

学 位 論 文 要 旨

氏名: MOHAMMAD MEJBAH UDDIN

題 目 : **MOLECULAR STUDY ON GM1 GANGLIOSIDOSIS, CANAVAN DISEASE AND KRABBE DISEASE IN DOGS AND CATS**
犬および猫の GM1 ガングリオシドーシス、カナバン病およびクラッベ病に関する分子的研究

論文要旨 :

In human medicine, the molecular bases of many inherited disorders have been clarified, and furthermore, the number of molecularly defined disorders continues to increase. In veterinary medicine, many naturally occurring, inherited disorders have been reported, but the molecular bases of many such disorders have yet to be defined. Rapid and accurate genotyping of inherited disorders is very important for reaching swift diagnoses and improving patient outcomes, as well as the control and prevention of the disease in populations of pure-bred animals. In the present study, molecular investigations of GM1 gangliosidosis, Canavan disease, and Krabbe disease were performed in dogs and cats. The objectives of my thesis are to formulate effective strategies for the control and prevention of GM1 gangliosidosis in the Shiba Inu breed of dogs (Chapter 1) and discuss the significance and distribution of feline GM1 gangliosidosis caused by the c.1448G>C mutation of the β -galactosidase (*GLB1*) gene (Chapter 2), and in addition to clarifying the molecular bases of canine Canavan disease (Chapter 3) and feline Krabbe disease (Chapter 4).

Chapter 1: GM1 gangliosidosis is a fatal, progressive neurodegenerative lysosomal storage disease caused by mutations in the *GLB1* gene. A real-time PCR-based genotyping assay has been developed for detecting the pathogenic mutation c.1647delC in the canine *GLB1* gene in the Shiba Inu dogs with GM1 gangliosidosis. In the present study, a molecular epidemiological survey was conducted using a genotyping assay among 590 clinically unaffected Shiba Inu dogs from all over Japan. The number and native district of the affected dogs identified between 1997 and 2013 were also surveyed retrospectively. Of the 590 dogs examined, 6 dogs (1.02%, 6/590) were carriers: 3 dogs (2.27%, 3/132) were from the Kinki district, while the other 3 dogs from the Hokkaido, Kanto, and Shikoku districts. The retrospective survey revealed 23 affected dogs, among which 19 dogs (82.6%) were born within the last 7 years. Of the 23 affected dogs, 12 dogs (52.2%) were from the Kinki district. Pedigree analysis demonstrated that all the affected and carrier dogs for which pedigree information was available had a close blood relationship. The high carrier frequency in the Kinki district may be related to the high prevalence observed over the past 16 years in this region. Therefore, for the effective control and prevention of the disease, it is necessary to examine as many breeding dogs as possible from all regions of Japan, especially those from

kennels located in areas with high prevalence and carrier frequency.

Chapter 2: In feline GM1 gangliosidosis, a pathogenic mutation c.1448G>C in the feline *GLB1* gene has previously been identified in Siamese and Korat cats in Western countries. In the present study, a mutation analysis was performed on a Siamese cat diagnosed histopathologically and biochemically with the disease in Japan in the 1960s and 2 domestic cats suspected of being affected with a lysosomal disease in Bangladesh in 2009. The presence of the c.1448G>C mutation was examined using a direct sequencing method and a PCR-restriction fragment length polymorphism assay with the restriction endonuclease *Hae*III. This analysis demonstrated that the 3 cats were homozygous for the c.1448G>C mutation. Identification of the mutation in a Siamese cat in Japan and in native domestic cats in Bangladesh, in concert with the history of cat domestication, suggests that the c.1448G>C mutation may have been transferred from native domestic cats to Siamese and Korat breeds through the process of breed establishment in Southeastern Asia.

Chapter 3: Canavan disease is an autosomal recessive neurodegenerative leukodystrophy that is caused by mutations in the aspartoacylase (*ASPA*) gene. In order to clarify the molecular basis of a mixed-breed dog affected with Canavan disease, the canine *ASPA* gene was analyzed using a direct DNA sequencing method. As a result, a homozygous deletion-insertion mutation, c.537_540delTTGGTinsATAGAA (p.G180fsX), in exon 4 of the canine *ASPA* gene was identified as a candidate pathogenic mutation for the disease. A genotyping survey was conducted using a real-time PCR-based assay for the mutation among 1,508 dogs. The survey demonstrated that all dogs examined were of the wild-type genotype, suggesting that the mutation is very rare, and therefore, pathogenic.

Chapter 4: Krabbe disease is an autosomal recessive neurodegenerative leukodystrophy that is caused by mutations in the galactocerebrosidase (*GALC*) gene. In order to clarify the molecular basis of a mixed-breed cat affected with Krabbe disease, the feline *GALC* gene was analyzed using a direct DNA sequencing method. As a result, a homozygous missense mutation, c.1945G>A (p.A649T), in exon 17 of the feline *GALC* gene was identified as a candidate pathogenic mutation for the disease. A genotyping survey was conducted using a real-time PCR-based assay for the mutation among 1,060 cats. The survey demonstrated that all cats examined were of the wild-type genotype, suggesting that the mutation is very rare, and therefore, pathogenic.

In conclusion, the molecular epidemiological information for GM1 gangliosidosis in the Shiba Inu breed in Japan will contribute extensively to the control and prevention of the disease. A newly developed PCR-based genotyping assay for feline GM1 gangliosidosis will be important for rapid differential diagnosis in cats suspected of having the disease and for genotyping in purebreeds related to Siamese and Korat cats. The molecular bases of canine Canavan disease and feline Krabbe disease are the first to be defined. Therefore, these findings will contribute to future studies in the attempts to better understand the pathogenesis and to develop potential therapeutic methods in both human and veterinary medicine.

