

偶蹄類動物における膜貫通7回構造を持つ レセプター遺伝子のSNPs解析

The polymorphism of 7-transmembrane receptor genes in Artiodactyla.

田中和明, 滝沢達也, 岡林寿人

麻布大学獣医学部

Kazuaki Tanaka, Tatsuya Takizawa, Hisato Okabayashi

School of Veterinary Medicine, Azabu University

Abstract. The beta 3-adrenergic receptor (*ADRB3*) is a G protein-coupled receptor that is involved in regulating energy homeostasis. We have studied DNA sequences of swine *ADRB3* to find candidate genetic polymorphisms for the economically important growth and performance traits in pigs. Five novel haplotypes derived from the three In/dels and 44 SNPs were identified among domestic pigs and wild boars. Three of them encode non-synonymous amino acid sequences by five missense polymorphisms and a frameshift by a thymine insertion. The amino acid polymorphic sites were distributed as follows, one substitution in extracellular loop 1, three substitutions in intracellular loop 3, and one substitution and deletion of two amino acids at the carboxyl-terminal. There was no polymorphism in the transmembrane domains. In addition, we surveyed allelic frequency of the thymine insertion that cause frameshift in Southeast Asian local pigs, some commercial breeds, and wild boars. This thymine insertion was distributed widely throughout the domestic pigs and wild boars. The frequencies of this allele were relatively low in western improved breeds, while very common in Asian breeds and wild boars in Asia. This result indicates that this insertion originally occurred in ancient Asian wild boars and then circulated among Asian domestic pigs. This allele also spread over western breeds probably through the introgression of Asian pigs into European stocks during the 18th and 19th centuries.

1. 目的

約211種の野生動物からなる偶蹄目は、オセアニア地域を除く世界の主要な地域に分布し、ウシ、ヤギ、ヒツジ、スイギュウ、ブタといった、主要な家畜がこの分類群に含まれる。これらの動物種における機能的遺伝子多型を見つけることは、食料生産に重要な役割を担っている偶蹄目家畜における改良に大きく貢献できると考えられる。膜7回貫通構造を特徴とするGタンパク質共役受容体は1,000種類を超え、哺乳類の全遺伝子の数%を占める大きな遺伝

子ファミリーを形成する。多くのペプチド性ホルモンのほか、アミンやアミノ酸に属する生理活性物質、におい物質などの受容体がこれに含まれている。本研究課題では、ウシ、スイギュウ、ブタ、イノシシなどを対象に、ヒトにおける肥満との相関が示されている受容体遺伝子を対象として遺伝子多型の検索を行った。本報告書では、紙面に限りがあるため、ブタおよびイノシシにおける $\beta 3$ アドレナリンレセプター遺伝子(*ADRB3*)に対する研究成果を報告する。本報告書は、研究代表者らの原著論文「The novel polymorphism of the beta 3-adrenergic receptor gene and

its distribution in domestic pigs and wild boars in Asia.] Animal Science Journal 78 巻3号に掲載予定の内容を要約したものである。

2. 方法

ブタにおける *ADRB3* 遺伝子の配列決定

クラウンミニチュア, メイシヤン, ランドレース, ニホンイノシシ (*Sus scrofa leucomystax*), リュウキウイノシシ (*S. s. riukiuanus*) および, ミャンマー産イノシシ (*S. s. sp.*) 各1個体から得られたDNA試料を用いて *ADRB3* 遺伝子における多型を検索した。すなわち, Table 1に示したPCRプライマーを用いて *ADRB3* 遺伝子の全翻訳領域および上流約0.4 kb, 下流0.3 kbを含む全長2.7 kbをPCRにより増幅した。PCR産物は, プラスミドベクター pCR2.1-TOPO (Invitrogen; CA, USA) に組み込み, 大腸菌を用いて

クローニングを行った。1個体のPCR産物より最低6クローンを単離し, Table 1に示したシーケンス反応用プライマーセットを用いて, サイクルシーケンス法によって塩基配列の決定を行った。

