

学 位 論 文 要 旨

氏 名	村田 修治郎
題 目	ニホンウズラにおける脂質代謝の遺伝的制御に関する研究 (Genetic Studies on Lipid Metabolism Regulations of Japanese Quail(<i>Coturnix japonica</i>))

本研究はニホンウズラを用いて、腹腔内脂肪の蓄積に関連する遺伝的制御機構の解明を試みたものである。脂質代謝において、生体内に蓄積された脂肪をエネルギーとして利用する α 型ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (peroxisome proliferator-activated receptor: *PPAR α*) および脱共役タンパク質 (avian uncoupling protein: *avUCP*) の遺伝子に着目し、それらの遺伝子発現や一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) と腹腔内脂肪率の関連を解析した。

1. ニホンウズラ *PPAR α* 遺伝子の cDNA の塩基配列を決定し、全長が 1407bp であることを確認した。その遺伝子発現の局在性を調べたところ、心臓で最も高い発現を認めたが、多くの臓器での発現が観察された。浅胸筋での遺伝子発現と、腹腔内脂肪率には高い負の相関が存在していた。また、5'非翻訳領域の g.-10C>T 変異において CC の遺伝子型を持つものは遺伝子発現が有意に高く、かつ腹腔内脂肪率が少ない傾向がみられた。
2. ニホンウズラ *avUCP* の塩基配列決定を行なったところ、イントロンを含む全長は 2163bp であった。遺伝子発現は多くの臓器で確認され、浅胸筋で最も高い発現がみられた。また、筋の部位による遺伝子発現量の比較では浅胸筋(赤筋)が大腿筋(白筋)より高い値を示した。浅胸筋における *avUCP* 遺伝子発現量と腹腔内脂肪率には高い負の相関が存在していた。*avUCP* 遺伝子中の SNP において、3箇所ハプロタイプブロックの存在が推定され、g.-32T>A および g.-21T>C で構成されるハプロタイプ AT を持つものは、遺伝子発現量が高く、腹腔内脂肪率が低く、かつ体重が軽い傾向がみられた。また、開始コドンから、2304bp 上流には *PPAR α* 結合配列が存在していた。
3. 腹腔内脂肪率、体重、*PPAR α* および *avUCP* 遺伝子発現量の関連について多変量解析を行ったところ、*avUCP* と腹腔内脂肪率は固有ベクトルが正反対の関係にあり、*PPAR α* よりも腹腔内脂肪率と強い関連を持っている可能性が示唆された。
4. g.-32T>A および g.-21T>C 変異の分布をニホンウズラの4集団で調べたところ、実験系の集団では遺伝子頻度の偏りがみられた。またニワトリにおける *avUCP* の g.1270C>T および g.1316T>C の分布を調べたところ、アジア在来鶏は多様性に富んでおり、改良種は遺伝子型が偏る傾向が確認できた。

本研究の結果より、ニホンウズラの腹腔内脂肪蓄積は *avUCP* および *PPAR α* の遺伝子発現や、特定の SNP もしくはハプロタイプにより制御を受けていることが明らかとなった。これらの結果は、家禽における脂肪蓄積の遺伝的制御の可能性を示唆するものである。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Shujiro Murata ✓
題 目	Genetic Studies on Lipid Metabolism Regulations of Japanese Quail (<i>Coturnix japonica</i>) (ニホンウズラにおける脂質代謝の遺伝的制御に関する研究)

The aim of the present study was to clarify the genetic control of abdominal fat accumulation of poultry using Japanese quail, *Coturnix japonica*. Two related genes which code peroxisome proliferator-activated receptor (*PPARα*) and avian uncoupling protein (*avUCP*) were analyzed. Relationships among abdominal fat amount, gene expression and single nucleotide polymorphisms (SNPs) were clarified.

1. Japanese quail *PPARα* was sequenced, and the length of translated region was 1407bp. *PPARα* gene expression was detected in various organs, and the highest expression level was observed in heart muscle. High negative correlation coefficient was observed between *PPARα* gene expression and abdominal fat percentage. Quail with CC genotype on g.-10C>T at 5' untranslated region indicated high *PPARα* gene expression level and low abdominal fat amount.
2. Japanese quail *avUCP* was sequenced, and it's total length was 2163bp. *avUCP* gene expression was confirmed in various organ, and the highest expression level was observed in Pectorails major. Pectorails major showed higher *avUCP* expression level than Biceps femoris. High negative correlation coefficient was observed between abdominal fat amount and *avUCP* gene expression. Three haplotype blocks were reconstructed in *avUCP* gene, and a haplotype with g.-32T>A and g.-21T>C were strongly related to low abdominal fat, low body weight and high *avUCP* gene expression level. *PPARα* binding site was detected 2304bp up the stream from the start codon of *avUCP* gene.
3. The principal component analysis among abdominal fat, body weight and both of *avUCP* and *PPARα* gene expressions were analyzed. From the eigenvectors, both *avUCP* and *PPARα* have almost opposite relationship to abdominal fat content. Gene expression of *avUCP* was more related to abdominal fat content than that of *PPARα*.
4. Genetic variation of 2 SNPs g.-32T>A and g.-21T>C, of *avUCP* was investigated among 4 quail populations, 3 commercial populations for egg production and 1 experimental selected line. Although three commercial populations had all alleles uniformly, experimental quail strain was high A allele frequency at g.-32T>A locus. Distribution of the g.1270C>T and g.1316T>C SNPs of *avUCP* was investigated in various chicken populations. Asian native chicken populations had various allele frequencies, and improved chicken indicate tendency to have specific genotypes.

