

ブタにおける脂質関連遺伝子における機能的SNPsの検索

Porcine Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) associated with lipid metabolism and obesity

田中和明

麻布大学獣医学部

Kazuaki Tanaka

School of veterinary medicine Azabu University

Abstract. Growth and the energy metabolism are the most important traits for animal production. The beta 3-adrenergic receptor (ADRB3) is a G protein-coupled receptor that is involved in regulating energy homeostasis. We found an insertion/deletion polymorphism of a thymine in the Exon 2 of swine ADRB3. We named these two alleles as T5 and T6 after the repetition number of thymine base. The allelic effects on the ADRB3 were studied using the Duroc breed to determine the associations with traits. There was no association between daily gains and genotypes during the 30kg to 90kg body weight. However, the size of eye muscle area (EMA) at the middle of body length were significantly associated with genotypes of ADRB3 ($P < 0.01$) in female and T6/T6 gilt had a significant larger EMA ($P < 0.05$) than T5/T5 and T5/T6 pigs. Although the row date set of male pigs could not reached statistical significance, it showed same tendency. In addition, the best linear unbiased predictor model analysis revealed that the T6/T6 genotype had positive effect on breeding value of EMA in both sex ($P < 0.002$). Accordingly, the T6 allele had a favorable effect on meat production traits and had a potential to be a major gene or marker for pig improvements. We submitted a patent application for use of polymorphisms of porcine ADRB3 to predict a size of eye muscle area.

1. 目的

農畜産業振興機構による2005年度の統計によれば全国に約7800戸の養豚事業者が存在し、年間1000万頭以上のブタが生産されている。しかし、国内生産のみでは国内消費をまかなうことが出来ず、毎年精肉換算で90万トンのブタ肉が輸入され国内自給率は約50%に留まっている（農畜産業振興機構2007）。わが国の養豚は、飼料の大半を海外からの輸入に依存することから生産コストの削減にはおのずと限界がある。さらに、自由貿易協定（FTA）が農産物にも波及し始めたことから、豚肉の内外価格差を調整し国内生産農家に対して保護的に働いてきた差額関税制度の維持が将来的には困難となっている。

今後、国内養豚家は、海外養豚産業との競合が現状以上に厳しくなると考えられる。しかし、飼料を輸入に依存しているかぎり、国内養豚家が輸入ブタ肉と価格面で競争をするのはほぼ不可能である。ゆえに、今後の国内養豚産業の持続的な発展を模索するためには、輸入ブタ肉に比べて、何らかの付加価値のあるブタ肉を生産することが重要である。肉生産において、牛肉生産では和牛による霜降り肉という輸入畜産物と差別化できるブランドが存在する。しかし、養豚に用いられる品種は、欧米で開発され世界規模で流通するランドレース、大ヨークシャー、デュロック、およびパークシャー種といった、いわゆるグローバル品種であり、わが国独自の遺伝資源はほとんど利用されていない。このため、鹿児島黒

豚を例外として、和牛のように広域に流通するブランドは豚肉には存在しない。また、国産であることに伴う安全安心に関する部分を除外すれば、一般家庭消費向け国産ブタ肉の品質は、家庭消費向けに冷蔵で輸入されるブタ肉との間で明確な差別化に成功していない。しかし、わが国と諸外国の間では、豚肉に対する嗜好に違いが存在する。例えば、米国产の冷蔵肉の肉色が、わが国で一般的に生産されるブタ肉に比べて赤みが強いものが少なくない。これは、米国では、わが国では、ほとんど利用されていない、ハンプシャー種が雄系統として比較的多く利用されているからである。また、諸外国では、脂肪を減らす方向へブタの改良が進められているのに対して、わが国では、適度に脂肪を含むブタ肉が嗜好されている。日本の市場の要求に近づける方向に、国内養豚産業で用いられるブタの品種改良を進めることで、国産豚肉を差別化できるチャンスが存在する。

