

# イヌの肥満関連遺伝子の探索と 遺伝子変異が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)

宮部 真裕

# イヌの肥満関連遺伝子の探索と 遺伝子変異が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)

宮部 真裕

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：左向 敏紀)

平成 28 年 3 月

## 目次

緒言	・・・ 1
<b>第1章 イヌ GPR120 の遺伝子クローニングと肥満犬における多型調査</b>	
序文	・・・ 6
材料と方法	
1. イヌ GPR120 のクローニング	・・・ 9
2. イヌ GPR120 の組織発現分布解析	・・・ 10
3. 供試動物および血液試料の採取	・・・ 10
4. ゲノム DNA の抽出	・・・ 10
5. イヌ GPR120 遺伝子の増幅と精製	・・・ 11
6. イヌ GPR120 遺伝子の塩基配列解析	・・・ 12
7. イヌ GPR120 の遺伝子多型解析	・・・ 12
結果	
1. イヌ GPR120 の分子構造	・・・ 16
2. イヌ GPR120 の組織発現分布	・・・ 16
3. イヌ GPR120 の遺伝子多型分布	・・・ 17
4. イヌ GPR120 の肥満度別多型解析	・・・ 17
考察	・・・ 25
小括	・・・ 29
<b>第2章 イヌ <math>\beta 3</math> アドレナリン受容体遺伝子の肥満犬における多型調査</b>	
序文	・・・ 30
材料と方法	
1. 供試動物および血液試料の採取	・・・ 33
2. ゲノム DNA の抽出	・・・ 33
3. イヌ ADRB3 の遺伝的増幅と精製	・・・ 34
4. ゲノムを用いたイヌ ADRB3 遺伝子の塩基配列解析	・・・ 34
5. イヌ ADRB3 遺伝子の多型解析	・・・ 35
結果	
1. イヌ ADRB3 の遺伝子解析	・・・ 39
2. イヌ ADRB3 遺伝子多型の犬種別解析	・・・ 39
3. イヌ ADRB3 遺伝子の肥満度別多型解析	・・・ 40
考察	・・・ 46
小括	・・・ 50

<b>第3章 細胞発現系によるイヌ <math>\beta 3</math> アドレナリン受容体変異体の機能解析</b>	
序文	… 51
材料と方法	
1. イヌ ADRB3 変異遺伝子の増幅	… 52
2. 変異遺伝子増幅産物の TA クローニング	… 52
3. 発現ベクターの作製	… 53
4. イヌ ADRB3 タンパク質の細胞発現	… 55
5. イヌ ADRB3 タンパク質の発現解析	… 55
6. イヌ ADRB3 遺伝子変異による受容体機能解析	… 56
結果	
1. ウェスタンブロット法による発現タンパク質の検出	… 61
2. イヌ ADRB3 遺伝子変異が受容体機能に及ぼす影響	… 61
考察	… 65
小括	… 68
総括	… 69
謝辞	… 71
引用文献	… 72
<b>SUMMARY</b>	… 85

## 緒言

肥満とは体脂肪が過剰に蓄積した状態であり、エネルギー摂取量がエネルギー消費量を上回ることによって生じる。イヌにおいて肥満は最も一般的な代謝異常であり、都会で飼育されている犬の3分の1が肥満であると報告されている [Edney, 1974; Yamakita et al., 2010]。肥満は中高齢以上の犬に多く、去勢や不妊手術は性ホルモンのバランスと活動性に影響することによって肥満のリスクを増加させる [Kawasumi et al., 2014; Sonnenschein et al., 1991]。一部の犬種に肥満が多いことが疫学的に示されており、ある報告では肥満になりやすい犬種としてラブラドル・レトリバーやダックスフント、ビーグル、シェットランド・シープドッグ、キャバリア、チワワ、ヨークシャー・テリア、プードルなどが挙げられている [Edney & Smith, 1986; Corbee, 2012; Mankowska et al., 2015]。品種の作出は好ましいとされる形質を持つ個体同士を人為的に交配させることによるため、特定の遺伝子型が特定の品種に蓄積している可能性が高い。事実、内分泌疾患や弁膜症、ある種の神経疾患など、特定の犬種に発症する疾患は数多く知られている [Faller et al. 2016; Voorbij et al., 2015]。

肥満した犬では急性膵炎や高脂血症、関節疾患、高血圧からくる慢性腎不全のリスクが高まっており、近年行われた研究によれば寿命も短縮することが知られている [Brown et al., 1996; Hess et al., 1999; Kealy et al., 2002; Perez et al., 2015; Sims et al., 2016; Verkest et al., 2012; Xenoulis&Steiner, 2010]。肥満は、発症機序によって原発性肥満と二次性肥満に大別される。後者は何らかの基礎疾患の二次的影響として肥満する場合であり、前者はそれ以外の全ての肥満である。原発性肥満はいわゆる「食べ過ぎ」や「運動不足」による肥満であり、基礎疾患を欠くことから以前は単純性肥満とも呼ばれていた。しかし、遺伝因子と環境因子が複合して生じるその複雑な病態が明らかになるにつれ、この名称

は専門家の間ではしだいに使われなくなってきた。哺乳類には体脂肪率を一定に保つ高度な恒常性維持のメカニズムが備わっており、このシステムが破綻して起こる原発性肥満は決して単純な異常とは呼べないのである。

遺伝子レベルでの肥満研究は、1995年のレプチンの発見を契機として急速に進展した。重度の過食によって著しい肥満を呈する *ob/ob* マウスの原因遺伝子がポジショナルクローニング法によって特定され、脂肪細胞で産生される分泌型蛋白、即ちレプチンがその本体であることが明らかにされた。レプチンは視床下部に作用して満腹中枢を刺激し、食欲を低下させるとともに交感神経を刺激して代謝を亢進させる。体脂肪率が増加するとレプチンの分泌も増加するので、より強い摂食抑制効果を発揮し肥満を解消させる。即ち、負のフィードバックによる体脂肪率の維持機構が働いているわけである。前述の *ob/ob* マウスではレプチン遺伝子の一部が変異して正常な蛋白を産生できなくなっており、そのため摂食行動を制御できないことが重度肥満の原因であった [Lee et al., 2015]。肥満したヒトでは血中レプチン濃度は正常域を超えて増加し、十分に効果を発揮していないことが知られているが、この現象はレプチン抵抗性と呼ばれている [Frederich et al., 1995. Singh et al., 2015]。

イヌにおいても、肥満関連遺伝子の研究がいくつか報告されている。レプチンはイヌでも遺伝子クローニングが行われ、ヒトやマウスと同様に脂肪組織で産生され血液中に分泌されることが明らかにされている [Balogh et al., 2012; Di Loria et al., 2014; de Godoy et al., 2013; Iwase et al., 2000]。特異抗体を用いた ELISA で測定すると肥満犬ではレプチンの血中濃度は高値を示し [Ishioka, 2002; Ishioka, 2006]、ヒトと同様レプチン抵抗性となっていることが推察される [Park et al., 2015; Platt et al., 2016; Verkest et al., 2011]。ヒトではレプチン遺伝子の異常により重度肥満を示す症例が報告されているが、イヌにおいて同様の報告は今のところなされていない。

メラノコルチン 4 型受容体 (melanocortin 4 receptor, MC4R) は、視床下部で摂食行動を抑制する重要な分子であり、ヒトでは遺伝子変異が摂食亢進と肥満を惹起することが報告されている [Bradnova et al., 2015]。近年、MC4R の変異とイヌの体重の関係を疫学的に示した研究が報告され [Zeng et al., 2014]、MC4R がイヌにおいても肥満関連遺伝子の一つである可能性が指摘されている。ただしこの研究では表現型として体重が指標に使われており、厳密には肥満度について調べられたわけではない。

脱供役蛋白質 (uncoupling protein, UCP) はミトコンドリア内膜に存在する熱産生分子であり、ヒトでは遺伝的多型が代謝に影響を及ぼすことが知られている。イヌの UCP は 1-3 のアイソフォームがクローニングされ [Ishioka et al., 2002]、多種との高い相同性や類似した組織発現分布が確かめられている。近年、イヌにおいても UCP2 と UCP3 の遺伝的多型が調査され、一部の変異が脂質代謝に関与する可能性が示されている [Udagawa et al., 2014]。一般的に、UCP は肥満のリスク因子であるとともに治療のためのターゲット分子としても注目される [Boss et al., 1998; Clapham et al., 2000; Ricquier & Bouillaud, 2000]。例えば、イヌでは実験的に多価不飽和脂肪酸を多く含む食事が骨格筋で UCP3 の発現を増加させること [Ishioka et al., 2002]、 $\beta 3$  アドレナリン受容体の選択的作動薬が白色脂肪組織で UCP1 の異所性発現を促すことなどが報告されており、これらはいずれも抗肥満効果を発揮する [Brodani et al., 2014; Nakamura et al., 2001; Omachi et al., 2007; Sasaki et al., 1998]。

肥満の治療は、エネルギー摂取量を低下させるか、もしくは消費量を増加させるかのいずれかによる。後者の代表に運動療法があるが、心疾患や関節疾患など肥満犬では運動そのものが困難なケース例も少なくない。臨床的には、肥満治療や肥満予防は主に食事療法によって行われる。給餌量を決めるための計算は、体重から安静時エネルギー要求量 (resting energy requirement, RER) を求

め、それに適切な係数をかけて得られた 1 日当たりエネルギー要求量 (daily energy requirement, DER) に基づいている。しかし、実際は計算で得られた RER には大きな誤差が存在し、個体によって多すぎたり少なすぎたりということが起こる。このような個体レベルでのエネルギー要求量の違いは、代謝に関連する遺伝子レベルでの違いによるものと考えられる。事実、ヒトでは既にいくつかの遺伝子多型が肥満リスクに関与することが知られており、肥満専門外来では事前に遺伝子検査を行ってそれらの遺伝子型を調べ、患者ごとの代謝レベルを基礎データとして利用することが行われている。例えば、UCP 遺伝子、レプチン遺伝子、レプチン受容体遺伝子、 $\beta 2$  アドレナリン受容体 (adrenoceptor beta 2, ADRB2) 遺伝子、 $\beta 3$  アドレナリン受容体 (adrenoceptor beta 3, ADRB3) 遺伝子などが利用されている [Baturin et al., 2012; Daghestani et al., 2012; Iwasa et al., 2000; Ohshiro et al., 2000; Sahin et al. 2013]。獣医療ではまだそこまでの評価は行われていないが、栄養管理上の基礎データとして有用性は高いものと考えられる。

本研究では、近年注目を集めている GPR120 と、以前より多くの研究が行われてきた ADRB3 という 2 つの代謝関連遺伝子に着目し、その多型がイヌの肥満リスクと関係する可能性について検証した。GPR120 は中鎖および長鎖脂肪酸をリガンドとする脂肪酸受容体であり [Hirasawa et al., 2005; Ichimura et al., 2012; Katsuma et al., 2015]、Arg270His の変異はヒトにおいて肥満リスクを高めるとされる。一方、ADRB3 はアドレナリン受容体の一種であり、主に脂肪細胞に発現して脂肪分解に促進的に作用する [Skeberdis, 2004]。ヒトにおいて ADRB3 の Trp64Arg の変異は安静時代謝量を 200-220 kcal 減少させ、肥満リスクに関与する。これらの遺伝子に含まれる一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) がイヌの肥満と関係することが明らかになれば、個体別栄養管理のための基礎データとして有用であり、将来的には遺伝子検査項目とし



での利用が期待される。

## 第1章 イヌ GPR120 の遺伝子クローニングと肥満犬における多型調査

### 序文

近年、ヒトやマウスにおけるゲノム解析研究の成果として、多くのオーファ  
ン G タンパク質共役型受容体 (G protein coupling receptor, GPCR, GPR) が発見  
されている。また、それらを対象に行われたリガンド探索の結果、脂肪酸と結  
合して活性化される脂肪酸受容体が複数種見い出され、一つの受容体ファミリ  
ーを形成していることが明らかになってきた。例えば、GPR41 と GPR43 は短  
鎖脂肪酸受容体として、GPR84 は中鎖脂肪酸受容体として、GPR40 は長鎖脂肪  
酸および不飽和脂肪酸受容体として機能し、様々な生理活動に関与することが  
報告されている [Fukunaga et al., 2006]。脂肪酸が  $\beta$  酸化のエネルギー源として  
だけでなく、分子シグナルとして多くの細胞機能に関与することは以前より知  
られていた [Chawla et al., 2001]。しかし脂肪酸受容体の構造や生体分布につい  
ては長らく不明のままで、それらを標的とした臨床研究も実施は困難であっ  
た。リガンド探索により異なる脂肪酸を識別する一連の GPR 分子が発見され  
たことで、現在この分野の研究は急速に進展しつつある [Moran et al., 2016]。

GPR120 は、前述の受容体ファミリーに含まれる分子としてマウスやヒトの  
細胞からクローニングされた脂肪酸受容体の一つで、長鎖脂肪酸および不飽和  
脂肪酸の内因性リガンドとされている [Milligan et al., 2015]。飽和脂肪酸 (C14-  
18) や不飽和脂肪酸 (C16-22) によって活性化された GPR120 は  $G_q$  タンパク質  
と共役し、細胞外シグナル調節性キナーゼ (Extracellular signal-regulated kinase,  
ERK) を活性化することで細胞機能の発現を促す。例えば、GPR120 はヒトや  
マウスでは腸管組織に高発現し、コレシストキニン (cholecystokinin, CCK) や  
グルカゴン様ペプチド (Glucagon-like peptide, GLP) -1 など消化管ホルモンの分

泌に関与することが明らかにされている [Richards et al., 2015; Tanaka et al., 2008]。脂肪の消化によって生じた脂肪酸は CCK 分泌を促し、膵外分泌を刺激する。一方、GLP-1 はインクレチン作用を発揮してインスリン分泌を促し、脂肪蓄積を促進する。即ち GPR120 は、腸管内の脂肪酸によって引き起こされるこれらの生理活動を仲介する役割を持っている。GPR120 は脂肪組織にも発現が見られ、脂質代謝に深く関与する。3T3-L1 細胞を用いた *in vitro* の研究では、GPR120 が脂肪細胞の分化に促進的に働くことが示されている [Gotoh et al., 2007; MacDougald et al., 1995]。GPR120 遺伝子欠損マウスに高脂肪食を与えた研究では、野生型マウスと比較して有意なインスリン抵抗性の増加、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 [Suckow et al., 2014]。さらに、ヒトにおける GPR120 遺伝子の多型解析調査では、肥満者において 270 番目のアルギニンがヒスチジンに変異 (Arg270His) している頻度が高く、肥満リスクに関与することが疫学的に示されている。この変異の影響について細胞発現系を用いて行われた *in vitro* の研究によれば、変異体では脂肪酸が結合したときの細胞内シグナル伝達が野生型に比べて低下することが確かめられている [Bonnefond et al., 2015]。即ち、GPR120 はヒトにおいて肥満関連遺伝子であり、Arg270His は肥満のリスクとなる変異であると考えられる。

イヌやネコにおいても脂肪酸は重要な生体機能調節因子であるが、脂肪酸受容体の研究は獣医領域では始まったばかりである。近年、ネコの GPR40 と GPR120 について遺伝子クローニングを行った研究報告がなされたが、イヌの GPR 分子についての報告はまだなされておらず、臨床的意義も不明である [Habara et al., 2015]。イヌにおいても GPR120 に遺伝子変異が見つかれば肥満リスクに関与する可能性があり、遺伝子検査項目として有用かも知れない。

本章では、まずイヌの GPR120 遺伝子のクローニングを行い、GPR120 がイヌにおいても発現しているか、またヒトやマウスと相動性の高い構造を有して

いるかについて調査した。次に、イヌ **GPR120** の組織別発現分布を調べ、腸管や脂肪組織など、これまでに得られた他種と同様の臓器で発現が見られるかを確認した。最後にこれらを踏まえ、臨床現場で 141 頭の犬から得られたゲノム DNA を材料として多型調査を行い、イヌにおける **SNP** の探索を実施した。

**SNP** が見つかった場合は、犬種ごとの遺伝子頻度、および肥満度の指標であるボディコンディションスコア (**body condition score, BCS**) との関連について疫学的に解析した。

## 材料と方法

### 1. イヌ GPR120 のクローニング

他の実験のために犬の回腸組織から抽出され、-80℃で凍結保存されていた Total RNA 液を材料として使用した。解凍された Total RNA 液は吸光度 260 nm および 280 nm で蛋白濃度および純度を測定した後、逆転写 PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) に使用した。まず、cDNA を作製するため Total RNA を RNA template として用いて Quantiscript reverse transcriptase (Qiagen, Germany) による逆転写を行った。即ち 2  $\mu$ l の 7 $\times$ gDNA Wipeout Buffer と 8  $\mu$ l の RNA template (50ng/ $\mu$ l)、4  $\mu$ l の RNase free water を混合し、42℃ /10 分間でインキュベートした。その後、インキュベートした反応産物 14  $\mu$ l と 1  $\mu$ l の Quantiscript Reverse Transcriptase、4  $\mu$ l の 5 $\times$ Quantiscript RT Buffer、1  $\mu$ l の RT Primer Mix を混合し、42 °C/ 30 分間と 95 °C/ 3 分間でインキュベートした。次に、生成した cDNA を鋳型とし、ゲノムデータベース上のイヌ GPR120 塩基配列情報をもとに 5'-および 3'-非翻訳領域に設計したプライマー対 (表 1-1, ORF-Fwd と ORF-Rev) を用いて PCR を行い、イヌ GPR120 翻訳領域を増幅した (図 1-1)。PCR は PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa, Japan) を用いて、2 Step 法により 98.0℃/10 秒間、70℃/90 秒間、30 cycle の条件で実施した。

得られた PCR 産物をエチジウムブロマイドを添加した 1.5%アガロースゲルで電気泳動し、365 nm の紫外線下で観察した。予想される分子サイズである 1,193 bp 付近にバンドが見られるかを確認し (図 2)、PCR Purification Kit

(QIAGEN, Germany) を用いて PCR 産物を精製した。塩基配列の解析は、外部委託 (Eurofins Genomics, Japan) にて実施した。

## 2. イヌ GPR120 の組織発現分布解析

イヌ GPR120 の組織発現分布を解析するため、材料として肺、胃、十二指腸、空腸、回腸、結腸、肝臓、腎臓、脳、視床下部、海馬、脊髄、骨髄、骨格筋、皮膚、脂肪の 16 組織のイヌ Total RNA (AMS Biotechnology, UK) を使用した。逆転写およびイヌ GPR120 遺伝子の PCR 増幅は前述のクローニングと同じ条件で実施した。また、陽性コントロールとしてイヌ  $\beta$ -actin の PCR 増幅も同時に行った (表 1-2,  $\beta$ -actin-Fwd と Rev)。電気泳動とバンド観察は、クローニングと同じ方法で実施した。

## 3. 供試動物および血液試料の採取

2012 年から 2013 年にかけて日本獣医生命科学大学附属動物医療センター (東京都武蔵野市) および愛甲石田動物病院 (神奈川県伊勢原市) に来院した犬 141 頭 (6 ヶ月齢-14 歳、雄 69 頭/雌 72 頭、21 犬種) を対象とした。各個体のデータとして、年齢、性別、犬種、BCS 等を記録した。

## 4. ゲノム DNA の抽出

全血 1 ml を採取後、直ちにエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) チューブに移して抗凝固処理を行い、Flexi Gene DNA Kit (Qigen, Japan) を用いてゲノム DNA を抽出した。即ち、15 ml 遠心チューブに界面活性剤を含む Buffer FG 1 を 2.5 ml と血液を 1 ml 添加して、上下に 5 回転倒混和後、2,000 g/21°C で 5 分間遠心した。上清をデカントして清潔な紙の上にチューブを転倒後 2 分間静置し、DNA とタンパク質を含むペレットを得た。次に 0.5 ml の Buffer FG 2 と Qiagen Protease 混合液にて得られたペレットを再懸濁し、迅速にペレットが均一化されるまで攪拌後、65°C/10 分間インキュベートした。このとき、ゼリー状の粘稠性のあるペレット残留物が存在した場合には、30  $\mu$ l の Buffer FG 2 を