第2エクソンにおける1置塩挿入変異の分布

6個体の塩基配列を決定した結果, Figure 1に示した47の多型部位から構成される5種類のハプロタイプを得ることができた。5種類のハプロタイプをアミノ酸配列に翻訳した結果, ハプロタイプは, A,B,Cの3種類に分類された。これらの多型のうちAハプロタイプを特徴付ける第2エクソンにおける一塩基挿入は, フレームシフトが生じるため, カルボキシル末端側2アミノ酸残基を欠損するレセプタータンパク質をコードすることになる (Figure 2)。我々は, 本研究で発見された多型のうちAハプロタイプに注目し, Table 2に示した5か国610個体から

Table 1. List of the sequence of primers for swine *ADRB3*. The underlined bases in PCR-RFLP primers are mismatch bases, which artificially introduced a recognition site for the *Aas I* or *Xag I* restriction enzyme into the amplified fragment.

Name of primers	Application	DNA sequence of primers (5' → 3')
Pig beta 3-F1	PCR	TCACTACAGTTGCTGCCATCCGAAA
Pig beta 3-R2	PCR	AATGAGGGTGCTGTCTTTGCCCTAA
Pig beta 3-F3	sequencing	CGTCTTCGTGACTTCGCTGGCTACA
Pig beta 3-F4	sequencing	TATCCGGAAGCATTCCGGTATCTCCT
Pig beta 3-R1	sequencing	CTCAATTCAGAGACCCTCCCCAGCC
Pig beta 3-R7	sequencing	TTCCAGCTGAGAATCTCCACAGGGC
Pig beta 3-R6	sequencing	TCACACACAGCAGTCCACCGAGGT
Pig beta 3-R9	sequencing	GTTTGCATAGCCTAGCCAGTTAAGG
miss- <i>Aas I</i> -F	PCR-RFLP	TTTGTGGCTGGGTGAATCCCGGAAG
miss- <i>Aas I</i> -R	PCR-RFLP	ATCAACAGAGCTGTTTCTTCAAGGACT
miss- <i>Xag I</i> -F	PCR-RFLP	CCATTTTCAGGGCTTCTGGGGCCTT
miss- <i>Xag I</i> -R2	PCR-RFLP	GCCACTTGGTAAGGAATCCCCCT

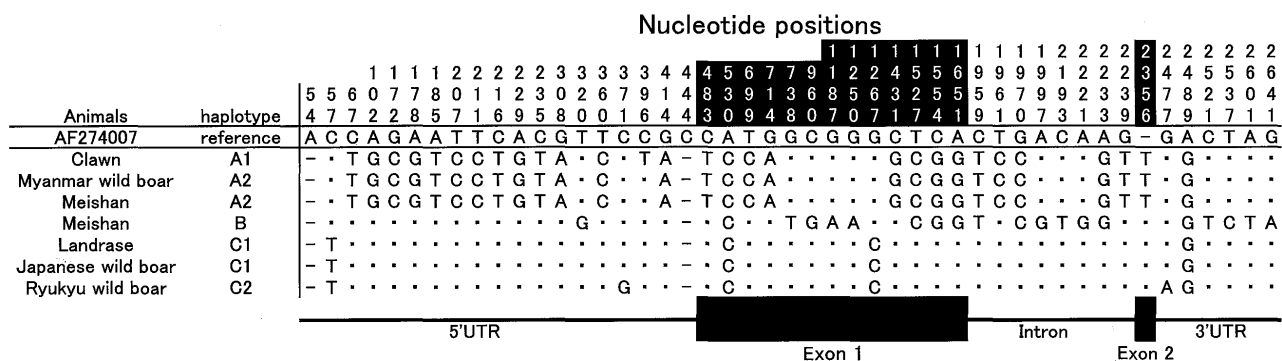


Figure 1. Variable positions in the *ADRB3* gene among wild boars and domestic pigs. The dots (·) means the identical sequence with referred AF274007 (Smith *et al.* 2001). The minus signs (-) means gaps. Nucleotide positions are numbered according to our sequence alignment, the start codon begins at 460th base.

