

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目： 基盤研究(B)  
 研究期間： 2007 ~ 2009  
 課題番号： 19380156  
 研究課題名(和文) 野生マウスの遺伝資源から発掘したユニークな成長・肥満QTLの候補遺伝子の同定  
 研究課題名(英文) Identification of candidate genes for unique QTL affecting growth and obesity discovered from a genetic resource of the wild mouse  
 研究代表者  
 石川 明 (ISHIKAWA AKIRA)  
 名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授  
 研究者番号：20211724

研究成果の概要(和文)：我々は、今までに、野生マウスの遺伝子プールから成長・肥満に関わる新規量的形質遺伝子座(QTL)を第2染色体上に発見し、野生マウス由来のQTL対立遺伝子を保有するコンジェニック系統を樹立した。本研究では、導入した野生マウス由来ゲノム領域をさらに断片化したサブコンジェニック系統を複数樹立して表現型の解析を行い、また、導入領域内に存在する遺伝子の発現解析を行った結果、肥満QTLに関わる4つの有力な候補遺伝子を発見した。

研究成果の概要(英文)：We have previously discovered a new QTL for growth and obesity on mouse chromosome 2 from a gene pool of the wild mouse and have constructed a congenic strain carrying the QTL allele derived from the wild mouse. In this study, we developed many subcongenic strains with different introgressed intervals using the previously constructed congenic strain. Phenotypic characterization of the subcongenic strains developed and expression analyses of genes within the introgressed region revealed that four genes are most likely candidates for the obesity QTL.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2008年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2009年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

## 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：マウス、成長、肥満、QTL、量的形質、候補遺伝子、コンジェニック系統

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 1980年代後半からの分子遺伝学と統計学の急速な発展により、動植物の様々な量的形質(農業上重要な経済形質、ヒトの多因子性疾患など)に關与する量

的形質遺伝子座(QTLs: quantitative trait loci)を染色体上に位置づけることが可能となった。現在、世界中で精力的にチャレンジされている研究は、QTLの候補

遺伝子を同定することである。その最終目的は、量的形質の分子遺伝学的基盤を解明し、人類の健康増進や食料の安定供給に役立てることである。

- (2) しかし、今までに、実際に候補遺伝子が同定されたものは、遺伝子効果が比較的大きいQTLに関するもののみで、いわゆる表現型効果の15%以下までを説明する典型的なQTLに関するものは皆無である。
- (3) 哺乳動物の成長や脂肪蓄積に関与するQTLの候補遺伝子を同定したという報告例は世界中でわずかしかない(例えば、ブタの筋肉成長に関わるIGF2遺伝子とマウスの体重成長に関与するGpc3遺伝子)。
- (4) 未開発の野生動物の遺伝資源に着目して新規QTLsを発掘・利用することは、今までに想像もつかない高能力を有する新規家畜品種の分子育種を可能にする。しかし、マウスを家畜のモデルとして、野生哺乳動物の遺伝資源に着目して成長・肥満形質に関わる有用なQTLsの探索を行っているのは、国内外において我々の研究グループのみである。
- (5) 我々は、今までに、野生マウスの遺伝資源から生後の体重成長と肥満に関与する24個の新規QTLsを13本の染色体上に位置づけることに成功した。これらの中、最も大きな表現型効果(約12%)を示した第2染色体のQTLをC57BL/6J近交系マウスに導入したコンジェニック系統(B6, Cg-Pbwg1)を樹立したところ、野生マウス由来の対立遺伝子が生後1-3週齢間の体重増加量を増加させるとともに、皮下・内臓の白色脂肪組織重量を減少させるというユニークな予備実験結果を得た。

## 2. 研究の目的

野生マウスの遺伝資源から発掘した第2染色体上のユニークな成長・肥満QTLの候補遺伝子の同定を試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) サブコンジェニック系統の樹立

- ① 以前に樹立したB6, Cg-Pbwg1コンジェニック系統をC57BL/6J系統に交配してF1世代を得た。F1同士を交配してF2世代を生産した。

- ② F2の耳介から常法によりゲノムDNAを抽出し、着目した染色体領域上に1-2cM間隔に配置した25個のマикроサテライトマーカーの遺伝子型をサーマルサイクラーVeriti(ABI)を用いてPCRとアガロースゲル電気泳動法により決定した。
- ③ 様々な組換え個体を選抜・交配し、マクロサテライトマーカーの遺伝子型を決定し、着目したゲノム領域をホモ型に持つサブコンジェニック系統を樹立した。