添加し再度攪拌してインキュベートした。サンプル中のタンパク質が分解され、色が赤からオリーブ色に変化したことを確認後、0.5 ml の 100% イソプロパノールを添加して上下に激しく振盪し、ゲノム DNA を抽出した。2,000 g/3 分間で遠心後、上清を捨て、清潔な紙の上に静置した。ゲノム DNA を洗浄するため、0.5 ml の 70% エタノールを添加して 5 秒間攪拌し、2,000 g/3 分間で遠心後、上清を捨て清潔な紙の上に転倒して 5 分間静置した。その後、液体が完全に蒸発するまで、DNA を 5 分間空気乾燥させた。液体の蒸発後、Buffer FG 3 を 300  $\mu$ l 加え、低速で 5 秒間攪拌し、65°C/1 時間から一晩インキュベートして再懸濁した。回収したゲノム DNA は Nano Drop (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて吸光度を測定し、吸光度 260 nm および 280 nm で蛋白濃度および純度を測定した。

## 5. イヌ GPR120 遺伝子の増幅と精製

ゲノムデータベース上に記録されているイヌ GPR120 遺伝子 (NC\_006610.3) の、3 つの Exon 領域を挟むように設計したプライマー対 (表 1, Exon 1-3) を用いて PCR を行った (図 3)。PCR には Mighty Amp DNA Polymerase (TaKaRa, Japan) を用い、Exon 1 は 98.0°C/10 秒間、72.0°C/90 秒間を 30 cycle のステップ法で、Exon 2 および Exon 3 は 98.0°C/10 秒間、66°C/15 秒間、72°C/90 秒間の 30 cycle で実施した。

得られた PCR 産物をエチジウムブロマイドを添加した 1.5% アガロースゲルで電気泳動し、365 nm の紫外線下で観察した。予想される分子サイズ付近にバンドが見られるかを確認し、PCR Purification Kit (QIAGEN, Japan) を用いて PCR 産物を精製した。即ち、1.5 ml チューブで PCR サンプル 20  $\mu$ l と Buffer PBI (結合バッファー) 100  $\mu$ l を混和後、DNA 結合のためにカラムをセットした 2 ml のコレクションチューブに全量アプライし、13,000 rpm/1 分間遠心操作

した。遠心後、廃液を棄てて同じチューブ上にカラムを再度セットし、250  $\mu$ l の Buffer PE（洗浄バッファー）を添加して 13,000 rpm/ 30 秒間の条件で遠心操作した。新しい 1.5 ml チューブにカラムをセットし、20  $\mu$ l の Buffer EB（溶出バッファー）をカラムの中央に添加して 1 分間静置後、13,000 rpm/1 分間で遠心操作し、精製 DNA を回収した。

## 6. イヌ GPR120 遺伝子の塩基配列解析

イヌ GPR120 遺伝子の塩基配列解析のため、Big Dye Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems, Japan）を用いて精製 DNA の 1 本鎖 PCR を行った。Exon 部分を増幅するように設計した 3 対のプライマーを使用し、反応液 10  $\mu$ l 中の組成は以下の通りとした。PCR チューブに Ultra Pure Water を 5.5  $\mu$ l、プライマー（1.6 pmol/ $\mu$ l）を 1.0  $\mu$ l、5 x Big Dye Sequence Buffer を 1.5  $\mu$ l、Big Dye Terminator を 1.0  $\mu$ l 添加した。反応条件は始めに 96°C/1 分間、その後 96°C/10 秒間、50°C/5 秒間、60°C/4 分間を 35 cycle 繰り返し、最後に 4°C で維持した。塩基配列の解析は、クローニングと同様に外部委託（Eurofins Genomics, Japan）で実施した。

## 7. イヌ GPR120 の遺伝子多型解析

141 頭の犬の全血から抽出したゲノム DNA 検体を材料にイヌ GPR120 の塩基配列を解析し、ゲノムデータベース上に記録されているイヌ GPR120 遺伝子（NC\_006610.3）の塩基配列と比較した。SNP が見つかった場合は記録し、各 SNP の遺伝子頻度を犬種別、または BCS 別に算出し、比較した統計解析にはカイ二乗検定を用いた。



表 1-1 イヌ GPR120 遺伝子の解析に用いたプライマーの塩基配列

名称	塩基配列 (5'-3')	PCR 産物 (bp)
ORF-Fwd	GGCATGTCCCCTGAGTGCG	1,193
ORF-Rev	GGCTACATTGATGTCATGCACCTGG	
Exon 1-Fwd	AGGTGTCGCAACCGCCTC	810
Exon 1-Rev	ACAGCGACACAGCGGGCA	
Exon 2-Fwd	AGCCAGAGCCAAACAAGCA	223
Exon 2-Rev	GCTGATTCCAAGCCTAAGTGG	
Exon 3-Fwd	TAGCTGCTTTGCTCCTCCAA	502
Exon 3-Rev	ATCATGGCTTTCCAGAGGGT	
$\beta$ -actin-Fwd	GCCAACCGTGAGAAGATGACT	90
$\beta$ -actin-Rev	CCCAGAGTCCATGACAATACCAG	

Fwd : 上流側、Rev : 下流側

ORF : Open reading frame (翻訳領域) を増幅

Exon 1-3 : それぞれイヌ GPR120 の 3 つの Exon を増幅

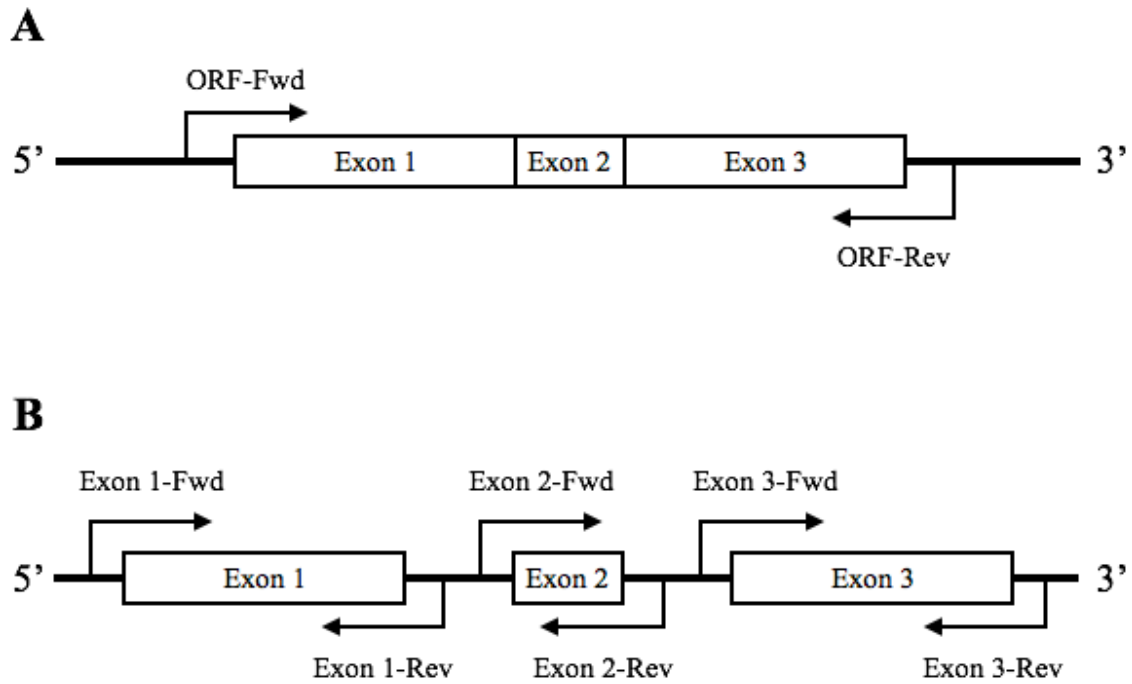


図 1-1 イヌ GPR120 遺伝子増幅に用いたプライマーの設計位置

A : cDNA クローニングのためのプライマー対 (ORF-Fwd,Rev) は、スプライシング後の翻訳領域を挟むようにイントロン上に設計した。B : ゲノム DNA 増幅のためのプライマー対 (Exon 1,2,3-Fwd,Rev) は、各 Exon の上流と下流のイントロン上に設計し、3 つの Exon を個別に増幅する配置とした。各プライマーの塩基配列と予想される PCR 産物のサイズは表 1-1 に示した。

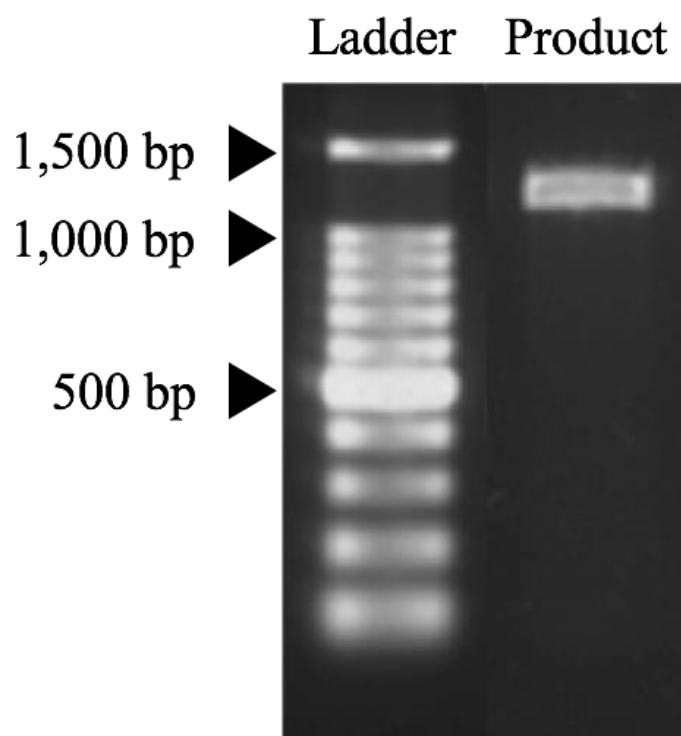


図 1-2 イヌ GPR120 翻訳領域の cDNA クローニング

イヌ空腸から抽出した mRNA から逆転写反応で作製した cDNA を鋳型として、イヌ GPR120 遺伝子の翻訳領域を含む領域を増幅した。電気泳動の結果、予想される 1,193 bp 付近に単一バンドを確認した。

## 結果

### 1. イヌ GPR120 の分子構造

イヌ回腸組織から抽出した RNA を材料として RT-PCR 法で GPR120 遺伝子の cDNA クローニングを行ったところ、PCR 産物は予想される 1,193 bp 付近に単一バンドを生成した (図 1-1)。この PCR 産物を精製して塩基配列を解析し、ゲノムデータベース上の配列と比較した結果、イヌ GPR120 遺伝子が増幅されていることが確認できた。

イヌ GPR120 の翻訳領域は 1,086 bp からなり、361 個のアミノ酸をコードしていることが明らかとなった (DNA Data Bank of Japan, LC019015)。その塩基配列はヒト、マウス、ラット、ネコ、ウマ、ブタ、シロクマなど他の動物種と 84-95% の相同性を持ち、この中で最も高い相同性を示した動物種はネコで 95%、最も低い相同性を示したのはラットで 84% であった。アミノ酸配列で比較した場合、他の動物種との相同性は 78-96% であり、この中で相同性が最も高いのはネコで 96%、最も低いのはラットで 83% であった (図 1-3、表 1-2)。

### 2. イヌ GPR120 の組織発現分布

イヌ GPR120 の組織発現分布について、RT-PCR 法を用いて解析した。イヌ GPR120 の mRNA は肺、空腸、回腸、結腸、視床下部、海馬、脊髄、骨髄、皮膚、脂肪組織で発現が確認され、特に結腸では強いバンドが認められた。発現が確認できなかったのは、胃、十二指腸、肝臓、腎臓、小脳、骨格筋であった。一方、陽性コントロールとして増幅した  $\beta$ -actin は全ての組織で発現が確認された (図 1-4)。

### 3. イヌ GPR120 の遺伝子多型分布

141 頭の犬の GPR120 遺伝子を解析したところ、全部で 9 種類の SNP が確認された。うち 5 種類はアミノ酸変異の無い同義置換であり、変異部位は c.252C>G、c.282C>G、c.702A>G、c.726G>A、c.984T>C であった。一方、残り 4 種類はアミノ酸が変異する非同義置換であり、変異部位は c.287T>G (Leu96Arg)、c.307G>A (Ala103Thr)、c.446G>C (Gly149Ala)、c.595C>A (Pro199Thr) であった。各遺伝子型が見られた頭数や遺伝子頻度の詳細は、表 1-3 に示した。また、非同義置換の見られた部位が受容体の高次構造上で占める位置の詳細は、図 1-5 に示した。

4 つの非同義置換が見られた個体数を犬種別に集計したところ、SNP ごとにやや特徴的な分布が見られた。c.287T>G (Leu96Arg) は 21 犬種中ビーグルのみに見られ、ビーグル群に着目すると半数近くがこの変異を有していた。c.307G>A (Ala103Thr) は全頭中ラフ・コリー 1 頭でのみ確認され、その 1 頭も遺伝子型はヘテロであった。c.446G>C (Gly149Ala) は 5 頭の犬で確認され、その内訳はミニチュア・ダックスフント 1 頭 (ホモ)、ボルゾイ 2 頭 (いずれもヘテロ)、ボーダー・コリー 2 頭 (いずれもヘテロ) であった。c.595C>A (Pro199Thr) は、4 つの非同義置換の中では最も多く 141 頭中 15 犬種 40 頭で確認され、遺伝子頻度は 0.191 であった (表 1-4)。

### 4. イヌ GPR120 の肥満度別多型解析

4 種類の非同義置換のうち、c.595C>A (Pro199Thr) は 141 頭中 40 頭で確認され、統計解析に耐える例数が得られたため、BCS 別に遺伝子頻度を算出比較した。その結果、肥満を示す BCS=5/5 個体群での遺伝子頻度は 0.312、過体重を示す BCS=4/5 個体群での遺伝子頻度は 0.324、適正を示す BCS=3/5 の個体群での遺伝子頻度は 0.175、低体重を示す BCS=2/5 の個体群での遺伝子頻度は

0.000 であった。BCS=4/5 および 5/5 の個体群を広義の肥満群ととらえ、合わせて算出すると遺伝子頻度は 0.320 となり、SNP c.595C>A おける C と A の遺伝子頻度間の比較、統計解析の結果正常個体群 (BCS=3/5) と比較して肥満群 (BCS=4/5 + 5/5) において有意に高かった ( $p=0.022$ , 表 1-5)。

<b>Dog</b>	1	MSPECAQAPGAGSPRSLERANRTRFPFFSDVKGDHRLVLTAVETVVVLALIFAVSLLGNVC	60
<b>Cat</b>	1	.....A.T.....	60
<b>Pig</b>	1	..L....ACT.PA...S.....ST.....V.....	60
<b>Human</b>	1	.....R.A.DAPL...Q.....A...T..V.....	60
<b>Mouse</b>	1	.....TT.P.PSHT.DQV...H.....SV...T..G...V.....	60
	61	ALVLVARRRRRGTTACLVNLFCADLLFTSAIPPVRAVRWTEAWLLGPVACHLLFYVMSL	120
	61	.....AGT.....	120
	61	.....G...S.....L.L.....S.....T.	120
	61	.....A.....I...L.L.....T.	120
	61	.....A..S.....L.LV.....V.....TM	120
	121	SGSVTILTLAAVSLERVVCIVRLQRGARGLGRRARAALLALVWGYSALAALPLCVFFHV	180
	121	.....M.....V.....I.....QCC	180
	121	.....M.....V..P.....I.....I..R..	180
	121	.....M...H...V..P...V...I...V.....R..	180
	121	.....M.....R..LS.P...TQ....FI.....IL.R..	180
	181	PORLPGRDQEILICTLAWPSVAGEISWDVSVFTLNFLVPGLLIVISYSKILQITKASRKR	240
	181	...S.....P...S...I.....M.....	240
	181	..F..A.....I.....R.	240
	181	.....A...S...I..TIP.....V.....	240
	181	.....G...P...D..NRI.....F.....V.....	240
	241	LTVNLAYSESHHIRVSQQDFRLFRTLFLLMISFFIMWSOIIITILLILIQNFKQDLVIWP	300
	241	.....S.....	300
	241	..MS.....Q.....V.....N.....	300
	241	...S.....Q.....V.....	300
	241	..LS.....Q.....Y.....V.....R.....	300
	301	SLFFWVVAFTFANSALNPILYNMSLFRNEWKIFHCFFYPEKGAMFTDTSVRRNDLSIIYS	361
	301	.....V.SN	361
	301	.....M.....V.....F.....F.....V.S.	361
	301	.....T.C...K...C..WF....IL....K.....SG	361
	301	.....C...F....I.....V.S.	361

図 1-3 イヌ GPR120 分子の一次構造および他の動物種との比較

イヌの GPR120 は 361 個のアミノ酸からなり、多種のものと高い相同性を示した。最上段にイヌのアミノ酸配列を 1 文字表記で、2 段目以下はネコ、ブタ、ヒト、マウスの配列がイヌのものと異なる箇所についてそれぞれ示した。

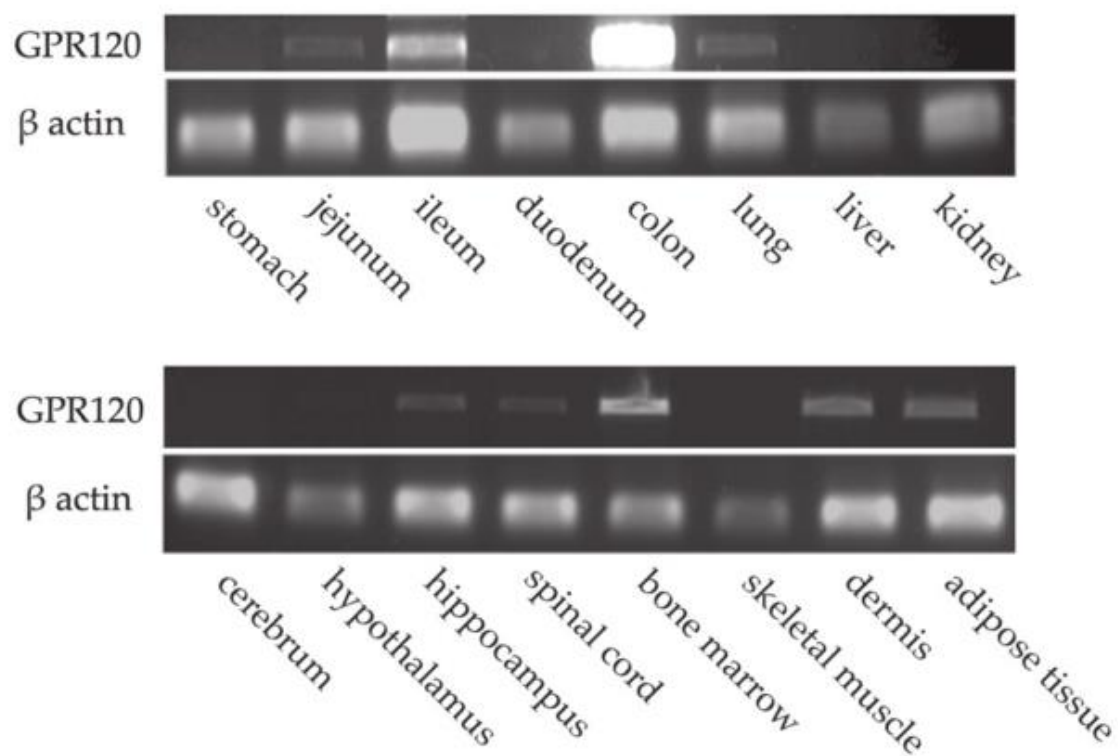


図 1-4 イヌ GPR120 の組織発現分布

16 種のイヌ組織における GPR120 遺伝子の発現の有無を、RT-PCR 法にて解析した。胃、空腸、回腸、十二指腸、結腸、肺、肝臓、腎臓、小脳、視床下部、海馬、脊髄、骨髄、骨格筋、皮膚、脂肪組織における結果をそれぞれ示す。下段には、陽性対照として同じ組織における  $\beta$ -actin の発現を示した。



