

但馬系黒毛和種，高知系褐毛和種および見島牛における PPAR 2 変異個体の家系調査

相川勝弘・太田垣進*・谷本保幸**・中西直人***・柴田昌宏・松本和典

Key words : PPAR 2, Japanese Black cattle, Japanese Brown cattle, Mishima cattle, variants of the PPAR

| 目 次 | |
|----------------|----|
| 緒 言 | 85 |
| 材料および方法 | 86 |
| 1 供 試 牛 | 86 |
| 2 DNAの調製 | 86 |
| 3 変異体の検出 | 86 |
| 結果および考察 | 86 |
| 摘 要 | 88 |
| 謝 辞 | 88 |
| 引用文献 | 88 |
| Summary | 90 |

緒 言

近年，脂肪細胞の分化過程に関する分子レベルでの研究が進展し，その過程で多くの遺伝子の関与が示されている¹⁾．なかでも，脂肪細胞分化の主要な調節因子であるPPAR は転写因子として機能し，脂肪細胞の分化を強く促進することが報告されている^{11) 13) 14)}．PPAR 遺伝子の変異に関しては，肥満と糖尿病との関連からヒトで研究が進められ，変異部位，変異個体の分布および生理的特徴等について多くの報告がある^{3) 4) 6) 7) 10) 15)}．特に，PPAR 遺伝子産物の1つであるPPAR 2のアミノ酸置換に関しては，Pro12Alaの存在がヒトで知られており，表現型としてbody mass index (BMI) が減少し，インシュリン感受性と血中HDLコレステロール濃度が高まる場合⁴⁾とBMIが増加を示す場合^{3) 15)}が報告されている．さらに，Pro12Ala置換はPPAR

2の転写因子としての機能を抑制することが報告され⁴⁾，この結果はBMIの減少を伴う痩せ傾向と良く一致している．一方，ウシのPPAR 2については，著者らがアミノ酸置換 (Ala18Val) を伴うヘテロ型変異体 (Ala/Val型) の存在を黒毛和種で示し¹⁾，Ala/Val型である種雄牛1頭の産子139頭について産肉形質の調査を行い，Ala/Val型ではバラ厚が有意に増加し (P<0.01)，冷屠体重と脂肪交雑基準値が増加傾向を示すことを報告している²⁾．現在までに報告されたAla/Val型は，但馬系種雄牛D (図1)の子と孫に相当する母子2頭¹⁾および但馬系種雄牛F (図1)とその産子69頭²⁾の合計72頭であるが，これ以外の報告は無い．そこで今回，但馬系黒毛和種，高知系褐毛和種および見島牛を用いて，主な種雄牛とその産子の家系におけるAla18Val置換を有する個体の有無について調査を行ったので報告する．

(平成17年5月16日受理)

畜産草地部

*兵庫県立農林水産技術総合センター

**現家畜改良センター宮崎牧場

***現畜産草地研究所

材料および方法

1 供試牛

黒毛和種については、近畿中国四国農業研究センター畜産草地部(以下、近中四農研センターとする)で Ala/Val 型であることが確認されている母子2頭の父と祖父に相当する D (図1) を含む但馬系種雄牛6頭 (A ~ F), および平成11年の時点で入手可能であった家畜改良事業団の但馬系種雄牛46頭の合計52頭を調査した。また、Ala/Val 型であることが確認された但馬系種雄牛 D, E, F の産子167頭についても調査を行った。高知系褐毛和種については主な種雄牛46頭とその娘牛36頭の合計82頭について調査を行った。見島牛については主な種雄牛3頭の産子14頭について調査を行った。

2 DNAの調製

精液からの DNA の精製は Puwaravutipanich らの方法⁹⁾ に準じて行った。脂肪組織からの DNA の精製は中山ら⁸⁾ の方法に準じて行った。また、血液からの DNA の精製は、DNA 精製キット Gen とるくん (宝酒造株式会社) を用いて行った。

