

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901  
研究種目：基盤研究(B) (一般)  
研究期間：2016～2019  
課題番号：16H04680  
研究課題名(和文) 野生マウスの遺伝子プールから発掘した過体重と肥満抵抗性QTLの責任遺伝子の同定  
  
研究課題名(英文) Identification of a causal gene for QTL affecting overweight and resistance to obesity discovered from a gene pool of wild mice  
  
研究代表者  
石川 明 (Ishikawa, Akira)  
  
名古屋大学・生命農学研究科・准教授  
  
研究者番号：20211724  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの過体重や肥満は、生活習慣病の元凶であることが近年明らかとなっている。これらの形質は複数の量的形質遺伝子座(QTLs: quantitative trait loci)と環境要因が複雑に絡み合って統御されており、そのQTL責任遺伝子を同定することはチャレンジングである。本研究では、新しい解析アプローチを用いて、野生マウスの遺伝子プールから発見した肥満抵抗性QTLの責任遺伝子が、免疫系に関わるLy75 (lymphocyte antigen 75)遺伝子であることを世界で初めて明らかにした。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、肥満に関わるQTLの責任遺伝子を同定した数少ない成功例の一つと位置付けることができる。Ly75遺伝子の脂質代謝に関わる役割は全く報告されていないので、本研究は、肥満生物学に新しい知見を提供するものと期待できる。また、本研究は、ヒトでは、万病の元である肥満を克服するためのゲノム医療への応用が期待できる。さらに、家畜では、家畜の健康改善と畜産物の生産性の向上のためのゲノム育種への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Overweight and obesity in humans are main risk factors for lifestyle diseases which are controlled by multiple genetic loci (QTLs: quantitative trait loci) and environment. To identify causal genes for the QTLs remains challenging. In this study, by using new analytical approaches, I first identified the Ly75 (lymphocyte antigen 75) gene for an immune system as a causal gene for a QTL affecting resistance to obesity that was previously discovered from a gene pool of wild mice.

研究分野：動物遺伝育種学

キーワード：マウス QTL 肥満 体重

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 1980-2013年の33年間のBMI(体格指数)を調査した研究によると、世界183カ国の成人の3人に1名が過体重(BMIが25-30)または肥満(BMIが30以上)であるという衝撃的な報告がなされた( )。過体重または肥満の割合は、1980年では約29%であったものが2013年には約38%に上昇していた。このことは、我が国も例外ではない。近年、過体重や肥満は、糖尿病、高血圧、動脈硬化、脂質異常症等の生活習慣病の元凶であることが証明された( )。肥満は、QTLs(Quantitative Trait Loci)と呼ばれる複数の遺伝子座が関与し、環境の影響を強く受ける多因子性疾患である。ゲノムワイド関連解析により、BMI等の肥満形質に関与する多くのQTLsの染色体上の位置が明らかとなっているが、責任遺伝子はほとんど同定されていない( )。したがって、食生活や運動などの生活習慣の改善に加え、脂肪蓄積に関わる遺伝子の探索・同定とその分子基盤の解明は、肥満の克服・予防のために非常に重要な研究課題である。

(2) 研究代表者は、これまでにフィリピンで捕獲された野生マウス(*Mus musculus castaneus*)と世界中で汎用されているC57BL/6(B6)近交系マウス間の戻し交配におけるQTL解析により、野生マウスの遺伝子プールから出生後の体重と成長に関わる24個のQTLsを13本の染色体上に位置づけた(④~⑥)。検出したQTLの中で最も大きな表現型効果をもつ第2染色体上のQTL(*Pbwg1*と命名)をB6系統に導入したB6.Cg-*Pbwg1*コンジェニック系統を樹立し、さらにQTL解析を行った結果、体重、体重増加量、体長、白色脂肪組織重量と臓器重量に関わるQTLsが約44Mbという限られたコンジェニック領域内にクラスターとして存在していることを明らかにした(⑦~⑨)。これらのQTLsのうち、体重に関与するQTL *Pbwg1.12*の野生マウス由来対立遺伝子は、野生マウスの成体体重がB6の60%であるにもかかわらず、体重を増加させ過体重を示した( )。また、白色脂肪組織重量に関わる *Pbwg1.5*の野生マウス由来対立遺伝子は脂肪重量を減少させて肥満抵抗性を示した( )。サブコンジェニックマウスの解析により、*Pbwg1.12*を3.8Mbの、*Pbwg1.5*を2.1Mbのゲノム領域内に位置づけ、候補遺伝子をそれぞれ2個(*Gcg*と*Grb14*; *Ly75*と*Itgb6*)に絞り込んだ。さらに、次世代シーケンサーを用いたコンジェニック領域44Mbのエクソーム解析により、これらの候補遺伝子にはアミノ酸置換を伴う非同義置換SNP(一塩基多型)が幾つか存在するが、パイオインフォマティクス解析の結果、これらはいずれもタンパク質の機能には影響しないことを明らかにした( )。