### (2) 表現型の解析

- ① 樹立したサブコンジェニック系統並びにB6, Cg-Pbwg1コンジェニック系統とC57BL/6J系統に通常食として日本クレアのCA-1(粗脂肪含量約5%)を自由摂取させた。生後10または13週齢にと殺し、体重、体長と臓器重量を計測した。また、血中脂質濃度を吸光マイクロプレートリーダー(テカンジャパン)を用いて計測した。
- ② 生後6から13週齢までの7週間、サブコンジェニック系統、B6, Cg-Pbwg1とC57BL/6J系統にResearch Dietsの高脂肪食D12451(粗脂肪含量約24%)を自由摂取させた。13週齢にと殺し、上述の成長・肥満形質を計測した。

### (3) マイクロアレイ解析

- ① 生後10週齢のB6, Cg-Pbwg1とC57BL/6J雄個体から肝臓と精巣周囲の白色脂肪組織を採取し、RNAlater(アンピオン)に浸した。
- ② 採取した臓器試料をラボウ・バイオメディカル部へ送付して受託解析した。常法により総RNAを抽出し、逆転写酵素によりcDNAを合成し、Affimetrix社のジーンチップMouse Genome 430 2.0 arrayを用いて遺伝子発現量を定量した。

### (4) リアルタイム定量PCR法による遺伝子発現解析

- ① 肝臓、白色脂肪組織、骨格筋およびすい臓から常法に従って総RNAを抽出し、逆転写酵素によりcDNAを合成した。
- ② サイバーグリーン(ABI)で標識

し、リアルタイムPCR装置 *StepOne* (ABI) を用いて遺伝子発現量を定量した。

#### 4. 研究成果

##### (1) サブコンジェニック系統の樹立

B6. *Cg-Pbwtg1* コンジェニック系統と C57BL/6J 系統間の交雑 F2 世代の組み換え個体群を用いて、14 種類のサブコンジェニック系統の樹立に成功した。これらのうち、図 1 には後述の表現型解析に用いた 5 種類のサブコンジェニック系統 (B6. *Cg-Pbwtg1*/SR# と命名し、以降 SR# と略す) の野生マウス由来の導入ゲノム領域の長さを示す。その長さは、約 0.8–3.1 Mb の範囲内にあった。

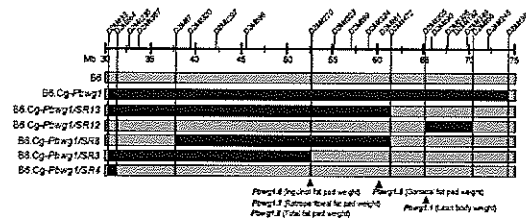


Figure 1

図 1. 樹立したサブコンジェニック系統が保有する導入ゲノム領域の長さ (黒いバー)。図の下の三角は以前にマップされた成長・肥満 QTLs の位置を示す。図の上にはマイクロサテライトマーカーの位置を示す。

##### (2) 表現型の解析

5 種類のサブコンジェニック系統並びにコントロールのオリジナル B6. *Cg-Pbwtg1* コンジェニック系統と C57BL/6J 系統において、体重、体長および臓器重量などを計測した。その結果、特に、2 つのサブコンジェニック系統 SR8 と SR13 において、白色脂肪組織重量が C57BL/6J のそれより統計学的に有意に軽かった。図 2 に、その実例を示す。

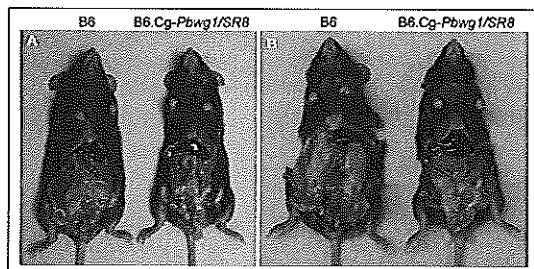


Figure 2

図 2. サブコンジェニック系統 SR8 の白色脂肪組織重量。コントロールの C57BL/6J より著しく少ないことがわかる。A: 生後 13 週齢, B: 生後 30 週齢。

一方、SR3 の白色脂肪組織重量には C57BL/6J と有意な差異がみられなかった。したがって、白色脂肪組織重量に関与する QTLs の存在するゲノム領域の長さは、図 1 より、SR8 と SR3 間で重複していない *D2Mit270* と *D2Mit472* 間の 8.8 Mb であることが明らかとなった。

