

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580393

研究課題名(和文)ブタの脂肪蓄積に関する遺伝子マーカーの開発

研究課題名(英文)Development of efficient gene markers that can be used to improve the fat deposition traits in pigs.

研究代表者

田中 和明 (Tanaka, Kazuaki)

麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号：50345873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ブタの脂肪蓄積に関する形質の改良に有効な遺伝子マーカーの開発を目的としヒトの肥満と関連付けられている候補遺伝子を対象に、多型解析と形質相関解析を実施した。解析対象は、グレリン前駆体、グレリン受容体、レプチン受容体、およびGタンパク質共役型受容体120遺伝子である。グレリン前駆体遺伝子c.335C>A多型は、筋肉内脂肪含量割合および背脂肪厚と有意な相関は認められなかった。レプチン受容体遺伝子c.2002C>T (c.1987C>T)は既知の多型ではあるが、背脂肪厚と相関を持ち重要な遺伝子マーカーになり得ることが確認できた。さらに、この多型に対する簡便な遺伝子型判定法の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we analyzed sequence variations in pig homolog of candidate genes for human obesity in order to develop efficient gene markers that can be used to improve the fat deposition traits in pigs. The preproghrelin (GHRL), growth hormone secretagogue receptor (GHSR), leptin receptor (LEPR), and G-protein coupled receptor 120 (GPR120) genes were selected to study. The c.335C>A polymorphism in GHRL gene was not associated with intra-muscular fat and back fat thickness. However, previously reported c.2002C>T (now c.1987C>T) polymorphism in LEPR was significantly associated with back fat thickness in our study population, and thus, we confirmed that this polymorphism could be an effective gene marker. Furthermore, we have succeeded in developing a simple genotyping method for this polymorphism.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・家畜ゲノム

キーワード：ブタ 改良 遺伝子マーカー 脂肪蓄積 グレリン グレリン受容体 レプチン受容体 Gタンパク質共役型受容体120

1. 研究開始当初の背景

平成 23 年度食料需給表(農林水産省)によると、我が国の豚肉の自給率は約 52%である。今後、豚肉の輸入に関する差額関税制度の見直しが行われれば、国内養豚産業は、大きな内外価格差に晒されることになる。このような状況下において、日本国内の養豚産業の持続的発展を図るためには、国内で生産される豚肉を品質によって差別化する必要がある。

日本の産業的養豚で用いられるブタ品種は、欧米諸国原産のランドレース種、大ヨークシャー種、デュロック種、パークシャー種および、これら純粋種間の交雑種によって寡占されている。ゆえに、ブタにおいては、肉牛生産における黒毛和種のような我が国固有の遺伝資源は存在しない。このため、ブタの改良は海外と同一の遺伝子プールを基礎として行う必要がある。しかし、欧米諸国のブタの改良は、脂肪を減らし、赤肉の生産量を増やすことに重点が置かれてきた。これに対して、日本の市場では、適度に脂肪を含む豚肉が好まれているため、脂肪蓄積に関わる形質は、国産豚肉の付加価値を高めるための重要な改良対象に位置づけられている。

近年の遺伝子解析技術の発展によって、ブタの生産能力の改良を目的とした、遺伝子マーカーの開発が積極的に行われている。研究代表者は、平成 18 年~20 年度若手研究(B)課題番号 18780212『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』の研究成果として、

3 アドレナリン受容体(*ADRB3*)遺伝子の第 2 エクソンにおける一塩基挿入多型が、デュロック種のロース面積に影響を与えることを明らかにした。上記の研究を通じて、日本国内で利用されている主要なブタ品種の十分な DNA 試料セットを得ることができたため、これを有効活用することで、効率よくブタの遺伝子多型を検出し、形質との相関解析が可能であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、ブタの脂肪蓄積に関する形質の改良に有効な遺伝子マーカーの開発を目的としヒトの肥満と関連付けられている候補遺伝子を対象に、配列多型解析と形質相関解析を実施する。

(1) グレリン前駆体(GHRL)の $\text{Asn}^{112} \leftrightarrow \text{Thr}^{112}$ 多型を生じる SNP と、ブタの形質との相関解析を行い改良マーカーとしての有効性を明らかにする。

(2) グレリン受容体(GHSR)遺伝子の配列を決定し多型解析を行う

(3) レプチン受容体(LEPR)の $\text{Leu}^{663} \leftrightarrow \text{Phe}^{663}$ 多型を生じる SNP の簡便な遺伝子型判定方法の開発と形質相関解析を実施する。

