant of the bovine *FOXP3* gene associated with infertility in cattle: A comparative analysis of Japanese Black, Holstein Friesian, Korean Hanwoo, and Indonesian Madura cows (牛の不妊症に関連する *FOXP3* 遺伝子の X 連鎖性多型のアレル頻度：黒毛和種牛、ホルスタイン-フリージアン牛、韓国の韓牛およびインドネシアのマドゥーラ牛の比較分析)

*FOXP3*+制御性 T (Treg) 細胞に関連して調節されている免疫寛容や免疫応答は、妊娠の成立に重要な役割を果たしている。最近、JB 牛において *FOXP3* 遺伝子の開始コドン上流に位置する X 連鎖性一塩基多型 (SNP) が同定され (NC\_037357.1:g.87298881A>G, rs135720414)、これが JB 繁殖牛の不妊性 (リピートブリーディング) に関連していることが示唆された。本研究では、この SNP に対するリアルタイム PCR 法による遺伝子型検査を開発し、国内外の様々な牛品種におけるアレル頻度を調査・解析し、同 SNP が繁殖成績に関連しているかどうかを評価した。調査された雌牛は、JB 牛 (*Bos taurus*) 581 頭、ホルスタイン-フリージアン牛 (HF: *B. taurus*) 73 頭、韓牛 (KH: *B. taurus coreanae*) 125 頭、マドゥーラ牛 (IM: *B. indicus* および *B. javanicus* の交雑種) 30 頭の計 809 頭であった。また、HF 牛に関しては、69 頭の経産牛と 39 頭の未経産牛を用いて、本 SNP の遺伝子型と繁殖成績に関連するとされている抗ミュラー管ホルモン (AMH) および炎症マーカーの一つである血清アミロイド A (SAA) 濃度との関連性についても調査した。その結果、不妊に関連すると考えられる同 SNP の G アレル頻度は、IM 牛 (0.700) で高く、乳牛の HF 牛 (0.466) で中等度であり、肉牛の JB 牛 (0.250) と KH 牛 (0.112) で比較的低く、各品種間の頻度には統計学的に有意差 ( $P < 0.005$ ) が認められた。この結果から、G アレル頻度と不妊との関連性は、アレル頻度が品種や牛の用途ごとに大きく異なるため、品種毎に調査してその対策を個別に立案する必要があると考えられた。また、HF 牛に着目した調査では、本 SNP の野生型ホモ接合体である A/A 型経産牛の AMH 濃度は、A/G および G/G 型の経産牛よりも有意に ( $P < 0.05$ ) 高かったため、A/A 型経産牛が他の遺伝子型の経産牛よりも高い繁殖性を有している可能性が示唆された。一方、この傾向は未経産牛では観察されなかったため、遺伝的素因による繁殖成績の低下は経年的に助長される可能性が考えられた。さらに、HF 経産牛において、AMH と SAA の相関関係を調査したところ、統計学的有意性はなかったものの A/A 型の牛で負に相関する傾向 ( $P = 0.00528$ ) が観察されたため、炎症状態にない A/A 型経産牛では AMH が適度に分泌されているが、G アレルを有する牛 (A/G および G/G 型) では炎症状態でない場合も AMH 分泌が不十分である可能性が示唆された。すなわち、本 SNP は AMH 分泌や炎症などを介して、繁殖性や不妊に関連していると推測された。

以上のように、申請者は、JB 牛における *IARS* 遺伝子変異の鹿児島県におけるキャリア頻度の経年変化を明らかにし、MPT と繁殖成績を分析することでキャリア牛が疾病に関連する可能性を示した。また、*FOXP3* 遺伝子の SNP については、牛の品種や用途で大きく異なることを証明するとともに、国内の FH 乳牛においては同 SNP の遺伝子型と AMH および SAA 濃度が密接に関連する可能性を示した。これによって、同 SNP が繁殖成績に関連する可能性が強くとともに、それぞれの牛品種で調査し個別の対策を立案することで、各牛群の繁殖性向上に貢献することが示された。

以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位に十分に値すると判断された。