

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)

宇田川 智野

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

(指導教員：近江俊徳教授)

平成 27 年 3 月

目次

	ページ数
緒論	1
第1章 イヌ <i>UCP2</i> および <i>UCP3</i> 遺伝子の cDNA 単離と mRNA 発現解析	
緒言	6
材料および方法	
1. イヌ <i>UCP2</i> および <i>UCP3</i> 遺伝子の cDNA 単離	
1.1. 翻訳領域	
(1) cDNA 合成	7
(2) イヌ <i>UCP2</i> および <i>UCP3</i> 遺伝子 cDNA 断片の増幅	8
(3) サブクローニング	8
(4) 塩基配列の決定	10
1.2. 5'非翻訳領域	
(1) イヌ <i>UCP2</i> および <i>UCP3</i> 遺伝子 cDNA 断片の増幅	11
(2) アガロースゲルからの DNA 断片の精製	12
(3) 塩基配列の決定	13
1.3. 既報 cDNA と配列が異なる部位の塩基配列の確認	13
2. Reverse Transcription PCR (RT-PCR) 法による mRNA 発現解析	
2.1. 組織	15
2.2. RT-PCR 法	15
結果	
1. イヌ <i>UCP2</i> 遺伝子の構造	
1.1. cDNA 配列	16
1.2. 他動物種との相同性	19
1.3. エクソン-イントロン構造	20
2. イヌ <i>UCP3</i> 遺伝子の構造	
2.1. cDNA 配列	22
2.2. 他動物種との相同性	25

2.3. エクソン-イントロン構造	26
2.4. イヌ <i>UCP3</i> mRNA アイソフォームの構造	28
3. RT-PCR 法による各組織での mRNA 発現解析	30
考察	
1. イヌ <i>UCP2</i> および <i>UCP3</i> 遺伝子の cDNA 単離	31
2. RT-PCR 法による mRNA 発現解析	33
小括	35
第2章 イヌ <i>UCP2</i> および <i>UCP3</i> 遺伝子領域の DNA 多型探索	
緒言	36
材料および方法	
1. 解析サンプル	38
2. ゲノム DNA 抽出	40
3. PCR 法による標的領域の増幅	40
4. 塩基配列の決定	43
5. DNA 多型の探索	43
結果	
1. 本研究における多型の定義	44
2. イヌ <i>UCP2</i> 遺伝子領域で同定された DNA 多型の特徴	44
3. イヌ <i>UCP3</i> 遺伝子領域で同定された DNA 多型の特徴	50
考察	55
小括	56
第3章 イヌ <i>UCP2</i> および <i>UCP3</i> 遺伝子領域の DNA 多型と生化学検査値との相関解析	
緒言	58
材料および方法	
1. 解析サンプル	58
2. 相関解析に用いた DNA 多型	59
3. 生化学検査値の測定	59
4. 統計解析	59
結果	

1. イヌ <i>UCP2</i> 遺伝子領域の DNA 多型頻度	60
2. イヌ <i>UCP2</i> 遺伝子領域の DNA 多型と生化学検査値との相関解析	62
3. イヌ <i>UCP3</i> 遺伝子領域の DNA 多型頻度	64
4. イヌ <i>UCP3</i> 遺伝子領域の DNA 多型と生化学検査値との相関解析	66
考察	68
小括	69
第4章 2犬種間におけるイヌ <i>UCP2</i> および <i>UCP3</i> 遺伝子領域の DNA 多型分布の 比較解析	
緒言	71
材料および方法	
1. 解析サンプル	71
2. 比較解析に用いた DNA 多型	72
3. 統計解析	72
結果	
1. イヌ <i>UCP2</i> 遺伝子領域で同定された多型の犬種差	72
2. イヌ <i>UCP3</i> 遺伝子領域で同定された多型の犬種差	79
考察	86
小括	87
総括	89
謝辞	92
引用文献	93

緒論

イヌは昔からヒトにとって身近な存在であり、最近の研究では約 32,000 年から 19,000 年前に家畜されたと考えられている(Thalmann et al., 2013)。イヌの祖先はオオカミであるが、オオカミは食糧を求めてヒトへ近づき、ヒトも住居に近づく他の猛獣を追い払うオオカミを受け入れ、互惠関係が成立していた事が家畜化の始まりとされる(田名部, 1995)。古来イヌは番犬や猟犬あるいはヒツジやウシなどの家畜の管理を手伝う牧羊犬または愛玩犬として人々の生活を支えてきた。

この約 30 年で人間社会とイヌの関係や飼育形態は大きく変化した。戦後のペットブーム前まではイヌは番犬としての役割を担うことも少なくなかったが、近年では家族同様の関係が見られるようになった(吉田, 2013)。内閣府により 2003 年に報告された『動物愛護に関する世論調査』の質問項目である、ペットを飼育している理由について 1983 年と 2003 年のデータを比較してみると、「家族が動物好きだから」が両年代において共通して最も高い。1983 年よりも 2003 年でポイントが高かった理由は「気持ちやわらぐ(まぎれる)から」、「家庭内がうまくいくから」などであり、前者は 19.4% から 47.9% に、後者は 2% から 11% に増加した。一方「子どもの情操教育のため」、「役に立つから」といった理由は 1983 年から 2003 年で減少していた。ペット関連総市場も、1994 年度 6870 億円から 2000 年度予測 9100 億円と伸びており(環境省ペット動物流通販売実態調査報告書平成 15 年より)、生体の他にフード、おもちゃ、洋服などのグッズ、ペット関係の雑誌が充実してきたことや、近年ではペット入居可能な住宅の増加やペットの保険などの登場により市場は成長を続けている。また、多摩獣医臨床研究会『イヌ・ネコの疾病統計』の飼育場所に関する調査で、1990 年イヌの室外飼育率(51.1%)と室内飼育率(35.3%)および室内外飼育率(13.6%)の合計は同程度であったが、2009 年には室外飼育率が 9.7% に減少し、室内飼育率が 76.7% に上昇した。従って小型犬やおとなしい性格の犬種が好まれるようになり、ペットを飼っている多くの世帯において、ヒトとペットが同じ空間で時間を共有していること等からペットを家族の一員と考える飼い主が多くなったと考えられる。

ペットを家族の一員と考える飼い主が多くなったことにより、飼い主のイヌへの健

康意識も高まる一方、イヌに要求されるとヒトの食事や過剰なおやつをあげてしまう心理や「少し太っている方がかわいい」という健康上好ましくない考えを持つ飼い主も生じてくる。加えて、室内飼育による運動量の減少や、脂肪分が多く嗜好性の高い、栄養が行き届いたフードを与えられるなど、イヌを取り巻く環境の変化もありヒト同様にイヌにおいても肥満が生じている。

肥満は体脂肪が過剰に蓄積された状態であると定義される。肥満の原因は様々であるが、大きくは疾患が原因で起こる肥満（二次性肥満）と食事、運動、ストレスなどの環境因子と遺伝因子の相互作用により発生する肥満（原発性肥満）の2つに分類される（古瀬, 2013）。

二次性肥満の原因となるのは、副腎皮質機能亢進症、インスリノーマ、甲状腺機能低下症などの内分泌異常である（古瀬, 2013）。二次性肥満でない場合を原発性肥満と判断するが、二次性肥満は少数であり原発性肥満が大部分を占めている。肥満が原因で起こる疾患は骨や関節に過度の負担がかかることによる関節炎や、脂肪細胞からのアディポサイトカイン分泌の異常による糖尿病や高血圧、脂質異常症などのいわゆる生活習慣病とも関係している（古瀬, 2013; 齊藤, 2006）。

室内飼育犬の約30%が肥満とされており、アメリカにおいても動物病院を訪れたイヌの34-59%が過体重、5-10%が肥満であると報告されている（齊藤, 2006; Lund et al., 2006; Courcier et al., 2010; Switonski et al., 2013）。二次性肥満の場合は原因となる疾患の治療により肥満が解消されるが、原発性肥満の場合は、主に食事内容の改善と運動量を増やすことで減量を試みるため、飼い主の理解を得ることが重要である（北川ら, 2005）。ダイエットは飼い主のモチベーション維持が必須であり、長期間に及ぶことから負担も大きい。肥満は治療よりも予防が効果的であるため、獣医師や動物看護師による飼い主の指導も重要である。

臨床において指導を行える領域は主に環境因子に由来する部分であるため、イヌの肥満と環境因子に関する研究が複数報告されている。例えば、飼い主の年齢、運動時間、おやつをあげる頻度、収入などが肥満に関連していることが報告されている（Courcier et al., 2010）。また、肥満の判定法や、マーカー、予防法など様々な研究が行われている（佐々木ら, 1996; 森ら, 2013）。これらに加えて、遺伝的素因の情報を獣医師あるいは飼い主に提供することで、肥満の予防や治療への寄与が期待されている

(De Godoy et al., 2013)。

ヒトにおいては肥満になる原因の一つである遺伝的素因に関して、関連遺伝子探索が進められている(Frayling et al., 2007)。大規模な DNA サンプルを用いて、全ゲノムを対象にジェノタイプング評価を行い疾患や形質の原因となる多型を探索するゲノムワイド関連解析 (Genome Wide Association Study: GWAS) により、これまでに 50 以上の肥満関連遺伝子多型が明らかになっている (Loos et al., 2012)。肥満は多因子疾患であることに加え、生活習慣が原因にもなることから遺伝子のみで全てを語ることはできないが、肥満関連遺伝子の型判定を行うことにより個人の体質に合わせた食事指導が可能な時代に入っている (吉田, 2005)。

イヌの全ゲノム配列は 2005 年に公開されている。イヌはヒトと共通の遺伝性疾患を多く有していることや、実験動物として使用されていること等からイヌの遺伝子研究の目的はイヌの健康のためというよりも、ヒトの遺伝性疾患の解明に役立てるために進められてきた (Switonski., 2014)。

イヌにおいては GWAS による大規模な肥満関連遺伝子探索は行われていないが、ヒトにおいて肥満との関連が明らかになっている遺伝子について研究が行われている。例えば fat mass and obesity-associated (FTO)、melanocortin-4 receptor (MC4R)、melanocortin-3 receptor (MC3R)、peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) 遺伝子などである (Switonski et al., 2013)。体重との関連が FTO、MC3R 遺伝子多型において解析されており、FTO 遺伝子多型は関連が認められているが MC3R 遺伝子多型は関連が報告されていない(Grzes et al., 2011; Skorczyk et al., 2011)。MC4R、PPAR γ 遺伝子は今後の研究へ向けての多型探索結果が報告されている (Van den Berg et al., 2010; Nishii et al., 2007)。このようにイヌにおいても遺伝的素因を明らかにする研究が進められている。

脱共役蛋白質 (Uncoupling Protein: UCP) はヒトにおいてエネルギー代謝や脂質代謝に関与していることが報告されており、肥満研究のターゲットとして注目されている。UCP はミトコンドリア内膜に存在する 32 kDa の 6 回膜貫通型蛋白質である (Boss et al.,

2000; Pawade et al. 2005)。ミトコンドリアの主要な機能は電子伝達系を介した酸化リン酸化による ATP の産生であり (Mitchell, 1961)、その詳細は以下の通りである。まず、クレブス回路などから電子伝達系に供給された水素原子(H)はプロトン(H⁺)と電子(e⁻)にわかれる。プロトンは内膜の外側に放出され、電子は内膜の電子伝達系で受け渡されていく。電子が受け渡されていくごとに、内膜の内側にあるプロトンは内膜の外側に汲み出されていく。電子は最終的に内膜の内側にあるプロトンと結合し、さらに酸素(O₂)と結合して水(H₂O)となる。これらによりプロトン濃度勾配が生じ、プロトンは ATP 合成酵素を通してミトコンドリア内膜の外側から内側へ流入する。この酸化リン酸化反応により、ADP と無機リン酸から ATP が合成されるのである。UCP は、プロトンが ATP 合成酵素を通らずにマトリックスに戻るような経路を提供し、その結果として酸化のエネルギーは ATP 生成によっては保存されず、熱として散逸される (Lehninger et al., 2010) (図 1)。

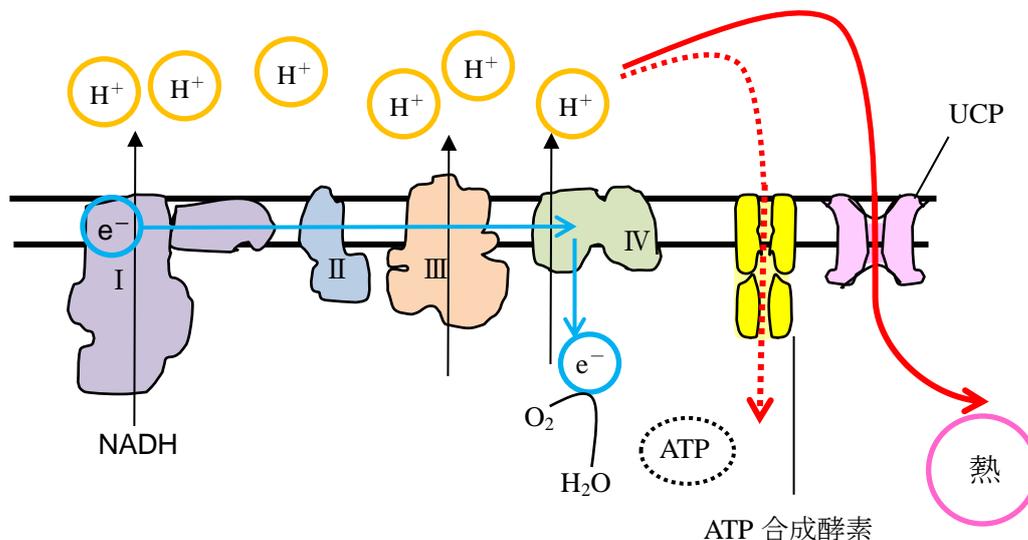


図 1. 電子伝達系における ATP の産生および UCP による熱産生

(Lehninger et al., 2010 より引用一部改編)

I ~IVの複合体は電子伝達系であり、電子が複合体を経由するごとにプロトンが膜間腔に汲み出される。最終的にプロトンが ATP 合成酵素を通して流入し、ATP が合成されるが、UCP は別ルートを提供することによりエネルギーを ATP 生成によっては保存せず、熱として散逸する

ヒトでは UCP1 から UCP5 の 5 つのファミリーが報告されている(Bouillaud et al., 1985; Kozak et al., 1988; Fleury et al., 1997; Boss et al., 1997; Mao et al., 1999; Sanchis et al., 1998)。UCP の特徴的な機能である熱産生については、UCP ファミリーの中で最初に同定された UCP1 で確認されており、UCP1 ノックアウトマウスは低温条件下での体温維持ができないことから (Lowell et al., 2000)、げっ歯類や冬眠をする動物の体温維持に重要な役割を果たしていると考えられている(Nicholls., 2001)。UCP2、UCP3 においても熱産生能は報告されているが、これまでイヌ UCPs と肥満に関する研究は少ない。

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 UCP2 および UCP3 遺伝子のオーソログであるイヌ UCP2、UCP3 遺伝子に着目し、当該遺伝子がイヌにおける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 つになりうるか分子遺伝学的研究を行った。第 1 章ではイヌ UCP2、UCP3 遺伝子の cDNA 単離および mRNA 発現解析を行った。第 1 章で決定された塩基配列および発現パターンがヒトと類似していたことから、第 2 章ではイヌ UCP2、UCP3 遺伝子領域の DNA 多型を探索した。第 2 章で同定された多型について、第 3 章および第 4 章で表現型との関連解析を行った。第 3 章では生化学検査値と DNA 多型の相関を検討し、第 4 章ではシェットランド・シープドッグ (シェルティー) と柴犬における DNA 多型分布の比較解析を行った。

第1章

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

緒言

2000年に石岡らは、イヌ UCP ファミリーの研究によりイヌ *UCP1*、*UCP2*、*UCP3* 遺伝子の cDNA 単離、分子構造の決定および mRNA 発現解析を報告した(石岡ら, 2000)。それによると、翻訳領域の塩基対数 (bp) およびアミノ酸残基数 (aa) は *UCP1* 遺伝子が 930bp、309aa、*UCP2* 遺伝子が 930bp、309aa、*UCP3* 遺伝子が 936bp、311aa であり、これらはヒト、マウス、ラットと高い相同性を有している。イヌ *UCP1*、*UCP2*、*UCP3* のアミノ酸配列は、ヒト UCPs との相同性がそれぞれ 76%、97%、92%で、その中でも特に構造や機能に重要とされている3ヶ所のミトコンドリア輸送蛋白モチーフと6ヶ所の膜貫通部分は100%近く一致していた。また、ヒトやげっ歯類で報告されている各アイソフォーム特有の配列(ヒスチジン・ペアやC末端から3番目に位置するシステイン残基の有無)をイヌも有していることが明らかになった。さらに脂肪組織、心臓、骨格筋など12種類の組織で行われたノーザンブロット法による mRNA 発現解析は、イヌ *UCP1* mRNA はいずれの組織においても検出されず、*UCP2* mRNA はユビキタスに発現が確認され、*UCP3* mRNA は骨格筋と心臓で特異的に発現が認められた。この結果はヒトやげっ歯類と同様の分布であったことから、イヌ UCP ファミリーも熱産生能を持つことが予想された(石岡ら, 2000; Ishioka et al., 2002)。

エネルギー消費への寄与が予想されるイヌ UCPs の発現を誘導することによるイヌの肥満予防や治療への応用を模索した研究として、あらかじめ過体重または肥満状態にした犬を食餌制限で減量させる際、魚油と牛脂を別々に添加した食餌を与え、2群間で *UCPs* mRNA 発現を比較した研究がある(石岡ら, 2002)。この実験により牛脂群よりも魚油群で体重の有意な減少が認められ、同時に魚油群ではイヌ骨格筋中に発現している *UCP3* mRNA の量が増加していた事を明らかにした。すなわち、*UCP3* mRNA 発現上昇がエネルギー消費を亢進させ、より大きな減量効果をもたらしたことを示唆した(石岡ら, 2002)。他にも、抗肥満効果へのイヌ *UCP1* の寄与が報告されている。イヌにおいて β_3 アドレナリン受容体アゴニストによる慢性処置は体脂肪含量を減少させ、脂肪細胞における *UCP1* mRNA の発現を誘導することが明らかになっている(Inokuma et al., 2006)。この抗肥満効果における *UCP1* の役割を評価するインビトロの

試験では、 $\beta 3$ アドレナリン受容体アゴニストにより処置された脂肪細胞で酸素消費速度が増加することから、UCP1 依存性のエネルギー消費が $\beta 3$ アドレナリン受容体アゴニストの抗肥満効果に寄与していることが示された (Omachi et al., 2008)。

このように UCP1 を代表とする UCP ファミリーは、イヌにおいても肥満予防のターゲット分子として予防医学上注目すべき遺伝子と考えられるが、全身に発現している UCP2 遺伝子や、自律的なエネルギー消費において重要な骨格筋や心臓で主に発現している UCP3 遺伝子は、UCP ファミリーの中で UCP1 遺伝子の後に発見されたことから UCP1 遺伝子に比べ知見が乏しい。そこで申請者は、分子遺伝学的に遺伝子機能を推測するために必要な DNA 多型マーカー探索 (第 2 章) の基盤を整えることを目的に、まず本章ではこれまでの研究で明らかになっていないイヌ UCP2、UCP3 遺伝子の非翻訳領域の塩基配列の決定、コーディング領域のリシーケンス (既知塩基配列の読み直し) を行い、公開されているイヌゲノム配列との比較解析を行うことでエクソン-イントロン構造を決定した。同時に、組織における UCP2 および UCP3 遺伝子の発現分布を Reverse Transcription PCR (RT-PCR) 法により解析した。

材料および方法

1. イヌ UCP2 および UCP3 遺伝子の cDNA 単離

1.1. 翻訳領域

(1) cDNA の合成

本学比較細胞生物学教室より分与されたビーグル犬骨格筋由来 Total RNA と Reverse Transcription System Kit (Promega, USA) を用い以下の手順で cDNA を合成した。

まず、 -80°C で保管している Total RNA を 0.2 ml PCR チューブに 4 μl 分注し、 70°C 10 分間加温した。その間に、0.6 ml チューブに滅菌水 15.6 μl 、 MgCl_2 25 mM 8 μl 、Reverse Transcription 10 \times Buffer 4 μl 、dNTP Mixture 10 mM 4 μl 、Oligo (dT)₁₅ Primer 2 μl 、Recombinant RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor 1 μl 、AMV Reverse Transcription (High Conc.) 1.4 μl を順に入れ軽くタッピング後スピンドウンし、全量 36 μl の反応溶液を作成した。次に、この調整した反応溶液を 42°C 15 分間 (逆転写反応)、 95°C 5 分間 (酵素活性の失活) 加温した後、5 分間氷冷した。合成された cDNA は実験に使用するまで 4°C で保存した。

(2) イヌ *UCP2* および *UCP3* 遺伝子 cDNA 断片の増幅

イヌ *UCP2* および *UCP3* 遺伝子の翻訳領域を増幅するために、National Center for Biotechnology Information (NCBI) に登録されている標的領域のイヌゲノム配列 (NC_006603) および cDNA 配列 (*UCP2*: AB020887、*UCP3*: AB022020) に基づいてプライマーを作成した。プライマーは、両遺伝子とも Forward を開始コドンより約 20bp 上流、Reverse を終止コドンより約 20bp 下流の非翻訳領域と予想される位置に作成し、配列は、*UCP2*-Forward: 5'-CCTGGGAGGTAGTGAGCAGT-3'、*UCP2*-Reverse: 5'-TGGG-GTCAGCAGCAGGAGAT-3'、*UCP3*-Forward: 5'-GGGACCAAGCAGAACCTTCT-3'、*UCP3*-Reverse: 5'-GTACCACATGGCCCTGCCTT-3'とした。

これらのプライマーと cDNA を用いて RT-PCR 法によりイヌ *UCP2* および *UCP3* 遺伝子 cDNA 断片を増幅した。増幅反応には FastStart *Taq* DNA Polymerase, dNTPack (Roche, Switzerland) を使用した。反応溶液の調整は、10×Buffer+MgCl₂ 2.5 μl、dNTP Mix 0.5 μl、Forward Primer (20 pmol/μl) 1 μl、Reverse Primer (20 pmol/μl) 1 μl、cDNA 1 μl、滅菌水 18.8 μl、FastStart *Taq* DNA Polymerase (Roche) 0.2 μl を 0.2 ml PCR チューブに分注し、全量 25 μl とした。RT-PCR 反応条件は、95°C 4 分間加熱後、初期変性 95°C 30 秒、アニーリング 55°C 30 秒、伸長反応 72°C 60 秒を 1 サイクルとして 35 サイクル行い、最終伸長反応を 7 分間行った後 4°C で保存した。反応には TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP600 (TaKaRa, Japan) を使用した。増幅産物の確認は PCR 産物 5 μl に対して 6×Loading Dye 1 μl を混合し、2 % アガロースゲルにて 100V 25 分間電気泳動後、エチジウムブロマイド溶液 (1 μl/ml) で 10 分間染色、蒸留水で 5 分間の脱色を行い UV トランスイルミネーターでバンドを検出後、撮影した (ATTO, Japan)。

(3) サブクローニング

翻訳領域増幅用プライマー (*UCP2*-Forward / *UCP2*-Reverse、*UCP3*-Forward / *UCP3*-Reverse) により増幅された cDNA 断片はバンドが複数本認められたため、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, USA) を用いて、PCR 産物を TOPO TA ベクターにサブクローニングした。

1. LB 寒天培地の作成

LB Agar Powder (Invitrogen) 3.84 g と蒸留水 100 ml をビーカーに入れ攪拌後、蒸留水

を加え全量 120 ml にした。オートクレーブ内で 121°C 15 分間加温溶解後混和した。その後、室温に放置し 60°C 以下になったところで、アンピシリン (100 µg/ml) 60 µl を添加し、よく混和した。次に、クリーンベンチ内でシャーレ 1 枚につき、調整溶液約 12 ml を加え、蓋をずらした状態で 1 時間静置した。37°C で一晩温置後、密閉し 4°C で保存した。

2. 液体培地の作成

2×YT Broth (Becton, Dickinson and Company, USA) 15.5 g と蒸留水 400 ml をビーカーに入れ攪拌後、蒸留水を加え全量 500 ml にした。オートクレーブ内で 121°C 15 分間加温後、室温に放置し 60°C 以下になったところで、アンピシリン (100 µg/ml) 60 µl を添加し、4°C で保存した。

3. ライゲーション

0.2 ml PCR チューブに、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) に含まれている Salt Solution 0.5 µl、Fresh PCR Product 0.4 µl、滅菌水 1.6 µl、TOPO Vector 0.5 µl の全量 3 µl を分注し、軽くタッピング後室温で 20 分間静置した。

4. 大腸菌へのトランスフォーメーションと培養

1.5 ml チューブに E Coli. JM109 competent cells (TaKaRa) 50 µl と 1.1.(3) 3.で調整したライゲーション溶液を 1 µl 入れ、30 分間氷冷後、42°C 30 秒の加温 (ヒートショック)、2 分間の氷冷を行った。ついで、コンピテントセル付属の 450 µl S.O.C メディウム (TaKaRa) を添加し、37°C 1 時間振盪培養後、5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactoside (x-gal) (Wako, Japan) 50 µl、Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) 50 µl を含む LB 寒天培地に 100 µl 塗抹し、37°C で一晩培養した。15 ml 遠心管に 1.1 (3) 2.で作成した液体培地を 4 ml 加えた後、寒天培地に生育した白色コロニーを入れ、37°C 一晩振盪培養した。