(4) G タンパク質共役型受容体 120(GPR120)遺伝子の新規多型探索を行う。

3. 研究の方法

(1) 研究に用いたブタ試料

研究期間を通じて、パークシャー種(n=50)、イベリア種(n=3)、マンガリツア種(n=2)、デュロック種(n=471)、ランドレース種(n=250)、大ヨークシャー種(n=296)、梅山種(n=6)、クラウンミニブタ(n=52)、LWD 三元交配豚(n=81)、ニホンイノシシ(n=74)、リュウキュウイノシシ(n=12)の合計 1297 個体のブタおよびイノシシの試料を解析した。これらの中で、デュロック種、ランドレース種、大ヨークシャー種、および LWD 三元交配豚では、下記の形質測定値が得られたので相関解析を実施した。

デュロック種の筋肉内脂肪割合(%)は、体重約 90 kg 到達時に体長 2 分の 1 部よりバイオプシーされた最長筋(ロース)をエーテル抽出して得られた粗脂肪の値を利用した。LWD 三元交配豚の筋肉内脂肪割合(%)は、体重 115 kg 到達時の屠体の最後胸椎の後端部位のロース部をエーテル抽出して得られた粗脂肪の値を利用した。

デュロック種、ランドレース種、および大ヨークシャー種の背脂肪厚(cm)とロース面積(cm^2)は、体重 90 kg の生体における体長 2 分の 1 部を、B モード超音波診断装置を用いて計測した値を用いた。LWD 三元交配豚の背脂肪厚は、体重 115 kg 到達時の屠体の背部の最小の値を利用し、ロース面積は第 5 胸椎と第 6 胸椎間の切断面での値を用いた。

一日平均増体重(g)は、デュロック種、ランドレース種、および大ヨークシャー種では、体重 30 から 90 kg の期間を、LWD 三元交配豚では体重 30kg から 115 kg の期間を基に求めた値を利用した。

(2) グレリン前駆体(GHRL)の $\text{Asn}^{112} \leftrightarrow \text{Thr}^{112}$ 多型を生じる c.335 A>C 多型の部位を含む 217bp の DNA 断片を (TGATGATGTTGGGATCAAGTTGTCA) と (CACAGAAGCTCTTTAGAGAGGCAG) のプライマーセットを用いて PCR 増幅した。次に、PCR 産物を制限酵素 *Tsp45I* で消化することで生じる断片長多型によって遺伝型判定を行った。これによって品種ごとの対立遺伝頻度および形質との相関を解析した。

(3) グレリン受容体(GHSR)遺伝子を対象に (CGCCCCAGGCTCTCAGTCTT) と (GGCAGAAAGCTTACATCACCTTCA) のプライマーを用いて PCR を行い、約 1.5kb の断片を増幅した。家畜ブタ 8 品種とイノシシについて DNA の塩基配列を決定し相互に比較し多型を探索した。また、新規に発見した 1 塩基多型 GHSR1b:c.842A>G に対して、制限酵素 *BsrBI* を用いた判定法を開発し、品種内での頻度分布を調査した。

(4) 背脂肪厚に影響を持つ遺伝子多型と報告されているレプチン受容体の $\text{Leu}^{663} \leftrightarrow \text{Phe}^{663}$ の原因となる一塩基多型 c.2002C>T(命名規約に従えば、c.1987C>T の表記となる)(引用文献 [1], [2], [3], [4]) の簡便な遺伝子型判定方法として、ミスマッチ塩基導入プライマー (CCACTAAAAAGAGAGGAATATCACgCTG[小文字で

表した (g) がミスマッチ塩基]) と (ATGGCAGAGTCCAGAAATGACT) の組み合わせによって、133bp の DNA 断片を増幅した。増幅産物を制限酵素 *ApeK* で消化した後、アガロースゲル電気泳動を行い、断片長多型による遺伝子型判定を行った。

(5)GPR120 遺伝子の3つのコーディングエクソンを含む DNA 断片を PCR 増幅し家畜ブタ 8 品種とイノシシについて DNA の塩基配列を決定し多型を探索した。プライマーは、エクソン 1 は (CACCTTGGGTGCCCTGGAG) と (CGTCGGATCCCGCCGACCAG)、エクソン 2 は (TGGGGCCACGTACTCTCTCT) と (AGCCACAGAGCGCTTAAGCAAACG)、エクソン 3 は (CCAGCGCAACCTAAGCGCGG) と (GCAGGTACAGGGTGAATGGT) の組み合わせを用いた。

4. 研究成果

(1) グレリン前駆体 (GHRL) 遺伝子の c.335 A>C 多型の対立遺伝子頻度分布を表 1 に示した。デュロック種、梅山種、およびニホンイノシシでは A 型が最頻対立遺伝子であるが、他の品種では C 型のほうが高頻度であることが明らかとなった。

