

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏 名 田之村 秀樹
 学 位 博 士 (農 学)
 学 位 記 番 号 新大院博 (農) 第 133 号
 学位授与の日付 平成 26 年 3 月 24 日
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
 博 士 論 文 名 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

論文審査委員 主査 教授・山田 宜永
 副査 教授・新村 末雄
 副査 教授・高田 良三
 副査 准教授・中野 優
 副査 准教授・杉山 稔恵

博士論文の要旨

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。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可能にすることに貢献できる。現在、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であることから、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。

本論文では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であるか否かの検討を行った。筋肉内脂肪量の測定については、オイルレッド O による脂肪染色および切片内の脂肪染色陽性面積の割合を求めるという組織化学的測定法が最適であると判定した。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および正常コントロールとして F344 を用いて筋肉内脂肪量の比較を行い、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を明らかにした。

次に、OLETF ラットと正常ラットとしての F344 ラット、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。さらに、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、F344 との比較で有意な差が見られた。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ける OLETF ゲノム移行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肉脂肪量を調べ、ハプロタイプ解析を行うことで、Imf のゲノム領域を約 2.3cM にまで限局した。限局された Imf の領域より、筋肉内脂肪蓄積原因遺伝子の位置のおよび機能的候補となりえる遺伝子を探索したところ、候補遺伝子として pancreatic lipase(Pnlip)を選出した。候補遺伝子である Pnlip のダイレクトシーケンスを行ったところ、5' -フランキンク領域において、OLETF と F344 間で VNTR 多型の存在するミニサテライトを検出した。得られた多型と Imf は完全に共分離していた。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。

引き続き、これまでに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を試みた。ラットで得られたミニサテライトはウシの PNLIP プロモーター領域には存在しなかったため、SNP の検索を行い、検索された 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雄牛群と、その能力が極めて低い黒毛和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、いくつかの SNP において特定の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。さらに、黒毛和種とホルスタイン種との間のアリル頻度分布の比較を行った結果、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 SNP との相関解析を行った結果、大分県有黒毛和種雄牛 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。去勢肥育牛 367 頭を用いた相関解析においても、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。

審査結果の要旨

本研究は、II 型糖尿病のモデル動物である OLETF が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を明らかにした。また、OLETF を用いたゲノム解析により、Pnlip 遺伝子は筋肉内脂肪蓄積に関与する原因遺伝子として、VNTR 多型は原因変異として有望であることが示唆された。さらに、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で、PNLIP 遺伝子上の SNP 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を明らかにした。これらの研究成果は、脂肪交雑に関わる分子機構を解明するための重要な学術的知見であるとともに、選抜育種に応用することによって畜産業界の課題克服に貢献するものと考えられる。

本研究の内容は、いずれもレフリーシステムの確立された学術雑誌に 8 件掲載されており、学術的価値が非常に高いと評価された。

よって、本論文は博士（農学）の博士論文として十分であると認定した。