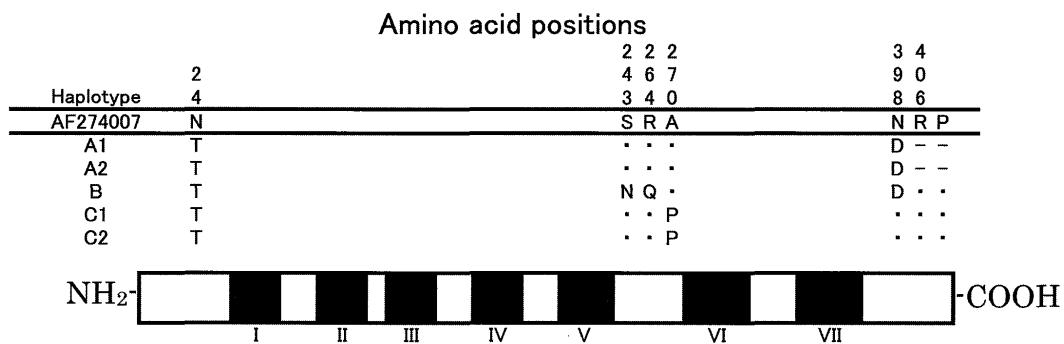


Figure 2. Variable positions of the amino acid sequence of the porcine *ADRB3*. The dots (·) means the identical sequence with referred AF274007 (Smith *et al.* 2001). The minus signs (-) means gaps. The black boxes from I to VII are transmembrane domains.

なる、ブタおよびイノシシ集団における遺伝子頻度を求めた。すなわち、第2エクソン領域を増幅できる2組のプライマーセット (miss-AasI, miss-XagI) を新たに開発し、PCR増幅後に制限酵素処理を行い、アガロースゲル電気泳動によって得られる泳動バンドによって遺伝子型の判定を行った (Table 1)。

3. 結果と考察

3種類の特徴的な家畜ブタ、すなわち医学実験用に開発されたクラウン、中国系ブタであるメイシャン、および欧米系改良品種であるランドレース、さらに3地域から得られた野生イノシシ3個体について、約2.6 kb からなる *ADRB3* 遺伝子の塩基配列を決定した。これらの配列を、Smithら2001による配列AF27007と比較した結果、我々が決定した配列は、47ヶ所の多型部位からなる5つの新しいハプロタイプに分類された (Figure 1)。これらのハプロタイプをA1, A2, B, C1, およびC2と呼ぶことにする。A1はクラウンで見つかり、A2はミャンマー産イノシシとメイシャンが共有していた。C1はニホンイノシシとランドレースが共有しており、C2はリュウキュウイノシシに存在していた。Bはメイシャンで発見された。47の多型部位のうち14個は、翻訳領域に、残りの33個は非翻訳領域に存在した。すなわち、5'非翻訳領域に19個 (17の塩基置換と2つの挿入/欠失)、第1エクソンに13個の塩基置換、イントロンにおける8個の塩基置換、第2エクソンにおける1塩基挿入および、3'非翻訳領域における6個の塩基置換である。本研究で決定した配列は、AB252778からAB252782までの登録番号で、DDBJ, ENBL,

およびGene Bankの各データベース上に公表している。これらの塩基配列に基づいてアミノ酸配列を推定した結果、A1とA2, C1とC2はそれぞれ同一のアミノ酸配列を指定しおり、今回得られたハプロタイプは、アミノ酸配列からA, B, およびCの3タイプに分類された。これらの配列は参照したSmithら2001の配列と比べ2ヶ所以上のアミノ酸配列が異なっていた (Figure 2)。わずか6個体のDNA試料に基づき、*ADRB3* 遺伝子の多型を検索した結果、DNAの塩基配列レベルで5種類のハプロタイプが発見できたことから、我々のブタおよびイノシシの遺伝多型検出手法は、効率のよい手法であることが示された。