表1 GHRL遺伝子c.335A>C多型の頻度分布

品種	個体数	遺伝子型			対立遺伝子頻度	
		AA	AC	CC	A	C
パークシャー	50	4	17	29	0.250	0.750
デュロック (集団1)	10	4	5	1	0.650	0.350
デュロック (集団2)	461	333	122	6	0.855	0.153
ランドレース (集団1)	78	12	35	31	0.378	0.622
ランドレース (集団2)	172	35	84	53	0.448	0.552
大ヨークシャー (集団1)	10	0	4	6	0.200	0.800
大ヨークシャー (集団2)	282	16	132	134	0.291	0.709
中ヨークシャー	26	2	17	7	0.404	0.596
梅山	6	6	0	0	1.000	0.000
LWD三元交配	81	17	48	16	0.506	0.494
クラウンミニ	52	0	0	52	0.000	1.000
ニホンイノシシ	64	64	0	0	1.000	0.000
リュウキュウイノシシ	12	3	3	6	0.375	0.625

筋肉内脂肪割合 (%) と遺伝子型との相関解析は表 2 に示した結果となった。有意ではないが、デュロック種では雌雄ともに AC 型は、他の遺伝子型に比べて、筋肉内脂肪割合が高い傾向が認められた。しかし LWD 三元交配豚では、同様の傾向は認められなかった。

表2 GHRL遺伝子c.335A>C多型と筋肉内脂肪含量割合 [IMF (%)] との相関解析

品種	個体数	遺伝子型			p値
		AA	AC	CC	
デュロック (雌)	88		38	2	
デュロック (雄)	67		19	2	
デュロック (雌)	IMF (%) ±SD	4.28±0.14	4.75±0.21	3.34±0.91	0.064
デュロック (雄)	IMF (%) ±SD	4.07±0.19	4.81±0.36	4.13±1.11	0.072
LWD三元交配 (雌)	6		29	7	
LWD三元交配 (雄)	IMF (%) ±SD	3.44±0.42	3.00±0.18	3.16±0.43	0.590
LWD三元交配 (去勢雄)	11		19	9	
LWD三元交配 (去勢雄)	IMF (%) ±SD	2.53±0.31	2.65±0.26	2.76±0.42	0.883

背脂肪厚 (cm) と遺伝子型との相関解析は表 3 に示した結果となった。デュロック種、ランドレース種、大ヨークシャー種および LDW 三元交配豚のいずれの集団においても背脂肪厚と遺伝子型の間には有意な相関は認められなかった。また、一日平均像体重と遺伝子型との間にも有意な相関は認められなかった。

表3 GHRL遺伝子c.335A>C多型と背脂肪厚 (BFT) との相関解析

品種 (性)	個体数	遺伝子型			P値
		AA	AC	CC	
デュロック (雌)	BFT (cm)	1.64±0.03	1.74±0.04	1.74±0.19	0.126
デュロック (雄)	BFT (cm)	1.45±0.03	1.54±0.07	1.68±0.19	0.574
デュロック (去勢雄)	BFT (cm)	1.78±0.07	1.76±0.12	—	0.866
ランドレース (雌)	BFT (cm)	1.39±0.05	1.44±0.03	1.52±0.04	0.070
ランドレース (雄)	BFT (cm)	1.21±0.04	1.16±0.03	1.22±0.04	0.376
大ヨークシャー (雌)	BFT (cm)	1.35±0.09	1.42±0.04	1.47±0.04	0.459
大ヨークシャー (雄)	BFT (cm)	0.93±0.12	1.25±0.04	1.26±0.04	0.876
LWD三元交配豚 (雌)	BFT (cm)	1.70±0.13	1.57±0.06	1.79±0.14	0.272
LWD三元交配豚 (雄)	BFT (cm)	2.08±0.13	1.98±0.11	1.82±0.18	0.415

デュロック種の雌では AA 型の個体は AC 型に比べて有意にロース面積が大きかった (p=0.014)。しかし、雄および他の品種では、この効果は検出できなかった。以上の結果から、GHRL 遺伝子 c.335 A>C 多型は、ブタの脂肪蓄積に対するマーカーとしての有用性は低いことが明らかとなった。

