

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間： 2006 ～ 2008
 課題番号： 18780212
 研究課題名 (和文) ブタおよびイノシシにおけるエネルギー代謝制御に関する遺伝子多型と形質との相関解析
 研究課題名 (英文) The correlation analysis between traits and genetic polymorphisms that relate to the energy metabolism in domestic and wild pigs.
 研究代表者
 田中 和明 (Tanaka Kazuaki)
 研究者番号： 50345873

研究成果の概要：

ベータ3アドレナリンレセプター (*ADRB3*) 遺伝子は、エネルギーの恒常性維持や肥満との関連が報告されている。研究代表者は、ブタ *ADRB3* のコード領域内に一塩基挿入/欠失型多型を発見し、T5 型および T6 型対立遺伝子と命名した。全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所で飼育されているデユロック種集団を用いて、*ADRB3* の遺伝子型と各種形質との相関解析を行った。その結果、*ADRB3* 遺伝子の T5・T6 対立遺伝子型によって、体重 95 kg 到達時における体長約 1/2 部位のロース芯断面積に統計学的に有意な差が認められた。すなわち T6 型のホモ接合体は、その他の遺伝子型の個体に比べて、ロース芯面積を有意 ($P < 0.002$) に増加させる効果が認められた。ロース部位は豚肉の中で利用価値の高い部位であることから、本研究の成果は、ブタを遺伝的に改良するための遺伝マーカーとして利用できる。また、摂食と成長ホルモン分泌の制御にかかわるグレリン遺伝子の配列を決定し多型解析を行った。その結果、グレリン前駆体タンパク質の第 112 番地におけるアミノ酸置換 [トレオニン (T) ⇄ アスパラギン (N)] を生じる 1 塩基多型を発見した。わが国用いられる主要ブタ品種を用いて対立遺伝子の分布を調査した結果、ランドレース種および大ヨークシャー種では 112T 型対立遺伝子の頻度が 0.7~0.9 と高く、デユロック種では、112N 型の頻度が 0.8 以上であった。この多型に関しても、形質と遺伝子型との相関解析を行う必要がある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,300,000	0	1,300,000
2007 年度	1,000,000	0	1,000,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	300,000	3,600,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学／獣医学 ・ 応用動物科学

キーワード：家畜育種・遺伝資源・ブタ・遺伝子多型・遺伝相関解析・エネルギー代謝・遺伝子マーカー

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、平成 16 年度科学研究補助金若手研究 (B)「偶蹄目の家畜および野生動物における環境適応性に関する遺伝子の cSNPs 探索」(課題番号 16710147) の成果として、世界に先駆けて、ブタおよびイノシシの β 3 アドレナリン受容体 (以後 *ADRB3*) 遺伝子に 1 塩基挿入/欠失多型が存在することを発見した。挿入型対立遺伝子 (以後 T6 型) は、欠失多型 (以後 T5 型) に比べて、カルボキシル末端側 (C 末端) の 2 アミノ酸残基を欠損した受容体タンパクを産生する。

主に脂肪組織に分布する *ADRB3* は、褐色脂肪組織では熱産産を促進することで、また、白色脂肪組織では貯蔵した脂肪の細胞外への放出を調節することで、エネルギー代謝制御に重要な役割を担っている。ゆえに、T5/T6 遺伝子多型によって *ADRB3* の働きに変化が生じるとすれば、ブタの様々な形質に影響すると考えられた。

しかし、前項の研究では、研究代表者らが過去の海外学術調査などによって収集した、DNA 試料コレクションを利用して解析を行ったため、遺伝子型と個体の持つ形質との関連性を十分に解明するには至らなかった。エネルギー代謝の恒常性に関連し、基礎代謝を減少させる遺伝子変異を見つけることが出来れば、熱として失われるエネルギー量を減らすことで飼料効率の向上が図れるかもしれない。実際、ヒトにおいて *ADRB3* 遺伝子変異が、成人の基礎代謝量と関連するという報告が、研究開始時点で存在した。

近年、家畜の遺伝解析が急速に進められ、形質に相関のある遺伝子多型を直接検出し、効率的な品種改良に進める研究が積極的に行われている。これらの中には、ブタのムレ肉 (PSE 豚) の原因となる遺伝子多型のように、遺伝子が同定されることによって、改良に大きく貢献したものが少なくない。しかし、家畜に関する有用な遺伝情報の多くが海外の企業・団体等によって特許化されている。わが国の養豚産業の競争力を増強するためにも、産業形質の改良に応用可能な新規遺伝子マーカーの開発が望まれている。

2. 研究の目的

(1) わが国で飼育されているブタ集団およびイノシシにおいて、*ADRB3* 遺伝子における T5 型と T6 型対立遺伝子の遺伝子頻度を解析し、育種上利用できる頻度で存在するかどうかを調査する。さらに、ブタの野生種であるイノシシの配列と比較することで、T5 型と T6 型対立遺伝子の由来を検討した。

