OLETF ラットを用いた筋肉内脂肪蓄積に関わる遺伝子の探索

2014年

田之村秀樹

新潟大学大学院自然科学研究科博士後期課程

生命・食料科学専攻

## 目 次

第1章 緒 論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・5

- 第2章 筋肉内脂肪蓄積の遺伝的解析に有用なラットモデルの検討・・・・・・・・10
  - 第1節 筋肉内脂肪量測定法の確立
    - 第1項緒 言
    - 第2項 材料および方法
    - 第3項 結果および考察
    - 第4項 要約
  - 第2節 筋肉内脂肪蓄積モデル動物としての OLETF ラットの有用性の検証・・・・15
    - 第1項緒 言
    - 第2項 材料および方法
    - 第3項 結果および考察
    - 第4項 要約
- 第3章 ラットモデルを用いた筋肉内脂肪蓄積原因遺伝子の同定・・・・・・・・29
  - 第1節 OLETF×F344 F2インタークロスを用いた QTL 解析
    - 第1項 緒 言
    - 第2項 材料および方法
    - 第3項 結果および考察
    - 第4項 要約
  - 第2節 筋肉内脂肪蓄積 QTL についてのコンジェニック系統を用いた解析・・・・46第1項 緒 言

- 第2項 材料および方法
- 第3項 結果および考察
- 第4項 要約
- 第3節 筋肉内脂肪蓄積 QTL のファインマッピング・・・・・・・・・・・63
  - 第1項 緒 言
  - 第2項 材料および方法
  - 第3項 結果および考察
  - 第4項 要約
- 第4節 ラットにおける筋肉内脂肪蓄積原因遺伝子の同定・・・・・・・・・・74
  - 第1項 緒 言
  - 第2項 材料および方法
  - 第3項 結果および考察
  - 第4項 要約
- 第4章 ラットモデルより得られた筋肉内脂肪蓄積原因遺伝子のウシへの外挿・・・・96 第1節 ウシ PNLIP における多型の検索
  - 第1項 緒 言
  - 第2項 材料および方法
  - 第3項 結果および考察
  - 第4項 要約
  - 第2節 ウシ PNLIPSNP と脂肪交雑との間の相関解析・・・・・・・・・・109
    - 第1項 緒 言
    - 第2項 材料および方法
    - 第3項 結果および考察

第5章	総括	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	117
謝辞・・	•••	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	122
引用文南	犬・・	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	123
SUMMA	ARY •	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	131

第4項 要約

#### 第1章 緒論

高級和牛肉としての必須条件に挙げられる霜降りは、和牛生産者にとって、最も関心 を寄せる経済的に重要な形質となっている。霜降りとは、筋肉組織内へ脂肪がよく蓄積し ている、すなわち脂肪交雑がよく形成され(図 1-1)、そのような脂肪交雑の形成には飼養条 件などの環境要因が影響している。その一方、日本固有の黒毛和種牛の脂肪交雑能力は他 品種に比べて優れており、脂肪交雑形質に品種間の差が見られること、および表現型分散 に対する遺伝子型分散の割合が高い、つまり遺伝率が高いことが明らかにされている(守 屋ら、1994)。こうして、遺伝率の高い形質であるウシ脂肪交雑は、選抜による遺伝的改 良が有効であるということが判明している(守屋ら、1994)。また、ウシ脂肪交雑に関わる 遺伝子が黒毛和種牛集団内で分離していることが統計遺伝学的解析により判明しており (Miyake ら、1999)、ブタを用いた統計遺伝学的研究では、脂肪交雑に関わる単一の効果 の大きい遺伝子の存在が明らかにされている(Janss ら、1997)。さらに、脂肪交雑は連続 的な変異を示す量的形質に分類されることから、複数の遺伝子に支配される多遺伝子性の 形質であることも明らかにされている(Miyake ら、1999)。

脂肪交雑など肉質に関する形質を遺伝的に改良するための指標として BLUP 法など で推定される育種価が用いられる。しかし、これらの形質に関する育種価の推定は当該個 体の後代記録に基づくものであり、選抜には多くの年月と費用が必要となる。こうして、 脂肪交雑に関与する遺伝的要因の遺伝子座としての同定(原因遺伝子あるいはその遺伝子 を含むウシゲノム領域の同定)は、それらを DNA マーカーとして利用することにより、 受精卵や出生直後の段階でマーカーアシスト選抜を行うことを可能にすることができ、脂 肪交雑の向上を目指した肉牛の選抜育種に大きく貢献することになる。 しかしながら、実際にウシを用いて遺伝子座同定の解析を行おうとしても、ウシにお ける長い世代間隔および高い維持費用により、筋肉内脂肪蓄積原因遺伝子のQTL解析の ために新規に実験家系を作成することは事実上困難である。このような状況下、山田(1999) はDNAマーカーなどのツールが充分に整備されており、かつ実験家系およびコンジェニ ック系統の作出が容易であるため、QTL解析およびQTLゲノム領域のファインマッピン グ解析が容易に行える実験動物をモデル動物として用いて、脂肪交雑に関わるゲノム領域 もしくは候補遺伝子を同定し、さらにはその遺伝学的情報を比較染色体地図上でのゲノム シフトアプローチによりウシへ外挿し、そのゲノム領域もしくは候補遺伝子がウシ脂肪交 雑の原因となりうるか否かを調査していくという戦略を推奨している。本手法はあらゆる 家畜経済形質に関わる遺伝子座の同定研究に応用可能であると考えられている(山田、 1999)。

本研究で用いた Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF)ラットは、肥満を 伴う II 型糖尿病のモデル動物として 1992 年に大塚製薬株式会社(徳島)において確立さ れたミュータントラットである(図 1・2)。このラットは glucose-tolerance test を用いて高 血糖を示すものを育種選抜後、20 代の近交化により作出された。OLETF ラットは高イン シュリン血症、高血糖症、インシュリン抵抗性、トリグリセリド過剰血症、中程度の肥満 のような糖尿病に関連した表現型を示す(Kawano ら、1991; Kawano ら、1992)。また、 カロリー制限や強制的運動による肥満の除去を行うと、血糖値が低下することから、肥満 が糖尿病の必須要因であると判明している(Okauchi ら、1995a; Okauchi ら、1995b)。こ れまでこの OLETF と正常ラットである F344 ラットの F2 個体群を用いた II 型糖尿病発症 原因遺伝子の QTL 解析が行われてきた(Moralejo ら、1998)。同様に、この OLETF を用 いた解析により、肥満に関わる遺伝子が、第1、2、4、8、9、14 および 16 染色体上に存 在しており、OLETF アリルが脂肪量の増加につながることが明らかになっている (Ogino ら、2000)。さらに、これらの遺伝子は、副睾丸、後腹膜、腸間膜、および皮下への脂肪 蓄積に対し、部位特異的に働くことが判明している(Ogino ら、2000)。また、第1染色 体上には、OLETF アリルが体重増加と血糖値増加につながる QTL として、*Nidd6/of* (Sugiura ら、1999; Wei ら、1998)および *Dmo1* (Kanemoto ら、1998)が報告されており、 この2つの QTL のゲノム領域は一致している。Okuno ら(2001)は *Dmo1* が腹腔内脂肪量 に関連することも明らかにしている。こうして OLETF ラットは腹腔内や皮下のみならず、 筋肉内へも脂肪蓄積を増加させていると考えられた。

そこで、本研究では第2章において、最初に、ラット最長筋における筋肉内脂肪量を 組織化学的に測定する方法を確立した。その方法を適用することで、10系統の肥満近交系 ラットの最長筋内脂肪量を比較し、筋肉内脂肪蓄積モデル動物としての OLETF ラットの 有用性を検討した。

第3章では、OLETF ラットを用いた筋肉内脂肪蓄積原因遺伝子の同定を行った。 OLETF ラットと正常ラットとしてのF344 ラットを用い、それらの間のF2個体群を用い た QTL 解析を行い、筋肉内脂肪蓄積に影響する QTL (*Imf*)を同定した。次に、F344を バックグラウンドゲノムとし、*Imf*の存在する領域の OLETF ゲノムを挿入したコンジェ ニックラットを用いた QTL の効果の確認および存在ゲノム領域の決定を行った。さらに、 Informative recombinant を利用したハプロタイプ解析により *Imf*領域を限局した。また、 限局された *Imf*の領域より候補遺伝子を検索することで、位置的機能的候補として *Pnlip* を選定し、*Pnlip*が筋肉内脂肪蓄積に関与しているか否かについて検討を行った。

第4章では、第3章までで得られた Pnlip の遺伝学的情報をウシへ外挿することを試み、DNA マーカーとして SNP を検索した。また、大分県黒毛和種種雄牛、半きょうだい 去勢肥育牛集団を用いて、検索により得られた SNP と脂肪交雑との相関解析を行い、得 られた SNP が DNA マーカーとして有用であるか否かについて検討した。





低脂肪交雑能力牛の最長筋横断面

高脂肪交雑能力牛の最長筋横断面

図 1-1.ウシにおける霜降り

霜降りとは筋肉内へよく脂肪が蓄積している、すなわち脂肪交雑がよく形成されている状 態のことを示している。



## 図 1-2.OLETF ラット

OLETF ラットは高インシュリン血症、高血糖症、インシュリン抵抗性、 トリグリセリド過剰血症、中程度の肥満のような糖尿病に関連した表現型 を示すミュータントとして確立された。 第2章 筋肉内脂肪蓄積の遺伝的解析に有用なラットモデルの検討

第1節 筋肉内脂肪量測定法の確立

## 第1項 諸言

OLETF ラットは腹腔内や皮下のみならず、筋肉内へも脂肪蓄積を増加させていると 考えられることから、筋肉内に脂肪蓄積を引き起こす遺伝子を探索するためのモデル動物 として有用であると考えられる。その場合、OLETF と正常ラットの実験交配群を用いて 筋肉内脂肪蓄積原因遺伝子の遺伝的解析を行っていくことになるが、親系統およびそれら から作出された交配群において筋肉内にどの程度の脂肪が蓄積されているかという表現型 を調べることが必須となる。そこで、ラット最長筋における筋肉内脂肪量測定方法を確立 することを行った。

筋肉内脂肪量の増加がみられると予想される OLETF ラットと、コントロールラット としての F344 ラットより最長筋サンプルを採取し、切片作製、脂肪染色、画像解析を実 施した。筋肉内脂肪量を画像解析により算出し、統計的解析を行うことで、どれだけの枚 数の切片をどの部位から作製することが筋肉内脂肪量の測定として最適であるかについて 検討した。加えて、その最適な測定法を用いて、OLETF と F344 の比較を行った。

## 第2項 材料および方法

1. 材料

OLETF ラット雄 7 個体と F344 ラット雄 7 個体を用いた。これらのラットは徳島大 学医学部動物実験施設で 30 週齢まで室温 21℃、湿度 55%、12 時間毎の明暗の条件にて SPF 環境下、自由給餌・給水で維持された。30 週齢の屠殺時に、それらのラットの腰椎 右側より第1腰椎から第3腰椎の部分の最長筋サンプルを採取し、ドライアイスで冷却したイソペンタン中で凍結した後、保湿した 50ml チューブに入れ、・80℃で保存した。

#### 2. 最長筋切片作製

凍結保存した最長筋より、クリオスタットを用いて横断面に平行に薄層切片を作製した。その際、両端と中央の3つの部位を設定し、それぞれ両端をA部位、C部位、中央を B部位と名付けた。A、B、およびCの3部位についてそれぞれ8枚の切片を作製した。 切片は1枚6μmの厚さで作製し、切片ごとの間隔は60μmとした。さらに、部位の間隔 は2mmとした。部位の設定の仕方、切片の取り方について、図2-1に示す。切片を作製し た後はスライドガラスに貼りつけ、-80℃で保存した。

### 3. 筋肉内脂肪量測定

作製した切片をオイルレッドO染色することで、脂肪染色を行った。脂肪染色の際に 染色液、染色時間、脱色時間などによる染色実験間のばらつきが各個体サンプルで同じに なるように設定した。脂肪染色した切片の画像解析を行った。画像解析ソフトで画像の取 り込みから2値化を行い、切片面積と脂肪染色陽性の赤色部分の面積の比を求めた。それ ぞれ3回測定し、その平均値を用いた。

4. データ解析

OLETF系統7個体、F344系統7個体について筋肉内脂肪量を測定し、統計分析を 行うことで、筋肉内脂肪量測定に用いる切片枚数について検討した。そのため、各個体か らランダムに一定枚数の切片を取り出し、その筋肉内脂肪量のデータより測定誤差の分散 を求めた。このとき、SASのNESTED プロシジャを用いた。この解析により得られた測 定誤差分散の枚数間での比較を行うことで、その個体を代表する筋肉内脂肪量を測定する ために必要な最適な切片枚数を求めた。なお、本実験では各個体より8回ランダムに切片 を選出し、その8回の平均値により比較検討を行った。枚数に関する検討の誤差分析に用 いたモデルを以下に示す。

## Rate = Line + Animal(Line) + Error

Rate:脂肪面積割合 Line:系統 Animal(Line):系統内個体 Error:誤差 次に、脂肪量測定に用いる部位に関する検討を行った。この解析にも SAS の NESTED プ ロシジャを用いた。この解析は最長筋のどの部位を用いることが筋肉内脂肪量測定に最適 であるかについて検討するため、A、B、C の部位ごとに分けて行った。さらにこの解析で はA、B、C、それぞれの部位内に小部位を設定し、部位内での切片作製方法の検討も行っ た。小部位の設定の方法を図 2-2 に示す。また、部位に関する検討における系統間差検出 の解析に用いたモデルを以下に示す。

Rate = Line + Animal(Line) + Group(Animal\*Line)

Rate:脂肪面積割合 Line:系統 Animal(Line):系統内個体

Group(Animal\*Line):系統内個体内小部位

## 第3項 結果および考察

1. OLETF、F344 における最長筋の脂肪染色像

OLETF、F344から採取された最長筋より組織切片を作製し、オイルレッドO染色した結果を図 2-3 に示す。図 2-3 に示されているように、OLETF は F344 に比べて筋肉内脂肪量が増加していると判明した。そこで、この筋肉内脂肪量の測定法を確立するために、

どれだけの枚数の切片をどの部位より作製することが最適であるかについて以下に示すように検討した。

2. 枚数に関する検討

まずは、OLETF系統7個体、F344系統7個体のそれぞれから切片をランダムに一定 枚数選び出した後、その筋肉内脂肪量のデータの誤差分散を検討することで、どの程度ま で切片の枚数を減らしたとしても正確な解析が可能かどうかを調べた。本実験では各個体 よりランダムに2枚~8枚の切片を選出し、その8回の平均値の比較により解析を行った。 それぞれの枚数と回数における誤差の分散をまとめたものを表 2-1 に示す。枚数が減って いくに従い、誤差分散が増加していくことが期待されたが、表 2-1 に示されるように、誤 差分散の8回の測定値の平均はほぼ一定の値をとっていた。ただし、2枚の場合は誤差分 散のばらつきが極めて大きいことから、切片枚数は3枚以上が最適であると判断した。

3. 部位に関する検討

部位に関する検討においては、系統間効果、系統内個体間効果、系統内小部位間効果 を設定し解析を行った結果を表 2·2 に示す。ここでは、小部位の設定は図 2·1 における部 位内で偏った位置から切片を取得した場合を採用した。結果として、A、B、Cのすべての 部位において、系統間において有意な効果が検出された。ただし、A、C 部位については 系統内個体間において、統計的に有意な効果が見られた。一方、B 部位では系統内個体間 において、統計的に有意な効果が検出されなかった。また、B 部位において、図 2·1 にお ける部位内からまんべんなく切片を取得した場合の小部位を設定した解析結果を表 2·3 に 示す。系統内小部位間においては、部位内で偏った位置から切片を取得した場合、有意な 効果が見られたが、部位内からまんべんなく切片を取得した場合、有意な効果は見られな かった。このことより、切片の間隔はある程度あけることが必要であると判明した。間隔 については、今回の実験の設定より、180µm あければ十分であると考えられた。

## 4. 筋肉内脂肪量測定法についての結論

以上の結果から、ラットの筋肉内脂肪量の組織化学的測定においては、最長筋の出来 るだけ中央の部位より、180µmの間隔をあけて3枚以上の切片を作製してオイルレッドO 染色を施し、最後に、脂肪染色陽性面積を切片面積で除することによって切片内の脂肪の 割合を求めればよいという結論となった。

## 第4項 要約

本研究ではラットモデルの筋肉内脂肪蓄積原因遺伝子の遺伝的解析を行うため、筋肉 内脂肪量の増加が見られると予測される OLETF ラットとコントロールラットとしての F344 ラットを用いて、ラット最長筋における筋肉内脂肪量の組織化学的測定方法の確立 を行った。最長筋の中央の部位より、180µm の間隔をあけて3枚以上の切片を作製し、そ れをオイルレッドOにより脂肪染色する。次に、画像解析を用い、切片面積と脂肪染色陽 性面積を測定し、脂肪染色陽性面積を切片面積で除することによって切片内の脂肪組織の 割合を求めるという組織化学的測定法が最適な測定法であると判定した。また、OLETF ではF344に比べて筋肉内脂肪量が増加していることが明らかになった。

14

第2節 筋肉内脂肪蓄積モデル動物としての OLETF ラットの有用性の検証

## 第1項 諸言

ラットはマウスを少し大型にした哺乳動物であり、100系統以上が知られている。そ の中で、飼育が容易で近交系の作製も可能であるという理由から、*Rattus norvegicus*の 近交化によって、実験動物として使われる近交系ラットが確立されている(松本、1998)。 現在では数百種類に及ぶ近交系ラットが世界中に普及しており(松本、1998)、また、その 作製過程において多くのミュータントラットが発見されている。ラットは同じ実験動物と して広く扱われているマウスとは異なり、その体の大きさゆえ血液採取などが経時的にか つ容易に行うことが可能である。こうしたことから、ラットは生理学的研究に高い利用価 値を持つと考えられている。また、遺伝的マーカーであるマイクロサテライトマーカーも マウスやヒトと同程度に整備されており、遺伝学的解析モデルとしての有用性も高いもの である。

第2章第1節ではOLETF ラットがF344 ラットに比べて筋肉内脂肪量が増加しているということを示した。ここでは肥満を呈する近交系ラットにおける筋肉内および皮下の脂肪蓄積量を測定し、筋肉内脂肪量が皮下脂肪へのものに比べて偏って増加している系統を調査し、OLETF が筋肉内脂肪蓄積モデル動物として有用か否かの検討を行った。

