

学位論文要旨	
氏名	下桐 猛
題目	<p>放射線雑種細胞(RH)パネルを用いた家畜遺伝子のマッピングとヒト-家畜比較地図の作成に関する研究 (The studies on gene mapping in domestic animals and construction of comparative map between human and domestic animals using radiation hybrid (RH) panel)</p>
	<p>近年のゲノム解析の進展により、ブタを含めた家畜では経済的に重要な形質に関する量的形質遺伝子座(QTL)の染色体上の位置が明らかにされた。しかしながら、量的形質遺伝子座に関わる候補遺伝子を同定するまでにはいたっていない。この理由は、ブタなどの家畜の遺伝子地図情報が不十分であるからである。比較遺伝学的アプローチは、候補遺伝子を同定するための効率的な手法の1つである。また、本アプローチは進化学的解析についても考察が可能である。そこで、本研究では、放射線雑種細胞(RH)パネルを用いて以下のような比較遺伝学的研究を行なった。</p> <p>まず、候補遺伝子を効率的に選択できるように、ヒト染色体(HSA)とブタ染色体(SSC)との対応関係を調査した。すなわち、1) HSA17に座乗する208遺伝子をSSCs上に位置づけた。その結果、HSA17上の204遺伝子がSSC12に位置づけられた。HSA17とSSC12の遺伝子の位置を比較した結果、染色体の再編成が多数観察された。他方、SSC12とマウス11番染色体との間では大きな染色体の再編成は認められなかった。2) HSA5に座乗する117遺伝子をSSCsに位置づけた。その結果、HSA5の117遺伝子のうち67遺伝子がSSC2q、48遺伝子がSSC16に位置づけられた。同様に、HSA5とSSC2q/SSC16の遺伝子の位置を比較した結果、HSA5とSSC2qの間、HSA5とSSC16の間で少なくとも2箇所ずつ染色体の再編成が起こっていることが明らかとなった。3)ニワトリは尿酸排泄動物であるので、尿素サイクルを必要としない。また、本サイクルの初発酵素であるCPSIは進化の過程で消失したと考えられており、2番目の酵素であるOTCは、酵素活性のない個体も正常に生存できる。しかしながら、OTC遺伝子を、活性を示す個体としない個体との間で比較した結果、cDNAやプロモーター中に変異が同定されなかった。そこで、A)ニワトリCPSIオーソログの同定、B) RHマッピングによる尿素サイクルにかかわる遺伝子(CPSI・OTC・CRYD2・ARG2・ASS)のニワトリ染色体(GGA)上の位置を調査した。その結果、ヒトCPSIと10⁻¹¹⁹の類似性を示すexpressed sequence tag (EST)が同定され、ヒトCPSIが座乗するHSA2qと対応のあるGGA7に位置づけられた。したがって本ESTがニワトリCPSIオーソログであると決定した。また、OTCはGGA1に、CRYD2はGGA19に、ARG2はGGA5に、ASSは特定の染色体に同定できなかつた。</p> <p>本研究の結果から、1) QTLの候補遺伝子の探索、2) 家畜のゲノム概要配列解読に向けたBACコンティグの構築、3) 種の分化に関わる染色体の進化の解明につながることが期待される。</p>

