

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	ジョージ ムサリヤ
題 目	ウシ属におけるプリオン遺伝子の遺伝的評価と遺伝子発現における2種類の indel 多型の機能に関する研究 (Genetic evaluation of the prion protein gene in the genus <i>Bos</i> and function of two indel polymorphisms in its gene expression)
<p>[目的] プリオン遺伝子(<i>PRNP</i>)はプリオンタンパクの情報を持つ遺伝子である。ウシ海綿状脳症(BSE)は、プリオンタンパクの異常型により発症する。現在までにヒト、ヒツジ、マウスで <i>PRNP</i> の多型がそれらのプリオン病の感受性に影響することが知られている。現在、<i>PRNP</i> の多型との BSE 感受性との関係については、プロモーターの 23-bp の挿入/欠失(indel)多型が有意に影響するという報告、翻訳領域中にある 8 アミノ酸残基の遺伝情報をもつオクタペプチドリピート配列の反復回数の少ない方が BSE に罹りにくいという報告がある。本研究は、ウシ <i>PRNP</i> の多型に関して、① ウシ属(和牛、アジア在来牛、ミタン)における分布状況の調査、② 和牛の脊髄における遺伝子発現への効果を検討した。</p> <p>[材料と方法] 研究① 解析したプリオン遺伝子(<i>PRNP</i>)多型は、プロモーターにある 23-bp の indel、イントロン 1 の 12-bp の indel、翻訳領域では 2 種類のアミノ酸置換を伴う SNPs (K3T、S154N)とオクタペプチドリピート、3'UTR の 14-bp の indel の合計 6 種類だった。調査したウシ属サンプルは 752 頭の血液または精液から抽出したゲノム DNA だった。ウシ集団は東南アジア(SEA)の在来牛 7 集団、日本の 7 品種、ドイツのウシ集団を調査した。得られた遺伝子型からハプロタイプを推定した。</p> <p>研究② 本研究で用いた <i>PRNP</i> 多型は、転写調節因子結合配列を有する 23bp と 12bp の indel だった。供試材料は、BSE 陰性の黒毛和種 120 頭と褐毛和種 98 頭の延髄から抽出したゲノム DNA と総 RNA だった。ゲノム DNA から 23-bp と 12-bp の indel の遺伝子型(いずれも ++、+-、--型)を決定し、diplotype (23bp 遺伝子型/12bp 遺伝子型)としてまとめた。他方、総 RNA から cDNA を合成し、リアルタイム PCR により <i>PRNP</i> の遺伝子発現量を定量した。内部標準にはベータアクチン(<i>ACTB</i>)を用いた。得られた発現量を diplotype 間や品種間で比較検討した。</p> <p>[結果] 研究① 調査した 6ヶ所すべての部位で多型があった。23-bp の indel は欠失(-)の対立遺伝子が 2 集団を除くすべてで頻度が高く、12-bp の indel は挿入(+)の対立遺伝子が 3 集団を除くすべてで頻度が高かった。K3T は SEA の 5 集団を除くすべてで KK 型だった。S154N は、全 SEA 集団とドイツの集団で多型が得られ、それ以外は SS 型だった。オクタペプチドリピートは繰り返し数 6 回の頻度が高かった。14-bp の indel は+対立遺伝子の頻度が高かった。ハプロタイプは 37 種類推定された。</p> <p>研究② 2 品種で多数観察された --/--型と +-/+型について遺伝子発現量を比較した結果、どちらの品種でも --/--型 &gt; +-/+型となった (<math>P &lt; 0.05</math>)。どちらの diplotype でも褐毛和種 &gt; 黒毛和種となった (<math>P &lt; 0.001</math>)。次に、23-bp と 12-bp の indel のどちらが遺伝子発現に影響するのかを検討した。その結果、遺伝子発現量は、各品種で 23-bp indel の遺伝子型で -- &gt; +- &gt; ++、12-bp indel で -- &gt; ++ &gt; +- となり、23-bp の挿入が遺伝子発現を抑制している効果が認められた。以上、本研究の成果は、<i>PRNP</i> の遺伝的変異とその発現に関する基礎的かつ重要な知見になるものと期待される。</p>	