(2) *ADRB3* 遺伝子の T5 型と T6 型対立遺伝子が高度に多型を維持している集団 (品種) を用いて、*ADRB3* 遺伝子の遺伝子型によって、個体の産業的形質との関連性を評価する。目

的 (1) の研究の結果、共試動物は、全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所 (以後 JA 全農) が育成中のブタ (デユロック種) の閉鎖集団における合計 682 頭 (雄 323 頭・雌 359 頭) の形質測定値を用いることとした。これによって、*ADRB3* 多型が、ブタの改良に利用できる遺伝子マーカーとなりうるかどうかを検討する。

(3) ブタ *ADRB3* 遺伝子の他に、ブタの改良に寄与する遺伝子マーカーを開発する目的で、成長ホルモンの分泌制御に関わるホルモンであるグレリンを指定しているグレリン遺伝子の配列を決定し、ブタおよびイノシシにおける多型を検索する。

3. 研究の方法

(1) ブタ *ADRB3* 遺伝子における T5 型と T6 型の変異は、最終エクソン内におけるチミン

(T) 塩基の繰り返し数によるものである。T5 型と T6 型対立遺伝子の末端部を図示すると図 1 のようになる。

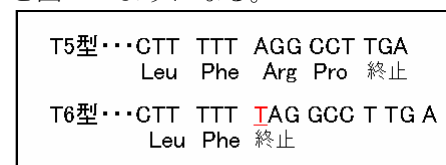


図1 ブタ*ADRB3*遺伝子のT5/T6多型

多くの DNA 試料を簡便に遺伝子型判定するため、多型部位を含む DNA 断片を PCR によって増幅した後、PCR 産物を所定の制限酵素で処理し、得られる DNA 断片の長さの差異、すなわち制限酵素断片長多型として検出する手法を開発した。プライマー 1

(CCATTTTCAGGGCTTCCTGGGGCCCTT) とプライマー 2 (GCCACTTGGAAGGAATCCCCCTT) の組み合わせで得られる PCR 産物 (約 185 塩基対) を制限酵素 *XagI* (CCTNN↓NNAGG) で処理すると、T5 の配列は切断されないが、T6 型は切断され、約 20bp と 165bp の断片となる。これを 3% のアガロースゲルを用いて電気泳動することで、2 つの対立遺伝子を容易に判定できる。図 2 は実際の判定結果を示したものである。

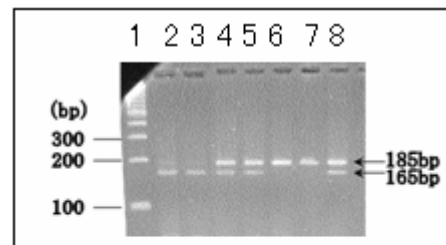


図2 制限酵素断片長多型に基づいた *ADRB3* 遺伝子の遺伝子型判定。
 レーン1: 分子量マーカー、レーン2と3: T6 のホモ接合、レーン4、5および8: T5/T6 のヘテロ接合、レーン6と7: T5 型ホモ接合。

この手法を用いて多個体の遺伝子型判定を行った。

(2) 研究(1)から、わが国で一般的に利用されている主要ブタ品種における T5 型/T6 型の対立遺伝子頻度を求めた。その結果、ランドレース、大ヨークシャー種およびパークシャー種では、T5 型対立遺伝子の頻度が 0.8~1.0 と極めて高位であり、T6 型対立遺伝子の頻度が低いこと遺伝子型と形質との相関解析が困難であった。しかし、JA 全農が系統造成中であるデュロック種の集団では T5 型と T6 型が、それぞれ約 0.6 と 0.4 の頻度で存在していた。これは、集団内で遺伝子型と形質との相関を解析するために好ましい状態にあり、かつ実際の育種への応用も期待できるものである。そこで、本集団において 3 世代にわたる血縁情報および、形質値の記録のある 682 個体を対象として、遺伝子型判定を行った。これらのデータを用いて、遺伝子型による形質値の比較および、多形質アニマルモデル BLUP 法を用いた育種価の推定を行った。解析の対象とした形質は 1 日当りの増体重量 (DG: 体重 30kg から 95kg に到達するまでの期間)、体長の 1/2 の部位に位置する背脂肪の厚み (BF: 体重 95kg 到達時) および、ロース部分 (EMA: 体重 95kg 到達時) である。DG と BF の値は、生体に対して B モード超音波診断装置を用いて間接的に測定した。