Figure 1および2に示すように、我々が新たに発見したブタ *ADRB3* ハプロタイプのうち、A型ハプロタイプは他のハプロタイプと2つの大きな相違が認められる。すなわち、5'非翻訳領域における他のハプロタイプと比較した時の塩基置換が多いく、カルボキシル末端の2アミノ酸残基の欠損がある。このため、Aハプロタイプは他のハプロタイプと機能的違いがある可能性が高いと考えられる。A型ハプロタイプのブタおよびイノシシ集団中での分布を明らかにするため、PCR産物の制限酵素切断断片長多型 (PCR-RFLP) による遺伝子型判定を行った。A型ハプロタイプはT (チミン) の一塩基挿入のため、多型部位でTの6回繰り返しを持つことになり、BとC型ハプロタイプはTの繰り返し数が5回である。今回の遺伝子型判定では、第2エクソンにおける連続したTの繰り返し数を判定基準となるため、A型ハプロタイプをT6型、BおよびC型ハプロタイプを

Table 2. Number of samples from wild boars and domestic pigs by locality and breed. And the result of genotyping for *ADRB3*.

	Sample No.	Genotypes			Allele frequency of T6(%)
		T5/T5	T5/T6	T6/T6	
Wild boars¹⁾					
Japanese wild					
1:Kagawa	18	1	5	12	80.6
2:Chubu ²⁾ district	11	6	4	1	27.3
Ryukyu wild	21	19	2		4.8
Myanmar wild	1			1	100
Cambodian wild	4		4		50.0
Native Pigs					
Myanmar	31	10	11	10	50.0
Cambodia	83	30	41	12	39.2
Vietnam	26	1	15	10	67.3
Laos	49	13	14	22	59.2
Chinese breed					
Meishan	7	1	6		42.9
Jinhua	5	1	2	2	60.0
Improved breeds					
Laos ³⁾	20	16	4		10.0
Amami ⁴⁾	18	12	6		16.7
Berkshire	129	83	43	3	19.0
Large white					
1:Aichi	10	10			0
2:Private farm	5		4	1	60.0
Landrace	68	52	15	1	12.5
Duroc	8	6	2		12.5
Middle white	20	20			0
Clawn	76	67	8	1	6.8

1) The subspecies of *Sus scrofa* in Southeast Asian countries are not well identified.

2) Pooled samples from neighboring prefectures at the midland of Japan, Aichi, Shizuoka, and Nagano.

3) An improved population by using Duroc and some other colored breed.

4) Mixed breed origin, probably between British Berkshire and some Chinese breeds in Japan.

T5型として判定を行った。Figure 3Aに示したように、*AasI*セットを用いた場合には、T5のホモ接合は175 bpの単一泳動バンドが認められ、T5/T6のヘテロ接合では175と155 bpの2本の泳動バンドが出現し、T6のホモ接合では155 bpの単一バンドが出現する。*XagI*セットを用いた場合には、T5のホモ接合は165 bpの単一泳動バンドが認められ、T5/T6のヘテ

ロ接合では185と165 bpの2本の泳動バンドが出現し、T6のホモ接合では185 bpの単一バンドが出現する (Figure 3B)。総数560頭の家畜ブタと50頭の野生イノシシについて、遺伝子型判定を行った結果、T6型 (A型) の対立遺伝子は、欧米系改良品種、アジア在来ブタ、および野生イノシシに広く分布していることが明らかになった (Table 2)。対立遺伝子類

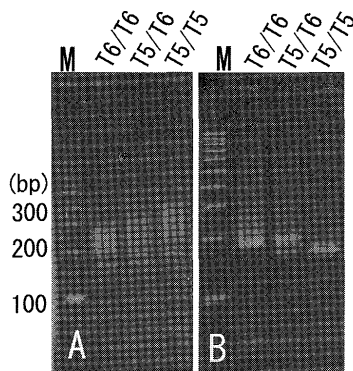


Figure 3. Identification of the genotype of swine *ADRB3* by using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms. Result of *Xba*I reaction (A), and *Aas*I reaction (B). M: DNA size marker with regular intervals of 100-bp from 1-kb to 100-bp. T5/T5: homozygote of Exon2-T5 allele, T5/T6: heterozygote, T6/T6: homozygote of Exon2-T6 allele.