学位論文審査の結果の要旨

氏名	MOHAMMAD MEJBAH UDDIN
審査委員	主査：鹿児島大学 教授 大和 修
	副査：鹿児島大学 教授 川崎 安亮
	副査：鹿児島大学 教授 藤田 秋一
	副査：鹿児島大学 准教授 矢吹 映
	副査：鳥取大学 准教授 保坂 善真
題目	Molecular study on GM1 gangliosidosis, Canavan disease and Krabbe disease in dogs and cats (犬および猫の GM1 ガングリオシドーシス、カナバン病およびクラッペ病に関する分子的研究)
審査結果の要旨： <p>本研究は、犬および猫の GM1 ガングリオシドーシス、カナバン病およびクラッペ病の集団内変異アレル頻度ならびに分子基盤を解明するために実施された。本研究の目的は、柴犬の GM1 ガングリオシドーシスの効果的な予防法を確立し（第 1 章）、猫の GM1 ガングリオシドーシスの分布とその意義を明らかにし（第 2 章）、ならびに雑種犬のカナバン病（第 3 章）および雑種猫のクラッペ病（第 4 章）の分子基盤を明らかにすることであった。</p> <p>第 1 章：柴犬の GM1 ガングリオシドーシスは、犬 <i>GLBI</i> 遺伝子における変異(c.1647delC)によって引き起こされる致死性の神経変性性疾患である。本研究では、本変異を検出するリアルタイム PCR 法を用いて、日本全国から収集された 590 頭の柴犬の遺伝子型を決定するとともに、1997 年から 2013 年までの 16 年間に確定診断された発症犬を回顧的に調査した。その結果、遺伝子型調査では 6 頭(1.02%、6/590)のキャリアが同定され、その内 3 頭(2.27%、3/132)が近畿地方の犬で占められていた。回顧的調査では、全 23 頭の発症犬の内 19 頭(82.6%)が最近 7 年間に診断されており、12 頭(52.2%)が近畿地方の犬で占められていた。近畿地方における高いキャリア頻度は、同地区の高い発症率と関連しており、さらに同地区犬舎内の受賞歴がある繁殖犬の血統に強く関連していた。したがって、同疾患を効果的に予防するためには、継続的に多くの繁殖犬を検査する他に、発症率とキャリア頻度が高い地域内の特定犬舎を集中的に調査することが必要であると考えられた。</p> <p>第 2 章：猫の GM1 ガングリオシドーシスの原因として、猫 <i>GLBI</i> 遺伝子における変異(c.1448G>C)が知られており、本変異に起因するシャムおよびコラットの発症猫が欧米諸</p>	

国で報告されている。本研究では、日本において1960年代に組織学および生化学的にGM1ガングリオシドーシスと診断された1頭のシャム猫、ならびにバングラデシュにおいて2009年に同疾患が疑われた2頭と同腹雑種猫について、同変異に関連する領域の塩基配列を解析した。その結果、これら3頭の猫は、c.1448G>Cのホモ接合によりGM1ガングリオシドーシスを発症していることが判明した。このことによって、本変異は東南アジアの雑種猫集団に潜在し、同地域を起源とするシャムおよびコラット種に伝わり、さらに同品種を通じて世界中に広がったと推測された。

第3章：カナバン病は、*ASPA* 遺伝子の変異に起因する神経変性性の白質ジストロフィーであり、現在までに動物では分子基盤が明らかにされた同疾患症例は報告されていない。本研究では、尿の代謝物分析によってカナバン病と化学診断された雑種成犬について、その犬 *ASPA* 遺伝子を解析した。その結果、同遺伝子エクソン 4 上にホモ接合の変異 (c.[537_540delGTTGGT]+[527_534dupGTATAGAA]) が同定された。本変異によるフレームシフトによって終止コドンが導かれることと、分子疫学調査によって1,508頭の犬に本変異が存在しなかったことから、本変異が犬のカナバン病の原因変異であると強く示唆された。

第4章：クラッペ病は、*GALC* 遺伝子の変異に起因する神経変性性の白質ジストロフィーであり、現在までに猫では分子基盤が明らかにされた同疾患症例は報告されていない。本研究では、組織学的検査によってクラッペ病と病理診断された雑種猫について、その猫 *GALC* 遺伝子を解析した。その結果、同遺伝子エクソン 17 上にホモ接合のミスセンス変異 (c.1945G>A) が同定された。本変異によって置換されるアミノ酸 (アラニン) は各種哺乳動物でよく保存されており、また SIFT 解析によって同部位の置換が酵素蛋白の機能に大きな影響を及ぼすことが推定され、さらに分子疫学調査によって1,060頭の猫に本変異が存在しなかったことから、本変異が猫のクラッペ病の原因変異であると強く示唆された。

以上のように、申請者は、柴犬のGM1ガングリオシドーシスの日本におけるキャリア頻度および発症率の分布を明らかにすることで、本疾患の効果的な予防法を立案することに成功した。また、c.1448G>Cによって引き起こされる猫のGM1ガングリオシドーシスの国内および東南アジアにおける分布とその意義を明らかにした。さらに、動物では初めてとなる犬のカナバン病の病原性変異、ならびに猫では初めてとなるクラッペ病の病原性変異を同定した。これらの知見は、犬および猫の遺伝病研究の発展に大きく貢献すると考えられた。

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。