(2) ランドレース、イベリア、デュロック、梅山、中ヨークシャー、パークシャー、大ヨークシャー、マンガリツアの 8 品種およびニホンイノシシとリュウキュウイノシシの計 22 個体グレリン受容体 (GHSR) 遺伝子の配列を解析した。転写開始点より 5' 側上流に、ブタゲノム配列 (Sscrofa10.2) では、認められない 9 塩基の挿入を発見した (図 1)。9 塩基の挿入は、配列を決定した 22 個体に共通していた。

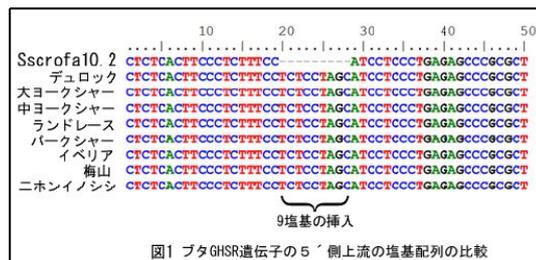


図1 ブタGHSR遺伝子の5'側上流の塩基配列の比較

さらに、GHSR のスプライシングバリエーションである GHSR1b のコード領域の 842 番目の塩基に A>G 置換を発見した。この多型によって GHSR1b タンパクの 281 番目のアミノ酸がヒスチジンからアルギニンに置換することが明らかとなった (図 2)。アミノ酸置換によるタンパク質の構造への影響を SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) を用いて分析した結果、機能に影響があると予測された。

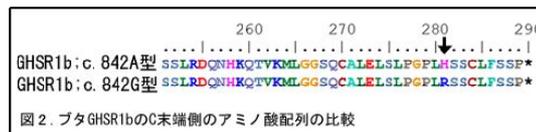


図2. ブタGHSR1bのC末端側のアミノ酸配列の比較

GHSR1b は、グレリン受容体である GHSR1a の C 末端側の細胞質ループを欠くので直接的なシグナル伝達を行わないと考えられている。しかし、GHSR1a に対してドミナントネガティブ効果を有すると報告されている (引用文献

[5])。さらに、GHSR1aとGHSR1bはヘテロ二量体を形成するとの報告もされている(引用文献[6])。このため、今回発見した多型は、グレリンによる生理学的制御に影響を及ぼす可能性がある。そこで、GHSR1b:c.842A>G多型の簡便な遺伝型判定方法を開発した。研究の方法の項で示したプライマーを用いて増幅した1.5 kbのDNAを制限酵素 *Bsr*BI で消化した後、1.5%アガロースゲル電気泳動を行うと、図3に示のように容易に遺伝子型判定が可能であった。

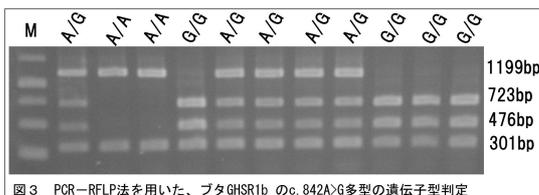


図3 PCR-RFLP法を用いた、ブタGHSR1bのc.842A>G多型の遺伝子型判定

この手法を用いて対立遺伝子頻度を求めた結果デュロック、ランドレースおよび大ヨークシャー種では、A型の対立遺伝子頻度がそれぞれ、0.45、0.34、0.29であった。形質との相関は、現時点ではまだ十分な結果が得られていない。

(3) 本研究以前からレプチン受容体遺伝子(LEPR)のc.2002 C>T(c.1987C>T)多型は背脂肪厚に効果を持つという複数の報告があった(引用文献[1],[2],[3],[4])。しかし、遺伝子型判定は、ダイレクトシークエンスやSNaPshot法など、高額な装置を必要とする方法しか報告されてなかった。複数のプライマーを検討した結果、研究の方法の項で示したプライマー配列と制限酵素の組み合わせによる、遺伝子型判定方法を開発することができた。図4に示したように、多数の個体の遺伝子型を簡便に判定することができた。

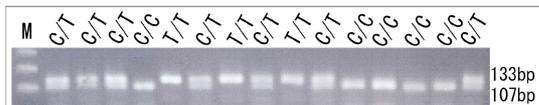


図4 ミスマッチ導入プライマーを使ったPCR-RFLP法によるc.2002 C>T多型の遺伝子型判定結果

対立遺伝子の頻度は、表4に示した結果となった。パークシャー種ではT型対立遺伝子の頻度が非常に低いことが明らかとなった。

表4 LEPR遺伝子c.2002 C>T多型の頻度分布

品種	個体数	遺伝子型			対立遺伝子頻度	
		CC	CT	TT	C	T
パークシャー	66	58	8	0	0.939	0.061
デュロック	313	100	148	65	0.556	0.444
ランドレース	140	83	51	6	0.775	0.225
大ヨークシャー	281	106	127	48	0.603	0.397
LWD三元交配	81	15	49	17	0.488	0.512
イベリア	3	0	0	3	0.000	1.000
二ホンイノシシ	74	40	27	7	0.723	0.277