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名

GEORGE MSALYA

題 目

Genetic evaluation of the prion protein gene in the genus *Bos* and function of two indel polymorphisms in its gene expression  
(ウシ属におけるプリオン遺伝子の遺伝的評価と遺伝子発現における2種類のindel多型の機能に関する研究)

**Background:** This study was carried out to analyze polymorphisms and expression of the bovine *prion protein* gene (*PRNP*). *PRNP* is one of the genes associated with the occurrence of bovine spongiform encephalopathy (BSE). BSE belong to a group of fatal neurodegenerative diseases known as transmissible spongiform encephalopathies or prion diseases which affect humans and animals. The diseases are caused by abnormal folding of the prion protein (PrP).

**Methodology/Results:** Six *PRNP* loci including a 23-bp indel in the promoter, a 12-bp indel in the first intron, a 14-bp indel in the 3' untranslated region, 24/27-bp octapeptide repeat units in the third exon and two single nucleotide polymorphisms namely K3T and S154N were studied in seven native populations of South-East Asian (SEA) countries and seven Japanese breeds. These loci play different roles in either incubation or susceptibility of BSE. Also, the expression of *PRNP* was studied in Japanese Black and Brown cattle. [1] The - was the major allele at the 23-bp indel locus except in two populations while the + was the major allele at the 12-bp indel loci except in three populations. These loci were polymorphic in SEA animals, in five Japanese breeds, and in Germany cattle. [2] K3T was monomorphic for a K except in five SEA populations. The 6 repeats was the major allele at the octarepeat locus whereas the + was the major allele at the 14-bp indel. S154N was polymorphic in the SEA and Germany animals but monomorphic for an S in the Japanese breeds. [3] Thirty five haplotypes were inferred from these loci. [4] *PRNP* expression showed a significant difference ( $P < 0.05$ ) between Japanese Black and Brown breeds, diplotypes --/-- and +/-/, also among genotypes and alleles of the two indels. The absorbance of PrP was greater in the ++/++ diplotype than in the +/-/+ and --/--.

**Conclusion:** The ranges observed for the allele, genotype, and haplotype frequencies reflect regional differences in selection and breeding programs. The 23-bp - allele and the -- genotype likely cause an increase in the expression of *PRNP*.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	GEORGE MSALYA
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 岡本 新
	副査 鹿児島 大学 准教授 侯 徳興
	副査 佐賀 大学 教授 和田 康彦
	副査 琉球 大学 教授 川本 康博
	副査 琉球 大学 教授 及川 卓郎
審査協力者	
題 目	Genetic evaluation of the prion protein gene in the genus <i>Bos</i> and function of two indel polymorphisms in its gene expression (ウシ属におけるプリオン遺伝子の遺伝的評価と遺伝子発現における2種類のindel多型の機能に関する研究)
<p>プリオン遺伝子(PRNP)はプリオンタンパク質の情報を持つ遺伝子である。ウシ海綿状脳症(BSE)は、プリオンタンパク質の異常型により発症する。これまでにヒト、ヒツジ、マウスで PRNP の多型がそれらのプリオン病の感受性に影響することが知られている。現在、PRNP の多型と BSE 感受性との関係については、プロモーターの 23-bp の indel 多型が有意に影響するという報告および翻訳領域中にある 8 アミノ酸残基の遺伝情報をもつオクタペプチドリピート配列の反復回数の少ない方が BSE に罹りにくいという報告がある。</p> <p>本研究は、ウシ PRNP の多型に関して、① ウシ属(和牛、ヨーロッパ牛、アジア在来牛、ミタン)における分布状況の解析、および② 和牛の脊髄における遺伝子発現の影響について検討した。本研究によって得られた知見は以下のように要約できる。</p> <p>供試したウシは、東南アジア(SEA)の在来牛7集団、日本の7品種およびドイツのウシ集団計752頭であった。さらにこれらのウシより採取した血液または精液</p>	

