

イヌの脱共役蛋白質 *UCP2* および *UCP3* 遺伝子の
DNA 多型に関する研究

(Study of DNA Polymorphisms in Canine Uncoupling Protein 2 and 3 genes)

学位論文の内容の要約

獣医生命科学研究科獣医保健看護学専攻博士後期課程平成 24 年入学

宇田川 智野

(指導教員：近江俊徳教授)

近年増加しているイヌの肥満は健康を損なう要因の一つとされる。遺伝的素因は肥満の一因であるにも関わらず、イヌにおける肥満関連遺伝子の同定や DNA 多型マーカーの探索は未だ十分とは言えない。そこで本研究では、ヒトにおいてエネルギー代謝や脂質代謝への関連が明らかになっており肥満研究のターゲットになっている脱共役蛋白質 (Uncoupling Protein: UCP) ファミリーのオーソログであるイヌ *UCP2*、*UCP3* 遺伝子に着目した。イヌ *UCP2*、*UCP3* 遺伝子に関する知見は、2000 年に石岡らにより cDNA 単離、分子構造の決定および 12 種類の組織での mRNA 発現解析が報告され、ヒト *UCP2*、*UCP3* 遺伝子と同様の機能を有することが予想されている。

本研究は 4 章より構成され、イヌ *UCP2* および *UCP3* 遺伝子がイヌのエネルギー代謝や脂質代謝あるいは肥満研究のターゲット分子の 1 つになり得るか分子遺伝学的手法を用いて基礎研究を行った。

第 1 章 イヌ *UCP2* および *UCP3* 遺伝子の cDNA 単離と mRNA 発現解析

イヌ *UCP2*、*UCP3* 遺伝子の翻訳領域のリシークエンス (既知塩基配列の読み直し)、これまで報告のなかった非翻訳領域 (UTR) の塩基配列の決定を行い、公開されているイヌゲノム配列との比較により両遺伝子のエクソン-イントロン構造を決定した。決定した翻訳領域の予想されるアミノ酸配列は、両遺伝子においてそれぞれ 1 残基既報の配列と異なっていたが、その他の配列は一致した。また 5'UTR の塩基配列はゲノム上の配列と完全に一致し、オーソログであるヒト *UCP2*、*UCP3* 遺伝子 5'UTR の配列との相同性はそれぞれ 89.7%、74.6% と高かった。エクソン-イントロン構造は、イヌ *UCP2* 遺伝子は 8 個のエクソンから成り、開始コドンは Exon 3 に位置していること、イヌ *UCP3* 遺伝子は 7 個のエクソンから成り、開始コドンは Exon 2 に位置していることが予想され、これはヒトの当該遺伝子と同様であることが明らかになった。さらに 30 種類の組織での mRNA 発現分布を RT-PCR 法で解析したところ、既報のノーザンブロット法による解析結果と同様に *UCP2* はユビキタス、*UCP3* は骨格筋や心臓で主に発現しており、これまでイヌで調べられていない組織に関してもヒトで報告されている結果と同様の傾向を示した。

第2章 イヌ *UCP2* および *UCP3* 遺伝子領域の DNA 多型探索

第1章で明らかになったイヌ *UCP2*、*UCP3* 遺伝子の塩基配列およびエクソン-イントロン構造を基に、DNA 多型探索を行った。まず 11 犬種各 1 検体をスクリーニングサンプルとし、各エクソンとその周辺領域の塩基配列を PCR 増幅後ダイレクトシーケンシング法で決定した。National Center for Biotechnology Information に登録されているイヌゲノム配列 (NC_006603) と比較し、異なっていた部分は多型であるとした。次に 108 検体を追加して、スクリーニングサンプルで多型が同定された領域の塩基配列を決定したところ、*UCP2* 遺伝子領域では 14 ヶ所の多型が同定された。内訳は、Intron 1 に 4 SNPs (-3629C/G、-3621T/C、-2931A/T、-2913A/G) と 1 Indel (-2951delTTCA)、Exon 2 (非翻訳領域) に 1 SNP (-2613A/C)、Intron 2 に 3 SNPs (-916C/T、-748G/A、-636A/G)、Intron 6 に 1 SNP (IVS6-108C/T) と 1 Indel (IVS6-133delTCTCCCC)、Intron 7 に 1 SNP (IVS7-106C/T) と 2 Indels (IVS7-187insA、IVS7-152delA) であった。*UCP3* 遺伝子領域でも 14 ヶ所の多型が同定され、その内訳は Intron 1 に 6 SNPs (-4399C/T、-4339T/C、-4160G/A、-4010C/T、-930T/C、-803C/T)、Exon 3 に 1 SNP (143A/C)、Intron 3 に 3 SNPs (IVS3+26T/C、IVS3+69G/A、IVS3+121T/C)、Intron 5 に 2 SNPs (IVS5-115G/C、IVS5-100T/C)、Exon 7 に 1 SNP (838T/C) と 1 Indel (1106delAAG) であった。143A/C は 143 番目の塩基が A から C へ置換される多型で、これにより 48 番目のアミノ酸がグルタミンからプロリンに変わる c (coding) SNP であった。

