

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24580417

研究課題名(和文)ブタアディポネクチン遺伝子の多型で背脂肪厚の違いを説明する

研究課題名(英文) Polymorphism of adiponectin gene in Landrace and Meishan breeds may associate with backfat thickness in pigs

研究代表者

中島 郁世 (Nakajima, Ikuyo)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・畜産物研究領域・上級研究員

研究者番号：60355063

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)：本研究では、背脂肪の厚い梅山豚種と薄いランドレース種間で見られるアミノ酸置換を伴う多型が多量体形成及び脂肪量との関係を解明することを目的とした。

単量体から多量体に及ぶ多様な血液中アディポネクチン分子を認識可能な抗ブタモノクローナル抗体の作出に成功した。また、ELISAによる血液中アディポネクチン濃度測定法を確立した。ランドレース型及び梅山豚型アディポネクチンの強制発現試験、更にランドレース及び梅山豚の血清試料を用いたウェスタンブロットの結果から両者のアディポネクチン多量体に明確な違いはなかった。しかしながら遺伝子発現同様、血清アディポネクチン量は背脂肪の厚い豚で低いことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, polymorphism in porcine adiponectin was evaluated for associations with adiponectin multimer formation and backfat thickness between Landrace and Meishan breeds. A novel monoclonal antibody against porcine adiponectin was developed for use in Western blot and ELISA analysis. Although one SNP was located in coding region of Landrace and Meishan adiponectin genes which altered the protein sequence Val60Ile, there seemed to be no obvious differences in adiponectin multimers between these two breeds. Similar results were also obtained from the study by cultured cells transfected with cDNA encoding Landrace or Meishan adiponectin. Instead of the difference in multimeric patterns of adiponectin, the blood adiponectin concentration was significantly lower in high backfat Meishan pigs than Landrace pigs, which results were consistent with the mRNA levels of subcutaneous adipose tissue.

研究分野：ブタの脂肪組織発達

キーワード：畜産学 生理活性 ブタ 皮下脂肪 アディポネクチン 品種間比較

## 1. 研究開始当初の背景

食肉において脂肪組織は、美味しさや風味、軟らかさといった官能特性に大きく影響する。特にブタでは豚枝肉取引規格の評価項目である背脂肪厚が重要視され、豚肉の価格を左右することから背脂肪厚を制御するために遺伝的改良や飼養管理による様々な工夫が試みられている。しかし、ブタ背脂肪厚がどのようなメカニズムで制御されているのかは未解明である。

今日、脂肪組織は単なる余剰エネルギーの貯蔵庫ではなく、生体最大の内分泌臓器として位置付けられており、脂肪細胞から分泌されるアディポカインの種類や量の変化が肥満と強い相関関係にあることが報告されている。多くのアディポカインの中でもヒトの肥満を改善する作用があることからアディポネクチンは特に注目度が高い。脂肪細胞から分泌されたアディポネクチンは血液中に運ばれアディポネクチン受容体である AdipoR1 及び AdipoR2 に結合し細胞内にシグナルを伝達する。

これまで背脂肪厚が顕著に異なるアジア系品種の梅山豚(厚脂型)と西洋系品種のランドレース(薄脂型)を用いて皮下脂肪組織に特化した比較解析を行ってきた。その結果、背脂肪の脂肪細胞は梅山豚の方がランドレースよりも肥大化していることが明らかになった。更に、梅山豚の方がランドレースよりもアディポネクチン mRNA 発現量が少ないこと、両者においてアディポネクチンプロモーター領域に多型が存在すること、アディポネクチンの翻訳領域内にはアミノ酸置換をもたらす多型が存在することを見いだした。

これらの結果は、2 品種の背脂肪厚の違いはアディポネクチンに起因する可能性が高いことを示唆している。アディポネクチン分子は N 末端側にコラーゲン様領域、C 末端側に球状領域からなる特徴的な構造をとる。N 末端側コラーゲン様領域ではコラーゲンと同様に三重螺旋構造の 3 量体を形成し、更にシステイン残基による S-S 結合で多量体の高分子を構築する。梅山豚とランドレース間に見られるアディポネクチンのアミノ酸置換を有する多型は N 末端側のコラーゲン様領域に存在するため、アディポネクチンの多量体形成に影響する可能性がある。

