

学 位 論 文 題 名

Genomic analysis of hereditary myopathy of  
diaphragmatic muscles in Holstein-Friesian cattle

（ホルスタイン種牛における遺伝性横隔膜筋症のゲノム解析）

学位論文内容の要旨

ホルスタイン種牛における遺伝性横隔膜筋症(Hereditary myopathy of diaphragmatic muscles; HMDM)は4~7歳に発症し、鼓張症および呼吸器不全を主徴とする常染色体性劣性遺伝病であり、横隔膜筋における筋変性及びコア様構造が病理学的特徴である。ヒトにおける多くの遺伝性筋症のうち、このコア様構造を伴う疾患としては desmin-related myopathy (DRM) が知られている。DRM は心筋および骨格筋に存在するコアに desmin が蓄積する常染色体性優性遺伝病であり、desmin 遺伝子の変異や desmin の折り畳み構造を整える働きを持つ chaperone である alpha-B-crystallin 遺伝子の変異によって発症する。HMDM の原因遺伝子の同定は、横隔膜筋におけるコア様構造の出現と筋線維の変性に関する分子的メカニズムの解明に手がかりを与える。

HMDM の原因遺伝子を同定するために、12頭の発症牛を含む26頭の家系について1200個のマイクロサテライトマーカーを用いて連鎖解析を行った。その結果、第23番染色体にある Heat-shock protein 70 (Hsp70) 遺伝子の1つが欠損することにより HMDM を発症することが判明した。Hsp70 は熱などのストレスを与えると発現が増える70 kdの蛋白であり、主要な chaperone の一つである。その遺伝子は第23番染色体のMHC領域にあり、9 kb の非翻訳領域をはさむ *HSPA1A* と *HSPA1B* の2つの遺伝子からなる。Long Range PCR により、12頭の発症牛はすべて9 kb の非翻訳領域及び *HSPA1B* が欠損しており、DNA の解析においては、*HSPA1B* の欠損によって HMDM を発症することが示唆された。

次に、mRNA および蛋白の発現において HMDM 発症牛と正常牛の Hsp70 がどのように異なるか調べた。RT-PCR により、発症牛において欠損していない Hsp70 遺伝子 *HSPA1A* の mRNA は正常に発現していることが確認された。しかし、Western blotting および免疫染色により、発症牛においては Hsp70 蛋白質量が正常牛と比較して著しく減少していることが明らかになった。また、免疫沈

降により正常牛の横隔膜筋ではグリコーゲンリン酸化酵素等の酵素が Hsp70 蛋白と結合していることが示唆された。さらに、免疫染色により発症牛のコア様構造にグリコーゲンリン酸化酵素が蓄積していることが判明した。以上のことから HMDM 発症牛の横隔膜筋では Hsp70 蛋白が発現していないため、Hsp70 により折り畳み構造が整えられて正常に機能すべき酵素が凝集することによって、コア様構造の出現が起こり、ひいては筋変性が引き起こされることが明らかとなった。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 島 郁 夫  
副 査 教 授 高 橋 芳 幸  
副 査 教 授 稲 葉 睦  
副 査 助教授 荻 和 宏 明

## 学 位 論 文 題 名

### Genomic analysis of hereditary myopathy of diaphragmatic muscles in Holstein-Friesian cattle

(ホルスタイン種牛における遺伝性横隔膜筋症のゲノム解析)

ホルスタイン種牛における遺伝性横隔膜筋症(Hereditary myopathy of diaphragmatic muscles; HMDM)は4~7歳に発症し、鼓張症および呼吸器不全を主徴とする常染色体性劣性遺伝病であり、横隔膜筋における筋変性およびコア様構造が病理学的特徴である。

HMDMの原因遺伝子を同定するために、12頭の発症牛を含む26頭の家系について1200個のマイクロサテライトマーカールを用いて連鎖解析を行った。その結果、第23番染色体にあるHeat-shock protein 70 (Hsp70) 遺伝子の1つが欠損することによりHMDMを発症することが判明した。Hsp70は熱などのストレスを与えると発現が増える70 kdの蛋白であり、主要なchaperoneの一つである。その遺伝子は第23番染色体のMHC領域にあり、9 kbの非翻訳領域をはさむHSPA1AとHSPA1Bの2つの遺伝子からなる。Long Range PCRにより、12頭の発症牛はすべて9 kbの非翻訳領域およびHSPA1Bが欠損しており、DNAの解析においては、HSPA1Bの欠損によってHMDMを発症することが示唆された。

次に、mRNAおよび蛋白の発現においてHMDM発症牛と正常牛のHsp70がどのように異なるか調べた。RT-PCRにより、発症牛において欠損していないHsp70遺伝子HSPA1AのmRNAは正常に発現していることが確認された。しかし、ウエスタンブロットおよび免疫染色により、発症牛においてはHsp70蛋白質量が正常牛と比較して著しく減少していることが明らかになった。また、免疫沈降により正常牛の横隔膜筋ではグリコーゲンリン酸化酵素等の酵素がHsp70蛋白と結合していることが示唆された。さらに、免疫染色により発症牛のコア様構造にグリコーゲンリン酸化酵素が蓄積していることが判明した。以上のことからHMDM発症牛の横隔膜筋ではHsp70蛋白が発現していないため、Hsp70により折り畳み構造が整えられて正常に機能すべき酵素が凝集することによって、コア様構造の出現が起こり、ひいては筋変性が引き起こされることが明らかとなった。

本研究によって同定された HMDM の原因遺伝子と発症の機序は、本症の診断と摘発に多大な貢献を果たすものと期待される。よって、審査員一同は杉本真由美氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格を有するものと認めた。