からゲノム DNA を抽出した。ウシ *PRNP* は約 20kb の長さがあり、3つのエクソンと2つのイントロンより構成されている。*PRNP* の多型解析は、プロモーター領域にある 23-bp の indel およびイントロン 1 の 12-bp の indel、翻訳領域では2種類のアミノ酸置換を伴う SNPs (K3T、S154N) およびオクタペプチドリピート、3'UTR の 14-bp の indel の合計 6 座位について行った。これらの座位について、観察された表現型から遺伝子頻度を算出し、さらに得られた遺伝子型からハプロタイプを推定した。解析した 6 座位すべてにおいて多型が検出された。23-bp の indel は欠失の対立遺伝子がミタンおよびドイツ集団を除くすべての集団で頻度が高く、また 12-bp の indel は挿入の対立遺伝子が黒毛和種、褐毛和種および口之島野生化牛を除くすべての集団で頻度が高いことが判明した。K3T は SEA の 5 集団を除くすべてで KK 型だった。S154N は、SEA およびドイツの集団で多型が得られ、日本の 7 品種はすべて SS の単型を示した。オクタペプチドリピートは繰り返し数 6 回が最も多く認められた。14-bp の indel は挿入の頻度がすべての集団において高かった。ハプロタイプは 37 種類と推定された。これらの情報は日本を含むアジアのウシについて同時に解析した初めてののものであり、極めて重要であると考えられる。

次に BSE 陰性の黒毛和種 120 頭と褐毛和種 98 頭の延髄から抽出したゲノム DNA と総 RNA を用いて、転写調節因子結合配列を有する 23-bp と 12-bp の indel について解析した。まずゲノム DNA から 23-bp と 12-bp の indel の遺伝子型(++、+-、--型)を決定し、diplotype (23-bp 遺伝子型/12-bp 遺伝子型)としてまとめた。さらに総 RNA から cDNA を合成し、リアルタイム PCR により *PRNP* の遺伝子発現量を定量した。内部標準にはベータアクチン(*ACTB*)を用い、得られた発現量を diplotype 間や品種間で比較検討した。2 品種で多数観察された--/--型と+/-/+型について遺伝子発現量を比較した結果、どちらの品種でも--/--型 > +/-/+型を示し( $P < 0.05$ )、両 diplotype でも褐毛和種 > 黒毛和種となった( $P < 0.001$ )。また 23-bp と 12-bp の indel 遺伝子発現量は、各品種で 23-bp indel の遺伝子型で-->+>++、12-bp indel で-->++>+-となり、特に 23-bp の挿入が遺伝子発現を抑制している効果が示唆され *PRNP* の遺伝的変異とその発現に関する基礎的かつ重要な知見が得られた。