5. プラスミド DNA 抽出

QIAprep[®] Miniprep Kit (QIAGEN, USA) を用いて添付のプロトコールの手順に従いプラスミド DNA の抽出を行った。

大腸菌培養液の入っている遠心管を 3,000 rpm 10 分間遠心後、上清を除去した。上清除去後のペレットに Buffer P1 を 250 µl 添加し、ピペッティングによりペレットを再懸濁した後、1.5 ml チューブに全量移した。ついで、Buffer P2 を 250 µl 添加し 4-6 回

転倒混和後、Buffer N3 を 350 μ l 添加し 4-6 回転倒混和を行った後に、13,000 rpm 10 分間遠心した。容器を傾けて上清を QIAprep スピンカラムにアプライし、13,000 rpm で 1 分間の遠心を行った。Buffer PB を 500 μ l 添加し、13,000 rpm で 1 分間の遠心後、Buffer PE を 750 μ l 添加し、13,000 rpm で 1 分間の遠心を行うことにより、QIAprep スピンカラムを洗浄した。フルースロー液を捨て、残留している洗浄バッファーを除去するために、さらに 13,000 rpm で 1 分間の遠心を行った。QIAprep カラムを新しい 1.5 ml チューブにセットした後、DNA を溶出するために Buffer EB を 50 μ l カラムの中央にアプライし、1 分間静置した後 13,000 rpm で 1 分間の遠心を行い、プラスミド DNA を抽出した。抽出したプラスミド DNA の濃度および純度を Spectrophotometer ND-1000 (Nano Drop) (LMS, Japan) を用いて測定し、-20 $^{\circ}$ C で保存した。

6. プラスミド DNA 断片の確認

精製したプラスミドベクターに標的遺伝子産物が挿入されているかを確認する為に、イヌ *UCP2* および *UCP3* 遺伝子特異的なプライマーを用いて PCR 反応を行った。それぞれ翻訳領域増幅用のプライマーセット (*UCP2-Forward* / *UCP2-Reverse*、*UCP3-Forward* / *UCP3-Reverse*) を使用した。

PCR 反応は、TaKaRa Ex *Taq*[®] (TaKaRa) を用いた。なお、反応溶液の調整は 10 \times Ex *Taq* Buffer 1.25 μ l、dNTP Mixture 1.25 μ l、Forward Primer 0.25 μ l、Reverse Primer 0.25 μ l、DNA 1 μ l、Ex *Taq* 0.1 μ l、および滅菌水 8.4 μ l を 0.2 ml PCR チューブに分注し、全量を 12.5 μ l とした。PCR 反応条件は 95 $^{\circ}$ C 1 分間加熱後、初期変性 95 $^{\circ}$ C 1 分、アニーリング 55 $^{\circ}$ C 1 分、伸長反応 72 $^{\circ}$ C 3 分を 1 サイクルとして 35 サイクルの PCR 反応を行い、最終伸長反応は 72 $^{\circ}$ C 7 分間行い、その後 4 $^{\circ}$ C で保存した。反応には TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP600 (TaKaRa) を使用した。PCR 産物の確認には 2% アガロースゲル電気泳動を行い、UV トランスイルミネーターでバンドを検出後、撮影した (ATTO)。

(4) 塩基配列の決定

塩基配列を決定するためのシーケンス反応には、Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) を使用した。Cycle sequence 反応液は、0.2 ml PCR チューブに、Ready Reaction Premix 1 μ l、5 \times Big Dye Sequence Buffer 1.5 μ l、Primer (1.6 pmol/ μ l) 1 μ l、テンプレート 1 μ l、および滅菌水 5.5 μ l 加え、全量 10 μ l とした。プ

ライマーは、1.1.(2)で使用したプライマー (UCP2-Forward、UCP2-Reverse、UCP3-Forward、UCP3-Reverse) の他に、UCP2- SEQ1: 5'-CCCAATGTTGCTCGTAATGC-3'、UCP2-SEQ2: 5'-AGAAGTGAAGTGGCAAGGGA-3'、UCP3-SEQ1: 5'-GTGCTGGGCAC-CATCCTGAC-3'、UCP3-SEQ2: 5'-ACAATGGATGCCTACAGGAC-3'、UCP3-SEQ3: 5'-TCACCATCTTCAGCATAACAG-3'を使用した。反応条件は、96°C 1分間加熱後、96°C 10秒、50°C 5秒、60°C 4分を1サイクルとして25サイクル行い、4°Cで保存した。反応には、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP600 (TaKaRa) を使用した。

Cycle sequence 産物の精製には、Big Dye[®] XTerminator[™] Purification Kit (Applied Biosystems) を使用した。反応溶液は、SAM[™] Solution 45 µl、Big Dye[®] XTerminator[™] Solution 10 µl、cycle sequence 産物 10 µl を 1.5 ml チューブに分注し、振盪器 (Taitec, Japan) で 30 分間攪拌した。攪拌後、1,000×g 2 分間の遠心を行い、上清 40 µl を ABI チューブに移した。上清に HiDi-formamide 20 µl を添加し、よく混合したものをサンプルとした。

塩基配列の解析は、ABI PRISM 310 or 3730 genetic analyzer (Applied Biosystems) を使用した。得られた塩基配列は、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) でデータベース上の配列と比較した。アミノ酸配列への変換や、相同性解析には GENETYX Ver.11 (ゼネティックス, Japan) を使用した。

1.2. 5'非翻訳領域

(1) イヌ UCP2 および UCP3 遺伝子 cDNA 断片の増幅

イヌ UCP2 および UCP3 遺伝子の 5'非翻訳領域 (UTR) は同定されていないため、既に明らかになっているヒト UCP2 および UCP3 遺伝子の 5'UTR 配列 (NM003355、NM003356) を参考に Forward プライマーを作成した。エクソン領域の配列は種を超えて高度に保存されていると考え、イヌゲノム配列中でヒト UCP2 および UCP3 遺伝子の 5'UTR 配列と相同性の高い領域を BLAST 検索した。ヒトの配列と一致した部分の最上流、またはイヌゲノム上でさらに上流領域にプライマーを設計した。Reverse プライマーは、NCBI に登録されている標的領域のイヌゲノム配列 (NC_006603) および cDNA 配列 (UCP2: AB020887、UCP3: AB022020) に基づいてプライマーを作成した。5'UTR 増幅用のプライマー配列は UCP2-5'UTR-Forward: 5'-CAGCTCTCGGCTTGTGA-

GC-3'、UCP2-5'UTR-Reverse: 5'-GAGGCGGCTCCCGATGCCAG-3'、UCP3-5'UTR-Forward: 5'-AACCAGATCTGGAAGCTCTGAC-3'、UCP3-5'UTR-Reverse: 5'-AGCAGCTTCTCCTTGATGAT-3' とした。

これらのプライマーと 1.1.(1)で合成した cDNA を用いて RT-PCR 法によりイヌ *UCP2* および *UCP3* cDNA 断片を増幅した。反応溶液の組成、反応条件および増幅 PCR 産物の確認は 1.1.(2)と同様に実施した。

イヌ *UCP3* 遺伝子 5'UTR の増幅を試みた PCR 産物についてはバンドが非常に薄かったため、更に Semi-nested PCR 反応を行った。反応溶液は、10×Buffer+MgCl₂ 2.5 μl、dNTP Mix 0.5 μl、Forward Primer: 5'-AACCAGATCTGGAAGCTCTGAC-3' (20 pmol/μl) 1 μl、Reverse Primer: 5'-CTGCAGGCGAACCTTGGCT-3' (20 pmol/μl) 1 μl、PCR 産物 1 μl、滅菌水 18.8 μl、FastStart *Taq* DNA Polymerase (Roche) 0.2 μl を 0.2 ml チューブに分注し、全量 25 μl とした。反応条件は、95°C 4 分間加熱後、初期変性 95°C 30 秒、アニーリング 55°C 30 秒、伸長反応 72°C 60 秒を 1 サイクルとして 35 サイクル行い、最終伸長反応を 72°C 7 分間行った。反応には TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP600 (TaKaRa) を使用した。PCR 産物は 4°C で保存後、増幅 PCR 産物の確認を行った (1.1.(2)参照)。

(2) アガロースゲルからの DNA 断片の精製

5'UTR 増幅用プライマーにより増幅された cDNA 断片はバンドが複数本認められたため、PCR 産物 15 μl を 1%アガロースゲルにて 100 V、30 分間の電気泳動を行い、エチジウムブロマイド溶液で 10 分間の染色、蒸留水で 5 分間の脱色を行った後、QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて添付のプロトコールの手順を参考にアガロースゲルから DNA の抽出を行った。

UV 照射下にて、標的増幅産物を含むゲルをメス刃で切り出し、1.5 ml チューブに入れた。ゲルを入れたチューブに、Qx1 Buffer を 900 μl とよく攪拌した QIAEX II を 10 μl 添加し、50°C 10 分間加温した。加温中は 2 分毎に 30 秒の攪拌を行い、ゲルを溶解した。インキュベート後に 15,000 rpm で 30 秒の遠心を行い、上清をデカントで除去した。ついで、Qx1 Buffer を 500 μl 添加し、ピペッティングによりペレットの洗浄を行った。15,000 rpm で 30 秒の遠心を行い、上清をデカントで除去後、PE Buffer を 500 μl 添加し、ピペッティングによりペレットを洗浄した。15,000 rpm で 30 秒の遠心後、ペレットの

色が黄色の場合は、再度 PE Buffer を添加し、同様の手順でペレットの洗浄を行った。白色のペレットが見られたら、チューブを傾けて上清除去後、ピペットを用いてペレット以外の溶液を除去し、清潔なキムワイブ上にチューブを置き、ペレットを風乾させた。風乾後、滅菌水を 40 μ l 添加し、攪拌により DNA を抽出させ、50°C 5 分間の加温を行った。加温後、15,000 rpm で 30 秒の遠心を行い、新しく用意した 1.5 ml チューブに上清を移し、4°C にて保存した。

(3) 塩基配列の決定

塩基配列の決定に使用した試薬および方法は、1.1.翻訳領域と同じである (1.1.(4)参照)。プライマーは 1.2.(1) で使用した 5 種類を使用した。また、得られた配列の解析も同様に BLAST および GENETYX Ver.11 (ゼネティックス) を使用して行った。

1.3. 既報 cDNA と配列が異なる部位の塩基配列の確認

得られた cDNA 断片の塩基配列を解析した結果、既報のイヌ *UCP2* および *UCP3* cDNA の配列と一部配列の異なるクローンが検出されたため、ランダムに選抜したイヌゲノム DNA 12 検体を用いて配列の確認を行った (表 1)。

表 1. 既報 cDNA と配列が異なる部位の確認に使用したイヌゲノム DNA

No.	犬種	Lab ID
1	ヨークシャー・テリア	3460
2	ミニチュア・ダックスフンド	2699
3	シーズー	3971
4	チワワ	3972
5	ゴールデン・レトリバー	3973
6	トイ・プードル	3980
7	ボルゾイ	3993
8	ミニチュア・シュナウザー	4008
9	ビーグル	4616
10	イタリアン・グレーハウンド	4629
11	ウェルッシュ・コーギー	4642
12	レオンベルガー	4651

UCP2 遺伝子の開始コドンである ATG の A を 1 塩基目と数えた場合に 190 番目の塩基が既報配列と異なっていたが、これについてはダイレクトシーケンス法により解析を行った。同様に *UCP3* 遺伝子の開始コドンである ATG の A を 1 塩基目と数えて、543 番目と 660 番目の塩基も既報配列と異なっていたため 543 番目については、制限酵素 *Nb.BsrDI* (New England Biolabs, Japan) の認識部位だったことより、PCR-Restriction Fragment Length Polymorphosm (RFLP) 解析を、660 番目についてはダイレクトシーケンス法を行った。

ゲノム DNA の抽出方法に関しては後述する。PCR 反応溶液は、10×Ex *Taq* Buffer 1.25 μl、dNTP Mixture 1.25 μl、Forward Primer (20 pmol /μl) 0.25 μl、Reverse Primer (20 pmol /μl) 0.25 μl、DNA 1 μl、Ex *Taq* (TaKaRa) 0.1 μl、および滅菌水 8.4 μl を 0.2 ml PCR チューブに分注し、全量を 12.5 μl とした。PCR 反応条件は 95°C 1 分間加熱後、初期変性 95°C 1 分、アニーリング 55°C 1 分、伸長反応 72°C 1 分を 1 サイクルとして 35 サイクルの PCR 反応を行い、最終伸長反応は 72°C 7 分間行い、その後 4°C で保存した。反応には、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP600 (TaKaRa) を使用した。増幅産物の確認は、1.1. (2) と同様に行った。標的遺伝子の増幅が確認された検体は、制限酵素処理またはシーケンス反応を実施した。

制限酵素処理溶液は、10×Buffer NEB (2) 1 μl、PCR 産物 8 μl、*Nb.BsrDI* (NEB) 0.25 μl、および滅菌水 0.75 μl を 0.6 ml チューブに分注し、全量を 10 μl とした。65°C で 2 時間加温後、80°C 20 分で酵素を失活させ、3% アガロースゲル電気泳動 (100 V、30 分) を行い、遺伝子型の判定を行った。

シーケンス反応により塩基配列を確認するサンプルは、まず PCR 産物の精製を行った。PCR 産物の精製は、High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) を用いて行った。0.2 ml PCR チューブに入っている 20 μl の PCR 産物に、Binding Buffer を 100 μl 添加し、ピペッティングにより混和した。Spin Filter Tube と Collection Tube をセットし、Spin Filter Tube の中央に、PCR 産物と Binding Buffer を混和したものを全量アプライし、13,000×g で 1 分間の遠心を行った。容器を傾け上清を捨てた後、Spin Filter Tube の中央に Wash Buffer を 100 μl アプライし、13,000×g で 1 分間の遠心を行った。同様にフロースルー液を捨て、再度 Wash Buffer 40 μl を Spin Filter Tube の中央にアプライし、13,000×g で 1 分間の遠心を行った。ついで、1.5 ml チューブに Spin Filter Tube をセッ

トし、Spin Filter Tube の中央に Elution Buffer を 20 μ l アプライし、13,000 rpm で 1 分間の遠心を行い、4°Cにて保存した。その後 1.1.(4)にて記述の通りダイレクトシーケンシング法を行い、塩基配列を決定した。

2. Reverse Transcription PCR (RT-PCR) 法による mRNA 発現解析

2.1. 組織

30 種類のイヌ組織由来の Total RNA は Zyagen Laboratories (USA) および BioChain Institute (USA) より購入した (犬種は不明)。Total RNA が抽出された組織は、皮膚、筋肉、脂肪、舌、小脳、海馬、視床下部、大脳皮質、脊髄、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、大腸、直腸、膵臓、肝臓、精巣、子宮、副腎、肺、横隔膜、脾臓、胸腺、骨髄、心臓、腎臓、胆嚢、目である。

2.2. RT-PCR 法

1.1. (1)と同様に cDNA 合成後、イヌ *UCP2* および *UCP3* 遺伝子特異的なプライマー (*UCP2-Forward* / *UCP2-Reverse*、*UCP3-Forward* / *UCP3-Reverse*、配列は 1.1. (2)参照) を用いて RT-PCR 反応を行った。PCR 反応液は FastStart *Taq* DNA Polymerase, dNTPack (Roche) を用いて 10 \times Buffer+MgCl₂ 2.5 μ l、dNTP Mix 0.5 μ l、Forward Primer (20 pmol/ μ l) 1 μ l、Reverse Primer (20 pmol/ μ l) 1 μ l、cDNA 0.2 μ l、滅菌水 19.6 μ l、FastStart *Taq* DNA Polymerase (Roche) 0.2 μ l を 0.2 ml PCR チューブに分注し、全量 25 μ l とした。RT-PCR 反応条件は、95°C 4 分間加熱後、初期変性 95°C 30 秒、アニーリング 55°C 30 秒、伸長反応 72°C 60 秒を 1 サイクルとして 35 サイクル行い、最終伸長反応を 72°C 7 分間行った後、4°Cで保存した。反応には TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP600 (TaKaRa) を使用した。PCR 産物の確認は 1.1. (2)と同様に行った。

RNA の内部コントロールとして β -glucuronidase (*GUSB*) 遺伝子の増幅も同様に行った。使用したプライマー配列は、*GUSB-Forward*: 5'-TGAGCCCACTTCCTTCCTGA-3'、*GUSB-Reverse*: 5'-GGTCTGCTTCATAGTTGGAATTGG-3'とした。

なお本研究は、動物実験委員会および組換え DNA 実験安全委員会の承認を受けて行った。

結果

1. イヌ *UCP2* 遺伝子の構造

1.1. cDNA 配列

ビーグル犬骨格筋由来 Total RNA より、イヌ *UCP2* 遺伝子の翻訳領域および 5'UTR の増幅を試みた (図 2)。

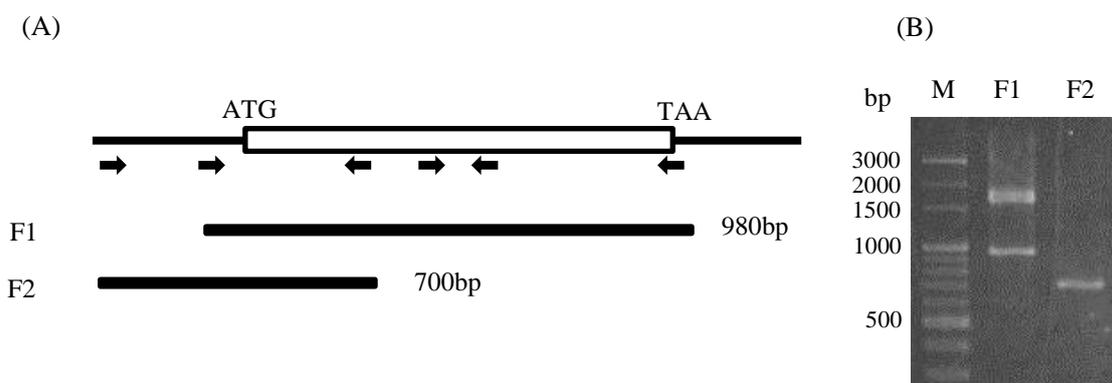


図 2. (A) イヌ *UCP2* 遺伝子 cDNA の単離および塩基配列の決定に使用したプライマーの位置と増幅領域
(B) 電気泳動像 M: ラダーマーカー

まず、翻訳領域増幅を目的としたフラグメント (F1) の増幅を試みたところ、予想された約 980 bp の PCR 産物が検出された。この PCR 産物を、ダイレクトシーケンシング法により塩基配列を決定したところ、既報のイヌ *UCP2* 遺伝子 cDNA 配列 (AB020887) とは 1 塩基を除き全て一致していた。既報のイヌ *UCP2* 遺伝子 cDNA 配列およびアミノ酸配列との相同性はどちらも 99%であった。申請者が認めた 1 塩基置換はアミノ酸置換を伴う置換であり、その部位は、開始コドンである ATG の A を 1 塩基目と数えた場合に 190 番目の塩基が T (チミン) ではなく G (グアニン) であった (T190G)。予想されるアミノ酸置換は 64 番目のアミノ酸が Cys (システイン) から Gly

(グリシン) であった (Cys64Gly)。

次に、5'UTR 増幅を目的としたフラグメント (F2) の増幅を試みたところ約 700 bp の PCR 産物が検出された。塩基配列を決定したところ、フラグメント F2 下流の翻訳領域にあたる領域 (365 bp) は、既報のイヌ *UCP2* 遺伝子 cDNA 配列 (AB020887) と 99% 一致した。1 塩基異なっていたが、これは F1 同様に 190 番目の塩基が T ではなく G であった。フラグメント F2 の上流 321 bp は既報 cDNA 配列に含まれていないため、イヌゲノム配列 (NC_006603) と比較した。この 321 bp と相同性が確認されたゲノム領域は、イヌ *UCP2* 遺伝子の開始コドンから上流約 3800 bp の範囲に、65 bp、157 bp、99 bp の 3 ブロックにわかれていたが、いずれも 100% 一致した。99 bp のブロックの直後には開始コドンが位置していた。

以上の結果からフラグメント F1 と F2 はそれぞれイヌ *UCP2* 遺伝子 cDNA であると考えられ、塩基配列を統合したものを GenBank Accession No. AB6011704 に登録した。本研究で決定した塩基配列は新規に 5'UTR が 321 bp、翻訳領域が 930 bp の合計 1251 bp であり、推定されるアミノ酸は 309 残基であった (図 3)。

なお翻訳領域増幅を試みた際に、目的サイズ以外に約 1700 bp の増幅産物も確認されたが、塩基配列を解析した結果これは *UCP* 遺伝子ではなかった。

tccgcgcgctctccgccccgccagacagacagagccgccccgctcccgtgttctcctt	57
gcggccccggacacatagtagtactattaggtgtttcgtctcccagccattttctatggaaaaccaa	123
ggagatcgggcatgatagccactggcagctttgaagaatgggatgcctttagagaagcttgatct	189
tggaggcctcagcgtgagaccttaaaaagccggattccggcagagtctttctatctcgtcttgttg	255
ctgactgaaggtgaccccttctccagcttttctccatctcctgggaggtagtgagcagtcagcatt	321
atggttgggttcaaggctacggatgtaccccctactgccactgtgaagttcctggggctggcaca	387
M V G F K A T D V P P T A T V K F L G A G T	22
gctgcctgcattgcagatctcatcacctttcctctggacaccgctaaagtccggctgcagatccaa	453
A A C I A D L I T F P L D T A K V R L Q I Q	44
ggagaaaggcagggccagtgcgggctcgggccagcggccagtagccagggcgtgctaggcaccatc	519
G E R Q G P V R A A A S A Q Y R G V L C T I	66
ctgaccatggtgcgactgagggccccctagcctctacagtgggctggtcgccggcctgcagcgc	585
L T M V R T E G P R S L Y S G L V A G L Q R	88
cagatgagctttgcctctgtccgcctcggcctctacgactctgtcaagcaattctacaccaagggt	651
Q M S F A S V R I G L Y D S V K Q F Y T K G	110
tctgagcatgctggcatcgggagccgctcctggcaggcagcaccacaggtgccttggctgtggct	717
S E H A G I G S R L L A G S T T G A L A V A	132
gtagcccagcccacagatgtagtaaagggtccggttccaggctcaggccccgggctggaagtggccgg	783
V A Q P T D V V K V R F Q A Q A R A G S G R	154
agataccaaagcactgttgatgcctacaagaccatcgcccagaggaagggttccgaggactctgg	849
R Y Q S T V D A Y K T I A R E E G F R G L W	176
aaagggacctctccaatgttgctcgtaatgccattgtcaactgtgctgagctggtgacctacgat	915
K G T S P N V A R N A I V N C A E L V T Y D	198
ctcatcaaggacgcccctcctgaaggccaacctcatgacagatgacctccccttgccacttcacttct	981
L I K D A L L K A N L M T D D L P C H F T S	220
gccttcggggcaggcttctgcaccaccgtcatcgctccccgctgatgtcgtcaagacgagatat	1047
A F G A G F C T T V I A S P V D V V K T R Y	242
atgaactctgccctaggccagtagcagcagcgtggccactgtgccctcaccatgctccagaaggag	1113
M N S A L G Q Y S S A G H C A L T M L Q K E	264
ggtccccgagccttctacaaagggttcatgccttctttctccggttgggttctggaacgtggtg	1179
G P R A F Y K G F M P S F L R L G S W N V V	286
atgtttgtcacctatgagcagctcaaacgggccctcatggctgcctgcacttcccgggaggctccc	1245
M F V T Y E Q L K R A L M A A C T S R E A P	308
ttttaa	1251
F -	309

図3. 今回単離したイヌ *UCP2* 遺伝子の塩基配列と予想されるアミノ酸配列
(GenBank Accession No. AB611704)
上段：ヌクレオチド 下段：アミノ酸

1.2. 他動物種との相同性

本研究で得られたイヌ *UCP2* 遺伝子の翻訳領域および 5'UTR 配列と他動物種オーソログの相同性を解析した。まず翻訳領域 (930 bp) についてヒト、ウシ、マウス、ラットの 4 種と比較したところ、アミノ酸レベルでヒトと 97.7%、ウシと 97.1%、マウスと 96.1%、ラットと 95.5%一致し、相同性が高いことが確認された (表 2)。

表 2. 今回単離したイヌ *UCP2* 遺伝子 cDNA と他動物オーソログとの配列比較

<i>UCP2</i>	ORF(アミノ酸配列)	5'UTR	Accession No.
イヌ	99.7%	-	BAA90457
ヒト	97.7%	89.7% [321 bp]	NM003355
ウシ	97.1%	83.5% [321 bp]	NM001033611
マウス	96.1%	79.8% [321 bp]	NM011671
ラット	95.5%	-	NM019354

同様に 5'UTR (321 bp) について、配列が登録されているヒト、ウシ、マウスの 3 種と比較した。データベース上では、ヒトは 368 bp、ウシは 337 bp、マウスは 380 bp の 5'UTR 配列が登録されているが、本研究で得られたイヌ *UCP2* 遺伝子の 5'UTR 配列は 321 bp であったため、この 321 bp を基準にして相同性を解析した。その結果、ヒトと 89.7%、ウシと 83.5%、マウスと 79.8%一致していた (表 2)。