The present study is suggested that modulation of *PPARα* and *avUCP* gene expression, and SNPs or haplotypes affect to accumulation of abdominal fat of Japanese quail. These results suggested the possibility of genetic controls of fat accumulation in poultry.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	村田 修治郎
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 岡本 新
	副査 鹿児島 大学 教授 侯 徳興
	副査 琉 球 大学 教授 川本 康博
	副査 佐 賀 大学 教授 和田 康彦
	副査 鹿児島 大学 准教授 下桐 猛
審査協力者	
題 目	ニホンウズラにおける脂質代謝の遺伝的制御に関する研究 (Genetic Studies on Lipid Metabolism Regulations of Japanese Quail (<i>Coturnix japonica</i>))

動物の脂質代謝制御は、生体内への脂質の取り込み、コレステロール等の脂質合成および蓄積された脂質の分解・利用から構成されている。しかしながら、それらの代謝制御の変化について、家禽を含めた鳥類での実態はほとんど明らかにされていないのが現状である。そこで、本研究では脂質の分解および利用に関わると考えられている α 型ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (peroxisome proliferator-activated receptor: PPAR α) および鳥類の脱共役タンパク質 (avian uncoupling protein: avUCP) に焦点を当て、ニホンウズラを用いて、遺伝子の発現量と腹腔内脂肪率の関係について分子遺伝学的観点から解析を行った。

結果の概要は以下のとおりである。

ニホンウズラ PPAR α 遺伝子の塩基配列を決定し、その遺伝子発現量の臓器局在性を比較したところ、心臓、肝臓および浅胸筋において高い遺伝子発現量を確認した。浅胸筋における PPAR α 遺伝子発現量と腹腔内脂肪率の間には高い負の相関が明らかにされた。また、5'非翻訳領域の g.-10C>T 変異において CC の遺伝子型を持つものは遺伝子発現量が高く、体重が少なく、かつ腹腔内脂肪率が低い傾向

を示すことが確認された。

ニホンウズラ *avUCP* 遺伝子の塩基配列を決定し、その遺伝子発現量の臓器局在性を比較したところ、骨格筋において特に高い発現量を確認した。また、*avUCP* 遺伝子発現量は筋肉のタイプによって異なっており、赤筋である浅胸筋では白筋である大腿筋よりも遺伝子発現量が高いことが明らかとなった。浅胸筋における遺伝子発現量は腹腔内脂肪率との間に高い負の相関が確認された。*avUCP* 遺伝子中の 55 箇所の一塩基多型(SNP)には 3 箇所のハプロタイプブロックの存在が推定され、5'非翻訳領域における g.-32T>A および g.-21T>C で構成されるハプロタイプ A-T を持つものは、遺伝子発現量が高く、体重が低く、かつ腹腔内脂肪率が低い傾向がみられた。また、本遺伝子の開始コドンから 2304bp 上流には *PPARα* 応答配列が存在していることを確認した。

体重および腹腔内脂肪率と *PPARα* および *avUCP* 遺伝子発現量の関連について相関分析を行った結果、*PPARα* 遺伝子発現量と体重の相関は極めて低かった。*avUCP* 遺伝子発現量と体重の間には低い負の相関がみられた。*PPARα* および *avUCP* 遺伝子発現量と腹腔内脂肪率には高い負の相関係数が認められた。また、その傾向は *avUCP* において強く、同遺伝子が腹腔内脂肪蓄積に対して *PPARα* より大きな影響を及ぼしていることが示唆された。さらに主成分分析を行ったところ、それらを支持する結果が得られた。

avUCP の g.-32T>A および g.-21T>C の変異性をニホンウズラの産卵用 3 集団および実験系統 1 集団で調べたところ、全ての集団にこれらの変異が存在していることを確認した。産卵用ウズラ集団には多くの変異が分布していたが、実験系の集団では特定のアレルに偏る傾向が認められた。また、ニワトリにおける *avUCP* の g.1270C>T および g.1316T>C の分布を調べたところ、アジア在来鶏は多様性に富んでいるとともに、改良種は特定の遺伝子型に偏る傾向が明らかとなった。