表 1-2 イヌ GPR120 の分子構造における他動物種との相同性

	塩基	アミノ酸	Accession
ネコ	95%	96%	XM_003994220.2
シロクマ	93%	94%	XM_008696357.1
ブタ	90%	89%	NM_001204766.1
ウマ	89%	86%	XM_001500867.2
ヒト	89%	84%	BC_101175.2
マウス	84%	85%	NM_181748.2
ラット	84%	83%	NM_001047088.1

表 1-3. イヌ GPR120 多型解析で検出された遺伝子多型 (n=141)

	変異		頭数		遺伝子頻度
	遺伝子	アミノ酸	ヘテロ	ホモ	
同義置換	c.252C>G	-	10	9	0.099
	c.282C>G	-	9	4	0.060
	c.702A>G	-	0	1	0.007
	c.726G>A	-	6	3	0.043
	c.984T>C	-	40	19	0.277
非同義置換	c.287T>G	Leu96Arg	11	9	0.103
	c.370G>A	Ala103Thr	1	0	0.004
	c.446G>C	Gly149Ala	5	0	0.010
	c.595C>A	Pro199Thr	28	12	0.191

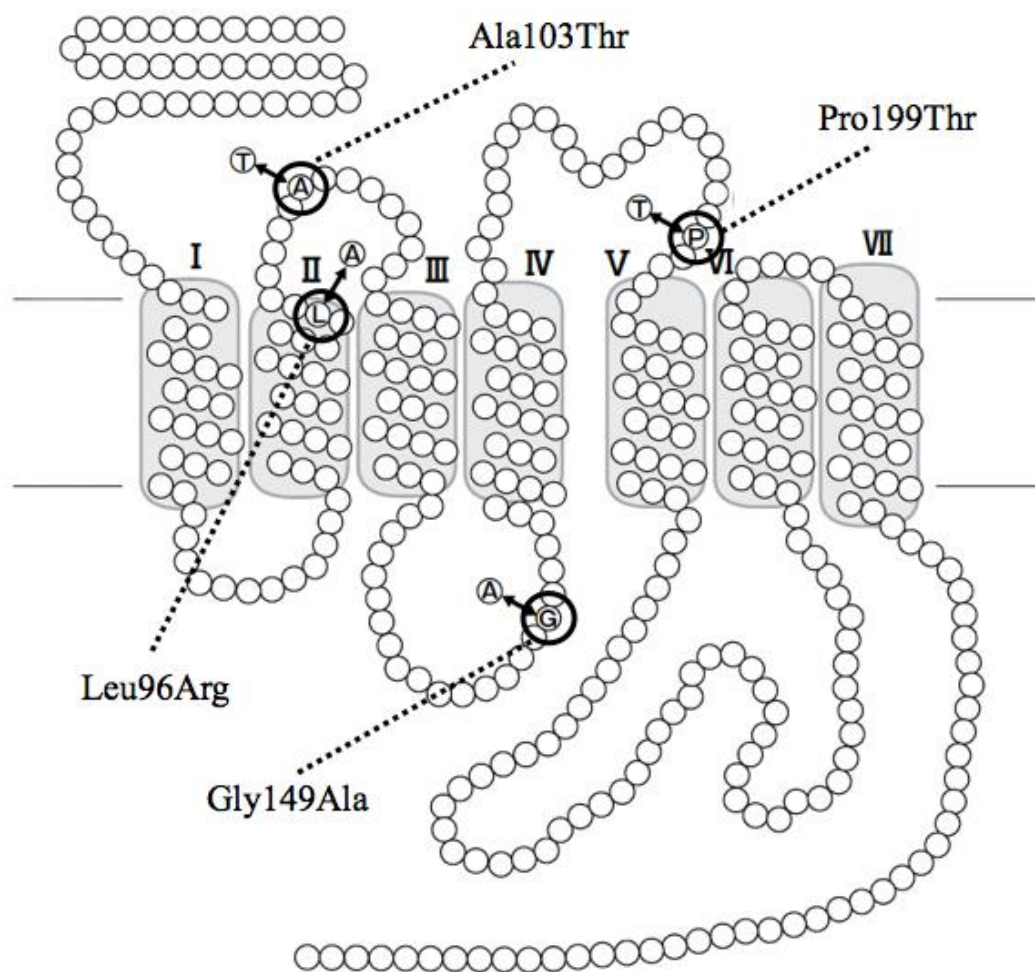


図 1-5 イヌ GPR120 変異体におけるアミノ酸変異部位

イヌ GPR120 遺伝子で見つかった 4 つの非同義置換によるアミノ酸の変異部位を、受容体の模式図上に示した。Ala103Thr と Pro199Thr は細胞外領域、Leu96Arg は膜貫通領域、Gly149Ala は細胞内領域にそれぞれ位置している。

表 1-4 イヌ GPR120 遺伝子における非同義置換の犬種別分布 (n=141, ヘテロの個体は 0.5 頭として合算)

犬種	頭数	c.287T>G	c.307G>A	c.446G>C	c.595C>A
ミニチュア・ダックスフント	36	0	0	0.5	4.5
ビーグル	36	14.5	0	0	4.5
ウェルシュ・コーギー	17	0	0	0	4
ヨークシャー・テリア	12	0	0	0	1
ミニチュア・シェパード	6	0	0	0	3.5
トイ・プードル	4	0	0	0	0.5
サワ	3	0	0	0	0
シェットランド・シープドッグ	3	0	0	0	0
ホーランド	3	0	0	1	2
ホーランド・ゴリー	3	0	0	1	1
ラフ・コリー	3	0	0.5	0	1.5
シェパード	3	0	0	0	0
雑種	2	0	0	0	0.5
ラフ・コリー・トリバー	2	0	0	0	0.5
ゴールデン・トリバー	2	0	0	0	0.5
フラット・コート・トリバー	1	0	0	0	0.5
ギヤハリア	1	0	0	0	0.5
ホーランド	1	0	0	0	0
シェパード・ハスキー	1	0	0	0	0
アイリッシュ・セター	1	0	0	0	1
ベルギー・シェパード	1	0	0	0	0
計	141	14.5	0.5	2.5	26

表 1-5 イヌ GPR120 の非同義置換 c.595C>A (Pro199Thr)の肥満度別遺伝子頻度

BCS	頭数	c/c	c/a	a/a	a の遺伝子頻度
4 および 5	25	13	8	4	0.320*
3	103	75	20	8	0.175
2	13	13	0	0	0.000

\*, p=0.022 vs BCS=3

## 考察

今回クローニングしたイヌ **GPR120** 遺伝子翻訳領域の塩基配列は、ゲノムデータベースを照会したところ、イヌの第 28 番染色体 (NC\_006610.3) に含まれることが確認された。3 つのエクソンの詳細は、それぞれ Exon 1 (chromosome 7801713-7802280, 568 bp)、Exon 2 (chromosome 7812752-7812876, 125bp)、Exon 3 (chromosome 7819629-7819989, 420bp) であった。マウスやヒトの **GPR120** に存在する疎水性アミノ酸の存在比が高い 7 つの膜貫通領域は、イヌ **GPR120** でも保存されていた (44-45、73-98、113-137、156-177、209-225、266-289、296-316 番目のアミノ酸が相当)。このことから、イヌ **GPR120** はマウスやヒトのものと同様、7 回膜貫通型の受容体であることが推察される。また、**GPR** の機能的部位として知られる 2 つの N-グリコシル化部位 (糖鎖付加部位)、即ち N 末側 21 番目と C 末側 322 番目のアスパラギン残基も、イヌ **GPR120** では保存されていた。イヌ **GPR120** の塩基配列およびアミノ酸配列は他の動物種の **GPR120** と高い相同性が認められたが、特にネコやシロクマなど同じ食肉目 (ネコ目) の動物との相同性が高かった。このことは、イヌの系統分類学上の位置づけをそのまま反映しているものと考えられる。

組織発現分布の結果から、**GPR120** はヒトやマウスの基礎研究の結果と同様、イヌにおいても様々な組織で発現していることが明らかとなった。消化器系においては空腸、回腸、結腸において **GPR120** の mRNA 発現が確認され、特に結腸におけるバンドが強い傾向を示した。一方、同じ消化管でも胃や十二指腸においては **GPR120** の発現は確認されなかった。このことから、イヌ **GPR120** は下部消化管で多く発現していると考えられた。ただし今回、定量的 PCR は実施していないので、バンドが確認できなかった組織で発現が無いと言い切ることはできない。**GPR120** は、ヒトやマウスの研究では小腸における CCK や GLP-1 の分

泌に関与することが報告されているが、イヌ GPR120 でも同様に、これらの消化管ホルモンの制御に関与している可能性が示される研究結果が、イヌのインクレチンホルモンの研究結果から示されている [Oda et al., 2014]。

GPR120 はイヌにおいて、海馬や大脳など中枢神経系にも発現していた。海馬では n-3 ( $\omega$ 3) 多価不飽和脂肪酸が記憶の形成に影響を及ぼし、一部の認知症に対して有効であることが知られている [Oulhaj et al., 2016]。多価不飽和脂肪酸の受容体である GPR120 の変異は、これらの疾患のリスクや多価不飽和脂肪酸を用いた治療成績にも影響を及ぼすかも知れない。マウスにおいて GPR120 は単球やマクロファージで発現しており、脂肪酸の結合による  $\beta$ -アレスチン 2 経路による抗炎症作用が報告されている [Oh et al., 2010; Wellhauser & Belsham, 2014]。従って、イヌにおいても不飽和脂肪酸による抗炎症作用が GPR120 依存的に引き起こされる可能性があり [Bauer, 2011]、GPR120 の変異は炎症性疾患のリスク因子ともなりうるのかもしれない。

ヒトの研究において Arg270His の多型が肥満者でより多く確認されていること、および細胞発現系を用いた *in vitro* の研究結果から、この遺伝子変異が肥満のリスクを高めることが推定されている。今回の研究でイヌの GPR120 遺伝子を調べたところ、141 頭の全ての個体において 270 番目のアミノ酸はアルギニンであり、ヒトと同様の変異は確認されなかった。一方、それとは別に 5 種類の同義置換と 4 種類の非同義置換が発見された。この 4 つの非同義置換は、受容体の高次構造において c.307G>A (Ala103Thr) と c.595C>A (Pro199Thr) が細胞外領域、c.287T>G (Leu96Arg) が膜貫通領域、c.446G>C (Gly149Ala) が細胞内領域にそれぞれ位置すると推定された。同義置換ではアミノ酸が変異しないため、表現形への影響は可能性が低い（ただし転写効率の違いを生じる可能性までは否定できない）。そこで本研究では、非同義置換の多型に注目して以後の考察を行った。

疫学的に太りやすい犬種の存在が知られていることから、特定の犬種に肥満関連遺伝子が蓄積している可能性についてまず検討した。今回見つかった 4 つの SNP の中では、c.287T>G (Leu96Arg) だけが特定の犬種（ビーグル）に集中して見られた。ビーグルは疫学的に肥満しやすいとされている犬種であり、犬種特異的な肥満関連因子である可能性が考えられる。しかし、ビーグル群の中で肥満度との関係を調べるだけの例数は確保できなかったため、例数を増やして今後調査を進めることが必要と考えられた。c.307G>A (Ala103Thr) と c.446G>C (Gly149Ala) は、いずれも見つかった頭数が少なく解析を進めることができなかった。ただし、c.446G>C (Gly149Ala) は 141 頭中に 3 頭ずつしか含まれていないボルゾイとボーダー・コリーのそれぞれ 2 頭ずつから見つかっているため、この 2 犬種の保有率が高い可能性が予想される。今後この 2 犬種について例数を増やし、より詳細な解析を行う価値があるものと考えられた。

GPR120 の細胞外領域に位置する非同義置換 c.595C>A (Pro199Thr) は、犬種に特定の傾向は見られなかったが、141 頭中 40 頭と最大数の個体で確認された。この SNP については統計解析に耐えるだけの例数が得られたため、異なる BCS グループごとに遺伝子頻度を算出し、その比較を行った。その結果、この変異の遺伝子頻度は BCS=4/5 と 5/5 を合算した肥満犬群において BCS-3/5 の健常犬群より有意に高く、この SNP は肥満リスク（代謝の低下）に関与している可能性が示唆された。また、この SNP は受容体構造の中でも細胞外領域に位置する変異であることから、リガンドとの結合能の低下や喪失などの機能変化への影響も考えられるが、本研究では受容体機能そのものは調べておらず、動物の代謝には遺伝因子以外に食事や運動などさまざまな環境因子が含まれる。しかし、今回見つかったイヌ GPR120 の c.595C>A (Pro199Thr) はイヌの肥満リスクにおける候補因子として有望と考えられる。この仮説を補強するには、より多くの症例を対照とした疫学調査を行うか、または細胞発現系を用いた *in vitro* の研究で細胞

内カルシウム動態や ERK の活性を比較し、受容体機能への影響を解析することが必要であろう。この SNP は、将来的に遺伝子型ごとの個体レベルでの栄養管理、肥満管理に有効な遺伝子検査項目として利用の可能性が期待される。



## 小括

イヌの肥満関連候補遺伝子の一つとして、**GPR120** の遺伝子について多型解析を行い、肥満との関係を考察した。**GPR120** は中鎖および長鎖脂肪酸をリガンドとする脂肪酸受容体の一種であり、ヒトにおいては特定の遺伝子型が肥満リスクとなることが示されている。

まず、イヌ **GPR120** の遺伝子クローニングを行い、塩基配列やアミノ酸配列がヒトやマウスのもとの高い相同性を有していること、ヒトやマウスとほぼ同様の組織発現分布を示すことを明らかにした。これらの結果より、イヌの **GPR120** が他の動物種と同様の機能を担っている可能性が示された。

次に、141 頭の犬を対象に **GPR120** の塩基配列の解析を行ったところ、5 種類の同義置換と 4 種類の非同義置換を発見した。非同義置換の一つである **c.287T>G (Leu96Arg)** はビーグルのみで見つかったことから、犬種特異的な変異である可能性が示された。また、**c.595C>A (Pro199Thr)** は **BCS=4** または **5** の肥満群において **BCS=3** の健常群より遺伝子頻度が有意に高く、イヌの肥満リスクに関与する可能性が示された。今後研究を進めることで、イヌの個体別栄養管理への応用が期待される。

## 第2章 イヌ $\beta 3$ アドレナリン受容体遺伝子の肥満犬における多型調査

### 序文

$\beta 3$  アドレナリン受容体 (Adrenoceptor beta 3, ADRB3) は、1989 年にヒトや齧歯類からクローニングされたアドレナリン受容体のサブタイプの一つである [Dib et al., 1995]。ヒトの ADRB3 は  $\beta 1$  アドレナリン受容体 (Adrenoceptor beta 1, ADRB1) や  $\beta 2$  アドレナリン受容体 (Adrenoceptor beta 2, ADRB2) よりも C 末端側のアミノ酸が少なく、それぞれに対して 51% と 46% の相同性を持つ [Belfer et al., 2005]。ADRB3 は脂肪細胞にほぼ限局的に発現し、脂肪分解に促進的に働くことが報告されている。受容体の分類上は G タンパク質結合受容体の 1 種であり、22 個から 28 個のアミノ酸で構成される 7 つの膜貫通領域と、細胞外および細胞内領域にそれぞれ 3 つのループ構造を有している。ヒト ADRB3 の機能解析研究では、細胞外第 2、第 3 ループはリガンド結合およびレセプター活性に、膜貫通領域はそれぞれリガンド結合と Gs 活性に、さらに細胞内ループの一部は G タンパク質の結合に重要なアデニレートシクラーゼの活性に関与している。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。ADRB3 の特異的作動薬を用いた代謝の制御は、肥満治療戦略の一つとして注目を集めている。

前章で解析した GPR120 とは対照的に、肥満のリスク因子として ADRB3 については古くから様々な報告がなされている [Genelhu et al., 2010; Kuo et al., 2014; Kurokawa 2011]。1995 年、米国アリゾナ州に居住するピマ・インディアンにおいて ADRB3 のミスセンス変異が発見された。この変異が熱産生機能の異常や肥満（主に内臓脂肪型）、インスリン抵抗性、糖尿病の早期発症と相関することが報告された。事実、ヒト ADRB3 については様々な遺伝子多型が報告されているが、

ある研究報告によれば Trp64Arg の遺伝子頻度は一般的に 12% であるが、高体脂肪率の集団に着目すると 43.8% とより高い割合で保有していることが判明している [Yamakita et al., 2010]。ヒト ADRB3 遺伝子において翻訳領域の 189 番目の塩基がチミンからシトシンに変異 (c.189T>C) すると、受容体を構成する細胞内領域の第 1 ループを構成する 64 番目のアミノ酸がトリプトファンからアルギニンに変異 (Trp64Arg) し、野生型のヒトより 1 日当たりの安静時代謝量が 200-220 kcal 減少することが実験的に確かめられている。即ち、野生型に比べて過剰なエネルギーを体脂肪として貯めやすく、肥満や糖尿病のリスク因子となることが示されている [Iemitsu et al., 2014; Mirrakhimov et al., 2011; Yoshida, 2006]。現在、日本人の約 3 分の 1 がこの変異を保有することが知られており、専門の肥満外来では食事指導の基礎データとして ADRB3 の遺伝子検査が実施されている。

イヌの ADRB3 遺伝子はすでにクローニングされており、翻訳領域の全長が 1,218 bp であること、2 つのエクソン (1,196 bp の Exon 1 と 22 bp の Exon 2) から構成されていることなどが知られている [Dib et al., 1995]。イヌ ADRB3 は他種のもと同様、主に脂肪細胞に発現している。事実、CL316,243 や AJ9677 等の ADRB3 特異的作動薬を犬に急性投与すると、脂肪分解が引き起こされ血中の遊離脂肪酸濃度が速やかに上昇する [Granneman et al., 2005; Lee et al., 2015]。このようにイヌ ADRB3 をイヌの肥満治療のターゲット分子としてとらえた研究は既にいくつかあり、前述の特異的作動薬を長期的に投与すれば白色脂肪組織の褐色化（またはベージュ細胞化）を惹起し、脱供役蛋白質（uncoupling protein, UCP）1 の異所性誘導によってエネルギー消費を高め、抗肥満効果を発揮することも報告されている [Spaethling et al., 2016]。これらの方法は、イヌの新しい肥満治療戦略として有望視されている。

一方、肥満のリスク因子としてのイヌ ADRB3 の遺伝子多型解析は、これまで

行われてこなかった。ヒトの **ADRB3** のようにイヌ **ADRB3** の遺伝的多型が個体の代謝レベル、さらには肥満リスクに関与するなら、ヒトと同様に遺伝子検査の対象項目となりうる可能性がある。

本章では、臨床現場で 160 頭の犬から得られたゲノム **DNA** を材料としてイヌ **ADRB3** の多型調査を行い、イヌにおける **SNP** の探索を実施した。**SNP** が見つかった場合は、犬種ごとの遺伝子頻度、および肥満度の指標であるボディコンディションスコア (body condition score, **BCS**) との関連について疫学的に解析した。

## 材料と方法

### 1. 供試動物および血液試料の採取

2012 年から 2015 年にかけて日本獣医生命科学大学附属動物医療センター（東京都武蔵野市）および愛甲石田動物病院（神奈川県伊勢原市）に来院した犬 160 頭（19 犬種）を対象とした。各個体のデータとして、年齢、性別、犬種、BCS 等を記録した。

### 2. ゲノム DNA の抽出

全血 1 ml を採取後、直ちにエチレンジアミン四酢酸（EDTA）チューブに移して抗凝固処理を行い、Flexi Gene DNA Kit（QIAGEN, Germany）を用いてゲノム DNA を抽出した。即ち、15 ml 遠心チューブに界面活性剤を含む Buffer FG 1 を 2.5 ml と血液を 1 ml 添加して、上下に 5 回転倒混和後、2,000 g/21°C/5 分間遠心した。上清をデカントして清潔な紙の上にチューブを転倒後 2 分間静置し、DNA とタンパク質を含むペレットを得た。次に 0.5 ml の Buffer FG 2 と Qiagen Protease 混合液にて得られたペレットを再懸濁し、迅速にペレットが均一化されるまで攪拌後、65°C/10 分間インキュベートした。このとき、ゼリー状の粘稠性のあるペレット残留物が存在した場合には、30  $\mu$ l の Buffer FG 2 を添加し再度攪拌してインキュベートした。サンプル中のタンパク質が分解され、色が赤からオリーブ色に変化したことを確認後、0.5 ml の 100%イソプロパノールを添加して上下に激しく振盪し、ゲノム DNA を抽出した。2,000 g/3 分間遠心後、上清を捨て、清潔な紙の上に静置した。ゲノム DNA を洗浄するため、0.5 ml の 70%エタノールを添加して 5 秒間攪拌し、2,000 g/3 分間で遠心後、上清を捨て清潔な紙の上に転倒して 5 分間静置した。その後、液体が完全に蒸発するまで、DNA を 5 分間空気乾燥させた。液体の蒸発後、Buffer FG

