

イヌの肥満候補遺伝子の探索と
遺伝子変異がイヌの代謝機能に与える影響

(The search for canine obesity-related genes and the effects
of genetic mutation on metabolism in dogs)

学位論文の内容の要約

獣医生命科学研究科獣医保健看護学専攻博士後期過程平成 25 年入学

宮部 真裕

(指導教員：左向敏紀)

緒言

肥満とは、摂食によるエネルギー摂取量が基礎代謝、熱産生および運動等による総エネルギー消費を上回った結果、白色脂肪組織に過剰な脂肪が蓄積された状態である。肥満の要因には大きく、食事量や運動量など日々の生活習慣が素因となる環境的要因と代謝レベルに影響を与える遺伝子の変異による遺伝的要因の2種類が挙げられる。ヒトでの肥満の遺伝因子として、脱共役タンパク質（UCPs）遺伝子、レプチン遺伝子、レプチン受容体遺伝子、 $\beta 2$ および $\beta 3$ アドレナリン受容体（ADRB3）遺伝子といった肥満関連遺伝子の異常、近年では G タンパク結合受容体 120（GPR120）遺伝子が報告されている。

GPR120 はグルカゴン様ペプチド-1 やコレシストキニンの分泌などの生化学的機能にかかわる脂肪酸受容体である。GPR120 に関しては様々な遺伝的多型が報告されているが、中でも Arg270His の変異は受容体へのリガンド結合による細胞内シグナルへ影響し、ヒトで肥満に関与する多型であるとの報告がある。GPR120 の mRNA はヒトやマウスの研究報告では肺、空腸、回腸、結腸、視床下部、海馬、脊髄、骨髄、皮膚、白色脂肪組織での発現が報告されている。

ADRB3 は G タンパク質結合受容体で、主に脂肪細胞に発現している。ノルアドレナリンやアドレナリンの刺激により中性脂肪が分解され、グリセロールと脂肪酸を生じ熱産生が起こる。ヒトにおいてこの遺伝子の Trp64Arg の変異を持つヒトは、野生型のヒトより1日の安静時代謝量が 200-220 kcal 少なくなり、肥満や糖尿病のリスクが高まるという報告がある。

近年、ヒトと同様伴侶動物においても肥満は最も一般的な代謝異常であり、都市部で飼われている伴侶動物の 1/3 が肥満であるとされている。さらにイヌでも肥満により関節疾患、膵炎、高脂血症、寿命の短縮など様々な疾患のリスクが増加することが明らかになっている。しかしイヌの肥満関連遺伝子に関する研究報告はなく、イヌの GPR120 遺伝子および ADRB3 遺伝子についても肥満との関係性は明らかになっていない。この2つの遺伝子で SNP が検出され、犬種や肥満度と間に関連性があれば、ヒトと同様 GPR120 および ADRB3 の機能変化による肥満リスクの増加の可能性が考えられる。

本研究では第1章と第2章でイヌの GPR120 遺伝子および ADRB3 遺伝子の SNP 解析と BCS などの表現系との関連性の解析を行った。第3章では ADRB3 遺伝子変異の発現系の作製と変異がタンパク質の機能に与える影響を調査した。

第1章 肥満関連遺伝子としてのイヌ GPR120 遺伝子の塩基解析

GPR120 は G タンパク質結合受容体の中でも遊離脂肪酸受容体ファミリーに属する長鎖脂肪酸および不飽和脂肪酸をリガンドとする受容体である。脂肪酸はβ酸化のエネルギー源としてだけでなく、分子シグナルなどの様々な細胞機能に関与している。

過去の研究報告によると、GPR120 遺伝子欠損マウスに高脂肪食を与えたところ、野生型のマウスと比較して有意な体重増加とエネルギー消費量の低下、脂肪細胞の肥大化が確認された。さらにヒト GPR120 遺伝子の研究では肥満者において Arg270His 変異の遺伝子頻度が高く、脂肪酸に対するシグナル伝達や生理活性が喪失していることも明らかになっており、このことから GPR120 の遺伝子変異は肥満のリスクに関連すると考えられている。