以上の結果から、*PPARα* および *avUCP* 遺伝子はニホンウズラにおいて脂質代謝制御に大きく関わっており、腹腔内への脂肪の蓄積は遺伝子発現レベルにおいて制御されていることが明らかとなった。また、両遺伝子とも SNP によってその発現量が左右されていることも明らかにした。本研究の結果は、家禽のみならず肉用家畜の産肉性について、分子遺伝学的レベルからの育種情報を提供するものである。また、量的形質における遺伝変異の発現制御の仕組みを分子レベルから解明できる可能性を示唆するものであり、学位論文として十分価値があるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	村田 修治郎
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 岡本 新
	副査 鹿児島 大学 教授 侯 徳興
	副査 琉球 大学 教授 川本 康博
	副査 佐賀 大学 教授 和田 康彦
	副査 鹿児島 大学 准教授 下桐 猛
審査協力者	
実施年月日	平成 25 年 1 月 12 日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査および副査は、平成25年1月12日の公開審査会において学位申請者に対して学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者
氏 名

村田 修治郎

[質問 1] この研究では 2 つの遺伝子の塩基配列を決定していますが、プライマーはどのようにして設計しましたか。

[回答 1] まず、どちらの遺伝子もジーンバンクには塩基配列は登録されていなかったため、ニワトリの配列を参照して設計しました。*PPAR α* はイントロンを含めた全長が約 31 kb と長いので全長の決定は困難であると考え、cDNA の配列から翻訳領域の大部分を決定して、5' および 3' に近い部分はゲノム DNA をテンプレートとしてダイレクトシーケンシング法で配列を決定しました。*avUCP* についてはニワトリでは全長が約 2300 bp なのでゲノム DNA をテンプレートとしてイントロンも含め、全長を決定しました。上手く増えなかった場合、多少位置をずらしてプライマーの再設計をするなどの工夫をしました。

[質問 2] 今回、腹腔内脂肪組織重量との関連を提示していますが、内臓脂肪量を反映するような体脂肪率といったものとの関連については検討していないのでしょうか。

[回答 2] 体脂肪率については、犬用の体脂肪計の応用を試みてみましたがニホンウズラは小さすぎるためうまく測定ができませんでした。したがって本研究では内蔵に蓄積するタイプの脂肪については検討できていません。

[質問 3] 在来鶏や改良鶏の遺伝子多型について調べていますが、形質との関連については調べることができなかったのでしょうか。

[回答 3] 調べたニワトリに関して、血液サンプルはあったのですが体重のデータは無く、また腹腔内脂肪量は解剖しないと調べられないため今回は遺伝子型と形質の関連については検討できませんでした。非常に興味深いので、今後サンプリングのチャンスに恵まれれば是非調べてみたいと考えます。

[質問 4] ウシのマーブリングは筋肉内への脂肪の蓄積ですが、ニホンウズラなど、鳥類では腹腔内と筋肉内では脂肪の蓄積のメカニズムは異なっているのでしょうか。

[回答4] 鳥類では腹腔内以外では、筋肉内ではなく主に筋肉間に脂肪が蓄積します。それらの脂肪の蓄積に関して本研究では比較を行なっていませんが、増体よりも食味の向上に重きを置いている全国各地の銘柄鶏の中には筋肉間へ多くの脂肪を蓄積させようという試みをしているものもあり、このような改良を行うと腹腔内への脂肪の蓄積も進むといわれています。本研究は脂肪の低減に着目していますが、脂肪の蓄積を進めたいという場合、腹腔内脂肪蓄積を低減させることが示された遺伝子変異を持つ個体を除いて選抜することにより、それが可能になるかもしれません。

[質問5] 今回は雄のみを使用していますが、雌を使わなかったのはなぜでしょうか。

[回答5] 雌の場合、脂肪の蓄積量が産卵の影響を受けている可能性があると考え、なるべく均一な条件での脂肪蓄積について検討を行うために雄のみを使用しました。

[質問6] 鳥類には哺乳類UCP3の類似配列のみで、他の分子種は存在していないのでしょうか。偽遺伝子のようなものも見つかっていないのでしょうか。

[回答6] *avUCP1*には現在他の分子種の存在は報告されていません。ジーンバンクにはUCP3として登録されています。偽遺伝子についても報告がありません。哺乳類ではUCP2とUCP3は隣り合って存在していますが鳥類では*avUCP1*が単独で存在しており、近くに似た配列も存在していません。

[質問7] ヒトではPPARおよびUCPともにそれらを活性化する薬剤や健康食品が検討されているかと思いますが家畜においてはいかがでしょうか。

[回答7] ヒトではPPAR α およびPPAR γ ともにその作動薬が薬剤として承認され、使用されています。UCPについても β 受容体刺激薬の投与により活性化させる試みがなされています。家畜ではそのような検討がなされていませんが、そのような薬剤の家畜における効果が明らかになれば応用することは可能であると思います。

[質問8] 今回調べた遺伝子はどちらも発現量が高くなることによって脂質の代謝が亢進して脂肪の蓄積を抑えると考えて良いということですね。

[回答8] 実験の結果から、ニホンウズラではどちらの遺伝子も発現が高くなると脂肪の蓄積量が少なくなることから脂質代謝は亢進するものと考えられます。