1.3. エクソン-イントロン構造

イヌ *UCP2* 遺伝子のエクソン-イントロン構造は、5'UTR を増幅し得られた配列がゲノム上では3つのブロックにわかれていたことから、非翻訳領域として Exon 1、Exon 2、Exon 3 が存在し、開始コドンは Exon 3 に位置していることが予想された。翻訳領域についても 5'UTR 同様に、cDNA 配列とゲノム配列を比較し、GT-AG 則 (ごく少数の例外を除いて、イントロンは 5'端に GT を 3'端に AG を持つというルール) を確認してエクソン-イントロン構造を同定した (図 4)。イヌ *UCP2* 遺伝子の予想されるエクソン-イントロン境界配列は表 3 に示した。

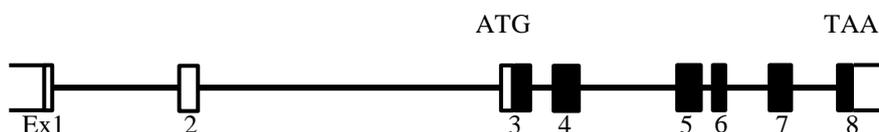


図 4. イヌ *UCP2* 遺伝子の予想される構造

□ : 非翻訳領域 ■ : 翻訳領域 — : Intron
— : 約 170 bp

表 3. 予想されるイヌ *UCP2* 遺伝子のエクソン-イントロン境界領域の配列

下線は GT-AG 則に合致

Exon	3' Intron	Exon	5' Intron
1 (65 bp)	-----5'UTR-----	TCCGCGCGCT....TTGCGGCCCG	<u>gt</u> gagcccgggcccctcccg (1006 bp)
2 (157 bp)	ttcttgcctcatccac <u>ag</u>	GACACATAGT....AAAAAGCCGG	<u>gt</u> aagtgtccagtctaagg (2505 bp)
3 (225 bp)	cttctctctctgget <u>tag</u>	ATCCGGCAG....CCGGCTGCAG	<u>gt</u> gaggggatgaagcctggg (172 bp)
4 (211 bp)	caccaattgatcttgc <u>ag</u>	ATCCAAGGAG....GGTTCTGAGC	<u>gt</u> gagtatggaactgggcca (796 bp)
5 (195 bp)	ccccaatggttccccac <u>ag</u>	ATGCTGGCAT....CTCTGGAAAG	<u>gt</u> cagtgtatcagttattc (80 bp)
6 (102 bp)	agtaccatttcttctg <u>tag</u>	GGACCTCTCC....CTCATGACAG	<u>gt</u> gagaggataaatggtgct (367 bp)
7 (181 bp)	ttctgctctcttggc <u>ag</u>	ATGACCTCCC....TCTACAAAGG	<u>gt</u> gagtctctgatccatccc (386 bp)
8 (115 bp)	ctatgtttctcttct <u>tag</u>	GTTCATGCCT....TCCCTTTTAA	-----3'UTR-----

2. イヌ *UCP3* 遺伝子の構造

2.1. cDNA 配列

ビーグル犬骨格筋由来 Total RNA より、イヌ *UCP3* 遺伝子の翻訳領域および 5'UTR の増幅を試みた (図 5)。

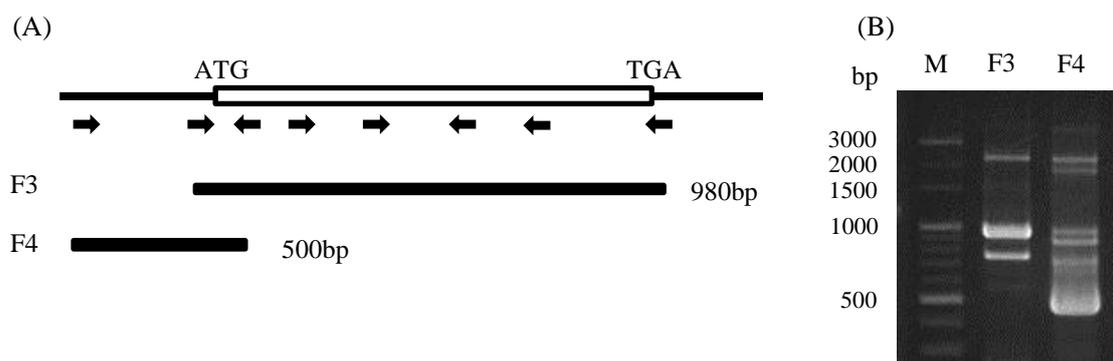


図 5. (A) イヌ *UCP3* 遺伝子 cDNA の単離および塩基配列の決定に使用したプライマーの位置と増幅領域
(B) 電気泳動像 M: ラダーマーカー

まず翻訳領域増幅を目的としたフラグメント (F3) の増幅を試みたところ、予想された約 980 bp の PCR 産物が検出された。この PCR 産物をダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定したところ、既報のイヌ *UCP3* 遺伝子 cDNA 配列 (AB022020) とは 2 塩基を除き一致した。既報のイヌ *UCP3* 遺伝子 cDNA 配列およびアミノ酸配列との相同性はどちらも 99%であった。申請者が認めた 2 ヶ所の 1 塩基置換の部位は、開始コドンである ATG の A を 1 塩基目と数えた場合に 543 番目の塩基が A (アデニン) ではなく T (チミン) (A543T)、660 番目の塩基が G (グアニン) ではなく T (チミン) (G660T) であった。G660T はアミノ酸置換を伴い、予想されるアミノ酸置換は 220 番目のアミノ酸が Leu (ロイシン) から Phe (フェニルアラニン) (Leu220Phe) であった。次に、5'UTR 増幅を目的としたフラグメント (F4) の増幅領域は約 500 bp であった。塩基配列を決定したところ、フラグメント F4 下流の翻訳領域にあたる領域 (126 bp)

は既報のイヌ *UCP3* 遺伝子 cDNA 配列 (AB022020) と 100%一致した。フラグメント F4 の上流 365 bp は既報 cDNA 配列に含まれていないため、イヌゲノム配列 (NC_006603) と比較した。この 365 bp と配列が一致したゲノム領域は、イヌ *UCP3* 遺伝子の開始コドンから上流約 4800 bp の範囲に、95 bp、270 bp の 2 ブロックにわかれていたが、いずれも 100%一致した。270 bp のブロックの直後には開始コドンが位置していた。

以上の結果からフラグメント F3 と F4 はそれぞれイヌ *UCP3* 遺伝子 cDNA であると考えられ、塩基配列を統合したものを GenBank Accession No. AB611705 に登録した。本研究で決定した塩基配列は新規に 5'UTR が 365 bp、翻訳領域が 936 bp の合計 1301 bp であり、推定されるアミノ酸は 311 残基であった (図 6)。

aaccagatctggaactctgacctttccctcacct	35
ccctgccactcaccagccagccgctcttgtcaagtgatcaagctgtcaactaagcttctatgggc	101
taaggtttcaggctcagctggaacgtataaagataggtgcccaagccagaggcagcagagacaacagt	167
gaatggcaaggggcaactagatccctgctgccacctccaggatggagccctaaggagccttaag	233
ggaaccccgctgcttcccaaccctggctgactcacagcctcctccctgactaaagctcagggtg	299
caaagtggcctctcttcttgacctcacctggaccctggaggaccaagcagaaccttctgggacc	365
atggttgactaaagccttcagaggtaccccctaccacagctgtgaaattcctgggggcaggcaca	431
M V G L K P S E V P P T T A V K F L G A G T	22
gcagcctgttttctgatctcctcacctttccactggacacagccaaggttcgctgcagatccag	497
A A C F A D L L T F P L D T A K V R L Q I Q	44
ggggagaaccaggcgacacaggcagcccggagaatccaataccgcggtgtgctgggcaccatcctg	563
G E N Q A T Q A A R R I Q Y R G V L G T I L	66
accatggtgcgaccgaggccccgcagcccctacaacgggctggtcgccggcctgcagcgccag	629
T M V R T E G P R S P Y N G L V A G L Q R Q	88
atgagctttgcctccatccgcattggcctctatgactctgtcaagcagttctacacccccaaagga	695
M S F A S I R I G L Y D S V K Q F Y T P K G	110
tcagaccactccagcatcactacgaggattttggcaggctgcaccacaggagccatggcagtatca	761
S D H S S I T T R I L A G C T T G A M A V S	132
tgtgccagcccacagatgtggtgaaggtccgatttcaggccagcatacaccttggggcggggagc	827
C A Q P T D V V K V R F Q A S I H L G A G S	154
aacaggaagtacagtgaggacaatggatgcctacaggaccatcgccagggaagaaggggtcaggggc	893
N R K Y S G T M D A Y R T I A R E E G V R G	176
ctatggaaggaactttgccaacatcacaaggaatgccatcgtcaactgtgctgagatggtgacc	959
L W K G T L P N I T R N A I V N C A E M V T	198
tatgacatcatcaaggagaagctgctagactatcatctgctcactgacaatttccctgccacttt	1025
Y D I I K E K L L D Y H L L T D N F P C H L	220
atcttctgcctttggagccggtttctgtgccacagtggtggcctcccagtggtatggtgaagacc	1091
I S A F G A G F C A T V V A S P V D V V K T	242
cgtacatgaactcgccccaggccaatactgcagccccctggactgtatgctgaagatggtgacc	1157
R Y M N S P P G Q Y C S P L D C M L K M V T	264
caagagggccccacagccttctataaggatttacaccatccttttgcgttgggaacctggaat	1223
Q E G P T A F Y K G F T P S F L R L G T W N	286
gtggtgatgtttgtgacctatgagcagctgaaacgggccttgatgaaagtccagatgctacgggaa	1289
V V M F V T Y E Q L K R A L M K V Q M L R E	308
tctccattctga	1301
S P F -	311

図 6. 今回単離したイヌ *UCP3* 遺伝子の塩基配列と予想されるアミノ酸配列 (GenBank Accession No. AB611705)

上段：ヌクレオチド 下段：アミノ酸

2.2. 他動物種との相同性

本研究で得られたイヌ *UCP3* 遺伝子翻訳領域および 5'UTR 配列と他動物種オーソログの相同性を解析した。まず、翻訳領域 (936 bp) についてヒト、ウシ、マウス、ラットの 4 種と比較したところ、アミノ酸レベルでヒトと 91.7%、ウシと 91.6%、ラットと 88.1%、マウスと 87.8%一致し、相同性が高いことが確認された (表 4)。

表 4. 今回単離したイヌ *UCP3* 遺伝子 cDNA と他動物オーソログとの配列比較

<i>UCP3</i>	ORF(アミノ酸配列)	5'UTR	Accession No.
イヌ	99.7%	-	BAA90458
ヒト	91.7%	74.6% [355bp]	NM003356
ウシ	91.6%	81.2% [197bp]	NM174210
ラット	88.1%	58.6% [128bp]	NM013167
マウス	87.8%	68.0% [197bp]	NM009464

同様に 5'UTR (365 bp) についても、4 種と比較した。データベース上では、ヒトは 355 bp、ウシは 197 bp、ラットは 128 bp、マウスは 197 bp の 5'UTR 配列が登録されており、本研究で得られたイヌ *UCP3* 遺伝子の 5'UTR 配列は 365 bp であったため、各対象動物の塩基配列数を基準にして相同性を解析した。その結果、ヒトと 74.6%、ウシと 81.2%、マウスと 68%、ラットと 58.6%一致していた (表 4)。

2.3. エクソン-イントロン構造

イヌ *UCP3* 遺伝子のエクソン-イントロン構造は、5'UTR を増幅し得られた配列がゲノム上では2つのブロックにわかれていたことから、非翻訳領域として Exon 1、Exon 2が存在し、開始コドンは Exon 2 に位置していることが予想された。翻訳領域についても5'UTR 同様に、cDNA 配列とゲノム配列を比較し、GT-AG 則を確認してエクソン-イントロン構造を同定した (図7)。イヌ *UCP3* 遺伝子の予想されるエクソン-イントロン境界配列は表5に示した。

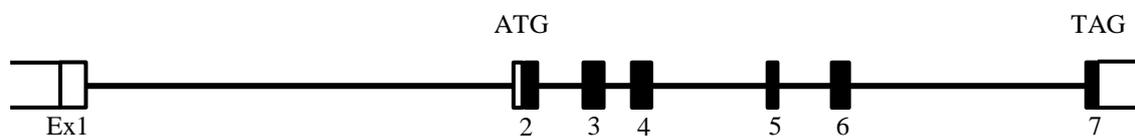


図7. イヌ *UCP3* 遺伝子の予想される構造

□ : 非翻訳領域 ■ : 翻訳領域 — : Intron
— : 約 500 bp

表 5. 予想されるイヌ *UCP3* 遺伝子のエクソン-イントロン境界領域の配列
 下線は GT-AG 則に合致

Exon	3' Intron	Exon	5' Intron
1 (270 bp)	-----5'UTR-----	AACCAGATCT.... TGA CTCACAG	<u>g</u> taagacccattctccacc (4435 bp)
2 (221 bp)	ctcggcctgtctctc gag	CCTCCTCCCT.... TCGCCTGCAG	<u>g</u> taggtgcttttgacaagg (492 bp)
3 (211 bp)	tctgctgggatgttctc ag	ATCCAGGGGG.... GGATCAGACC	<u>g</u> tgagtgcctggtatcctgt (289 bp)
4 (201 bp)	ctcttttctctctc ag	ACTCCAGCAT.... CTATGGAAAG	<u>g</u> taggcctggactcgaggct (1193 bp)
5 (102 bp)	ccgactccatcctt taacag	GAAC TT TGCC.... CTGCTCACTG	<u>g</u> tgaggcctgggctccagg (561 bp)
6 (181 bp)	tccttctccctgct acag	ACAAT T TCCC.... TCTATAAGGG	<u>g</u> taaggctccctctctgca (2468 bp)
7 (115 bp)	ttggtgttctctca acag	ATTACACCA.... TCCATTCTGA	-----3'UTR-----

2.4. イヌ *UCP3* mRNA アイソフォームの構造

イヌ *UCP3* 遺伝子翻訳領域増幅用のプライマーセット (UCP3-Forward / UCP3-Reverse) を使用して RT-PCR 反応を行ったところ、予想される約 980 bp のバンド以外に、約 700 bp のバンドが増幅された (図 5B)。このフラグメントの塩基配列を解析したところ、イヌ *UCP3* 遺伝子翻訳領域 full length に対して、Exon 3 に相当する 211 bp が欠損しているスプライシングアイソフォームであった (図 8)。

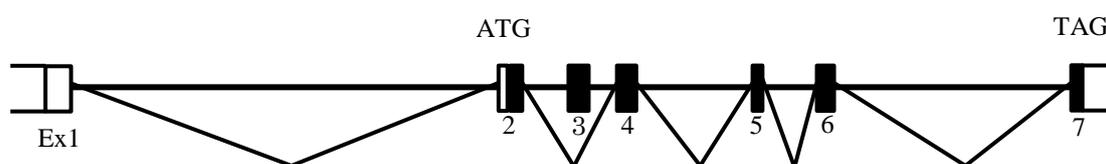


図 8. イヌ *UCP3* mRNA アイソフォームの予想される遺伝子構造

□ : 非翻訳領域 ■ : 翻訳領域 — : Intron
— : 約 500 bp

アミノ酸配列は、Exon 3 のスキッピングによりフレームシフトが生じ、早期にストップコドンが生じるため、推定されるアミノ酸は 69 残基であった (図 9)。配列は GenBank Accession No. AB611706 に登録した。

→ Exon 2

atggttgactaaagccttcagaggtaccccctaccacagctgtgaaattcctggggcaggcaca 66

M V G L K P S E V P P T T A V K F L G A G T 22

gcagcctgttttctgatctcctcacctttccactggacacagccaaggttcgcctgcagpctcca Exon 4 132

A A C F A D L L T F P L D T A K V R L Q T P 44

gcatcactacgcgattttggcaggctgcaccacaggagccatggcagtatcatgtgccagocca 198

A S L R G F W Q A A P Q E P W Q Y H V P S P 66

cagatgtggtgaaggtccgatttcaggccagcatcaccttggggcggggagcaacaggaagtaca 264

Q M W * Exon 5 69

gtgggacaatggatgcctacaggaccatcgcagggaagaaggggtcagggcctatggaaggaa 330

ctttgcccaacatcacaaggaatgccatcgtcaactgtgctgagatggtgacctatgacatcatca 396

aggagaagctgctagactatcatctgctcactgacaatttcccctgccactttatttctgcctttg Exon 6 462

gagccggtttctgtgccacagtggcctccccagtggtatggtgaagaccgggtacatgaact 528

cgccccagccaataactgcagccccctggactgtatgctgaagatggtgaccaagaggcccca 594

cagccttctataagggatttacaccatcctttttgcgtttgggaacctggaatgtggtgatgtttg Exon 7 660

tgacctatgagcagctgaaacggccttgatgaaagtccagatgctacgggaatctccattctga 725

図 9. 今回単離したイヌ *UCP3* mRNA アイソフォームの塩基配列と予想される

アミノ酸配列

(GenBank Accession No. AB611706) 上段：ヌクレオチド 下段：アミノ酸

Exon 3 に相当する 211 bp の欠損によりフレームシフトが生じる結果、予想される

アミノ酸は 69 残基となる

3. RT-PCR 法による各組織での mRNA の発現分布

30 種類のイヌ組織 Total RNA より cDNA 合成後、RT-PCR 法による mRNA 発現解析を行った (図 10)。イヌ *UCP2* mRNA は、全ての組織で full length のサイズである約 980 bp のバンドが検出された。比較的濃いバンドとして増幅された組織は舌、十二指腸、空腸、回腸であり、皮膚、脂肪、肝臓、肺、目などではバンドは薄かった。イヌ *UCP3* mRNA においては、比較的濃いバンドとして増幅された組織は、筋肉、舌、十二指腸、空腸、回腸、横隔膜、心臓であった。full length のサイズのバンドが確認できなかった組織は、脂肪、大脳皮質、肝臓、副腎、骨髄であるが、他の複数の組織においてもとてもバンドが薄かった。また、イヌ *UCP3* mRNA アイソフォームのサイズである約 700 bp のバンドも full length 同様の発現分布を示し、筋肉、舌、横隔膜で特に濃いバンドであった。なお、本研究で用いた RT-PCR 法による解析では各組織間でバンドの濃さに違いが認められたが、それが mRNA の発現量の違いを示しているというためにはリアルタイム PCR など定量的解析が今後必要である。この他に 250 bp、600 bp の増幅産物が確認されたが、塩基配列を解析した結果いずれも *UCP* 遺伝子ではなかった。

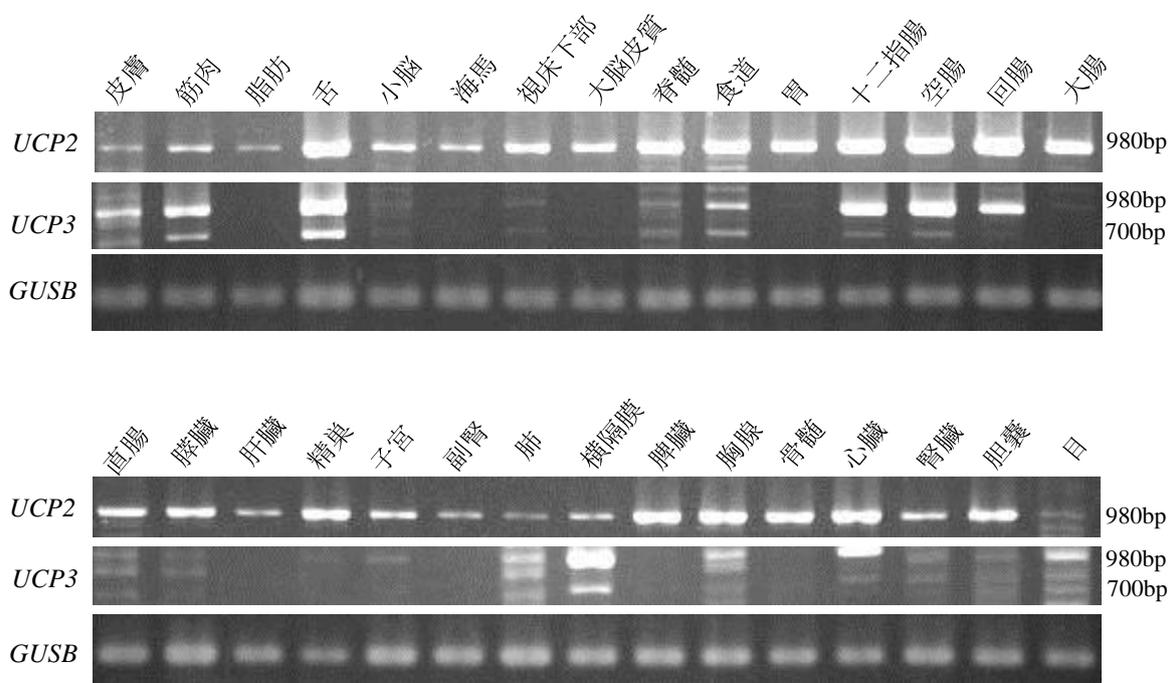


図 10. 30 種類の組織における mRNA 発現分布

考察

1. イヌ *UCP2* および *UCP3* 遺伝子の cDNA 単離

本研究によりイヌ *UCP2*、*UCP3* 遺伝子の部分的非翻訳領域および翻訳領域の塩基配列が決定された。翻訳領域配列は既に石岡らが報告しているが (石岡ら, 2000)、本研究におけるリシーケンスの結果、*UCP2* 遺伝子において T190G→Cys64Gly、*UCP3* 遺伝子において A543T→Thr181Thr、G660T→Leu220Phe の一塩基置換が検出された。この3ヶ所の塩基についてイヌゲノム DNA 12 検体で確認したところ、全ての検体において今回検出した塩基と同一であった。また、NCBI に登録されているイヌゲノム配列 (NC_006603) も、当該塩基配列は本研究で同定した塩基配列であった。以上のことから、本研究で同定した翻訳領域の塩基配列およびアミノ酸配列は、イヌ *UCP2* および *UCP3* 遺伝子のメジャータイプであることが示唆された。

イヌ *UCP2* 遺伝子で検出された *UCP2* G190A がコードするアミノ酸は、1 本目の α ヘリックスドメイン後のミトコンドリアマトリックス内の部分に位置し (図 11)、この一塩基置換によりアミノ酸は Cys (極性・中性) から Gly (非極性・疎水性) に変化する。アミノ酸の極性変化による機能への影響等は今後解析する必要があると考える。なお、ヒト *UCP2* 遺伝子の当該アミノ酸は Gly である。

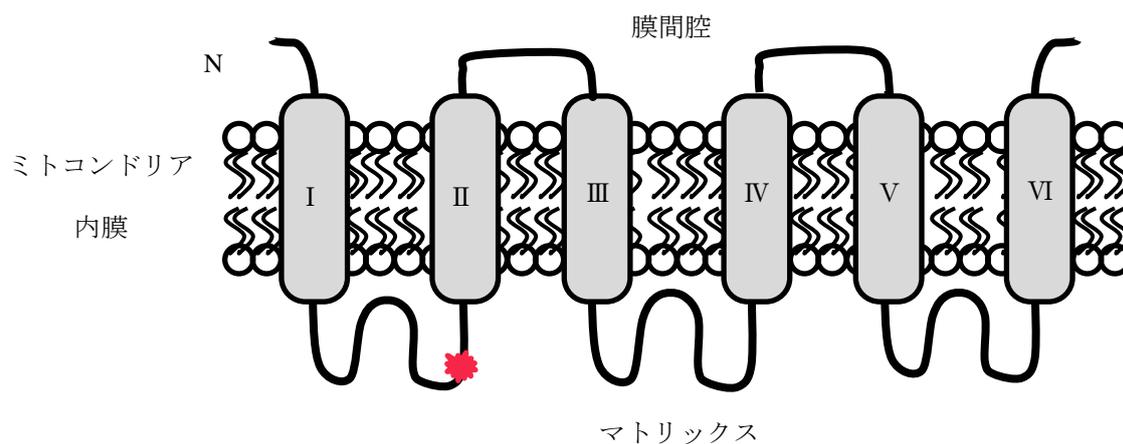


図 11. 既報イヌ *UCP2* cDNA 配列と今回単離したイヌ *UCP2* cDNA 配列を比較した結果、配列の異なっていた部位 (赤)

イヌ *UCP3* 遺伝子で検出された *UCP3* A543T→Thr181Thr がコードするアミノ酸は 4 本目の α ヘリックスドメイン後のミトコンドリアマトリックス内に位置するが、この一塩基置換はアミノ酸変化を伴わない。*UCP3* G660T がコードするアミノ酸は 5 本目の α ヘリックスドメイン部分であり (図 12)、アミノ酸は Leu (非極性・疎水性) から Phe (非極性・疎水性) への変化を伴うがアミノ酸の極性が変わらないため、タンパクの立体構造等にはあまり影響しないと考えられた。なお、ヒト *UCP3* 遺伝子の当該アミノ酸は Phe である。