近年、家畜の遺伝解析が急速に進められ、形質に相関のある遺伝子多型を直接検出し、効率的な品種改良に進める研究が積極的に行われている (Ovilo et al., 2005)。これらの中には、ブタのムレ肉 (PSE 豚) の原因となる遺伝子多型のように、遺伝子が同定されることによって、豚集団の改良に大きく貢献したものが少なくない (Fujii et al. 1991)。しかし、家畜に関する有用な遺伝情報の多くが海外の企業・団体等が保有する特許化されている。このため、遺伝情報に基づいた家畜の改良にも海外企業との競争が生じている。わが国独自の遺伝子特許を開発することは、海外の巨大な畜産企業の攻勢からわが国の養豚産業を保護するためにも極めて有効である。本研究では、ブタにおいて、ヒトおよびマウスにおいて脂質代謝に関与が示唆されている遺伝子における多型を検索し、遺伝子型と形質との相関を解析した。紙面に限りがあるので、本稿では、2005 年度に著者らが発見したベータ 3 アドレナリンレセプター遺伝子 (ADRB3) の多型 (Tanaka et al., 2007) と形質との相関について報告する。ADRB3 遺伝子は、脂肪細胞に存在し、脂肪をエネルギーに動員する時に重要なシグナル伝達に関与する受容体である (Kadowaki et al. 1995)。著者らは以前の研究から、ブタ ADRB3 遺伝子の第 2 エクソン領域に T の一塩基挿入/欠失型多型

を発見した (Tanaka et al., 2007)。多型部位が連続した T の配列中に存在するため、この多型を T5 型、T6 型対立遺伝子と呼ぶことにする。T5 型と T6 型の対立遺伝子間に存在する多型はコード領域におけるフレームシフトを伴うため、両対立遺伝子間では、レセプターの機能に何らかの変化が生じると予測された。そこで、全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所と共同で、遺伝子多型と表現型形質との間の相関解析を行い、新しい知見を得た。なお、本報告は田中和明、廣瀬健右、普川一雄の 3 名が発明者、平成 19 年 6 月 5 日に麻布大学と全国農業共同組合連合会が日本国特許の共同出願を行った「ブタバータ 3 アドレナリンレセプター遺伝子の多型に基づくブタ形質の診断方法」(特許願 2007-149480) の内容を要約したものである。

2. 方法

共試動物は、全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所 (JA) が育成中のブタ (デユロック種) の閉鎖集団における第 1 世代から第 3 世代までの合計 682 頭 (雄 323 頭・雌 359 頭) である。系統育成中のブタ群であるので、調査対象とした雄は去勢していない。飼育管理のために断尾した尾部の肉片から、DNesay Blood & Tissue Kit (株式会社キアゲン) を用いて染色体 DNA を抽出した。これらの DNA 試料を用いて、Tanaka et al., (2007) に従って ADRB3 遺伝子における遺伝子型すなわち、T5 型のホモ接合、T5/T6 型のヘテロ接合、および T6 型のホモ接合であるのかを判定した。

各個体の表現型の計測は次の手順で行った。体重約 30 kg から約 95 kg に到達するまでの期間の記録を利用し、1 日増体重量 (DG) を求めた。さらに、豚の体重が約 90 ~ 100 kg 到達時に、B モード超音波診断装置 (アロカ株式会社) を用いて、体長の 1/2 の部位に位置する背脂肪の厚み (BF) および、ロース部分 (EMA) を撮影し、イメージ解析ソフトウェア SigmaScanPro (株式会社ヒューリンクス) を用いて数値化した。

遺伝子型と表現型との相関分析は、雌雄別に次の手順で行った。まず、調査対象個体を、ADRB3 遺伝子の対立遺伝子型によって 3 群に分類した。すなわち、T5/T5、T5/T6、T6/T6 群である。これら 3 群につ

いて Tukey の統計手法を用いて、DG、BF および、EMA の値に遺伝子型による差が存在するかどうかを多重比較した。さらに、ADRB3 遺伝子における T5、T6 型対立遺伝子の効果をより明確にするために、各形質の測定値及びブタの血縁情報を加えた、多形質アニマルモデル BLUP (Best Linear Unbiased Predictor) 法 (佐々木 2007) を用いて、ADRB3 遺伝子における対立遺伝子の育種価を算出した。