(3) 研究代表者は、上記とは別のアプローチにより、*Pbwg1.12*と*Pbwg1.5*の候補遺伝子を絞り込むことを立案し実施した。すなわち、*Pbwg1.12*と*Pbwg1.5*を保有するサブコンジェニック系統SR1とB6を交配してF2交雑群を作出した。得られたF2では、サブコンジェニック領域に関して3つのディプロタイプ(B6/B6, B6/SRとSR/SR)が分離している。各ディプロタイプのマウス1個体から肝臓と白色脂肪組織を採取し、総RNAを抽出して次世代シーケンサーによるRNA-seq解析を行った結果、B6/B6ディプロタイプに対して遺伝子発現量の差異が見られたものは、肝臓で8個、白色脂肪組織で10個、そのうち両組織に共通に存在するものは2個あった(未発表)。これらの遺伝子には、上述した4つの遺伝子のうち、肝臓と脂肪組織では発現していない *Gcg*を除き3つの候補遺伝子が含まれていた。そこで、これまでの研究成果とこの研究をさらに進展させ、本研究課題を実施した。

### 2. 研究の目的

(1) 野生マウスから発掘した過体重と肥満抵抗性QTLの責任遺伝子を同定した。さらに、その原因となるDNA変異の特定を試みた。

### 3. 研究の方法

(1) リアルタイムPCR解析: この解析で使用するF2個体(各ディプロタイプそれぞれ5個体)の肝臓と白色脂肪組織は生後14週齢に既に採取し、超低温フリーザーで保存してある。常法に従って肝臓と白色脂肪組織から総RNAを抽出し、RT-PCR法によりcDNAを合成した。RNA-seq解析により差異があった16個の遺伝子のリアルタイムPCR用プライマーを外部委託により合成した。現有設備のリアルタイムPCR解析装置SepOne Plus (Applied Biosystems)を用いて、合成したプライマーをSYBR Green I法(タカラバイオ)により標識し、mRNA発現量を測定した。

(2) 因果推論テスト: 量的形質の変異は、遺伝子のDNA変異(本研究ではディプロタイプ)が遺伝子発現量の変化を引き起こし、その遺伝子発現量変化が量的形質変異を引き起こすと仮定できる。この仮定を証明するために、以下に示す4つのテストから構成される因果推論テスト( )を実施する。テスト1から3において有意な相関がみられ、テスト4で有意な相関がみられない場合、解析した遺伝子がQTLの最有力候補遺伝子であるといえる。

テスト1: DNA変異と量的形質値間の相関解析

テスト2: 量的形質値の条件付けの下でのDNA変異と発現量間の相関解析

テスト3: DNA変異の条件付けの下での発現量と量的形質値間の相関解析

テスト4: 発現量の条件付けの下でのDNA変異と量的形質値間の相関解析

(3) ノックアウト(KO)マウスを用いた相補性テスト: 「1. 研究開始当初の背景」の項目の中で

記載した候補遺伝子のうち、*Ly75* 遺伝子について KO したマウス (KO 遺伝子はホモ型で固定) を既に保有している。そこで、KO ホモ型マウスを KO 作出に用いた遺伝的背景の B6J 系統マウスと交配し、F1 個体を生産した。同様に、SR24 コンジェニック系統とその遺伝的背景 B6Jc1 系統を交配し、F1 個体を生産した。得られた 2 種類の F1 同士を交配し、4 元交雑雑種を作出した。また、KO 系統と遺伝的背景 B6J 系統間の F2 交雑群を作出した。得られたすべての個体の体重と臓器重量を計測した。

(4) 光学顕微鏡標本の作製：相補性テストで得られた個体の白色脂肪組織と肝臓組織をホルマリン固定し、常法に従ってヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡標本を作製した。

(5) シークエンス解析：SR24 サブコンジェニック系統マウスから常法に従ってゲノム DNA を抽出し、外部委託により、全ゲノムリシーケンス解析を行った。得られた DNA 変異を確認するため、着目した最有力候補遺伝子の DNA 変異領域を PCR 増幅後、通常のダイレクトシークエンス解析を行った。

(6) ゲノム編集マウスの作出：SR24 コンジェニック系統を用いて、CRISPR/Cas9 システムの i-GONAD 法 ( ) により遺伝子改変マウスを作出した。