## 第2項 材料及び方法

1. 材料

肥満を呈することが知られている 10 系統の近交系ラット(ExHC、LEA、SHC、TM、

Wistar、Wistar fatty、WKAH、Zucker、Zucker fatty および OLETF)の雄 3 個体を使用 した。また肥満を示さない正常コントロールとして F344 近交系ラットの雄 3 個体を用い た。F344、LEA、OLETF および WKAH は徳島大学医学部附属実験動物施設より、TM は京都大学医学部附属動物実験施設より、ExHC、SHC、Wistar および Wistar fatty は武 田薬品工業株式会社より供与された。Zucker と Zucker fatty は紀和実験動物株式会社よ り購入した。これらのラットは 25 週齡の屠殺時まで、室温 21℃および湿度 55%の SPF 環境下、自由給水・給餌および 12 時間毎の明暗条件で動物実験に関する指針(平成 11 年 12 月 2 日京都大学大学院農学研究科長裁定)に従い、京都大学農学部動物飼育室にて飼育 された。

## 2. 剖検および皮下脂肪量の測定

ラットは 25 週齢で屠殺された。ネンブタール(大日本製薬(株)、東京)の腹腔内投与 (1µl/g 体重)により麻酔を行った後、体重測定、右側腋窩静脈からの血液採取を行った。瀉 血により屠殺した後、開腹し、左右腰部皮下脂肪組織を採取して重量を測定した。また、 筋肉内脂肪量を測定するため、腰椎右側の最長筋を第1腰椎から第3腰椎の部分より採取 し、ドライアイスで冷却したイソペンタンで凍結した後、-80℃にて保存した。

## 3. 筋肉内脂肪量測定

第2章第1節で述べたとおり、クリオスタットを用いて180μm間隔の横断薄層切片(6μm 厚)を5枚作製した後、オイルレッドOにより脂肪染色を実施した。その後、画像解析に より切片面積に対する脂肪染色陽性の赤色部分の面積の割合を測定した。5枚の切片から の測定値の平均値を当該個体の筋肉内脂肪量とした。

## 4. 血中脂質成分量の測定

採血後、遠心分離により血漿を得た。血漿中のトリグリセリド量、コレステロール量 および遊離脂肪酸量を、それぞれトリグリセリド G-テストワコー(和光純工業(株)、東京)、 コレステロール C-テストワコー(和光純工業(株)、東京)および NEFA-テストワコー(和光純 薬工業(株)、東京)を用いて測定した。検量線作製は添付のプロトコールの指示に従った。

## 5. データ分析

体重および筋肉内脂肪量の系統間比較はSASプログラムのGLMプロシジャを用いた 一元配置分散分析により行った。筋肉内脂肪量、皮下脂肪量および血中脂質成分量の間で の相関の分析は各系統の平均値を用いて SAS プログラムの CORR プロシジャを用いて実 施した。また、SAS プログラムの GLM プロシジャにより、各系統の平均値を用いること で筋肉内脂肪量の皮下脂肪量への回帰が分析された。

## 第3項 結果および考察

## 1. 体重および筋肉内脂肪量の比較

本研究で調査された 10 系統の肥満ラットの 25 週齢時点での体重値はいずれも F344 のそれに比べて有意に高く、これらの系統は肥満を呈することが示された(図 2-4)。これら の系統の 25 週齢時の筋肉内脂肪量を測定したところ、Zucker fatty が一番高い値を示し、 ついで Wistar fatty、次に OLETF および LEA という順序で低くなった。その他の系統は F344 と統計的に有意な差は見られなかったものの、F344 よりは高い値を示した(図 2-4)。

2. 皮下脂肪量を基準とした筋肉内脂肪量の程度の検討

次に、11 系統の 25 週齡時での皮下脂肪量を測定し、各系統における皮下脂肪を基準 にした時の筋肉内脂肪量の程度について検討した。筋肉内脂肪量と皮下脂肪の間の相関は 有意であった(r=0.91(P<0.0001))(図 2-5)。 筋肉内脂肪量を従属変数 y、皮下脂肪量を独 立変数 x とした単回帰分析を行うことで回帰式を求めた。筋肉内脂肪量の皮下脂肪量への 回帰直線に対し、大きな残差をもつ系統を調べることで、皮下脂肪を基準とした場合、筋 肉内脂肪量が高い傾向にある系統を検出することを試みた。解析の結果、皮下より筋肉内 への脂肪蓄積の程度が高くなっていたのは Zucker fatty、LEA、SHC、ExHC および OLETF であった。

3. 血中脂質成分と皮下および筋肉内脂肪量との相関解析

最後に、11 系統のラットの25 週齡時点における血中トリグリセリド量、コレステロ ール量、および遊離脂肪酸量を測定し、これら血中脂質成分と、皮下脂肪量および筋肉内 脂肪量との間の相関について検討した(表2-4)。血中トリグリセリド量については脂肪量と の間に有意な相関が検出された。しかし、血中コレステロール量および遊離脂肪酸量につ いては脂肪量との間の相関は有意なものではなかった。これらの結果により、血中トリグ リセリド量を指標とすることで、生体のまま皮下脂肪量および筋肉内脂肪量をある程度予 測できると考えられた。

4. 結論

18

10 系統の肥満を呈する近交系ラットの雄を用いて、コントロール系統の F344 と筋肉 内脂肪量の比較を行った結果、OLETF は F344 に比べて、多量の筋肉内脂肪を持つこと が明らかにされた。また、皮下より筋肉内への脂肪蓄積の程度が高い系統であることが示 された。以上のことより、OLETF は筋肉内脂肪蓄積を遺伝学的に解析するためのモデル 動物として有用であると考えられた。

## 第4項 要約

本研究では肥満を呈することが知られている 10 系統の近交系ラット(ExHC、LEA、 SHC、TM、Wistar、Wistar fatty、WKAH、Zucker、Zucker fatty および OLETF)およ び正常コントロールとして F344 を用い、筋肉内並びに皮下への脂肪蓄積量の比較を行っ た。その結果、F344 と比べて統計的に有意に高い筋肉内脂肪量を示したのは Zucker fatty、 Wistar fatty、および OLETF であった。また、皮下より筋肉内への脂肪蓄積の程度が高 くなっていたのは Zucker fatty、LEA、SHC、ExHC および OLETF であった。以上の結 果より、OLETF は F344 に比べ、筋肉内脂肪量が多く、皮下脂肪量を基準とした場合、 筋肉内脂肪量が多い傾向のあることから、OLETF は筋肉内脂肪蓄積を遺伝的に解析する ためのモデル動物として有用であることが明らかにされた。また、血中トリグリセリド量、 コレステロール量、および遊離脂肪酸量を測定し、これら血中脂質成分と、皮下脂肪量お よび筋肉内脂肪量との間の相関について検討した結果、血中トリグリセリド量については 脂肪量との間に有意な相関が検出され、血中トリグリセリド量を指標とすることで、生体 のまま皮下脂肪量および筋肉内脂肪量の程度をある程度予測できると考えられた。

19



図 2-1. 最長筋切片作成法

ラットの腰椎右側の第1腰椎~第3腰椎の部分の最長筋のA、B、C部分より切片を作成 した。各部位について1枚 6μmの厚さで8枚の切片を作製した。切片ごとの間隔は 60μm とした。また、部位間の間隔は 2mm とした。



図 2-2. 各部位内の小部位の設定方法

部位内での切片の作製法を検討するため、部位内で小部位を設定した。

同じ番号のものを同じ小部位として設定した。





OLETF





図 2-4. 10 系統の肥満ラットおよび F344 系統の 25 週齢時の体重および

## 筋肉内脂肪量の比較

データは各系統3個体の平均±標準偏差で示す。平均値について、肩文字が違うもの は統計的に有意な差(P<0.05)があることを示す。



図 2-5. 25 週齢時の皮下脂肪量を基準とした筋肉内脂肪量の程度

各シンボルは各系統3個体の平均値を示す。

	回数									
枚数	1	2	3	4	5	6	7	8	平均	標準偏差
2	2.05	0.68	0.90	0.32	1.03	0.68	1.62	1.65	1.12	0.60
3	1.38	1.17	1.53	1.41	1.63	1.69	1.82	1.15	1.47	0.24
4	1.92	1.12	1.63	1.57	1.43	0.98	1.09	1.58	1.42	0.32
5	1.21	1.12	0.94	1.73	1.77	1.62	1.26	1.52	1.40	0.31
6	1.32	1.08	1.31	1.34	1.28	1.22	1.29	1.55	1.30	0.13
7	1.53	1.22	1.27	1.26	1.08	1.42	1.46	1.35	1.32	0.15
8	1.36								1.36	

表 2-1. 枚数に関する検討における誤差分散の比較

部位	変動因	自由度	分散	F值	P值
А	Line	1	200.75	20.20	0.0007
	Animal(Line)	12	9.94	2.24	0.0389
	Group(Animal*Line)	28	4.44	1.23	0.2474
	Error	42	3.53		
В	Line	1	91.06	64.64	0.0001
	Animal(Line)	12	1.40	0.42	0.9416
	Group(Animal*Line)	28	3.34	5.23	0.0001
	Error	42	0.64		
С	Line	1	192.16	13.46	0.0032
	Animal(Line)	12	12.97	11.85	0.0001
	Group(Animal*Line)	28	1.65	1.06	0.4278
	Error	42	1.04		

表 2-2. 部位に関する検討における分散分析

小部位は部位内の偏った位置から切片を取得するように設定した。

変動因	自由度	分散	F值	P 値
Line	1	91.06	64.68	0.0001
Animal(Line)	12	1.41	1.83	0.1405
Group(Animal*Line)	14	0.77	0.97	0.9721
Error	56	1.96		

表 2·3. B 部位における小部位設定を変更した分散分析

小部位は部位内から切片をまんべんなく取得するように設定した。

表 2-4. 血中脂質成分と皮下脂肪量および筋肉内脂肪量の相関解析

	月	自防量
血中脂質成分	皮下脂肪	筋肉内脂肪
トリグリセリド	0.86**	0.63*
コレステロール	0.54	0.28
遊離脂肪酸	0.05	0.35

データは相関係数で示す。相関係数は各系統3個体の平均値をもとに SAS プログラ

ムの CORR プロシジャで算出した。

\*P<0.05; \*\*P<0.001.

第3章 ラットモデルを用いた筋肉内脂肪蓄積原因遺伝子の同定

第1節 OLETF×F344 F2インタークロスを用いた QTL 解析

## 第1項 諸言

第2章では OLETF ラットの筋肉内脂肪蓄積モデル動物としての有用性を検証した。 筋肉内脂肪蓄積という形質は多数の遺伝子座が関与して形成される量的形質と考えられる。 ラットでは遺伝子マーカーであるマイクロサテライト DNA 多型(microsatellite DNA polymorphism)が大量に開発されており(Dietrich ら、1994)、また、量的形質遺伝子座 (Quantitative Train Loci: QTL)を解析する統計的手法が確立されている(Lander ら、 1987)ことから、量的形質に関与する原因遺伝子の染色体マッピングが可能である。さら に、QTL の原因遺伝子を特定するためには QTL が存在する染色体領域に存在する候補遺 伝子を検索するために、その QTL 領域を限局していく、すなわちファインマッピングし ていくことが必要である。ラットでは、このようなファインマッピングに有用なコンジェ ニック解析のような QTL 解析以降の原因遺伝子同定のための研究を容易に行うことが可 能である。こうして、第3章第1節では、OLETF ラットと、コントロールとしての F344 ラットを用いて F2インタークロスを作製し、それを用いることによって筋肉内脂肪蓄積に 関わる QTL を検出することを試みた。検出する方法として、QTL 解析の代表的な方法で ある Interval Mapping 法 (IM 法)を用いた。

## 第2項 材料および方法

1. 材料

OLETF 系統の雄 7 個体、F344 系統の雄 7 個体、F344 雄と OLETF 雌を掛け合わせ て作製した F<sub>1</sub>(F<sub>1</sub>-1)の雄 7 個体、OLETF 雄と F344 雌を掛け合わせて作製した F<sub>1</sub>(F<sub>1</sub>-2) の雄 12 個体、F<sub>1</sub>-1 同士を掛け合わせて作製した F<sub>2</sub>の雄 108 個体を使用した。

各ラットは徳島大学医学部動物実験施設で 35 週齢まで室温 21℃、湿度 55%、12 時間毎の明暗の条件にて SPF 環境下、自由給餌・給水で維持された。35 週齢の屠殺時に、 それらのラットの腰椎右側より第 1 腰椎から第 3 腰椎の部分の最長筋サンプルを採取し、 ドライアイスで冷却したイソペンタン中で凍結した後、保湿した 50ml チューブに入れ、 -80℃で保存した。また、屠殺前に体重測定も実施した。

2. 最長筋切片の作製

凍結保存してある最長筋よりクリオスタットを用いて、横断面に平行に薄層切片を 6μm 厚で作製した。各最長筋サンプルにつき 180μm 間隔で5枚の切片を作製し、それら をスライドガラスに貼り付け、乾燥条件下−80℃で凍結保存した。

3. 脂肪染色

上記2で作製した切片に脂肪染色を施した。脂肪染色はオイルレッドOにより行った。

4. 筋肉内脂肪量の測定

上記3で染色した切片について画像解析を行った。脂肪染色陽性の赤色部分の面積と 切片面積を測定した。切片面積の測定については手作業になることから誤差を少なくする ため、それぞれ3回測定し、その平均を用いた。また、筋肉内脂肪量として、脂肪染色陽 性面積を切片面積で割ることにより、1cm<sup>2</sup>の切片内での脂肪染色陽性面積を筋肉内脂肪量 とした。また、得られた筋肉内脂肪量を体重で割った値(adiposity index)についても解析 を行った。

#### 5. 筋肉内脂肪量以外の脂肪量の測定

筋肉内脂肪量以外の脂肪量については 35 週齢の屠殺時にそれぞれの脂肪蓄積組織を 摘出し、重量を測定した。後腹膜脂肪、腸間膜脂肪、副睾丸脂肪および皮下脂肪について 重量を測定した。

## 6. マーカー型の判定(Genotyping)

Research Genetics 社より市販されているマイクロサテライトマーカー222 個を用い てマーカー型 (OLETF ホモ型、OLETF/F344 ヘテロ型、F344 ホモ型)を判定した。こ れらのマーカーは OLETF と F344 の間で多型を示し、ラット全染色体を網羅していた。 用いたマーカーについては図 3-1 に示す。F2 個体群のラットの尾より DNA 抽出を行い、 PCR のテンプレートとした。PCR は Research Genetics 社のプロトコールに従った。マ イクロサテライトを PCR で増幅後、4%アガロースゲルにて電気泳動し、マーカー型の判 定を行った。

7. データ解析法

OLETF と F344 との間で作製された F2個体群での QTL 解析は、それぞれの個体に おける各脂肪量の表現型のデータおよびマーカー型データを用いた Interval Mapping 法 (IM 法) により実行した。

MAPMAKER/EXP プログラムにより、マーカー型のデータを用いて連鎖地図を作製 した。Genotyping のミスと思われる判定は MAPMAKER/EXP プログラムにより候補が 示され、電気泳動図を見直すことによって確認を行った。また、必要があれば Genotyping を再度実施した。作製された連鎖地図と各脂肪量の表現型のデータを用いてシングル QTL モデルおよびマルチプル QTL モデルに基づいた QTL 解析を行った。シングル QTL モデ ルについては MAPMAKER/QTL プログラムにより解析を行い、QTL の有意性を判断する 閾値は suggestive level については 2.8 とし、 significant level については 4.3 とした。 異なる遺伝子型を持つグループ間の表現型の比較は Student's t 検定、もしくは post hoc test として Scheffe's F 検定を用いた一元配置分散分析により行った。マルチプル QTL モ デルについては MapQTL プログラムを用いた MQM マッピングにより解析を行った。検 出された QTL のロッドピークのもっとも近傍にあるマーカーをコファクターとしてモデ ルに取り込み、再度 LOD スコアの計算を行い、他の QTL が検出されるか否かの検討を行 った。

8. X-Linked 遺伝子についての検討

X 染色体上の各マーカーについては、F2 個体群を OLETF アリル型と F344 アリル型 を持つ2 群に分類した後、その2 群間で筋肉内脂肪量について表現型に差が検出されるか 否かを分散分析により解析した。

9. Y-Linked 遺伝子効果、インプリンティング遺伝子効果、ミトコンドリア遺伝子効果 および母性効果についての検討

相反交雑により得られた F<sub>1</sub>-1 および F<sub>1</sub>-2 の筋肉内脂肪量に差があるか否かを分散分 析により解析した。これにより、Y-Linked 遺伝子効果、インプリンティング遺伝子効果、 ミトコンドリア遺伝子効果および母性効果の有無について検討した。

#### 第3項 結果および考察

# OLETF 系統、F344 系統、およびそれらの系統間の交雑系統における筋肉内脂肪 量の比較

OLETF、F344、およびそれらの間の F<sub>1</sub>-1、F<sub>1</sub>-2、F<sub>2</sub>における筋肉内脂肪量の比較結 果を図 3-2 および表 3-1 に示す。OLETF と F344 および F<sub>1</sub>-1 の平均値は有意に差のある 結果となった。OLETF が F344 に対して有意に脂肪量が増加しているという結果が得ら れ、F<sub>1</sub>-1 は OLETF と F344 の中間値を示しており、筋肉内脂肪量は相加的遺伝様式に従 っていると考えられた。F<sub>1</sub>-1 同士の交雑により作出された F<sub>2</sub>の平均値と F<sub>1</sub>-1 の平均値の 間においては差が見られないが、F<sub>2</sub>の方が、標準偏差が大きくなっており、ばらつきの大 きい連続分布という結果となった。これは F<sub>2</sub>のばらつきには遺伝分散が含まれており、多 遺伝子性の量的形質の特徴を示しているためと考えられた。また、adiposity index につ いても同様の傾向が見られ(図 3-2、表 3-1)、このことより、OLETF ラットは筋肉内脂肪 量を増加させていると考えられた。

#### 2. 連鎖地図の作製

F2 インタークロス 108 個体について 222 個のマイクロサテライトマーカーを用いて 作製した連鎖地図を図 3-1 に示す。これらのマーカーは全ゲノムを平均 7.6cM 間隔でカバ ーしていた。

## 3. 筋肉内脂肪量に関与する QTL 解析

シングル QTL モデルを用いた QTL 解析結果について図 3-3 に示す。図の縦軸は LOD スコアを示す。筋肉内脂肪量についての QTL 解析の結果、ラット第1 染色体上の *D1Wox8* と *D1Rat90* マーカー間の 40cM の位置に 3.4 の LOD スコアを持つ suggestive level の

QTL が一つ検出された。adiposity index についての QTL 解析の結果、同じ位置に 3.2 の LOD スコアを持つ QTL が検出された。この QTL は筋肉内脂肪量については 5%の全 表現型分散および 7%の遺伝分散、adiposity index については 7%の全表現型分散および 8%の遺伝分散を説明するものであり、いずれにおいても OLETF アリルがその筋肉内脂肪 量の増加に対して劣性の効果を持つことが示された(表 3-2)。マルチプル QTL モデルでの QTL 解析の結果においても、シングル QTL モデルで得られた第 1 染色体上の QTL のみ が検出され、新たな QTL が検出されることはなかった。