3 を 300  $\mu$ l 加え、低速で 5 秒間攪拌し、65 $^{\circ}$ C/1 時間から一晚インキュベートして再懸濁した。回収したゲノム DNA は Nano Drop (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて吸光度を測定し、吸光度 260 nm および 280 nm で蛋白濃度および純度を測定した。

### 3. イヌ ADRB3 遺伝子の増幅と精製

抽出した DNA を鋳型とし、イヌ ADRB3 遺伝子の翻訳領域を含む Exon 1 の上流と Exon 2 の下流に設計したプライマー対 (表 2-1、図 2-1) を用いて PCR 法を実施した。反応液 50  $\mu$ l 中の組成は以下の通りとした。即ち、鋳型 DNA を 2  $\mu$ l、2 $\times$ MightyAmp<sup>TM</sup> Buffer を 25  $\mu$ l、MightyAmp<sup>TM</sup> DNA Polymerase を 1  $\mu$ l、プライマーをそれぞれ 1  $\mu$ l、Ultra Pure Water を 20  $\mu$ l 添加した。PCR は 2 ステップ法を用いて行った。反応条件は始めに熱変性を 98  $^{\circ}$ C/1 分間、その後熱変性を 98  $^{\circ}$ C/10 秒間、アニーリングと伸長反応を合わせて 70  $^{\circ}$ C/2 分 30 秒間を 26 cycle 繰り返した。PCR 産物の純度を高めるため、得られた PCR 産物を鋳型としてさらに内側に設計したプライマー対 (表 2-1、図 2-1) による PCR を、同条件にて実施した (nested PCR)。2 度目の PCR で得られた PCR 産物を 1.5%エチジウムブロマ이드添加アガロースゲルで電気泳動後、365 nm の紫外線下で観察した。目的の配列が増幅できた場合、2,186 bp 付近にバンドを確認することができた (図 2-2)。

目的配列の増幅を確認した後、PCR Purification Kit (QIAGEN, Germany)を用いて PCR 産物を精製した。すなわち、1.5 ml チューブで PCR サンプル 20  $\mu$ l と Buffer PBI (結合バッファー)100  $\mu$ l を混和後、DNA 結合のためにカラムをセットした 2 ml のコレクションチューブに全量アプライし、13,000 rpm/1 分間遠心操作した。遠心後、廃液を棄て同じチューブ上にカラムを再度セットし、250  $\mu$ l の Buffer PE (洗浄バッファー) を添加し、13,000 rpm/30 秒間遠心操作した。新し

い 1.5 ml チューブにカラムをセットし、20  $\mu$ l の Buffer EB（溶出バッファー）をカラムの中央に添加し、1 分間静置後、13,000 rpm/1 分間遠心操作し、精製 DNA を回収した。

#### 4. ゲノムを用いたイヌ ADRB3 遺伝子の塩基配列解析

イヌ ADRB3 遺伝子の塩基配列の解析のために、Big Dye Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems, Japan）を用いて Exon 部分全長をカバーするように 7 ヶ所のプライマーを設計し（表 2-2）、精製 DNA を鋳型として 1 本鎖 PCR を行った。反応液 10  $\mu$ l 中の組成は以下の通りとした。PCR チューブに Ultra Pure Water を 5.5  $\mu$ l、プライマー（1.6 pmol/ $\mu$ l）を 1.0  $\mu$ l、5 x Big Dye Sequence Buffer を 1.5  $\mu$ l、Big Dye Terminator を 1.0  $\mu$ l 添加した。反応条件は始めに 96°C/1 分間、その後 96°C/10 秒間、50°C/5 秒間、60°C/4 分間を 35 cycle 繰り返し、最後に 4°C で維持した。塩基配列の解析は、GPR120 と同様に外部委託（Eurofins Genomics, Japan）で実施した。

#### 5. イヌ ADRB3 遺伝子の多型解析

160 頭の犬の全血から抽出したゲノム DNA 検体を材料にイヌ ADRB3 の塩基配列を解析し、ゲノムデータベース上に記録されているイヌ ADRB3 遺伝子の塩基配列と比較した（NM\_001003377.1）。SNP が見つかった場合は記録し、各 SNP の遺伝子頻度を犬種別、または BCS 別に算出し、比較した。統計解析にはカイ二乗検定を用いた。

表 2-1 イヌ ADRB3 遺伝子の解析に用いたプライマーの塩基配列

名称	塩基配列 (5'-3')	PCR 産物 (bp)
First-Fwd	CGGCTCGGTGAGACTATTGG	2,496
First-Rev	TCGGAGTCCCCATTAGCTTT	
Nest-Fwd	CTCCTCGGGAAGATGGCTCA	2,186
Nest-Rev	GAGCAGGCTGCTGGGTACTT	

Fwd : 上流側、Rev : 下流側

First : 1 段階目 PCR 用、Nest : nested PCR 用

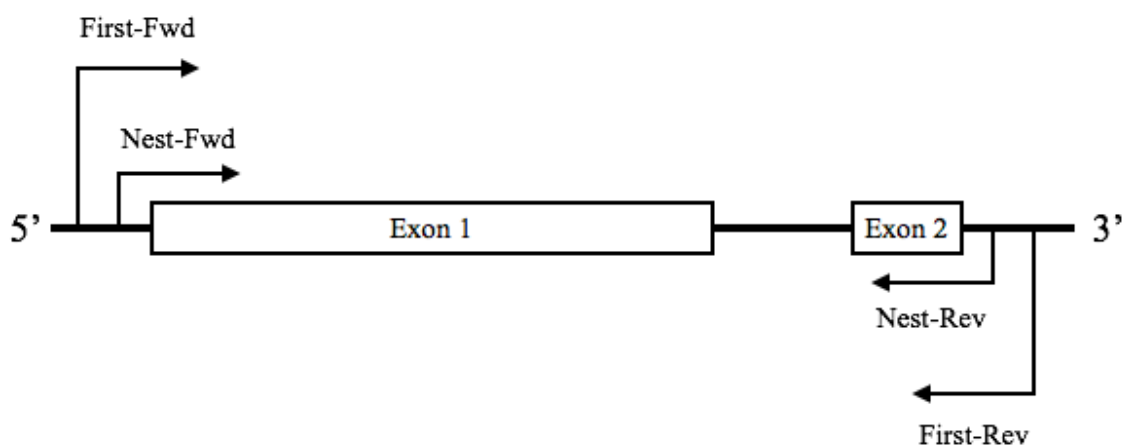


図 2-1 イヌ ADRB3 遺伝子増幅に用いたプライマーの設計位置

1 段階目の PCR に使用するプライマー対 (First-Fwd,Rev) は、スプライシング後の翻訳領域を挟むようにイントロン上に設計した。Nested PCR のためのプライマー対 (Nest-Fwd,Rev) は、それぞれ First プライマーの内側のイントロン上に設計し、2 つの Exon とそれらに挟まれるイントロン領域を一度に増幅する配置とした。各プライマーの塩基配列と予想される PCR 産物のサイズは表 2-1 に示した。



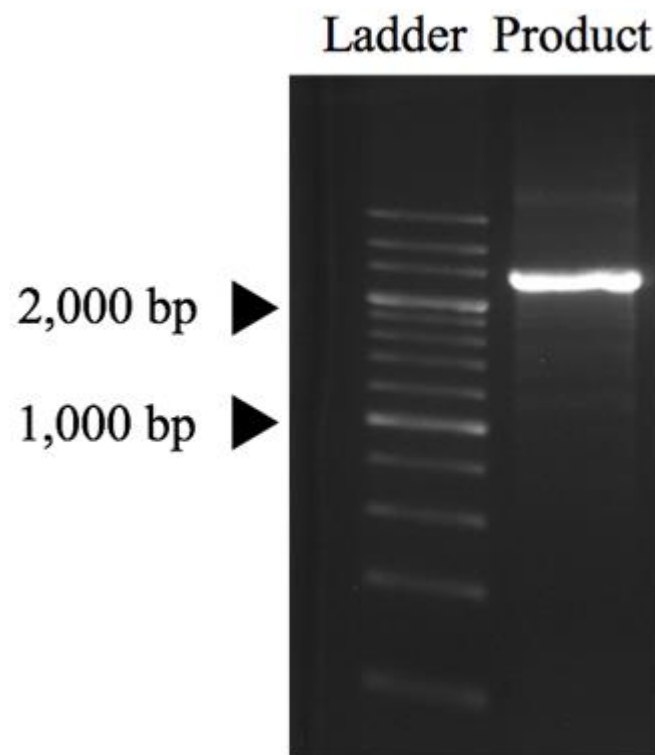


図 2-2 Nested PCR によって増幅したイヌ ADRB3 の PCR 産物

イヌ全血（白血球）から抽出したゲノム DNA を鋳型として、イヌ ADRB3 遺伝子の全翻訳領域を含む 2 つのエクソン領域を nested PCR 法によって増幅した。電気泳動の結果、予想される 2,186 bp 付近に単一バンドを確認した（離れたレーンの泳動像を併記）。

表 2-2 イヌ ADRB3 遺伝子一本鎖 PCR プライマーの塩基配列

対象	塩基配列 (5'-3')
Exon 1	CGGCTCGGTGAGACTATTGG, GAGCATCACCAGAAGCGGAA ACCCACCTTATCCTACCGA, CGTCTCCAACCCACCTTAT GGCCACGATGACCAGCAGGT, TGGCCAGCGACGTCACGAAC
Exon 2	AAAGCTAATGGGGACTCCGA

## 結果

### 1. イヌ ADRB3 遺伝子の遺伝子解析

160 頭の犬を対象に ADRB3 遺伝子の多型解析を行い、得られた塩基配列を NCBI データベース上のイヌ ADRB3 遺伝子情報と比較した。その結果、アミノ酸変異の無い同義置換が 5 種類とアミノ酸変異を伴う非同義置換が 7 種類の合計 12 種類の SNP が確認された。各遺伝子多型が見られた頭数や遺伝子頻度の詳細を表 2-3 に、エクソン上の存在部位の概略を図 2-3 にそれぞれ示した。また、ヒト ADRB3 において肥満リスクとして知られる Trp64Arg に相当する部位は、今回調査した全ての個体で当該部位のアミノ酸は Arg であり、近接部位を含めてヒトの肥満型と同じであった (図 2-4)。

同義置換の変異はそれぞれ c.39G>T、c.81G>A、c.432C>G、c.759C>G、c.853C>T、非同義置換の変異はそれぞれ c.110T>G (Val37Gly)、c.220G>A (Val74Met)、c.511G>A (Ala171Thr)、c.749C>T (Ser250Phe)、c.758C>G (Ala253Gly)、c.1121C>G (Pro374Arg)、c.1184C>A (Pro395Gln) であった。今回見つけた SNP は、全て Exon-1 上に位置していた。アミノ酸変異を伴わない同義置換は受容体機能に影響しないため、以後は 7 種類の非同義置換に着目して解析を行った。

### 2. イヌ ADRB3 遺伝子多型の犬種別解析

特定の犬種に特定の SNP が集積している可能性を検討するため、犬種別に集計、比較した (表 2-4a,b)。その結果、c.110T>G (Val37Gly) と c.220G>A (Val74Met) が確認された犬種はそれぞれイングルッシュ・コッカ・スパニエルとボーダー・コリー 1 頭ずつでいずれもホモ個体であり遺伝子頻度は 0.006 であった。c.511G>A (Ala171Thr) が確認された犬種はチワワとシーズーであ

り、ホモ個体が 2 頭、ヘテロ個体が 1 頭で遺伝子頻度は 0.016 であった。

c.749C>T (Ser250Phe) は統計学的に肥満しやすいとされるヨークシャー・テリアやミニチュア・ダックスフント、ビーグルなどを含む 8 犬種で検出され、その内訳はホモ個体が 12 頭でヘテロ個体が 48 頭、全体の遺伝子頻度は 0.194 であった。c.758C>G (Ala253Gly) は 4 犬種で確認され、ホモ個体が 3 頭、ヘテロ個体が 2 頭で全体の遺伝子頻度は 0.025 であった。c.1121C>G (Pro374Arg) は 5 犬種で確認され、ホモ個体 11 頭、ヘテロ個体 5 頭で全体の遺伝子頻度は 0.053 であった。

c.1184C>A (Pro395Gln) の変異はキャバリアとラフ・コリーを除く 17 犬種で確認され、ホモ個体 104 頭、ヘテロ個体 15 頭と今回調べた中で約 7 割の個体で確認され、全体の遺伝子頻度は 0.697 であった。

### 3. イヌ ADRB3 遺伝子の肥満度別多型解析

遺伝子頻度が他の SNP に比べて高かった c.749C>T (Ser250Phe)、c.1121C>G (Pro374Arg) の 2 種類の SNP に着目して、BCS 別に遺伝子頻度を算出、比較した。c.749C>T (Ser250Phe) の遺伝子頻度は、BCS=2 の低体重群で 0.066、BCS=3 の健常犬群で 0.175、BCS=4 または 5 の肥満群で 0.405 と、BCS の高い集団で遺伝子頻度がより高く、SNP c.749C>T における C と T の遺伝子頻度間の比較、統計解析により健常群と肥満群の間に有意差 ( $p=0.0001$ ) が存在した (表 2-5)。一方、c.1121C>G (Pro374Arg) の遺伝子頻度は、BCS=2 の低体重群で 0.300、健常群で 0.072、肥満群で 0.048 と、BCS の低い集団で遺伝子頻度がより高く、SNP c.1121C>G における C と T の遺伝子頻度間の比較、統計解析により健常群と低体重群の間に有意差 ( $p<0.0001$ ) が存在した (表 2-6)。

表 2-3. イヌ ADRB3 多型解析で検出された遺伝子多型 (n=160)

	変異		頭数		遺伝子頻度
	遺伝子	アミノ酸	ヘテロ	ホモ	
同義置換	c.39G>T	-	0	1	0.006
	c.81G>A	-	0	1	0.006
	c.432C>G	-	0	6	0.038
	c.759C>G	-	0	1	0.006
	c.853C>T	-	0	10	0.063
非同義置換	c.110T>G	Val37Gly	0	1	0.006
	c.220G>A	Val74Met	0	1	0.006
	c.511G>A	Ala171Thr	1	2	0.016
	c.749C>T	Ser250Phe	48	12	0.194
	c.758C>G	Ala253Gly	2	3	0.025
	c.1121C>G	Pro374Arg	5	11	0.055
	c.1184C>A	Pro395Gln	15	104	0.697

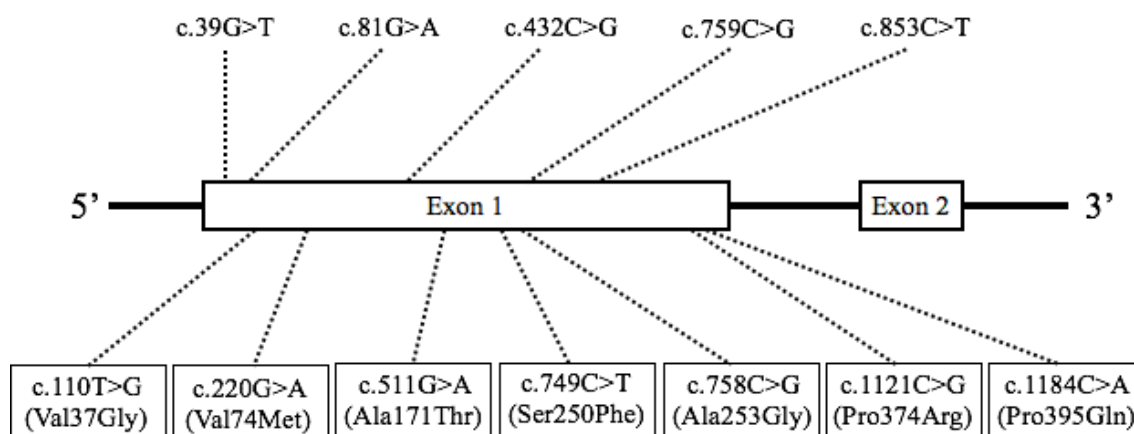


図 2-3 イヌ ADRB3 多型解析で検出された変異のエクソン上の位置

160 頭の犬から見つかった 5 種類の同義置換（上段）と 7 種類の非同義置換（下段）のエクソン上の存在部位を概略図で示した。

アミノ酸 No.	62	63	64	65	66		
ヒト (WT)	—	ATC Ile	GCC Ala	TGG Trp	ACT Thr	CCG Pro	—
ヒト (OB)	—	ATC Ile	GCC Ala	CGG Arg	ACT Thr	CCG Pro	—
イヌ (WT)	—	ATC Ile	GCT Ala	CGG Arg	ACG Thr	CCA Pro	—

図 2-5 ADRB3 一次構造における 64 番目のアミノ酸の種間比較

ヒトで肥満リスクに関与するとされる ADRB3 の Trp64Arg 変異部位について、イヌ ADRB3 における該当部位を前後のアミノ酸とともに示す (WT, wild type ; 野生型、OB, obese ; 肥満型)。

表 2-4a イヌ ADRB3 遺伝子における非同義置換の犬種別分布 (n=160, ヘテロの個体は 0.5 頭として合算)

犬種	頭数	c.110T>G	c.220G>A	c.511G>A	c.749C>T
ミニチュア・ダックスフント	68	0	0	0	13
ビーグル	38	0	0	0	7
ウェルシュ・コーギー	17	0	0	0	5
ヨークシャー・テリア	12	0	0	0	4
ダックス	8	0	0	1	4
ミニチュア・シェパード	3	0	0	0	2
シェパード	3	0	0	1.5	0
柴犬	3	0	0	0	0
トイ・プードル	2	0	0	0	0
シェットランド・シープドッグ	2	0	0	0	0
ホンド・コリ	2	0	1	0	0.5
ラフ・コリ	2	0	0	0	0.5
雑種	2	0	0	0	0
ラブラドル・レトリバー	2	0	0	0	0
ゴールデン・レトリバー	2	0	0	0	0
キャバリア	2	0	0	0	0
イングリッシュ・コッカースパニエル	1	1	0	0	0
ポメラニアン	1	0	0	0	0
シベリアン・ハスキー	1	0	0	0	0
計	160	1	1	2.5	36

表 2-4b イヌ ADRB3 遺伝子における非同義置換の犬種別分布 (n=160, ヘテロの個体は 0.5 頭として合算)

犬種	頭数	c.758C>G	c.1121C>G	c.1184A>C
ミニチュア・ダックスフント	68	2	5	42
ビーグル	38	0	0	24.5
ウエルシュ・コーギー	17	0.5	2	11
ヨークシャー・テリア	12	1	2	7
サウワ	8	0	0	8
ミニチュア・シェパード	3	0	0	1.5
シェパード	3	0	0	3
柴犬	3	0	1.5	2
トイ・プードル	2	0	1	1
シェットランド・シープドッグ	2	0	0	2
ボクサー・コリ	2	0	0	2
ラフ・コリ	2	0	2	0
雑種	2	0	0	1
ラブラドル・レトリバー	2	0	0	2
ゴールデン・レトリバー	2	0	0	2
キャバリア	2	0	0	0
イングリッシュ・コッカ・スパニエル	1	0	0	0.5
ポメラニアン	1	0	0	1
シェパード・パズキ	1	0.5	0	1
計	141	4	13.5	111.5



表 2-5 イヌ ADRB3 の非同義置換 c.749C>T (Ser250Phe)の肥満度別遺伝子頻度

BCS	頭数	c/c	c/t	t/t	t の遺伝子頻度
4 および 5	42	15	20	7	0.405*
3	103	72	26	5	0.175
2	15	13	2	0	0.066