そこで、まずは多型によりアディポネクチン分子の多量体形成に差が生じ、次いでアディポネクチンの分子形態の違いにより脂肪細胞への作用機序が異なり、ひいてはこれらの違いが 2 品種間のブタ背脂肪厚の差に繋がっているのではないかと仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

本研究では梅山豚とランドレースに存在するアディポネクチン遺伝子の多型に着目し、その多型がアミノ酸置換をもたらすことから梅山豚型とランドレース型のアディポ

ネクチンでは、アディポネクチン分子の多量体形成様式が異なる、アディポネクチンの分子形態の違いからアディポネクチン受容体 AdipoR1 と AdipoR2 への結合性が異なる、アディポネクチン受容体の選択性の違いは脂肪細胞自身の代謝に影響を及ぼすであろうことを解明すべく取り組んだ。

## 3. 研究の方法

### (1) ブタ血清中アディポネクチンタンパク質の多量体様式の検出

抗アディポネクチン抗体を 5 社より購入し、ランドレースと梅山豚より採取した血清、ブタ由来の培養脂肪細胞(PSPA)より調製したタンパク質画分及び市販の組換えブタアディポネクチンタンパク質(標品)を試料としてウェスタンブロットを行い、ブタアディポネクチンタンパク質の多量体様式の検出を試みた。

### (2) ランドレース型及び梅山豚型アディポネクチン遺伝子の強制発現によるアディポネクチンタンパク質多量体形成様式の比較

ランドレース型と梅山豚型のアディポネクチン cDNA を pCMV-(DYKDDDDK)ベクターに組み込みコンストラクトを作製した。HEK293 細胞及び PSPA 細胞にプラスミドを導入して強制発現させ、抗 DYKDDDDK 抗体を用いてウェスタンブロットによりアディポネクチンタンパク質の分子形態を検出した。

### (3) ブタ脂肪細胞におけるアディポネクチン受容体の mRNA 発現解析

西洋種交雑豚胎子(85 日齢)皮下組織由来の脂肪前駆細胞株 PSPA を用いた。Confluent 後、インスリン、デキサメタゾン、ビオチン、パントテン酸及びオクタン酸を添加した分化誘導培地に置換して 15 日間培養した脂肪細胞と共に対照区として同様の期間を増殖培地で培養した未分化な前駆細胞を用意し、経時的(分化誘導後 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 15 日目)に total RNA を抽出した。cDNA を合成し、アディポネクチン受容体 AdipoR1 および AdipoR2 に対するプライマーを用いてリアルタイム PCR により遺伝子発現量を解析した。リボソームタンパク質 L7 (RPL7) の mRNA 発現量を内部標準として補正した。

### (4) 抗ブタアディポネクチンモノクローナル抗体の作出

ブタアディポネクチン分子の多量体構成を検出するために、ブタアディポネクチンアミノ酸配列に基づきペプチド抗原を 3 種類(Ad1, Ad2 及び Ad3)設計すると共に標品のブタアディポネクチンをそれぞれ 6 週齢の BALB/c マウス各 2 匹に 20~30 µg/100 µL 免疫した。十分な抗体力価の上昇が認められた後、マウスの脾細胞とミエロマ細胞(SP2/o-Ag14)を融合させた。ELISA 法によりハイブリドーマの上清をスクリーニングし、

抗ブタアディポネクチン抗体を産生するハイブリドーマをクローニングすることによりモノクローナル抗体の作出を試みた。

#### (5) ELISA による血液中ブタアディポネクチンタンパク質濃度測定法の確立

Ad3 を抗原とするモノクローナル抗体 IgM(精製済み)を用いた競合 ELISA 及びサンドイッチ ELISA によるブタ血液中アディポネクチン量の測定を試みた。検量線は、市販の組換えブタアディポネクチンタンパク質(標品)を用いて作成した。サンドイッチ ELISA のための抗体は新たにブタアディポネクチン配列に基づいて設計したペプチド(Ad4, Ad5)を抗原としたウサギポリクローナル抗体を作製すると共に標品を抗原とした市販ポリクローナル抗体を試行した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ブタ血清中アディポネクチンタンパク質の多量体様式の検出