IM 法において検出された QTL は筋肉内脂肪量において全表現型分散の 5%、遺伝分 散の 7%を説明し、adiposity index において全表現型分散の 7%、遺伝分散の 8%を説明 するものであり、効果の小さな QTL であるという結果を得た。また、筋肉内脂肪量とい う形質は遺伝率の高い形質ということが示されおり、今回の結果はこの高い遺伝率を説明 するのに十分な結果ではなかった。このことから筋肉内脂肪量という形質には複数の遺伝 子座が影響を与えており、その効果が主効果ではないエピスタシス効果を持つ遺伝要因の 存在が疑われた。

第1染色体上に主効果を示す QTL が検出されたことより、この第1染色体上に位置 する QTL を Imfと命名した。また、この第1染色体上の Imfのゲノム領域と一致する領 域には、OLETF アリルが体重増加や血糖値の増加に対して劣性遺伝様式で効果を与える QTL として、Nidd6/of (Sugiura ら、1999; Wei ら、1999)および Dmo1 (Kanemoto ら、 1998)が存在しており、この QTL は体重値に加えて、腹腔内脂肪量にも関連することが明 らかにされていることから、第1染色体上の 40cM の位置には筋肉内脂肪量に影響する脂 肪蓄積の効果があるのではないかと考えられた。ここで、我々はその脂肪蓄積 QTL の解 析を進めるために、F344 をバックグラウンドとし、第1 染色体上の一部、つまり今回検 出された Imf付近のゲノム領域が OLETF 型に置き換わっているコンジェニック系統を作

34

製し、その系統を用いて、QTLの効果の確認、さらに戻し交配個体を作製することによる ファインマッピングを行うことを考えた。これらの結果については、第3章第2節および 第3節に示す。

また、最近ウシにおいて第4、6、7、9、10、17、20、21 および 26 番染色体上に筋 肉内脂肪蓄積に関与する QTL が検出されている(Takasuga ら、2007)これらのウシ QTL のうち、第 26 染色体上の PNLIP を含むゲノム領域に脂肪交雑 QTL の存在が報告されて おり(Takasuga ら、2007)、今回見つかった Imfの領域はウシゲノム上では 8q12-q18 およ び PNLIP を含む 26q12-q23 に相当することから、Imf と一致するものであると考えられ た。ブタにおいては筋肉内脂肪量に関与する QTL はブタ第 2、4、6 および7 染色体上に マッピングされている(Janss ら、1997; De Koning ら,1999)。これらのブタ染色体は比 較染色体地図解析によりラット第 1 染色体と相同性を示さないものであることから、Imf QTL と一致する QTL は検出されていない。

#### 4. X-Linked 遺伝子効果についての解析

F₂について、X 染色体上の各マーカーのアリルをもとに分類される 2 群間で筋肉内脂 肪量に関して差があるか否かを分散分析によって解析した。その結果を表 3-3 に示す。各 マーカーにおいて筋肉内脂肪量についてアリル間で差のみられるマーカーは検出されなか った。この結果より、筋肉内脂肪量に関わる X-Linked 遺伝子は存在しないことが示唆さ れた。

5. Y-Linked 遺伝子効果、インプリンティング遺伝子、ミトコンドリア遺伝子効果および母性効果についての解析

相反交雑により得られた Fi-1 および Fi-2 の筋肉内脂肪量について、筋肉内脂肪量に

差があるか否かを分散分析により解析した結果、有意差があるという結果となった(図 3-2、 表 3-1)。このことより、筋肉内脂肪量という形質には、Y-Linked 遺伝子効果、インプリ ンティング遺伝子効果、ミトコンドリア遺伝子効果および母性効果のいずれかの効果が関 与していると考えられた。Y-Linked 遺伝子の場合、OLETF に由来するアリルが、インプ リンティング遺伝子の場合、OLETF 由来父方アリルおよび F344 由来母方アリルが、ミ トコンドリア遺伝子の場合、F344 に由来するアリルが、母性遺伝効果の場合、F344 に由 来するアリルが筋肉内脂肪量を低下させる効果を持つと考えられた。

6. 筋肉内脂肪量以外の脂肪量に関しての QTL 解析

筋肉内脂肪量以外の脂肪量(後腹膜脂肪、腸間膜脂肪、副睾丸脂肪、皮下脂肪および 腹腔内脂肪量)について、IM 法を用いた QTL 解析を行った。これらの脂肪量については、 シングル QTL モデルを用いた解析のみ行った。

各形質における QTL 解析の結果を表 3・4 に示す。後腹膜脂肪については第 14 染色体 上(LOD スコア 4.4)、第 2 染色体上(LOD スコア 4.0)および第 4 染色体上(LOD スコア 4.0) に、腸間膜脂肪については第 8 染色体上(LOD スコア 4.7)に QTL が検出され、以前の Ogino ら(2000)の QTL 解析結果と一致するものであった。皮下脂肪については第 17 染色体上 (LOD スコア 4.2)に、腹腔内脂肪量については筋肉内脂肪量と同じ第 1 染色体上(LOD ス コア 4.2)に OLETF アリルが劣性遺伝様式を持つ QTL が検出された。副睾丸脂肪量に関 しては有意な QTL は検出されなかった。その結果、筋肉内脂肪量と腹腔内脂肪量におい て、同じ位置に QTL が検出され(図 3・4)、腹腔内脂肪量に関して検出された QTL 領域は *D1Rat166 と D1Rat90* の間の約 10cM の領域であり、筋肉内脂肪量に関して検出された QTL より領域の狭いものであった。筋肉内脂肪量だけでなく腹腔内脂肪量に関しても検出 されたことから、この第 1 染色体上の 10cM 領域上の QTL はあまねく体内に脂肪を蓄積
させる QTL であると考えられた。この QTL のゲノム領域内に筋肉内脂肪量を増加させる 原因遺伝子も含まれている可能性が高いと考え、バックグランドゲノムを F344 とし、こ の *D1Rat166 と D1Rat90* の間の約 10cM の領域が OLETF に置き換わったコンジェニッ ク系統を作製し、QTL の効果の確認を行うこととした。

### 第4項 要約

本研究では OLETF ラットと、コントロールとしての F344 ラットを用いて F2インタ ークロスを作製し、それを用いることによって筋肉内脂肪蓄積に関わる QTL を検出する ことを試みた。その結果、第1染色体上の D1Wox8 と D1Rat90 マーカー間の 40cM の位 置に 3.4 の LOD スコアを持つ suggestive level の QTL が一つ検出された。その QTL に ついて、OLETFアリルは筋肉内脂肪量の増加に対して劣性の効果を持っていた。X-Linked 遺伝子効果についての解析を行ったところ、筋肉内脂肪量に関わる X-Linked 遺伝子は存 在しないことが示唆された。Y-Linked 遺伝子効果、インプリンティング遺伝子、ミトコ ンドリア遺伝子効果および母性遺伝効果についての解析を行ったところ、Y-Linked 遺伝子 の場合、OLETF に由来するアリルが、インプリンティング遺伝子の場合、OLETF 由来父 方アリルおよび F344 由来母方アリルが、ミトコンドリア遺伝子の場合、F344 に由来する アリルが、母性効果の場合、F344 に由来するアリルが筋肉内脂肪量を低下させる効果を 持つと考えられた。また腹腔内脂肪量に関わる QTL 解析を行ったところ、D1Rat166 と D1Rat90の間の約 10cM の位置に 4.2 の LOD スコアを持つ significant level の QTL が検 出された。この QTL は筋肉内脂肪量に関して検出された QTL より領域の狭いものであっ た。この第1染色体上の10cM領域上のQTLはあまねく体内に脂肪を蓄積させるQTLで あると考えられ、この QTL のゲノム領域内に筋肉内脂肪量を増加させる原因遺伝子も含 まれている可能性が高いと考えられた。



図 3-1. OLETF と F344 の F2 交雑群を用いた QTL 解析に利用したマーカー



図 3-2. 各系統における筋肉内脂肪量の比較

同じ肩文字を持たない平均値間に有意差が存在する。



第1染色体

図 3-3. F2インタークロスを用いた筋肉内脂肪量に関する QTL 解析



第1染色体

図 3-4. F2インタークロスを用いた腹腔内脂肪量に関する QTL 解析

		筋肉内	內脂肪量	adiposi	ity index
	個体数	平均值	標準偏差	平均值	標準偏差
F344	7	1.34 <sup>a</sup>	0.38	3.62 <sup>a</sup>	2.19
OLETF	7	3.26 <sup>c</sup>	0.52	5.01 <sup>c</sup>	2.29
F <sub>1</sub> -1	7	2.44 <sup>b</sup>	0.9	4.06 <sup>b</sup>	1.71
F <sub>1</sub> -2	12	1.26 <sup>a</sup>	0.34		
$F_2$	108	2.49 <sup>b</sup>	1.52	4.74 <sup>b</sup>	2.99

表 3-1. 各系統における筋肉内脂肪量の比較 .

表 3-2. Imf領域内に位置するマーカーの遺伝子型に基づく筋肉内脂肪量および

形質	遺伝子型			
	OLETF/OLETF	OLETF/F344	F344/F344	
個体数	20	54	21	
筋肉内脂肪量(mm <sup>2</sup> )	3.33±2.12 <sup>a</sup>	$2.26 \pm 1.16^{b}$	2.50±1.61 <sup>b</sup>	
adiposity index(mm <sup>2</sup> /g×10 <sup>-3</sup> )	$6.20{\pm}4.05^{a}$	$4.29 \pm 2.12^{b}$	4.89±3.31 <sup>b</sup>	
体重 (g)	543.0±46.1 <sup>a</sup>	$527.9 {\pm} 49.9^{a}$	$527.8 \pm 51.6^{b}$	

その adiposity index の比較

		マージ		
マーカー	位置	X f /Yf	Xo/Yf	P 値
*DXMgh4	0	2.31±1.21	2.64±1.75	0.34
*DXMgh8	2.3	2.28±1.22	2.71±1.82	0.21
*Prps2	5.7	2.17±1.21	2.65±1.78	0.17
*DXMgh2	18.2	2.24±1.09	2.46±1.75	0.21
*DXMit4	30.1	2.15±0.98	2.63±1.73	0.23
*DXMgh9	36.9	2.21±1.12	2.72±1.64	0.09
*DXR1t96	49.6	2.09±1.24	2.69±1.77	0.10
*DXR1t21	80.9	2.28±1.13	2.56±1.76	0.43
*DXR1t104	101.6	2.74±1.22	2.54±1.61	0.29

表 3-3. X-Linked 遺伝子の解析

Xf:F344 由来 X 染色体上の遺伝子のアリル

Xo: OLETF 由来 X 染色体上の遺伝子のアリル

Yf:F344 由来 Y 染色体上の遺伝子のアリル

数値は各マーカー型間の筋肉内脂肪量の平均値および標準偏差を示す。

形質	染色体	LOD スコア
後腹膜脂肪量	14	4.4
	2	4.0
	4	4.0
腸間膜脂肪量	8	4.7
皮下脂肪量	17	4.2
腹腔内脂肪量	1	4.2

表 3-4. 筋肉内脂肪量以外の QTL 解析の結果

第2節 筋肉内脂肪蓄積 QTL についてのコンジェニック系統を用いた解析

#### 第1項 諸言

第3章第1節でOLETFとF344との間のF2個体群を用いてIMによるQTL 解析を行った。その結果、筋肉内脂肪量について第1 染色体上の D1Wox8 と D1Rat90間の40cMの領域に主効果を持つ有意なQTLの存在が示唆され、Imf と命名した。また、腹腔内脂肪量に関しては、Imf 領域に含まれる領域である D1Rat166とD1Rat90の間の10cMの領域にQTLが検出された。この10cMの QTL 領域には体内にあまねく脂肪を蓄積させる脂肪蓄積原因遺伝子が存在する と考えられた。こうして、本節ではD1Rat166とD1Rat90の間の約10cMのゲ ノム領域のみがOLETF由来となっており、その他のバックグラウンドゲノム領 域のすべてがF344 由来となっているコンジェニック系統(F344.OLETF-Imf系 統)を作製することにより、Imfの効果およびその存在ゲノム領域を検討した。

#### 第2項 材料および方法

1. 材料

OLETF 系統の雄 12 個体、F344 系統の雄 12 個体、F344.OLETF-Imf コン ジェニック系統の雄 9 個体を用いた。コンジェニック系統を作製するために、 OLETF 雌と F344 雄を掛け合わせて F1個体を作製し、その雄を F344 の雌に戻 し交配し、第1世代を得た。得られた戻し交雑仔から雄のみを選び、さらに下記 の方法で選抜された最良雄個体を F344 雌に掛け合わせる戻し交配を第5世代目

を得るまで繰り返した。戻し交配の各世代において、離乳時に雄のみを選抜しそ の雄の尾から抽出したゲノム DNA を用いて全染色体をカバーするマイクロサテ ライトマーカーによるタイピングを行い、最良雄個体を選抜した(マーカーアシス ト選抜)。マーカーアシスト選抜は全染色体を平均 14.3cM 間隔でカバーする 146 個のマーカーを用いて行った。マーカータイピングにより、第3章第1節で筋肉 内脂肪量について検出された QTL である *Imf* の領域に位置する *D1Rat166* およ び D1Rat90 でのマーカー型がヘテロ型となっており、それ以外のマーカーにつ いてはそのマーカー型が F344 ホモ型となっている確率の高い個体を最良雄個体 として選抜し、引き続く戻し交配に用いた。戻し交配第5世代目を兄妹交配する ことにより、D1Rat166 および D1Rat90 のマーカー型が OLETF ホモ型となって いるコンジェニック系統 (F344.OLETF-*Imf*) を作製した。この F344.OLETF-*Imf* コンジェニックにおける D1Rat166 および D1Rat90 以外のマーカーのマーカー 型はすべて F344 ホモ型を示したことから、このコンジェニックは Imf 周辺のゲ ノム領域のみが OLETF 由来であり、それ以外のバックグラウンドゲノム領域の すべては F334 由来となっていることが明らかにされた。以上のコンジェニック 作製については徳島大学医学部付属動物実験施設において行われた。このラット はその後、第3章第1節で示した条件下で35週齢まで飼育した。

## 2. 各脂肪組織における脂肪量の測定

35 週齢の OLETF、F344、F344.OLETF-*Imf* コンジェニックの雄より第 3 章第1節で示した方法により最長筋を採取した。その最長筋内における脂肪量の 測定については第3章第1節で示した最長筋切片作製、オイルレッド O 染色およ び画像解析法に従った。筋肉内脂肪量以外の脂肪量(後腹膜脂肪量、腸間膜脂肪 量、副睾丸脂肪量、皮下脂肪量)の測定についても第3章第1節で示した方法に 従った。また、屠殺前に体重測定も実施し、筋肉内脂肪量については脂肪量と、 脂肪量を体重で割った adiposity index のデータを用いた。その他の脂肪量につ いては脂肪量のデータのみを用いた。

3. データ解析

各脂肪量についての OLETF、F344 および F344.OLETF-*Imf* コンジェニッ クにおける比較を行った。各系統間に差があるか否かの検討は、Student's t 検定、 もしくは post hoc test として Scheffe's F 検定を用いた一元配置分散分析により 行った。

4. コンジェニックにおける OLETF ゲノム移入領域の決定

F344.OLETF-*Imf*コンジェニックの尾から DNAを抽出し、それを用いて*Imf* ゲノム領域に位置するマイクロサテライトマーカー(*D1Rat123、D1Mit7、 D1Rat81、D1Rat166*および *D1Rat90*)のタイピングを行い、コンジェニック系 統における OLETF ゲノム移入領域を検討した。用いたマーカーを表 3-5 に示す。

マーカータイピングのための PCR は以下の条件により行った。12.8µl dw、 2µl dNTP mix (各 2mM)、2µl 10×Ex Taq Buffer、0.2µl Ex Taq polymerase (5units/µl)、1µl sence primer (10µM)、1µl antisence primer (10µM)および 1µl DNA を混合し、94℃にて 45 秒、55℃にて 1 分、72℃にて 4 秒を 1 サイクルと して 40 サイクル行った。その後、72℃にて 5 分を 1 サイクル実行することで PCR 増幅産物を得た。PCR 増幅後、4%アガロースゲルにて電気泳動し、マーカー型の判定を行った。

#### 第3項 結果および考察

F344.OLETF-*Imf*コンジェニック系統における OLETF ゲノム移入領域の決
 定

表 3-5 に示したマーカーのタイピングを行うことで、F344.OLETF-*Imf*コン ジェニック系統における OLETF ゲノム挿入領域を決定した(図 3-5)。*D1Rat90* および *D1Rat166* でのマーカー型は OLETF ホモ型、その他のマーカーは F344 ホモ型を示した。また、*D1Rat166* および *D1Rat81* は非常に近い距離 (2 cM) にある隣接したマーカーであることから、この F344.OLETF-*Imf*コンジェニック における OLETF ゲノム移入領域は *D1Rat166* および *D1Rat90* の間の第 1 染色 体末端領域であり、コンジェニック系統のもつ染色体は *D1Rat166* と *D1Rat81* との間で組み換えを生じたものであると決定された。この移入領域は長さにして 約 10 cM であり、第 3 章第 1 節で示した QTL 解析における筋肉内脂肪量につい ての IM 法の結果から得られた *Imf*のゲノム領域に含まれていた。

## 2. 各系統間の脂肪量の比較

筋肉内脂肪量の各系統の脂肪染色の結果を図 3-6 に示す、また、筋肉内脂肪 量およびその adiposity index の各系統の間での比較の結果を図 3-7、後腹膜脂肪 量の比較結果を図 3-8、腸間膜脂肪量の比較結果を図 3-9、副睾丸脂肪量の比較結 果を図 3-10、皮下脂肪量の比較結果を図 3-11 に示す。また、それらの結果をま とめ、各系統間に統計的に有意な差が存在するか否かを Student's t 検定、もし くは post hoc test として Scheffe's F 検定を用いた一元配置分散分析により検討 した結果を表 3-6 に示す。

筋肉内脂肪量については、F344.OLETF-*Imf*コンジェニックは OLETF およ び F344 のほぼ中間値を示し、OLETF、あるいは F344 との比較で脂肪量におい て有意な差が見られるという結果となった。F344 よりも脂肪量が増加している ことより、F344.OLETF-*Imf*コンジェニックにおいて OLETF ゲノムが移入され ている領域である *D1Rat166 と D1Rat90*の間の領域に筋肉内脂肪量を増加させ る効果をもつ原因遺伝子が存在していることが示唆された。