(3) ブタ・グレリン遺伝子における塩基配列多型を検索する目的で、起源が大きく異なり形質にも差異の存在するブタ品種として、ランドレース種、デュロック種、メイシャン種および、イベリア種を選択した。さらに、イノシシと比較するためニホンイノシシ、リュウキュウイノシシおよび、カンボネシア産イノシシを加え、それぞれ各 1 個体の DNA 試料を解析に供した。これら 7 個体に関して、グレリン遺伝子の全コード領域を含む約 4500bp の配列を PCR により増幅し、塩基配列を決定した。解析の対象にした領域は、開始コドンより上流約 30 塩基から終止コドンより下流約 60 塩基である。7 個体間に存在した一塩基多型のうち、第 3 エクソンにおける A ⇄ C 置換 (ブタのグレリン遺伝子の転写開始点が未解明のため仮称 3519 番地) は、それぞれ複数の個体から検出され、かつ唯一アミノ酸置換 (Thr112Asn) を伴う多型であったため集団解析の対象とした。遺伝子型判定には、多型部位を含む約 217bp の DNA 断片を、プライマー 3 (GTGATGTTGGGATCAAGTTGTC) とプライマー 4 (CACAGAAGCTCTTTAGAGAGGCAG) の組み合わせを用いた PCR で増幅し、産物を制限酵素 *Tsp45I* (↓GTSAC) 処理することで得られる制限酵素断片長多型を用いた。すなわち、3519A 型対立遺伝子は切断されず、3519C 型は、切断され 89bp と 128bp の断片を生じる。

この手法により、主要なブタ品種における対立遺伝子頻度を調査した。

4. 研究成果

(1) *ADRB3* 遺伝子の T5/T6 型対立遺伝子の分布をブタおよびイノシシ集団において調査した。表 1 に示すとおり、両対立遺伝子は、ブタおよびイノシシに広範囲で分布するが、改良品種では T5 型対立遺伝子の頻度が高く、T6 型対立遺伝子の頻度は総じて低いことが明らかになった。これに対して、中国産品種及びベトナム在来豚では T6 型の頻度が比較的高く、さらにニホンイノシシもこの対立遺伝子を保有することから、T6 型対立遺伝子は、東アジアのイノシシ集団およびこの地域で家畜化されたブタに由来すると考えられる。

表 1 ブタおよびイノシシにおける *ADRB3* 遺伝子 T5/T6 対立遺伝子の出現頻度

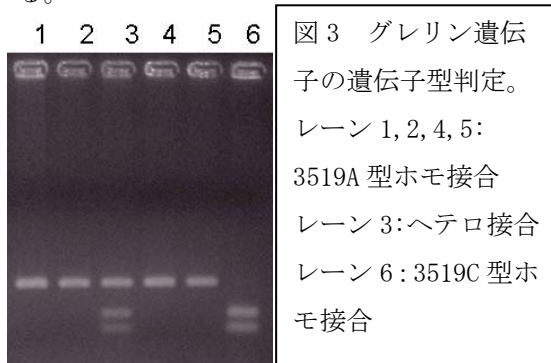
品種 (集団)	対立遺伝子頻度	
	T5	T6
ランドレース	0.875	0.125
大ヨークシャー	1.00	0.00
パークシャー	0.810	0.190
デュロック (1)	0.875	0.125
デュロック (2)	0.596	0.404
梅山豚	0.571	0.429
金華豚	0.400	0.600
ベトナム在来豚	0.327	0.673
ニホンイノシシ (1)	0.194	0.806
ニホンイノシシ (2)	0.727	0.273
リュウキュウイノシシ	0.952	0.048

T6 型対立遺伝子の頻度が、0.1 前後の集団では、ホモ接合の個体は 100 頭に 1 頭程度しか存在しないため、遺伝子型との相関解析が難しい。中国産品種は、日本国内での飼育数が少なく十分な個体データを得にくい問題がある。以上の結果を踏まえて、形質と遺伝子型の相関を分析する集団としてデュロック (2) 集団を選択した。

(2) 研究成果 (1) によって選定したデュロック集団は、JA 全農が系統育成中の集団であり、毎世代数百頭規模の個体データを得ることが出来た。これを利用して遺伝子型と形質との相関解析を行った。調査対象のデュロック種 (雌 359、雄 323 頭) において遺伝子型判定を行った。*ADRB3* 遺伝子の遺伝子型によって分類した個体群間で、約 95 kg 時点の DG、BF および EMA の平均値を多重比較した。その結果、雌のロース断面積にのみ統計学的に有意 ($P < 0.002$) な差が認められた。すなわち、雌では T5 型ホモ ($38.0 \pm 4.7 \text{ cm}^2$)、ヘテロ ($38.9 \pm 4.7 \text{ cm}^2$)、T6 型ホモ ($40.6 \pm 4.6 \text{ cm}^2$) の順にロース断面積が大きいことが観察され、T6 型ホモの値は、他の遺伝子型に対して有意 ($P < 0.05$) に大きかった。雄でも、同様の傾向が認められたが、統計的有