ランドレース種と梅山豚種間で見られるアディポネクチンの多型がアディポネクチン分子の多量体形成に影響を及ぼすかどうかを明らかにするためには、単にブタアディポネクチンタンパク質に反応するのみならず、多様な分子形態を認識可能な高品質抗ブタアディポネクチン抗体が必須となる。しかしながら、何れの市販抗体もブタ血清中アディポネクチンを検出することはできなかった。また、アディポネクチン mRNA を十分に発現している分化後期の PSPA 脂肪細胞の培養上清と細胞画分を調製し、同じ抗体を用いてウェスタンブロットを行ったが、バンドを検出することはできなかった。組換えタンパク質に対しては2つの抗体が反応したものの、ヒト及びマウスで報告されている血液中濃度と同様のアディポネクチン量に調製した結果、バンドが検出されなくなった。従って、市販のヒトやマウスを抗原とした抗体ではブタアディポネクチンタンパク質を評価できないことが判明した。

抗体が種間交差性を示すためにはアミノ酸配列レベルで9割以上のホモロジーが必要であるとされ、ブタとヒト及びマウス間のアディポネクチンタンパク質の相同性はそれぞれ 82.8%と 80.2%である。市販抗体の抗原領域として利用されたペプチド配列に限ってブタのそれと比較しても何れもホモロジーは9割以下であった。そこで、ブタアディポネクチンタンパク質多量体を検出するためには独自に抗体を作出することとした。

##### (2) ランドレース型及び梅山豚型アディポネクチン遺伝子の強制発現によるアディポネクチンタンパク質多量体形成様式の比較

C末端側に DYKDDDDK を標識したランドレース型(Val60)或いは梅山豚型(11e60)のアディポネクチンを最も一般的なヒト腎臓由来の HEK293 細胞に強制発現させ、抗標識抗体

によりウェスタンブロットを行った結果、細胞画分・培養上清画分共にバンドの強弱は若干あるもののアディポネクチンの多量体形成に特段の差異は認められなかった。また、ブタ由来の脂肪前駆細胞 PSPA にプラスミドを導入して強制発現試験を行ったところ HEK293 とは異なるバンド様式を示したものの両品種型のアディポネクチン多量体形成に差はなかった。更に、分化誘導条件下の PSPA 脂肪細胞を用いて強制発現を試みたが、両品種間で分子量の異なるアディポネクチン多量体が発現することはなかった。一方、Val60 をブタ以外の多くの動物種で見られる Thr に置換した Thr60 の変異体も作製したが、アディポネクチンのバンド様式に顕著な違いは生じなかった。むしろ、動物種(ブタ、マウス、ウシ及びヒト)によるアディポネクチン多量体構成の特異性が見いだされた。

この結果、少なくともブタの脂肪細胞を含む培養細胞に組換えブタアディポネクチンを合成させた場合、Val60 と 11e60 のアミノ酸の違いは多量体形成に影響しないということが明らかになった。

##### (3) ブタ脂肪細胞におけるアディポネクチン受容体の mRNA 発現解析

一般的に脂肪細胞特異的な分化マーカーとされるようにアディポネクチンは、未分化なブタ脂肪前駆細胞ではまったく発現せずに分化誘導刺激後の脂肪細胞において mRNA 発現が認められる。その発現は、脂肪細胞特異的な転写因子群の発現よりも数日遅く、分化誘導後4日目から確認でき細胞内の脂肪蓄積に伴い徐々に増加した。

一方、アディポネクチンの受容体である AdipoR1 および AdipoR2 は、前駆細胞において常時一定量発現していた。しかしながら、分化誘導刺激に伴い両者共に mRNA 発現量は増加し、分化誘導前に比べ分化誘導後 15 日目にはそれぞれ発現量が AdipoR1 で約 2 倍、AdipoR2 で約 14 倍上昇した。マウス 3T3-L1 細胞では、脂肪細胞分化に伴い発現率が増加するのは AdipoR1 よりも AdipoR2 であるとの報告があり、ブタの脂肪細胞もマウスと同様の挙動を示すことが明らかになった。また、AdipoR2 の発現量の増加は分化誘導後3日目以降確固としたものとなり、リガンドであるアディポネクチンのそれとよく一致していたことから、AdipoR2 が脂肪細胞におけるアディポネクチンの自己分泌・傍分泌の主要受容体として作用している可能性は高い。しかし、元来高発現している AdipoR1 も分化6日目以降微増することから、脂肪細胞に対するアディポネクチンの受容に少なからず影響を及ぼしている可能性が示唆された。