F344.OLETF-*Imf* コンジェニックは F344 にくらべて筋肉内脂肪量が 0.84mm<sup>2</sup> および adiposity index では  $0.92 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{g}$  増加していた。F<sub>2</sub> 個体群 を用いた QTL 解析では *D1Rat166*マーカーの遺伝子型が OLETF ホモ型と F344 ホモ型の個体間の差が筋肉内脂肪量では 0.79mm<sup>2</sup>、adiposity index では 1.01×  $10^{-3} \text{ mm}^2/\text{g}$  であり、今回のコンジェニック解析の結果は QTL 解析により得られ た結果と一致するものであった。OLETF と F344 の筋肉内脂肪量の差は 1.92mm<sup>2</sup> および adiposity index の差では  $1.39 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{g}$  であり、このコンジェニック 領域に存在する原因遺伝子は筋肉内脂肪量増加の 44%程度(コンジェニック解析) あるいは 41%程度(QTL 解析)および adiposity index の増加の 66%程度(コンジェ ニック解析)あるいは 71%程度(QTL 解析)を説明するものであり、効果の大きい QTL であると考えられた。しかしながら、第 3 章第 1 節の QTL 解析の分散に基 づく結果では、当 QTL は筋肉内脂肪量において全表現型分散の 5%、遺伝分散の 7%を説明し、adiposity index において全表現型分散の 7%、遺伝分散の 8%を説 明するという結果を得ており、効果の小さい QTL であると考えられた。今回の コンジェニック解析で *Imf*の効果が大きいという結果が得られた理由として、こ の QTL はコンジェニックによりバックグラウンドゲノムのすべてが F344 に置換 されたことにより、本来持つと考えられたエピスタシス効果がマスクされ、大き い効果を発揮できるようになったと考えられる。

本節の結果より、最長筋内脂肪量を増加させる効果を持つ原因遺伝子が D1Rat166 と D1Rat90 の間に存在することが示唆された。ここで我々はこの F344.OLETF-Imf コンジェニックを用いて戻し交雑個体群を作製することによ り、OLETF ゲノム移入領域において組換えを生じさせ、それを利用することに よってその候補遺伝子の存在するゲノム領域の限局が可能ではないかと考えた。 その結果については第3章第3節に示す。

後腹膜脂肪量については各系統間においてすべて有意な差がみられ、 F344.OLETF-*Imf*コンジェニックは OLETF と F344 の中間値を示すという結果 となった。

腸間膜脂肪量については各系統間においてすべて有意な差が見られ、 F344.OLETF-Imfコンジェニックは OLETF と F344 の中間値を示すという結果 となった。

副睾丸脂肪量については各系統間においてすべて有意な差が見られ、 F344.OLETF-*Imf*コンジェニックは OLETF と F344 の中間値を示すという結果 となった。

皮下脂肪量については各系統間においてすべて有意な差が見られ、

**F344.OLETF**-*Imf*コンジェニックは **OLETF** と **F344** の中間値を示すという結果 となった。

F344.OLETF-Imf コンジェニックでは筋肉内脂肪量以外のすべての脂肪量 についても F344 と比べて有意に増加しているという結果となった(表 3・6)。第3 章第1節の QTL 解析では腹腔内脂肪量について、筋肉内脂肪量と同様に主効果 を持つ QTL が D1Rat166 と D1Rat90 の間に検出された。一方、後腹膜脂肪量、 腸間膜脂肪量、副睾丸脂肪量、皮下脂肪量においてはその領域に有意な QTL は 検出されなかった。QTL 解析に用いた個体数が 108 個体と少数であることから、 今後の解析法の改良、また、解析に用いる個体数を増やすことにより、今回のコ ンジェニックへの OLETF ゲノム挿入領域付近に有意な効果を持つ後腹膜脂肪量、 腸間膜脂肪量、副睾丸脂肪量、皮下脂肪量に対する QTL が検出されてくる可能 性は十分に考えられる。今回のコンジェニック系統でそれらの脂肪量が増加する のは確かな事実であり、D1Rat166 と D1Rat90 の間の領域に脂肪量増加の効果が あることは確かであると考えられた。今後、このコンジェニック系統を用いて実 験を進めることは十分に意義のあることであると考えられた。

#### 第4項 要約

本研究では、D1Rat166 と D1Rat90 の間の約 10cM のゲノム領域のみが OLETF 由来となっており、その他のバックグラウンドゲノム領域のすべてが F344 由来となっているコンジェニック系統(F344.OLETF·Imf系統)を作製し、筋 肉内脂肪量、後腹膜脂肪量、腸間膜脂肪量、副睾丸脂肪量および皮下脂肪量の表 現型を解析することにより、Imfの効果およびその存在ゲノム領域を検討した。 その結果、筋肉内脂肪量、後腹膜脂肪量、腸間膜脂肪量、副睾丸脂肪量および皮 下脂肪量において、F344.OLETF-*Imf*コンジェニックは OLETF および F344 の ほぼ中間値を示し、OLETF、あるいは F344 との比較で脂肪量において有意な差 が見られるという結果となった。F344.OLETF-*Imf*コンジェニックにおいて F344 よりも筋肉内脂肪量が増加していることより、F344.OLETF-*Imf*コンジェ ニックにおいて OLETF ゲノムが移入されている領域である D1Rat166 と D1Rat90 の間の領域に筋肉内脂肪量を増加させる効果をもつ原因遺伝子が存在 していることが示唆された。



図 3-5. コンジェニック系統における OLETF ゲノム挿入領域



図 3-6. 各系統における最長筋切片の脂肪染色結果



図 3-7. 筋肉内脂肪量およびその adiposity index における系統間比較



図 3-8. 後腹膜脂肪量における系統間比較



図 3-9. 腸間膜脂肪量における系統間比較



図 3-10. 副睾丸脂肪量における系統間比較



図 3-11. 皮下脂肪量における系統間比較

マーカー	第1染色体上における位置(cM)
D1Rat123	156.0
D1Mit7	187.3
D1Rat81	192.7
D1Rat166	194.7
D1Rat90	203.3

表 3.5. コンジェニックのタイピングに用いたマーカー

			筋肉内				
		筋肉内	(adiposity	後腹膜	腸間膜	副睾丸	皮下
			index)				
F344	平均	1.34 <sup>a</sup>	3.62 <sup>a</sup>	$11.7^{a}$	11.5 <sup>a</sup>	11.2 <sup>a</sup>	2.14 <sup>a</sup>
- 12	標準	0.38	2.19	0.7	0.0	0.9	0.06
n=12	偏差				0.8		0.06
F344•	亚构	2 1 9 <sup>b</sup>	5 01 <sup>b</sup>	21 0b	14 Ob	14 4 <sup>b</sup>	0 80 <sup>b</sup>
OLET-Imf	+- KJ	2.18	5.01	34.8	14.0	14.4	9.80
n=9	標準	0.42	2.29	2.6	15	1.6	2.46
	偏差	0.43			1.3	1.0	2.40
OLETF	平均	3.26 <sup>c</sup>	4.54 <sup>c</sup>	42.6 <sup>c</sup>	17.5°	17.3 <sup>°</sup>	15.51 <sup>°</sup>
n=12	標準	0.52	1 (1	2.5	17	1.2	2.2
	偏差	0.52	1.61	3.3	1./	1.2	2.2

表 3-6. 各脂肪量における系統間比較

第3節 筋肉内脂肪蓄積 QTL のファインマッピング

### 第1項 緒言

第3章第2節において、F344.OLETF-*Imf*コンジェニック系統の解析を行う ことで、F344.OLETF-*Imf*コンジェニックに移入された D1Rat166 と D1Rat90 の間の約 10cM の OLETF ゲノム領域には確かに筋肉内脂肪量を増加させる効果 を持つ原因遺伝子が存在することが判明した。さらに、その領域に存在すると考 えられる QTL は OLETF 由来アリルが F344 由来アリルに対して筋肉内脂肪量増 加において劣性様式で効果を示すことが第3章第1節のQTL解析の結果から判 明している。また、F344.OLETF-Imfコンジェニック系統とレシピエント系統で ある F344 ラット系統間での最長筋内脂肪量に関与する遺伝的要因の差は F344.OLETF-Imfコンジェニックに移入された OLETF ゲノム領域のみの差とな る。これらのことからコンジェニックと F344 の間の F<sub>1</sub>を F344.OLETF-Imfコ ンジェニックに戻し交配した個体を用いた最長筋内脂肪量についての遺伝解析は 単一原因遺伝子の解析に置き換えられることとなる。こうして、戻し交配した個 体を作製し、この個体より、F344.OLETF-*Imf*コンジェニックにおいての OLETF ゲノム移入領域における組換え個体を選抜し、その選抜された組換え個体の最長 筋内脂肪量を調べ、ハプロタイプ解析を行うことで、筋肉内脂肪蓄積原因遺伝子 のさらなるファインマッピングを試みた。

# 第2項 材料および方法

1.材料

63

F344.OLETF-*Imf*コンジェニックの雌をF344の雄に掛け合わせてF1を作製 し9週齢まで飼育した後、そのF1の雌をF344.OLETF-*Imf*コンジェニックの雄 に掛け合わせることにより戻し交配個体群(BC)を作製した。本研究ではBCの 雄のみを用いた。組換え個体を得るためには多くのBC 雄個体を必要とするため、 1 産目の戻し交配の後、約3週間の妊娠期間、約3週間の哺乳期間を過ぎた時点 で後追い交配に利用した。作製されたBCは35週齢まで室温21℃、湿度55%、 12時間毎の明暗条件にてSPF環境下、自由給水・給餌で維持された。また、35 週齢時のOLETF ラット12個体、F344 ラット 12個体、F344.OLETF-*Imf*コン ジェニック9個体および(F344.OLETF-*Imf*コンジェニック×F344)F16個体を使 用した。

2.BCにおけるマーカータイピングによる選抜

上記 1 で作製された BC より離乳時期である約 3 週齡で尾を採取し、ゲノム DNA の単離を行った。単離されたゲノム DNA を用いてマイクロサテライトマー カーによるマーカータイピングを行った。第 3 章第 2 節の結果に示されているよ うにコンジェニックにおける OLETF ゲノム移入領域の両端に位置するマーカー である *D1Rat166* および *D1Rat90* をタイピングに用いた。マーカータイピング により、両マーカー型の組み合わせが OLETF/F344 ヘテロ型かつ OLETF ホモ型 もしくは OLETF ホモ型かつ OLETF/F344 ヘテロ型となっているもの、つまり OLETF ゲノム移入領域の末端に位置する *D1Rat166と D1Rat90*の間で組換えが 起こっているものを選抜した。非組換え型はマーカータイピング後屠殺した。そ の選抜法の模式図を図 3-12 に示す。

# 3.表現型値の測定

選抜された BC は 35 週齢まで飼育した後、屠殺前に体重を測定した。屠殺し た後、腸間膜脂肪、後腹膜脂肪、副睾丸脂肪の各重量を測定した。また、筋肉内 脂肪量を測定するため、第1腰椎~第3腰椎の部分の右側最長筋を採取した。採 取した最長筋を用いて筋肉内脂肪量を測定した。筋肉内脂肪量の測定は第3章第 1節で示した方法に従った。

3. ハプロタイプ解析

選抜された BC について、ハプロタイプ解析を行うために D1Rat166 と D1Rat90の間に位置する D1Rat225 について、マーカータイピングを実施した。 D1Rat166、D1Rat225、D1Rat90のそれぞれの遺伝子型と筋肉内脂肪量測定値の 結果を用いてハプロタイプ解析を行った。

# 第3項 結果および考察

 OLETF、F344、F344.OLETF-*Imf* コンジェニックおよび(コンジェニック× F344)F1の脂肪量比較

OLETF、F344、F344.OLETF-*Imf*コンジェニックおよび(コンジェニック× F344)F1の脂肪量の比較結果を表 3-7 に示す。体重、腸間膜脂肪量、後腹膜脂肪 量および腹腔内脂肪量についてはすべての系統間で統計的に有意な差が見られる という結果となった。筋肉内脂肪量についても、すべての系統間で有意な差が見 られるという結果となった。筋肉内脂肪量の比較結果を図 3-13 に示す。各系統 間の脂肪量は F344、(F344.OLETF-*Imf* コンジェニック×F344)F<sub>1</sub>、 F344.OLETF-*Imf* コンジェニック、OLETFの順で体重および脂肪量が増加して いた。副睾丸脂肪量については F344 と(コンジェニック×F344)F<sub>1</sub>との間では統 計的に有意な差が見られないが、その他の系統間では統計的に有意な差が見られ るという結果となり、F344、(F344.OLETF-*Imf* コンジェニック×F344)F<sub>1</sub>、 F344.OLETF-*Imf* コンジェニック、OLETFの順で脂肪量が増加していた。これ までの QTL解析では OLETF アリルが劣性様式により脂肪量増加に効果をもつと いう結果となっていたが、今回の結果では副睾丸脂肪量を除いて、 (F344.OLETF-*Imf* コンジェニック×F344)F<sub>1</sub>の脂肪量が「F344 と F344.OLETF-*Imf* コンジェニックの中間の値をもつことから、OLETF アリルは 相加的遺伝様式により脂肪量を増加させることを示していた。このことは、コン ジェニックではバックグラウンドゲノムのすべてがF344 ホモ型に置換され、本 来持つと考えられたエピスタシス効果がマスクされたことに起因すると考えられ た。

# 2.BC の作製

F344.OLETF-*Imf*コンジェニックの雌をF344の雄に掛け合わせてF1を作製 し、そのF1の雌をF344.OLETF-*Imf*コンジェニックの雄に掛け合わせることに より BC を作製した結果、176 個体の BC 雄個体群を作製することができた。そ のうち *D1Rat166* と *D1Rat90*の間で組み換えを起こしていた個体は 12 個体であ った。こうして、*D1Rat166* と *D1Rat90*の間の遺伝距離は 6.8cM と推定された。

# 3. ハプロタイプ解析

D1Rat166 と D1Rat90 の間で組み換えを起こしている 12 個体における、 D1Rat166、D1Rat225 および D1Rat90 の遺伝子型タイピング結果および筋肉内 脂肪量の測定結果を表 3-8 に示す。組み換えを起こしていた 12 個体の筋肉内脂 防量は、F344.OLETF-Imf コンジェニックに近似した値を示す個体(脂肪量の高 い個体)と、(コンジェニック×F344)F1 に近似した値を示す個体(脂肪量の低い個 体)の 2 パターンに明確に区別することができた。脂肪量の高い個体群と脂肪量の 低い個体群が D1Rat166、D1Rat225 および D1Rat90 の遺伝子型とどのような関 係にあるかを表 3-8 に示す。また、それを図示したものを図 3-14 に示す。この結 果より、脂肪量が高いグループが OLETF ホモ型で、低いグループが OLETF/F344 ヘテロ型の領域を維持しているのは D1Rat225 と D1Rat90 の間の約 2.3cM の領 域と考えられ、Imfのゲノム領域は約 2.3cM にまで限局された。

#### 第4項 要約

本研究では、まず OLETF、F344、F344.OLETF-*Imf* コンジェニックおよび (コンジェニック×F344)F1の脂肪量の比較を行ったところ、体重、腸間膜脂肪量、 後腹膜脂肪量、腹腔内脂肪量および筋肉内脂肪量についてすべての系統間で統計 的に有意な差が見られた。副睾丸脂肪量については F344 と(コンジェニック× F344)F1 との間では統計的に有意な差が見られないが、その他の系統間では統計 的に有意な差が見られた。各脂肪量については OLETF、F344.OLETF-*Imf* コン ジェニック、(コンジェニック×F344)F1、F344 の順で多い値を示した。これま での QTL 解析では OLETF アリルが劣性様式により脂肪量増加に効果をもつとい う結果となっていたが、今回の結果では OLETF アリルは相加的遺伝様式により 脂肪量を増加させることを示していた。このことは、コンジェニックではバック グラウンドゲノムのすべてが F344 ホモ型に置換され、本来持つと考えられたエ ピスタシス効果がマスクされたことに起因すると考えられた。

次に F344.OLETF-*Imf* コンジェニックと F344 の間の F<sub>1</sub>を F344.OLETF-*Imf* コンジェニックに戻し交配した個体から、F344.OLETF-*Imf* コンジェニックにおいての OLETF ゲノム移入領域における組換え個体を選抜し、 その選抜された組換え個体の最長筋内脂肪量を調べ、ハプロタイプ解析を行うこ とで、筋肉内脂肪蓄積原因遺伝子のさらなるファインマッピングを試みた。その 結果、筋肉内脂肪量が高いグループが OLETF ホモ型で、低いグループが OLETF/F344 ヘテロ型の領域を維持しているのは *D1Rat225* と *D1Rat90* の間の 約 2.3cM の領域と考えられ、*Imf*のゲノム領域は約 2.3cM にまで限局された。



図 3-12. 組み換えを起こした BC を選抜する方法の模式図



図 3-13. OLETF、F344、F344.OLETF-Imf コンジェニックおよび(コンジェニ

ック×F344)F1の筋肉内脂肪量の比較



図 3-14. ハプロタイプ解析の結果

形質	F344	OLETF	F344.OLETF-Imf コンジェニック	(F344.OLETF- <i>Imf</i> コンジェニック×F344) $F_1$
個体数	12	12	9	6
体重(g)	393.6±18.4ª	$605.2 \pm 25.5^{d}$	$483.1 \pm 20.4^{\circ}$	425.3±16.1 <sup>b</sup>
筋肉内脂肪量(mm²)	1.30±0.28 <sup>a</sup>	$3.38{\pm}0.5^d$	$2.16 \pm 0.45^{\circ}$	$1.51{\pm}0.15^{\rm b}$
後腹膜脂肪量(g)	$11.7{\pm}0.7^{a}$	42.0±3.5 <sup>d</sup>	34.8±2.6 <sup>c</sup>	$21.1 \pm 2.5^{b}$
腸間膜脂肪量(g)	11.5±0.8 <sup>a</sup>	$17.5 \pm 1.7^{d}$	$14.8 \pm 1.5^{\circ}$	$12.7 \pm 0.8^{b}$
副睾丸脂肪量(g)	11.2±0.9 <sup>a</sup>	17.3±1.2 <sup>c</sup>	$14.4{\pm}1.6^{\rm b}$	$11.8{\pm}1.0^{\mathrm{a}}$
腹腔内脂肪量(g)	34.4±2.3 <sup>a</sup>	$76.8 \pm 6.5^{d}$	$64.1 \pm 5.2^{c}$	$45.6 {\pm} 4.0^{ m b}$

表 3-7. OLETF、F344、F344.OLETF-Imf コンジェニックおよび(コンジェニック×F344)F1の脂肪量の比較
# 表 3-8. 組み換えを起こした個体の遺伝子型タイピング結果および筋肉内脂肪 量の測定結果

		_	Genotype	
筋肉内脂肪量	個体数	D1Rat166	D1Rat225	D1Rat90
		(0 cM)	(4.5 cM)	(6.8 cM)
Low level	4	O/O	O/F	O/F
	1	O/O	O/O	O/F
High level	4	O/F	O/O	0/0
	2	O/F	O/F	0/0
	1	O/O	O/O	O/F