以上の成果は、*PRNP* 遺伝子と BSE の関連を探るうえで大いに寄与するものであると考えられ、審査員一同、本論文が博士(農学)の学位論文として十分価値があるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏 名	GEORGE MSALYA
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 岡本 新
	副査 鹿児島 大学 准教授 侯 徳興
	副査 佐賀 大学 教授 和田 康彦
	副査 琉球 大学 教授 川本 康博
	副査 琉球 大学 教授 及川 卓郎
審査協力者	
実施年月日	平成23年 1月 22日
試験方法（該当のものを○で囲むこと。） <span style="float: right;"> <input checked="" type="radio"/> 口答             <input type="radio"/> 筆答           </span>	
<p>主査および副査は、平成23年1月22日の公開審査会において学位申請者に対して学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏 名	GEORGE MSALYA
[質問 1]	<i>PRNP</i> の発現量がふえるとBSEの感受性が高まるのでしょうか。
[回答 1]	プリオンタンパク質は、 <i>PRNP</i> が転写、翻訳されることで生産されます。BSEは正常型のプリオンタンパク質が異常型に変換・蓄積されることで発症しますので、正常型の量が多いと病気に対する感受性が高まると予想されます。したがって、 <i>PRNP</i> の発現量が増加するとBSEの感受性も増加すると予想します。また、 <i>PRNP</i> の発現は本遺伝子に存在する変異によって左右されていると考えられます。
[質問 2]	プリオンタンパク質が増加するとそれ自体が変化して異常タンパク質が増えるのですか。
[回答 2]	本研究では、正常なウシを用いています。どのようにプリオンタンパク質が変化していくかは不明ですが、量を問わず、異常型のプリオンタンパク質が共存しないと変化しません。ただ、正常型のプリオンタンパク質の量が多いと異常になる時期が早まると言えます。
[質問 3]	生体内でのプリオンタンパク質の機能は何ですか。
[回答 3]	プリオンタンパク質は主にニューロンの成長と細胞間のコミュニケーションに関係があると言われていています。ノックアウトマウスを用いた実験では、プリオンタンパク質が生産できないような状況でも著しい異常は見られなかったという報告があります。ただ家畜ではまだそのような研究報告はありません。
[質問 4]	<i>PRNP</i> はどのような組織で発現しているのでしょうか。また本研究ではどの組織を用いて発現を確認したのですか。
[回答 4]	<i>PRNP</i> の発現は様々な臓器で確認が観察されています。なかでも主に脳において発現していると報告されています。また肝臓でも見られます。本研究では、食肉センターより入手した延髄をサンプルに <i>PRNP</i> の発現を調べました。
[質問 5]	BSEの発症には、 <i>PRNP</i> だけが関わっているのですか。他の遺伝子の関与はないのですか。
[回答 5]	QTL解析等の手法を用いてBSEに関係するいくつかの遺伝子が検索されていますので、他の遺伝子の関与もあると予想されます。ただ、現在

はPRNPが最も注目されており、その変異と発症との関係について解析が進められています。今後、他の関与する遺伝子も見つかる可能性はあると思います。

[質問6] 今回の日本のウシについて得られたデータは、他の国でも同じように認められますか。また、今後はどのように解析を進めるか考えはありますか。

[回答6] 得られたデータは、他の国でもほぼ同じような結果となっています。また、PRNPについては今回解析した6カ所以外の変異が報告されています。今後は、それらの変異についても十分に検討する必要があると考えます。

[質問7] 6カ所の変異は、BSEについてはまずここを調べれば十分であるというコンセンサスがあるのですか。

[回答7] そのような考え方はありません。ただこれまで感染したウシを分析した結果、23-bpおよび12-bpの両indelにおいてともに欠損型が多く報告されています。また、コーディング領域についてはその変異がタンパク質生産に直接関係するので調査しました。これ以外の変異も重要であると思います。今は、それらの関係をすべて調べ基礎情報を収集することが大事だと思います。

[質問8] 和牛においてリピートユニットの変異は見られないと判断しているのですか。

[回答8] ここでご報告した通り、和牛では、リピートユニットが5回と6回の対立遺伝子が見つかっています。したがって、変異はあります。

[質問9] 和牛、アジア在来牛の情報からBSEに対して耐性をもつウシの育種は可能ですか。

[回答9] 現在まだ情報集めている状態で、そこまでの可能性は何とも言えません。また飼養管理等を含めBSEには様々な問題が関与していると思います。したがって本研究では交配までは視野に入れませんでした。

[質問10] ORFのSNPは黒毛和種で調べたのは2つだけですか。

[回答10] ORFについては、本研究では2つのSNPとリピートユニットについて調査しました。ここにはSNPをはじめとする変異がまだ存在しています。今回は分析しませんでした。詳細に分析していくことが必要です。