3 変異体の検出

Ala/Val 型の検出には既に報告済のミスマッチプライマーを用いた PCR-RFLP¹⁾ を用いた。鋳型 DNA にフォワードプライマー (GCTGTGATGGGT-GAAACTCTGGGAGA) とリバースプライマー (GTGAGGTCCTTGACAGACTGTGTCA) を加え、94 で1分間、58 で1分間および72 で1分間の条件で36サイクルPCRを行った。PCR産物は *Hinc* を用いて37 で2時間処理後、6%アクリルアミドゲル電気泳動を行い、60bpの変異特異的バンドの存在により Ala/Val 型の識別を行った。

結果および考察

黒毛和種については、近中四農研センターで既に Ala/Val 型であることが確認されている母子2頭の父と祖父に相当する但馬系種雄牛 D (図1) を含む但馬系種雄牛6頭 (A ~ F) を用いて、Ala/Val 型

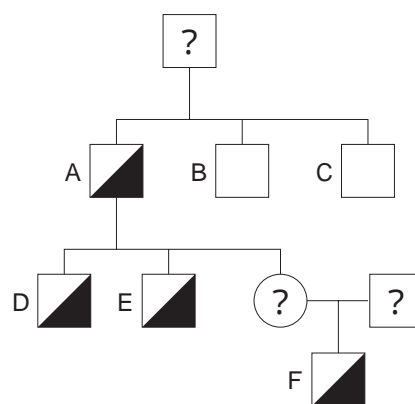


Fig. 1 Partial pedigree of Japanese Black cattle according to the Ala18Val substitution in PPAR 2.

□ : male, ○ : female,
 ▨ : heterozygote, ⊙ ⊚ : not determined

を含む家系を調査した。その結果、図1に示されるように A とその息牛 D, E (D と E は半兄弟) および孫牛 F の4頭の種雄牛が Ala/Val 型であることが明らかとなった。一方、A と半兄弟の関係にある B, C は Ala/Ala 型であった。4頭の種雄牛が Ala/Val 型であったことから、これらの種雄牛について産子の生産状況を調査した。その結果、合計で13,297頭の登録産子が生産されていた(表1)。また、種雄牛 A と F からは多くの種雄牛が生産されていたことから、A と F を父に持つ種雄牛数を調査した。その結果、現在までに50頭が登録されていることが明らかとなった(表1)。次に、D, E, F の産子167頭について、その遺伝子型を調査した。その結果、非変異体 (Ala/Ala 型) が81頭、Ala/Val 型が85頭

Table 1 Number of registered offspring from the 4 sires with hetero variants of PPAR 2 (Ala18Val).

| Sire | Registered offspring | |
|-------|----------------------|--------|
| | Male (Sire) | Female |
| A | 3,568 (36) | 3,530 |
| D | 341 | 294 |
| E | 212 | 160 |
| F | 2,581 (14) | 2,611 |
| Total | 6,702 (50) | 6,595 |

Table 2 Genotypes of offspring from the sires with hetero variants of PPAR 2 (Ala18Val).

| Genotype | Number of animals | Frequency (%) |
|----------|-------------------|---------------|
| Ala/Ala | 81 | 48.50 |
| Ala/Val | 85 | 50.90 |
| Val/Val | 1 | 0.60 |

存在し、ホモ型変異体 (Val/Val型) は1頭のみであった (表2)。PPAR 2 遺伝子はウシでは22番染色体上に存在することが報告されている¹²⁾。従って、Ala/Val型の雄とAla/Ala型の雌を交配した場合、産子の2分の1がAla/Val型になると推定される。本試験では、Ala/Ala型とAla/Val型がほぼ同じ割合で存在しており、推定頻度とよく一致していた。このことから交配に使用された雌牛集団の大部分はAla/Ala型であったと推定された。また、Val/Val型が1頭存在することから、雌牛集団中にAla18Val置換を伴う個体の存在も示唆された。表1に示されているように、Ala/Val型である種雄牛AとFを父に持つ登録種雄牛は50頭存在していた。都道府県別では、兵庫県と岡山県に6頭、京都府に4頭、北海道と青森、岩手、群馬、宮崎、鹿児島各県に3頭、山形、福島、富山、大分の各県に2頭、栃木、長野、福井、岐阜、愛知、山口、香川、長崎の各県で1頭繋養されていた。これら50頭中2頭は種雄牛D、E (Ala/Val型) であり、残りの種雄牛48頭中半数の約24頭が、表2の結果より、Ala/Val型であったと推定される。また、Ala/Val型である種雄牛A、D、E、Fから生まれた登録産子数は13,297頭であり (表1)、表2の結果より、半数の約6,500頭がAla/Val型であったと推定される。これらに加えて、Ala/Val型であると推定される種雄牛約24頭の産子数および種雄牛Aの孫牛に相当する種雄牛からの産子数を考慮すると、種雄牛Aに由来する家系内のAla/Val型の個体数はさらに大きくなると思われる。また、今回の調査の結果、家畜改良事業団の平成14年度および平成15年度間接検定候補種雄牛中には種雄牛Fの産子が存在していることが示され、間接検定の結果によっては、Ala/Val型種雄牛が全国規模で供用され、家系内のAla/Val型の個体数が飛躍的に増大する可能性も考えられ