意水準に達しなかった。次に、ロース芯面積に対する *ADRB3* 遺伝子効果をより明確にするため多形質アニマルモデル B L U P 法を用いてロース芯面積に対する育種価推定した。*ADRB3* 遺伝子の T6 型ホモ接合は、後代のロース芯面積を平均から $0.83 \pm 0.15 \text{ cm}^2$ 増大させる効果が認められた。ロース芯面積は、ブタの産肉性における重要形質の一つであり、*ADRB3* 遺伝子における T6 型対立遺伝子は、改良マーカーとして利用できる。

(3) 合計 7 個体のブタおよびイノシシ試料を用いてグレリン遺伝子の多型を検索した。これまで詳細な配列が報告されていない第 2 エクソンの後半部分から第 2 イントロンの領域を含め約 4500bp の配列を決定し 106 箇所の一塩基多型と 7 箇所の挿入置換多型を発見した。多型の大多数はイントロン領域に位地していた。エクソン領域内の多型は、第三エクソン内の 2 箇所でのみ認められた。このうち、仮称 3519 番地における C3519A 塩基置換は、グレリン前駆体タンパクの第 112 番目のアミノ酸置換 (Thr112Asn) の原因となる。C3519A 多型を容易に判別する手法として PCR 産物の制限酵素断片長を用いる手法を開発した。図 3 に示すように、3519C 型対立遺伝子と 3519A 型対立遺伝子を容易に判別できる。



本手法を用いてわが国で飼育されている主要品種での対立遺伝子の分布を調査した。デュロック種では、3519A 型対立遺伝子の頻度が 0.89 と圧倒的優位であるのに対して、ランドレース種、大ヨークシャー種および、パークシャー種では、3519C 型の頻度が 0.8 以上の高い値を示した。研究成果(2)と同一の集団を対象として、遺伝子型と形質との相関解析を試みたが、集団内に 3519C 型のホモ接合が 2 個体しか含まれなかったため、解析不能であった。しかし、対立遺伝子の出現頻度が品種によって大きく異なることから、本研究で発見したグレリン遺伝子多型とブタの各種形質との相関は今後さらなる調査を必要とする。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

(1) Kensuke HIROSE (他 4 名) Kazuaki TANAKA. 2009 年

An insertion/deletion variant of a thymine base in the Exon 2 of porcine beta 3-adrenergic receptor (*ADRB3*) gene is associated with the size of eye muscle area. **Animal Science Journal** (2009 年 2 月 2 日付け受理証明書あり). 査読有

(2) Kazuaki TANAKA (他 14 名). 2008 年
 Mitochondrial diversity of native pigs in the mainland South and South-east Asian countries and its relationships between local wild boars. **Animal Science Journal** (79)417-434. 査読有

(3) Kazuaki TANAKA (他 11 名). 2007 年
 The genetic constitution of native pigs in Bhutan and its relationships between local wild boars. **Rep. Soc. Res. Native Livestock** (24)157-166. 査読無

(4) Kazuaki TANAKA (他 12 名). 2007 年
 The novel polymorphism of the beta 3-adrenergic receptor gene and its distribution in domestic pigs and wild boars in Asia. **Animal Science Journal** (78)243-250. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

(1) 沖 修, 田中 和明, 滝沢 達也, 廣瀬 健右 ブタにおけるグレリン前駆体遺伝子の多型解析 2009 年 3 月 27 日 日本畜産学会 110 回大会 日本大学

(2) 田中 和明, 山本 義雄, 滝沢 達也, 黒澤 弥悦, ドルジ タシ, 並河 鷹夫 大陸東南・南アジアにおける在来ブタとイノシシにおけるミトコンドリア DNA 多様性 2008 年 9 月 5 日 日本動物学会 79 回大会 福岡大学

(3) 中村 真理子, 田中 和明, 滝沢 達也, 岡林 寿人, CHHUM PHITH Loan, DAING Tan, 並河 鷹夫 ブタにおける NPY2R 遺伝子の多型解析 日本畜産学会第 108 回大会 2007 年 9 月 27 日 岡山大学

(4) 中村 真理子, 田中 和明, 滝沢 達也, 岡林 寿人, CHHUM PHITH Loan, DAING Tan, 並河 鷹夫 ブタにおけるグレリン遺伝子の多型解析 日本畜産学会第 107 回 2007 年 3 月 27 日 麻布大学

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：ブタベータ3アドレナリンレセプター
遺伝子の多型に基づくブタ形質診断方法

発明者：田中 和明、廣瀬 健右、
普川 一雄

権利者：学校法人麻布獣医学園
全国農業協同組合連合会

種類：特許権

番号：特願2007-149480（特開2
008-301718）

出願年月日：2007年6月5日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 和明 (Tanaka Kazuaki)

研究者番号：50345873

(2) 研究分担者

無し ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：