表5 LEPR遺伝子c.2002 C>T多型と豚肉内脂肪含量割合の相関解析

品種	個体数	遺伝子型			P値
		CC	CT	TT	
ランドレース(雌)	51	31	7		
背脂肪厚(cm) ±SD		1.46±0.03	1.42±0.06	1.57±0.11	0.407
ランドレース(雄)	32	20	2		
背脂肪厚(cm) ±SD		1.34±0.02	1.32±0.04	1.40±0.09	0.674

ランドレース種の背脂肪厚とc.2002 C>Tとの相関解析の結果は、表5のようになった。雌雄ともにTT型が、他の遺伝子型に比べて背脂肪厚の平均値が大きかった。しかし、標準偏差が大きく統計的な有意差は認められなかった。これは、TT型の個体数が少ないことに原因があると考えられる。今後、個体数を増やして、相関解析を行う必要がある。

図4で示した遺伝型判定手法は、共同研究を行っている種豚改良機関に移管し、デュロック種1414個体を対象とした形質との相関解析に利用された。その結果、T型対立遺伝子には、背脂肪厚を増加させる効果があり、背脂肪厚に関する遺伝分散の約20%を説明できることが示された。ゆえに、c.2002 C>Tは、背脂肪厚の改良に対して有効な遺伝子マーカーとなり得ることが再確認された。この結果は、主な発表論文の項で示した雑誌論文の中ですでに公表されている。

(4) オメガ-3脂肪酸受容体であるGタンパク質共役型受容体120(GPR120)遺伝子の遺伝子多型を探索し、表6に示した7個の1塩基多型を発見した。

表6 ブタGPR120遺伝子上に発見した1塩基多型

多型	遺伝子上での位置	タンパク質への影響
c.-263 C>T	5'フランキング領域	
c.42 G>T	エクソン1	同義置換
c.56 G>A	エクソン1	Ser19Asn
c.567+8956 C>T	イントロン1	
c.567+9023 G>T	イントロン1	
c.696+11462 G>C	イントロン2	
c.837 G>A	エクソン3	同義置換

これらのうちで、c.56 G>A多型は、受容体タンパクの19番目のアミノ酸をセリンからアスパラギンに置換させるものであった。アミノ酸置換によるタンパク質の構造への影響をPolyPhen-2とSIFTによって分析すると、どちらも影響は小さいと推定された。さらに、この多型が検出されたのは、リュウキュウイノシシでのみで、家畜ブタからは見つからなかった。このためGPR120 c.56G>A多型は、ブタの改良を目的とした遺伝子マーカーの候補にはならなかった。

[引用文献リスト]

文献[1] Ovilo et al., (2005). Fine mapping of porcine chromosome 6 QTL and LEPR effects on body composition in multiple generations of an Iberian by Landrace intercross. *Genetics Research* 85:57-67.

文献[2] Muñoz et al., (2009). Single- and joint-population analyses of two experimental pig crosses to confirm quantitative trait loci on *Sus scrofa* chromosome 6 and leptin receptor effects on fatness and growth traits. *Journal of Animal Science* 87:459-468.

文献[3] Muñoz et al., (2011) Effects of porcine MC4R and LEPR polymorphisms, gender and Duroc sire line on economic traits in Duroc × Iberian crossbred pigs. *Meat Science* **88**:169-173.

文献[4] Uemoto et al., (2012). Effects of porcine leptin receptor gene polymorphisms on backfat thickness, fat area ratios by image analysis, and serum leptin concentrations in a Duroc purebred population. *Animal Science Journal* **83**:375-385.

文献[5] Leung et al., (2007). The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) acts as a dominant-negative mutant of the ghrelin receptor. *Cellular Signalling* **19**:1011-1022.

文献[6] Chow et al., (2012). The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) is localized in the endoplasmic reticulum where it forms heterodimers with ghrelin receptors (GHS-R1a) to attenuate their cell surface expression. *Molecular and Cellular Endocrinology* **348**:247-254.

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 1 件)

Hirose K, Ito T, Fukawa K, Arakawa A, Mikawa S, Hayashi Y, Tanaka K. (2014) Evaluation of effects of multiple candidate genes (*LEP*, *LEPR*, *MC4R*, *PIK3C3*, and *VRTM*) on production traits in Duroc pigs. *Animal Science Journal* **85**:198-206. doi: 10.1111/asj.12134.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：