度は欧米系の改良品種では、0%から19%と比較的低く、東南アジア在来ブタおよび中国系品種で39%から67%であり、日本を含むアジアイノシシで5%から81%であった。A型ハプロタイプは、アジア在来ブタおよび同地域の野生イノシシに比較的高い頻度で存在することから、この多型の起源はアジア地域のイノシシに由来すると考えられる。欧米系改良品種は、18世紀以降に中国から導入したブタをヨーロッパ在来ブタと交配し改良されたことが知られている (Kijas and Andersson 2001)。欧米系改良品種に存在するA型対立遺伝子は、改良の過程で用いられた中国系ブタを介して広がったものであると考えられる。

ヒトにおける *ADRB3* 遺伝子の多型は、Neel (1962) が予言した儉約遺伝子の有力な候補である (Silver et al. 1997)。すなわち、*ADRB3* 遺伝子の多型 (Trp64 → Arg) は、エネルギーの消費量を抑制し肥満とII型糖尿病のリスク要因となることが示されている。成長と食物中のエネルギーの有効な活用は、家畜の生産において極めて重要な形質の一つである。今回ブタにおいて新たに見つかった多型が、ブタの生産に有効な指標となりうるのか、今後追跡調査を行う予定である。

4. 要約

β 3 アドレナリンレセプター (*ADRB3*) は、Gタンパク共役膜7回貫通型受容体であり、エネルギー恒常性の制御に関与している。我々は、ブタにおける経済形質に関与する遺伝子多型を探索するために、野生イノシシおよび家畜ブタにおいて *ADRB3* 遺伝子の配列を決定した。その結果、アミノ酸置換を伴う3つの対立遺伝子を発見した。新規に発見された対立遺伝子の1つは、第2エクソン領域にチミンの1塩基挿入が生じており、C末端側の2アミノ酸残基を欠損したレセプターをコードしていた。さらに、チミン挿入型対立遺伝子 (以後T6型) の野生イノシシ、東南アジア在来ブタおよび、欧米原産の改良品種における分布を調査した。T6型対立遺伝子は、アジア産イノシシおよび、東南アジア在来ブタに高頻度で存在し、改良品種にも低い頻度ではあるが幅広く分布していた。このことから、*ADRB3* 遺伝子第2エクソンにおける1塩基挿入変異は、ブタの家畜化が行われる以前にアジア地域のイノシシ集団に存在したことが示唆された。欧米原産の改良品種に存在するT6型対立遺伝子は、18世紀・19世紀に行われたアジア産ブタを用いた品種改良によってアジア由来のブタから遺伝子流入が生じたためだと考えられる。

文献

- Kijas JM, Andersson L. 2001. A phylogenetic study of the origin of the domestic pig estimated from the near-complete mtDNA genome. *Journal of molecular evolution* 52, 302-308.
- Neel JV. 1962. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *American journal of Human Genetics* 14, 353-362.
- Silver K, Mitchell BD, Walston J, Sorkin JD, Stern MP, Roth J, Shuldiner AR. 1997. TRP64ARG beta 3-adrenergic receptor and obesity in Mexican. *Americans. Human Genetics* 101, 306-311.
- Smith TR, Bidwell CA, Mills SE. 2001. Rapid communication: nucleotide sequence of the porcine beta3-adrenergic receptor gene. *Journal of animal science* 79, 781-782.