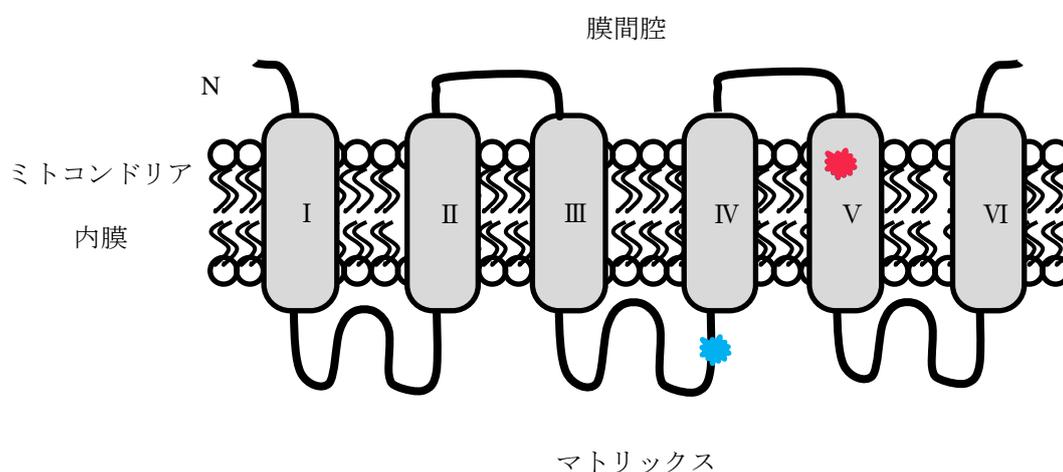


図 12. 既報イヌ *UCP3* cDNA 配列と今回単離したイヌ *UCP3* cDNA 配列を比較した結果、配列の異なっていた部位
マトリックス内の変異 (青) はアミノ酸変化を生じず、5 本目の α ヘリックスドメイン部分の変異 (赤) はアミノ酸変化を生じた

他動物種オーソログとの相同性は、翻訳領域については石岡らの報告と同様の結果となり、*UCP2*、*UCP3* 遺伝子どちらも高い相同性が確認された。5'UTR については、*UCP3* 遺伝子より *UCP2* 遺伝子の方が相同性が高く翻訳領域と同じ傾向であった。

イヌ *UCP3* 遺伝子のスプライシングアイソフォームは本研究により初めて明らかになった。ヒトにおいても *UCP3* 遺伝子のスプライシングアイソフォームが報告されており (Solanes et al., 1997)、full length をロングタイプ、スプライシングアイソフォームがショートタイプと言われている。このショートタイプは Exon 6 直後の Intron 6 の配列 gtga の tga が終止コドンとなり、それ以降のロングタイプでは Intron 6 にあたる配列が 3'非翻訳領域になっている。ロングタイプが 312 個のアミノ酸をコードしているのに対し、ショートタイプは推定上 275 個のアミノ酸をコードしているが、*UCP3* mRNA ロングタイプや *UCP1* mRNA、*UCP2* mRNA に存在するカルボキシ末端を含んでいない。この領域は脱共役活性において重要な意味を持つと予測されているので、*UCP3* mRNA ショートタイプの活性は、他の UCPs とは著しく異なる可能性が示唆されている。*UCP3* mRNA ショートタイプについて様々な研究が行われているが、その一つに健常者は *UCP3* mRNA ロングタイプとショートタイプの発現量が同程度であるのに対し、糖尿病患者の骨格筋において、*UCP3* mRNA ショートタイプがロングタイプの 2 倍発現していることが報告されている (Vidal et al., 1999)。このことから何らかの機能が考えられるが、詳細については解明されていない。

本研究で見出されたイヌ *UCP3* mRNA アイソフォームは、推定アミノ酸数が 69 個であるため、カルボキシ末端を含んでいないことに加え膜貫通構造をとらないと推定されるので、機能を持たないことが示唆されたが、タンパク質の機能への影響を解析する必要があると考える。

2. RT-PCR 法による mRNA 発現解析

イヌ *UCP2* および *UCP3* mRNA の 30 種類の組織での mRNA 発現の有無を RT-PCR 法により定性的に検討した。その結果、*UCP2* mRNA、*UCP3* mRNA ともバンドの濃さに差があるものの多くの組織で標的遺伝子の cDNA が増幅され、ユビキタスな発現が認められた。*UCP2* mRNA に関しては、既に報告されているイヌの 12 種類の組織でのノーザンブロット法による解析 (石岡ら, 2000) や、ヒトの *UCP2* mRNA の発現

に関する報告 (Vidal-Puig et al., 1997) と同様の結果であった。イヌ *UCP2* mRNA のノーザンブロット解析により、白色脂肪組織、脾臓、肺において特に強い発現が確認されている (石岡ら, 2000) が、本研究では、脾臓と肺では同様に強い発現が認められ、脂肪ではバンドが確認されたが他臓器と比較してバンドは薄かった。本解析に用いた脂肪組織の詳細は購入品のため不明である。

UCP3 mRNA は *UCP2* mRNA と比較して、組織間でバンドの濃さの差が顕著であった。先に紹介したノーザンブロット解析では、*UCP3* mRNA はヒトやげっ歯類と同様に、骨格筋と心臓で特異的に発現が報告されている。本研究でも同様に、骨格筋や心臓で強い発現が確認された他、これまで調べられていなかった十二指腸、空腸、回腸、舌、横隔膜でも強い発現が認められた。舌、食道、横隔膜はいずれも横紋筋よりなり、これまでの報告から予想される結果であった。*UCP2*、*UCP3* mRNA の塩基配列は相同性が非常に高いが、今回の解析結果は、同一の組織において *UCP2* 遺伝子と *UCP3* 遺伝子で発現の強さが異なっていること、*UCP3* mRNA では約 700 bp のアイソフォームも確認されていることから、それぞれ目的の領域を増幅していると考えられた。*UCP3* mRNA スプライシングアイソフォームのバンドの濃さは full length のバンドの濃さと平行であった。

本章の各組織における標的遺伝子の発現解析は定性的なものであり、各組織および遺伝子間の mRNA 発現について傾向を示唆してはいるが限定的な結果である。今後、リアルタイム PCR 法による定量的解析、また蛋白レベルでの発現解析を行う事によって mRNA の組織分布を詳細にする必要があると考える。また、UCP は各ファミリーによって、あるいは組織によって生理的・病理的条件に対する応答が一樣ではないので (入江ら, 1999)、脂肪酸や糖など、個々のエネルギー基質の代謝や細胞特異的な機能と関係づけながら今後より詳細に検討することも必要である。

本章では、まずイヌ *UCP2* および *UCP3* 遺伝子の cDNA 配列、エクソン-イントロン構造を明らかにした。さらに mRNA 発現解析結果と合わせてヒトの遺伝子構造と極めて類似した結果を得た。イヌ *UCP2* および *UCP3* 遺伝子はヒトで報告されている機能と同様にエネルギー代謝や脂質代謝へ寄与していることが予測された。

小括

本章においてイヌ *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イヌ *UCP2*、*UCP3* 遺伝子のエクソン-イントロン構造を明らかにした。決定した翻訳領域の予想される塩基配列は、イヌ *UCP2* 遺伝子で1ヶ所 (T190G)、イヌ *UCP3* 遺伝子において2ヶ所 (A543T, G660T) が既報の配列と異なっており、*UCP2* 遺伝子の T190G および *UCP3* 遺伝子の G660T はアミノ酸置換も伴っていたが、その他の配列は一致した。また本解析で新規に同定した 5'UTR の塩基配列はゲノム上の配列と完全に一致し、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。イヌゲノム情報と比較してエクソン-イントロン構造を決定したところ、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* mRNA はユビキタス、*UCP3* mRNA は骨格筋や心臓で発現が強い傾向にあり、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。本章における解析結果より、イヌ *UCP2*、*UCP3* 遺伝子は既に報告されている通り、ヒト *UCP2*、*UCP3* 遺伝子と類似した機能を持つことが示唆された。

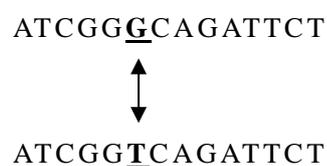
第 2 章

イヌ *UCP2* および *UCP3* 遺伝子領域の DNA 多型探索

緒言

DNA 多型とは、集団において 1%以上の頻度で見られる個体レベルのゲノム配列の違いであり、個体差を遺伝的要因の面から規定している。最も多く存在する DNA 多型は一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) である (図 13)。SNP はその名の通り、一塩基が別の塩基に変わるもので、塩基がプリン基 (A, G) からプリン基またはピリミジン基 (C, T) からピリミジン基への置換をトランジション、プリン基からピリミジン基あるいはその逆の置換をトランスバージョンという。SNP の他にも挿入欠失多型 (Insertion Deletion: Indel) がある。Indel は、一塩基あるいは数塩基の挿入または欠失である。

(A) Single Nucleotide Polymorphism: SNP



(B) Insertion Deletion: Indel

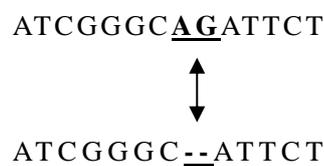


図 13. 一塩基多型 (SNP) と挿入欠失多型 (Indel) の例

多型は生じている場所により大きく 4 つに分類される。特に SNP は場所により名称が付けられているため、ここでは SNP を例にあげてみる。一つ目はプロモーター領域にある r (regulatory) SNP、二つ目はイントロンにある i (intron) SNP、三つ目は遺伝子外領域にある g (genomic) SNP、四つ目は翻訳領域にある SNP であり、翻訳領域の SNP はさらに、アミノ酸置換を伴う c (coding) SNP とアミノ酸置換を伴わない s (silent) SNP の 2 つに分類される (図 14) (三木, 2000)。

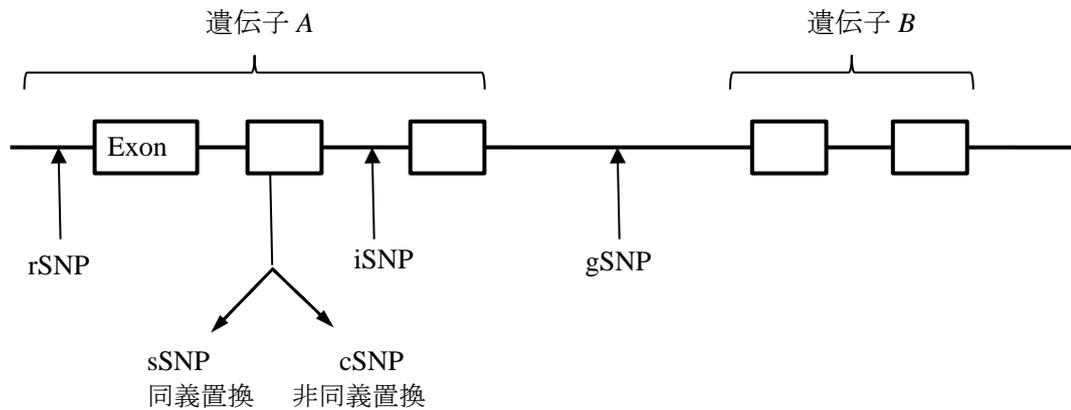


図 14. SNP の種類 (三木, 2000 より引用一部改編)

このように分類されているのは、生じている場所により機能への影響が異なるからである。影響が大きいとされているのは、アミノ酸置換による蛋白質構造の変化をもたらす翻訳領域の多型や、発現量の変化をもたらすプロモーター領域の多型である。一方、スプライシングサイトではないイントロン領域や遺伝子間領域の多型は表現型に影響しないといわれている。しかし、表現型に関連している多型と連鎖不平衡の関係にある場合はマーカーとして利用されている。Indel も同様で、翻訳領域に位置している場合、塩基の挿入または欠失によりコドンの読み枠が変更される。Indel 以降の全てのアミノ酸配列に影響するため、全く異なるアミノ酸配列となるほか早期に終止コドンが現れる場合もある。例えばイヌでは、ミオスタチン遺伝子の Exon 3 の 2 塩基の欠失によるフレームシフト変異が、ドッグレースの主要な品種であるウィペットにおいて知られている。欠失が生じると骨格筋の過形成が起こり、野生アリルと変異アリルのヘテロタイプを有する個体は、野生アリルホモ個体よりも筋肉が豊富で有意に早く走ると報告されている (Mosher et al., 2007)。

現在、ヒト *UCP2* 遺伝子は 392 ヶ所、*UCP3* 遺伝子は 403 ヶ所の DNA 変異部位が NCBI に登録されている。多くの集団や民族でこれらの多型と表現型との関連解析が行われており、肥満や糖尿病、脂質代謝との関連が報告されている (Kagawa et al., 2002;

Reis et al., 2004; Bulotta et al., 2005; Park et al., 2005; Cha et al., 2007; Yoon et al., 2007; Hamada et al., 2008; Kosuge et al., 2008; Lee et al., 2008; Oktavianthi et al., 2012)。

イヌにおいても *UCP2* 遺伝子領域に 2 ヶ所、*UCP3* 遺伝子領域に 6 ヶ所の多型が NCBI に登録されているほか、近年 GWAS 解析が行われていることから、いくつかの多型が報告されている (Lindblad-Toh et al., 2005)。ところがこれらの遺伝子に焦点を置いた研究はこれまで報告されていなく、表現型との関係は明らかにされていない。

そこで本章では、第 1 章で決定したイヌ *UCP2*、*UCP3* 遺伝子の配列および構造、また発現分布からイヌもヒトと類似した機能を持つことが示唆されたため、イヌ *UCP2*、*UCP3* 遺伝子のエクソンおよびその周辺領域における DNA 多型探索を行った。

材料および方法

1. 解析サンプル

本学科獣医保健看護学基礎部門比較遺伝学研究分野にて保管されている、11 犬種計 119 検体のイヌゲノム DNA を使用した (表 6)。

犬種は、ジャパンケネルクラブ (JKC) が形態や用途により分類している 10 グループ (国際畜犬連盟の 10 グループと同じ) から、各グループ最低 1 犬種を選択した。各グループの定義は次のようになっている。第 1 グループ<牧羊犬>：牧畜犬、家畜の群れを誘導・保護する犬、第 2 グループ<使役犬>：番犬・警護・作業をする犬、第 3 グループ<テリア>：穴の中に住むキツネなど小型獣用の猟犬、第 4 グループ<ダックスフンド>：地面の穴の中に住むアナグマや兎用の猟犬、第 5 グループ<原始的な犬・スピッツ>：日本犬を含む、スピッツ (尖ったの意) 系の犬、第 6 グループ<嗅覚ハウンド>：大きな吠声と優れた嗅覚で獲物を追う獣猟犬、第 7 グループ<ポインター・セター>：獲物を探し出し、その位置を静かに示す猟犬、第 8 グループ<7 グループ以外の鳥猟犬>：7 グループ以外の鳥猟犬、第 9 グループ<愛玩犬>：家庭犬、伴侶や愛玩目的の犬、第 10 グループ<視覚ハウンド>：優れた視力と走力で獲物を追跡捕獲する犬 (JKC HP より)。本章では、ウェルシュ・コーギー、ドーベルマン、ヨークシャー・テリア、ミニチュア・ダックスフンド、ビーグル、ワイマラナー、パピヨン、ウィペットの 8 犬種は各 1 検体、ラブラドル・レトリバーは 51 検体、シェットランド・シープドッグ (シェルティール)、柴犬の 2 犬種は各 30 検体を使用した。

シェルティー、柴犬およびラブラドル・レトリバーの3犬種は第3章以降の実験でも使用したため解析個体数が多い。

表 6. 解析サンプル一覧

犬種	JKC GP	サンプル数			Lab ID
		雄	雌	合計	
WC	1G	1	0	1	5894
D	2G	0	1	1	1968
Y	3G	1	0	1	4628
MD	4G	0	1	1	5815
B	6G	0	1	1	5102
Wi	7G	0	1	1	4944
P	9G	0	1	1	8036
Wh	10G	0	1	1	6300
LR	8G	28	23	51	6364 , KGD49, KGD50, KGD51, KGD61, KGD71, KGD72, KGD73, KGD76, KGD88, KGD90, KGD94, KGD96, KGD47, KGD52, KGD53, KGD55, KGD56, KGD57, KGD59, KGD60, KGD62, KGD63, KGD65, KGD68, KGD69, KGD70, KGD75, KGD77, KGD78, KGD80, KGD81, KGD82, KGD83, KGD84, KGD85, KGD86, KGD87, KGD89, KGD91, KGD95, KGD97, KGD98, KGD99, KGD100, KGD101, KGD103, KGD106, KGD107, KGD109, KGD110
SS	1G	15	15	30	5890 , 5781, 4218, 4826, 1328, 620, 4439, 4069, 4611, 4070, 8219, 6493, 5691, 2836, 4878, 5296, 1617, 6938, 8469, 9199, 8804, 7030, 6881, 7181, 9747, 8749, 8733, 8486, 8395, 7163
S	5G	15	15	30	8577 , 6424, 5990, 5576, 6674, 6782, 7739, 6070, 1904, 7717, 8116, 6273, 6268, 4911, 4289, 3357, 5485, 6380, 7540, 8886, 8765, 8622, 8422, 8384, 7353, 7174, 6810, 6239, 5718, 5027

表中略語は以下の通り

WC: ウェルシュ・コーギー、D: ドーベルマン、Y: ヨークシャー・テリア、

MD: ミニチュア・ダックスフンド、B: ビーグル、Wi: ワイマラナー、P: パピヨン、

Wh: ウィペット、LR: ラブラドル・レトリバー、SS: シェットランド・シープドッグ、

S: 柴犬、KGD: 九州盲導犬協会所属犬

※太字はスクリーニング検体

2. ゲノム DNA 抽出

イヌ血液からの DNA 抽出は Pure Gene Kit (QIAGEN) を用いて以下の手順で実施した。RBC Lysis solution を 900 μ l 分注してある 1.5 ml チューブに、血液を全量加え数回ピペッティングを行った後、攪拌器でよく攪拌し、室温に 1-10 分間静置し、赤血球膜を溶解した。15,000 rpm 20 秒の遠心後、ペレット以外の上清を除去した。明瞭なペレットが確認できない場合は、RBC Lysis solution 900 μ l を再度加え、よく攪拌した後、15,000 rpm 20 秒の遠心を行った。上清除去後、タッピングによりペレットを解し、Cell Lysis solution を 300 μ l 添加し、ピペッティングで攪拌した。5 分間の氷冷を行った後、Protein precipitation solution を 100 μ l 添加、細胞溶解液と混和して、均質になるようによく攪拌器で攪拌し、15,000 rpm 5 分間の遠心を行った。ついで、イソプロパノール 300 μ l を分注した新しい 1.5 ml チューブに、容器を傾け上清を移し、穏やかに転倒混和を 30 回行った。15,000 rpm 3 分間の遠心後、白い小さなペレットとして目視できる DNA を確認した。容器を傾け上清を捨てた後、70%エタノールを 300 μ l 添加し、リンスした。15,000 rpm 3 分間の遠心を行い、容器を傾け上清を除去後、清潔なキムワイブ上にチューブを逆さに置き、余分なエタノールを除去した。その後、エバポレーターにて 20 分間、減圧乾燥させた。DNA Hydration solution を 30 μ l 添加し、ピペッティング後、65°C 5 分間の加温により DNA の溶解を行った。溶解後、攪拌器で軽く攪拌し、スピンドウンした後 4°C で保存した。抽出した DNA の純度と濃度は、Spectrophotometer ND-1000 (Nano Drop) (LMS) で測定した。

3. PCR 法による標的領域の増幅

NCBI に登録されているイヌのゲノム配列 (NC_006603) に基づき、イヌ *UCP2*, *UCP3* 遺伝子のエクソンおよびその周辺領域を増幅するためのプライマーセットを *UCP2* 遺伝子で 6 組、*UCP3* 遺伝子で 9 組それぞれ設計した (表 7)。

表 7. プライマー配列および増幅領域

遺伝子	フラグメント	プライマー名	プライマー配列(5'-3')	増幅領域 (サイズ)
<i>UCP2</i>	F1	-30F	CAGCTCTCGGCTTGTGAGC	Exon 1
		27308832R	CACAACAGTCAGCAGACTGG	(581 bp)
	F2	27309072F	CCTTGCTGGAGTGTAATCTG	Exon 2
		27309909R	TGGGTTTGCCCAGGTCTTTC	(838 bp)
	F3	27311099F	TACCAACTCTTCCATACCTC	Exon 3
		27312194R	ATGCAGGCAGCTGTGCCAG	(1096 bp)
	F4	27311970F	TGAGCAGGACAGGACTGTT	Exon 3, 4
		27312729R	AAAGGAGCTATACAGCAAATCA	(759 bp)
	F5	27313176F	TCTCAGAGCATTACTCTGCT	Exon 5, 6
		27314151R	AGAAAAGGCAGTCAGGACTC	(976 bp)
	F6	27314058F	TCCTCCCCCTCAAACCATCA	Exon 7, 8
		27314967R	GAAAGGGAGGTGGTGGGAA	(910 bp)
<i>UCP3</i>	F7	-600F	ATAGTACTTACCTCATAGGGT	Exon 1
		27282506R	TATCTGTTCTCCATGGCAGC	(1076 bp)
	F8	27281898F	CTAAGGAGCCTTAAGGGAAC	Exon 1
		27282609R	TTCAGGGAGAGCTCAGGATC	(712 bp)
	F9	27285321F	ACGCTACAGGTATGTGTGAG	Intron 1
		27286050R	CCTGAAGTGTACAGAGAGCC	(730 bp)
	F10	27285958F	TAACTAACAGTTTAGGTGAGTC	Exon 2
		27286717R	TGCTCAGAGTTCTGTGTGAAG	(760 bp)
	F11	27287028F	CAGGTCCTTCTGCACCCAG	Exon 3, 4
		27287895R	TCATTCTGGGAGTTCCTCC	(868 bp)
	F12	26321F	CCTGTGGCCTTGCAACCAGA	Exon 5
		26579R	TGTTACCTCTGAGTGGTGCC	(259 bp)
	F13	27289161F	GGCACCCTCAGAGGTAACA	Exon 6
		25629F	TGGGAAGGGATGTTGGATGC	(712 bp)
	F14	25969R	GCACTATCGTTACTCAAGG	Exon 6
25629F		TGGGAAGGGATGTTGGATGC	(341 bp)	
F15	27292072F	TAAGTGCCTAACACAGAACC	Exon 7	
	27292788R	TTCAGCCTTTCCTGTACACA	(717 bp)	

抽出したゲノム DNA および設計したプライマーを用いて PCR 法により標的領域を増幅した。増幅反応には、TaKaRa Ex *Taq*[®]を使用した。試薬の組成は、ゲノム DNA 20 ng、10×Ex *Taq* Buffer (20 mM Tris-HCl、100 mM KCl、0.1 mM EDTA、1 mM DTT、0.5% Tween 20、0.5% Nonidet P-40、50% Glycerol、20 mM Mg²⁺) 2.5μl、プライマー(F、R) 各 0.4 mM、dNTP (dATP、dTTP、dCTP、dGTP) 200 μM、Ex *Taq* (TaKaRa) 1U に滅菌水を加えて 25μl に調整した。Ex *Taq* で増幅が悪かったフラグメントは FastStart *Taq* DNA Polymerase, dNTPack (Roche) を使用した。その組成は以下の通りである。ゲノム DNA 20 ng、10×reaction Buffer (500 mM Tris-HCl、100 mM KCl、50 mM (NH₄)₂ SO₄、20 mM MgCl₂) 2.5μl、プライマー (F、R) 各 0.4 mM (F12 のみ各 0.2 mM)、dNTP (dATP、dTTP、dCTP、dGTP) 200 μM、FastStart *Taq* DNA polymerase 1U に滅菌水を加えて 25 μl に調整した。各フラグメントの PCR 条件は表 8 に示した。アニーリングの温度および時間がフラグメントごとに異なるのは、シングルバンドを得るために適した条件が異なったためである。PCR 反応には TaKaRa PCR Thermal Cycler TP600 (TaKaRa) を使用した。

まずスクリーニングとして 11 検体 (表 6 太字個体) を用いて、全フラグメントの塩基配列を決定し、多型を同定した。その後、残りの検体はスクリーニングで同定された多型の型判定を目的とし、多型が同定されたフラグメントのみ塩基配列を決定した。従って、フラグメント F4、F10、F12 の 3 領域については解析を行わなかった。スクリーニング検体ではない個体において新たに同定された多型はスクリーニング個体でも再度多型の確認を行った。

表 8. 各フラグメントの PCR 条件

フラグメント	<i>Taq</i> ^a	熱変性 (°C/m) ^b	初期変性 (°C/m) ^b	Annealing (°C/s) ^b	伸長 (°C/m) ^b	サイクル	最終伸長 (°C/m) ^b
F1	F	95 / 4	95 / 1	57 / 30	72 / 1	35	72 / 7
F2	E	95 / 1	95 / 1	60 / 30	72 / 1	35	72 / 7
F3	F	95 / 4	95 / 1	60 / 10	72 / 1	30	72 / 7
F4	E	95 / 1	95 / 1	60 / 30	72 / 1	35	72 / 7
F5	F	95 / 4	95 / 1	60 / 30	72 / 1	35	72 / 7
F6	E	95 / 1	95 / 1	62 / 30	72 / 1	35	72 / 7
F7	E	95 / 1	95 / 1	60 / 15	72 / 1	34	72 / 7
F8	F	95 / 4	95 / 1	62 / 30	72 / 1	35	72 / 7
F9	F	95 / 4	95 / 1	62 / 30	72 / 1	35	72 / 7
F10	E	95 / 1	95 / 1	60 / 30	72 / 1	35	72 / 7
F11	F	95 / 4	95 / 1	62 / 15	72 / 1	32	72 / 7
F12	E	95 / 1	95 / 1	60 / 30	72 / 1	35	72 / 7
F13	E	95 / 1	95 / 1	60 / 30	72 / 1	35	72 / 7
F14	E	95 / 1	95 / 1	60 / 30	72 / 1	35	72 / 7
F15	E	95 / 1	95 / 1	60 / 30	72 / 1	35	72 / 7

a. *Taq* polymerase: E=Ex*Taq* (TaKaRa) F=FastStart *Taq* (Roche)

b. m : minutes s : seconds

4. 塩基配列の決定

得られた PCR 産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定した。PCR 産物の精製、サイクルシーケンス反応は第 1 章と同様の手順で行った。1.1. (4)および 1.3.参照。