O/O:OLETFアリルホモ型

O/F : OLETF アリルと F344 アリルのヘテロ型

第4節 ラットにおける筋肉内脂肪蓄積原因遺伝子の同定

#### 第1項 諸言

第3章第3節において、(F344.OLETF-*Imf*コンジェニック×F344)F1× F344.OLETF-*Imf*コンジェニックの BC 個体群から組み換え個体を選抜し、ハプ ロタイプ解析を行うことによって、*Imf*の領域を約2.3cM にまで限局した。こう して、第4節では、この2.3cM のゲノム領域より、筋肉内脂肪蓄積原因遺伝子 の位置的候補となりえる遺伝子を検索し、その中から機能注釈情報を用いた検索 および mRNA の発現量の解析を行うことで、機能的候補となりえる遺伝子を同 定することを試みた。その結果、候補遺伝子として pancreatic lipase(*Pnlip*)を選 出した。さらに、その位置的機能的候補遺伝子が原因遺伝子として有力であるか 否かを検討するため、最初に、候補遺伝子のダイレクトシーケンスを行い、OLETF とF344 の間での多型を検出した。次に、得られた多型が *Imf*と共分離するか否 かについて検討した。

#### 第2項 材料および方法

1. 材料

第3章第3節で作製した BC 個体群から、*R1Rat166 と D1Rat90*の間のゲノ ム領域で組み換えを起こしている、12 個体を用いた。また、mRNA 量の比較を 行うため、15 週齢あるいは 35 週齢の OLETF 雄 12 個体、F344 雄 12 個体、 F344.OLETF-*Imf*コンジェニック雄9 個体、(コンジェニック×F344)F1 雄 6 個体 を用いた。さらに、F344 と同様に野生型コントロールとして BN 系統を用いた。 2. 位置的候補遺伝子の検索

第3章第3節で限局された *Imf*の領域(*D1Rat225*と*D1Rat90*の間の約2.3cM のゲノム領域) に存在する遺伝子を、NCBI のラットゲノムデータベース (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/rat/index.html)により検索した。得 られた遺伝子の機能注釈情報を NCBI の Gene データベースにより検索した。

3. マクロアレイ解析

データベースで検索された46個の位置的候補遺伝子のうち、25個の遺伝子の cDNAクローンをプローブとし、膵臓から抽出されたmRNAをターゲットとした マクロアレイ解析を行った。これら25個のcDNA断片を含むプラスミドDNAは Research Geneticsより入手した。ナイロンメンプレン上にプラスミドDNAを整 列化し、整列化したDNAを130℃で30分間加熱した後、UVクロスリンクで架橋す ることでcDNAマクロアレイを作製した。内部標準としてβ-actin遺伝子のcDNA を、陰性コントロールとしてpBluescriptベクターのDNAをマクロアレイ上に整 列化した。F344、OLETFおよびF344.OLETF-*Imf*コンジェニックの膵臓から ISOGEN (WAKO Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)を用いて抽出したト ータルRNAより、oligo-dTマグネットビーズ (Toyobo Co., Osaka, Japan)を用い てmRNAを単離した。単離したmRNAから、ランダムプライマーおよび ReverTraAce (Toyobo)を用いた逆転写反応によりビオチンラベルcDNAを合成し た。作製したマクロアレイとビオチン化cDNAをPerfectHyb (Toyobo)にて一晩、 68℃でハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーション後、Imaging High Chemifluorescence Detection kit (Toyobo)によりシグナル検出し、

Imagene (Bio-Discovery, Los Angels, CA)を用いることでグナル強度を定量化した。F344、OLETFおよびF344.OLETF-*Imf*コンジェニック間のシグナル強度の 比較はE-Gene Navigator Analysis (GeneticLab, Sapporo, Japan)を用いて行った。RNAサンプル間の遺伝子発現レベルの比較のために、各遺伝子のシグナル強 度をβ-actin遺伝子のシグナル強度により補正した。

## 4. Pnlip 発現レベルの確認

15 週齡および 35 週齡の雄個体から一晩の絶食後、膵臓を採取した。トータ ル RNA は ISOGEN (WAKO Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)を用いて 精製した。トータル RNA から RNA PCR Kit ver. 2.1 (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いた逆転写により、First-strand cDNA を合成した。合成後の逆転写反応溶 液を用いて、Competitive PCR (Shikamoto and Morita, 1999)を実施した。 Competitive PCR に用いたプライマーは *Pnlip* (GenBank アクセッション No. NM\_013161)と glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 遺伝子 (*Gapdh*) (GenBank アクセッション No. NM\_017008) の cDNA 配列を用いて設計した。 *Pnlip* のプライマー配列は 5'-ATACACCCAGGCTACCCAGAAC-3' (NM\_013161 の 419-440 番目の塩基配列) と 5'-CCAATAGCTCCGAATGTCCTCT-3' (NM\_013161 の 589-568 番目の塩基配列)であった。*Gapdh* のプライマー配列は 5'-TCCTGCACCACCAACTGCTTA-3' (NM\_017008 の 1294-1314 番目の塩基配 列) と 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCA-3' (NM\_017008 の 1817-1797 番目の 塩基配列)であった。Competitive PCR に用いたコンペティターDNA は、 Competitive DNA Construction Kit (Takara Bio)を用いて PCR により生成した。 Pnlip コンペティターの精製のためのプライマー配列は 5'-ATACACCCAGGCTACCCAGAACGTACGGTCATCATCTGACAC-3' (NM 013161 の 419-440 番目の塩基配列とコンペティターテンプレートの 1-20 番 塩 基 配 列 配 列 ) と 目  $\mathcal{O}$  $\mathcal{O}$ 混 成 5'-CCAATAGCTCCGAATGTCCTCTTCATTACGCATCGCTATTAC-3' (NM 013161 の 589-568 番目の塩基配列とコンペティターテンプレートの 200-181 番目の塩基配列との混成配列)であった。Gapdh のコンペティターの合 プ 成 ラ イ V 配 列 は 5'-TCCTGCACCACCAACTGCTTAGTACGGTCATCATCTGACAC-3' (NM 017008 の 1294-1314 番目の塩基配列とコンペティターテンプレートの 1-20 目  $\mathcal{O}$ 塩 基 配 列の 混 成 配 列)と 番 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAGCGTGAGTATTACGAAGGTG-3' (NM 017008 の 1817-1797 番目の塩基配列とコンペティターテンプレートの 400-381 番目の塩基配列の混成配列)であった。DNA コンペティターの濃度は分 Competitive PCR は RNA PCR Kit ver.21(Takara Bio)を用いて 0.5 µM PCR プ ライマー、DNA コンペティター (反応あたり 10<sup>1</sup>コピーから 10<sup>10</sup>コピーまでの 10 倍希釈系列)および 0.1 µl 逆転写反応溶液の条件下で行った。PCR 反応条件と して 94℃で 45 秒、60℃で 45 秒および 72℃で 45 秒の 35 サイクルを用いた。PCR 後、3%アガロースゲル電気泳動を行い、PCR 産物のシグナル強度を Scion Image により解析することで、コンペティターの濃度をもとに Pnlip と Gapdh の発現

77

レベルを Shikamoto と Morita の方法(Shikamoto と Morita、1999)に従って算 出し、RNA サンプル間の比較のために *Pnlip* の発現レベルを *Gapdh* の発現レベ ルにより補正した。

5. *Pnlip*の多型の検出

OLFTFとF344の間における Pnlipの多型をダイレクトシーケンスにより検 出した。5<sup>\*</sup>-フランキング領域(約 9.8kb)、エクソン/イントロン領域(約 13.1kb)お よび3<sup>\*</sup>-フランキング領域(約 3.6kb)を含む約 26.6kbにわたる Pnlipのゲノム領域 をカバーする 95 個のプライマーペアを用いて PCR を行った。PCR のテンプレー トとして F344 および OLETF の尾より精製した DNA を用い、PCR 条件として は発現レベルの確認と同様の条件を使用した。DNA 配列の決定には RISA-384 シーケンサーを用い、得られた配列の解析には GENETYX-WIN3.1 ソフトウエア を用いた。95 個のプライマーペアは GenBank アクセッション No. NW\_047570 の配列に基づき設計された。

6. Pnlip VNTR のジェノタイピング

Pnlipの VNTR のジェノタイピングには尾から精製した DNA を用いた。約 2.8kbのゲノム断片となる PCR 産物が約 38-bp コア配列のミニサテライトを含む ようにプライマーを設計した。プライマーの配列は 5'-TGTGCAGAGCACTGCGTCAC-3'(NW\_047570の1792587-1792606番目の 塩基配列)と 5'-CACAGTGCTCTGCTTGTGGA-3'(NW\_047570の 1795406-1795387番目の塩基配列)であった。PCR 反応条件として、94℃で 60 秒、60℃で 60 秒および 72℃で 180 秒の 30 サイクルを用いた。PCR 増幅後 1.0% アガロースゲル電気泳動を行い、PCR 産物長に従ってジェノタイピングを行った。

7. データ解析。

*Pnlip*の発現レベルの比較は Student's t 検定、もしくは post hoc test として Scheffe's F 検定を用いた一元配置分散分析により行った。

#### 第3項 結果および考察

1. 候補遺伝子の選出

データベースより D1Rat225 と D1Rat90の間の約 2.3cM のゲノム領域に存 在する遺伝子を検索したところ、49 個の遺伝子が検索された。遺伝子の検索結果 を表 3-9 に示す。49 個の遺伝子の中で機能的な候補として Pnlip を選出した。 Pnlip は 13kb 以上に及ぶ 13 個のエクソンで構成されており、465 個のアミノ酸 残基からなる 56kDa のタンパク質をコードする遺伝子である。また、Pnlip によ りコードされている膵リパーゼは機能的にはトリグリセリドから脂肪酸への加水 分解を引き起こし、腸管からの脂肪吸収に関与していることから、体内のエネル ギー吸収を増大させる役割を持つ。また、膵リパーゼの活性を阻害するオルリス タットを用いた治療では肥満患者の脂肪抑制に効果が見られることが報告されて いる(Sjostrom ら、1998; Hill ら、1999)。そのため、膵リパーゼを増加させるこ とは過剰なエネルギー吸収を促進し、その影響で筋肉内脂肪蓄積を引き起こすと 考えられた。さらに、マクロアレイ解析により膵において Pnlip が F344 に比べ て OLETF および F344.OLETF・Imfコンジェニックで高い発現パターンを持つこ とが示された(図 3-15)。こうして、*Pnlip* は筋肉内脂肪蓄積の原因遺伝子になり うると考えられた。

#### 2. Pnlipの mRNA 発現量の比較

マクロアレイ解析により得られた Pnlip 発現パターンを確認するために Competitive PCR を行った。F344.OLETF-Imfコンジェニック系統の膵における Pnlip mRNA の発現量は 15 週齢で 2.81 ± 0.21、35 週齢で 3.03 ± 0.43 となり、 OLETFの発現量(15週齢で2.98±0.40、35週齢で3.13±0.31)と近似した値 を示し、F344の発現量(15週齢で0.82±0.06、35週齢で0.95±0.06)と比較す ると、15週齢、35週齢ともに有意に高い値を示した(P < 0.05)。(コンジェニッ ク×F344)F1の発現量(15週齡で1.92±0.20、35週齡で1.85±0.19)については、 F344 と F344.OLETF-Imf コンジェニックの中間の値を示し、15 週齢、35 週齢 ともに F344 および F344.OLETF-Imfコンジェニックに対して統計的に有意な差 が検出された(P<0.05)(図 3-16、表 3-10)。また、BN の発現レベルは F344 のも のと同様の結果を示した。これらの結果より、OLETF アリルは膵における mRNA の発現量を相加的に上昇させることが示唆された。この発現レベルの遺伝様式の 結果は、第3節で得られた筋肉内脂肪量における遺伝様式の結果と一致しており、 PnlipのmRNA発現量の上昇が筋肉内脂肪蓄積量を上昇させていると考えられた。 機能注釈情報を用いた検索および mRNA の発現レベル解析の結果を総合的に判 断することで、Pnlip を筋肉内脂肪蓄積原因遺伝子の位置的機能的候補として選 定した。

80

#### 3. Pnlipの多型の探索

ダイレクトシーケンスの結果、Pnlip のエクソン/イントロン領域および 3<sup>-</sup> フランキング領域では F344 と OLETF の間に、多型を検出することができなか った(図 3-17、図 3-18)。しかし、5<sup>-</sup>フランキング領域では、F344 と OLETF の 間に Pnlip の転写開始点の上流 2698bp から 5517bp の間の位置に約 38-bp コア 配列のリピートというミニサテライト(約 2.8kb のゲノム長)が存在することが分 かった(図 3-18、図 3-19)。そのミニサテライトの PCR 産物は F344 では約 2.8kb の長さを持っていたが、OLETF および F344.OLETF-Imf コンジェニックでは約 3.0kb の長さを有していた(図 3-20)。BN については F344 と同様の PCR 産物長 の結果を示した。このことから、PCR 産物の長さの差はミニサテライトのリピー ト数の差に起因すると考えられ、Pnlip の OLETF アリルは 5<sup>-</sup>フランキング領域 において長い VNTR 多型を持つと示唆された。

#### 4. Imfと VNTR 多型の共分離解析

第3章第3節で作製した BC から選出された組み換えを起こしている 12個 体について、Pnlip の VNTR 多型についてのジェノタイピングを行った。ジェノ タイピングの結果、12個体は OLETF ホモ型の7個体と OLETF/F344 ヘテロ型 の5個体の2つのグループに分けることができた。この結果と筋肉内脂肪量の表 現型によりグループ分けした Imfのジェノタイピングの結果は完全に一致してお り、Imfと VNTR 多型は完全に共分離することが示唆された(表 3・11)。5<sup>-</sup>フラン キング領域に OLETF と F344 の間に VNTR 多型が検出され、この VNTR 多型の 長いアリルが、Pnlip の発現量を増加させることを通じて筋肉内脂肪量の増加に つながることが示唆された。また、今回検出したリピートコア配列は、既知の転 写因子の推定結合部位を含んでいた。その中には AP1 と USF1 が含まれており、 それらは膵臓の機能を高める機能を持っていた。セロトニントランスポーター遺 伝子の調節領域における VNTR の長いアリルはセロトニントランスポーター遺 伝子の mRNA レベルを上昇させることが報告されている(Lesch 6、1996)。さら に、インスリン遺伝子の調節領域におけるクラス III アリル (リピート数 140-210)はクラス I アリル(リピート数 23-63)に比べて 2 倍から 3 倍のインスリン mRNA を発現させると報告されている(Vafiadis 6、1997; Pugliese 6、1997)。こ れらのことからも、*Pnlip*の OLETF アリルにおける VNTR 多型の長いアリルは *Pnlip*の mRNA 発現量を増加させていると示唆された。以上より、*Pnlip* は原因 遺伝子として、検出された VNTR 多型は原因変異として有望であると考えられた。

#### 第4項 要約

本研究では、限局された約 2.3cM の Imfの領域より、筋肉内脂肪蓄積原因遺 伝子の位置的候補となりえる遺伝子を検索し、その中から機能注釈情報を用いた 検索および mRNA の発現量の解析を行うことで、機能的候補となりえる遺伝子 を同定することを試みた。その結果、候補遺伝子として pancreatic lipase(*Pnlip*) を選出した。*Pnlip* はトリグリセリドから脂肪酸への加水分解を引き起こし、腸 管からの脂肪吸収に関与していることから、機能的な候補と考えられた。また、 マクロアレイ解析および Competitive PCR 解析により、膵において *Pnlip*が F344 に比べて OLETF および F344.OLETF-*Imf*コンジェニックで高い発現パターンを 持つこと、さらに OLETF アリルが相加的に *Pnlip* 発現量を増加させていること が示された。さらに、その位置的機能的候補的遺伝子が原因遺伝子として有力で あるか否かを検討するため、最初に、候補遺伝子のダイレクトシーケンスを行い、 OLETF と F344 の間での多型を検出した。その結果、5<sup>-</sup>フランキング領域にお いて、*Pnlip* の転写開始点の上流の 2698bp から 5517bp の間の位置に約 38-bp コア配列のリピートというミニサテライト(約 2.8kb のゲノム長)が存在すること が分かった。そのミニサテライトの PCR 産物は F344 では約 2.8kb の長さを持っ ていたが、OLETF および F344.OLETF-*Imf* コンジェニックでは約 3.0kb の長さ を有しており、VNTR 多型が存在し OLETF アリルは F344 アリルに比べて長い アリルであることが明らかにされた。最後に、得られた VNTR 多型が *Imf*と共分 離するか否かについて検討した。その結果、*Imf* と VNTR 多型が *Imf* と共分離す ることが示された。以上の結果より、*Pnlip* は原因遺伝子として、検出された VNTR 多型は原因変異として有望であると考えられた。



図 3-15. F344、OLETF、F344.OLETF-Imf コンジェニックにおける膵での

Pnlip のマクロアレイ解析



図 3-16. F344、OLETF、F344.OLETF-*Imf* コンジェニックおよび(コンジェニック×F344)F<sub>1</sub>についての膵における *Pnlip* mRNA 発現量の比較

同じ肩文字を持たない平均値間に有意差が存在する。



図 3-17. Pnlip エクソン/イントロン領域における多型の検索(ダイレクトシーケンス)

#### 5' flanking region of NW\_043241



図 3-18. Pnlip 5'フランキング領域 (~9.8 kb)および 3'フランキング領域(~3.6 kb)における多型の検索(ダイレクトシーケンス)



図 3-19. Pnlip 5'フランキング領域に存在するミニサテライト



図 3-20. 検出した VNR 多型の電気泳動像

表 3-9. D1Rat255と D1Rat90の間のゲノム領域に存在する遺伝子および染色体

位置

		染色体位置	
遺伝子座名	遺伝子名	START	STOP
Gpam	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	261370264	261431434
Tectb	tectorin beta	261482994	261498415
Gucy2g	guanylate cyclase 2G	261500922	261542254
Acs15	acyl-CoA synthetase long-chain family member 5	261554383	261599373
Zdhhc6	zinc finger, DHHC-type containing 6	261600778	261606354
Vtila	vesicle transport through interaction with t-SNAREs 1A	261664003	261905744
Tcf712	transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)	262031823	262226710
Habp2	hyaluronan binding protein 2	262556446	262591500
Nrap	nebulin-related anchoring protein	262591454	262672255
Casp7	caspase 7	262689300	262721591
Plekhsl	pleckstrin homology domain containing, family S member 1	262740491	262770180

LOC680527	hypothetical protein LOC680527	262773103	262819109
Dclre1a	DNA cross-link repair 1A	262822176	262840988
Nh1rc2	NHL repeat containing 2	262842003	262902709
LOC680553	hypothetical protein LOC680553	262911784	262981815
Adrb1	adrenoceptor beta 1	263025655	263027055
RGD1307158	similar to oocyte-testis gene 1	263095247	263118602
LOC680584	hypothetical protein LOC680584	263118795	263126956
Tdrd1	tudor domain containing 1	263130977	263174231
von Willebrand factor A domain Vwa2		263185213	263217657
Afap112	actin filament associated protein 1-like 2	263220056	263256132
LOC680684	similar to HBxAg transactivated 80684 protein 2		263367981
Ablim1	actin-binding LIM protein 1	263380818	263465905
Fam160b1	family with sequence similarity 160, member B1	263667832	263692211
Trub 1	TruB pseudouridine (psi) synthase	263766535	263813/02
11001	homolog 1 (E. coli)	203700333	203013492
Atrn11	attractin like 1	263919358	264486579
LOC680147	similar to 40S ribosomal protein S19	264270239	264270657
Gfra1	GDNF family receptor alpha 1	264614329	264875486