3. 結果と考察

調査対象のデユロック種において遺伝子型判定を行った結果、雄 (323 頭) では T5/T5 型 98 頭、T5/T6 型 173 頭、T6/T6 型 52 頭であり、雌 (359 頭) では T5/T5 型 115 頭、T5/T6 型 183 頭、T6/T6 型 61 頭であった。ADRB3 遺伝子の遺伝子型によって分類された個体群間で、90～100 kg 時点の DG、BF および EMA の平均値を多重比較した。その結果、DG および BF には雌雄とも有意差は認められなかったが、雌のロース断面積に有意差 ($P < 0.002$) が認められた (Table 1)。雄のロース断面積には統計的有意差は存在しなかった (Table 2)。雌では T5/T5 型 ($38.0 \pm 4.7 \text{ cm}^2$)、T5/T6 型 ($38.9 \pm 4.7 \text{ cm}^2$)、T6/T6 型 ($40.6 \pm 4.6 \text{ cm}^2$) の順にロース芯面積が大きいことが観察され、T6/T6 型の値は、他の遺伝子型に対して有意 ($P < 0.05$) に大きかった。雄でも、T5/T5 型 ($36.9 \pm 4.7 \text{ cm}^2$)、T5/T6 型 ($37.4 \pm 4.3 \text{ cm}^2$)、

T6/T6 型 ($37.8 \pm 4.5 \text{ cm}^2$) の順でロース芯面積の観察値に増加が認められたが、統計的有意水準に達しなかった。ロース芯面積に対する ADRB3 遺伝子の効果をより明確にするため多形質アニマルモデル BLUP 法を用いて ADRB3 のロース芯面積に対する育種価を推定した (Table 1&2)。育種価を用いると、ADRB3 遺伝子の遺伝子型は、雌雄ともにロース芯面積に影響を与えることが明らかになった ($P < 0.001$)。すなわち T6 型のホモ接合は、他の遺伝子型に比べて有意にロース芯面積を増大させる効果が認められた。T6 型対立遺伝子のホモ接合の効果は雄に比べて雌のほうが大きな値をとる。ロース芯面積は、ブタの産肉性における重要形質の一つであり、ADRB3 遺伝子における T6 型対立遺伝子を用いた、改良が期待できる。本研究結果に基づいて、「ブタベータ 3 アドレナリンレセプター遺伝子の多型に基づくブタ形質の診断方法」について平成 19 年 6 月 5 日に特許を出願した (特許願 2007-149480)。本研究では、繁殖集団を対象としているので、去勢雄における T6 型対立遺伝子の効果が調査されていない。ADRB3 遺伝子の効果を、実際の養豚産業に活用するためには、食肉生産を目的とした実用豚を用いた調査が必要である。今後、実用豚を用いた遺伝子効果の実証をへて、日本国内の養豚産業に貢献する系統豚の育成に、本研究結果が活用されることが期待される。

本研究を着手するにあたり、ADRB3 遺伝子におけ

Table 1. Genetic effect of ADRB3 alleles on the eye muscle area in the male pigs at the range of 90kg to 100kg body weight.

Genotype	T5/T5	T5/T6	T6/T6
Number of animals	98	173	52
Average eye muscle area [#]	$36.9 \pm 4.7(\text{SD}) \text{ cm}^2$	$37.4 \pm 4.3(\text{SD})$	$37.8 \pm 4.5(\text{SD})$
Breeding value*	$-0.36^b \pm 1.8(\text{SD})$	$0.132^b \pm 1.66(\text{SD})$	$0.769^a \pm 1.61(\text{SD})$

[#]Values could not reach statistical significance.

*Values were significant ($P < 0.05$) between a and b.

Table 2. Genetic effect of ADRB3 alleles on the eye muscle area in the female pigs at the range of 90 kg to 100 kg body weight.

Genotype	T5/T5	T5/T6	T6/T6
Number of animals	115	183	61
Average eye muscle area*	$38.0^b \pm 4.7(\text{SD}) \text{ cm}^2$	$38.9^b \pm 4.7 (\text{SD})$	$40.6^a \pm 4.6 (\text{SD})$
Breeding value*	$-0.40^b \pm 1.73(\text{SD})$	$0.08^b \pm 1.76(\text{SD})$	$0.85^a \pm 1.63(\text{SD})$

*Values were significant ($P < 0.05$) between a and b.