5. DNA 多型の探索

決定した塩基配列について、BLAST および Genetyx Ver.11 (ゼネティックス) を使用してリファレンス配列と比較した。リファレンス配列は NCBI に登録されているボクサー犬の配列 (NC_006603.3) を使用した。ヘテロ型の波形については、目視で解析を行った。

結果

1. 本研究における多型の定義

本研究ではダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) や挿入欠失多型 (Insertion Deletion: Indel) の探索を行った。リファレンス配列は NCBI に登録されているボクサー犬の配列 (NC_006603.3) とし、この配列と異なる場合に多型であるとした。判定基準は、1. forward と reverse の両側から読み、同じ配列であること、2. ヘテロの場合はピークの高さがメインピーク高の 50% 以上であり、かつバックグラウンドがきれいであること、3. 周辺配列の都合上、forward と reverse の両側から読むことのできなかつた多型は、野生アレルホモ個体があること、複数個体でヘテロ型が見られること、以上 3 点を基本として判定した。

2. イヌ *UCP2* 遺伝子領域で同定された DNA 多型の特徴

同定された多型の位置表記は次のようにした。多型がエクソンに位置していた場合は、開始コドン (ATG) の A を +1 と数えた。イントロンに位置していた場合は、イントロン番号の後に最も近いエクソンからのアレル数を示し、プラスは多型が位置するイントロンより上流のエクソン、マイナスは下流のエクソンから数えたことを示す (例: IVS6-108C/T は、Intron 6 に位置し、Exon 7 から上流 108 アレル)。なおアレルの表記は、リファレンス配列のアレル (野生アレル) / 同定された変異アレルとした。挿入欠失 (Indel) 多型の場合は、変異アレルを示した (例: IVS7-187insA は、Intron 7 に位置し、Exon 8 から上流 187 アレルの位置に A が挿入)。イヌ *UCP2* 遺伝子領域では合計 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)、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)、1 Indel (IVS6-133delTCTCCCC)、Intron 7 に 1 SNP (IVS7-106C/T)、2 Indel (IVS7-187insA、IVS7-152delA)であった (表 9、図 15)。本研究では、まず始めに 11 検体のスクリーニングで多型を同定した。その他の検体は同定された多型の型判定を目的に、多型が同定されているフラグメントに限り塩基配列を決定したが、IVS-152delA はスクリーニングの 11 検体では検出されず、その後に解析したラブラドル・レトリバーで検出さ

れた。

本解析において、-2951delTTCA、-2913A/G、-916C/T、IVS6-108C/T、IVS7-187insA は変異アリル頻度が野生アリル頻度よりも高かった (表 10)。野生アリル頻度はいずれも 0.24 であり、-2951del TTCA、-2913A/G、IVS6-108C/T、IVS7-187insA は連鎖不平衡であった。なお、本解析検体では翻訳領域の多型は同定されなかった。多型座位のシーケンス波形は図 16 に示した。

表 9. イヌ *UCP2* 遺伝子領域で同定された DNA 多型

DNA 多型 ^a	場所	CGD ^b	塩基置換 ^c
-3629C/G	Intron 1	24304705	TTTCCTCT[C/G]TGTCCTCT
-3621T/C	Intron 1	24304713	CTGTCCTC[T/C]GTCTTTTC
-2951delTTCA	Intron 1	24305383 ^d	CTGTTGGC[TTCA/----]TTCAGCTC
-2931A/T	Intron 1	24305403	AGGTCATG[A/T]TCTGGGGATG
-2913A/G	Intron 1	24305421	ATGATAGTGG[A/G]ATCCAGCT
-2613A/C	Exon 2	24305721	AGACCTTA[A/C]AAAGCCGG
-916C/T	Intron 2	24307418	TGCCCATC[C/T]CCGTGCCA
-748G/A	Intron 2	24307586	CCGGGATC[G/A]TGTTCGGC
-636A/G	Intron 2	24307698	AAAAAATG[A/G]CTTGCGAG
IVS6-133delTCTCCCC	Intron 6	24310250 ^d	CTCTCCCC[TCTCCCC/-----]CTCCCCCT
IVS6-108C/T	Intron 6	24310275	CCGCCTGT[C/T]CTCCCCCT
IVS7-187insA	Intron 7	24310762-63	TTAAAATA[-/A]GAGACTCA
IVS7-152delA	Intron 7	24310798	GCTACACA[A/-]CTGTGGAG
IVS7-106C/T	Intron 7	24310844	TGTGACAG[C/T]AGCTGGGT

a. 翻訳開始点または最も近いエクソンからの位置。IVS: intervening sequence

b. CGD: Canine Genome Draft. NC_006603.3 をリファレンス配列とした

c. 左側がリファレンスアリル (野生アリル)

d. 挿入欠失多型が生じる最初の位置

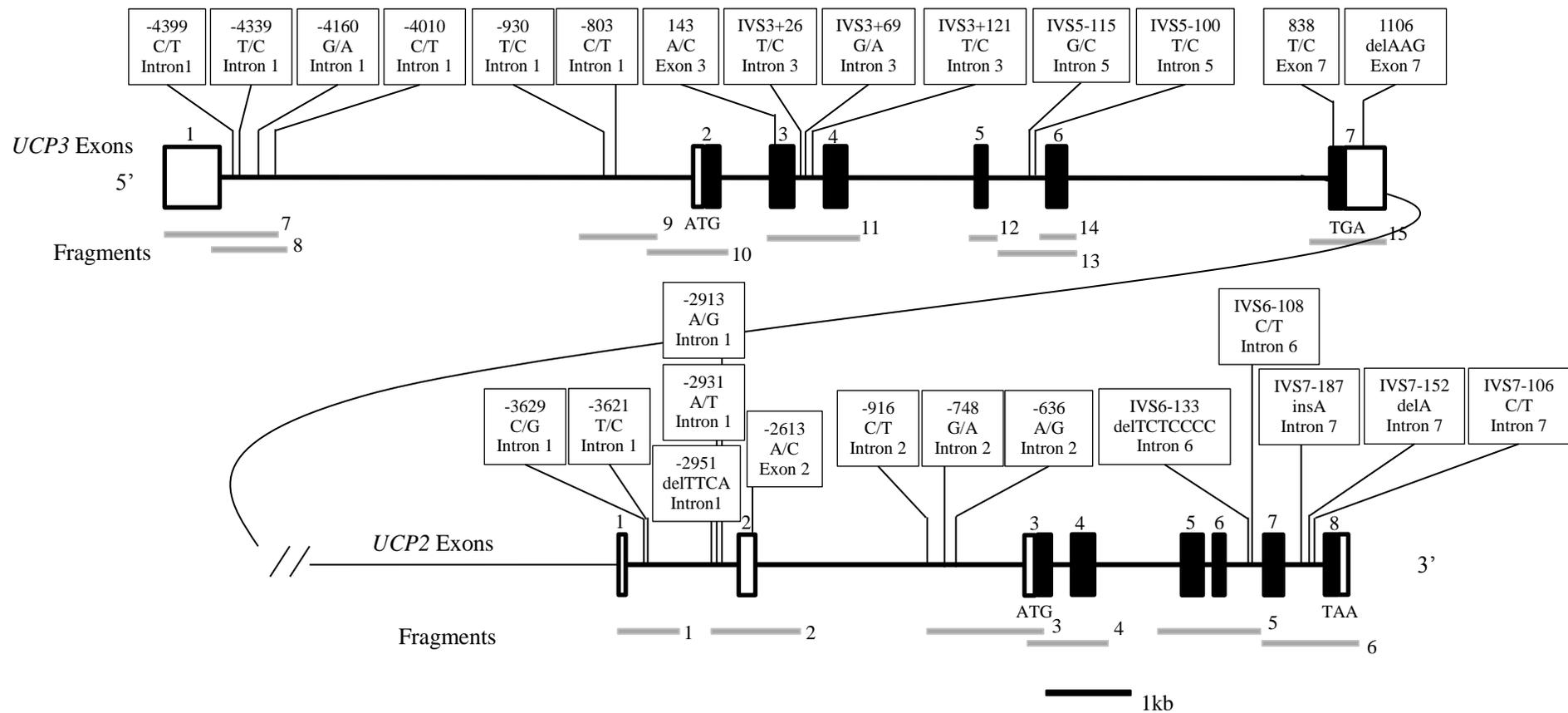


図 15. イヌ *UCP2*、*UCP3* 遺伝子の構造と同定された多型一覧

□: Exon (UTR) ■: Exon (CDS) — : Intron | : SNP or Indel — : PCR Fragment

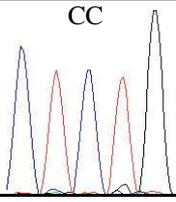
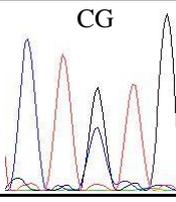
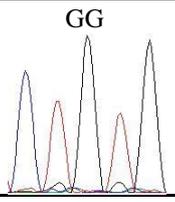
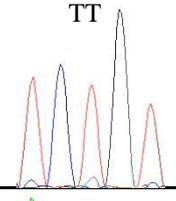
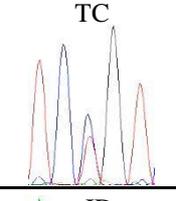
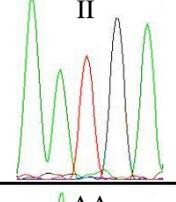
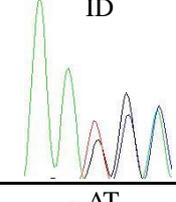
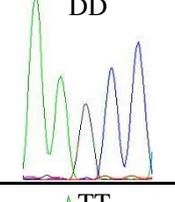
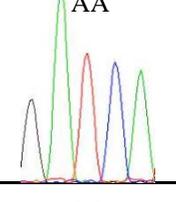
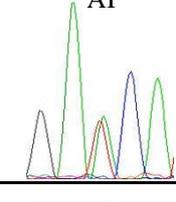
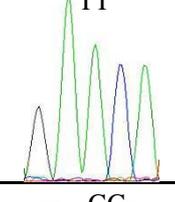
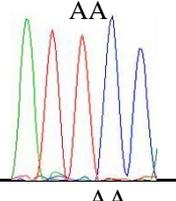
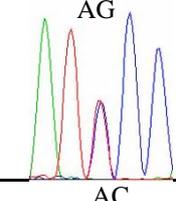
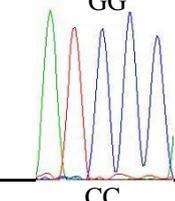
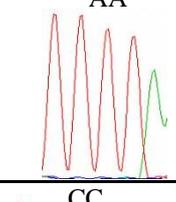
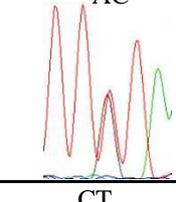
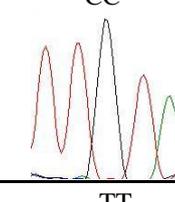
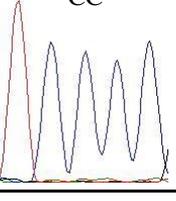
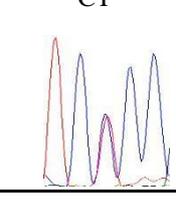
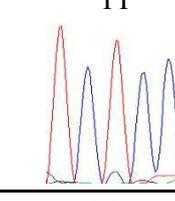
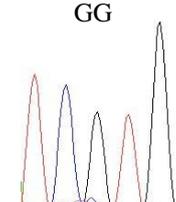
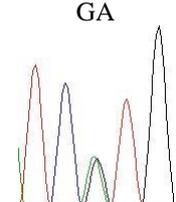
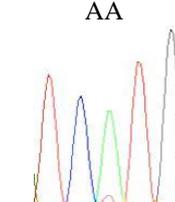
座位	野生アリルホモ型	ヘテロ型	変異アリルホモ型
-3629 C/G	CC 	CG 	GG 
-3621 T/C	TT 	TC 	CC 検出されず
*-2951 delTTCA	II 	ID 	DD 
*-2931 A/T	AA 	AT 	TT 
*-2913 A/G	AA 	AG 	GG 
*-2613 A/C	AA 	AC 	CC 
-916 C/T	CC 	CT 	TT 
-748 G/A	GG 	GA 	AA 

図 16. イヌ *UCP2* 遺伝子領域で同定された多型の波形 (1)

*の波形はリバース

座位	野生アリルホモ型	ヘテロ型	変異アリルホモ型
*-636 A/G	AA 	AG 	GG
IVS6-133 delTCTCCCC	II 	ID 	DD
*IVS6-108 C/T	CC 	CT 	TT
*IVS7-187 insA	DD 	DI 	II
*IVS7-152 delA	II 	ID 	DD 検出されず
*IVS7-106 C/T	CC 	CT 	TT 検出されず

図 16. イヌ *UCP2* 遺伝子領域で同定された多型の波形 (2)

*の波形はリバース

表 10. イヌ *UCP2* 遺伝子多型の型判定結果 (1)

DNA 多型	遺伝子型	N	アリル	アリル頻度
-3629C/G	CC	96	C	0.87
	CG	15	G	0.13
	GG	8		
-3621T/C	TT	115	T	0.98
	TC	4	C	0.02
	CC	0		
-2951delTTCA	ins ins	73	ins	0.76
	ins del	35	del	0.24
	del del	11		
-2931A/T	AA	102	A	0.91
	AT	13	T	0.09
	TT	4		
-2913A/G	AA	11	A	0.24
	AG	35	G	0.76
	GG	73		
-2613A/C	AA	11	A	0.24
	AC	35	C	0.76
	CC	73		
-916C/T	CC	11	C	0.24
	CT	36	T	0.76
	TT	72		
-748G/A	GG	99	G	0.91
	GA	19	A	0.09
	AA	1		
-636A/G	AA	99	A	0.91
	AG	19	G	0.09
	GG	1		

表 10. イヌ *UCP2* 遺伝子多型の型判定結果 (2)

DNA 多型	遺伝子型	N	アリル	アリル頻度
IVS6-133del TCTCCCC	ins ins	92	ins	0.85
	ins del	19	del	0.15
IVS6-108C/T	del del	8		
	CC	11	C	0.24
	CT	35	T	0.76
IVS7-187insA	TT	73		
	del del	11	del	0.24
	del ins	35	ins	0.76
IVS7-152delA	ins ins	73		
	ins del	3	del	0.01
	del del	0		
IVS7-106C/T	ins ins	116	ins	0.99
	ins del	3	del	0.01
	del del	0		
IVS7-106C/T	CC	114	C	0.98
	CT	5	T	0.02
	TT	0		

3. イヌ *UCP3* 遺伝子領域で同定された DNA 多型の特徴

イヌ *UCP3* 遺伝子領域では合計 14 ヶ所の多型が同定された。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)、1 Indel (1106delAAG) であった (表 11、図 15)。スクリーニング検体以外で同定された多型は 2 個であり、一つは柴犬で同定された 838 T/C、もう一つはラブラドル・レトリバーで同定された -4160G/A であるが、838 T/C はヘテロ型が 2 検体、-4160G/A はヘテロ型が 1 検体検出されたのみであった。

本解析において、-3621T/C、-2913A/G は変異アリル頻度が野生アリル頻度よりも高かった (表 12)。この 2 SNPs は連鎖不平衡の関係であったため、野生アリル頻度はどちらも 0.32 であった。

143 A/C は 143 番目の塩基が A から C へ置換される多型であり、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 cSNP であった。この座位については、解析した 119 検体のうち 109 検体が野生アリルホモ型 (AA) 、9 検体がヘテロ型 (AC) 、1 検体に変異アリルホモ型 (CC) であったが、変異アリル (C) を有していた 10 検体は全て柴犬であった。838 T/C は 838 番目の塩基が T から C へ置換される多型であったが、アミノ酸置換は伴わない sSNP であった。多型座位のシーケンス波形は図 17 に示した。

表 11. イヌ *UCP3* 遺伝子領域で同定された DNA 多型

DNA 多型 ^a	場所	CGD ^b	塩基置換 ^c
-4399C/T	Intron 1	24278297	CCCAGCCG[C/T]GTCAAGAA
-4339T/C	Intron 1	24278357	GTCACACC[T/C]CCACACCT
-4160G/A	Intron 1	24278536	TTTTCTGG[G/A]TAGAGGTG
-4010C/T	Intron 1	24278686	GGGGTCCC[C/T]TGACCCCT
-930T/C	Intron 1	24281766	CTGGGAGA[T/C]GGGGCACC
-803C/T	Intron 1	24281893	AGATCAGC[C/T]GCCACTGC
143A/C	Exon 3	24283330	GGAGAACC[A/C]GGCGACAC
IVS3+26T/C	Intron 3	24283550	TGTAGACA[T/C]CGAGGGGG
IVS3+69G/A	Intron 3	24283593	AGATCAGA[G/A]ATGAGGGC
IVS3+121T/C	Intron 3	24283645	GGTGGTAA[T/C]AGACATTC
IVS5-115G/C	Intron 5	24285756	GCACTATC[G/C]TTACTCTC
IVS5-100T/C	Intron 5	24285771	TCAAGGAG[T/C]CCACAGTT
838T/C	Exon 7	24288536	CATCCTTT[T/C]TGCGTTTG
1106delAAG	Exon 7	24288804 ^e	TTTGTCTT[AAG/---]AACACATT

a. 翻訳開始点または最も近いエクソンからの位置。IVS: intervening sequence

b. CGD: Canine Genome Draft. NC_006603.3 をリファレンス配列とした

c. 左側がリファレンスアリル (野生アリル)

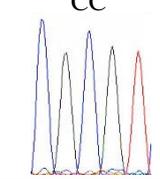
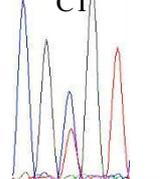
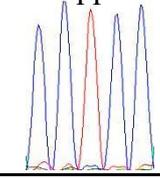
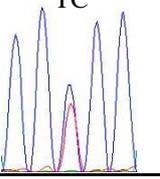
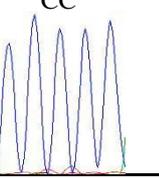
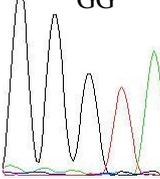
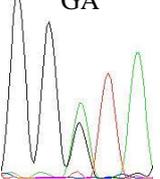
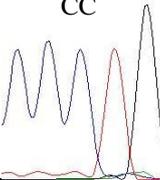
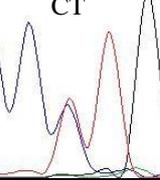
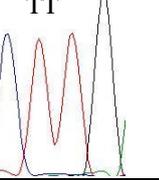
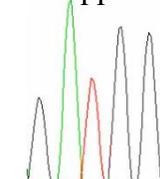
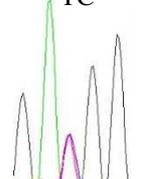
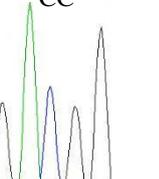
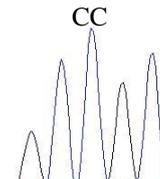
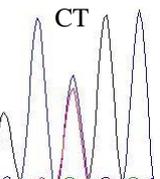
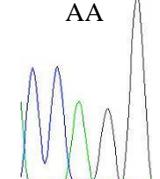
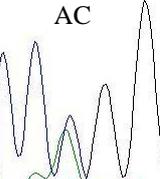
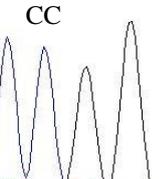
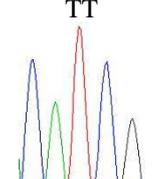
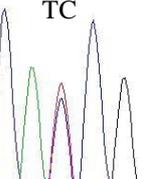
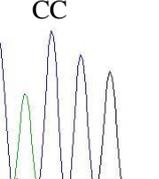
座位	野生アリルホモ型	ヘテロ型	変異アリルホモ型
-4399 C/T	CC 	CT 	TT 検出されず
-4339 T/C	TT 	TC 	CC 
-4160 G/A	GG 	GA 	AA 検出されず
-4010 C/T	CC 	CT 	TT 
-930 T/C	TT 	TC 	CC 
-803 C/T	CC 	CT 	TT 検出されず
143 A/C	AA 	AC 	CC 
IVS3+26 T/C	TT 	TC 	CC 

図 17. イヌ *UCP3* 遺伝子領域で同定された多型の波形 (1)

座位	野生アレルホモ型	ヘテロ型	変異アレルホモ型
IVS3+69 G/A	GG 	GA 	AA
IVS3+121 T/C	TT 	TC 	CC
IVS5-115 G/C	GG 	GC 	CC
IVS5-100 T/C	TT 	TC 	CC
838 T/C	TT 	TC 	CC 検出されず
1106 delAAG	II 	ID 	DD

図 17. イヌ *UCP3* 遺伝子領域で同定された多型の波形 (2)

表 12. イヌ *UCP3* 遺伝子多型の型判定結果 (1)

DNA 多型	遺伝子型	N	アリル	アリル頻度
-4399C/T	CC	101	C	0.92
	CT	18	T	0.08
	TT	0		
-4339T/C	TT	13	T	0.32
	TC	51	C	0.68
	CC	55		
-4160G/A	GG	118	G	0.996
	GA	1	A	0.004
	AA	0		
-4010C/T	CC	51	C	0.66
	CT	56	T	0.34
	TT	12		
-930T/C	TT	13	T	0.32
	TC	51	C	0.68
	CC	55		
-803C/T	CC	103	C	0.93
	CT	16	T	0.07
	TT	0		
143A/C	AA	109	A	0.95
	AC	9	C	0.05
	CC	1		
IVS3+26T/C	TT	43	T	0.62
	TC	61	C	0.38
	CC	15		
IVS3+69G/A	GG	51	G	0.66
	GA	56	A	0.34
	AA	12		

表 12. イヌ *UCP3* 遺伝子多型の型判定結果 (2)

DNA 多型	遺伝子型	N	アリル	アリル頻度
IVS3+121T/C	TT	99	T	0.9
	TC	16	C	0.1
	CC	4		
IVS5-115G/C	GG	31	G	0.52
	GC	61	C	0.48
	CC	27		
IVS5-100T/C	TT	51	T	0.66
	TC	56	C	0.34
	CC	12		
838T/C	TT	117	T	0.992
	TC	2	C	0.008
	CC	0		
1106delAAG	ins ins	51	ins	0.66
	ins del	56	del	0.34
	del del	12		

考察

イヌ *UCP2* および *UCP3* 遺伝子領域において多数の DNA 多型が同定された。本研究において翻訳領域で同定された多型は 143A/C および 838T/C であり、143A/C は *UCP3* 遺伝子 Exon 3 に位置しておりアミノ酸置換を伴うものであった。変異アリルは柴犬でのみ確認されたが、他の多型においてもアリル頻度が犬種により異なる傾向が見られたことと、解析検体数に犬種間でばらつきがあり 1 検体のみ解析を行った犬種も多いことから、各犬種の検体数を増やすことや今回調べていない犬種の解析を行うことで当該座位の変異アリルを有する個体、さらには新たな多型が検出される可能性がある。

本研究で同定された多型のほとんどは、イントロン領域に位置しており、これらが直接遺伝子機能に影響を与えることは考えづらい。ところが、ヒト *UCP2*、*UCP3* 遺伝子のプロモーター領域や非翻訳領域に位置している多型は、肥満や血清脂質値との関

連マーカーとしてよく研究されている。ヒト *UCP2* 遺伝子では-866G/A、Ala55Val、45bp Indelが、*UCP3* 遺伝子では-55C/Tがマーカーとして研究されている (Dalgaard, 2011)。*UCP2* 遺伝子の-866G/A はプロモーター領域の転写因子結合部位に影響し、mRNA の発現量などが変化することが明らかになっている (Wang et al., 2004)。3'UTR の 45bp 挿入欠失多型はmRNAのプロセッシングや転写の安定性に関与していることが示唆されているが、そのメカニズムの詳細は明らかになっていない (Hashemi et al., 2014)。翻訳領域の Ala55Val に関しては、Martinez-Hervas らはこれまで機能的な変化を引き起こしたという報告がないことから、Ala55Val 多型が真の疾患原因変異ではないが、-866G/A や 45bp 挿入欠失多型と強くリンクしており、それらの影響を受けていると考える事ができると述べている(Martinez-Hervas et al., 2012)。また、*UCP3* 遺伝子の-55C/T は、*UCP3* 遺伝子の mRNA 発現量に関係している (Pedraza et al., 2006; Francesc et al., 2007)。いずれの多型も肥満や糖尿病との関連について研究が行われているが、解析した民族や集団の違いにより、関係がある、関係がないという結果がそれぞれ複数の論文で報告されている。このように、ヒトにおいても *UCP2*、*UCP3* 遺伝子領域多型と表現型との関連は明確に証明されていない。

本章においてイヌ *UCP2*、*UCP3* 遺伝子領域にも多数の DNA 多型が存在することが明らかにされたことより、イヌにおいても同定された多型と表現型との関連を解析することが重要であると考え。従って、本研究で同定された多型は表現型との関連を検討する上で有効的な遺伝的マーカーとなり得ると考え、同定された多型を用いて、第3章では血液生化学検査値との相関解析を、第4章では2犬種間におけるアレル頻度の差を検討した。