#### 4. 研究成果

(1) リアルタイム PCR 解析の結果、ディプロタイプ間において、肝臓では 5 個の遺伝子 (*Ly75*, *Pla2r1*, *Tank*, *Fap*, *Gca*) に、白色脂肪組織では 4 個の遺伝子 (*Fap*, *Ifih1*, *Grb14*, *Cobll1*) に mRNA 発現量の有意な差異が観察できた。

(2) 上記の遺伝子について因果推論テストを実施した結果、因果推論テストの 4 つのテストをすべてクリアできた遺伝子は *Ly75* のみであった。すなわち、肝臓における *Ly75* 発現量と白色脂肪組織重量との間に負の因果関係があることを示した。したがって、*Ly75* が肥満抵抗性 QTL *Pbwg1.5* の最有力候補遺伝子であることが示唆された。

(3) *Ly75* 遺伝子の KO マウスと SR24 マウスを用いた 4 元交雑群の相補性テストの結果、鼠蹊部白色脂肪組織重量と総白色脂肪組織重量について *Ly75* 遺伝子座と *Pbwg1.5* 遺伝子座間で有意な交互作用が認められた。また、KO マウスと B6J 系統間の F2 交雑群において、B6J 対立遺伝子をホモ接合体型にもつ *B6J/B6J* マウスはヘミ接合体型の *B6J/KO* マウスより白色脂肪重量が有意に軽いことが示された。これらの結果から、*Ly75* が *Pbwg1.5* の責任遺伝子であることが示された。

(4) 上記の *B6J/B6J* マウスと *B6J/KO* マウスを用いた因果推論テストの結果、肝臓における *Ly75* 発現量が白色脂肪組織重量と負の因果関係を示した。この結果は、上記研究成果 (2) の結果を支持した。

(5) *B6J/B6J* マウスと *B6J/KO* マウスの白色脂肪組織を光学顕微鏡下で観察した結果、*B6J/B6J* の脂肪細胞のサイズは *B6J/KO* よりやや小さい傾向がみられた。肝臓組織の光学顕微鏡標本を観察した結果、肝臓組織には脂肪滴等の異常はいずれのマウスにも観察されなかった。

(6) SR24 系統と B6Jc1 系統の肝臓からゲノム DNA を抽出し、全ゲノムリシーケンス解析を行った結果、*Ly75* 遺伝子のプロモーター領域に、SNP や indel 等の DNA 変異を 16 個発見することができた。

(7) 上記の *Ly75* プロモーター領域の DNA 変異のうち、4 個の変異を含む 3 ヶ所のゲノム領域について、SR24 マウスを用いて合計 21 回のゲノム編集を行った。その結果、目的とした正常 B6Jc1 型に置換した変異をもつ個体は得られなかった。しかし、2 個の変異を含む 28bp 領域を欠失した雄 2 個体を得ることができた。

(8) 以上の結果を総合すると、本研究課題により、研究代表者が以前に野生マウス (*Mus musculus castaneus*) の遺伝子プールから発見した肥満抵抗性 QTL の責任遺伝子が、免疫系に関わる *Ly75* 遺伝子であることを世界で初めて明らかにすることができた。また、*Ly75* の mRNA 発現量が高くなると白色脂肪組織重量が減少することを明らかにした。さらに、この遺伝子のプロモーター領域内に幾つかの DNA 変異を発見し、その内の 2 個の変異を欠失した遺伝子改変マウスを作製することができた。今後、このプロモーター領域に関するルシフェラーゼアッセイと遺伝子改変マウスの作出・解析により、肥満抵抗性 QTN (quantitative trait nucleotide) の同定が期待できる。

#### < 引用文献 >

Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N. et al., (2014). Global,

regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*, 384: 766-781.

Fall, T., Hägg, S., Mägi, R., Ploner, A., Fischer, K. et al., (2013). The role of adiposity in cardiometabolic traits: a Mendelian randomization analysis. *PLoS Med.*, 10: e1001474.

Speliotes, E. K., Willer, C.J., Berndt, S.I., Monda, K.L., Thorleifsson, G. et al., (2010). Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat. Genet.*, 42: 937-948.

Ishikawa, A., Matsuda, Y., and Namikawa, T. (2000). Detection of quantitative trait loci for body weight at 10 weeks from Philippine wild mice. *Mamm. Genome*, 11: 824-830.

Ishikawa, A., and Namikawa, T. (2004). Mapping major quantitative trait loci for postnatal growth in an intersubspecific backcross between C57BL/6J and Philippine wild mice by using principal component analysis. *Genes Genet. Syst.*, 79: 27-39.