Ccdc172	coiled-coil domain containing 172	264938299	264981620
Pnlip	pancreatic lipase	265107812	265120969
Pnliprp1	pancreatic lipase-related protein 1	265237786	265253415
Pnliprp2	pancreatic lipase-related protein 2	265267609	265285920
LOC681006	hypothetical protein LOC681006	265297710	265301777
Hspa12a	heat shock protein 12A	265305145	265373007
LOC100363150	hypothetical protein LOC100363150	265368367	265373012
LOC100363557	hypothetical LOC100363557	265398518	265406323
Eno4	enolase family member 4	265466484	265489862
RGD1311558	similar to 4930506M07Rik protein	265492017	265597362
Vax1	ventral anterior homeobox 1	265699404	265703320
Kcnk18	potassium channel, subfamily K, member 18	265749192	265764641
Slc18a2	solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 2	265789917	265824551
Pdzd8	PDZ domain containing 8	265825444	265883170
Emx2	empty spiracles homeobox 2	266004257	266011265
LOC502394	hypothetical LOC502394	266136063	266136644
RAB11 family interacting protein 2 Rab11fip2		266461752	266497576
LOC100363203	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, alpha/beta subcomplex, 1-like	266705521	266705992

Fam204a	family with sequence similarity 204,	266749513	266779356
	member A		
LOC681275	hypothetical protein LOC681275	266911245	266911733
Prlhr	prolactin releasing hormone receptor	267068380	267070067

# 表 3-10. F344、OLETF、F344.OLETF-Imf コンジェニックおよび(コンジェニック

ギロモ	F244		F344.OLETF-Imf	(コンジェニック
衣現坐	F344 OLEIF		コンジェニック	$\times$ F344)F <sub>1</sub>
個体数	12	12	9	6
Pnlip mRNA レベル(15	$0.82+0.06^{a}$	$2.08\pm0.40^{b}$	$2.81\pm0.21^{b}$	$1.02\pm0.20^{\circ}$
週 齢)	0.82±0.00	2.98±0.40	2.01±0.21	1.92±0.20
Pnlip mRNA レベル(35	$0.95 \pm 0.06^{a}$	$3 13 \pm 0 31^{b}$	$3.03\pm0.43^{b}$	$1.85\pm0.10^{\circ}$
週齡)	0.75±0.00	5.15±0.51	5.05±0.45	1.05±0.17

×F344)F<sub>1</sub>についての膵における Pnlip mRNA 発現量の比較

同一行内で同じ肩文字を持たない平均値間に有意差が存在する。

	Pnlip VNTR 多型における			
		遺伝子型		
		O/F	0/0	
Lufになけて進にこ刑	O/F	5	0	
Img にわける 夏仏 J 生	0/0	0	7	

表 3-11. Imf と Pnlip の VNTR 多型の共分離解析

O/F: OLETF アリルと F344 アリルのヘテロ型 O/O: OLETF アリルのホモ型

第4章 ラットモデルより得られた筋肉内脂肪蓄積原因遺伝子のウシへの外挿

第1節 ウシ PNLIP における多型の検索

#### 第1項 諸言

筋肉組織内への脂肪蓄積により形成される霜降りは和牛生産者にとって、最 も関心を寄せる経済的に重要な形質となっている。高い程度の霜降りは食味や柔 らかさに影響を与えることで、肉質の向上につながることが報告されている (Busboom ら、1993; Boylston ら、1995; Matsuishi ら、2001)。そのため、霜降 りの程度を上昇させる、選抜育種に有効となるより効率のよい分子マーカーを開 発することが重要な課題となっている。

第3章では、Pnlip 遺伝子がラットにおける筋肉内脂肪蓄積の原因遺伝子と して有望であることを明らかにした。このようなラットモデルで得られた情報を ウシへ外挿することで PNLIP がウシ脂肪交雑形質に関連する遺伝子であるか否 かについて検討することとした。第4章第1節ではウシにおける PNLIP 遺伝子 の多型の検索を行った。また、検索により得られた SNP と脂肪交雑との予備的 相関解析を、脂肪交雑が極めて高い黒毛和種種雄牛群と、その能力が極めて低い 黒毛和種種雄牛群との間および脂肪交雑に関する選抜が行われてきた黒毛和種牛 品種とそのような選抜が行われてこなかったホルスタイン種牛品種との間のアリ ル頻度分布の比較により行った。

#### 第2項 材料および方法

1. 材料

大分県有黒毛和種種雄牛 101 頭の中から、脂肪交雑育種価の極めて高い種雄 牛 17 頭、脂肪交雑育種価の極めて低い種雄牛 17 頭を選抜し、SNP タイピングお よび予備的相関解析に用いた。それらの種雄牛において、特定の血統への偏りは ほとんど見られなかった(Sasaki ら、2006a)。101 頭の種雄牛における脂肪交雑 育種価の正確さは0.770 から0.990 の範囲で0.935±0.008 という平均値を示した。 育種価のデータは Sasaki ら(2006a)によって報告された肉用牛についての大分県 レコーディングシステムより得られた。さらに、34 頭の特定血統の偏りがみられ ないホルスタイン種牛についても、SNP ジェノタイピングおよび予備的相関解析 に用いた。精液、血液あるいは脂肪組織を、SNP ジェノタイピング用の DNA 抽 出のために大分県畜産試験場にて採取した。DNA は、標準的なプロトコールに従 って精製した。

#### 2. Harrplot 解析および SNP の検索

ラットでみられた Pnlip プロモーター領域上のミニサテライトがウシ PNLIP に存在するか否かを検討するために、ウシ PNLIP の DNA 配列(10kb の プロモーター領域)を用いて Harrplot 解析を実施した。解析には GENETYX ソフ トウェアを用いた。ウシ PNLIP の DNA 配列は NCBI のウシゲノムデータベース より入手した。また、ウシ PNLIP の SNP を NCBI dbSNP データベースを用い て検索した。

#### 3. SNP ジェノタイピング

検索により得られた 13 個の SNP について、ジェノタイピングを行った。13 個の SNP は rs41648166、rs41648167、rs41648171、rs41648172、rs41648173、 rs41648174, rs41648165, rs41648176, rs41648178, rs41648179, rs41648180, rs42104800 および rs42104801 であった。これらの SNP は、それぞれイントロ ン 5、イントロン 5、イントロン 6、イントロン 6、イントロン 6、イントロン 6、 イントロン 7、エクソン 7、イントロン 7、イントロン 10、イントロン 10、イン トロン 12 およびイントロン 12 に存在していた(図 4-1)。SNP のジェノタイピン グは PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法を用いて行った。 PCR-RFLP 法で用いた PCR プライマーと制限酵素を表 4-1 に示す。PCR 増幅は、 25ng DNA、0.5 µM 各プライマー、0.2 mM 各 dNTP、0.625 Uの Ex Taq ポリ メラーゼ(Takara)および1XEx Taq バッファー (Takara)を含む 25µl の反応溶 液の条件下で行った。94℃で3分間1サイクルの変性を行った後、94℃で 50 秒、 66℃で 50 秒、72℃で 50 秒を 1 サイクルとした 35 サイクルの PCR 条件下で増 幅を行った。その後、伸長反応を 72℃で 5 分間行った。PCR 産物の消化は、制 限酵素として rs41648166 と rs41648172 については HpyCH4IV を、rs41648167 については BsaXI を、rs41648171 については NlaIII を、rs41648173 について は HphI を、rs41648174 については MboI を、rs41648175 については BamHI を、rs41648176 については MsII を、rs41648179 については BccI を、rs41648180 については MboII を、rs42104801 については AluI を用いて、37℃で1時間の 反応条件を使用した。rs41648178 については TaqI を用いて 65℃で1 時間の反 応条件を使用した。その後、3.0%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。

#### 4. データ解析

脂肪交雑育種価の極めて高い黒毛和種種雄牛 17 頭と脂肪交雑育種価の極め て低い黒毛和種種雄牛 17 頭の間、および 34 頭の黒毛和種牛品種と 34 頭のホル スタイン種牛品種の間での PNLIP SNP のアリル頻度分布の比較を SAS プログラ ムの FREQ プロシジャを用いたカイ二乗検定により行った。

#### 第3項 結果および考察

#### 1. Harrplot 解析および SNP 検索

ウシ PNLIP遺伝子をウシゲノムデータベースにより検索したところ、第26 染色体上に PNLIP が存在していた。PNLIP の機能は第3章第4節に示した通り であり、脂肪交雑原因遺伝子の機能的な候補として考えられた。また、黒毛和種 牛の半きょうだい家系を用いた QTL 解析により、ウシ第26染色体上には脂肪交 雑に関わる QTL が存在しているとの報告もあり(Takasuga ら、2007)、その QTL ゲノム領域に PNLIP が存在することから位置的な候補としても考えられた。こ うした理由から、ラット Pnlip プロモーター領域で検出され、筋肉内脂肪蓄積に 関わると考えられたミニサテライトがウシ PNLIP でも存在しているか否かの検 討を Harrplot 解析により行った。10kb のプロモーター領域について Harrplot 解析を行った結果を図4・2 に示す。解析の結果、ウシのプロモーター領域にはラ ットの Pnlip で検出されたミニサテライトは存在しないことが判明した。そこで dbSNP データベースを用いて、ウシ PNLIP の SNP の検索を行った。SNP 検索 の結果、それぞれイントロン 5、イントロン 5、イントロン 6、イントロン 6、イ ントロン 6、イントロン 6、イントロン 7、エクソン 7、イントロン 7、イントロ ン 10、イントロン 10、イントロン 12 およびイントロン 12に存在する、rs41648166、 rs41648167、rs41648171、rs41648172、rs41648173、rs41648174、rs41648165、 rs41648176、 rs41648178、 rs41648179、 rs41648180、 rs42104800 および rs42104801 という 13 個の SNP が得られた。

#### 2. 脂肪交雑能力に極端な差を持つ黒毛和種牛群を用いた予備的相関解析

大分県有黒毛和種種雄牛101頭から、脂肪交雑育種価の極めて高い種雄牛17 頭、脂肪交雑育種価の極めて低い種雄牛 17 頭を選抜し PCR-RFLP 法を用いて SNP のジェノタイピングを行った。rs41648171 においては、GGホモ、CCホモ および CG ヘテロがそれぞれ 3 バンド(91、 163 および 292 bp)、4 バンド(42、 91、121 および 292 bp)および 5 バンド(42、91、121、163 および 292 bp) で検出された。rs41648172 においては、TTホモ、CCホモおよび CT ヘテロが それぞれ1バンド(546 bp)、2バンド(131 および415bp)および3バンド(131、415 および 546 bp)で検出された。 rs41648173 においては、CC ホモ、TT ホモお よび CT ヘテロがそれぞれ 2 バンド (113 および 433 bp)、 3 バンド (113、 176 および 257 bp) および 4 バンド (113、 176、 257 および 433 bp)で検出 された。 rs41648174 においては、 AA ホモ、CC ホモ および AC ヘテロが それぞれ 4 バンド (48、 53、 139 および 306 bp)、 5 バンド (42、 48、 53、 139 および 264 bp) および 6 バンド (42、48、53、139、264 および 306bp) で検出された。 rs41648176 においては、 CC ホモ、TT ホモ および CT ヘテ ロがそれぞれ 3 バンド (53、223、および 270 bp)、4 バンド (53、116、154、

および 223 bp) および 5 バンド (53、 116、 154、 223、 および 270 bp)で検 出された。rs41648178 においては、 TT ホモ、CC ホモ および CT ヘテロ が それぞれ 1 バンド (546 bp)、 2 バンド (74 および 472 bp) および 3 バンド (74、 472、 および 546 bp)で検出された。rs42104801 においては、TT ホモ、 CC ホモ および CT ヘテロ がそれぞれ 2 バンド (64 および 193 bp)、3 バンド (54、 64 および 139 bp) および 4 バンド (54、 64、 139 および 193 bp)で検 出された。rs41648166, rs41648167, rs41648175, rs41648179, rs41648180 お よび rs42104800 については黒毛和種集団においては SNP が G, G, T, C, A およ び GT リルで固定されているらしいことから、多型は検出されなかった。

脂肪交雑育種価の極めて高い黒毛和種種雄牛群と脂肪交雑育種価の極めて低 い種雄牛群間でのアリル頻度分布の差については、多型が検出された 7 つの SNP の全てで有意な差が見られた。各 SNP における P 値は、0.0154 (rs41648171)、 0.0154 (rs41648172)、 0.0154 (rs41648173)、 0.0154 (rs41648174)、0.0154 (rs41648176)、0.0066 (rs41648178) および 0.0154 (rs42104801)であった。 rs41648171、rs41648172、rs41648173、rs41648174、rs41648176、rs41648178 および rs42104801 において、それぞれ *C、T、T、C、C、T* および *T アリルの* 頻度が脂肪交雑育種価の極めて低い種雄牛群よりも脂肪交雑育種価の極めて高い 種雄牛群の方で高い値を示した。また、*G、C、A、T、C* および *C アリルの* 頻度が脂肪交雑育種価の極めて高い種雄牛群よりも脂肪交雑育種価の極めて低い 種雄牛群の方で高い値を示した(図 4-3)。以上の結果より、rs41648171、 rs41648172、rs41648173、rs41648174、rs41648176、rs41648178 および rs42104801において、それぞれ *C、T、T、C、C、T* および *T アリル*が脂肪交

101

雑の高いレベルと関連しているのではないかと考えられた。

## 3. 脂肪交雑能力に極端な差を持つ品種を用いた予備的相関解析

黒毛和種牛品種においては脂肪交雑に対して、50年にわたり強い選抜が行わ れてきた。その一方、ホルスタイン種牛品種ではそのような選抜が行われてこな かった。(Sasaki ら、2006a; Sasaki ら、2006b)。そのため、rs41648172、 rs41648176 および rs41648178 において、PCR-RFLP 法を用いてホルスタイン 種牛34頭についてジェノタイピングを行い、黒毛和種牛34頭とのアリル頻度分 布の比較を行った。その結果、3つの SNP の全てにおいて統計的に有意な品種間 での差が検出された(図 4-4)。rs41648172 について、黒毛和種牛においては T ア リルの頻度は 0.5、C アリルの頻度は 0.5、ホルスタイン種牛においては T アリル の頻度は 0.34、C アリルの頻度は 0.66 であった。rs41648176 について、黒毛和 種牛においては C アリルの頻度は 0.5、T アリルの頻度は 0.5、ホルスタイン種牛 においては C アリルの頻度は 0.34、T アリルの頻度は 0.66 であった。rs41648178 について、黒毛和種牛においてはTアリルの頻度は0.47、Cアリルの頻度は0.53、 ホルスタイン種牛においては T アリルの頻度は 0.34、C アリルの頻度は 0.66 で あった。rs41648172 について Tアリル、rs41648176 について Cアリル、および rs41648178 について Tアリルが、ホルスタイン種牛品種よりも黒毛和種牛品種 において高いアリル頻度を示した。この結果は、脂肪交雑育種価の極めて低い種 雄牛群と脂肪交雑育種価の極めて高い種雄牛群との間の比較の結果と一致してお り、rs41648172 において T アリル、rs41648176 において C アリルおよび rs41648178 において Tアリルが脂肪交雑に対する選択圧を受けて黒毛和種牛品 種では高いアリル頻度を示すようになったと考えられた。

#### 第4項 要約

第3章までで得られた、Pnlip遺伝子がラットにおける筋肉内脂肪蓄積の原 因遺伝子として有望であるという結果をウシの脂肪交雑形質へ外挿することを試 みることとした。そこで、最初にウシにおける PNLIP 遺伝子の検索を行い、ラ ットで得られたミニサテライトがウシ PNLIP 遺伝子のプロモーター領域でも存 在するかの確認を行った。その結果、ウシではミニサテライトは存在しないこと が明らかにされた。次にウシ PNLIP について SNP の検索を行い、検索により得 られた SNP と脂肪交雑との予備的相関解析を、脂肪交雑が極めて高い黒毛和種 種雄牛群と、その能力が極めて低い黒毛和種種雄牛群との間のアリル頻度分布の 比較により行った。その結果、rs41648171、 rs41648172、rs41648173、 rs41648174、rs41648176、rs41648178 および rs42104801 において、それぞれ C、T、T、C、C、T および T アリルが脂肪交雑のレベルを上昇させているので はないかと考えられた。また、脂肪交雑に関する選抜が行われてきた黒毛和種牛 品種とそのような選抜が行われてこなかったホルスタイン種牛品種との間のアリ ル頻度分布の比較を行った。その結果、rs41648172 において T アリル、 rs41648176において Cアリルおよび rs41648178 において Tアリルが黒毛和種 牛品種において高い頻度を持つことが明らかにされ、これらのアリルは脂肪交雑 の高いレベルに関連していると考えられた。

103



図 4-1. ウシ PNLIPにおいて検索された 13 個の SNP



ラット Pnlip プロモーター領域



ウシ PNLIP プロモーター領域

図 4-2. ラット Pnlip およびウシ PNLIP プロモーター領域における Harrplot

解析

		rs41648171		
高脂肪交雑能力種雄牛群	High	C a	illele	G allele
低脂肪交雑能力種雄牛群	Low	C allele	G allele	;
		rs41648172		
高脂肪交雑能力種雄牛群	High	T a	illele	C allele
低脂肪交雑能力種雄牛群	Low	T allele	C allele	)
		rs41648173		
高脂肪交雑能力種雄牛群	High	Ta	illele	C allele
低脂肪交雑能力種雄牛群	Low	T allele	C allel	e
		rs41648174		
高脂肪交雑能力種雄牛群	High	Ca	A allele	
低脂肪交雑能力種雄牛群	Low	C allele A allele		
		rs41648176		
高脂肪交雑能力種雄牛群	High	C allele		T allele
低脂肪交雜能力種雄牛群	Low	C allele T allele		
		rs41648178		
高脂肪交雑能力種雄牛群	High	T allele C		C allele
低脂肪交雑能力種雄牛群	Low	T allele C allele		
		rs42104801		
高脂肪交雑能力種雄牛群	High	Ta	illele	C allele
低脂肪交雜能力種雄牛群	Low	T allele C allele		,