小括

本章においては、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。各エクソンおよびその周辺配列を増幅するためのプライマーセットを *UCP2* 遺伝子領域で6個、*UCP3* 遺伝子領域で9個作成し、これらのプライマーとスクリーニングサンプルである11犬種各1検体のゲノム DNA を用いてダイレクトシーケンシング法により塩基配列を決定した。報告されているイヌゲノム配列と比較し、異なっていた部分は多型とした。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。つまり 108 検体において、*UCP2* 遺伝子 Exon 4、*UCP3* 遺伝子 Exon 2、Exon 5 は塩基配列を決定しなかった。合計 119 検体より同定された多型は、*UCP2* 遺伝子領域で Intron 1 に 4 SNPs (-3629C/G、-3621T/C、-2931A/T、-2913A/G) 、 1 Indel (-2951del TTCA) 、 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) 、 1 Indel (IVS6-133de TCTCCCC) 、 Intron 7 に 1 SNP (IVS7-106C/T) 、 2 Indel (IVS7-187ins A、IVS7-152delA) であった。*UCP3* 遺伝子領域では 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) 、 1 Indel (1106delAAG) であった。イントロンの多型が遺伝子機能に直接影響することは考えづらいが、ヒト *UCP2*、*UCP3* 遺伝子のプロモーター領域の多型はマーカーとして研究が進められているため、本研究においてイヌ *UCP2*、*UCP3* 遺伝子多型と表現型との関連を検討するために、第 3 章で生化学検査値との相関解析を、第 4 章で 2 犬種間における多型分布の比較解析を行った。

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 緒言

第1章において、ヒトとイヌの *UCP2*、*UCP3* 遺伝子の構造および発現パターンが類似していることが改めて明らかになり、第2章においてはイヌ *UCP2* 遺伝子領域で 10 SNPs、4 Indels、*UCP3* 遺伝子領域で 13 SNPs、1 Indel の多型が同定された。そこで本章では、同定されたイヌ *UCP2*、*UCP3* 遺伝子多型と表現型との関連を検討した。これまで述べてきている通り、ヒト *UCP2*、*UCP3* 遺伝子多型は睡眠時代謝率、糖尿病、肥満、インスリン感受性、Total、LDL、HDL コレステロール値等との関連が複数の研究で報告されているが (Reis et al., 2004; Yoon et al., 2007; Chan et al., 2006; Lee et al., 2008; Oktavianthi et al., 2012; De Souza et al., 2013; Schrauwen et al., 1999; Hamada et al., 2008; De Luis et al., 2013; Salopuro et al., 2009) その結果は必ずしも一致しておらず遺伝子の機能に関しては不明な点もある。

イヌにおいては *UCP2*、*UCP3* 遺伝子の機能に関する研究が多くはないため、本章ではヒトで示唆されている脂質代謝への寄与に着目し研究を行った。ヒト同様イヌにも高脂血症は存在し、その定義は血中のコレステロールまたはトリグリセリド (中性脂肪)、またはその両者が増加した状態とされている。2007年にヒトの日本動脈硬化学会がガイドラインの改訂を行い診断名を「高脂血症」から「脂質代謝異常症」に変更したことから、近年は獣医療においても同様に表現されることがある (荒井, 2014)。高脂血症は、様々な疾患に付随してみられる二次性のものと、原発性のものに分けられるが (水谷, 2014)、近年は食生活や生活習慣の変化に伴う原発性のものを防ぐことも重要な課題となってきた (日笠, 2014)。本章では、総コレステロールや中性脂肪に着目し、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を行った。

材料および方法

1. 解析サンプル

九州盲導犬協会にて飼育・繁殖されているラブラドル・レトリバー50検体を使用した (表6の Lab ID 6364を除く KGD49-KGD110)。この50検体は第2章においてイヌ

UCP2、UCP3 遺伝子領域 DNA 多型の型判定が終了している。生化学検査値への影響を考慮し、臨床的に健康な個体を使用した。

2. 相関解析に用いた DNA 多型

第2章において同定された合計28個のDNA多型を使用した。イヌUCP2遺伝子領域は以下の多型座位を使用した。-3629C/G、-3621T/C、-2931A/T、-2913A/G、-2951delTTCA、-2613A/C、-916C/T、-748G/A、-636A/G、IVS6-108C/T、IVS6-133delTCTCCCC、IVS7-106C/T、IVS7-187insA、IVS7-152delA。イヌUCP3遺伝子領域は以下の多型座位を使用した。-4399C/T、-4339T/C、-4160G/A、-4010C/T、-930T/C、-803C/T、143A/C、IVS3+26T/C、IVS3+69G/A、IVS3+121T/C、IVS5-115G/C、IVS5-100T/C、838T/C、1106delAAG。

3. 生化学検査値の測定

食後12時間以上経過している状態で採血し、採血にはヘパリン入り採血管を使用した。1,500 ×g で10分間遠心後、血漿を分離した。生化学検査項目は、血糖 (Glucose: GLU)、中性脂肪 (Triglyceride: TG)、総コレステロール (Total Cholesterol: T-Chol)、乳酸脱水素酵素 (Lactate Dehydrogenase: LDH) の4項目を測定した。測定にはSpotchem EM SP-4430 (Arkray, Japan) を使用し、手順は機器のプロトコールに従った。

4. 統計解析

生化学検査値と遺伝子多型との相関は一元配置分散分析 (ANOVA) により有意差を検討した。各多型座位において2群に分けて生化学検査値の平均値を比較した。遺伝子型が2種類検出された場合は両者間 (メジャーアレルホモ型 vs ヘテロ型) で、3種類検出された場合は、ヘテロ型をマイナーアレルホモ型に合算した場合 (メジャーアレルホモ型 vs マイナーアレルホモ型+ヘテロ型) とヘテロ型をメジャーアレルホモ型に合算した場合 (メジャーアレルホモ型+ヘテロ型 vs マイナーアレルホモ型) の両方で検討した。本章ではラブラドル・レトリバー50検体において頻度が高かった方のアレルをメジャーアレル、低い方をマイナーアレルとした。 $P<0.05$ で有意差ありとした。

結果

1. イヌ *UCP2* 遺伝子領域の DNA 多型頻度

本章で解析に使用したラブラドル・レトリバー50検体は、第2章において、イヌ *UCP2* 遺伝子領域の DNA 多型型判定が行われている。その詳細は以下の通りであった。まず-3629C/G (Intron 1)、-2613A/C (Exon 2) はいずれも同一の4検体において変異アリルが検出されたが、全てヘテロ型であった。残りの46検体は野生アリルのホモ型であり、変異アリルホモ型の個体は検出されなかった。次に IVS6-133delTCTCCCC (Intron 6)、IVS7-152delA (Intron 7) は同一の3検体で変異アリルが検出されたが、全てヘテロ型であった。残りの47検体は野生アリルのホモ型であり、変異アリルホモ型の個体は検出されなかった。そして-2951delTTCA (Intron 1)、-2913A/G (Intron 1)、-916C/T (Intron 2)、IVS6-108C/T (Intron 6)、IVS7-187insA (Intron 7) は、変異アリルの方が野生アリルよりも頻度が高く、いずれの座位も46検体に変異アリルホモ型、4検体がヘテロ型であった。なお-3621T/C (Intron 1)、-2931A/T (Intron 1)、-748G/A (Intron 2)、-636A/G (Intron 2)、IVS7-106C/T (Intron 7) は全検体が野生アリルのホモ型であり、多型性が認められなかった (表 13)。

表 13. イヌ *UCP2* 遺伝子多型の型判定結果 (1): ラブラドル・レトリバー50 検体

DNA 多型	遺伝子型	N	アリル	アリル頻度
-3629C/G	CC	46	C	0.96
	CG	4	G	0.04
	GG	0		
-3621T/C	TT	50	T	1.00
	TC	0	C	0.00
	CC	0		
-2951delTTCA	ins ins	0	ins	0.04
	ins del	4	del	0.96
	del del	46		
-2931A/T	AA	50	A	1.00
	AT	0	T	0.00
	TT	0		
-2913A/G	AA	0	A	0.04
	AG	4	G	0.96
	GG	46		
-2613A/C	AA	46	A	0.96
	AC	4	C	0.04
	CC	0		
-916C/T	CC	0	C	0.04
	CT	4	T	0.96
	TT	46		
-748G/A	GG	50	G	1.00
	GA	0	A	0.00
	AA	0		
-636A/G	AA	50	A	1.00
	AG	0	G	0.00
	GG	0		

表 13. イヌ *UCP2* 遺伝子多型の型判定結果 (2) : ラブラドル・レトリバー50 検体

DNA 多型	遺伝子型	N	アリル	アリル頻度
IVS6-133del TCTCCCC	ins ins	47	ins	0.97
	ins del	3	del	0.03
IVS6-108C/T	del del	0		
	CC	0	C	0.04
	CT	4	T	0.96
IVS7-187insA	TT	46		
	del del	0	del	0.04
	del ins	4	ins	0.96
IVS7-152delA	ins ins	46		
	ins del	4	ins	0.96
	del del	0	del	0.04
IVS7-106C/T	ins ins	47	ins	0.97
	ins del	3	del	0.03
	del del	0		
IVS7-106C/T	CC	50	C	1.00
	CT	0	T	0.00
	TT	0		

2. イヌ *UCP2* 遺伝子領域の DNA 多型と生化学検査値との相関解析

ラブラドル・レトリバーで多型性が認められた多型座位 (-3629C/G (Intron 1)、-2951delTTCA (Intron 1)、-2913A/G (Intron 1)、-2613A/C (Exon 2)、-916C/T (Intron 2)、IVS6-133delTCTCCCC (Intron 6)、IVS6-108C/T (Intron 6)、IVS7-187insA (Intron 7)、IVS7-152delA (Intron 7)) において、多型と生化学検査値 4 項目 (GLU、TG、T-Cho、LDH) の相関解析を行った。各多型座位の遺伝子型ごとに生化学検査値の平均値を算出したが、-3629C/G、-2951delTTCA、-2913A/G、-2613A/C、-916C/T、IVS6-108C/T、IVS7-187insA はヘテロ型を有していた個体が同一の 4 検体、また IVS6-133delTCTCCCC および IVS7-152delA もヘテロ型を有していた個体が同一の 3 検体であったことから相関解析の結果はそれぞれ同一となった。解析を行った全ての多型座位において生化学検査値との関連は認められなかった (表 14)。

表 14. イヌ *UCP2* 遺伝子多型と生化学検査値の相関解析

		GLU	T-Cho	LDH	TG
-3629C/G	CC (46)	97.43±10.70	262.72±53.17	56.11±17.18	46.85±22.19
	CG (4)	100.0±10.55	252.0±52.59	52.75±5.5	39.75±24.46
	CC vs CG	0.647	0.701	0.701	0.545
-2951del TTCA	ID (4)	100.0±10.55	252.0±52.59	52.75±5.5	39.75±24.46
	DD (46)	97.43±10.70	262.72±53.17	56.11±17.18	46.85±22.19
	ID vs DD	0.647	0.701	0.701	0.545
-2913A/G	AG (4)	100.0±10.55	252.0±52.59	52.75±5.5	39.75±24.46
	GG (46)	97.43±10.70	262.72±53.17	56.11±17.18	46.85±22.19
	AG vs GG	0.647	0.701	0.701	0.545
-2613A/C	AA (46)	97.43±10.70	262.72±53.17	56.11±17.18	46.85±22.19
	AC (4)	100.0±10.55	252.0±52.59	52.75±5.5	39.75±24.46
	AA vs AC	0.647	0.701	0.701	0.545
-916C/T	CT (4)	100.0±10.55	252.0±52.59	52.75±5.5	39.75±24.46
	TT (46)	97.43±10.70	262.72±53.17	56.11±17.18	46.85±22.19
	CT vs TT	0.647	0.701	0.701	0.545
IVS6-133del TCTCCCC	II (47)	97.26±10.66	261.55±53.19	55.98±17.01	46.55±22.04
	ID (3)	103.67±9.29	266.67±53.46	53.67±6.35	42.0±29.44
	II vs ID	0.315	0.872	0.817	0.734
IVS6-108C/T	CT (4)	100.0±10.55	252.0±52.59	52.75±5.5	39.75±24.46
	TT (46)	97.43±10.70	262.72±53.17	56.11±17.18	46.85±22.19
	CT vs TT	0.647	0.701	0.701	0.545
IVS7-187 insA	DI (4)	100.0±10.55	252.0±52.59	52.75±5.5	39.75±24.46
	II (46)	97.43±10.70	262.72±53.17	56.11±17.18	46.85±22.19
	DI vs II	0.647	0.701	0.701	0.545
IVS7-152 delA	II (47)	97.26±10.66	261.55±53.19	55.98±17.01	46.55±22.04
	ID (3)	103.67±9.29	266.67±53.46	53.67±6.35	42.0±29.44
	II vs ID	0.315	0.872	0.817	0.734

3. イヌ *UCP3* 遺伝子領域の DNA 多型

イヌ *UCP2* 遺伝子多型同様に、イヌ *UCP3* 遺伝子領域の多型座位についても、第 2 章において型判定が終了している。その詳細は以下の通りであった。143A/C、IVS3+121T/C、838T/C は全検体において野生アレルのホモ型であったが、これら以外の多型座位においては多型性が確認された (表 15)。多型性が認められた-4339T/C、-4010C/T、-930T/C、IVS3+26T/C、IVS3+69G/A、IVS5-115G/C、IVS5-100T/C、1106delAAG においてはマイナーアレル頻度が 0.41 以上であり、変異アレルが広く分布していた。

なお-4160G/A は本研究で解析した全 119 検体のうち、ラブラドル・レトリバー 1 検体でのみ変異アレルが確認され、変異アレルを有していた個体はヘテロ型であったことから、変異アレル頻度は低かった。-4339T/C、-930T/C は変異アレルの方が野生アレルよりも頻度が高かった。

表 15. イヌ *UCP3* 遺伝子多型の型判定結果 (1) : ラブラドル・レトリバー50 検体

DNA 多型	遺伝子型	N	アリル	アリル頻度
-4399C/T	CC	34	C	0.84
	CT	16	T	0.16
	TT	0		
-4339T/C	TT	8	T	0.43
	TC	27	C	0.57
	CC	15		
-4160G/A	GG	49	G	0.99
	GA	1	A	0.01
	AA	0		
-4010C/T	CC	15	C	0.59
	CT	29	T	0.41
	TT	6		
-930T/C	TT	8	T	0.43
	TC	27	C	0.57
	CC	15		
-803C/T	CC	35	C	0.85
	CT	15	T	0.15
	TT	0		
143A/C	AA	50	A	1.00
	AC	0	C	0.00
	CC	0		
IVS3+26T/C	TT	15	T	0.59
	TC	29	C	0.41
	CC	6		
IVS3+69G/A	GG	15	G	0.59
	GA	29	A	0.41
	AA	6		

表 15. イヌ *UCP3* 遺伝子多型の型判定結果 (2): ラブラドル・レトリバー50 検体

DNA 多型	遺伝子型	N	アリル	アリル頻度
IVS3+121T/C	TT	50	T	1.00
	TC	0	C	0.00
	CC	0		
IVS5-115G/C	GG	15	G	0.59
	GC	29	C	0.41
	CC	6		
IVS5-100T/C	TT	15	T	0.59
	TC	29	C	0.41
	CC	6		
838T/C	TT	50	T	1.00
	TC	0	C	0.00
	CC	0		
1106delAAG	ins ins	15	ins	0.59
	ins del	29	del	0.41
	del del	6		

4. イヌ *UCP3* 遺伝子領域の DNA 多型と生化学検査値との相関解析

イヌ *UCP2* 遺伝子多型同様に、ラブラドル・レトリバーで多型性が認められた多型座位 (-4399C/T (Intron 1)、-4339T/C (Intron 1)、-4010C/T (Intron 1)、-930T/C (Intron 1)、-803C/T (Intron 1)、IVS3+26T/C (Intron 3)、IVS3+69G/A (Intron 3)、IVS5-115G/C (Intron 5)、IVS5-100T/C (Intron 5)、1106delAAG (Exon 7)) において多型と生化学検査値の相関解析を行ったところ、-4399C/T、-4339T/C、-930T/C、-803C/T において、T-Cho 値との関連が認められた (表 16)。各遺伝子型における T-Cho 値の平均値 \pm SD は、-4399C/T の CC 型が 273.5 \pm 49.0、CT 型が 237.2 \pm 53.3、-4339T/C および-930T/C の TT 型が 264.3 \pm 49.6、CT 型が 276.9 \pm 49.5、CC 型が 233.5 \pm 51.2、-803C/T の CC 型が 271.6 \pm 49.5、CT 型が 239.1 \pm 54.5 であった。いずれの多型座位も、野生アリル (-4399C/T: C アリル、-4339T/C: T アリル、-930T/C: T アリル、-803C/T: C アリル)を有している方が、T-Cho が高い傾向であった。-4339T/C と-930T/C は、ラブラドル・レトリバー50 検体だけでなく、本研究において解析を行った 119 検体において連鎖不平衡の関係であったが、その間

に位置している-4010C/T とはそのような関係が認められず、-4010C/T は T-Cho との相関が認められなかった。

全ての座位において GLU、LDH、TG との相関は認められなかった (表 16)。

表 16. イヌ *UCP3* 遺伝子多型と生化学検査値の相関解析 (1)

		GLU	T-Cho	LDH	TG
-4399C/T	CC (34)	97.09±8.39	273.47±48.95	55.91±17.99	44.82±21.11
	CT (16)	98.81±14.51	237.19±53.26	55.69±13.49	49.38±24.77
	CC vs CT	0.597	0.021	0.965	0.504
-4339T/C	TT (8)	94.5±5.37	264.25±49.65	55.25±13.68	40.0±13.52
	TC (27)	96.33±11.49	276.89±49.54	58.19±20.87	50.37±24.80
	CC (15)	101.67±10.38	233.53±51.21	51.93±5.27	42.27±20.45
	CC vs TC+TT	0.079	0.011	0.279	0.408
	CC+TC vs TT	0.366	0.890	0.914	0.388
-4010C/T	CC (15)	94.4±11.89	255.47±52.60	56.93±16.06	51.2±23.21
	CT (29)	98.69±10.21	270.17±52.16	56.48±18.48	43.24±21.47
	TT (6)	100.67±8.64	237.67±54.69	50.0±0.0	48.67±24.57
	CC vs CT+TT	0.159	0.580	0.763	0.310
	CC+CT vs TT	0.462	0.234	0.362	0.782
-930T/C	TT (8)	94.5±5.37	264.25±49.65	55.25±13.68	40.0±13.52
	TC (27)	96.33±11.49	276.89±49.54	58.19±20.87	50.37±24.80
	CC (15)	101.67±10.38	233.53±51.21	51.93±5.27	42.27±20.45
	CC vs TC+TT	0.079	0.011	0.279	0.408
	CC+TC vs TT	0.366	0.890	0.914	0.388
-803C/T	CC (35)	96.86±8.38	271.6±49.48	55.74±17.75	44.49±20.89
	CT (15)	99.47±14.77	239.13±54.53	56.07±13.88	50.47±25.23
	CC vs CT	0.431	0.045	0.950	0.388
IVS3+26 T/C	TT (15)	94.4±11.89	255.47±52.60	56.93±16.06	51.2±23.21
	TC (29)	98.69±10.21	270.17±52.16	56.48±18.48	43.24±21.47
	CC (6)	100.67±8.64	237.67±54.69	50.0±0.0	48.67±24.57
	TT vs TC+CC	0.159	0.580	0.763	0.310
	TT+TC vs CC	0.462	0.234	0.362	0.782

表 16. イヌ *UCP3* 遺伝子多型と生化学検査値の相関解析 (2)

		GLU	T-Cho	LDH	TG
IVS3+69	GG (15)	94.4±11.89	255.47±52.60	56.93±16.06	51.2±23.21
	GA (29)	98.69±10.21	270.17±52.16	56.48±18.48	43.24±21.47
	AA (6)	100.67±8.64	237.67±54.69	50.0±0.0	48.67±24.57
G/A	GG vs GA+AA	0.159	0.580	0.763	0.310
	GG+GA vs AA	0.462	0.234	0.362	0.782
IVS5-115	GG (15)	94.4±11.89	255.47±52.60	56.93±16.06	51.2±23.21
	GC (29)	98.69±10.21	270.17±52.16	56.48±18.48	43.24±21.47
	CC (6)	100.67±8.64	237.67±54.69	50.0±0.0	48.67±24.57
G/C	CC vs GC+GG	0.462	0.234	0.362	0.782
	CC+GC vs GG	0.159	0.580	0.763	0.310
IVS5-100	TT (15)	94.4±11.89	255.47±52.60	56.93±16.06	51.2±23.21
	TC (29)	98.69±10.21	270.17±52.16	56.48±18.48	43.24±21.47
	CC (6)	100.67±8.64	237.67±54.69	50.0±0.0	48.67±24.57
T/C	TT vs TC+CC	0.159	0.580	0.763	0.310
	TT+TC vs CC	0.462	0.234	0.362	0.782
1106del	II (15)	94.4±11.89	255.47±52.60	56.93±16.06	51.2±23.21
	ID (29)	98.69±10.21	270.17±52.16	56.48±18.48	43.24±21.47
	DD (6)	100.67±8.64	237.67±54.69	50.0±0.0	48.67±24.57
AAG	II vs ID+DD	0.159	0.580	0.763	0.310
	II+ID vs DD	0.462	0.234	0.362	0.782

考察

今回解析を行ったラブラドル・レトリバー50 検体では、*UCP2* 遺伝子領域多型の全ての座位においてマイナーアレル頻度が 0.00-0.04 と多型性が低かった。その理由としてまずは犬種の特徴であることが考えられた。イヌは特徴的な体型や性質を求めてヒトが改良を重ねてきた歴史があることから、犬種により遺伝的特徴が異なることが報告されている(越村ら, 2006; Masuda et al., 2004)。次に、解析個体の多くは九州盲導犬協会で飼育・繁殖されていることから血縁関係を有する個体も含まれているため、アレル頻度に影響した可能性が考えられた。

UCP3 遺伝子多型においては、Intron 1 の 4 SNPs と T-Cho 値の関連が示唆された。

ヒト *UCP3* 遺伝子においても Exon 1 (5'UTR) に位置する-55C/T と肥満や T-Cho 値との関連が複数報告されている (Hamada et al., 2008; Salopuro et al., 2009; De Luis et al., 2013)。その理由として、*UCP3* mRNA 発現量に影響している PPAR の応答配列に-55C/T が隣接していることがあげられているが (Villarroya et al., 2007)、*UCP3* 遺伝子と T-Cho の直接の関連メカニズムは不明な点が多い。イヌにおいてはプロモーター解析が行われておらず、周辺に存在するモチーフや応答配列は不明であるが、イヌ *UCP3* 遺伝子 Intron 1 にヒト PPAR 応答配列と類似している配列が存在していたことから、今後詳細な解析が必要であると考えられる。また、本研究で用いた集団は血縁関係を有する個体が含まれていることから一般的に独立した集団であるとは言い難い。今後、よりサンプル数の大きい、独立した集団を解析することでさらなる知見が得られると考える。

小括

本章においては、第 2 章で同定された全ての多型と血液生化学検査値 (GLU、TG、T-Cho、LDH) との相関を検討した。サンプルは臨床的に健康なラブラドル・レトリバー 50 検体を使用した。イヌ *UCP2*、*UCP3* 遺伝子多型の型判定結果を用いて、遺伝子型ごとに各生化学検査値の平均値を算出し、有意差を検討した。その結果、ラブラドル・レトリバー 50 検体においては *UCP2* 遺伝子の多型性が低く、-2951delTTCA、-2913A/G、-916C/T、IVS6-108C/T、IVS7-187insA 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、4 検体であり、生化学検査値との相関は認められなかった。

UCP3 遺伝子多型は、143A/C、IVS3+121T/C、838T/C で全検体が野生アレルのホモ型であったが、他の多型座位は多型性が認められた。第 2 章における 119 検体での解析で同定されている、翻訳領域に位置しアミノ酸置換を伴うと予想される多型 (143A/C) はラブラドル・レトリバー 50 検体では検出されなかった。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 4 SNPs と T-Cho 値の相関が示唆された。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、そのメカニズムは正確には明らかにされていない。

本研究で T-Cho 値との相関が示唆された 4 SNPs はイントロンに位置しているため、直接 *UCP3* 遺伝子の構造を変化させることは考えづらい。イヌ *UCP3* 遺伝子の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 *UCP3* 遺伝子の PPAR 応答配列と類似している配列が付近に確認されたことから、ヒト同様に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

緒言

第3章において、イヌ *UCP3* 遺伝子領域の4 SNPs と T-Cho 値との関連が示唆された。シェットランド・シープドッグ (シェルティー) は遺伝的にコレステロール値が高い犬種であるといわれている (Sato et al., 2000)。これまでの研究でシェルティーにおける高中性脂肪血症および高コレステロール血症と、胆嚢粘液嚢腫の形成には関連があることが明らかになっており (Aguirre et al., 2007)、さらに胆嚢粘液嚢腫の発症と ATP-binding cassette, subfamily B, member 4 (ABCB4) 遺伝子の関連が明らかにされ、シェルティーは他犬種よりもそのリスクが有意に高いことが報告されている (Mealey et al., 2010)。しかし脂質代謝異常には複数の要因が作用しており、シェルティーにおけるそのメカニズムも完全には明らかにされていない。

