

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580467

研究課題名(和文) 品種の違いに着目した犬と猫の肥満関連遺伝子の探索

研究課題名(英文) Exploration of obese-related genes in cats and dogs.

研究代表者

石岡 克己 (Ishioka, Katsumi)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：60409258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：肥満はイヌにおいて臨床的に問題となっている。170頭の犬のゲノムDNAで遺伝子多型を解析し、次の結果を得た。β3アドレナリン受容体遺伝子では5つの同義置換と7つの非同義置換が見つかり、c.749C>T (p.Ser250Phe)が肥満度のより高い、c.1121C>G (p.Pro374Arg)が肥満度のより低い個体群で遺伝子頻度が高かった。GPR120遺伝子では5つの同義置換と4つの非同義置換が見つかり、c.595C>A (p.Pro199Thr)が肥満度のより高い個体群で遺伝子頻度が高かった。c287T>Gはビーグルのみで見られた。これらの知見は、イヌの臨床栄養学に応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Obesity is a clinical problem in dogs. We explored genetic variants using genomic DNA samples collected from 141 dogs. We found 5 synonymous and 7 non-synonymous variants in the canine beta-3 adrenergic receptor gene, in which c.749C>T (p.Ser250Phe) was found more in obese dogs and c.1121C>G (p.Pro374Arg) was found more in lean dogs. We found 5 synonymous and 4 non-synonymous variants in the canine GPR120 gene, in which c.595C>A (p.Pro199Thr) was found more in obese dogs. The variant c.595C>A (p.Pro199Thr) was found only in beagles. These findings will be applied to clinical nutrition in dogs.

研究分野：獣医学

キーワード：肥満 犬 遺伝子多型 SNP

1. 研究開始当初の背景

肥満は、医学・獣医学両方の領域において重大な課題である。イヌにおいて肥満は高脂血症や急性膵炎の危険因子であり、生存日数の短縮にも影響することが知られている。肥満は遺伝と環境の相互作用による多因子疾患であるが、ヒト医療では近年、遺伝因子の重要性が注目されている。即ち代謝に影響する遺伝形質が複数重なり合い、肥満しやすい素因を作り上げると考えられている。 $\beta 3$ アドレナリン受容体の一塩基多型 (SNP) はその代表格であり、64 番目のトリプトファンがアルギニンに置換されたヒトでは1日あたり約 200 kcal 代謝が低下し、肥満リスクの一つとなっている。他にも近年、脱共役蛋白質 1 (UCP1) やレプチン受容体、GPR-120 等、さまざまな代謝関連遺伝子の SNP が肥満リスクに影響を及ぼす事が明らかにされている。

犬や猫においては、太りやすい品種が存在する事は疫学的に証明されているものの、肥満との関連が証明されている遺伝子はまだ見つかっていない。犬や猫で肥満リスクに関与する遺伝子多型を明らかにすることは、イヌの健康管理、特に肥満治療や予防において、個体特性に基づいた健康管理が可能となることを意味している。

2. 研究の目的

肥満は、医学・獣医学の双方において重大な健康上の問題である。原発性肥満の要因の一つとして遺伝素因が重視されているが、犬や猫において肥満リスクに関係することが実証された遺伝子は、まだ見つかっていない。本研究では、太りやすい犬種や肥満動物群を対象にして大規模な SNP 検索を行い、イヌにおいて肥満リスクとなりうる遺伝子型を探索する。調査する遺伝子は、ヒトにおいて最も古典的かつ代表的な儉約遺伝子である $\beta 3$ -アドレナリン受容体遺伝子、および近年注目されている GPR-120 遺伝子の 2 つとした。これらにおいて肥満リスクに関係する SNP が見つければ、臨床現場で遺伝子検査項目として導入することによって、イヌにおける肥満の治療・予防に応用が期待される。

3. 研究の方法

(1) 動物病院に来院した 170 頭の犬を対象に、肥満関連候補遺伝子の探索を実施した。採取した血液の白血球からゲノム DNA を抽出し、PCR 法にて $\beta 3$ アドレナリン受容体遺伝子を増幅した。ダイレクトシーケンス法で PCR 産物の塩基配列を解読し、DNA データベース上のものと比較して一塩基多型 (SNP) を探索した。非同義置換については、犬種および肥満度との関係について統計解析を行った。肥満度は獣医師の身体検査に基づくボディコンディションスコア (BCS) で評価し、

5段階のうち2を低体重、3を適正、4-5を広義の肥満とした。

(2) 肥満との関連が予想される SNP を持つ個体群と持たない個体群 (野生型) の間で体重変動に違いが見られるか比較した。c. 749C>T 変異を持つビーグル犬3頭と持たないビーグル犬3頭をともに1日あたりエネルギー要求量 (DER) の90%に相当するエネルギー量で12週間飼育し、1週間毎に体重を測定して体重変動に差が見られるかを検証した。

(3) 発見した SNP を持つ $\beta 3$ アドレナリン受容体 cDNA を発現ベクターである pMACS および pcDNA3.1 に組み込み、リポフェクション法によって HEK293t (ヒト胎児胚由来腎臓) 細胞に導入した。これらの細胞からタンパク分画を抽出し、電気泳動後ウェスタンブロット法で導入受容体が含まれているかを確認して、機能解析に使用できるかを検討した。

(4) もう一つの肥満関連候補遺伝子である GPR120 について、イヌ腸管組織から抽出した RNA を材料に RT-PCR 法を実施し、遺伝子クローニングを行って塩基配列を決定した。次に、16種類のイヌ組織から抽出した RNA に対して RT-PCR を行い、臓器発現分布を明らかにした。さらに動物病院に来院した 141 頭の犬を対象に、 $\beta 3$ アドレナリン受容体遺伝子と同様に GPR-120 の SNP を探索した。非同義置換については、犬種および肥満度 (BCS) との関係について統計解析を行った。