る。

一方、表2の結果から、交配に使用された雌牛集団の大部分はAla/Ala型であったと推定された。このことは、家系外の黒毛和種におけるAla/Val型の存在頻度は低いことを示唆している。そこで、平成11年の時点で家畜改良事業団より入手可能であった但馬系黒毛和種種雄牛の凍結精液を用いて、家系外のAla/Val型の存在頻度の検討を行った。但馬系黒毛和種は安美系、菊則系、茂金系、城崎系の4系統に大別される¹⁷⁾。このうち、安美系種雄牛28頭、菊則系種雄牛13頭、および茂金系種雄牛5頭の合計46頭を用いて遺伝子型調査した。その結果、Ala/Val型の種雄牛は存在せず、いずれもAla/Ala型であった。従って、平成11年の時点においては、家系外の但馬系黒毛和種種雄牛にAla/Val型の存在する可能性は低かったと考えられる。

高知系褐毛和種については、主な種雄牛66頭中46頭について調査を行ったが、Ala/Val型の存在は確認されなかった。また、残り20頭のうち18頭はAla/Val型でない種雄牛を父としていた。さらに、Ala/Ala型の種雄牛が父である供卵牛36頭について調査を行ったが、Ala/Val型の存在は認められなかった。以上の結果から、高知系褐毛和種にAla/Val型の存在する可能性は低いものと思われる。

見島牛については主な種雄牛3頭の産子14頭について調査を行ったが、Ala/Val型は存在しなかった。従って、主な種雄牛3頭がAla/Val型である可能性は低い。調査を行った平成10年の時点では見島における見島牛の全繁殖牛は77頭であった。このうち75頭が主な種雄牛3頭の子であったことから、見島牛にAla/Val型の存在する可能性は低いものと思われる。

PPAR 2 遺伝子の産物である転写因子は、PPAR 1とPPAR 2の2種が知られている⁵⁾¹⁸⁾。PPAR 2は脂肪組織で特異的に発現し、脂肪細胞の分化に中心的役割を果たしている¹³⁾¹⁴⁾。PPAR 2はPPAR 1より分子量がやや大きく、PPAR 1のアミノ末端側にアミノ酸28~30個を付加した部分 (PPAR 2特異的部位) を持つ⁵⁾¹⁸⁾。PPAR 2特異的部位の機能としては、インシュリンによるPPAR 2の活性化への関与を示唆する報告がある¹⁶⁾。PPAR 2特異的部位のアミノ酸置換に関して

は, Pro12Alaの存在がヒトで知られており, 肥満との関連を指摘した報告³⁾⁴⁾¹⁵⁾に加え, Pro12Ala置換がPPAR 2の転写因子としての機能を抑制することが報告されている⁴⁾. 一方, 著者らは, 黒毛和種においてPPAR 2特異的部位にAla18Val置換が存在することを見出し¹⁾, この置換によりバラ厚が有意に増加($P < 0.01$)し, 冷屠体重と脂肪交雑基準値が増加傾向を示すことを報告している²⁾. 今回の調査によって, Ala/Val型である種雄牛Aに由来する但馬系黒毛和種の特定の家系が明らかとなり, その家系に属する4種雄牛(Ala/Val型)から生産された種雄牛と登録産子の生産状況が示された. また, この家系に属し, 1/2の確率でAla/Val型であると推定される種雄牛は全国レベルの拡がり示し, 21道府県で繋養されていたことが明らかとなった. 今後, 各道府県におけるこれらの種雄牛の産肉能力検定成績を活用することによって, Ala18Val置換の産肉形質への影響をより詳細に検討していくことが可能になると思われる.