\*, p<0.0001 vs BCS=3

表 2-6 イヌ ADRB3 の非同義置換 c.1121C>G (Pro374Arg)の肥満度別遺伝子頻度

BCS	頭数	c/c	c/g	g/g	g の遺伝子頻度
4 および 5	42	39	2	1	0.048
3	103	95	1	7	0.072
2	15	10	1	4	0.300*

\*, p<0.0001 vs BCS=3

## 考察

ADRB3 はヒトの肥満リスク遺伝子としておそらく最もよく知られているものの一つであり、これまで多くの研究報告がある。しかし、イヌの ADRB3 遺伝子について肥満リスクという視点で行われた研究は他には無い。ヒトでは ADRB3 の Trp64Arg の変異が肥満者に多く見られ、細胞発現系を用いた *in vitro* の実験データからもこの SNP が肥満のリスクを高めることが推定されている。今回の研究でイヌ ADRB3 遺伝子の該当領域を調べたところ、160 頭の全ての個体において 64 番目のアミノ酸はアルギニンであり、ヒトにおける肥満型に相当することが確かめられた。ちなみにネコ、ウマ、ウシなど遺伝子データベースで調べられるほとんどの哺乳類でこの部位のアミノ酸はアルギニンなので、ヒトにおいても本来野生型はアルギニンであり、トリプトファンとなる遺伝子型の方が後から生じた可能性が高い。

今回、イヌの ADRB3 遺伝子において 5 種類の同義置換と 7 種類の非同義置換が発見された。同義置換ではアミノ酸が変異しないため、表現形への影響は可能性が低い。そこで本研究では、非同義置換の多型に注目して以後の検討を行った。イヌ ADRB3 遺伝子の多型解析によって発見した 7 つの非同義置換は、受容体の高次構造において c.110T>G (Val37Gly)、c.220G>A (Val74Met)、c.511G>A (Ala171Thr) が膜貫通領域、c.749C>T (Ser250Phe)、c.758C>G

(Ala253Gly)、c.1121C>G (Pro374Arg)、c.1184C>A (Pro395Gln) が細胞内領域にそれぞれ位置すると推定された。部位に限らず非同義置換は表現形に影響する可能性があるが、ヒトにおける Trp64Arg 変異は細胞内領域であることを念頭に置けば、細胞内領域の SNP が細胞内シグナルに影響を及ぼし、肥満に係る可能性が高いかもしれない。7 つの非同義置換のうち、4 種類の SNP にアミノ酸の極性変化が推定され、残りの 3 種類では推定されなかった。即ち、

c.511G>A (Ala171Thr) では非極性から極性 (中性) に、c.749C>T

(Ser250Phe) では極性 (中性) から非極性に、c.1121C>G (Pro374Arg) では非極性から極性 (塩基性) に、c.1184C>A (Pro395Gln) では非極性から極性 (中性) にそれぞれ変化していた。タンパク質の高次構造には極性が関与するため、極性変化が推定される変異は高次構造を変化させ、表現型に影響する可能性が高い。事実、同様の極性変化はヒト ADRB3 遺伝子の Trp64Arg の変異においても認められる。また、今回見つかった 12 種の SNP の中にトランジション変異 (プリンまたはピリミジン塩基内での変異) は 4 つ、トランスバージョン変異 (プリンからピリミジン、またはピリミジンからプリンへの変異) は 8 つ含まれていた。一般的にトランジション変異の方がより起こりやすいとされるが、イヌ ADRB3 においてはトランスバージョン変異がトランジション変異の 2 倍存在し、遺伝子頻度が特に高かった c.749C>T (Ser250Phe) と c.1184C>A (Pro395Gln) はいずれもトランスバージョン変異であった。わずか 12 種類の SNP での検討であり、誤差の範囲とも考えられるが、自然な比率よりこれらがより多く存在する事実は、一部の SNP に機能的意義が存在することを暗に示しているかもしれない。

前章の GPR120 と同様に、イヌ ADRB3 についても一部の犬種に特定の SNP が蓄積している可能性について検討した。まず、c.110T>G (Val37Gly)、c.220G>A (Val74Met)、c.511G>A (Ala171Thr) の 3 つの変異は、いずれも 1-2 頭からしか見つかっておらず臨床的意義について検討することはできなかった。次に、c.749C>T (Ser250Phe) は 8 犬種、c.758C>G (Ala253Gly) は 4 犬種、c.1121C>G (Pro374Arg) は 6 犬種からそれぞれ見つかっているが、特定の犬種で保有率が高い傾向は残念ながら認められていない。最も遺伝子頻度が高かった c.1184C>A (Pro395Gln) は、ミニチュア・ダックスフントやビーグル、ウェルシュ・コーギーなど、例数の多い犬種の約 3 分の 2 の個体から見つかった。

ている。しかし全ての犬種を含めた集団内における保有率もほぼ同様なので、これらの犬種に多く含まれているわけではなさそうである。ただし、この変異はチワワにおいて 8 頭中 8 頭全てからホモとして見つかったので、チワワに高率に集積している可能性は考えられる。

イヌ ADRB3 多型と肥満度との関係は、c.749C>T (Ser250Phe) と c.1121C>G (Pro374Arg) の 2 つの SNP で統計解析まで行うことができた。その結果、c.749C>T (Ser250Phe) の遺伝子頻度は BCS=4/5 と 5/5 を合算した肥満群において BCS-3/5 の健常群より有意に高く、肥満リスク（代謝の低下）に関与する可能性が示唆された。一方、c.1121C>G (Pro374Arg) の遺伝子頻度は BCS=2 の低体重群において BCS-3/5 の健常群より有意に高く、逆に代謝の亢進に関与する可能性が示唆された。後者はこの検討では肥満回避因子の位置づけとなるが、遺伝子型がグアニンである個体を基準に考えれば、それがシトシンとなることが肥満リスク因子ととらえることもできる。ちなみにこの 2 つの SNP は、分子レベルの検討においていずれも細胞内領域に位置するトランスバージョン変異であり、アミノ酸の極性変化を伴っていた。

最後に、本章では同義置換はアミノ酸の変化を欠くため表現型には影響しないものとして考察を進めてきた。しかしながら、ヒトにおいてレプチン遺伝子の同義置換が肥満と相関している例が報告されている [Ovsyannikova et al., 2014]。これは、その SNP が直接的な影響を持たなくても機能に影響する別の SNP と連鎖しているためと考えられている。イヌにおいても今後、同義置換が遺伝マーカーとしての意義を有する可能性について検討を行う価値はあるものと考えられた。

本章ではイヌ ADRB3 遺伝子の多型解析を行い、5 種類の同義置換と 7 種類の非同義置換を発見した。犬種との関係について考察したところ、c.1184C>A (Pro395Gln) がチワワに高率に集積している可能性があるものの、どの変異も

特定犬種に集中的に見られることはなかった。また、肥満度との関係について調べたところ、c.749C>T (Ser250Phe) が肥満群で、c.1121C>G (Pro374Arg) が低体重群で、それぞれ遺伝子頻度が有意に高かった。この2つの SNP は肥満リスクの候補因子と考えられるが、実際の動物の代謝には遺伝因子以外に食事や運動などさまざまな環境因子が含まれる。ヒトの研究で行われたような細胞発現型による *in vitro* の実験で受容体機能の比較を行い、表現型への影響について確かめることが必要と考えられた。

## 小括

イヌの肥満関連候補遺伝子の一つとして、ADRB3 の遺伝子について多型解析を行い、肥満との関係を考察した。ADRB3 はアドレナリン受容体のサブタイプの一つであり、脂肪細胞に発現して脂肪分解に促進的に働くこと、ヒトにおいて Trp64Arg 変異が肥満リスクとなること等が示されている。

160 頭の犬を対象に ADRB3 の塩基配列の解析を行ったところ、5 種類の同義置換と 7 種類の非同義置換を発見した。非同義置換の一つである c.1184C>A (Pro395Gln) は、チワワに高率に集積している可能性が示唆された。また、c.749C>T (Ser250Phe) が肥満群で、c.1121C>G (Pro374Arg) が低体重群で、それぞれ遺伝子頻度が有意に高く、この 2 つの SNP はイヌの肥満リスクに関与する可能性が示された。今後研究を進めることで、イヌの個体別栄養管理への応用が期待される。

### 第3章 細胞発現系によるイヌ $\beta 3$ アドレナリン受容体変異体の機能解析

#### 序文

第1章と第2章の研究により、イヌの2種類の遺伝子について肥満度と有意な関連性を示す SNP が複数種確認された。これらの変異体は疫学的に肥満関連候補遺伝子として有望と考えられるが、データ解析において個々の動物における食事や運動など生活環境の違いが検討されておらず、また共存する他の遺伝子の多型の影響も除外できない。これらの遺伝子変異がもたらす表現形への影響を確かめるためには、細胞発現系を用いた *in vitro* の研究が必要である。

第2章で検討した ADRB3 は、アドレナリンやノルアドレナリンなど、 $\beta$  アドレナリン受容体の作動薬によって活性化される。脂肪細胞膜上に位置する ADRB3 は、これらの作動薬が結合すると細胞内でアデニレートシクラーゼ (adenylate cyclase, AC) を活性化し、活性化した AC は ATP を分解して環状 AMP (cyclic AMP, cAMP) を生成する。cAMP は細胞内メッセンジャーとして働き、さまざまな細胞機能の発現に関与する。例えば、脂肪細胞ではホルモン感受性リパーゼを活性化し、貯蔵している中性脂肪を分解してトリグリセリドと遊離脂肪酸を生成する。イヌにおいてもこれらの作動薬の急性投与によって血液中の遊離脂肪酸濃度が上昇するので、ヒトやマウスと同様に ADRB3 の下流では AC による cAMP の産生経路が働いているものと考えられる。

ヒト ADRB3 遺伝子の Trp64Arg 遺伝子変異においては、この遺伝子変異を含む発現ベクターを用いて細胞に変異型の ADRB3 を発現させ、受容体機能を解析した研究がある [Vrydag et al., 2009]。即ち、変異型を発現させた細胞をアドレナリンやノルアドレナリンなど作動薬で刺激し、代謝産物である cAMP の生成量を測定することで遺伝子の変異が受容体の機能に及ぼす影響を調査したもので

ある。その結果、Trp64Arg の変異を持つヒト ADRB3 は cAMP の生成能が低下していることが明らかにされ、疫学データが分子レベルでも証明されているわけである。この手法は他の動物種にも応用可能なものであり、我々が発見したイヌ ADRB3 変異体の機能解析においても有効と考えられた。

本章では、第 2 章でイヌ ADRB3 遺伝子において肥満との関係が疫学的に示された 2 つの変異体、即ち c.749C>T (Ser250Phe) と c.1121C>G (Pro374Arg)、および一部の犬種に高率に蓄積している可能性が示された 1 つの変異体、即ち c.1184C>A (Pro395Gln) に焦点を当て、細胞発現系を用いた実験を行って、これらの機能的差違について検討した。



## 材料と方法

### 1. イヌ ADRB3 変異遺伝子の増幅

第 2 章で肥満との関連が推察されたイヌ ADRB3 変異体の機能解析を行うため、まず発現ベクターの中心部となる各変異体の翻訳領域を増幅した。野生型 (wild type, WT) および c.749C>T (Ser250Phe)、c.1121C>G (Pro374Arg)、c.1184C>A (Pro395Gln) の 3 つの変異をそれぞれ単独で含む犬から抽出したゲノム DNA を鋳型として、ADRB3 遺伝子を PCR にて増幅した。プライマーは翻訳領域全長を含むとともに、上流側には XhoI の制限酵素配列、下流側には Exon-2 の全配列と EcoRI の制限酵素配列を付加し、後の作業で制限酵素による切り出しが可能ないように設計した (表 3-1)。ちなみに上記 4 つのイヌ ADRB3 遺伝子塩基配列は、いずれもこの 2 つの制限酵素サイトを含まないことを事前に確認している。PCR は 98.0°C/10 秒間、70.0°C/120 秒間を 30 cycle の条件で行い、電気泳動にて増幅バンドを確認した (図 3-1)。

### 2. 変異遺伝子増幅産物の TA クローニング

TA クローニングのため、PCR 産物へのアデニン付加 (A 付加) を行った。使用した試薬は 10xA-attachment MIX (TOYOBO, Japan) で、60°C/20 分間で反応させた。A 付加後、pGEM T-Easy Vector (TOYOBO, Japan) へのライゲーションを行った (図 3-2)。即ち、1 サンプルにつき同キットに含まれる 2×Rapid buffer を 5 µl と PCR 産物を 2 µl、pGEM T-Easy Vector を 1 µl、T4 DNA Ligase を 1 µl、精製水を 1 µl で混和し、軽くタッピングして 1 時間室温で反応させた。次に、各ライゲーション産物を用いて大腸菌の形質転換を行った。氷上でコンピテントセル (DH5α, TaKaRa, Japan) を 1.5 ml チューブに 10 µl ずつ分注し、ライゲーション産物をチューブに 2 µl 加え 30 分間氷上にて静置した。次にウォーターバス

で 42.0°C/ 30 秒間加温し、再度氷上で 2 分間静置した。

形質転換の後、各チューブに 37°C で加温しておいた SOC Medium を 100  $\mu$ l ずつ添加し 1 時間振盪培養を行った。1 時間後にアンピシリン添加 LB 寒天培地に培養した産物を全量添加し、培地全体に広げた。36.5°C/18 時間で一晚培養した後、pGEM T-Easy に含まれる M13 配列の Primer 対を用いてインサートチェックを行った。電気泳動でインサートによるバンドを確認した後に、0.001% アンピシリン添加 LB 液体培地 5 ml にて一晚同条件にて培養を行った。

培養した大腸菌から、FastGene Plasmid DNA mini kit（日本ジェネティクス株式会社, Japan）を用いてプラスミド DNA を抽出した。即ち、培養液を 10,000 rpm/2 分間で遠心した後に上清を除去し、プラスミドのペレットに mP1 を 200  $\mu$ l 加えてボルテックスを行い、mP2 を 200  $\mu$ l 加えて転倒混和し、2 分間静置した後に mP3 を 300  $\mu$ l 加えた。13,000 rpm/5 分間で遠心した後に上清をカラムへ分注し、13,000 rpm/30 秒間で遠心した。廃液を除去し、mP4 を 400  $\mu$ l 加えて 13,000 rpm/30 秒間で遠心した。再度廃液を除去し、mP5 を 600  $\mu$ l 加えて 13,000 rpm/30 秒間で遠心した。もう一度廃液を除去し、13,000 rpm/2 分間で遠心してカラムから水分を完全に除去した。最後に mP6 を 100  $\mu$ l 加え、室温で 2 分間静置した後に、13,000 rpm/2 分間で遠心しプラスミド DNA 溶液を回収した。抽出したプラスミド DNA を電気泳動にて確認し、外注にて塩基配列を確認し変異配列の挿入を確認した。

### 3. 発現ベクターの作製

大腸菌から抽出した変異遺伝子を含む 4 種類のプラスミド DNA を、制限酵素である Xho1 および ExoR1 で切断した。即ち、多型ごとに 10 $\times$ Hi Buffer を 4  $\mu$ l と DNA を 20  $\mu$ l、Xho1 を 1  $\mu$ l、EcoR1 を 1  $\mu$ l、精製水を 14  $\mu$ l で混和し、37.0°C/2 時間で反応させた後に電気泳動にて目的のバンドを確認し、切り出しを行った。

切り出し後、HA タグが付いた発現ベクターである pMACS-HA-(C) (Miltenyl Biotech, Germany) ヘライゲーションし (図 3-3)、TA クローニングと同様の手順で大腸菌への形質転換を行った。36.5°C/18 時間で一晚培養した後、M13 配列のプライマー対を用いてインサートチェックを行った (表 3-1)。電気泳動にてインサートが確認されたコロニーの菌を 0.001%アンピシリン添加 LB 液体培地 5 ml に接種し、1 時間振盪培養を行った。続いて、0.001%アンピシリン添加 LB 液体培地を 100 ml を添加した滅菌 500 ml 三角フラスコに、振盪培養した培養液を 100 µl 添加して一晚振盪培養した。培養した大腸菌から、Nucleo bond plasmid Midi (Macherey Nagel, Germany) を用いて発現用プラスミド DNA を抽出、精製した。即ち、培養液を 50 ml 遠心管に移し 6,000 g/10 分間で遠心しプラスミドペレットを回収、バッファー RES+RNase A を 8 ml 添加してボルテックをかけ、ペレットを再懸濁した。次にバッファー LYS を 8 ml 懸濁液に加えて 5 回転倒混和し、室温で 5 分間インキュベートした。カラムおよびカラムフィルターをバッファー EQU 12 ml でプレウェットし、懸濁液にバッファー NEU を 8 ml 加えて 15 回転倒混和し、カラムフィルターへ添加した。懸濁液がカラムを通過したのを確認してからバッファー EQU を 5 ml 加え、カラムおよびカラムフィルターを洗浄した。カラムフィルターを廃棄しバッファー WASH を 8 ml 加えてカラムを洗浄した。DNA 回収用に新しい 50 ml 遠心管にカラムをセットし、バッファー ELU を 5 ml 加えプラスミド DNA を溶出した。回収したプラスミド溶液に 99.5%イソプロパノールを 3.5 ml 加え、ボルテックスした後に 2 分間室温でインキュベートし、さらに 15,000 g/30 分間で遠心して上清を除去した。ペレットに 70%エタノールを加え、15,000 g/5 分間で遠心して上清を除去した。UPW でペレットを溶解して精製プラスミド DNA とし、塩基配列を確認して変異が起きていないことを確認した。

#### 4. イヌ ADRB3 タンパク質の細胞発現

イヌ ADRB3 タンパク質を発現させるため、細胞導入ベクターの調整を行った。即ち、Opti-MEM 培地 (Thermo-Fisher Scientific, USA) 200  $\mu$ l に対して FuGENE HD (Promega, Japan) を 16  $\mu$ l、プラスミド DNA を 100 ng 添加し、軽くタッピングした後 15 分間静置した。細胞導入ベクターをコンフルエントに増殖したヒト胎児腎細胞由来 (HEK) 293T 細胞に加え、48 時間培養した後に培養上清を除去、PBS にて細胞を回収した。回収した細胞から RIPA Buffer (Nacalai Tesque, Japan) を用いてタンパク質を抽出した。即ち、1 サンプルにつき 10 $\times$ RIPA IB を 15  $\mu$ l と 10 $\times$ SDS-EDTA を 15  $\mu$ l、精製水を 120  $\mu$ l で混和し、細胞を PBS で 2 回洗浄した後に氷上に設置した。洗浄した各 well に RIPA IB を 150  $\mu$ l 加え、細胞を懸濁して 1.5 ml チューブへ移した。氷上で 10 分間インキュベートし、4 $^{\circ}$ C/15,300 g/10 分間で遠心した。上清を回収し、タンパク質溶液とした。

#### 5. イヌ ADRB3 タンパク質の発現解析

発現細胞から抽出した ADRB3 タンパク質を解析するため、TGS Buffer に浸した SDS PAGE の各 well に抽出したタンパク質を 10 ng 添加し、200 V で 40 分間泳動した。ゲルをプレートから外し Transfer buffer にて 10 分間振盪させゲルのタンパク質を固定した。Blotting buffer に浸したハイブリバックファード (メンブレン) と PVDF を用いて、0.18 A 未満の電流で 30 分間かけメンブレンにタンパク質を転写した。メンブレンを 1 $\times$ TBS-1%TWEEN へ浸透させた後にブロッキング溶液で 1 時間振盪した。15 ml 遠沈管で 0.1%ウサギポリクローナル ADRB3 抗体 (Abbiotec, Japan) およびマウスモノクローナル HA 抗体 (Abbotec, Japan) の反応液をそれぞれ作製し、メンブレンを 1 $\times$ TBS-1 %TWEEN で洗浄後に抗体反応液に浸し、4 $^{\circ}$ Cにて一晩静置した。反応後、ウサギポリクローナル ADRB3 抗体に対しては抗ウサギ抗体蛍光抗体を、マウスモノクローナル HA 抗体に対し

ては抗マウス抗体蛍光抗体の反応液に浸して 1 時間反応させ、画像解析ソフトにてタンパク質の検出を行った。解析を行ったタンパク質は空ベクターを導入した Mock、野生型 ADRB3 を発現させた WT、Ser250Phe、Pro374Arg、Pro395Gln の各 ADRB3 変異体を発現させた細胞の計 5 種類であった。また、陽性対象として全ての検体において  $\beta$ -actin タンパクの検出を行った。検出にはマウスポリクローナル  $\beta$ -actin 抗体 (Abbiotec, Japan) を使用した。