##### (4) 抗ブタアディポネクチンモノクローナル抗体の作出

マウスに4種類の抗原を免疫したが、細胞融合により抗ブタアディポネクチン抗体を

産生するハイブリドーマが得られたのは、アディポネクチンのN末端側アミノ酸配列を抗原領域としたAd3のみであった。最終的にペプチドAd3に陽性な抗体産生株16クローンを得た。何れの抗体もアイソタイプは軽鎖のIgMであった。その中で抗体価の高いクローンを複数選出し(11H9\_11Aと11H9\_12B)、ハイブリドーマの培養上清由来の精製抗体を試験に用いた。

まず得られたモノクローナル抗体によるウェスタンブロットが、標品のブタアディポネクチンタンパク質に対して抗DYKDDDDK抗体を用いた場合と同等のバンド様式を示すことを確認した。次いで、ブタの血清試料を用いて非加熱・非還元条件下でウェスタンブロットを行い、3量体以上の分子量に相当する複数のバンドを検出した。更に、血清試料を加熱・還元下においてウェスタンブロットを行った結果、単量体に相当する分子量30kDa付近にバンドを認めた。これらの結果、Ad3を抗原とする作出した本モノクローナル抗体により、単量体から多量体に至る多様なブタアディポネクチンタンパク質の分子形態を認識可能となったことが明らかになった(図1)。

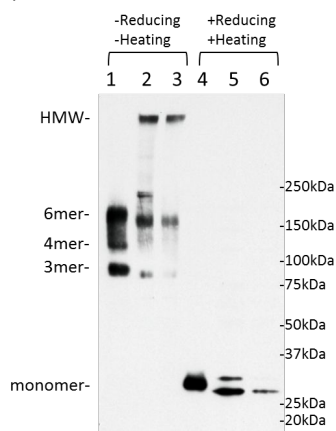


図1. モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットによるブタアディポネクチン分子の検出。標品ブタアディポネクチン 20ng (lane 1&4)、ブタ血清1:200希釈 (lane 2&5)、ブタ血清1:400希釈 (lane 3&6)。非還元・非加熱処理 (lane1-3)、還元・加熱処理 (lane4-6)。5-20% SDS-PAGE。HMW, high molecular weight。

本モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットにより、背脂肪厚の異なるブタの血清中アディポネクチン分子形態を比較した。純粋種の1、3、6週、3及び5ヶ月齢の血清では、両品種間で背脂肪厚に差が生じる3~5ヶ月齢頃から厚脂型の梅山豚のバンド強度が弱まり、加熱・還元条件における単量体の比較によりその違いは顕著となり、これまでのアディポネクチン遺伝子発現の結果と一致した。LWD母豚にランドレース或いは梅山豚を交配して作出した交雑種LWDLとLWDMの5ヶ月齢の血清を加熱・還元下でウエ

スタンブロットを行い単量体のアディポネクチンバンド強度を比較したところ、厚脂型のLWDMは薄脂型のLWDLに比べて弱く、これらもまたRT-PCRの結果と一致した。

一方、ランドレースと梅山豚の血清中アディポネクチンの多量体構成に関しては、両品種間の多型の違いが分子形態にそのまま反映されたかのような一目瞭然で判別可能な差異は認められなかった。異なる分子量のバンドは検出されるものの品種内で統一されておらず、それが個体差であるのか或いはまた成長による変化であるのか判然としなかった。交雑豚の血清中アディポネクチンの多量体構成は、純粋種とは異なる様相を呈した。純粋種では殆ど目立たなかった3量体のバンドがLWDLとLWDM共に強く出現し、更にLWDLでは600kDa付近の超高分子量アディポネクチンの存在が見受けられた。