ある対立遺伝子は、ヒトの肥満と強い関連があることが報告されていることから、我々は、ブタにおけるT5型T6型変異がADRB3の機能に何らかの影響を与えるのであれば、増体量や脂肪関連形質に影響を与えると予想していた。しかし、今回の観察期間内では肥満関連形質に対して有意な差は認められなかった。これは、本研究でのブタの観察期間を、産業応用を志向して約6ヶ月に限定したことに原因があるかもしれない。ヒトにおいても、ADRB3遺伝子の遺伝子型が肥満指数に影響を与えるとの報告は成人を対象としたものが多い(Kadowaki et al. 1995)。ゆえに、ブタを長期飼育し表現型との相関を引き続き観察した場合には、肥満関連形質とADRB3遺伝子の遺伝子型との間に何らかの関係が発見される可能性が残されている。しかし、一般にブタは生後半年程度で食肉出荷されることから、長期飼育によって得られる結果は、産業的には大きな効果をもたらさない。ゆえに、ADRB3遺伝子のT6型対立遺伝子は、先に述べたように1日増体量および背脂肪厚に影響を与えずに、ロース芯面積を増加させる指標として利用できる。非若齢期のブタをモデル動物として肥満に関連する医学研究を行う場合には、ADRB3遺伝子の多型は、養豚産業とは異なる位置づけが必要である。なお、本研究におけるブタに関する形質評価は、全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所の普川一雄博士、および廣瀬健右氏が行ったものである。

4. 要約

ベータ3アドレナリンレセプター (ADRB3) 遺伝子は、哺乳類におけるエネルギーの恒常性維持や肥満との関連が報告されている。我々は、ブタADRB3における一塩基挿入/欠失型多型を発見し、T5型およびT6型対立遺伝子と命名した。これら多型対立遺伝子の効果を明らかにする目的で、全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所と共同研究を行い遺伝子型と経済形質との相関解析を行った。その結果、デュロック種において、ADRB3遺伝子のT5型・T6型対立遺伝子は、体重30 kgから90 kgまでの期間における一日増体量には影響を及ぼさないが、ロース芯断面面積に統計学的に有意な差が発見された。すな

わちT6型のホモ接合体は、その他の遺伝子型の個体に比べて、95 kg時点でのロース芯面積を有意 ($P < 0.002$) に増加させる効果が認められた。有意水準に達しなかったが、ロース芯面積はT5型ホモ接合、T5/T6型ヘテロ接合、T6/T6ホモ接合の順に増加することから、T6型対立遺伝子の効果は相加的であると考えられる。先行研究を調査した結果、今回の知見には新規性が存在し、かつロース芯面積は、ブタの産肉能力において重要な経済形質であるので、本研究成果に基づいて「ブタベータ3アドレナリンレセプター遺伝子の多型に基づくブタ形質の診断方法」として日本国特許を出願した (特許願 2007-149480)。

文献

- Fujii, J., Otsu, K., Zorzato, F., DelLeon, S., Khanna, V.K., Weiler, J., O'Brien, P.J. and MacLennan, D.H. (1991): Identification of a mutation in the porcine ryanodine receptor that is associated with malignant hyperthermia. *Science* 253: 448-451.
- Kadowaki H, Yasuda K, Iwamoto K, Otabe S, Shimokawa K, Silver K, Walston J, Yoshinaga H, Kosaka K, Yamada N, Saito Y, Hagura R, Akanuma Y, Shuldiner A, Yazaki Y, Kadowaki T. 1995. A mutation in the beta 3-adrenergic receptor gene is associated with obesity and hyperinsulinemia in Japanese subjects. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 215, 555-660.
- Ovilo C, Fernández A, Noguera JL, Barragán C, Letón R, Rodríguez C, Mercadé A, Alves E, Folch JM, Varona L, Toro M. 2005. Fine mapping of porcine chromosome 6 QTL and LEPR effects on body composition in multiple generations of an Iberian by Landrace intercross. *Genetical research*. 85, 57-67.
- 佐々木義之 2007 変量効果の推定とBLUP法 京都大学学術出版会
- Tanaka K, Iwaki Y, Takizawa T, Murakami M, MANNEN H, MAEDA Y, KUROSAWA Y, DANG V-B, Chhum-Phith L, Bouahom B, Yamamoto Y, Daing T, NAMIKAWA T.(2007) The novel polymorphism of the beta 3-adrenergic receptor gene and its distribution in domestic pigs and wild boars in Asia. *Animal Science Journa* 78, 243-250.
- 農畜産業振興機構 2007. 畜産の情報 (国内編) 3. 豚肉 畜産物の需給動向 独立行政法人農畜産業振興機構2007年