学位論文要旨	
氏名	SHIMOGIRI Takeshi
題目	<p>The studies on gene mapping in domestic animals and construction of comparative map between human and domestic animals using radiation hybrid (RH) panel (放射線雜種細胞(RH)パネルを用いた家畜遺伝子のマッピングとヒト-家畜比較地図の作成に関する研究)</p>
<p>In recent years, extensive linkage analyses performed in domestic animals including pig have revealed the genomic regions (QTL) involved in economically important traits (ETs). However, identification of genes responsible for ETs remains difficult because available mapping information on the genome of domestic animals including pig is insufficient. In the process for the identification of genes or sequences responsible for ETs, the comparative genetic approach has been one of the most important tools. In addition, such an approach provides clues to an enhanced understanding of genome evolution. In this study, we performed the following comparative genetic researches using radiation hybrid (RH) panel. First, in order to select the candidate genes efficiently, we investigated the correspondence between human chromosomes (HSAs) and porcine chromosomes (SSCs). 1) 208 orthologs located on HSA17 were assigned to SSCs. These results showed 204 genes were located on SSC12. Correspondences of gene positions between HSA17 and SSC12 revealed many chromosomal rearrangements between two chromosomes. Correspondences of gene positions between SSC12 and MMU11 revealed that no large rearrangement was observed. 2) 117 orthologs located on HSA5 were assigned to SSCs. Out of 117 orthologs, 67 were located on SSC2q; 48, on SSC16. Correspondences of gene positions between HSA5 and SSC2q/SSC16 revealed that the conserved synteny between HSA5 and SSC2q is interrupted by at least two sites and that between HSA5 and SSC16 is also interrupted by at least two sites. 3) Chicken is uricotelic animals and is believed to have no functional urea cycle. In addition, CPSI catalyzing the first step of urea cycle is believed to have been lost in chickens during evolution. Concerning OTC catalyzing the second step of urea cycle, the absence of this activity has no effect on chick survival. However, the sequence comparison between <i>OTC</i> genes showing high activity and that of no activity revealed no polymorphism correlated with variation in activity. Therefore, we investigated A) the identification of <i>CPSI</i> orthologs and B) RH mapping of five urea cycle genes (<i>CPSI</i>, <i>OTC</i>, <i>CRYD2</i>, <i>ARG2</i> and <i>ASS</i>). Expressed sequence tag showing similarity of e-value 10^{-119} to human <i>CPSI</i> in blastn analysis was isolated. This EST was assigned to GGA7 corresponding to HSA2q locating on <i>CPSI</i>. These findings strongly suggest that this EST is <i>CPSI</i> orthologs in chicken. <i>OTC</i> was assigned to GGA1; <i>ARG2</i> to GGA5; <i>CPSI</i> to GGA7; and <i>CRYD2</i> to GGA19. <i>ASS</i> was not, however, assigned to a specific chromosomal position. The present study has provided 1) a very promising tool for selecting candidate genes for traits, 2) the construction of the BAC contigs for genome sequencing of domestic animals, and 3) clues to understand the chromosomal evolution in species speciation.</p>	

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	下 桐 猛		
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 前田 芳實		
	副査 鹿児島 大学 教授 岡本 新		
	副査 琉球 大学 教授 仲田 正		
	副査 佐賀 大学 教授 和田 康彦		
	副査 鹿児島 大学 助教授 侯 德興		
審査協力者	(独)農業生物資源研究所 上級研究員 安江 博		
題 目	放射線雑種細胞(RH)パネルを用いた家畜遺伝子のマッピングとヒト・家畜比較地図の作成に関する研究 <i>(The studies on gene mapping in domestic animals and construction of comparative map between human and domestic animals using radiation hybrid (RH) panel)</i>		
<p>近年のゲノム解析の進展により、ブタを含めた家畜では経済的に重要な形質に関する量的形質遺伝子座(QTL)の染色体上の位置が明らかにされた。しかしながら、量的形質遺伝子座に関わる候補遺伝子を同定するまでには至っていない。この理由は、各家畜の遺伝子地図情報が不十分であるからである。比較遺伝学的アプローチは、候補遺伝子の同定や染色体の進化について効率的な戦略の1つである。そこで、本研究では、放射線雑種細胞(RH)パネルを用いて以下のような比較遺伝学的研究を行なった。概要は以下のとおりである。</p> <p>1) 候補遺伝子を効率的に選択できるように、ヒト染色体(HSA)とブタ染色体(SSC)との対応関係を調査する1つとして、HSA17に座乗する208個の遺伝子をブタ染色体上に位置づけた。その結果、HSA17上の204個の遺伝子がSSC12に位置づけられた。HSA17とSSC12の遺伝子の位置を比較した結果、染色体の再編成が多数観察された。他方、SSC12とマウス11番染色体(MMU11)との間では染色体の大きな再編成は認められなかつた。そこで、これまでに報告されているSSC12上のQTL領域についてMMU11での対応</p>			