## 6. イヌ ADRB3 遺伝子変異による受容体機能解析

イヌ ADRB3 の変異が受容体機能に与える影響を解析するため、変異体を発現させた各細胞を複数のアゴニストで刺激し、cAMP の産生量を同一容量の培養液中の濃度として測定した。細胞に各タンパク質を発現させるまでの手順は、前項と同じ方法で行った。機能解析を行うための解析系は、空ベクターを添加した陰性コントロール (Mock)、WT、Ser250Phe、Pro374Arg、Pro395Gln の 5 系統とした。受容体を発現させた細胞はまず 1×PBS で 2 回洗浄した後に血清除外細胞乖離バッファーである Opti-MEM を 2ml ずつ加え、37°C/5%CO<sub>2</sub>/1 時間でインキュベートした。Opti-MEM を除外した後に 1×HBSS にて洗浄し、細胞を回収した。細胞は 0.05 % ウシ血清アルブミン添加 5 mmol /L HEPES で再懸濁した。

刺激実験として、非選択的アドレナリン受容体アゴニストであるアドレナリン (Adr) とノルアドレナリン (NAdr)、選択的 ADRB3 アゴニストである CL316,234、陰性コントロール設定のためホスホジエステラーゼ阻害薬である IBMX および RO20-1724 をそれぞれ最終濃度が 1 mM となるように細胞懸濁液 (10,000 個/well/50  $\mu$ l) の中に加え、室温で 30 分間反応させた。反応後、Cyclic AMP Select EIA Kit (Cayman Chemical Company, USA) を用いて cAMP の濃度を測定した。

表 3-1 イヌ ADRB3 機能解析試験に用いたプライマーの塩基配列

名称	塩基配列 (5'-3')	PCR 産物 (bp)
pMACS-Fwd	CGGCTCGGTGAGACTATTGG	1,228
pMACS -Rev	CCCAGCGCTCGACGGCGTCAGCGGGAATTCAAA	
pMACS-HA-F	GACATCGATTCGCGTACGC	
T7	AATACGACTCACTATAGGG	

Fwd : 上流側、Rev : 下流側

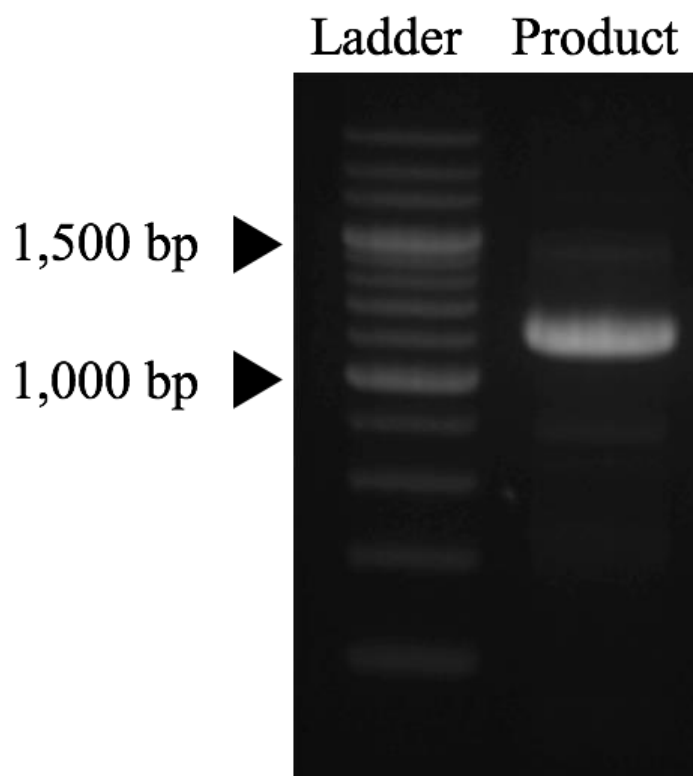


図 3-1 発現ベクター作製用プライマーで増幅したイヌ ADRB3 の PCR 産物

イヌ ADRB3 遺伝子の全翻訳領域を、両端に制限酵素部位を含むフラグメントとして増幅した。電気泳動の結果、予想される 1,226 bp 付近にバンドを確認した。

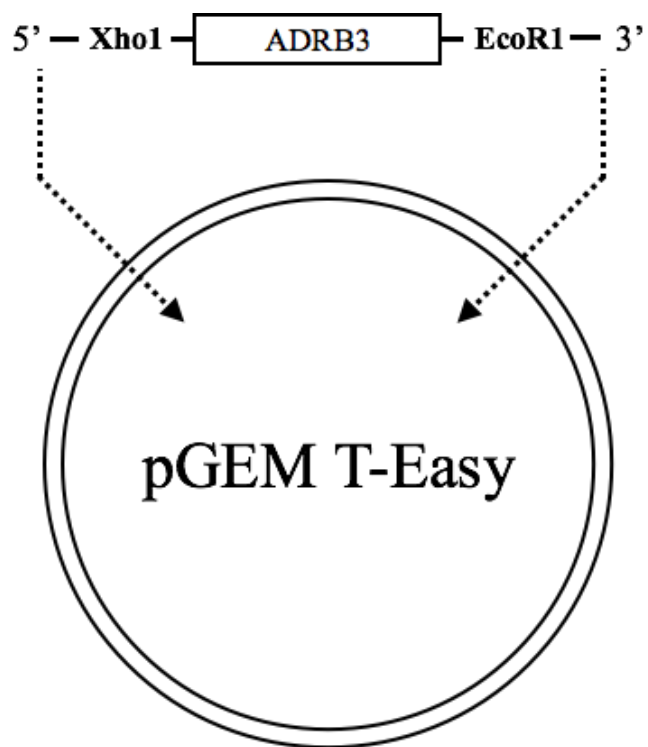


図 3-2 制限酵素を付加したイヌ ADRB3 遺伝子の TA クローニング

イヌ ADRB3 翻訳領域の 5'側に XhoI、3'側に EcoRI の制限酵素部位をそれぞれ付加し、TA クローニングにて pGEM T-Easy ベクターに挿入した。

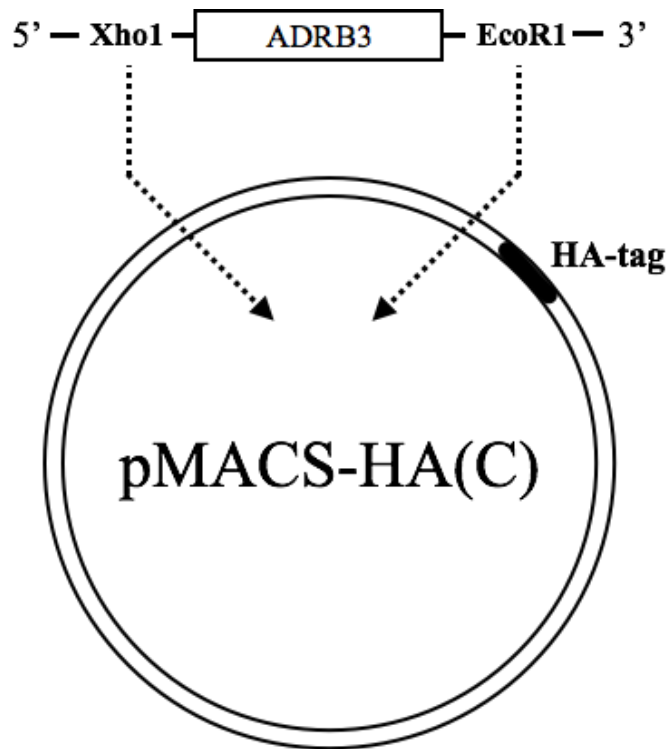


図 3-3 イヌ ADRB3 遺伝子の発現ベクターへの挿入

制限酵素部位を付加したイヌ ADRB3 遺伝子配列を pGEM ベクターから XhoI および EcoRI を作用させて切り出し、発現ベクターである pMACS-HA の制限酵素部位に挿入した。pMACS-HA には HA タグが含まれ、ADRB3 タンパクは HA を付加した形で発現する。



## 結果

### 1. ウェスタンブロット法による発現タンパク質の検出

発現系が適切に機能していることを確かめるため、Mock、WT、c.749C>T (Ser250Phe)、c.1121C>G (Pro374Arg)、c.1184C>A (Pro395Gln) の 5 つの細胞発現系から抽出したタンパク質を材料に、ウェスタンブロットを実施した (図 3-4)。その結果、マウスモノクローナル HA-tag 抗体を用いた解析では ADRB3 遺伝子をベクターへ組み込まなかった Mock の細胞抽出物を除き、ADRB3 遺伝子をベクターへ組み込んだ WT および 3 種の変異蛋白全てにおいて ADRB3 の分子量に相当する 37 kDa 付近に明瞭なバンドが観察された。一方、ウサギポリクローナル ADRB3 抗体を用いた解析では、Mock を含む全ての系で分子サイズの異なる位置に薄いバンドが確認されたのみであった。陽性対象である  $\beta$ -actin は全ての検体において検出された。

### 2. イヌ ADRB3 遺伝子変異が受容体機能に及ぼす影響

野生型 (WT) および各変異型のイヌ ADRB3 タンパク質を発現させた細胞に、アドレナリン (Adr)、ノルアドレナリン (NAdr)、CL316,243、IBMX、RO 20-1724 を作用させたときの cAMP 産生量を比較した (図 3-5)。

その結果、まず空ベクターを含む陰性コントロールの Mock の系では、全ての刺激において cAMP の産生は確認されなかった。次に、薬物を添加していない blank および cAMP 産生に抑制をかけた陰性コントロールの IBMX と RO20-1724 刺激下でも、全ての解析系で cAMP の産生が確認されなかった。

イヌ ADRB3 を発現している細胞を Adr (1 mM) で刺激すると、全ての細胞で cAMP の産生が確認された。測定値は WT が 22.6 pmol/ $\mu$ l、c.749C>T (Ser250Phe) が 16.2 pmol/ $\mu$ l、c.1121C>G (Pro374Arg) が 24.1 pmol/ $\mu$ l、c.1184C>A (Pro395Gln)

が 10.8 pmol/μl であった。

イヌ ADRB3 を発現している細胞を NAdr (1 mM) で刺激すると、全ての細胞で cAMP の産生が確認された。測定値は WT が 21.9 pmol/μl、c.749C>T (Ser250Phe) が 17.2 pmol/μl、c.1121C>G (Pro374Arg) が 23.2 pmol/μl、c.1184C>A (Pro395Gln) が 13.0 pmol/μl であった。

イヌ ADRB3 を発現している細胞を CL316,243 (1 mM) で刺激すると、全ての細胞で cAMP の産生が確認された。測定値は WT が 21.9 pmol/μl、c.749C>T (Ser250Phe) が 16.3 pmol/μl、c.1121C>G (Pro374Arg) が 23.2 pmol/μl、c.1184C>A (Pro395Gln) が 14.6 pmol/μl であった。

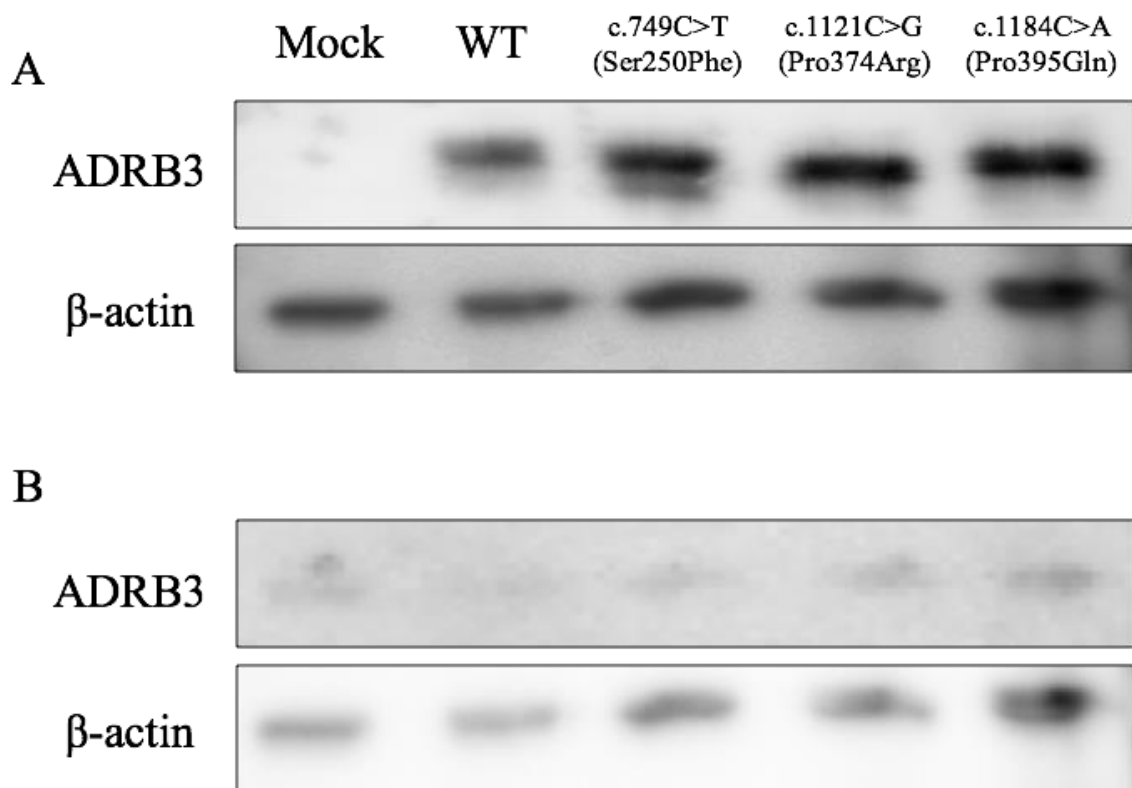


図 3-4 ウェスタンブロット法によるイヌ ADRB3 タンパク質の発現解析

HEK293T 細胞に空ベクター (Mock) または HA-tag を付加したイヌ ADRB3 遺伝子を含む発現ベクターを導入し、産生されたタンパク質を抗 HA 抗体 (A) または抗マウス ADRB3 抗体 (B) で検出した。下段は陽性コントロールとして検出した β-アクチンのバンドである。

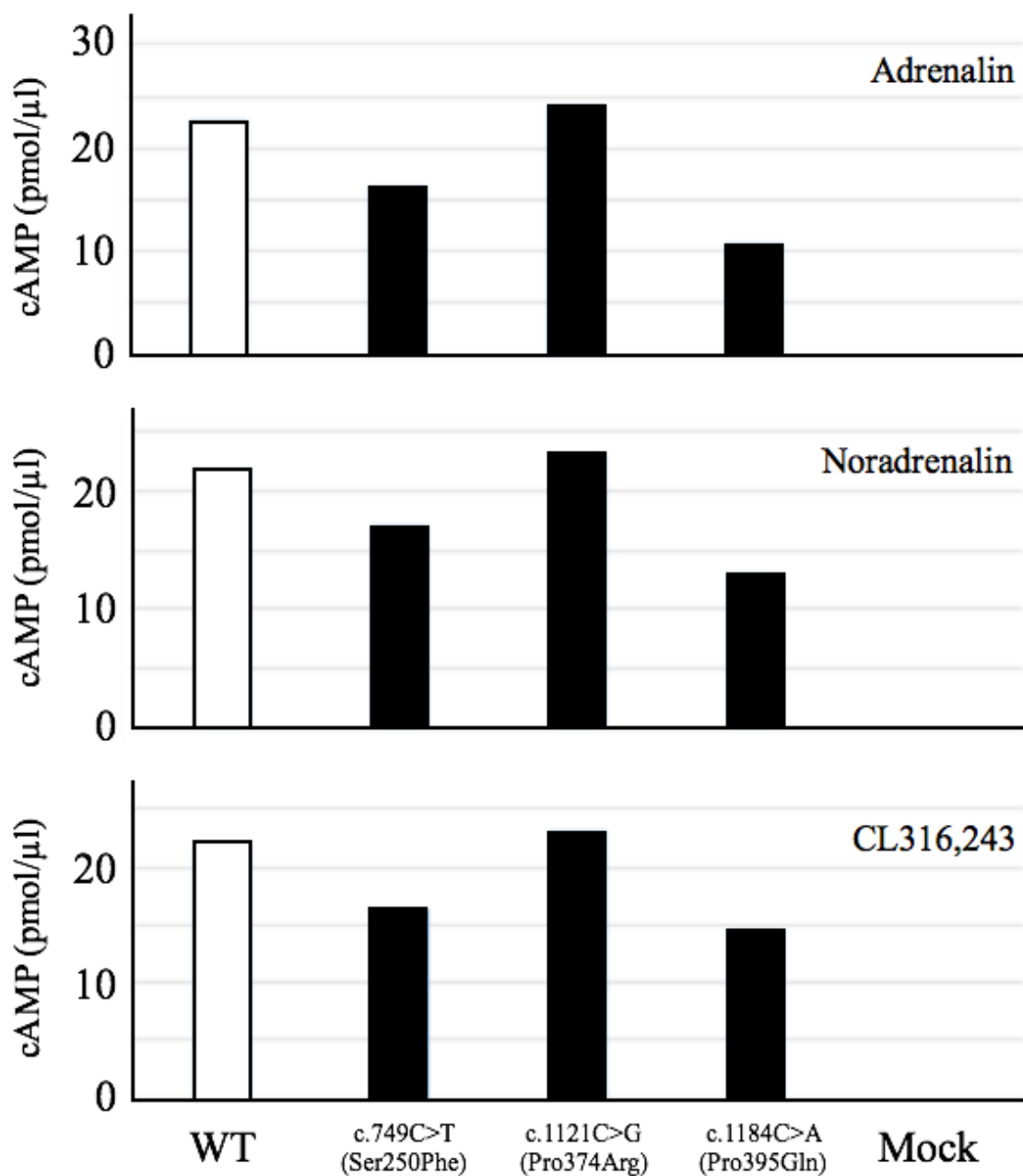


図 3-5 イヌ ADRB3 変異体のアドレナリン作動薬に対する反応解析

HEK293T 細胞にイヌ ADRB3 遺伝子 (WT および変異体 3 種) を含む発現ベクターを導入して ADRB3 を発現させ、アドレナリン (1 mM)、ノルアドレナリン (1 mM)、CL316,243 (1 mM) で刺激したときの cAMP 産生量を示す。

## 考察

前章までに発見したイヌ ADRB3 遺伝子の変異体について、細胞発現系を作製して刺激実験を行い、SNP ごとの機能的差違について検討した。まず、ADRB3 が発現しているかを確かめるため、細胞抽出物を材料としたウェスタンブロットを実施した。検出には本来、抗イヌ ADRB3 抗体を用いた解析が必要であるが、今回利用可能な抗体が入手できなかったため、やむをえず有効と思われる代用品にて検討した。まず、他種の ADRB3 に対する抗体として、ウサギポリクローナル ADRB3 抗体を用いた検討を行った。この抗体はヒト、マウス、ラットの ADRB3 への反応性が示されているが、この抗体では ADRB3 とサイズが異なる位置にごく薄いバンドが得られたのみで、空ベクターを導入した陰性コントロールにおいても同じバンドが検出された。従って、得られたバンドは非特異的な結合であり、イヌ ADRB3 タンパク質発現の有無を示すデータは得られなかった。次に、マウスモノクローナル HA-tag 抗体を用いた検討を行った。本研究に使用した発現ベクター pMACS-HA-(C)には遺伝子挿入部位の末尾に HA-tag の配列が含まれており、発現したタンパク質には HA-tag が付加されている。ウェスタンブロットの結果、空ベクターを導入した細胞 (Mock) ではバンドが検出されず、イヌ ADRB3 を発現させた細胞では全て強いバンドが生成した。この結果から、この抗 HA-tag 抗体が発現タンパク質の検出に有効であること、そして今回作製したイヌ ADRB3 の発現系が適切に機能していることが推察された。イヌやネコの分子生物学的研究では、ヒトやマウスと異なり適切な抗体の入手が困難な状況が少なくない。今回得られたデータは、この抗 HA-tag 抗体が ADRB3 に限らずこのベクターを用いた細胞発現試験でユニバーサルに利用可能である可能性を示している。