次に、高脂肪食を与えてサブコンジェニック系統とコントロール系統間で体重、臓器重量などを比較したところ、通常食の場合と同様な結果が得られた。また、通常食と高脂肪食のデータを統合して解析したところ、図 3 に示すように、与えた飼料と系統との間で有意な相互作用が認められた。したがって、野生マウス由来の QTL 対立遺伝子は、白色脂肪組織重量を減少させるとともに、高脂肪食付加を行っても肥満になりにくいことが明らかとなった。

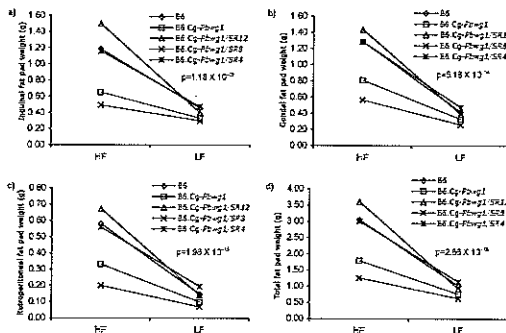


Figure 3

図 3. 各白色脂肪組織重量における系統×飼料の相互作用。

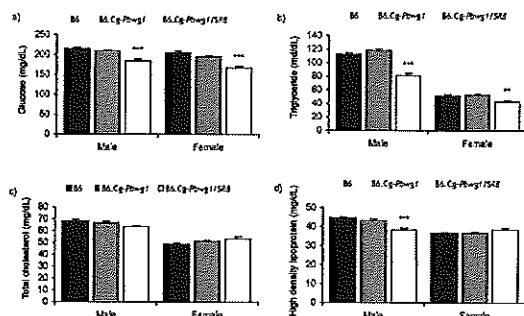


Figure 4

図 4. 血中グルコースとコレステロール濃度の比較。

最後に、通常食投与下の血中グルコースおよびコレステロール濃度を SR8 とコントロール系統間で比較した。図 4 に示すように、SR8 ではグルコースと HDL (high density lipoprotein) 濃度が有意に低いことが判明した。したがって、この対立遺伝子は、エネルギー代謝と脂肪組織の分化に関わっているものと推測された。

### (3) マイクロアレイ解析

マイクロアレイの受託解析を行ったところ、表1に示すように、肝臓で4個の、精巣周囲の白色脂肪組織で3個の遺伝子についてコンジェニックとC57BL/6J系統間で発現量の差異がみられた。

表1. マイクロアレイ解析結果

Organ	Gene symbol	Signal Log ratio <sup>1</sup>
Liver	<i>Gpd2</i>	1.5
	<i>Upp2</i>	-1.0
	<i>March7</i>	-2.3
	<i>Rbms1</i>	-1.0
Gonadal fat	<i>Gpd2</i>	1.0
	<i>Acvr1c</i>	1.5
	<i>March7</i>	-1.7

<sup>1</sup> プラスはコンジェニック系統において発現量高く、マイナスは低いことを示す。

### (4) 遺伝子発現解析

上記のマイクロアレイ解析結果を確認するために、8.8Mb内に存在する全29個の遺伝子についてリアルタイム定量PCR法による発現解析を行った。その結果、明確な遺伝子発現量の差異を示した4個の遺伝子(*Acvr1c*, *Cytip*, *Dap1*, *Upp2*)を発見することができた。

### (5) まとめ

本研究成果により、以前に野生マウスの遺伝資源から発掘した第2染色体上の新規肥満QTLを物理的に8.8Mbのゲノム領域内に位置づけることに成功した。そして、野生マウス由来対立遺伝子は肥満抵抗性を示すことを明らかにした。このようなユニークな特性をもつ野生由来遺伝子は、国内外において未だに発見されていない。また、遺伝子発現解析により、4個の候補遺伝子が発見することができ、ある遺伝子ではアミノ酸置換の存在が示唆されている。

今後、詳細なシーケンズ解析およびタンパク質の発現解析などにより、このQTLの責任遺伝子の同定と肥満抵抗性の分子遺伝学的メカニズムの解明を目指す。

## 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5件)

- ① Ishikawa, A., Li, C., Development and characterization of a congenic strain carrying *Pbwg12*, a growth QTL on mouse chromosome 12, *Exp. Anim.*, 査読有, 59巻, 2010, 109-113