Ishikawa, A., Hatada, S., Nagamine Y., and Namikawa, T. (2005). Further mapping of quantitative trait loci for postnatal growth in an intersubspecific backcross of wild *Mus musculus castaneus* and C57BL/6J mice. *Genet. Res.*, 85: 127-137.

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

Ishikawa, A. (2009). Mapping an overdominant quantitative trait locus for heterosis of body weight in mice. *J. Hered.*, 100: 501-504.

Mollah, Md.B.R., and Ishikawa, A. (2013). Fine mapping of quantitative trait loci affecting organ weights by mouse intersubspecific subcongenic strain analysis. *Anim. Sci. J.*, 84: 296-302.

Mollah, Md.B.R., and Ishikawa, A. (2011). Intersubspecific subcongenic mouse strain analysis reveals closely linked QTLs with opposite effects on body weight. *Mamm. Genome*, 22: 282-289.

Mollah, Md.B.R. and Ishikawa, A. (2010). A wild derived quantitative trait locus on mouse chromosome 2 prevents obesity. *BMC Genet.*, 11: 84.

Ishikawa, A., and Okuno, S. (2014). Fine mapping and candidate gene search of quantitative trait loci for growth and obesity using mouse intersubspecific subcongenic intercrosses and exome sequencing. *PLoS One*, 9: e113233.

Millstein, J., Zhang, B., Zhu, J., and Schadt, E.E. (2009). Disentangling molecular relationships with a causal inference test. *BMC Genet.*, 10: 23.

Ohtsuka, M., Sato, M., Miura, H., Takabayashi, S., Matsuyama, M., et al. (2018). i-GONAD: a robust method for in situ germline genome engineering using CRISPR nucleases. *Genome Biol.*, 19: 25.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Makino Keita, Ishikawa Akira	4. 巻 8
2. 論文標題 Genetic identification of Ly75 as a novel quantitative trait gene for resistance to obesity in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17658
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-36073-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Ishikawa, A.	4. 巻 8
2. 論文標題 A strategy for identifying quantitative trait genes using gene expression analysis and causal analysis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 347
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes8120347	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Ishikawa, A.	4. 巻 12
2. 論文標題 Identification of a putative quantitative trait gene for resistance to obesity in mice using transcriptome analysis and causal inference tests	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0170652
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0170652	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 石川 明	4. 巻 45
2. 論文標題 野生マウスの遺伝子プールから発掘した新奇肥満抑制遺伝子	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 285-286
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 石川 明	4. 巻 3
2. 論文標題 マウスの肥満を抑制する新奇遺伝子の同定	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 1176-1178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 石川明、牧野圭汰
2. 発表標題 野生マウスの肥満抵抗性に関わる新規量的形質遺伝子の同定
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 牧野圭汰、石川明
2. 発表標題 量的相補性検定によるマウスの腎臓重量に関わる量的形質遺伝子(QTG)の同定
3. 学会等名 第64回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ishikawa, A.
2. 発表標題 Toward the identification of causal genes for quantitative trait variation: lessons from QTL studies on growth and obesity in mice
3. 学会等名 The 2017 KALAS International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ishikawa, A.
2. 発表標題 Identification of a putative quantitative trait gene for resistance to obesity in mice
3. 学会等名 EMBL Conference Mammalian Genetics and Genomics: From Molecular Mechanisms to Translational Applications (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 牧野圭汰、石川明
2. 発表標題 マウス白色脂肪組織重量に関する量的形質遺伝子の同定
3. 学会等名 日本畜産学会第124回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石川 明
2. 発表標題 マウスからのニワトリへのトランスレショナルリサーチ ~ニワトリ量的形質遺伝子の同定を目指して~
3. 学会等名 第15回JAB(Japanese Avian Bioresource Project Research Center)特別セミナー (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 石川 明
2. 発表標題 マウスの成長形質関連遺伝子の探索
3. 学会等名 日本動物遺伝育種学会第17回大会シンポジウム「ポストQTL時代のQTG・QTN研究の現状と展望」(招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 牧野圭汰、石川 明
2. 発表標題 マウス白色脂肪組織重量および腎臓重量に関わるQTLの責任遺伝子の探索
3. 学会等名 日本動物遺伝育種学会第17回大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Makino and Ishikawa (2018). Sci. Reports, 8: 17658の研究成果が、朝日新聞デジタル、朝日新聞、日刊工業新聞、中日新聞、CBCテレビ、日本の研究.com、名古屋大学ホームページ でプレスリリースされた。

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	牧野 圭汰  (Makino Keita)		
研究協力者	高林 秀次  (Takabayashi Shuji)		
連携研究者	藤井 渉  (Fujii Wataru)  (40708161)	東京大学・農学生命科学研究科・助教   (12601)	