イヌは特定の気質や体型を求めて人為的に改良されてきた歴史があることから、複数の遺伝子における多型座位でアレル頻度に犬種差が報告されている (越村ら, 2006; Masuda et al., 2004)。10 犬種 275 頭を用いた大規模ゲノムワイド解析においても、人為選択の影響を受けていると考えられる 155 のゲノム領域が同定されており、これらの領域には体格、毛色、行動、骨格構造および生理機能に関する遺伝子が含まれていた (Akey et al., 2010)。

イヌ *UCP2*、*UCP3* 遺伝子領域多型においてもアレル頻度に犬種差があることが予想されるが、本章では、シェルティーが高脂血症になりやすい遺伝的な要因としてイヌ *UCP2*、*UCP3* 遺伝子が関連しているのかを検討するために、シェルティーおよびその対照として柴犬の *UCP2*、*UCP3* 遺伝子領域 DNA 多型のアレル頻度を比較した。

材料および方法

1. 解析サンプル

第2章においてイヌ *UCP2*、*UCP3* 遺伝子領域の DNA 多型型判定が終了している柴犬雄 15 検体、雌 15 検体の合計 30 検体、シェルティー雄 15 検体、雌 15 検体の合計 30 検体を使用した (表 6)。

2. 比較解析に用いた DNA 多型

第2章において同定された合計28個の多型座位を使用した。イヌ *UCP2* 遺伝子領域は以下の多型座位を使用した。-3629C/G、-3621T/C、-2931A/T、-2913A/G、-2951delTTCA、-2613A/C、-916C/T、-748G/A、-636A/G、IVS6-108C/T、IVS6-133delTCTCCCC、IVS7-106C/T、IVS7-187insA、IVS7-152delA。イヌ *UCP3* 遺伝子領域は以下の多型座位を使用した。-4399C/T、-4339T/C、-4160G/A、-4010C/T、-930T/C、-803C/T、143A/C、IVS3+26T/C、IVS3+69G/A、IVS3+121T/C、IVS5-115G/C、IVS5-100T/C、838T/C、1106delAAG。

3. 統計解析

遺伝子解析ソフト SNPalyze (ダイナコム, Japan) を使用して、ハプロタイプ解析を行った。またフィッシャーの正確確率検定により各アレル頻度の犬種差を検討した。 $P < 0.05$ で有意差ありとした。

結果

1. イヌ *UCP2* 遺伝子領域で同定された多型の犬種差

柴犬30検体、シェルティー30検体についてイヌ *UCP2* 遺伝子領域のDNA多型のアレル頻度について犬種間で有意差を検討した。イヌ *UCP2* 遺伝子領域で有意差が認められた多型は、-3629C/G (Intron 1)、-2931A/T (Intron 1)、-748G/A (Intron 2)、-636A/G (Intron 2)、IVS6-133delTCTCCCC (Intron 6) であった (表 17(A))。変異アレル頻度は、-3629C/G は柴犬が 0.45、シェルティーが 0.00、-2931A/T は柴犬が 0.35、シェルティーが 0.00 であり、シェルティーでは変異アレルを有する個体が検出されなかった。その一方-748G/A および -636A/G の変異アレル頻度はどちらも、柴犬が 0.00 シェルティーが 0.30 であり、柴犬で変異アレルを有する個体が検出されなかった。その他の多型座位については、有意差は出なかったが、-3621T/C と IVS7-106C/T の変異アレルは柴犬で、IVS7-152delA は両犬種において多型性が認められなかった。

表 17. (A) イヌ *UCP2* 遺伝子多型の型判定結果：全体 (1)

DNA 多型	遺伝子型	N		P 値	アレル	アレル頻度	
		柴犬	シェルティー			柴犬	シェルティー
-3629C/G	CC	11	30	2.67×10^{-8} CC vs CG+GG	C	0.55	1.00
	CG	11	0		G	0.45	0.00
	GG	8	0				
-3621T/C	TT	30	26	5.62×10^{-2} TT vs TC	T	1.00	0.93
	TC	0	4		C	0.00	0.07
	CC	0	0				
-2951delTTCA	ins ins	8	3	0.61 II+ID vs DD	ins	0.45	0.37
	ins del	11	16		del	0.55	0.63
	del del	11	11				
-2931A/T	AA	13	30	3.09×10^{-7} AA vs AT+TT	A	0.65	1.00
	AT	13	0		T	0.35	0.00
	TT	4	0				
-2913A/G	AA	8	3	0.61 AA+AG vs GG	A	0.45	0.37
	AG	11	16		G	0.55	0.63
	GG	11	11				
-2613A/C	AA	11	11	0.61 AA vs AC+CC	A	0.55	0.63
	AC	11	16		C	0.45	0.37
	CC	8	3				
-916C/T	CC	8	3	0.61 CC+CT vs TT	C	0.45	0.37
	CT	11	16		T	0.55	0.63
	TT	11	11				
-748G/A	GG	30	13	3.09×10^{-7} GG vs GA+AA	G	1.00	0.70
	GA	0	16		A	0.00	0.30
	AA	0	1				
-636A/G	AA	30	13	3.09×10^{-7} AA vs AG+GG	A	1.00	0.70
	AG	0	16		G	0.00	0.30
	GG	0	1				

表 17. (A) イヌ *UCP2* 遺伝子多型の型判定結果：全体 (2)

DNA 多型	遺伝子型	N		P 値	アレル	アレル頻度	
		柴犬	シェルティー			柴犬	シェルティー
IVS6-133del TCTCCCC	ins ins	11	26	6.95×10^{-5} II vs ID+DD	ins	0.55	0.93
	ins del	11	4		del	0.45	0.07
	del del	8	0				
IVS6-108C/T	CC	8	3	0.61 CC+CT vs TT	C	0.45	0.37
	CT	11	16		T	0.55	0.63
	TT	11	11				
IVS7-187insA	del del	8	3	0.61 DD+DI vs II	del	0.45	0.37
	del ins	11	16		ins	0.55	0.63
	ins ins	11	11				
IVS7-152delA	ins ins	30	30	N.D	ins	1.00	1.00
	ins del	0	0		del	0.00	0.00
	del del	0	0				
IVS7-106C/T	CC	30	26	5.62×10^{-2} CC vs CT	C	1.00	0.93
	CT	0	4		T	0.00	0.07
	TT	0	0				

次に各犬種 15 検体ずつではあるが雌雄別にアレル頻度の犬種差を解析した。雄で有意差が認められた座位およびその変異アレル頻度は以下の通りであった。-3629C/G (Intron 1) は柴犬が 0.37、シェルティーが 0.00、-2931A/T (Intron 1) は柴犬が 0.30、シェルティーが 0.00、-748G/A (Intron 2) は柴犬が 0.00、シェルティーが 0.33、-636A/G (Intron 2) は柴犬が 0.00、シェルティーが 0.33、IVS6-133delTCTCCCC (Intron 6) は柴犬が 0.37、シェルティーが 0.03 であった。雌では-3629C/G (Intron 1) は柴犬が 0.53、シェルティーが 0.00、-2931A/T (Intron 1) は柴犬が 0.40、シェルティーが 0.00、-748G/A (Intron 2) は柴犬が 0.00、シェルティーが 0.27、-636A/G (Intron 2) は柴犬が 0.00、シェルティーが 0.27 の 4 SNPs において有意差が認められた。有意差が認められた座位は、全体で解析を行った際に有意差が認められた座位と同じ多型座位であった(表 17 (B,C))。

表 17. (B) イヌ *UCP2* 遺伝子多型の型判定結果：雄 (1)

DNA 多型	遺伝子型	N		P 値	アリル	アリル頻度	
		柴犬	シェルティー			柴犬	シェルティー
-3629C/G	CC	6	15	3.50×10^{-4} CC vs CG+GG	C	0.63	1.00
	CG	7	0		G	0.37	0.00
	GG	2	0				
-3621T/C	TT	15	14	0.50 TT vs TC	T	1.00	0.97
	TC	0	1		C	0.00	0.03
	CC	0	0				
-2951delTTCA	ins ins	2	2	0.64 II+ID vs DD	ins	0.37	0.37
	ins del	7	7		del	0.63	0.63
	del del	6	6				
-2931A/T	AA	7	15	1.10×10^{-3} AA vs AT+TT	A	0.70	1.00
	AT	7	0		T	0.30	0.00
	TT	1	0				
-2913A/G	AA	2	2	0.64 AA+AG vs GG	A	0.37	0.37
	AG	7	7		G	0.63	0.63
	GG	6	6				
-2613A/C	AA	6	6	0.64 AA vs AC+CC	A	0.63	0.63
	AC	7	7		C	0.37	0.37
	CC	2	2				
-916C/T	CC	2	2	0.64 CC+CT vs TT	C	0.37	0.37
	CT	7	7		T	0.63	0.63
	TT	6	6				
-748G/A	GG	15	6	3.50×10^{-4} GG vs GA+AA	G	1.00	0.67
	GA	0	8		A	0.00	0.33
	AA	0	1				
-636A/G	AA	15	6	3.50×10^{-4} AA vs AG+GG	A	1.00	0.67
	AG	0	8		G	0.00	0.33
	GG	0	1				

表 17. (B) イヌ *UCP2* 遺伝子多型の型判定結果：雄 (2)

DNA 多型	遺伝子型	N		P 値	アレル	アレル頻度	
		柴犬	シェルティー			柴犬	シェルティー
IVS6-133del TCTCCCC	ins ins	6	14	2.60×10^{-3} II vs ID+DD	ins	0.63	0.97
	ins del	7	1		del	0.37	0.03
	del del	2	0				
IVS6-108C/T	CC	2	2	0.64 CC+CT vs TT	C	0.37	0.37
	CT	7	7		T	0.63	0.63
	TT	6	6				
IVS7-187insA	del del	2	2	0.64 DD+DI vs II	del	0.37	0.37
	del ins	7	7		ins	0.63	0.63
	ins ins	6	6				
IVS7-152delA	ins ins	15	15	N.D	ins	1.00	1.00
	ins del	0	0		del	0.00	0.00
	del del	0	0				
IVS7-106C/T	CC	15	14	0.50 CC vs CT	C	1.00	0.97
	CT	0	1		T	0.00	0.03
	TT	0	0				

表 17. (C) イヌ *UCP2* 遺伝子多型の型判定結果：雌 (1)

DNA 多型	遺伝子型	N		P 値	アレル	アレル頻度	
		柴犬	シェルティー			柴犬	シェルティー
-3629C/G	CC	5	15	1.00×10^{-5} CC vs CG+GG	C	0.47	1.00
	CG	4	0		G	0.53	0.00
	GG	6	0				
-3621T/C	TT	15	12	0.11 TT vs TC	T	1.00	0.90
	TC	0	3		C	0.00	0.10
	CC	0	0				
-2951delTTCA	ins ins	6	1	0.65 II+ID vs DD	ins	0.53	0.37
	ins del	4	9		del	0.47	0.63
	del del	5	5				
-2931A/T	AA	6	15	3.50×10^{-4} AA vs AT+TT	A	0.60	1.00
	AT	6	0		T	0.40	0.00
	TT	3	0				
-2913A/G	AA	6	1	0.65 AA+AG vs GG	A	0.53	0.37
	AG	4	9		G	0.47	0.63
	GG	5	5				
-2613A/C	AA	5	5	0.65 AA vs AC+CC	A	0.47	0.63
	AC	4	9		C	0.53	0.37
	CC	6	1				
-916C/T	CC	6	1	0.65 CC+CT vs TT	C	0.53	0.37
	CT	4	9		T	0.47	0.63
	TT	5	5				
-748G/A	GG	15	7	1.10×10^{-3} GG vs GA+AA	G	1.00	0.73
	GA	0	8		A	0.00	0.27
	AA	0	0				
-636A/G	AA	15	7	1.10×10^{-3} AA vs AG+GG	A	1.00	0.73
	AG	0	8		G	0.00	0.27
	GG	0	0				

表 17. (C) イヌ *UCP2* 遺伝子多型の型判定結果：雌 (2)

DNA 多型	遺伝子型	N		P 値	アリル	アリル頻度	
		柴犬	シェルティー			柴犬	シェルティー
IVS6-133del TCTCCCC	ins ins	5	12	0.01 II vs ID+DD	ins	0.47	0.90
	ins del	4	3		del	0.53	0.10
	del del	6	0				
IVS6-108C/T	CC	6	1	0.65 CC+CT vs TT	C	0.53	0.37
	CT	4	9		T	0.47	0.63
	TT	5	5				
IVS7-187insA	del del	6	1	0.65 DD+DI vs II	del	0.53	0.37
	del ins	4	9		ins	0.47	0.63
	ins ins	5	5				
IVS7-152delA	ins ins	15	15	N.D	ins	1.00	1.00
	ins del	0	0		del	0.00	0.00
	del del	0	0				
IVS7-106C/T	CC	15	12	0.11 CC vs CT	C	1.00	0.90
	CT	0	3		T	0.00	0.10
	TT	0	0				

また、本研究において同定された多型座位を用いてハプロタイプ解析を行ったところ、5つのハプロタイプが検出された(表18)。ハプロタイプ1は柴犬とシェルティーにおいて共通タイプであり、どちらの犬種においても高い頻度で有していた(柴犬: 0.55、シェルティー: 0.63)。その他の4つのハプロタイプはアリルに依存していることもあり、どちらか一方の犬種でのみ確認された。柴犬で検出されたハプロタイプは、ハプロタイプ1、2、3の3種類であり、頻度は最も高かったハプロタイプ1の0.55についてハプロタイプ2が0.35、ハプロタイプ3は0.10であった。シェルティーで検出されたハプロタイプは、ハプロタイプ1、4、5の3種類であり、頻度は最も高かったハプロタイプ1の0.63についてハプロタイプ4の0.30、ハプロタイプ5の0.07であった。柴犬とシェルティーで有するハプロタイプは異なっていたものの、3種類のハプロタイプを有していること、またその分布頻度は類似していた。ハプロタイプ多様度は柴犬0.58、シェルティー0.53であり、犬種差は認められなかった。

表 18. イヌ *UCP2* 遺伝子多型のハプロタイプ解析結果

ハプロタイプ	頻度					
	全体	柴犬		全体	シェルティー	
		雄	雌		雄	雌
1 CTDAGATGAIHIC	0.55	0.63	0.47	0.63	0.63	0.63
2 GTITACCGADCDCIC	0.35	0.30	0.40	0.00	0.00	0.00
3 GTIAACCGADCDCIC	0.10	0.07	0.13	0.00	0.00	0.00
4 CTIAACCAGICDCIC	0.00	0.00	0.00	0.30	0.33	0.27
5 CCIAACCGADCDCIT	0.00	0.00	0.00	0.07	0.03	0.10
ハプロタイプ多様度	0.58	0.54	0.65	0.53	0.53	0.56

2. イヌ *UCP3* 遺伝子領域で同定された多型の犬種差

イヌ *UCP2* 遺伝子領域 DNA 多型と同様にアレル頻度の犬種差を検討した結果、イヌ *UCP3* 遺伝子領域で有意差が認められた多型座位は、-4339T/C (Intron1)、-930T/C (Intron1)、143A/C (Exon3)、IVS3+121T/C (Intron3) であった (表 19(A))。各変異アレル頻度は、-4339T/C が柴犬 0.93、シェルティー 0.63、-930T/C は柴犬が 0.93、シェルティーが 0.63、143A/C は柴犬が 0.18、シェルティーが 0.00、IVS3+121T/C は柴犬が 0.02、シェルティーが 0.33 であった。特に IVS3+121T/C は 2 犬種間で変異アレルの頻度差が大きかった。143A/C の変異アレルは柴犬でのみ検出され、柴犬では変異アレル頻度が 0.18 であったのに対して、シェルティーは全検体野生アレルホモ型であった。その他の多型座位については、-4160G/A および-803C/T において柴犬およびシェルティーでは変異アレルが検出されなかった。

表 19. (A) イヌ *UCP3* 遺伝子多型の型判定結果：全体 (1)

DNA 多型	遺伝子型	N		P 値	アレル	アレル頻度	
		柴犬	シェルティー			柴犬	シェルティー
-4399C/T	CC	29	30	0.50 CC vs CT+TT	C	0.98	1.00
	CT	1	0		T	0.02	0.00
	TT	0	0				
-4339T/C	TT	0	4	1.84×10 ⁻⁴ TT+TC vs CC	T	0.07	0.37
	TC	4	14		C	0.93	0.63
	CC	26	12				
-4160G/A	GG	30	30	N.D.	G	1.00	1.00
	GA	0	0		A	0.00	0.00
	AA	0	0				
-4010C/T	CC	18	13	0.15 CC vs CT+TT	C	0.75	0.70
	CT	9	16		T	0.25	0.30
	TT	3	1				
-930T/C	TT	0	4	1.84×10 ⁻⁴ TT+TC vs CC	T	0.07	0.37
	TC	4	14		C	0.93	0.63
	CC	26	12				
-803C/T	CC	30	30	N.D.	C	1.00	1.00
	CT	0	0		T	0.00	0.00
	TT	0	0				
143A/C	AA	20	30	3.99×10 ⁻⁴ AA vs AC+CC	A	0.82	1.00
	AC	9	0		C	0.18	0.00
	CC	1	0				
IVS3+26T/C	TT	10	13	0.30 TT vs TC+CC	T	0.57	0.70
	TC	14	16		C	0.43	0.30
	CC	6	1				
IVS3+69G/A	GG	18	13	0.15 GG vs GA+AA	G	0.75	0.70
	GA	9	16		A	0.25	0.30
	AA	3	1				

表 19. (A) イヌ *UCP3* 遺伝子多型の型判定結果：全体 (2)

DNA 多型	遺伝子型	N		P 値	アリル	アリル頻度	
		柴犬	シェルティー			柴犬	シェルティー
IVS3+121T/C	TT	29	14	1.16×10^{-5} TT vs TC+CC	T	0.98	0.67
	TC	1	12		C	0.02	0.33
	CC	0	4				
IVS5-115G/C	GG	10	4	0.13 GG+GC vs CC	G	0.55	0.37
	GC	13	14		C	0.45	0.63
	CC	7	12				
IVS5-100T/C	TT	18	13	0.15 TT vs TC+CC	T	0.75	0.70
	TC	9	16		C	0.25	0.30
	CC	3	1				
838T/C	TT	28	30	0.25 TT vs TC+CC	T	0.97	1.00
	TC	2	0		C	0.03	0.00
	CC	0	0				
1106delAAG	ins ins	18	13	0.15 II vs ID+DD	ins	0.75	0.70
	ins del	9	16		del	0.25	0.30
	del del	3	1				

次に雌雄別に解析した結果、雄で有意差が認められた多型座位は 143A/C および IVS3+121T/C で、変異アリル頻度は 143A/C は柴犬が 0.23、シェルティーが 0.00、IVS3+121T/C は柴犬が 0.00、シェルティーが 0.40 であった。雌においては-4339T/C および-930T/C で有意差が認められ、変異アリル頻度は-4339T/C は柴犬が 0.97、シェルティーは 0.50、-930T/C は柴犬が 0.97、シェルティーが 0.50 であった (表 19 (B, C))。

表 19. (B) イヌ *UCP3* 遺伝子多型の型判定結果：雄 (1)

DNA 多型	遺伝子型	N		P 値	アレル	アレル頻度	
		柴犬	シェルティー			柴犬	シェルティー
-4399C/T	CC	15	15	N.D.	C	1.00	1.00
	CT	0	0		T	0.00	0.00
	TT	0	0				
-4339T/C	TT	0	1	0.21 TT+TC vs CC	T	0.10	0.23
	TC	3	5		C	0.90	0.77
	CC	12	9				
-4160G/A	GG	15	15	N.D.	G	1.00	1.00
	GA	0	0		A	0.00	0.00
	AA	0	0				
-4010C/T	CC	8	5	0.23 CC vs CT+TT	C	0.70	0.63
	CT	5	9		T	0.30	0.37
	TT	2	1				
-930T/C	TT	0	1	0.21 TT+TC vs CC	T	0.10	0.23
	TC	3	5		C	0.90	0.77
	CC	12	9				
-803C/T	CC	15	15	N.D.	C	1.00	1.00
	CT	0	0		T	0.00	0.00
	TT	0	0				
143A/C	AA	8	15	3.16×10 ⁻³ AA vs AC+CC	A	0.77	1.00
	AC	7	0		C	0.23	0.00
	CC	0	0				
IVS3+26T/C	TT	2	5	0.19 TT vs TC+CC	T	0.47	0.63
	TC	10	9		C	0.53	0.37
	CC	3	1				
IVS3+69G/A	GG	8	5	0.23 GG vs GA+AA	G	0.70	0.63
	GA	5	9		A	0.30	0.37
	AA	2	1				

表 19. (B) イヌ *UCP3* 遺伝子多型の型判定結果：雄 (2)

DNA 多型	遺伝子型	N		P 値	アレル	アレル頻度	
		柴犬	シェルティー			柴犬	シェルティー
IVS3+121T/C	TT	15	6	3.50×10^{-3} TT vs TC+CC	T	1.00	0.60
	TC	0	6		C	0.00	0.40
	CC	0	3				
IVS5-115G/C	GG	2	1	0.03 GG+GC vs CC	G	0.47	0.23
	GC	10	5		C	0.53	0.77
	CC	3	9				
IVS5-100T/C	TT	8	5	0.23 TT vs TC+CC	T	0.70	0.63
	TC	5	9		C	0.30	0.37
	CC	2	1				
838T/C	TT	15	15	N.D	T	1.00	1.00
	TC	0	0		C	0.00	0.00
	CC	0	0				
1106delAAG	ins ins	8	5	0.23 II vs ID+DD	ins	0.70	0.63
	ins del	5	9		del	0.30	0.37
	del del	2	1				

表 19. (C) イヌ *UCP3* 遺伝子多型の型判定結果：雌 (1)

DNA 多型	遺伝子型	N		P 値	アレル	アレル頻度	
		柴犬	シェルティー			柴犬	シェルティー
-4399C/T	CC	14	15	0.50 CC vs CT	C	0.97	1.00
	CT	1	0		T	0.03	0.00
	TT	0	0				
-4339T/C	TT	0	3	5.79×10 ⁻⁵ TT+TC vs CC	T	0.03	0.50
	TC	1	9		C	0.97	0.50
	CC	14	3				
-4160G/A	GG	15	15	N.D.	G	1.00	1.00
	GA	0	0		A	0.00	0.00
	AA	0	0				
-4010C/T	CC	10	8	0.36 CC vs CT+TT	C	0.80	0.77
	CT	4	7		T	0.20	0.23
	TT	1	0				
-930T/C	TT	0	3	5.79×10 ⁻⁵ TT+TC vs CC	T	0.03	0.50
	TC	1	9		C	0.97	0.50
	CC	14	3				
-803C/T	CC	15	15	N.D.	C	1.00	1.00
	CT	0	0		T	0.00	0.00
	TT	0	0				
143A/C	AA	12	15	0.11 AA vs AC+CC	A	0.87	1.00
	AC	2	0		C	0.13	0.00
	CC	1	0				
IVS3+26T/C	TT	8	8	0.64 TT vs TC+CC	T	0.67	0.77
	TC	4	7		C	0.33	0.23
	CC	3	0				
IVS3+69G/A	GG	10	8	0.36 GG vs GA+AA	G	0.80	0.77
	GA	4	7		A	0.20	0.23
	AA	1	0				

表 19. (C) イヌ *UCP3* 遺伝子多型の型判定結果：雌 (2)

DNA 多型	遺伝子型	N		P 値	アレル	アレル頻度	
		柴犬	シェルティー			柴犬	シェルティー
IVS3+121T/C	TT	14	8	0.02 TT vs TC+CC	T	0.97	0.73
	TC	1	6		C	0.03	0.27
	CC	0	1				
IVS5-115G/C	GG	8	3	0.50 GG+GC vs CC	G	0.63	0.50
	GC	3	9		C	0.37	0.50
	CC	4	3				
IVS5-100T/C	TT	10	8	0.36 TT vs TC+CC	T	0.80	0.77
	TC	4	7		C	0.20	0.23
	CC	1	0				
838T/C	TT	13	15	0.24 TT vs TC	T	0.93	1.00
	TC	2	0		C	0.07	0.00
	CC	0	0				
1106delAAG	ins ins	10	8	0.36 II vs ID+DD	ins	0.80	0.77
	ins del	4	7		del	0.20	0.23
	del del	1	0				

ハプロタイプ解析では7つのハプロタイプが検出された。柴犬は7種類のハプロタイプ全てが検出されたものの、その頻度には偏りがあった。柴犬の最も頻度が高いハプロタイプはハプロタイプ1の0.46であり、次いでハプロタイプ2の0.25、ハプロタイプ3の0.17となり、約88%がハプロタイプ1、2、3で占められていた(表20)。一方シェルティーではハプロタイプ2、4、7の3種類のハプロタイプのみが検出された。ハプロタイプ4が0.37と最も高頻度であったが、ハプロタイプ7が0.33、ハプロタイプ2が0.30であり頻度においてこの3種類で大差は認められなかった。ハプロタイプ多様度は柴犬0.72、シェルティー0.69であり犬種差は認められなかった。