本章ではイヌの GPR120 遺伝子のクローニング、組織発現分布を行った後に、141 の個体で塩基配列の解析し SNP を探索した。発見された SNP に関しては犬種やボディコンディションスコア (BCS) といった肥満度との関連性について検討を行った

クローニングの結果、イヌ GPR120 は ORF を含め 1,086 塩基でヒト、マウス、ラット、ネコ、ウマ、ブタ、シロクマといった他動物種と比較して 84-95% の相同性を持つ。361 基のアミノ酸で構成されており、他動物種との相同性は 78-96% であった。中でも最も相同性が高いのはネコで 96%、もっとも相同性が低いのはラットで 83% であった。組織発現分布解析の結果イヌ GPR120 の mRNA 発現は肺、空腸、回腸、大腸、視床下部、海馬、脊髄、骨髄、皮膚、脂肪組織で確認された。塩基配列解析の結果、同義的置換が 5 種類と非同義的置換が 4 種類の合計 9 種類の SNP が確認された。c.287T>G (p.Leu96Arg) の多型の遺伝子頻度は 141 頭全ての個体において 0.125 で、ビーグル全 36 頭において遺伝子頻度が 0.500 であった。c.595C>A (p.Pro199Thr) は 141 頭中 40 頭で確認されたため、BCS 別に遺伝子頻度を算出した結果、肥満群と正常群と比較して統計的に有意な差(p=0.022)が得られた。

本章の目的は肥満関連候補遺伝子としてイヌ GPR120 の遺伝子多型を解析であった。イヌ GPR120 遺伝子のクローニングに成功し、ヒトやマウスの研究で報告されている組織発現分布と類似した結果を得られた。そこから多数の個体で塩基配列の解析を行ったところ、5 種類の同義的置換と 4 種類の非同義的置換が明らかとなった。その中でも c.595C>A(p.Pro199Thr) について肥満群において有意に遺伝子頻度が高く肥満との関連を示唆する結果が得られた。

第2章 肥満関連遺伝子としてのイヌ ADRB3 遺伝子の塩基解析

β3 アドレナリン受容体(ADRB3)は G タンパク質結合受容体の 1 種であり、7 つの膜貫通領域を有する受容体である。主に脂肪細胞に発現している受容体であり、ノルアドレナリンやアドレナリンがこの受容体に結合すると、中性脂肪の分解が誘導されグリセロールと脂肪酸を生じる過程で熱産生が起こる。

ヒトにおいてこの遺伝子の Exon 内 189 番目の塩基がチミンからシトシンに変異している場合、受容体を構成するアミノ酸の 64 番目がトリプトファンからアルギニンへと変異(Trp64Arg)し、野生型のヒトより 1 日当たりの安静時代謝量がおおよそ 200-220 kcal 減少する、即ち過剰なエネルギーをより体脂肪として貯めやすく肥満や糖尿病のリスクとなる報告がある。

本章ではイヌ ADRB3 遺伝子について、160 頭の個体で塩基配列の解析し SNP を探索した。発見された SNP に関しては犬種やボディコンディションスコア (BCS)といった肥満度との関連性について検討を行った。

塩基配列解析の結果、同義的置換が 5 種類と非同義的置換が 7 種類の合計 12 種類の SNP が確認された。c.749C>T(p.Ser250Phe)の遺伝子頻度は 0.194 であり、統計学的に肥満しやすいとされているヨークシャー・テリアやミニチュア・ダックスフントを中心に 13 犬種で確認された。さらに正常群と肥満群間の遺伝子頻度に有意差(p=0.0001)が存在した。c.1121C>G(p.Pro374Arg)の遺伝子頻度は 0.053 でヨークシャー・テリアやミニチュア・ダックスフントを中心に 7 犬種で確認された。さらに正常群と低体重群間の遺伝子頻度に有意差(p=0.0001)が存在した。c.1184A>C(p.Pro395Gln)の変異は 20 犬種で確認され遺伝子頻度は 0.697 であった。