図 4-3. 脂肪交雑育種価の極めて高い種雄牛群と脂肪交雑育種価の極めて低い

種雄牛群の間のアリル頻度分布の差

	rs41648172			
黒毛和種牛品種	T allele		C allele	
ホルスタイン種牛品種	T allele	C allele		

rs41648176

ホルスタイン種牛品種

黒毛和種牛品種

C allele		T allele
C allele		T allele

rs41648178

黒毛和種牛品種 ホルスタイン種牛品種

T allele		C allele
T allele		C allele

図 4-4. 黒毛和種牛品種とホルスタイン牛品種の間のアリル頻度分布の差

SNP accession	Primer sequences			Restriction
no.	in <i>PNLIP</i>	Forward	Reverse	enzyme
rs41648166	intron 5	GCCTTTGACT GTGTGGATCA	GATTCCAGCT TGTGCTTCCT	HpyCH4IV
rs41648167	intron 5	GCCTTTGACT GTGTGGATCA	GATTCCAGCT TGTGCTTCCT	BsaXI
rs41648171	intron 6	CAGTGCTATC TCCCGGAGTC	GAAATCTAGG TGGCCCACAA	NlaIII
rs41648172	Intron 6	CAGTGCTATC TCCCGGAGTC	GAAATCTAGG TGGCCCACAA	HpyCH4IV
rs41648173	Intron 6	CAGTGCTATC TCCCGGAGTC	GAAATCTAGG TGGCCCACAA	HphI
rs41648174	Intron 6	CAGTGCTATC TCCCGGAGTC	GAAATCTAGG TGGCCCACAA	MboI
rs41648175	Intron 7	TACCACCTGC ACTTGCACTC	GAAATCTAGG TGGCCCACAA	BamHI
rs41648176	Exon 7	CAGTGCTATC TCCCGGAGTC	GAAATCTAGG TGGCCCACAA	MsЛ
rs41648178	Intron 7	CAGTGCTATC TCCCGGAGTC	GAAATCTAGG TGGCCCACAA	TaqI
rs41648179	Intron 10	AGGATTCTTG CCTGGGAAAT	CCAAATTGGA AAGGCGATAA	BccI
rs41648180	Intron 10	AGGATTCTTG CCTGGGAAAT	CCAAATTGGA AAGGCGATAA	MboII
rs42104800	intron 12	TCTGCAATGG TTCTCCTCTG	CACACAGTGA AAGCGAAAGC	BstN
rs42104801	intron 12	AAGATTGGAG TGTGCGTGAA	CTGTCTGTTT CAGTGGGAAG	AluI
## 第1項 諸言

第4章第1節ではウシにおける脂肪交雑の原因遺伝子の候補として PNLIP 遺伝子を取り上げ多型の検索を行った。また、大分県有黒毛和種種雄牛の脂肪交 雑育種価の極めて高い牛群と脂肪交雑育種価の極めて低い牛群との間で、検索に より得られた SNP のアリル頻度分布の差を比較し、予備的相関解析を行った。 その結果、rs41648171、rs41648172、rs41648173、rs41648174、rs41648176、 rs41648178 および rs42104801 において、それぞれ C、T、T、C、C、T および T アリルが脂肪交雑の高レベルと関連しているのではないかと考えられた。さら に、黒毛和種牛品種とホルスタイン種牛品種を用いた予備的相関解析を行うこと で、rs41648172 において T アリル、rs41648176 において C アリルおよび rs41648178 において T アリルが脂肪交雑レベルの上昇に関連している可能性を 裏付ける結果が得られた。

PNLIP SNP と脂肪交雑形質との関連を確認するために、第4章第2節では 大分県有黒毛和種種雄牛101頭および大分県産の父方半きょうだい黒毛和種去勢 肥育牛367頭を用いて、脂肪交雑とSNP との相関解析を行った。

### 第2項 材料および方法

1. 材料

脂肪交雑と SNP の相関解析を行うために、第4章第1節で行った予備的相 関解析に用いた 34 頭の大分県有黒毛和種種雄牛の母集団である種雄牛 101 頭を 用いた。これらの種雄牛において、特定の血統への偏りはほとんど見られなかっ た(Sasaki ら、2006a)。また、367 頭の大分県産の父方半きょうだい黒毛和種去 勢肥育牛を用いた。これらの個体の父親は SNP の遺伝子型がホモ型となってお り、母親は雌牛集団のランダムサンプルと考えられた。種雄牛については精液あ るいは血液を、去勢肥育牛では脂肪組織を採取し、これらのサンプルより SNP ジェノタイピングに用いた DNA を標準的なプロトコールに従い精製した。種雄 牛および去勢肥育牛における脂肪交雑および皮下脂肪厚についての育種価は、大 分県で肥育された黒毛和種牛の枝肉記録から予測された(Sasaki ら、2006a)。

育種価予測にあたって、最初に MTDFREML プログラム(Boldman ら、1995) を用いた REML 法により解析し、遺伝分散と環境分散を推定した。さらに BLUP オプションにより単一形質モデルを用いて育種価の予測を行った。性別、市場年 および農場は母数効果として考慮することにした。肥育期間および、畜年齢は共 変量として考慮することとした。肥育期間は各動物の肥育開始から市場出荷まで の期間とした。これらの母数効果および共変量はすべて有意であった(P<0.001)。 変量効果として個体の相加的遺伝効果を取り上げ、個体モデルが育種価を予測す るために採用された。

2. SNP ジェノタイピング

種雄牛 101 頭を用いた相関解析では、rs41648172、rs41648176 および rs41648178 の 3 つの SNP を用いた。これらの SNP はそれぞれ *PNLIP* のイント ロン 6、エクソン 7 およびイントロン 7 に存在していた。これら 3 つの SNP は第 4 章第 1 節の予備的相関解析において、高脂肪交雑能力牛群と低脂肪交雑能力牛 群の間で有意に異なるアリル頻度分布を示したものであった。SNPは PCR-RFLP
法を用いてジェノタイピングした。PCR-RFLP法は第4章第1節に示した方法に
従った。去勢肥育牛 367 頭を用いた相関解析では3つの SNPの内の rs41648172
のみを用いた。ジェノタイピングは PCR-RFLP 法を用いて行い、PCR-RFLP法
は第4章第1節に示した方法に従った

## 3. データ解析法

種雄牛 101 頭を用いた相関解析では、脂肪交雑あるいは皮下脂肪厚の育種価 に対する SNP の遺伝子型の効果について、SNP の遺伝子型を母数効果とし、父 親を変量効果として取り上げたモデルを用いて解析を行った。去勢肥育牛 367 頭 を用いた解析では、母数効果として SNP の遺伝子型のみを取り入れたモデルを 用いて解析を行った。統計解析は種雄牛 101 頭の解析では SAS プログラムの MIXED プロシジャを用い、去勢肥育牛 367 頭を用いた解析では GLM プロシジ ャを用いて解析を行った。

#### 第3項 結果および考察

1. 種雄牛 101 頭を用いた相関解析

大分県有黒毛和種種雄牛 101 頭を用いた解析では、ジェノタイピングの結果、 rs41648172 においては、15 頭が CCホモ型、56 頭が CT ヘテロ型および 30 頭 が TT ホモ型という結果となった。また、rs41648176 においては、12 頭が TT ホモ型、55 頭が CT ヘテロ型および 30 頭が CCホモ型という結果となった。ま た、rs41648178 においては、21 頭が CCホモ型、56 頭が CT ヘテロ型および 24 頭が TT ホモ型という結果となった。SNP の遺伝子型の効果は rs41648172 にお いて脂肪交雑育種価に対して有意な傾向を示したが(P=0.054)、皮下脂肪厚育種 価に対して有意ではなかった(P=0.952)(表 4-2)。rs41648172 においては、TT ホモ型の方が CC ホモ型よりも脂肪交雑育種価が高い傾向を示し、ヘテロ型の個 体はホモ型の個体の中間程度の脂肪交雑育種価を示した(表 4-2)。rs41648176 お よび rs41648178 においては SNP の遺伝子型の効果は脂肪交雑育種価および皮下 脂肪厚育種価の両方に対して統計的に有意ではなかった(表 4-2)。

2. 去勢肥育牛 367 頭を用いた相関解析

rs41648172の SNPの遺伝子型が脂肪交雑および皮下脂肪厚に与える影響を 確かめるため、367 頭の大分県産黒毛和種去勢肥育牛を用いて相関解析を行った。 この去勢肥育牛は rs41648172 の遺伝子型が CCホモ型のある一頭の父親に由来 する父方半きょうだい後代牛集団であった。相関解析の結果、脂肪交雑育種価に 対しては統計的に有意な差が見られたが(P=0.003)、皮下脂肪厚育種価に対して は有意な差は見られなかった(P=0.185)(表 4·3)。この rs41648172 SNP におい て、CT ヘテロの型個体の方が CCホモ型の個体より脂肪交雑育種価が統計的に有 意に高い値を示しており(表 4·3)、種雄牛 101 頭を用いた相関解析の結果と一致 した。

3.2つの相関解析の結果についての考察

2つの相関解析の結果より、第4章第1節の予備的相関解析の結果と同様に、 rs41648172において、Tアリルが高い脂肪交雑レベルと、Cアリルが低い脂肪交

雑レベルと関連しているという結果を得た。このことは母親が雌牛集団のランダ ムサンプルとみなされる去勢肥育牛を用いた解析によってより強く確証づけられ た。このような相関解析の結果より、rs41648172 が脂肪交雑のレベルに相関し ていることは明らかにされたが、rs41648172 はイントロンに存在する SNP であ ることから、脂肪交雑を引き起こす機能的な原因変異というよりはそのような未 知の原因変異と連鎖不平衡の関係にある多型であると考えられた。

皮下脂肪厚育種価に対しては、SNPの遺伝子型の効果は統計的に有意とはな らなかった。さらに、ウシ PNLIP の染色体上の位置に検出された脂肪交雑に関 わる QTL は皮下脂肪厚に対して統計的に有意な効果を示さないことが報告され ている(Takasuga ら、2007)。こうして、rs41648172 は黒毛和種牛の皮下脂肪厚 には関連していないと考えられた。このことは黒毛和種牛においては脂肪交雑と 皮下脂肪厚の間の遺伝的な相関が低いという報告に裏付けられた(Sasaki ら、 2006a)。

本研究で得られた rs41648172 についての結果より、rs41648172 は、黒毛和 種牛の脂肪交雑のレベルを上昇させるマーカーアシスト選抜に適用できるものと 考えられた。黒毛和種以外の肉用牛品種において、脂肪交雑に関連を持つ多型が 多数報告されている (Barendse, 1999; Hale ら、2000; Buchanan ら、2002; Thaller ら、 2003; Casas ら、 2004; Jiang ら、 2005; Nkrumah ら、 2005; Barendse ら、 2006, 2007; Michal ら、2006)。また、黒毛和種牛品種では EDG1、 TTN、AKIRIN2 および RPL27A 遺伝子上の SNP が脂肪交雑に関連する分子マ ーカーとして有用であることが報告されている (Yamada ら、 2008)。本研究で 得られた rs41648172 SNP はこれらの研究成果に続く黒毛和種牛における有用分

子マーカーの報告である。今後、大分県以外の分集団でも相関があるか否かのリ プリケーション解析、および脂肪交雑に対する選抜が行われてこなかったウシ品 種でのアリル頻度分布解析を行うことにより、rs41648172 SNPの黒毛和種牛集 団における脂肪交雑関連マーカーとしての有効性を検証する必要がある。

#### 第4項 要約

本研究では大分県有黒毛和種種雄牛 101 頭および半きょうだい去勢肥育牛 367 頭を用いて、脂肪交雑と PNLIP 遺伝子の SNP との相関解析を行った。その 結果、大分県有黒毛和種種雄牛 101 頭を用いた解析において、rs41648172 SNP では、TTホモ型の方が CCホモ型よりも脂肪交雑育種価が高い傾向を示し、ヘテ ロ型の個体はホモ型の個体の中間程度の脂肪交雑育種価を示した。また、去勢肥 育牛 367 頭を用いた相関解析において、rs41648172 SNP では、CT ヘテロ型の 個体の方が CCホモ型の個体より脂肪交雑育種価が統計的に有意に高い値を示し、 第4章第1節と同様に、T アリルが高い脂肪交雑レベルと関連しているという結 果を得た。以上の結果より、rs41648172 は、黒毛和種牛の脂肪交雑のレベル向 上を目指した脂肪交雑における分子マーカーとして有用であると考えられた。

			育種価	
SNP	遺伝子型	個体数	脂肪交雑	皮下脂肪厚(mm)
rs41648172	TT	30	$2.99 \pm 0.29$	$-2.73 \pm 0.94$
	СТ	56	$2.39 \pm 0.28$	$-2.99\pm0.95$
	CC	15	$2.09 \pm 0.41$	$-3.10 \pm 1.36$
rs41648176	CC	30	$2.92\pm0.43$	$-2.58 \pm 1.41$
	СТ	55	$2.46 \pm 0.38$	$-3.22 \pm 1.26$
	TT	12	$2.53 \pm 0.37$	$-4.37 \pm 1.19$
rs41648178	TT	24	$2.91\pm0.32$	$-2.08 \pm 1.03$
	СТ	56	$2.51 \pm 0.31$	$-3.16 \pm 1.02$
	CC	21	$2.09\pm0.39$	$-3.10 \pm 1.30$

表 4-2. 種雄牛 101 頭を用いた PNLIP SNP の相関解析

育種価は予測値±標準誤差で示す。

		育種価		
SNP 遺伝子型	個体数	脂肪交雑	皮下脂肪厚 (mm)	
СТ	204	$2.22^{a}\pm0.06$	$-2.14 \pm 0.24$	
CC	163	$1.95^b\pm0.07$	$-2.61 \pm 0.26$	

表 4-3. 去勢肥育牛 367 頭を用いた rs41648172 においての相関解析

育種価は予測値±標準誤差で示す。

同一列内の異なる肩文字を持つ平均値間で有意差が存在する。

#### 第5章 総括

霜降りとは筋肉組織内への脂肪蓄積、すなわち脂肪交雑により形成されるも のであり、脂肪交雑の程度の高い牛肉は高級とされており、和牛生産者の最も関 心を寄せる経済形質となっている。その形成には環境要因が影響している一方、 日本固有の黒毛和種牛については表現型に対する遺伝型分散が高いことが明らか にされている(守屋ら、1994)。そのため、脂肪交雑に関与する遺伝的要因の遺伝 子座としての同定は、それらを DNA マーカーとしたマーカーアシスト選抜を行 うことを可能にすることができ、脂肪交雑の向上を目指した選抜育種に大きく貢 献することになる。また、ウシにおいては QTL 解析のための実験家系を作製す ることおよびファインマッピング解析を行うことが困難なことから、実験動物を モデル動物として脂肪交雑に関わるゲノム領域もしくは候補遺伝子を同定し、さ らにはその遺伝学的情報を比較染色体地図上でのゲノムシフトアプローチにより ウシへ外挿する戦略が推奨されている(山田、1999)。

第2章ではII型糖尿病のモデル動物である OLETF ラットを用いて、筋肉内 脂肪量の測定法の確立および OLETF が脂肪交雑のモデル動物として有用か否か の検討を行った。筋肉内脂肪量の測定については、最長筋の中央の部位より、 180µm の間隔をあけて 3 枚以上の切片を作製し、それをオイルレッド O により 脂肪染色する、次に、脂肪染色陽性面積を切片面積で除することによって切片内 の脂肪組織の割合を求めるという組織化学的測定法が最適な測定法であると判定 した。また、肥満を呈することが知られている 10 系統の近交系ラット(ExHC、 LEA、SHC、TM、Wistar、Wistar fatty、WKAH、Zucker、Zucker fatty およ び OLETF)および正常コントロールとして F344 を用い、筋肉内脂肪量の比較を 行った結果、OLETF は F344 に比べて、高い筋肉内脂肪量を持ち、皮下脂肪量を 基準とした場合、筋肉内脂肪量が高い傾向を持つことから、OLETF は筋肉内脂 肪蓄積を遺伝的に解析するためのモデル動物として有用であることが明らかにさ れた。

第 3 章では OLETF ラットと正常ラットとしての F344 ラットを用い、それ らの間の F2 インタークロスを用いた QTL 解析を行い、筋肉内脂肪蓄積に関わる QTL の検出を行った。その結果、第1染色体上の D1Wox8 と D1Rat90 マーカー 間の 40cM の位置に 3.4 の LOD スコアを持つ suggestive level の QTL が一つ検 出され、そのQTLを Imfと命名した。また腹腔内脂肪量に関わるQTL 解析を行 ったところ、D1Rat166とD1Rat90の間の約10cMの位置に4.2のLODスコア を持つ significant level の QTL が検出された。こうして、この 10cM 領域上の QTL はあまねく体内に脂肪を蓄積させる QTL であると考えられ、この QTL のゲ ノム領域内に筋肉内脂肪量を増加させる原因遺伝子も含まれている可能性が高い と考えられた。次に、D1Rat166と D1Rat90の間の約 10cM のゲノム領域のみが OLETF 由来となっており、その他のバックグラウンドゲノム領域のすべてが F344 由来となっているコンジェニック系統(F344.OLETF-Imf 系統)を作製する ことにより Imfの効果およびその存在ゲノム領域を検討した。その結果、筋肉内 脂肪量、腹腔内脂肪量、腸間膜脂肪量、副睾丸脂肪量および皮下脂肪量において F344.OLETF-*Imf*コンジェニックは OLETF および F344 のほぼ中間値を示し、 OLETF、あるいはF344との比較で脂肪量において有意な差が見られるという結 果となった。こうして、F344.OLETF-*Imf*コンジェニックは F344 より筋肉内脂 肪量が増加していることより、D1Rat166と D1Rat90の間の約 10cM のゲノム領 域に筋肉内脂肪蓄積に関わる原因遺伝子が存在することを明らかにした。さらに、 F344.OLETF-*Imf*コンジェニックと F344 の間の F1を F344.OLETF-*Imf*コンジ ェニックに戻し交配した個体から、F344.OLETF-Imf コンジェニックにおいての OLETF ゲノム移入領域における組換え個体を選抜し、その選抜された組換え個 体の最長筋内脂肪量を調べ、ハプロタイプ解析を行うことで、筋肉内脂肪蓄積原 因遺伝子のさらなるファインマッピングを試みた。その結果、筋肉内脂肪量が高 いグループが OLETF ホモ型で、低いグループが OLETF/F344 ヘテロ型の領域を 維持しているのは *D1Rat225* と *D1Rat90* の間の約 2.3cM の領域と考えられ、*Imf* のゲノム領域は約 2.3cM にまで限局された。限局された約 2.3cM の Imfの領域 より、筋肉内脂肪蓄積原因遺伝子の位置的候補となりえる遺伝子を検索し、その 中から機能注釈情報を用いた検索および mRNA の発現量の解析を行うことで、 機能的候補となりえる遺伝子を同定することを試みた。その結果、候補遺伝子と して pancreatic lipase(*Pnlip*)を選出した。*Pnlip* はトリグリセリドから脂肪酸へ の加水分解を引き起こし、腸管からの脂肪吸収に関与していることから、機能的 な候補と考えられた。また、マクロアレイ解析および Competitive PCR 解析によ り、膵において Pnlip が F344 に比べて OLETF および F344.OLETF-Imfコンジ ェニックで高い発現パターンを持つこと、さらに OLETF アリルが相加的に Pnlip 発現量を増加させていることが示された。さらに、その位置的機能的候補的遺伝 子が原因遺伝子として有力であるか否かを検討するため、最初に、候補遺伝子の ダイレクトシーケンスを行い、OLETFと F344の間での多型を検出した。その結 果、5'-フランキング領域において、Pnlipの転写開始点の上流の 2698bp から