作製した細胞発現系を Adr、NAdr、CL316,234、IBMX、RO20-1724 の 5 種類

の薬物で刺激した結果、微量ではあるが cAMP 産生反応をとらえることができた。まず、Mock ではいずれの薬物で刺激したときも cAMP が検出できなかった。ので、反応が得られた系では発現タンパクが AC 機能に関与していると推察される。また、IBMX と RO20-1724 はホスホジエステラーゼ阻害薬であり、cAMP の産生を抑制する作用がある [Corradini et al., 2015; Kaneda et al., 2015]。もしこれらの薬物の刺激下で cAMP が検出されていれば、今回の評価系が非特異な現象を検出している可能性があるが、実験結果によるといずれも cAMP は検出限界未満であり、その可能性は否定できると考えられた。

ADRB3 の作動薬として作用する Adr、NAdr および CL316,243 は、いずれも ADRB3 発現細胞において cAMP の産生反応を誘導した。また、その際の cAMP 産生量は、いずれの作動薬においても変異体ごとにほぼ同様の傾向であった。即ち、WT と比較して c.749C>T (Ser250Phe) は約 2 割から 3 割の減少傾向を、c.1121C>G (Pro374Arg) は差が無いかあるいはごく僅かな上昇傾向を、c.1184C>A (Pro395Gln) は約 3 割から 5 割の減少傾向をそれぞれ示した。CL316,243 は ADRB3 の特異的作動薬であるが、内因性因子ではなく合成された化学物質なので、作用については種差を考慮しなければならない。しかし、これまでの研究によればイヌに CL316,243 を急性投与すると脂肪分解が刺激され、血液中の遊離脂肪酸が上昇することが知られている [Sasaki et al., 1998]。また、イヌに長期的に連日投与すると脂肪細胞が褐色化（またはベージュ細胞化）して UCP1 の発現が誘導され、抗肥満効果をもたらすことも報告されている。これらの知見から、CL316,243 は少なくともイヌの ADRB3 に対してリガンドとして作用すると現在では考えられている。この情報は、今回得られた知見と矛盾しない。

cAMP の産生抑制が見られた変異体のうち、c.749C>T (Ser250Phe) は、第 2 章において肥満群で遺伝子頻度が有意に高かった SNP である。また、前述のようにこの変異は細胞内領域に位置しており、アミノ酸の極性変化も伴っている。併

せて考えると、この変異が AC の活性に機能的影響を及ぼして細胞内メッセンジャーである cAMP の産生量を低下させ、脂肪分解能に影響することで肥満リスクを高めているという仮説を立てることができる。一方、第 2 章において低体重群で遺伝子頻度が有意に高かった c.1121C>G (Pro374Arg) は、cAMP 産生量にほとんど影響を及ぼさなかった。低体重群はサンプルサイズも小さいので、こちらについては表現形への影響を示すことは難しく思われた。最後に、チワワで保有率が高く特定の犬種により多く蓄積している可能性が疑われた c.1184C>A (Pro395Gln) は、最も cAMP 産生量が少ない結果であった。この SNP については未知の部分が多いが、今後疫学的なデータを追加し、さらに検証を進めることが必要と思われた。また、今回検出されたレベルの cAMP の変動が機能に影響するかについて、確実なことは不明である。しかし、ヒト ADRB3 の Trp64Arg 変異においても cAMP 産生量の差は微量であることから、イヌにおいても今回の微量な変化が個体ごとの肥満しやすさに影響を与えている可能性は十分に考えられる。ただし、本研究の結果については同一条件での実験をさらに複数回行い、再現性を確認するとともに統計学的評価を行うことが必要と考えられた。

## 小括

肥満リスクへの関与が推測されるイヌ ADRB3 の変異体について、細胞発現系を用いた *in vitro* の実験を行って受容体機能を評価し、第 2 章で得られた疫学データが分子レベルの知見に合致するかを検証した。まず、発現ベクターを用いてイヌ ADRB3 の野生型 (WT) および 3 つの変異体を HEK293T 細胞に発現させた。これらの細胞系が挿入したイヌ ADRB3 遺伝子を発現していることはウェスタンブロット法によって確かめ、実験に使用できることを確認した。次に、この細胞をアドレナリン、ノルアドレナリン、CL316,243 などさまざまなアドレナリン受容体作動薬で刺激したときの細胞内アデニレートシクラーゼ活性について、産生される cAMP 量を指標に評価した。その結果、WT に比べて c.1121C>G (Pro374Arg) と c.1184C>A (Pro395Gln) で cAMP の産生量が減少する傾向が認められた。これらの変異体は生体内でも受容体機能を低下させる可能性があり、第 2 章で見い出された疫学データを一部裏付けるものであると考えられた。



## 総括

肥満はイヌにおいて最も一般的な代謝異常であり、膵炎や高脂血症、関節疾患のリスクを高めるだけでなく寿命も短縮させるなど、多くの害が知られている。肥満の治療や予防は主に栄養学の視点から行われるが、イヌの代謝レベルには個体差が大きく、栄養管理上の困難をもたらしている。代謝の個体差を生み出しているのは遺伝的多型と考えられるが、肥満リスクへの関与が直接的に示された遺伝的変異は今のところ知られていない。もし特定の遺伝子変異がイヌの肥満傾向に影響するなら、そのデータは栄養管理上有益であり、また将来的に遺伝子検査の評価項目として利用可能である。本研究では、2つの遺伝子に着目してイヌの肥満関連遺伝子としての可能性をまず疫学的に調査し、肥満に関する可能性のある SNP について明らかにした。次に、候補となった SNP を対象に細胞発現系を用いた *in vitro* の実験を行い、表現型への影響を検証した。

第1章では、候補遺伝子の一つとして GPR120 に着目し、多型解析を行って肥満との関係を考察した。GPR120 は中鎖および長鎖脂肪酸をリガンドとする脂肪酸受容体の一種であり、ヒトでは Arg270His 変異が肥満リスクとなることが疫学調査および *in vitro* 実験の両方で示されている。イヌ GPR120 について調べたところ、塩基配列やアミノ酸配列および組織発現分布がヒトやマウスと似通っており、イヌ GPR120 は他の動物種と同様の機能を持つ可能性が示された。次に、141頭の犬を対象に遺伝子多型調査を行ったところ、5種類の同義置換と4種類の非同義置換を発見した。非同義置換の一つである c.287T>G (Leu96Arg) はビーグルのみで見つかったことから、犬種特異的な変異である可能性が示された。また、c.595C>A (Pro199Thr) は BCS=4 または 5 の肥満群において BCS=3 の健常群より遺伝子頻度が有意に高く、イヌの肥満リスクに関与する可能性が示された。

第2章では、もう一つの肥満関連候補遺伝子として ADRB3 に着目し、同じく多型解析を行って肥満との関係を考察した。ADRB3 は脂肪細胞に主に発現するアドレナリン受容体のサブタイプの一つであり、ヒトにおいて Trp64Arg 変異が肥満リスクとなることが示されている。160頭の犬を対象に遺伝子多型調査を行ったところ、5種類の同義置換と7種類の非同義置換を発見した。非同義置換の一つである c.1184C>A (Pro395Gln) は、チワワに高率に集積している可能性が示唆された。また、c.749C>T (Ser250Phe) が肥満群で、c.1121C>G (Pro374Arg) が低体重群で、それぞれ遺伝子頻度が有意に高かったことから、この2つの SNP はイヌの肥満リスクに関与する可能性が示された。

第3章では、肥満リスクへの関与が推測されたイヌ ADRB3 の変異体について、細胞発現系を用いた *in vitro* の実験を行って受容体機能を評価した。発現ベクターを用いてイヌ ADRB3 の野生型 (WT) および3つの変異体を HEK293T 細胞に導入したところ、これらの細胞は挿入したイヌ ADRB3 遺伝子を発現していた。この細胞をアドレナリン、ノルアドレナリン、CL316,243 などさまざまなアドレナリン受容体作動薬で刺激したときに細胞内で産生される cAMP 量を測定すると、WT に比べて c.1121C>G (Pro374Arg) と c.1184C>A (Pro395Gln) で cAMP の産生量が減少する傾向が認められた。これらの変異体は生体内でも受容体機能を低下させる可能性があり、第2章で得られた疫学データが一部裏付けられる結果となった。

以上の結果より、GPR120 と ADRB3 はともにイヌの肥満関連遺伝子である可能性が示された。特に GPR120 の c.595C>A (Pro199Thr) と ADRB3 の c.1121C>G (Pro374Arg) は疫学的に肥満群で有意に高く、個別別栄養管理のための基礎データとして、将来的に有用な遺伝子検査項目となるかもしれない。

## 謝辞

本論文を推敲するにあたり終始懇切な御指導および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臨床部門左向敏紀教授に甚大なる謝意を表します。また本研究を行う上で多大なる御協力、御助言を頂きました同部門石岡克己准教授、同大学獣医保健看護学基礎部門近江俊徳教授、落合和彦講師、同大学獣医保健看護学応用部門小林真理子教授に深く感謝いたします。

特に第3章の実験において、日本獣医生命科学大学獣医保健看護学基礎部門の落合和彦講師、加藤由比子氏には特別多大な御指導、御協力、御鞭撻、御助言を賜り、心より深く感謝いたします。

さらに研究を支えてくださった日本獣医生命科学大学獣医保健看護学臨床部門所属小野沢栄里氏と同室員にも感謝申し上げます。

## 引用文献

Balogh O, Kowalewski MP, Reichler IM. Leptin and leptin receptor gene expression in the canine corpus luteum during diestrus, pregnancy and after aglepristone-induced luteolysis. *Reprod. Domest. Anim.*, 2012. 6:40-2.

Baturin AK, Pogozheva AV, Sorokina Elu, Makurina ON, Tutel'ian VA. [The Trp64Arg polymorphism of beta3-adrenoreceptor gene study in persons with overweight and obesity]. *Vopr. Pitan.*, 2012. 81(2)23-7.

Bauer JE. Therapeutic use of fish oils in companion animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2011. 239:1441-51.

Belfer I, Buzas B, Evans C, Hipp H, Phillips G, Taubman J, Lorincz I, Lipsky RH, Enoch MA, Max MB, Goldman D. Haplotype structure of the beta adrenergic receptor genes in US Caucasians and African Americans. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2005. 13(3):341-51.

Bonnefond A, Lamri A, Leloire A, Vaillant E, Roussel R, Levy-Marchal C, Weill j, Galan P, Hercberg S, Ragot S, Hadjadj S, Charpentier G, Balkau B, Marre M, Fumeron F, Froguel P. Contribution of the low-frequency, loss-of-function p.R270H mutation in FAR4(GPR120) to increased fasting plasma glucose levels. *J. Med. Genet.*, 2015. 52(9):595-8.

Boss O, Muzzin P, Giacobino JP. The uncoupling proteins, a review. *Eur. J. Pharmacol.*, 1998. 139:1-9.

Bradnova O, Vejražková D, Vanková M, Lukášová P, Vcelák J, Stanická S, Dvorská K, Bendlová B. Metabolic and hormonal consequences of the “obesity risk” MC4R variant (rs12970134) in Czech women. *Physiol. Res.*, 2015. 2:S187-95.

Brodani LA, Duarte GC, Canani LH, Crispim D. The presence of at least three alleles of the ADRB3 Trp64Arg(C/T) and UCP1 -3826A/G polymorphisms is associated with protection to overweight/obesity and with higher high-density lipoprotein cholesterol levels in Caucasian-Brazilian patients with type 2 diabetes. *Metab. Syndr. Relat. Disord.*, 2014. 12(1):16-24.

Brown DC, Cozemius MG, Shofer FS. Body weight as a predisposing factor for humeral condylar fractures, cranial cruciate rupture and intervertebral disc disease in Cocker Spaniels. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.*, 1996. 9:75-8.

Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science.*, 2001. 294(5548):1866-70.

Clapham JC, Arch JR, Chapman H, Haynes A, Lister C, Moore GB, Piercy V, Carter SA, Lehner I, Smith SA, Beeley LJ, Godden RJ, Herrity N, Skehel M, Changanani KK, Hockings PD, Reid DG, Squires SM, Hatcher J, Trail B, Latcham J, Rastan S, Harper AJ, Cadenas S, Buckingham JA, Brand MD, Abuin A. Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature.*, 2000. 406:415-8.

- Corbee RJ. Obesity in show dogs. *J. Anim. Physiol. Nutr. (Berl.)*, 2012. 10.1111.
- Corradini E, Klaasse G, Leurs U, Heck AJ, Martin NI, Scholten A. Charting the interactome of PDE3A in human cells using an IBMX based chemical proteomics approach. *Mol. Biosyst.*, 2015. 11(10):2786-97.
- Daghestani MH, Warsy A, Daghestani MH, Al-Odaib AN, Eldali A, Al-Eisa NA, Omer SA, Hassan ZK. Arginine 16 Glycine Polymorphism in  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor Gene is Associated with Obesity, Hyperlipidemia, Hyperleptinemia, and Insulin in Resistance in Saudis. *Int. J. Endocrinol.*, 2012. 10.1155.
- de Godoy MR, Swanson KS. Companion Animals Symposium: nutrigenomics: using gene expression and molecular biology data to understand pet obesity. *J. Anim. Sci.*, 2013. 91(6):2949-64.
- Dib A, Adelaide J, Chaffanet M, Imbert A, Le Paslier D, Jacquemier J, Gaudray P, Theillet C, Birnbaum D, Pebusque MJ. Characterization of the region of the short arm of chromosome 8 amplified in breast carcinoma. *Oncogene.*, 1995. 10(5):955-1001.
- Di Loria A, Squillacioti C, De Luca A, Veneziano V, Mirabella N, Guccione J, Santoro D. Increased leptin mRNA expression in the blood of dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet. J.*, 2014. 202(3):634-6.
- Edney, A.T.B. Management of obesity in the dog. *Vet. Med. Small. Anim. Pract.*, 1974. 69:46-9
- Edney, A. T. B & Smith, P. M. Study of obesity in dogs visiting veterinary practices in the United Kingdom. *Vet. Rec.*, 1986. 118: 391-6.

Faller KM, Bras J, Sharpe SJ, Adnerson GW, Darwent L, Kun^Rodrigues C, Alroy J, Penderis J, Mole SE, Gutierrez-Quintana R, Guerreiro RJ. The Chihuahua dog: A new animal model for neuronal ceroid lipofuscinosis CLN7 disease? *J. Neurosci. Res.*, 2016. 10.1002.

Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat. Med.*, 1995. 1(12):1311-4.

Fukunaga S, Setoguchi S, Hirasawa A, Tsujimoto G. Monitoring ligand-mediated internalization of G protein-coupled receptor as a novel pharmacological approach. *Life. sci.*, 1995. 80: 17-23.

Genelhu VA, Francischetti EA, Duarte SF, Celoria BM, Oliveira RC, Cabello PH, Pimentel MM. Beta3-adrenergic receptor polymorphism is related to cardiometabolic risk factors in obese Brazilian subjects. *Genet. Mol. Res.*, 2010. 9(3):1392-7.

Gotoh C, Hong YH, Iga T, Hishikawa D, Suzuki Y, Song SH, Choi KC, Adachi T, Hirasawa A, Tsujimoto G, Sasaki S, Roh SG. The regulation of adipogenesis through GPR120. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007. 354(2):591-7.

Granneman JG, Li P, Zhu Z, Lu Y. Metabolic and cellular plasticity white adipose tissue I: effects of beta3-adrenergic receptor activation. *Am. J. Physiol. Ecdocrinol. Metab.*, 2005. 289(4):E608-16.

Habara M, Tamanuki M, Ishikawa S, Takemitsu H, Mori M, Okada Y, Nakao N, Kawasumi K, Ishioka K, Arai T, Yamamoto I. Identification of Free Fatty Acid Receptors GPR40/FFAR1 and GPR120/FFAR4 in a Domestic Cat. *Asia. J. Anim. Oh. Vet. Adv.*, 2015. 10(4):185-190.

Hess RS, Kass PH, Shofer FS, Van Winkle TJ, Washabau RJ. Evaluation of risk factors for fatal acute pancreatitis in dogs. *J. AM. Vet. Med. Assoc.*, 1999. 214(1):46-51.

Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, Sugimoto Y, Miyazaki S, Tsujimoto G. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nature. med.*, 2005. 11(1):90-4.

Iemitsu M, Fujie S, Murakami H, Sanada K, Kawano H, Gando Y, Kawakami R, Tanaka N, Miyachi M. Higher cardiorespiratory fitness attenuates the risk of atherosclerosis associated with ADRB3 Trp64Arg polymorphism. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 2014. 114(7):1421-8.

Ichimura A, Hirasawa A, Poulain-Godefroy O, Bonnefond A, Hara T, Yengo L, Kimura I, Leloire A, Liu N, Iida K, Choguet H, Besnard P, Lecoœur C, Viveguin S, Ayukawa K, Takeuchi M, Ozawa K, Tauber M, Maffeis C, Morandi A, Buzzetti R, Elliott P, Pouta A, Jarvelin MR, Komer A, Kiess W, Pigeyre M, Caiazzo R, Van Hui W, Van Gaal L, Hober F, Balkau B, Levy-Marchal C, Rouskas K, Kouvatsi A, Hevebrand J, Hinney A, Scherag A, Pattou F, Meyre D, Koshimizu TA, Wolowczuk I, Tsujimoto G, Froguel P. Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in boty mouse and human. *Nature.*, 2012. 483(7389):350-4.



Ishioka K, Kanehira K, Sasaki N, Kitamura H, Kimura K, Saito M. Canine mitochondrial uncoupling proteins: structure and mRNA expression of three isoforms in adult beagles. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 2002. 131(3):483-9.

Ishioka K, Mohamed MS, Okumura M, Sagawa M, Shibata H, Honjoh T, Kitamura H, Kimura K, Saito M. Effects of fish oil feeding on obesity and UCP expression in dogs.

Ishioka K, Omachi A, Sagawa M, Shibata H, Honjoh T, Kimura K, Saito M. Canine adiponectin: cDNA structure, mRNA expression in adipose tissues and reduced plasma levels in obesity. *Res. Vet. Sci.*, 2006. 80:127-32.

Ishioka K, Soliman MM, Sagawa M, Nakadomo F, Shibata H, Honjoh T, Hashimoto A, Kimura K, Saito M. Experimental and clinical studies on plasma leptin in obese dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, 2002. 64:349-53.

Iwase M, Kimura K, Sasaki N, Komagome R, Ishioka K, Morimatsu M, Murakami T, Saito M. Canine leptin: cDNA cloning, expression and activity of recombinant protein. *Res. Vet. Sci.*, 2000. 68: 109-14.

Kaneda T, Kido Y, Tajima T, Urakawa N, Shimizu K. PDE4 and PDE5 regulate contents and relaxing effects on carbachol-induced contraction in the bovine abomasum. *J. Vet. Med. Sci.*, 2015. 77(1):15-9.

Katsuma S, Hatae N, Yano T, Ruike Y, Kimura M, Hirasawa A, Tsujimoto, G. Free fatty acids inhibit serum deprivation-induced apoptosis through GPR120 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *J. Biol. Chem.*, 2005. 280(20):19507-15.

Kawasumi K, Kashiwado N, Okada Y, Sawamura M, Sasaki Y, Iwazaki E, Mori N, Yamamoto I, Arai T. Age effects on plasma cholesterol and triglyceride profiles and metabolite concentrations in dogs. *BMC. Vet. Res.*, 2014. 10:57.

Kealy RD, Lawler DF, Ballam JM, Mantz SL, Biery DN, Greeley EH, Lust G, Segre M, Smith GK, Stowe HD. Effects of diet restriction on life span and age-related changes in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2002. 220(9):1315-20.

Kuo NW, Tung KY, Tsai CH, Chen YC, Lee YL.  $\beta$ 3-Adrenergic receptor gene modifies the association between childhood obesity and asthma. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 2014. 134(3):731-3.

Kurokawa N. [Association of BMI with the beta3 adrenergic receptor gene mutation: a meta-analysis]. *Nihon. Eiseigaku. Zasshi.* 2011., 66(1):42-6.