- ② Ishikawa, A., Mapping an overdominant quantitative trait locus for heterosis of body weight in mice, *J. Hered.*, 査読有, 100巻, 2009, 501-504

- ③ Ishikawa, A., An ontogenic network for quantitative trait loci affecting body weight in mice, *Current Topics in Genetics*, 査読有, 3巻, 2008, 69-75

- ④ 石川 明, 量的形質変異の遺伝的基盤の複雑さ-マウス成長形質のQTL解析からの報告-, *動物遺伝育種研究*, 査読有, 36巻, 2008, 5-12

- ⑤ Ishikawa, A., Kim, E.-H., Bolor, H., Mollah, Md. B. R., Namikawa, T., A growth QTL (*Pbwg1*) region of mouse chromosome 2 contains closely linked loci affecting growth and body composition, *Mamm. Genome*, 査読有, 18巻, 2007, 229-239

[学会発表] (計12件)

- ① Mollah, Md. B. R., Ishikawa, A., Genetic dissection of closely linked quantitative trait loci affecting body weight and obesity on mouse chromosome 2, 日本動物遺伝育種学会第10回記念大会, 2009年11月9-10日, 群馬会館(前橋市)

- ② Mollah, Md. B. R., Ishikawa, A., Genetic dissection of a complex cluster of body weight and obesity quantitative trait loci on mouse chromosome 2, 11th International European Molecular Biology Laboratory (EMBL) PhD Student Symposium, 27 October-2 November 2009, Heidelberg (Germany)

- ③ 李 春・石川 明, 野生マウス由来のエピスタシスQTLを導入したコンジェニック系統の特徴, 日本畜産学会第111回大会, 2009年9月28-29日, 琉球大学共通教育棟(沖縄県中頭郡西原町)

- ④ 石川 明, マウスの体重変異に関わる遺伝的基盤の解明を目指して, 日本遺伝学会第81回大会ワークショップW7 量的形質研究の展望, 2009年9月16-18日, 信州大学理学部(松本市)

- ⑤ 石川 明, 量的形質の遺伝的基盤の解明を目指して: マウスの体重形質を例として, 第42回応用動物科学セミナー招待講演(広島大学5研究科共同セミナー), 2009年9月10日, 広島大学生物生産学部(東広島市)

- ⑥ 李 春, 石川 明, 野生マウス由来の成長QTL *Pbwg12* ゲノム領域を導入したコンジェニック系統の樹立とその特徴解析, 第56回日本実験動物学会総会, 2009

年5月14日-16日、大宮ソニックシティ  
(さいたま市)

- ⑦ 李 春、並河鷹夫、石川 明、マウス第12染色体上の体重 QTL を導入したコンジュニック系統の樹立とその特徴解析、2008年東海実験動物研究会例会、2008年10月4日、名古屋大学農学部(名古屋市)
- ⑧ 石川 明、並河鷹夫、野生マウスの体重に關与する超優性 QTL、第53回日本実験動物科学技術 2008、2008年5月15-17日、仙台国際センター(仙台市)
- ⑨ Mollah, M. B. R.、Nakao, N.、Namikawa, T.、Ishikawa, A.、Fine mapping and expression analysis reveals that *upp2* is a positional candidate gene for adiposity QTL、日本畜産学会第109回大会、2008年3月27-29日、常磐大学(水戸市)
- ⑩ 石川 明、並河鷹夫、野生マウスに発見されたヘテローシスを示す体重 QTL、日本畜産学会第109回大会、2008年3月27-29日、常磐大学(水戸市)
- ⑪ Mollah, Md. B. R.、Ishikawa, A.、Fine mapping of adiposity QTL on mouse proximal chromosome 2 by subcongenic analysis、The 21st International Mouse Genome Conference、28 October-1 November 2007、Kyoto (Japan)
- ⑫ 石川 明、並河鷹夫、マウスの体重と体重関連形質に正反対の遺伝子効果を持ち互いに密接に連鎖した QTLs、第54回日本実験動物学会総会、2007年5月23-25日、江戸川区民ホール(東京都)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石川 明 (ISHIKAWA AKIRA)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・  
准教授  
研究者番号：20211724

### (2) 研究分担者

並河 鷹夫 (NAMIKAWA TAKAO)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・  
特任教授  
研究者番号：70111838  
海老原 史樹文 (EBIHARA SHIZUFUMI)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授  
研究者番号：50135331