第3章 イヌ *UCP2* および *UCP3* 遺伝子領域の DNA 多型と生化学検査値との相関解析

第2章において、イヌ *UCP2*、*UCP3* 遺伝子領域多型の型判定が済んでいる臨床的に健康なラブラドル・レトリバー50 検体を使用して、全ての多型と4項目の生化学検査値 (Glucose: GLU、Triglyceride: TG、Total Cholesterol: T-Cho、Lactate Dehydrogenase: LDH) との相関を検討した。遺伝子型で2群に分け、各生化学検査値の平均値を算出し、一元配置分散分析にて有意差を検討した。その結果、本研究で使用したラブラドル・レトリバー50 検体においては *UCP2* 遺伝子領域多型の多型性が低く、-3621T/C、-2931A/T、-748G/A、-636A/G、IVS7-106C/T で全検体が野生アレルのホモ型、残りの多型座位でも、変異アレルを有していた個体は3または4検体であった。すなわち 50

検体中 46 検体で多型性が認められなかったことから生化学検査値との相関は認められなかった。*UCP3* 遺伝子領域多型は、143A/C、IVS3+121T/C、838T/C で全検体が野生アリのホモ型であったが、残りの多型座位は多型性が認められた。第 2 章で同定した cSNP (143A/C) は本章で解析を行った 50 検体では検出されなかった。多型性が認められた座位において生化学検査値との相関解析を行ったところ、Intron 1 に位置する -4399C/T、-4339T/C、-930T/C、-803C/T と T-Chol 値の相関が示唆された。イントロンに位置する多型が直接遺伝子機能に影響を及ぼす可能性は低いですが、ヒト *UCP3* 遺伝子のプロモーター領域に位置している多型は *UCP3* mRNA の発現量に関係している他、肥満やコレステロール値との関連が報告されている。この多型は、*UCP3* mRNA の発現に関与している PPAR の応答配列付近に位置していることから関連が示唆されているが、そのメカニズムは明らかにされていない。イヌ *UCP3* 遺伝子においてはプロモーター領域や様々なモチーフ配列は未だ明らかにされていないが、ヒトやマウスで明らかになっている PPAR の応答配列と類似した配列がイヌ *UCP3* 遺伝子 Intron 1 に確認された。本研究で T-Chol 値との相関が示唆された 4 個の多型の間の領域にその配列が位置していることから、ヒト同様にこれらの多型あるいは近隣に存在する多型が発現に関与している可能性が示唆された。

第 4 章 2 犬種間におけるイヌ *UCP2* および *UCP3* 遺伝子領域の DNA 多型分布の比較解析

第 2 章においてイヌ *UCP2*、*UCP3* 遺伝子領域多型の型判定が済んでいるシェットランド・シープドッグ (シェルティー) と柴犬各 30 検体を使用して、同定されたイヌ *UCP2*、*UCP3* 遺伝子領域の DNA 多型分布について比較解析を行った。シェルティーは遺伝的に T-Chol 値が高いと言われており何らかの遺伝的特徴を有することが予想されるが、その原因は未だ明らかにされていない。そこで、第 3 章でイヌ *UCP3* 遺伝子領域多型と T-Chol 値との相関が示唆されたことを受け、シェルティーと対照として柴犬を使用してイヌ *UCP2*、*UCP3* 遺伝子領域多型分布の特徴が異なるかを検討した。*UCP2* 遺伝子領域多型の -3629C/G (Intron 1)、-2931A/T (Intron 1)、-748G/A (Intron 2)、-636A/G (Intron 2)、IVS6-133delTCTCCCC (Intron 6)、*UCP3* 遺伝子領域多型の -4339T/C (Intron 1)、-930T/C (Intron 1)、143A/C (Exon 3)、IVS3+121T/C (Intron 3) において、

遺伝子型頻度に 2 犬種間で有意差が認められた。その理由として、一つはシェルティーと柴犬は原産国や育種過程が異なることが遺伝的特徴に反映されていることが考えられた。もう一つは、犬種差が認められた *UCP3* 遺伝子多型のうち、-4339T/C、-930T/C は第 3 章において T-Cho 値との相関が示唆された座位でもあった。さらに T-Cho 値が高い傾向にあったアリルは 2 犬種間比較でもシェルティーの方が高頻度に有していたことから、イヌ *UCP3* 遺伝子の脂質代謝への関与が示唆された。

本論文では、イヌ *UCP3* 遺伝子多型と T-Cho 値との相関が分子遺伝学的に示唆された。今後さらに当該遺伝子との関連を明らかにするには、相関解析の検体数や犬種を増やすこと、プロモーター領域の解析、そして原発性脂質代謝異常を示す検体の解析が必要である。