5517bp の間の位置に約 38-bp コア配列のリピートというミニサテライト(約 2.8kb のゲノム長)が存在することが判明した。そのミニサテライトの PCR 産物 は F344 では約 2.8kb の長さを持っていたが、OLETF および F344.OLETF-*Imf* コンジェニックでは約 3.0kb の長さを有しており、VNTR 多型が存在し OLETF アリルは F344 アリルに比べて長いアリルであることが明らかにされた。得られ た多型が *Imf*と共分離するか否かについて検討したところ、*Imf*と VNTR 多型は 完全に共分離することが明らかにされた。以上の結果より、*Pnlip* は原因遺伝子 として、検出された VNTR 多型は原因変異として有望であると考えられた。

第4章では第3章までで得られたラットにおける遺伝情報をウシへ外挿する ことにより、PNLIP遺伝子がウシ脂肪交雑形質に関連する遺伝子であるか否かに ついて検討することとした。まず、ウシにおける PNLIP 遺伝子の検索を行い、 ラットで得られたミニサテライトがウシの PNLIP プロモーター領域でも存在す るかについての確認を行った。その結果、ウシではミニサテライトは存在しない ことが明らかにされた。次にウシ PNLIPについて SNP の検索を行い、検索によ り得られた SNP と脂肪交雑との予備的相関解析を、脂肪交雑が極めて高い黒毛 和種種雄牛群と、その能力が極めて低い黒毛和種種雄牛群との間のアリル頻度分 布の比較により行った。その結果、PNLIP遺伝子のイントロン 6、イントロン 6、 イントロン 6、イントロン 6、エクソン 7、イントロン 7 およびイントロン 12 領 域に存在する rs41648171、rs41648172、rs41648173、rs41648174、rs41648176、 rs41648178 および rs42104801 において、それぞれ *C、T、T、C、C、T* および *T* アリルが脂肪交雑のレベルを上昇させているのではないかと考えられた。また、 脂肪交雑に関する選抜が行われてきた黒毛和種牛品種とそのような選抜が行われ

てこなかったホルスタイン種牛品種との間のアリル頻度分布の比較を行った。そ の結果、rs41648172 において Tアリル、rs41648176 において Cアリルおよび rs41648178 において Tアリルが黒毛和種牛品種において高い頻度を持つことが 明らかにされた。また、大分県有黒毛和種種雄牛 101 頭および半きょうだい去勢 肥育牛 367 頭を用いて、脂肪交雑と PNLIPSNP との相関解析を行った。その結 果、大分県有黒毛和種種雄牛 101 頭を用いた解析において、rs41648172 SNP で は、TTホモ型の方が CCホモ型よりも脂肪交雑育種価が高い傾向を示し、ヘテロ 型の個体はホモ型の個体の中間程度の脂肪交雑育種価を示した。また、去勢肥育 牛 367 頭を用いた相関解析において、rs41648172 SNP では、CT ヘテロ型の個 体の方が CCホモ型の個体より脂肪交雑育種価が統計的に有意に高い値を示し、 T アリルが高い脂肪交雑レベルと関連しているという結果を得た。

以上の結果より、rs41648172 は、黒毛和種牛における脂肪交雑に関連する 分子マーカーとして有用であることが示され、当該品種の脂肪交雑のレベルを上 昇させるマーカーアシスト選抜に適用できるものと考えられた。

## 謝 辞

本研究を取りまとめるにあたり、懇切な指導とご校閲を賜った新潟大学農学 部 山田宜永教授に対し甚大なる謝意を捧げるとともに、ご校閲いただいた新潟 大学農学部 新村末雄教授、高田良三教授、中野優准教授、杉山稔恵准教授に心 から感謝の意を申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり、ご指導とご協力を頂いた佐々木義之先生に厚 く御礼を申し上げます。

# 引用文献

- Barendse W, Assessing lipid metabolism. International patent application PCT/AU98/00882. international patent publication WO 99/23248, 1999
- Barendse W, Bunch RJ, Harrison BE, Thomas MB, The growth hormone 1 GH1:c.457C>G mutation is associated with intramuscular and rump fat distribution in a large sample of Australian feedlot cattle. Anim. Genet., 37:211-214, 2006
- Barendse W, Bunch RJ, Kijas JW, Thomas MB. The effect of genetic variation of the retinoic acid receptor-related orphan receptor C gene on fatness in cattle. Genetics, 175:843-53, 2007, Epub 2006 Dec 6.
- Boylston TD, Morgan SA, Johnson KA, Busboom JR, Jr Wright RW and Reeves JJ, Lipid content and composition of Wagyu and domestic breeds of beef. J. Agric. Food Chem., 43: 1202-1207, 1995
- Buchanan FC, Fitzsimmons CJ, Van Kessel AG, Thue TD, Winkelman-Sim DC, Schmutz SM, Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. Genet. Sel. Evol., 34:105-16, 2002
- Busboom, JR, Jeremiah LE, Gibson LL, Johnson KA, Gaskins CT, Reeves JJ and Jr Wright RW, Effects of biological source on cooking and palatability attributes of beef produced for the Japanese market. Meat Sci., 35: 241-258, 1993

- Casas E, Lunstra DD, Stone RT, Quantitative trait loci for male reproductive traits in beef cattle. Anim. Genet., 35:451-453, 2004
- De Koning DJ, Janss LLG, Rattink AP, Van Obers PAM, De Vries BJ, Groenen MAM, Van Der Poel JJ, De Groot PN, Brescamp EW and Van Arendonk JAM, Detection of quantitative tarit locifor backfat thickness and intramusculer fat content in pigs. Genetics, 152: 1679-1690, 1999
- Dietrich WF, Miller JC, Steen RG, Merchant M, Damron D, Nahf R, Gross A, Joyce DC, Wessel M, Dredge RD, et al. A genetic map of the mouse with 4,006 simple sequence length polymorphisms. Nat. Genet., 7: 220-45, 1994
- Hale CS, Herring WO, Shibuya H, Lucy MC, Lubahn DB, Keisler DH, Johnson GS, Decreased growth in angus steers with a short TG-microsatellite allele in the P1 promoter of the growth hormone receptor gene. J. Anim. Sci., 78:2099-2104, 2000
- Hill JO, Hauptman J, Anderson JW, Fujioka K, O'Neil PM, Smith DK,
  Zavoral JH, Aronne LJ, Orlistat, a lipase inhibitor, for weight
  maintenance after conventional dieting: a 1-y study. Am. J. Clin. Nutr.,
  69: 1108-16, 1999
- Janss LLG, Van Arendonk JAM and Brescamp EW Baysian statistical analyses for presence of single genes affecting meat quality traits in crossed pig population. Genetics, 136: 395-408, 1997

- Jiang Z, Kunej T, Michal JJ, Gaskins CT, Reeves JJ, Busboom JR, Dovc P, Wright RW Jr, Significant associations of the mitochondrial transcription factor A promoter polymorphisms with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F2 crosses. Biochem. Biophys. Res. Commun., 334:516-523, 2005
- Kanemoto N, Hishigaki H, Miyakita A, Oga K, Okuno S, Tsuji A, Takagi T, Takahashi E, Nakamura Y, Watanabe TK, Genetic dissection of "OLETF", a rat model for non-insulin-dependent diabetes mellitus. Mammalian Genome, 9: 419-425, 1998
- Kawano K, Hirashima T, Mor S, Kurosumi M, Saitoh Y, A new rat strain with non-insulin-dependent diabetes mellitus ,"OLETF". Rat News Lett., 25: 24-29, 1991
- Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M. et al, Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetes complications, Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty(OLETF)strain. Diabetes, 41: 1422-1428, 1992
  Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newberg LA, MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics, 1: 174-81, 1987

- Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Muller CR, Hamer DH, Murphy DL, Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. Science, 274: 1527-31, 1996
- Matsuishi M, Fujimori M and Okitani A, Wagyu beef aroma in Wagyu (Japanese Black cattle) beef preferred by the Japanese over imported beef. Anim. Sci. J., 72: 498-504, 2001
- 松本耕三、山田宜永, Speed congenic と complex disease-多因子疾患遺伝子の新しい解析法. Molecular Medicine, 35: 394-399, 1998
- Michal JJ, Zhang ZW, Gaskins CT, Jiang Z, The bovine fatty acid binding protein 4 gene is significantly associated with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F2 crosses. Anim. Genet., 37:400-402, 2006
- Miyake T, Moriya K and Sasaki Y, Influence of initial values on estimates by mixed inheritance model with Gibbs sampling, J. Anim. Breed. Genet., 116: 39-46, 1999
- Moralejo DH, Wei S, Wei K, Weksler-Zangen S, Koike G et al. Identification of quantitative trait loci for non-insulin-dependent diabetes mellitus that interact with body weight in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat. Proc. Assoc. Am. Physicians, 110: 545-558, 1998
- 守屋和幸・道後泰治・佐々木義之:黒毛和種の基礎集団並びに現集団における屠 肉性に関する遺伝率の REML 推定. 日畜会報 65:720-725,1994

- Nkrumah JD, Li C, Yu J, Hansen C, Keisler DH, Moore SS, Polymorphisms in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behavior, and measures of carcass merit. J. Anim. Sci., 83:20-8, 2005
- Ogino T, Wei S, Wei K, Moralejo DH, Kose H, Mizuno A, Shima K, Sasaki Y, Yamada T, and Matsumoto K, Genetics evidence for obesity loci involved in the regulation of body fat distribution in obese type 2 diabetes rat, OLETF. Genomics, 70: 19-25, 2000
- Okauchi N, Mizuno A, Yoshimoto S, Zhu M, Sano Y, Is caloric restriction effective in preventing diabetes mellitus in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat, a model of spontaneous non-insulin-dependent diabetes mellitus? Diabetes Res. Clin. Pract., 27: 97-106. 1995a
- Okauchi N, Mizuno A, Zhu M, Ishida K, Sato T,Noma Y and Shima K, Fffects of obesity and inheritance on the development of non-insulin-dependent diabetes mellitus in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. Diabetes Res. Clin. Pract., 29: 1-10, 1995b
- Okuno S, Watanabe TK, Ono T, Oga K, Mizoguchi-Miyakita A, Yamasaki Y, Goto Y, Shinomiya H, Momota H, Miyao H, Hayashi I, Asai T, Suzuki M, Harada Y, Hishigaki H, Wakitani S, Takagi T, Nakamura Y, Tanigami A, Effects of Dmo1 on obesity, dyslipidaemia and hyperglycaemia in the Otsuka Long Evans Tokushima Fatty strain. Genet. Res., 77: 183-190, 2001

- Pugliese A, Zeller M, Fernandez A Jr, Zalcberg LJ, Bartlett RJ, Ricordi C, Pietropaolo M, Eisenbarth GS, Bennett ST, Patel DD, The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. Nat. Genet., 15: 293-297, 1997
- Sasaki Y, Miyake T, Gaillard C, Oguni T, Matsumoto M, Ito M, Kurahara T, Sasae Y, Fujinaka K, Ohtagaki S and Dougo T, Comparison of genetic gains per year for carcass traits among breeding programs in the Japanese Brown and the Japanese Black cattle. J. Anim. Sci., 84: 317-323, 2006a
- Sasaki Y, Yamada T and Miyake T, Quantitative and molecular genetic approaches for the improvement of carcass traits in the Wagyu cattle. In: 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, MinasCentro Convention Center, Belo Horizonte, MG, Brazil, pp: 13-01, 2006b
- Shikamoto Y, Morita T, Expression of factor X in both the rat brain and cells of the central nervous system. FEBS Lett., 463: 387-389, 1999
- Sjostrom L, Rissanen A, Andersen T, Boldrin M, Golay A, Koppeschaar HP, Krempf M, Randomised placebo-controlled trial of orlistat for weight loss and prevention of weight regain in obese patients. European Multicentre Orlistat Study Group. Lancet., 352: 167-72, 1998

- Sugiura K, Miyake T, Taniguchi Y, Yamada T, Moralejo DH, Wei S, Sasaki Y, Matsumoto K, Identification of non-insulin-dependent diabetes mellitus susceptibility loci in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat by MQM-mapping method. Mammalian Genome, 10: 1126-1131, 1999
- Takasuga, A, Watanabe T, Mizoguchi Y, Hirano T, Ihara N, Takano A, Yokouchi K. Fujikawa A, Chiba K, Kobayashi N, Tatsuda K, Oe T, Furukawa-Kuroiwa M, Nishimura-Abe A, Fujita T, Inoue K, Mizoshita A, Ogino K and Sugimoto Y, Identification of bovine QTL for growth and carcass traits in Japanese Black cattle by replication and identical-by-descent mapping. Mammalian Genome, 18: 125-136, 2007 Thaller G, Kuhn C, Winter A, Ewald G, Bellmann O, Wegner J, Zuhlke H, Fries R, DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. Anim. Genet., 34:354-357, 2003 Vafiadis P, Bennett ST, Todd JA, Nadeau J, Grabs R, Goodyer CG,
- Wickramasinghe S, Colle E, Polychronakos C, Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. Nat. Genet., 15: 289-292, 1997
- Wei S, Wei K, Moralejo DH, Yamada T, Izumi K and Matsumoto K, An integrated genetic map of the rat with 562 makers from different sources. Mammalian Genome, 9: 1002-1007, 1998

Wei S, Wei K, Moralejo DH, Ogino T, Koike G, Jacob HJ, Sugiura K, Sasaki Y, Yamada T, Matsumoto K, Mapping and characterization of quantitative trait loci for non-insulin-dependent diabetes mellitus with an improved genetic map in the Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat. Mammalian Genome, 10: 249-258, 1999

山田宣永,モデル動物を利用した脂肪交雑原因遺伝子座の同定,文部省科学研究費 基盤研究(C)企画調査「有用動物資源の創出と伴有」第3回企画調査会議試料 1999

Yamada T, Itoh M, Nishimura S, Taniguchi Y, Miyake T, Sasaki S, Yoshioka S,
Fujita T, Shiga K, Morita M, Sasaki Y, Association of single nucleotide
polymorphisms in the endothelial differentiation sphingolipid
G-protein-coupled receptor 1 gene with marbling in Japanese Black beef
cattle. Anim. Genet., 40:209-216, 2009, Epub 2008 Dec 30.

## SUMMARY

Marbling characterized by the amount and distribution of intramuscular fat in a cross section of musculus longissimus muscle is one of the economically important traits of beef cattle (JMGA, 1988). High levels of marbling improve the palatability and acceptability of beef by affecting the taste and tenderness of the meat (Busboom *et al.*, 1993; Boylston *et al.*, 1995; Matsuishi *et al.*, 2001). Thus, there is great interest in gaining a better knowledge on the molecular architecture of marbling and in generating new opportunities for more effective marker-assisted selection. I applied the integrative approach combining mapping and expression profiling data to our marbling study using a rat model, Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat, and Japanese Black beef cattle.

In 2nd Chapter, I have established a method for measuring intramuscular fat accumulation. The method is that three or more sections(6 µm thick) are collected at intervals of 180 µm from the site of the center of frozen Musculus longissimus, and they are stained with Oil Red O to detect the presence of lipid droplets in adipocyte cytoplasm, and the section area, occupied by cells positive for Oil Red O staining, are measured in a given area (1 cm<sup>2</sup>). Further, I compared the amount of intramuscular fat by using F344 and 10 inbred rat (ExHC, LEA, SHC, TM, Wistea, Wistar fatty, WKAH, Zucker, Zucker fatty and OLETF). As a result, OLETF was found to be useful as an animal model of intramuscular fat accumulation.

In 3rd Chapter, I reported that a genomic region between D1Wox8 and *D1Rat90* on chromosome 1 influences intramuscular fat content, with the OLETF allele acting on an increase in fat content, by QTL analysis using F<sub>2</sub> progenies derived from the OLETF and F344 rats. Further, I demonstrated that the QTL on chromosome 1 responsible for intramuscular fat content is located in the  $\sim 10$ -cM genomic region between D1Rat166 and D1Rat90, using a congenic strain trapping the OLETF allele of the ~10-cM region on the F344 genetic background in a monogenic context. The QTL region was refined to the ~2.3-cM genomic region, using informative recombinants. Among 46 genes located within the ~2.3-cM region, pancreatic lipase gene involved in intestinal absorption of long-chain triglyceride fatty acids was selected as positional functional candidate for the intramuscular fat QTL, by utilizing gene expression profiling data of the located genes. The OLETF allele at pancreatic lipase(Pnlip) was found to possess higher mRNA level and longer size in variable number of tandem repeat within the 5'-flanking region than normal alleles. Further, the intramuscular fat accumulation QTL was shown to completely cosegregate with the variable number of tandem repeat at *Pnlip*, in the informative recombinants. These results suggested that *Pnlip* gene is possible candidate for the intramuscular fat accumulation QTL.

In 4th Chapter, I analyzed association of the single nucleotide

polymorphisms (SNPs) in the bovine *PNLIP* with marbling in Japanese Black beef cattle. I investigated the allele frequency distribution of the single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the PNLIP in high-marbled and low-marbled cattle. The frequencies of the rs41648171 C, rs41648172 T, rs41648173 T, rs41648174 C, rs41648176 C, rs41648178 T and rs42104801 T alleles were higher in Japanese Black sires with extremely high predicted breeding value for marbling than in the sires with extremely low one. Further, as compared to the frequencies of the rs41648172 T, rs41648176 C and rs41648178 T alleles in Japanese Black cattle that has been subjected to a strong selection for high marbling, those in Holstein cattle that has not been selected for high marbling were lower. Further, I showed that SNPs in the bovine *PNLIP* were associated with the predicted breeding value for beef marbling standard number by analyses using a population of Japanese Black beef cattle. I performed two experiments for the association study. I used 101 Japanese Black sires in experiment 1. In experiment 2, 367 paternal half-sib Japanese Black progeny steers produced from a sire homozygous for the SNP in the PNLIP, with dams considered to represent a random sample of the female population, were used. In experience 1, the predicted breeding value for beef marbling standard number was higher in the TT homozygotes at the rs41648172 SNP than in the CC homozygotes at the SNP, and that of the heterozygotes intermediate between those of the two homozygotes. In experience 2, the predicted breeding value for beef marbling standard number

was significantly higher in the CT heterozygotes at the rs41648172 SNP than in the CC homozygotes at the SNP.

My findings suggest that PNLIP SNPs may be useful for effective marker-assisted selection to increase the levels of marbling in Japanese Black beef cattle.