表 20. イヌ *UCP3* 遺伝子多型のハプロタイプ解析結果

ハプロタイプ	頻度					
	合計	柴犬		シェルティー		
		オス	メス	合計	オス	メス
1 CCGCCCATGTGTTI	0.46	0.37	0.53	0.00	0.00	0.00
2 CCGTCCACATCCTD	0.25	0.30	0.20	0.30	0.37	0.23
3 CCGCCCCCGTCTTI	0.17	0.23	0.13	0.00	0.00	0.00
4 CTGCTCATGTGTTI	0.05	0.10	0.03	0.37	0.23	0.50
5 TCGCCCATGTGTICI	0.02	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00
6 CCGCCCATGTGTICI	0.02	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00
7 CCGCCCATGCCTTI	0.02	0.00	0.03	0.33	0.40	0.27
ハプロタイプ多様度	0.72	0.76	0.71	0.69	0.70	0.69

考察

イヌ *UCP2*、*UCP3* 遺伝子領域 DNA 多型の複数の座位でアレル頻度に犬種差が認められた。イヌ *UCP3* 遺伝子領域多型で有意差の認められた座位に雌雄差が出た理由は、サンプル数によるものと考えられた。

アレル頻度に犬種差が認められた理由としては、まず育種過程における遺伝学的背景の違いが考えられる。シェルティーはイギリス最北端にあるシェットランド諸島原産の牧羊犬である。JKC 監修の最新犬種図鑑ではシェルティーのルーツは『一説によると、ボーダー・コリーの先祖となるスコットランドの小型の家畜番をしていたイヌと、クジラ漁のため北海へ来た猟師がサモエドなどのスピッツ・タイプのイヌの血が混じり、さらにラフコリーを加えて作出されたと伝えられている』と説明されている(社団法人ジャパンケネルクラブ, 2011)。シェルティーは牧羊犬として改良を重ねて作出されたと伝えられている。その一方、柴犬は日本の在来犬である。日本でも昔から犬は狩猟用や護衛用として利用されており、柴犬は小動物や鳥の猟犬として使われていた。1868年頃から西洋犬種が輸入され、柴犬との交配も行われていたが、1928年頃から純粋な柴犬の保護に力を入れはじめ、1936年に天然記念物に指定されている(ジャパンケネルクラブ, 2011)。このような原産国・ルーツの違いが反映されていること

が考えられた。なお他の遺伝子多型においても日本犬はヨーロッパ犬種とはかなり異なることが報告されている (越村ら, 2006)。

アリル頻度に犬種差が認められた理由の2つ目として、第3章において T-Cho 値との関連が示唆されている *UCP3* 遺伝子が、シェルティーが高脂血症になりやすいという遺伝的素因に関係していることが考えられた。T-Cho 値との関連が示唆された 4 SNPs (-4399C/T、-4339T/C、-930T/C、-803C/T) と本章において犬種差が認められた 4 SNPs (-4339T/C、-930T/C、143A/C、IVS3+121T/C) は、-4339T/C および-930T/C が共通であった。第3章ではどちらの多型座位も野生アリル (T) を有している方が T-Cho 値が高いという傾向が確認されているが、本章の解析において、シェルティーの方が T アリルを有している頻度が高いことが示された (シェルティー : 0.37、柴犬 : 0.07)。この2座位もしくはその周辺領域が、シェルティーが遺伝的に高脂血症になりやすいということに関連している可能性が示唆されたが、本研究は遺伝子に着目して研究を始めているため、今後は実際に原発性高脂血症を発症している犬と健康な犬を用いて、イヌ *UCP3* 遺伝子と脂質代謝の関連研究を進めていく必要がある。また、犬種により多型座位のアリル頻度に差があることが明らかになったことから、犬種ごとにマーカー探索を行うことで正確性や有用性が高まると考えられる。

小括

本章では、第2章で検出されたイヌ *UCP2*、*UCP3* 遺伝子多型のアリル頻度の犬種差について、シェットランド・シープドッグ (シェルティー) と柴犬を使用して解析した。シェルティーは遺伝的に T-Cho 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* 遺伝子多型と T-Cho 値との相関が示唆されたことも受け、犬種により多型の特徴が異なるかを柴犬を対照において検討した。*UCP2* 遺伝子多型の 4 SNPs、1 Indel、*UCP3* 遺伝子多型の 4 SNPs において、アリル頻度に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、*UCP3* 遺伝子多型で犬種差が認められた 4 SNPs のうち、2 SNPs 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ることから、シェルティーの高 T-Cho 値に *UCP3* 遺伝子が関連している可能性が考

えられた。

総括

本論文では、イヌの脱共役蛋白質 (Uncoupling Protein: UCP) ファミリーである *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一つになり得るか、分子遺伝学的手法を用いて基礎研究を行った。

本論文では、第1章においてイヌ *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ヶ所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、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* mRNAはユビキタス、*UCP3* mRNAは骨格筋や心臓で発現が強い傾向にあり、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章においては、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、エクソンとその周辺領域の塩基配列をダイレクトシークエンス法で決定した。報告されているイヌゲノム配列と比較し、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* 遺伝子で14ヶ所 (イントロンに9 SNPs、4 Indels、Exon 2 (非翻訳領域) に1 SNP)、*UCP3* 遺伝子で14ヶ所 (イントロンに11 SNPs、Exon 3 (翻訳領域) に1 SNP、Exon 7 (翻訳領域と非翻訳領域) に1 SNP、1 Indel) の多型が同定された。

第3章においては、第2章で同定された全ての多型と生化学検査値 (GLU、TG、T-Chol、LDH) との相関を検討した。サンプルは健康なラブラドル・レトリバー50例を使

用した。イヌ *UCP2*、*UCP3* 遺伝子多型型判定結果を用いて、遺伝子型ごとに各生化学検査値の平均値を算出し、有意差を検討した。その結果、ラブラドル・レトリバー50 検体においては *UCP2* 遺伝子の多型性が低く、-3621T/C、-2913A/T、-748G/A、-636A/G、IVS7-106C/T で全検体が野生アリのホモ型、残りの座位でも、変異アリを有していた個体は 3、4 検体であり、生化学検査値との相関は認められなかった。*UCP3* 遺伝子多型は、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、他の座位は多型性が認められた。第 2 章における 119 検体での解析で同定されている、翻訳領域に位置しアミノ酸変化を伴うと予想される多型 (143A/C) はラブラドル・レトリバー50 検体では検出されなかった。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。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、正確には明らかにされていない。本研究で T-Chol 値との相関が示唆された 4 SNPs はイントロンに位置しているため、直接 *UCP3* 遺伝子の構造を変化させることは無い。イヌ *UCP3* 遺伝子の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 *UCP3* 遺伝子の PPAR 応答配列と類似している配列が付近に確認されたことから、ヒト同様に発現に関与している可能性が示唆された。

第 4 章では、第 2 章で検出されたイヌ *UCP2*、*UCP3* 遺伝子多型のアリ頻度の犬種差について、シェットランド・シープドッグ (シェルティー) と柴犬を使用して解析した。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* 遺伝子多型と T-Chol 値との相関が示唆されたことも受け、犬種により多型の特徴が異なるかを柴犬を対照において検討した。その結果 *UCP2* 遺伝子多型の -3629C/G、-2931A/T、-748G/A、-636A/G、IVS6-133delTCTCCCC、*UCP3* 遺伝子多型の -4339T/C、-930T/C、143A/C、IVS3+121T/C において、アリ頻度に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、*UCP3* 遺伝子多型で

犬種差が認められた 4 SNPs 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ることから、シェルティーの高 T-Cho 値に *UCP3* 遺伝子が関連している可能性が考えられた。

本論文では、イヌ *UCP2* および *UCP3* 遺伝子の DNA 多型に関する基盤的な研究を行い、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。

謝辞

本研究を行うに際して終始懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました、日本獣医生命科学大学獣医保健看護学基礎部門近江俊徳教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究に対し有益な御指導と御援助を賜りました、日本獣医生命科学大学獣医保健看護学基礎部門落合和彦講師、青木博史准教授、浅野潤三博士、獣医保健看護学臨床部門石岡克己准教授に深く感謝の意を表します。

本研究を行うに際して終始多大なご協力を頂き、数々の御配慮を賜りました、日本獣医生命科学大学臨床獣医学部門鷺巣月美教授、盆子原誠准教授、獣医総合教育部門土田修一教授、浅野動物病院の皆様、九州盲導犬協会の皆様、獣医保健看護学基礎部門比較遺伝学研究分野卒業生鄭英和氏、多田尚美氏、河上剛氏、市東正幸氏および比較遺伝学分野在学生の皆様にご感謝致します。最後に、これまで私をあたたく応援してくれた友人、ゆう動物クリニックの皆様、家族にご感謝致します。

引用文献

- Aguirre AL, Center SA, Randolph JF, Yeager AE, Keegan AM, Harvey HJ, Erb HN, 2007. Gallbladder disease in Shetland Sheepdogs: 38 cases (1995-2005). *J Am Vet Med Assoc.* 231: 79-88.
- Akey JM, Ruhe AL, Akey DT, Wong AK, Connelly CF, Madeoy J, Nicholas TJ, Neff MW, 2010. Tracking footprints of artificial selection in the dog genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107: 1160-1165.
- Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, Giacobino JP, 1997. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett.* 408: 39-42.
- Boss O, Hagen T, Lowell BB, 2000. Uncoupling protein 2 and 3: potential regulators of mitochondrial energy metabolism. *Diabetes.* 49: 143-156.
- Bouillaud F, Ricquier D, Thibault J, Weissenbach J, 1985. Molecular approach to thermogenesis in brown adipose tissue: cDNA cloning of the mitochondrial uncoupling protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82: 445-448.
- Bulotta A, Ludovico O, Coco A, Di Paola R, Quattrone A, Carella M, Pellegrini F, Prudente S, Trischitta V, 2005. The common -866G/A polymorphism in the promoter region of the UCP-2 gene is associated with reduced risk of type 2 diabetes in Caucasians from Italy. *J Clin Endocrinol Metab.* 90: 1176-1180.
- Cha MH, Kim IC, Kim KS, Kang BK, Choi SM, Yoon Y, 2007. Association of UCP2 and UCP3 gene polymorphisms with serum high-density lipoprotein cholesterol among Korean women. *Metabolism.* 56: 806-813.
- Chan CB, Harper ME, 2006. Uncoupling proteins: role in insulin resistance and insulin insufficiency. *Curr Diabetes Rev.* 2: 271-283.
- Courcier EA, Thomson RM, Mellor DJ, Yam PS, 2010. An epidemiological study of environmental factors associated with canine obesity. *J Small Anim Pract.* 51: 362-367.
- Dalgaard LT, 2011. Genetic Variance in Uncoupling Protein 2 in Relation to Obesity, Type 2 Diabetes, and Related Metabolic Traits: Focus on the Functional -866G>A Promoter Variant (rs659366). *J Obes.* 2011: 340241.

- De Godoy MR, Swanson KS, 2013. Companion Animals Symposium: nutrigenomics: using gene expression and molecular biology data to understand pet obesity. *J Anim Sci.* 91: 2949-2964.
- De Luis DA, Aller R, Izaola O, De La Fuente B, Conde R, Eiros Bouza JM, 2013. Relation of -55CT polymorphism of UCP3 gene with weight loss and metabolic changes after a high monounsaturated fat diet in obese non diabetic patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 17: 2810-2815.
- De Souza BM, Brondani LA, Bouças AP, Sortica DA, Kramer CK, Canani LH, Leitão CB, Crispim D, 2013. Associations between UCP1 -3826A/G, UCP2 -866G/A, Ala55Val and Ins/Del, and UCP3 -55C/T polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes mellitus: case-control study and meta-analysis. *PLoS One.* 8: e54259.
- Fleury C, Neverova M, Collins S, Rimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, et al., 1997. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet.* 15: 269-272.
- Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JR, Elliott KS, Lango H, Rayner NW, et al., 2007. A Common Variant in the FTO Gene Is Associated with Body Mass Index and Predisposes to Childhood and Adult Obesity. *Science.* 316: 889-894.
- Grzes M, Szczerbal I, Fijak-Nowak H, Szydlowski M, Switonski M, 2011. Two Candidate Genes (FTO and INSIG2) for Fat Accumulation in Four Canids: Chromosome Mapping, Gene Polymorphisms and Association Studies of Body and Skin Weight of Red Foxes. *Cytogenet Genome Res.* 135: 25-32.
- Hamada T, Kotani K, Fujiwara S, Sano Y, Domichi M, Tsuzaki K, Sakane N, 2008. The common -55 C/T polymorphism in the promoter region of the uncoupling protein 3 gene reduces prevalence of obesity and elevates serum high-density lipoprotein cholesterol levels in the general Japanese population. *Metabolism.* 57: 410-415.
- Hashemi M, Rezaei H, Kaykhaei MA, Taheri M, 2014. A 45-bp insertion/deletion polymorphism of UCP2 gene is associated with metabolic syndrome. *J Diabetes Metab Disoed.* 13: 12.

- Inokuma K, Okamatsu-Ogura Y, Omachi A, Matsushita Y, Kimura K, Yamashita H, Saito M, 2006. Indispensable role of mitochondrial UCP1 for antiobesity effect of β 3-adrenergic stimulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 290: E1014-1021.
- Ishioka K, Kanehira K, Sasaki N, Kitamura H, Kimura K, Saito M, 2002. Canine mitochondrial uncoupling proteins: structure and mRNA expression of three isoforms in adult beagles. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 131: 483-489.
- Kagawa Y, Yanagisawa Y, Hasegawa K, Suzuki H, Yasuda K, Kudo H, Abe M, Matsuda S, Ishikawa Y, Tsuchiya N, et al., 2002. Single nucleotide polymorphisms of thrifty genes for energy metabolism: evolutionary origins and prospects for intervention to prevent obesity-related diseases. *Biochem Biophys Res Commun.* 295: 207-222.
- Kosuge K, Soma M, Nakayama T, Aoi N, Sato M, Haketa A, Uwabo J, Izumi Y, Matsumoto K, 2008. Human uncoupling protein 2 and 3 genes are associated with obesity in Japanese. *Endocrine.* 34: 87-95.
- Kozak LP, Britton JH, Kozak UC, Wells JM, 1988. The Mitochondrial Uncoupling Protein Gene. Correlation of exon structure to transmembrane domains. *J Biol Chem.* 263: 12274-12277.
- Lee HJ, Ryu HJ, Shin HD, Park BL, Kim JY, Cho YM, Park KS, Song J, Oh B, 2008. Associations between polymorphisms in the mitochondrial uncoupling proteins (UCPs) with T2DM. *Clin Chim Acta.* 398: 27-33.
- Lehninger Albert Lester, Nelson David L, Cox Michael M 2010. 『レーニンジャーの生化学[下] 第5版』中山和久, 山科郁男, 川崎敏祐, 廣川書店
- Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, Karlsson EK, Jaffe DB, Kamal M, Clamp M, Chang JL, Kulbokas EJ 3rd, Zody MC, et al., 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature.* 438: 803-819.
- Loos RJ, 2012. Genetic determinants of common obesity and their value in prediction. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 26: 211-226.
- Lowell BB, Spiegelman BM, 2000. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature.* 404: 652-660.
- Lund EM, Armstrong PJ, Kirk CA, Klausner JS, 2006. Prevalence and Risk Factors for

- Obesity in Adult Dogs from Private US Veterinary Practices. *Intern J Appl Res Vet Med.* 4: 177-186.
- Mao W, Yu XX, Zhong A, Li W, Brush J, Sherwood SW, Adams SH, Pan G, 1999. UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Lett.* 443: 326-330.
- Martinez-Hervas S, Mansego ML, de Marco G, Martinez F, Alonso MP, Morcillo S, Rojo-Martinez G, Real JT, Ascaso JF, Redon J, et al., 2012. Polymorphisms of the UCP2 gene are associated with body fat distribution and risk of abdominal obesity in Spanish population. *Eur J Clin Invest.* 42: 171-178.
- Masuda K, Hashizume C, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y, 2004. Breed differences in genotype and allele frequency of catechol O-methyltransferase gene polymorphic regions in dogs. *J Vet Med Sci.* 66: 183-187.
- Mealey KL, Minch JD, White SN, Snekvik KR, Mattoon JS, 2010. An insertion mutation in ABCB4 is associated with gallbladder mucocele formation in dogs. *Comp Hepatol.* 9: 6.
- Mitchell P, 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature.* 191: 144-148.
- Mosher DS, Quignon P, Bustamante CD, Sutter NB, Mellersh CS, Parker HG, Ostrander EA, 2007. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genet.* 3: e79.
- Nicholls DG, 2001. A history of UCP1. *Biochem Soc Trans.* 29: 751-755.
- Nishii N, Takasu M, Soe OK, Maeda S, Ohba Y, Inoue-Murayama M, Kitagawa H, 2007. Cloning, expression and investigation for polymorphisms of canine peroxisome proliferator-activated receptors. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 147: 690-697.
- Oktavianthi S, Trimarsanto H, Febinia CA, Suastika K, Saraswati MR, Dwipayana P, Arindrarto W, Sudoyo H, Malik SG, 2012. Uncoupling protein 2 gene polymorphisms are associated with obesity. *Cardiovasc Diabetol.* 11: 41.
- Omachi A, Matsushita Y, Kimura K, Saito M, 2008. Role of uncoupling protein 1 in the anti-obesity effect of β 3-adrenergic agonist in the dog. *Res Vet Sci.* 85: 214-219.
- Park HS, Kim Y, Lee C, 2005. Single nucleotide variants in the β 2-adrenergic and β

- 3-adrenergic receptor genes explained 18.3% of adolescent obesity variation. *J Hum Genet.* 50: 365-369.
- Pawade T, Ho PW, Kwok KH, Chu AC, Ho SL, Ramsden DB, 2005. Uncoupling proteins: targets of endocrine disruptors? *Mol Cell Endocrinol.* 244: 79-86.
- Pedraza N, Rosell M, Villarroya J, Iglesias R, Gonzalez FJ, Solanes G, Villarroya F, 2006. Developmental and tissue-specific involvement of peroxisome proliferator-activated receptor- α in the control of mouse uncoupling protein-3 gene expression. *Endocrinology.* 147: 4695-4704.
- Reis AF, Dubois-Laforgue D, Bellanné-Chantelot C, Timsit J, Velho G, 2004. A polymorphism in the promoter of UCP2 gene modulates lipid levels in patients with type 2 diabetes. *Mol Genet Metab.* 82: 339-344.
- Salopuro T, Pulkkinen L, Lindström J, Kolehmainen M, Tolppanen AM, Eriksson JG, Valle TT, Aunola S, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, et al., 2009. Variation in the UCP2 and UCP3 genes associates with abdominal obesity and serum lipids: the Finnish Diabetes Prevention Study. *BMC Med Genet.* 10: 94.
- Sanchis D, Fleury C, Chomiki N, Goubern M, Huang Q, Neverova M, Grégoire F, Easlick J, Raimbault S, Lévi-Meyrueis C, et al., 1998. BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *J Biol Chem.* 273: 34611-34615.
- Sato K, Agoh H, Kaneshige T, Hikasa Y, Kagota K, 2000. Hypercholesterolemia in Shetland sheepdogs. *J Vet Med Sci.* 62: 1297-1301.
- Schrauwen P, Xia J, Walder K, Snitker S, Ravussin E, 1999. A novel polymorphism in the proximal UCP3 promoter region: effect on skeletal muscle UCP3 mRNA expression and obesity in male non-diabetic Pima Indians. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 23: 1242-1245.
- Skorczyk A, Flisikowski K, Szydlowski M, Cieslak J, Fries R, Switonski M, 2011. Association of MC3R gene polymorphisms with body weight in the red fox and comparative gene organization in four canids. *Anim Genet.* 42: 104-107.
- Solanes G, Vidal-Puig A, Grubic D, Flier JS, Lowell BB, 1997. The human uncoupling protein-3 gene. Genomic structure, chromosomal localization, and genetic basis for short

- and long form transcripts. *J Biol Chem.* 272: 25433-25436.
- Switonski M, Mankowska M, 2013. Dog obesity - the need for identifying predisposing genetic markers. *Res Vet Sci.* 95: 831-836.
- Switonski M, 2014. Dog as a model in studies on human hereditary diseases and their gene therapy. *Reprod Biol.* 14: 44-50.
- Thalmann O, Shapiro B, Cui P, Schuenemann VJ, Sawyer SK, Greenfield DL, Germonpré MB, Sablin MV, López-Giráldez F, Domingo-Roura X, et al., 2013. Complete mitochondrial genomes of ancient canids suggest a European origin of domestic dogs. *Science.* 342: 871-874.
- Van den Berg L, van den Berg SM, Martens EE, Hazewinkel HA, Dijkshoorn NA, Delemarre-van de Waal HA, Heutink P, Leegwater PA, Heuven HC, 2010. Analysis of variation in the melanocortin-4 receptor gene (mc4r) in Golden Retriever dogs. *Anim Genet.* 41: 557.
- Vidal H, Langin D, Andreelli F, Millet L, Larrouy D, Laville M, 1999. Lack of skeletal muscle uncoupling protein 2 and 3 mRNA induction during fasting in type-2 diabetic subjects. *Am J Physiol.* 277: E830-837.
- Vidal-Puig A, Solanes G, Grujic D, Flier JS, Lowell BB, 1997. UCP3: An Uncoupling Protein Homologue Expressed Preferentially and Abundantly in Skeletal Muscle and Brown Adipose Tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 235: 79-82.
- Villarroya F, Iglesias R, Giralt M, 2007. PPARs in the Control of Uncoupling Proteins Gene Expression. *PPAR Res.* 2007: 74364.
- Wang H, Chu WS, Lu T, Hasstedt SJ, Kern PA, Elbein SC, 2004. Uncoupling protein-2 polymorphisms in type 2 diabetes, obesity, and insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 286: E1-7.
- Yoon Y, Park BL, Cha MH, Kim KS, Cheong HS, Choi YH, Shin HD, 2007. Effects of genetic polymorphisms of UCP2 and UCP3 on very low calorie diet-induced body fat reduction in Korean female subjects. *Biochem Biophys Res Commun.* 359: 451-456.
- 荒井延明 2014. 獣医療での脂質代謝治療の現在 3. 臨床例を中心に. *動物臨床医学.* 23: 54-58.

- 石岡克己, 金平克史, 北村浩, 佐々木典康, 木村和弘, 斉藤昌之 2000. イヌ脱共役蛋白質 UCP の cDNA クローニングと mRNA 発現. 獣医生化学. 37 : 65-72.
- 石岡克己, M. M. ソリマン, 奥村正裕, 佐川真由美, 柴田治樹, 本庄勉, 北村浩, 木村和弘, 斉藤昌之 2002. イヌの肥満に対する魚油給餌の効果と UCP 発現. 獣医生化学. 39 : 31-38
- 入江由希子, 斉藤昌之 1999. ミトコンドリア脱共役蛋白質 UCP ファミリーとエネルギー消費・肥満. 化学と生物. 37: 514-520.
- 環境省 2005. ペット動物流通販売実態調査報告書.
- 北川均, 鬼頭克也 2005 「第7章 内分泌・代謝性疾患 7. 肥満・高脂血症」 岩崎利郎, 辻本元, 長谷川篤彦監修. 日本獣医内科学アカデミー編. 『獣医内科学-小動物編-』 文永堂出版. 320-321.
- 越村章子, 井上一村上美穂, 植田祐子, 前島雅美, 北川均, 森田光夫, 岩崎利郎, 村山裕一, Kim. Heui-Soo, Ha. Ji-Hong ら 2006. アジア原産犬種および在来犬の遺伝的多様性. 在来家畜研究会報告. 23: 189-207.
- 斉藤昌之 2006. 「第2部 生体構成分子の代謝と生体エネルギー 12. 代謝の臓器分担と相関」 斉藤昌之, 鈴木嘉彦, 横田博編 『獣医生化学』 朝倉書店. 125-140.
- 佐々木典康, 斉藤昌之, 内田英二, 新山雅美 1996. 犬の肥満に対する脂肪細胞賦活薬を用いた新しい予防・治療法の開発. 動物臨床医学. 5: 11-14.
- 社団法人ジャパンケネルクラブ監修 2011. 『最新犬種図鑑 写真で見る犬種とスタンダード』 インターズー.
- ジャパンケネルクラブ HP [<http://www.jkc.or.jp/modules/worlddogs/>]
- 田名部雄一 1995. イヌ-最古の家畜. 畜産の研究. 49: 167-176.
- 多摩獣医臨床研究会編 1999. 『イヌ・ネコの疾病統計』 インターズー.
- 内閣府 2003. 動物愛護に関する世論調査.
- 日笠喜朗 2014. 獣医療での脂質代謝治療の現在 1. 脂質代謝の基礎と私たちの解析を含めたこれまでの経緯. 動物臨床医学. 23: 44-47.
- 古瀬充宏 2013. 「II 小動物の栄養学 II-1 疾病の栄養学 肥満」 一般社団法人日本ペット栄養学会(編) 『ペット栄養管理学テキストブック』 アドスリー. 116-127.
- 三木哲郎 2000. ヒトゲノム計画と多因子病の解析. 第 118 回日本医学会シンポジウム

記録集. 8-12.

水谷 尚 2014. 獣医療での脂質代謝治療の現在 2. 診断と解析法, 治療. 動物臨床医学. 23: 48-53.

森伸子、酒井美穂、岡田ゆう紀、新井敏郎 2013. 犬におけるアディポネクチンの肥満マーカーの可能性. ペット栄養学会誌. 16: 73-78.

吉田俊秀 2006. 肥満治療成功の秘訣～メタボリックシンドロームを治癒させる為に～. 高崎医学. 56: 45-51.

吉田 眞澄 2013. 現代のペット事情～ペットに関するトラブルと諸制度～ ペットをめぐる現代事情と制度. 独立行政法人国民生活センター. 国民生活. 6: 1-5.