

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 宇埜 友美子

Neu5Gc (N-グリコリルノイラミン酸)と Neu5Ac (N-グリコリルノイラミン酸) は一般に哺乳類の細胞最外層に存在するシアル酸分子種であり、Neu5Ac から酵素シチジン-5'-モノホスホ-N-アセチルノイラミン酸 (CMAH) によって Neu5Gc が合成される。この酵素は *CMAH* 遺伝子によってコードされるが、多くの哺乳類が Neu5Gc と Neu5Ac を持つのに対し、ヒトやフェレットは遺伝子内の欠失により Neu5Ac のみを合成する。Neu5Gc と Neu5Ac はネコ赤血球膜上の A 抗原と B 抗原であり、*CMAH* 遺伝子の点突然変異によりそれぞれの抗原量が制御される。猫 AB 式血液型において A 型・B 型・AB 型のいずれかであるかの把握は輸血の際に重要であり、血清学的血液型検査を補完できるような簡便で正確な遺伝子スクリーニング検査が求められている。一方でイヌ *CMAH* に関しては報告が殆どなく、ほとんどの西洋犬種が Neu5Ac を発現する一方でアジアを起源とする犬種は Neu5Gc 型と Neu5Ac 型に分かれる。しかしながら *CMAH* 遺伝子を解析した報告は殆どない。また、*CMAH* は近年パルボウイルス抗病性などとの関連が報告され、疾患関連遺伝子としても注目されている。そこで本研究ではイヌ *CMAH* の分子遺伝学的解析に初めて着手し、合わせてネコ *CMAH* の変異解析も行い、イヌとの比較を行った。

第2章では、イヌ *CMAH* 遺伝子の cDNA 配列決定および mRNA 発現解析を実施した。まず、骨髄由来 cDNA を用いて RT-PCR によりイヌ *CMAH* cDNA クローニングを行い、塩基配列を決定した。1737 bp から成る増幅産物は National Center for Biotechnology Information に登録されているイヌゲノム配列 (NC_006617.3) と比較してエクソン-イントロン構造を決定したところ、イヌ *CMAH* は、578 アミノ酸残基をコードし、から少なく

とも14個のエクソンから成り、ネコ *CMAH* 遺伝子の構造と非常に類似していた。さらにRT-PCRによる28種類の組織におけるmRNA発現解析の結果、イヌ *CMAH* は組織によって発現に差が見られ、ユビキタスに発現を示すネコ *CMAH* の既報の結果と一致しなかった。これらのことから、*CMAH* はイヌにおいても保存されており、ネコと類似した機能を持つ可能性があるものの、その発現調節機構にはイヌとネコでは差があると考えられた。またイヌ *CMAH* mRNA の発現調節機構には個体差があることも示唆された。

第3章では、第2章で明らかになったイヌ *CMAH* の塩基配列およびエクソン・イントロン構造を基に、DNA多型検索を行った。まず11犬種各1検体をスクリーニングサンプルとして、各エクソンとその周辺領域の塩基配列をPCR増幅後ダイレクトシーケンス法で決定した。登録イヌゲノム配列と比較し、異なった部分は多型とした。エクソン上に4ヶ所、イントロン・UTR上に11ヶ所のSNPsと1ヶ所の欠失挿入多型が同定された。エクソン上の3ヶ所のSNPsはアミノ酸置換を伴わないsilent SNPsであり、内訳はExon 2にc.15T>C (p.11e511e)、Exon 14にc.1701G>A (p.Pro567Pro)、c.1713G>A (p.Arg571Arg) であった。Exon 5のc.554 A>Gのみが、リジンからアルギニンへのアミノ酸置換を伴っており、この位置で他の犬種がGアリルを持つのに対し、柴犬のみがAアリルを保有していたことから、当該SNPが表現型との関連を解析していく上で有効的な遺伝的マーカーとなり得ると予想された。

第4章では、3章よりも各犬種の検体数を増やし、7犬種229検体でのc.554 A>G変異の分布形態を観察した。当該SNPのあるEx5のみをPCR増幅しダイレクトシーケンスでSNP遺伝子型を確認した。その結果西洋犬種にはGアリルが広く分布する一方で、柴犬が最も多型に富んでいたことから、ネコ同様にアミノ酸置換を伴うSNPにより抗原量が調節されると予想した。また柴犬56検体とラブラドル・レトリバー29検体間で、

表現型と遺伝子型の関連を検討した。Neu5Acの有無をレクチン抗体を用いて確認後、ダイレクトシーケンスにより当該SNP遺伝子型を判定した。ラブラドル・レトリバー全検体がNeu5Ac陽性であるのに対し、柴犬は陽性（44/56）と陰性（12/56）に2分された。Neu5Ac陽性のラブラドル・レトリバーはGアリの頻度が高いものの、Neu5Ac陰性の柴犬もGアリが高かった。従ってc. 554A>G変異と表現型の関連性は明らかにされず、今回使用した柴犬にヒトやフェレットで見られるような遺伝子上の欠失なども見られなかった。近年、ブタ *CMAH*mRNAの腸特異的な、今後は発現調整をプロモーター領域が担うという報告がなされイヌにおいても同様の解析が必要になると考えられる。

第5章では、先行研究（Omi et al., 2016）と同様にB型21検体・AB型6検体についてEx 2, 3, 4, 13のアミノ酸置換を伴う8 SNPsについてダイレクトシーケンスにより遺伝子型判定を行い、ディプロタイプを決定した。B型の遺伝子型判定では、ディプロタイプの割合は概ね先行研究の結果と一致しており、新規のディプロタイプも同定された。c. 268T>A変異に関しては、先行研究と本研究を合算すると、43/55検体がAAと判定された。海外も含めた先行研究と本研究を通してB型ネコ以外からAAが検出されたことがないため、当該箇所がAAならばB型と断定できると考えられる。これらのことから、B型に関しては表現型予測のための新しい知見を追加できた。

AB型の遺伝子型判定においても、日本では同定が初となるc. 364C>Tのホモ変異が同定された。しかし、先行研究ではA型で報告された正常対立遺伝子を少なくとも1つ持つD 13 (Diplotype 13) や、2つ持つD 1などが散見された。さらには先行研究ではB型で報告されたD 5を持つ検体も検出されたが、D 5はこれまで本研究室ではA型でも検出されたことがある（データ示さず）。これらのことから、AB型の予測には未だ研究の余地があると考えられる。本研究と先行研究を通して血液型をカード法を用いて判定していたが、この精度の低さを指摘する報告があり、

このことが原因となっている可能性がある。

ネコと比較するとイヌ *CMAH* の SNPs と表現型の関連性は低く、その原因として mRNA 発現調節機構の差が疑われる。より詳細を明らかにしていくためには、今後はプロモーター領域の解析が必要である。また同時にウェスタン・ブロッティング法や血清中同種抗体によってイヌ・ネコ共により正確な表現型判定を追求する必要があると考えられる。

以上のように、本論文は、イヌの *CMAH* 遺伝子について cDNA の構造およびその発現、exon-intron 構造、SNPs および Indels の同定、遺伝子型と表現型の関連、品種間の遺伝子構成の違い、ネコ *CMAH* 遺伝子多型との比較などを行い、イヌ *CMAH* 遺伝子の特徴を初めて明らかとし、今後獣医保健看護学領域において、学術上、応用上貢献するところが少くない。

よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医保健看護学）の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。