を調査した結果、4形質のQTLがMMU11の116Mb～119Mb、7形質のQTLが97Mb～115MB、6形質のQTLが68Mb～87Mbの領域に存在することが推定された。

2) 1)と同様にHSA5に座乗する117個の遺伝子をブタ染色体上に位置づけた。その結果、HSA5の117個の遺伝子のうち67個の遺伝子がSSC2q、48個の遺伝子がSSC16に位置づけられた。HSA5とSSC2q／SSC16の遺伝子の位置を比較した結果、HSA5とSSC2qの間、HSA5とSSC16の間で少なくとも2箇所ずつ染色体の再編成が起こっていることが明らかとなった。また、マウス染色体(MMU)との対応関係も調査した結果、SSC2qはMMU1、MMU11、MMU13、MMU17、MMU18の5つのMMUと、SSC16はMMU11、MMU13、MMU15の3つのMMUと対応していることが示された。

3) ニワトリは尿酸排泄動物であるので、尿素サイクルを必要としないと考えられている。また、本サイクルの初発酵素であるCPS1は進化の過程で消失し、2番目の酵素であるOTCは酵素活性のない個体も正常に生存できることから、生理的に無意味な酵素であると考えられている。しかしながら、酵素活性を示す個体と示さない個体との間で*OTC*遺伝子の構造を比較した結果、両タイプ間でcDNAやプロモーター中に変異が同定されなかった。それゆえ、進化の過程で失われたと考えられている*CPS1*もゲノム上に存在するかもしれないと考えた。そこで、A) ニワトリ*CPS1*オーソログの同定、B) RHマッピングによる尿素サイクルに関わる遺伝子(*CPS1*・*OTC*・*CRYD2*・*ARG2*・*ASS*)のニワトリ染色体(GGA)上の位置を調査した。その結果、ヒト*CPS1*とe⁻¹¹⁹の類似性を示すcDNAが同定され、ヒト*CPS1*が座乗するHSA2qと対応のあるGGA7に位置づけられた。したがって本cDNAがニワトリ*CPS1*オーソログであると決定した。また、*OTC*はGGA1に、*CRYD2*はGGA19に、*ARG2*はGGA5に同定された。*ASS*は既知のマーカーと連鎖しなかったために特定の染色体に同定できなかったものの、新しい連鎖群を形成した。

本研究の結果、RHパネルを用いて効率的に家畜家禽の高密度遺伝子地図が作成できた。また、この地図を利用することで、① QTLの候補遺伝子領域の選別、② 種の分化に関する染色体の進化の解明に有効であることが示唆された。これらの研究で得られた情報は、今後の家畜の改良や家畜ゲノム解析に大いに貢献するものである。本審査委員会は、本研究の成果が博士の学位論文として十分な価値を有するものと判断した。

学力確認結果の要旨

学位申請者 氏名	下桐 猛		
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 前田 芳實		
	副査 鹿児島 大学 教授 岡本 新		
	副査 琉球 大学 教授 仲田 正		
	副査 佐賀 大学 教授 和田 康彦		
	副査 鹿児島 大学 助教授 侯 徳興		
審査協力者	(独)農業生物資源研究所 上級研究員 安江 博		
実施年月日	平成19年 1月12日		
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)	<input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答		

主査、副査ならびに審査協力者の6名は、平成19年1月12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。

また筆記により外国語（英語）の学力を確認した。

以上の結果から、審査委員会は申請者が大学院博士課程修了者と同等以上の学力ならびに識見を有するものと認め、博士（農学）の学位を与えるに十分な資格を有するものと認めた。