本章の目的は肥満関連候補遺伝子としてイヌ ADRB3 遺伝子の遺伝子多型を解析することであり、5 種類の同義的置換と 7 種類の非同義的置換が明らかとなった。その中でも c.749C>T(p.Ser250Phe)の SNP において肥満群において正常群と比較して有意に遺伝子頻度が高く肥満との関連を示唆する結果が得られ、さらに c.1121C>G(p.Pro374Arg)の SNP においては低体重群において正常群と比較して有意に遺伝子頻度が高く低体重との関連を示唆する結果が得られた。

第3章 イヌ ADRB3 タンパク発現および機能解析

第1章と第2章においてイヌの2種類の遺伝子でBCSなどの肥満度との関連性が見られるSNPが複数確認された。しかし、これまでの検討は疫学的なデータからの検討であるためそれぞれの遺伝子変異が各受容体タンパク質の機能にどのように影響しているのかは実際には明らかにされていない。

ヒト ADRB3 遺伝子の遺伝子変異においては、Trp64Arg の遺伝子変異を持つ発現ベクターを用いて細胞に変異型の ADRB3 を発現させた研究があり、実際にヒト ADRB3 遺伝子においてはおよそ 200 kcal の代謝能力の差が明らかになっている。それぞれの遺伝子において多数の検体を用いた疫学的な調査により肥満関連遺伝子としての有益なデータは得られたが、実際の機能に与える影響を調査することは個体別の代謝能力を判別する上で重要な要素である事はヒトの研究からも明らかである。

そこで本章ではヒトで報告のある ADRB3 遺伝子の発現研究を参考に、イヌ ADRB3 遺伝子の数種類の遺伝子変異についての発現系の作製および機能解析を行った。

今回 Mock、WT、Ser250Phe、Pro374Arg、Pro395Gln の5系統のタンパク質についてウェスタンブロットを行った結果、抗 HA タグ抗体を用いた解析ではイヌ ADRB3 遺伝子をベクターへ組み込まなかった Mock の解析系を除きイヌ ADRB3 遺伝子をベクターへ組み込んだ WT、Ser250Phe、Pro374Arg、Pro395Gln のすべての解析系においてタンパク質の発現が確認された。

次にイヌ ADRB3 タンパク質を発現させた細胞へアドレナリン(Adr)、ノルアドレナリン(NAdr)、IBMX、RO 20-1724、CL316,243 といったアゴニストを反応させ産生される cAMP の濃度を測定した。brank を除いた全ての解析系に共通して有意差は存在せず更に検出できた cAMP も微量であったものの、WT と比較して Ser250Phe と Pro395Gln の cAMP の濃度が低値を示していた。

本章の目的はイヌ ADRB3 のタンパク質の発現およびイヌ ADRB3 遺伝子の変異が受容体機能へ与える影響を調査することであったが、今回の結果からイヌ ADRB3 の受容体タンパク質の発現系と cAMP 濃度の解析系を確立できたと考える。さらに変異ごとの cAMP 濃度の結果では2種類の変異に野生型の受容体との差が確認された。これらの結果からイヌの $\beta 3$ アドレナリン受容体がヒトのように肥満に関与し、受容体の代謝機能を低下させている可能性が示された。

総括

今回の研究で、イヌ GPR120 およびイヌ ADRB3 の 2 つの遺伝子を肥満関連候補遺伝子として解析を行った。その結果、イヌ GPR120 遺伝子の c.595C>A (Pro199Thr) の遺伝子頻度が正常犬と比較して肥満および過体重のイヌで有意に高かった。イヌ ADRB3 の c.749C>T (Ser250Phe) の遺伝子頻度が過体重群で有意に高く、c.1121C>G (Pro374Arg) の遺伝子頻度は低体重群で有意に高かった。さらにイヌ ADRB3 遺伝子変異と cAMP 濃度関連の解析では、Ser250Phe と Pro395Gln 変異においてアドレナリンアゴニストを加えた際の cAMP 産生の低下が確認され、これらの多型の肥満との関連性が示唆された。今後、遺伝子のスクリーニング検査によるイヌの臨床栄養管理への応用が可能になるかもしれない。