Lee YH, Kim SN, Kwon HJ, Maddipati KR, Granneman JG. Adipogenic role of alternatively activated macrophages in  $\beta$ -adrenergic remodeling of white adipose tissue. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.*, 2016. 310(1):R55-65.

Moran BM, Flatt PR, Mckillop AM. G protein-coupled receptors: signaling and regulation by lipid agonists for improved glucose homeostasis. *Acta. Diabetol.*, 2016. 1-12.

Lee YM, Han SI, Won YJ, Lee E, Parl E, Hwang SY, Yeum KJ. Black Rice with Giant Embryo Attenuated Obesity-Associated Metabolic Disorders in ob/ob Mice. *J. Agric. Food. Chem.*, 2015. 10.1021.

MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD. Regulated expression of the obese gene product(leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1995. 92(20):9034-7.

Mankowska M, Stachowiak M, Graczyk A, Ciazynska P, Gogulski M, Nizanski W, Switonski M. Sequence analysis of three canine adipokine genes revealed an association between TNF polymorphisms and obesity in Labrador dogs. *Anim. Genet.*, 2015. 10:1111.

Milligan G, Alvarez-Curto E, Watterson KR, Ulven T, Hudson BD. Characterizin pharmacological ligands to study the long-chain fatty acid receptors GPR40/FFA1 and GPR120/FFA4. *Br. J. Pharmacol.*, 2015. 172(13):3254-65.

Mirрахимов AE, Керимкулова AS, Лунегова OS, Молдокеева CB, Залеская YV, Абилова SS, Соьхозова NA, Алдасhev AA, Mirрахимов EM. An association between TRP64ARG polymorphism of the B3 adrenoreceptor gene and some metabolic disturbances. *Cardiovasc. Diabetol.*, 2011. 10: 89.

Nakamura Y, Nagase I, Asano A, Sasaki N, Yoshida T, Umekawa T, Sakane N, Saito M. Beta 3-adrenergic agonist up-regulates uncoupling proteins 2 and 3 in skeletal muscle of the mouse. *J. Vet. Med. Sci.*, 2001. 63(3):309-14.

Oda H, Mori A, Lee P, Saeki K, Arai T, Sako T. Preliminary study characterizing the use of sitagliptin for glycemic control in healthy Beagle dogs with normal glucose homeostasis. *J. Vet. Med. Sci.*, 2014. 76(10):1383-7.

Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu WJ, Watkins SM, Olefsky JM 2010. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell.*, 2010. 142(5):687-98.

Ohshiro Y, Ueda K, Nishi M, Ishigame M, Wakasaki H, Kawashima H, Furuta H, Sasaki H, Sanke T, Takasu N, Nanjo K. A polymorphic marker in the leptin gene associated with Japanese morbid obesity. *J. Mol. Med.*, 2000. 78(9):516-20.

Omachi A, Ishioka K, Uozumi A, Kamikawa A, Toda C, Kimura K, Saito M. Beta3-adrenoceptor agonists AJ-9677 reduces body fat in obese beagles. *Res. Vet. Sci.*, 2007. 83(1):5-11.

Oulhaj A, Jemeren F, Refsum H, David Smith A, de Jager CA. Omega-3 Fatty Acid Status Enhances the Prevention of Cognitive Decline by B Vitamins in Mild Cognitive Impairment. *J. Alzheimers. Dis.*, 2016. 10:3233.

Ovsyannikova IG, White SJ, Larrabee BR, Grill DE, Jacobson RM, Poland GA. Leptin and Leptin-related gene polymorphisms, obesity, and influenza A/H1N1 vaccine-induced immune responses in older individuals. *Vaccine.*, 2014. 32(7):881-7.

Park HJ, Lee SE, Kim HB, Isaacson RE, Seo KW, Song KH. Association of obesity with serum leptin, adiponectin, and serotonin and gut microflora in beagle dogs. *J. Vet. Intern. Med.*, 2015. 29(1):43-50.

Perez-Sanchez AP, Del-Angel-Caraza J, Quijano-Hernandez IA, Barbosa-Mireles MA. Obesity-hypertension and its relation to other disease in dogs. *Vet. Res. Commun.*, 2015. 39(1):45-51.

Platt TL, Beckett TL, Kohler K, Niedowicz DM, Murphy MP. Obesity diabetes, and leptin resistance promote tau pathology in a mouse model of disease. *Neuroscience.*, 2016. 315:162-74.

Richards P, Pais R, Habib AM, Brighton CA, Yeo GS, Reimann F, Gribble FM. High fat diet impairs the function of glucagon-like peptide-1 producing L-cells. *Peptides.*, 2015. 9781(15):00189-8.

Ricquier D, Bouillaud F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP, AtUCP. *Biochem. j.*, 2000. 345:161-79.

Sahin DS, Tumer C, Demir C, Celik MM, Celik M, Ucar E, Gunesacar R. Association with Leptin Gene c.-2548 G>A Polymorphism, Serum Leptin Levels, and Body Mass Index in Turkish Obese Patients. *Cell. Biochem. Biophys.*, 2013. 65(2):243-7.

Sasaki N, Uchida E, Niiyama M, Yoshida T, Saito M. Anti-obesity effects of selective agonists to the beta 3-adrenergic receptor in dogs. I. The presence of canine beta 3-adrenergic receptor and in vivo lipomobilization by its agonists. *J. Vet. Med. Sci.*, 1998. 60(4):459-63.

Sims-Robinson C, Bakeman A, Glasser R, Boqqs J, Pacut C, Feldman EL. The role of endoplasmic reticulum stress in hippocampal insulin resistance. *Exp. Neurol.*, 2016. 4886(16):30007-3.

Singh P, Sharma P, Sahakyan KR, Davison DE, Sert-Kunoyosi FH, Romero-Corral A, Swain JM, Jensen MD, Lopez-Jimenez F, Kara T, Somers VK. Different effects of leptin on adiponectin with weight gain versus obesity. *Int. J. Obes. (Lond.)*, 2015. 10.1038

Skeberdis VA. Structure and function of beta3-adrenergic receptors. *Medicina. (Kaunas.)*, 2004. 40(5):407-13.

Sonnenschein EG, Glickman LT, Goldchmidt MH, McKee LJ. Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. *Am. J. Epidemiol.*, 1991. 133(7):694-703.

Spaethling JM, Sanchez-Alavez M, Lee J, Xia FC, Dueck H, Wang W, Fisher SA, Sui JY, Seale P, Kim J, Bartfai T, Eberwine J. Single-cell transcriptomics and functional target validation of brown adipocytes show their complex roles in metabolic homeostasis. *FASEB. J.*, 2016. 30(1):81-92.

Suckow AT, Polidori D, Yan W, Chon S, Ma JY, Leonard J, Briscoe CP. Alteration of the glucagon axis in GPR120(FFAR4) knockout mice: a role for GPR120 in glucagon secretion. *J. Biol. Chem.*, 2014. 289(22):15751-63.

Tanaka T, Katsuma S, Adachi T, Koshimizu TA, Hirasawa A, Tsujimoto G. Free fatty acids induce cholecystokinin secretion through GPR120. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 2008. 377(4-6):523-7.

Udagawa C, Tada N, Asano J, Ishioka K, Ochiai K, Bonkobara M, Tsuchida S, Omi T. The genetic association study between polymorphisms in uncoupling protein 2 and uncoupling protein 3 and metabolic data in dogs. *BMC. Res. Notes.*, 2014. 7:904

Verkest KR, Fleeman LM, Morton JM, Ishioka K, Rand JS. Compensation for obesity-induced insulin resistance in dogs: assessment of the effects of leptin, adiponectin, and glucagon-like peptide-1 using path analysis. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 2011. 41(1):24-34.

Verkest KR, Fleeman LM, Morton JM, Groen SJ, Suchodolski JS, Steiner JM, Rand JS. Association of postprandial serum triglyceride concentration and serum canine pancreatic lipase immunoreactivity in overweight and obese dogs. *J. Vet. Intern. Med.*, 2012. 26(1):46-53.

Voorbij AM, Leegwater PA, Buijtels JJ, Daminet S, Kooistra HS. Central Hypothyroidism in Miniature Schnauzers. *J. Vet. Intern. Med.*, 2015. 10.1111.

Vrydag W, Alewijnse AD, Michel MC. Do gene polymorphisms alone or in combination affect the function of human  $\beta$ 3-adrenoceptors? *Br. J. Pharmacol.*, 2009. 156:127-134.

Wellhauser L, Belsham DD. Activation of the omega-3 fatty acid receptor GPR120 mediated anti-inflammatory actions in immortalized hypothalamic neurons. *J. Neuroinflammation.*, 2014. 11:60.

Xenoulis PG, Steiner JM. Lipid metabolism and hyperlipidemia in dogs. *Vet. J.*, 2010. 183(1):12-21.

Yamakita M, Ando D, Tang S, Yamagata Z, The Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene is associated with weight changes in obese Japanese men: a 4-year follow-up study. *J. Physiol. Anthropol.*, 2010. 29(4):133-9.

Yoshida T. [Beta3-adrenergic receptor gene polymorphism]. *Nihon. Rinsho.*, 2006. 5:455-8.

Zeng R, Zhanq Y, Du P. SNPs of melanocortin 4 receptor (MC4R) associated with body weight in Beagle dogs. *Exp. Anim.*, 2014. 63(1):73-8.



## SUMMARY

### Introduction

Obesity is a condition that the energy intake exceed energy expenditure, and excessive fat is accumulated to white adipose tissues. Two kinds of factors are related to obesity, such as environmental and genetic factors. Environmental factors includes daily lifestyle such as dietary habits and exercise quantity. Genetic factors depend on genetic polymorphism which influences the metabolism. As obesity-related genes in human beings, uncoupling proteins (UCPs), leptin, leptin receptors, beta-2 and beta-3 adrenergic receptors (ADRB3) genes have been reported. Recent years, G protein-coupling receptor 120 (GPR120) has been added to the list.

GPR120 is a fatty acid receptor relating to hormonal secretory functions such as glucagon-like peptide-1 and cholecystokinin. Gene polymorphisms are reported in human GPR120, especially the His270Arg mutant is functionally related to obesity. GPR120 is expressed in the lung, jejunum, ileum, colon, hypothalamus, hippocampus, spinal cord, bone marrow, skin and white adipose tissue in rodents and humans.

ADRB3 is a subtype of adrenergic receptors, which is expressed mainly in adipocytes. When adipocytes were stimulated with adrenergic agonists, acyl-glycerol would be broken down into glycerol and fatty acids, then causes heat production. In humans with Trp64Arg mutated ADRB3, the resting metabolism decrease by 200-220 kcal compared to wildtype people, and that increases risks of obesity and diabetes.

In veterinary medicine, obesity is the most common nutritional disorder as in human medicine. Epidemiological studies have revealed that one third or fourth of dogs are overweight or obese in developed countries. Furthermore, Obesity is a risk factor of pancreatitis, hyperlipidemia and arthritis in dogs. However, there is no report investigating obesity-related genes in dogs. In the present study, we focused on two candidate genes, such as GPR120 and ADRB3, and analyzed the relationship between their genetic polymorphism and body condition scores in dogs.

We have searched for SNPs of GPR120 (chapter 1) and ADRB3 (chapter 2) in client-owned dogs, and investigated the relationship between their gene frequency and body condition scores. In Chapter 3, we have developed a cell expression system which expresses ADRB3 mutants, and compared their molecular functions.

## **Chapter 1: Analyses of canine GPR120, a possible obesity-related gene in dogs.**

GPR120 is a member of the free fatty acid receptor family, which assumes long chain and unsaturated fatty acids as ligands. Fatty acids are not only energy source as substrates of beta-oxidation, but also signaling molecules in various cellular functions. It is reported that GPR120-deficient mice have developed obesity with fatty liver and insulin intolerance following a high fat diet feeding. In human GPR120 studies, higher gene frequency of the Arg270His mutant is detected in obese people, and the signaling function is attenuated, so this mutant is thought to be a risk factor of obesity.

In this chapter, we have cloned canine GPR120 cDNA and revealed the molecular nature. We have explored single nucleotide polymorphisms (SNPs) of GPR120 in 141 patient dogs' genome DNA, and investigated the relationship with obesity. Focus is on finding the candidate obesity-related genetic variations of cGPR120.

Cloned canine GPR120 consisted of 1,086 bases including ORF. Furthermore, canine GPR120 was 84-95 % identical to those of the human, mouse, rat, cat, horse, pig, and white bear. They were comprised of 361 amino acids, and the homology of the amino acid sequences were 78-96%. The highest identity was found to cats, and the lowest to rats. Tissue distribution analysis revealed that canine GPR120 was expressed in the lung, jejunum, ileum, large intestine, hypothalamus, hippocampus, spinal cord, bone marrow, skin, and adipose tissue.

We have analyzed GPR120 genomic sequences of 141 dogs, and found 5 synonymous and 4 non-synonymous SNPs. Gene frequencies of c.287T>G (Leu96Arg) variant was 0.125 in all dogs (n=141) and 0.500 in beagle dogs (n=36). The variant c.595C>A (Pro199Thr) was detected in 40 of 141 dogs tested, and the gene frequency was significantly higher in overweight and obese dogs than that in normal dogs (p=0.022).

The purpose of this chapter was to discover the genetic variants of canine GPR120 as candidate obesity-related genes. We have cloned canine GPR120 cDNA, and revealed the tissue distribution according to rodents and human studies. We have found 4 non-synonymous SNPs, especially the gene frequency of c.595C>A (Pro199Thr) was significantly higher in overweight and obese dogs suggestive of that the variant is a candidate obesity-related gene in dogs.

## **Chapter 2: Analyses of canine ADRB3, a possible obesity-related gene in dogs.**

Beta 3-adrenergic receptor (ADRB3) is a subtype of adrenergic receptors, which has a seven times transmembrane structure and G protein-coupling structure expressed mainly in the white adipose tissue. When adipocytes were stimulated with adrenergic agonists, acyl-glycerol would be broken down into glycerol and fatty acids, then causes heat production. In human beings, when the 189th base of the ADRB3 gene mutates from thymine to cytosine, the 64th amino acid constituting ADRB3 mutates from tryptophan to arginine. In this mutant, the resting metabolism decrease by 200-220 kcal compared to wildtype people, and that increases risks of obesity and diabetes.

In this chapter, we have explored single nucleotide polymorphisms (SNPs) of ADRB3 in 160 patient dogs' genome DNA, and investigated the relationship with obesity. Focus is on finding the candidate obesity-related genetic variations of ADRB3.

We have analyzed ADRB3 genomic sequences of 160 dogs, and found 5 synonymous and 7 non-synonymous SNPs. Gene frequency of c.749C>T (Ser150Phe) was 0.194, detected in 13 dog breeds including Yorkshire terrier and Miniature dachshund which are reported easy to grow fat, and it was significantly higher in overweight and obese dogs than that in normal dogs ( $p=0.0001$ ). Gene frequency of c.1121C>G (Pro374Arg) was 0.053, detected in 7 dog breeds including Yorkshire terrier and Miniature dachshund, and it was significantly higher in underweight dogs than that in normal dogs ( $p=0.0001$ ). Gene frequency of c.1121C>G (Pro374Arg) and c.1184A>C (Pro395Gln) were 0.053 and 0.697, detected in 7 and 17 dog breeds, respectively.

The purpose of this chapter was to discover the genetic variants of canine cADRB3 as candidate obesity-related genes. We have found 7 non-synonymous SNPs, especially the gene frequency of c.749C>T (Ser150Phe) was significantly higher in overweight and obese dogs, and that of c.1121C>G (Pro374Arg) was significantly higher in underweight dogs, respectively. It was suggested that these variants are candidate obesity-related genes in dogs.

### **Chapter 3: Development of a cell expression system of canine ADRB3 variants, and their functional analyses.**

In chapter 2 and 3, we have discovered candidate obesity-related variants in canine GPR120 and ADRB3 genes, but the data depend on epidemiological research and functions of the receptors have not ever been demonstrated. In human ADRB3, *in vitro* studies using a cell expression system of Trp64Arg variants have been performed and it was revealed that this mutation induces attenuated intracellular cyclic AMP production. Moreover, metabolic rates in humans with this mutation decreased by 200 kcal compared to those with wild type (WT) variants based on *in vivo* studies. Also in the present study, it is the next step to analyze functions of these mutants if they cause changes in metabolism

In this chapter, we have developed a cell expression system of ADRB3 variants (WT, Ser150Phe, Pro374Arg, Pro395Gln and empty) with HA-tags and demonstrated functional analyses by reference to human studies. Western blotting analyses using anti HA tag antibody detected ADRB3 proteins in 4 mutants (WT, Ser150Phe, Pro374Arg, Pro395Gln), but not in the mock one.

Subsequently, we have stimulated these cells with adrenergic agonists (adrenaline, noradrenaline, CL316,234, IBMX and RO20-1724) for 30 minutes and measured intracellular cAMP concentrations. Adrenaline, noradrenaline and CL316,234 induced cAMP production in the cells expressing ADRB3, but not in the mock mutants. Amounts of produced cAMP were tended to be lower in the Ser150Phe and Pro395Gln mutants compared to WT, but not in the Pro374Arg mutant.

The purpose of this chapter was to develop a cell expression system of ADRB3 variants, and analyze the difference in their functions. The Ser150Phe and Pro395Gln variants showed attenuated intracellular cAMP production when they were stimulated with adrenergic agonists, suggestive of that these mutations may decrease metabolic rates and increase the risk of obesity in dogs.

## **Conclusion**

We have analyzed GPR120 and ADRB3 as candidate obesity-related genes in dogs. Gene frequency of c.595C>A (Pro199Thr) variant of GPR120 was significantly higher in overweight and obese dogs than that in normal dogs. Gene frequency of c.749C>T (Ser150Phe) variant of ADRB3 was significantly higher in overweight and obese dogs, and that of c.1121C>G (Pro374Arg) was significantly higher in underweight dogs than that in normal dogs. Cell expression studies of ADRB3 variants have revealed that Ser150Phe and Pro395Gln mutants caused decrease in adrenergic agonists-induced intracellular cAMP production. These variants may be obesity-related mutations. Considering these variants as gene test items and utilizing the results for nutritional management, it, may be helpful for treatment and prevention of obesity in dogs

## Abstract

Obesity is a condition that the energy intake exceeds energy expenditure, and excessive fat is accumulated in white adipose tissues. Many kinds of genes are reported as obesity-related genes in rodents and human beings, however, there is no report about that in dogs. In the present study, we focused on the G-protein coupled receptor (GPR) 120 and beta-3 adrenergic receptor (ADRB3) as representative ones, and analyzed the relationship between their genetic polymorphism and body condition scores in dogs.

In chapter 1, we cloned canine GPR120 cDNA and revealed the tissue distribution. We have analyzed GPR120 genomic sequences of 141 dogs, and found 5 synonymous and 4 non-synonymous SNPs. Gene frequency of c.595C>A (Pro199Thr) was significantly higher in overweight and obese dogs than that in normal dogs.

In chapter 2, We have analyzed ADRB3 genomic sequences of 160 dogs, and found 5 synonymous and 7 non-synonymous SNPs. Gene frequency of c.749C>T (Ser150Phe) was significantly higher in overweight and obese dogs than that in normal dogs. Furthermore, gene frequency of c.1121C>G (Pro374Arg) was significantly higher in underweight dogs than that in normal dogs.

In chapter 3, we have developed a cell expression system of the cADRB3 mutants. Three kinds of mutants (Ser150Phe, Pro374Arg, Pro395Gln) and wild type (WT) cADRB3 were expressed on HEK239 cells. These cells were stimulated with adrenergic agonists (adrenaline, noradrenaline, CL316,243, IBMX and RO20-1274) and intracellular cyclic-AMP (cAMP) concentrations were measured after 2 hours-incubation. Adrenaline, noradrenaline and CL316,243 raised intracellular cAMP, but other agonists did not. The raise of cAMP in the cells expressing Ser150Phe or Pro395Gln mutants tended to be lower than that with WT.

These mutants may be related to obesity in dogs. In particular, c.749C>T (Ser150Phe) mutant of ADRB3 showed higher frequency in obese dogs epidemiologically, and lower cAMP production *in vitro* study suggestive of that the dogs with this mutation are easy to get weight when compared to dogs without them. They are available for gene screening items for treatment and prevention of obesity in dogs.