摘 要

脂肪細胞分化制御因子PPAR 2の遺伝的変異(Ala18Val)は黒毛和種の産肉形質に影響することが示唆されていることから, 但馬系黒毛和種, 高知系褐毛和種, 見島牛の主な種雄牛およびその産子を用いて, 変異体を含む家系の調査を行った. 遺伝的変異体の検出には既に報告済のミスマッチプライマーを用いるPCR-RFLP法を用いた. その結果, 但馬系種雄牛において1頭のヘテロ型変異体(Ala/Val型)に由来する家系の存在が明らかとなり, 家系内には52頭の種雄牛が存在し, それらは21道府県で繋養されていた. さらに, この家系に属する4頭の種雄牛がAla/Val型であることが確認され, それら4頭の種雄牛からは約13,000頭の産子が生産されていた. また, 残る48頭の種雄牛については, 約半数がAla/Val型であると推定された. 一方, 高知系褐毛和種と見島牛については, Ala/Val型の存在する可能性は低いと思われた.

謝 辞

見島牛の採血にご協力をいただきました見島牛保存会の方々, 黒毛和種の採血にご協力をいただきました京都府中丹家畜保健衛生所の森下賀之氏, 褐毛和種の試料収集と分析にご協力をいただきました高知県畜産試験場の平井啓一氏, 登録牛の調査にご協力をいただきました全国和牛登録協会の吉村豊信氏の諸氏に感謝いたします.

引用文献

- 1) 相川勝弘・中西直人・村元隆行・佐藤幸信・萬田富治 1999. 黒毛和種における脂肪細胞の分化制御因子PPAR 2の変異について. 日本畜産学会報 70: J1 - J5.
- 2) 相川勝弘・太田垣進・谷本保幸・柴田昌宏・松本和典・寺田文典 2004. 黒毛和種におけるPPAR 2の遺伝的変異体の産肉成績. 日本畜産学会報 75: 25-29.
- 3) Beamer B. A., C-J. Yen, R. E. Andersen, D. Muller, D. Elahi, L. J. Cheskin, R. Andres, J. Roth, A. R. Shuldiner 1998. Association of the Pro12Ala variant in the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- 2 gene with obesity in two Caucasian populations. Diabetes 47: 1806 - 1808.
- 4) Deeb S. S., L. Fajas, M. Nemoto, J. Pihlajamaki, L. Mykkanen, J. Kuusisto, M. Laakso, W. Fujimoto, J. Auwerx 1998. A Pro12Ala substitution in PPAR 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. Nature Genetics 20: 284 - 287.
- 5) Fajas L, J-C. Fruchart, J. Auwerx 1998. PPAR 3 mRNA: a distinct PPAR mRNA subtype transcribed from an independent promoter. Federation of European Biochemical Societies Letters 438: 55 - 60.
- 6) Meirhaeghe A, L. Fajas, N. Helbecque, D. Cottel, P. Lebel, J. Dallongeville, S. Deeb, J. Auw-