4. 研究成果

(1) $\beta 3$ アドレナリン受容体遺伝子を対象として 170 頭の犬のゲノム DNA を調べたところ、12種類の SNP を発見した。うち5つが同義置換 (c. 39G>T, c. 81G>A, c. 432C>G, c. 759C>T, c. 853C>T)、7つが非同義置換 (c. 110T>G, c. 220G>A, c. 511G>A, c. 749C>T, c. 758C>G, c. 1121C>G, c. 1184A>C) であった。肥満度の指標であるボディコンディションスコア (BCS) との関連性を検討したところ、c. 749C>T (p. Ser250Phe) は BCS のより高い個体群で、c. 1121C>G (p. Pro374Arg) は BCS のより低い個体群で遺伝子頻度がそれぞれ有意に高く、代謝に影響している可能性が示唆された。

犬種との有意な関連は認められなかったが、c. 749C>T (p. Ser250Phe) はウェルシュ・コーギーやヨークシャー・テリア、ミニチュア・ダックスフント等、疫学的に太りやすいとされている犬種で存在が確認された。また、c. 1184A>C (p. Pro395Gln) はほとんどの犬種で検出され、全体における遺伝子頻度も 0.697 と最も高かった。

(2) c. 749C>T 変異を持つビーグル (n=3) と野生型のビーグル (n=3) に12週間同じエネ

ルギー量 (DER x 0.9) を給与したときの体重変動を調べたところ、5 週目までは差が見られなかったが、6 週目以降野生型ビーグルでは体重が減少する経過を示し、9 週目および 10 週目において体重が約 2.5%減少し、c. 749C>T 変異群との間に有意差が認められた。即ち、この SNP を持つ個体群は同一エネルギーを給与されていても体重が落ちにくく、代謝がやや低い傾向にある可能性が示唆された。

(3) 野生型および変異型のイヌ $\beta 3$ アドレナリン受容体を発現させた HEK293t 細胞の蛋白分画を電気泳動し、ウェスタンブロット法で検証したところ、推定分子量 40 kDa 前後の所に単一バンドが形成され、目的の受容体が発現していることが推定された。一方、発現させていない mock ではこのバンドは見られなかった。即ち、本研究で発見した SNP の機能解析を行うための実験系を確立することができた。今後、この細胞の培養液中にアドレナリンやノルアドレナリンなどのリガンドを添加し、細胞内で産生される cAMP を定量することによって、SNP ごとに機能に違いが見られるか検証していく予定である。

(4) イヌ GPR120 の分子クローニングを行い、そのアミノ酸配列がヒトと 84%、マウスと 85% 相同である事が確かめられた。臓器発現分布では下部消化管に強い発現が見られたが、全般的に他種のものと同様であった。141 頭の犬のゲノム DNA を調べたところ、9 種類の SNP を発見した。うち 5 つが同義置換 (c. 252C>G, c. 282C>G, c. 702A>G, c. 726G>A, c. 984T>C)、4 つが非同義置換 (c. 287T>G, c. 307G>A, c. 446G>C, c. 595C>A) であった。肥満度の指標であるボディコンディションスコア (BCS) との関連性を検討したところ、c. 595C>A (p. Pro199Thr) は BCS のより高い個体群で遺伝子頻度が有意に高かった。犬種との関連について解析したところ、c287T>G はビーグルのみに認められた。

(5) 以上を総合し、本研究によってイヌの肥満に関与する可能性のある候補遺伝子を複数個見つけることができた。将来的には血液材料から個体ごとの遺伝子型を特定し、その結果に基づく栄養管理に応用できる可能性がある。特に肥満治療と予防において、遺伝子検査の結果に基づく効率的な給餌計画の実現が期待される。

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 1 件)

- ① Miyabe, M., Gin, A., Onozawa, E.,
Daimon, M., Yamada, H., Oda, H.,

Mori, A., Momota, Y., Azakami, D.,
Yamamoto, I., Mochizuki, M., Sako, T.,
Tamura, K. and Ishioka, K.

Genetic variants of the unsaturated
fatty acid receptor GPR120 relating to
obesity in dogs.

Journal of Veterinary Medical Science
(in press)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 宮部真裕、阿部真由美、小野沢栄里、
百田豊、皆上大吾、石岡克己
イヌにおける $\beta 3$ アドレナリン受容体
($\beta 3AR$) 遺伝子の SNP 解析
第 154 回日本獣医学会
平成 24 年 9 月 (盛岡市)
- ② 宮部真裕、小野沢栄里、百田豊、皆上大吾、
左向敏紀、石岡克己
イヌ $\beta 3$ アドレナリン受容体遺伝子の
C749T 多型と体重変動
第 15 回日本ペット栄養学会
平成 25 年 7 月 (東京)
- ③ 宮部真裕、大門 愛、山田 華、
小野沢栄里、百田 豊、皆上大吾、
左向敏紀、石岡克己
イヌ GPR120 遺伝子の一塩基多型解析と犬種
第 156 回日本獣医学会
平成 25 年 9 月 (岐阜)
- ④ 石岡克己、宮部真裕
イヌ $\beta 3$ アドレナリン受容体における SNP
検索と肥満との関連
第 28 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術
集会
平成 26 年 2 月 (宮崎)

[図書] (計 1 件)

- ① 石岡克己
犬の肥満：遺伝子多型からのアプローチ
MP アグロジャーナル (印刷中)
MP アグロ株式会社

[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：
出願年月日：
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

石岡 克己 (ISHIOKA, Katsumi)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・
獣医保健看護学科・准教授
研究者番号：60409258

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：