以上の結果、培養細胞を用いたランドレース型及び梅山豚型アディポネクチンの強制発現試験同様、V601のアミノ酸置換はブタアディポネクチンの多量体形成に直接的な効果はないことが示唆された。しかしながら、ブタの発育ステージや交雑種等により検出されるアディポネクチン分子に少なからず違いが見られたことから、単なるアミノ酸配列の違いよりもアディポネクチンタンパク質の翻訳後修飾過程における遺伝的或いは生理的な違いが多量体形成の差異をもたらす要因となっている可能性が考えられた。

#### (5) ELISAによる血液中ブタアディポネクチンタンパク質濃度測定法の確立

当初、抗原ペプチドAd3或いはモノクローナル抗体をプレートに固定した競合ELISA法を試みたが、標品による検量線は引けるものの血液試料を用いると希釈率が数値に反映されないことからこの測定法を断念した。

続いて、サンドイッチELISA法による測定を試行した。この場合、得られたモノクローナル抗体とは異なるアディポネクチン領域を認識する別な抗体が必要となるため、新たにポリクローナル抗体を作製すると共に市販の抗体も活用した。競合ELISA法の試行時同様、一般的な方法により検量線は作成できるものの何れも血清試料を用いると希釈率が測定値に反映されない等の不具合が生じた。これら問題を解消すべくバックグラウンド低下のためのブロッキング材の探索、希釈液の選択及び等、多くの条件検討を要した。

試行錯誤の末、最終的にキャプチャーとしてモノクローナル抗体5µg/mL、ブロッキング材として変性カゼイン、血液試料1:20,000希釈、ビオチン標識した検出抗体1:25,000希釈の条件下、標品アディポネクチンによる検量線0.39~25ng/mLを用いて(図2)、血液中アディポネクチン濃度の測定が可能となった。これまで市販のブタアディポネクチンELISAキットではどの血液試料も常に同じ

値しか示さなかったが、上記方法により、成長に伴う血液中アディポネクチン濃度の増加、厚脂型ブタ品種におけるアディポネクチン量の低下、絶食によるアディポネクチン濃度の増加といった現象を捉えることに成功した。また、本法により測定したブタの血液中アディポネクチン濃度は、厚脂型のブタにおいてもヒト及びマウスで従来報告されている濃度(0.5~30 µg/mL)よりも高い値を示した。

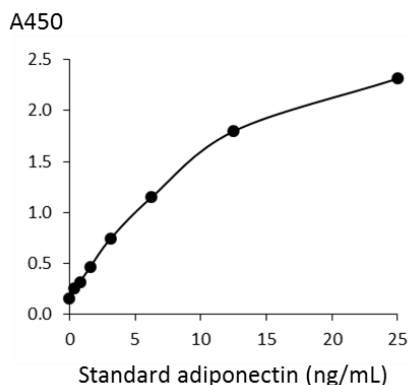


図2. モノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAによる検量線の作成。

以上(1)~(5)の結果より、ブタアディポネクチンのコラーゲン様領域に存在するアミノ酸置換をもたらす多型(V60I)がアディポネクチンの多量体形成に直接影響しないことが明らかになった。但し、一部の個体や交雑豚或いは成長に伴い多量体構成に変化が観察されたことから、これらの違いは多量体形成に必要な不可欠な翻訳後修飾を受ける場である小胞体環境が関与している可能性が強く示唆された。一方、皮下脂肪組織で確認されたアディポネクチン遺伝子発現の結果と同様、厚脂型のブタで血液中アディポネクチン量が低いもののヒトやマウスの肥満よりも高濃度であったことから、測定方法の検証も含めてブタ特異的な現象であるのか、今後更に検証する必要がある。また近年、AdipoR1とAdipoR2に加えて第3のアディポネクチン受容体としてT-cadherinが同定されたことから、アディポネクチンの脂肪細胞自身への作用については改めて見直す必要性が考えられた。

#### 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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

中島郁世、谷口雅章、荒川愛作、加藤誠二、伊野波周子、芦原茜、大江美香、尾嶋孝一、室谷進、相川勝弘、吉岡豪、美川智、千国幸一、抗ブタアディポネクチンモノクローナル抗体の作製、第103回日本養豚学会大会、講

演要旨、pp.11、じゅうろくプラザ(岐阜市) 2015.

〔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

中島 郁世 (NAKAJIMA, Ikuyo)  
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合  
研究機構・畜産研究部門・畜産物研究領  
域・上級研究員  
研究者番号：60355063