- erx, P. Amouyel 1998 . A genetic polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gene influences plasma leptin levels in obese humans . *Human Molecular Genetics* 7 : 435 - 440 .
- 7) Mori Y, H. K. Motoyama, T. Katakura, K. Yasuda, H. Kadowaki, B. A. Beamer, A. R. Shuldiner, Y. Akanuma, Y. Yazaki, T. Kadowaki 1998 . Effect of the Pro12Ala variant of the human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor 2 gene on adiposity, fat distribution, and Insulin sensitivity in Japanese men . *Biochemical and Biophysical Research Communications* 251 : 195 - 198.
- 8) 中山広樹・西方敬人 1997 . バイオ実験イラストイテッド2 遺伝子解析の基礎 . 秀潤社 , 東京 . 117 - 121 .
- 9) Puwaravutipanich T, S. Panyim 1975 . The nuclear basic proteins of human testes and ejaculated spermatozoa , *Experimental Cell Research* 90 : 153 - 158 .
- 10) Ristow M, D. M. Wieland, A. Pfeiffer, W. Krones, C. R. Kahn 1998 . Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation . *The New England Journal of Medicine* 339 : 953 - 959 .
- 11) Rosen ED, C. J. Walkey, Puigserver, B. M. Spiegelman 2000 . Transcriptional regulation of adipogenesis . *Genes and Development* 14 : 1293 - 1307 .
- 12) Sundvold H, A. Brzozowska, S. Lien 1997 . Characterization of bovine peroxisome proliferator-activated receptors 1 and 2 : Genetic mapping and differential expression of the two isoforms . *Biochemical and Biophysical Research Communications* 239 : 857 - 861 .
- 13) 高田伊知男・YuRT・大谷ひふみ・梅園和彦 . 1997 . 脂肪細胞分化における核内諸受容体群の関与 . *最新医学* . 52 : 12 - 19 .
- 14) Tontonoz P, E. Hu, B. M. Spiegelman 1994 . Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR 2, a lipid-activated transcription factor . *Cell* 7 : 1147 - 1156 .
- 15) Valve R, K. Sivenius, R. Miettinen, J. Pihlajamaki, A. Rissanen, S. S. Deeb, J. Auwerx, M. Uusitupa, Laakso 1999 . Two Polymorphisms in the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- 2 gene are associated with severe overweight among obese women . *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84 : 3708 - 3712 .
- 16) Werman A, A. Hollenberg, G. Solanes, C. Bjorbaek, A. J. Vidal-Puig, J. S. Flier 1997 . Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) . *The Journal of Biological Chemistry* 272 : 20230 - 20235 .
- 17) 全国和牛登録協会 . 2003 . 黒毛和種雄牛集大成 全国和牛登録協会 , 京都 . 1 - 21 .
- 18) Zhu Y, C. Qi, J. R. Korenberg, X-N. Chen, D. Noya, M. S. Rao, J. K. Reddy. 1995 . Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor (mPPAR) gene : Alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR isoforms . *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 : 7921 - 7925 .

Investigation of a family with the Ala18Val hetero variants of the PPAR α 2 in Japanese Black cattle (Tajima strain), Japanese Brown cattle (Kouchi strain), and Mishima cattle

Katsuhiko AIKAWA, Susumu OHTAGAKI*, Yasuyuki TANIMOTO**, Naoto NAKANISHI***,
Masahiro SHIBATA and Kazunori MATSUMOTO

Key words : PPAR α 2, Japanese Black cattle, Japanese Brown cattle, Mishima cattle, variants of the PPAR

Summary

PPAR α 2 plays an important role in adipocyte differentiation. The Pro12Ala substitution of PPAR α 2 is associated with obesity in human, and the Ala18Val seems to be associated with carcass traits of Japanese Black cattle. Here, we investigate the Ala18Val hetero variants of PPAR α 2 (Ala/Val variant) in 52 Japanese Black cattle (Tajima strain), 82 Japanese Brown cattle (Kouchi strain), and 14 Mishima cattle, using sires and their closely related offspring. In the Japanese Black cattle (Tajima strain), we found a family derived from one sire of the Ala/Val variant. The family contained 52 sires, which were kept in 21 prefectures throughout Japan. We confirmed that this family contained 4 sires that were Ala/Val variants, and these 4 sires had produced about 13,000 offspring. As for the remaining 48 sires, about half were estimated to be Ala/Val variants. On the other hand, we found no Ala/Val variants in the Japanese Brown cattle (Kouchi strain) or in the Mishima cattle.

Department of Livestock and Grassland Science.

*Hyogo Prefectural Technology for Agriculture, Forestry and Fisheries.

**National Livestock Breeding Center Miyazaki Station.

***National Institute of Livestock and Grassland Science.