学位申請者 氏名	下 桐 猛
[質問1] P8の下から4行目「進化の過程で遺伝子の消失や獲得」とありますが、獲得の意味するところはどういった現象でしょうか？	
(回答1) 本研究でニワトリのRHマッピングで用いた遺伝子であるデルタクリスタリンという遺伝子が獲得のよい例です。すなわち、本来、デルタクリスタリンの遺伝子は両生類やほ乳類などではアルギノコハク酸リアーゼという尿素サイクルの酵素に関わる遺伝子なのですが、爬虫類や鳥類への進化の過程で遺伝子重複を起こし、その結果、デルタクリスタリンという眼の構造タンパク質という新たな機能を獲得したというものです。また、乳酸脱水素酵素が同様に眼の構造タンパク質として利用したという例も挙げられると思います。	
[質問2] そうしますと、「獲得」とするとゲノムに何か新しいものが加わったというイメージになるので、「機能変化」などの適切な言葉にされたらいかがでしょうか？	
(回答2) 分かりました。そのようにしたいと思います。	
[質問3] ブタのRH地図をヒトゲノム地図との対応関係で調査されていますが、ウシのRH地図と比較されていませんか？	
(回答3) ウシのRH地図とは現時点では比較しておりません。ただ、ウシのゲノム地図が解読され、QTLの情報も整備されておりますので、ブタのRH地図と比較することで、両者で共通のQTLなどが発見されることもあると考えます。	
[質問4] 無意味な遺伝子がゲノム上に存在することでしたが、それを今後どのように展開されますか？例えば、タンパク質を合成や免疫力などを調べることなどですか？	
(回答4) タンパク質を合成するのも1つだと考えますが、近年アンチセンスRNAなどRNAで機能を有する場合があるので、そういう面からも調査する必要があるとおもいます。	
[質問5] 比較ゲノム学的研究ということですが、イントロンの数などの対応関係はどうなっていますか？	
(回答5) 僕が調べた限りでは、ほ乳類と鳥類との間で同祖的な遺伝子のイントロンの位置や数は大抵の場合同じです。	

学位申請者 氏 名	下 桐 猛
[質問6] P73の供試材料で255個のESTを選んでいますが、これらはHSA17上に座乗していたものですか？	
(回答6) そのとおりです。HSA17上に座乗している遺伝子とblastn解析でe-valueがe ⁻¹⁰⁰ 以下の相同性をもつESTだけを使用しております。	
[質問7] ニワトリで無意味な酵素である遺伝子のプロモーター領域などはほ乳類などと比較してどうなっておりますか？	
(回答7) 尿素サイクルのOTCで説明しますと、ほ乳類のOTC遺伝子転写制御を行なうエンハンサーヤプロモーターが遺伝子の上流領域に存在し、その中に肝臓特異的転写制御因子が結合するためのDNA配列が存在します。その部分をニワトリ OTC遺伝子で比較しましたが、そのような配列は存在せず、結果的に肝臓で発現しなくなつたのではと考えております。	
[質問8] P115の図ですが、翻訳開始部分はどこになりますか？	
(回答8) 6行目の右端のATGからです。この図は見づらくなつており、修正したいと思います。	
[質問9] 最後に示された精巣のin situ hybridizationの写真ですが、発現している箇所はどこですか？	
(回答9) 詳しい解剖学的な名称はまだ分かりませんが、精子を作る場所だと考えております。	
[質問10] BACコンティグにつかうライブラリーは既にありますか？	
(回答10) BACライブラリーはすでに構築されてあり、一部はクローンが塩基配列の解読のために利用されています。BACクローン中のインサートはおよそ150kbですので、今回構築したRH地図や遺伝連鎖地図の情報などをもとにBACクローン間をつなぎ合わせる作業つまりコンティグの構築を行なう必要があります。	
[質問11] 論文の最初に略語などの対応一覧表を作られたらどうですか？	
(回答11) 作りたいと思います。	
[質問12] 論文中に「our study」と出てくる箇所があるが、「this study」ではないか？また、テキスト中に「図」とあるが、脚注で「Fig」となつている。	
(回答12) これらすべてご指摘のとおりですので、修正します。	