

脂肪萎縮症モデル動物としてのスンクス (*Suncus murinus*)
に関する基礎的研究

(Fundamental Research on Suncus (*Suncus murinus*) as an Animal Model
of Lipodystrophy)

佐 賀 さ や か

脂肪萎縮症モデル動物としてのスンクス (*Suncus murinus*)
に関する基礎的研究

(Fundamental Research on Suncus (*Suncus murinus*) as an Animal Model
of Lipodystrophy)

佐 賀 さ や か

日本獣医生命科学大学大学院獣医学研究科
獣医学専攻博士課程平成 27 年入学

(指導教授：新井 敏郎)

平成 31 年 3 月

Fundamental Research on Suncus (*Suncus murinus*) as an Animal Model
of Lipodystrophy

(脂肪萎縮症モデル動物としてのスンクス (*Suncus murinus*)
に関する基礎的研究)

Sayaka Saga

Graduate School of Veterinary Medicine and Life Science
Nippon Veterinary and Life Science University

Doctoral Supervisor: Toshiro Arai, Professor
(指導教授：新井 敏郎)

March 2019

目 次

目 次	
略 語	
第1章 序 論	1
第2章 スンクスレプチンの cDNA クローニングおよび組織分布の解析	
2-1 緒 論	8
2-2 材料および方法	9
2-3 結 果	20
2-4 考 察	23
2-5 小 括	26
第3章 スンクスレプチンの分子系統解析	
3-1 緒 論	31
3-2 材料および方法	32
3-3 結 果	33
3-4 考 察	36
3-5 小 括	42
第4章 スンクスレプチンの構造解析	
4-1 緒 論	47
4-2 材料および方法	48
4-3 結 果	48
4-4 考 察	49
4-5 小 括	50
第5章 総 括	52
参考文献	57
謝 辞	65
英文要旨	66

【 略 語 】

aa : Amino Acid Residues (アミノ酸残基)

bp : base pair (塩基対)

AGL : Acquired Generalized Lipodystrophy (後天性全身性脂肪萎縮症)

BAT : Brown Adipose Tissue (褐色脂肪組織)

CGL : Congenital Generalized Lipodystrophy (先天性全身性脂肪萎縮症)

NCBI : National Center for Biotechnology Information (米国立生物工学情報センター)

ORF : Open Reading Frame (オープンリーディングフレーム)

RACE : Rapid Amplification of cDNA Ends

RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (逆転写ポリメラーゼ連鎖反応)

TG : Triacylglycerol (中性脂肪)

UTR: Untranslated Region (非翻訳領域)

WAT : White Adipose Tissue (白色脂肪組織)

第1章 序論

1-1. 脂肪萎縮症とは

脂肪萎縮症は種々の病因により生じる稀な疾患であるが、特徴としては様々な程度での体脂肪の欠損が認められ、全身性、部分性（身体の特定の領域）または局所性（皮下の狭い範囲）に体脂肪の減少ないし消失が見られる。体脂肪減少が著しい患者では、重度のインスリン抵抗性、糖尿病、高トリグリセリド（TG）血症および脂肪肝などの代謝性疾患を合併しやすい(1,2)。一部の患者ではこれらの合併症のコントロールが難しく、さらに糖尿病性腎症、網膜症、急性膵炎、肝硬変および心血管疾患なども引き起こす可能性がある(1,2)。なお脂肪萎縮症に関しては既に多くの総説が出版されているため、詳細はそれらの総説(1-4)に譲り、ここでは簡潔に要約するに留める。

体脂肪欠損は遺伝性（常染色体性劣性又は優性の遺伝性脂肪萎縮症）から自己免疫性（全身性または部分性の後天性脂肪萎縮症）、または薬物性（抗レトロウイルス療法を受けたヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染患者またはインスリンなどの注入薬剤による局所性脂肪萎縮症）に生じる。局所性脂肪萎縮症や HIV 感染患者における脂肪萎縮症は最も多くみられる病態であるが、遺伝性および後天性脂肪萎縮症は極めて稀な疾患である(2)。局所性脂肪萎縮症における脂肪組織の欠損は軽微であるため代謝性疾患合併の素因にはならない一方で、全身性あるいは部分性脂肪萎縮症は様々な代謝性疾患を引き起こす素因となること

が知られている(2)。しかしながら、脂肪欠損がこれら代謝異常を引き起こす詳細なメカニズムは未だ解明されていない。

合併症を生じない局所性脂肪萎縮症の患者では血中レプチン濃度が低値から高値まで幅を持つのに対し、全身性あるいは部分性脂肪萎縮症の患者では血中レプチン濃度が極めて低いという特徴がみられる(5,6)。加えて顕著な低レプチン血症は食欲を増進させるため、インスリン抵抗性による合併症を悪化させる可能性も指摘されている(1)。

先天性全身性脂肪萎縮症 (Congenital generalized lipodystrophy; CGL) あるいは Berardinelli-Seip 症候群として知られる脂肪萎縮症は、出生時または生後 1 年以内に脂肪組織の全般的な欠損が見られる常染色体性劣性遺伝病である。CGL 患者は、幼児期の著しいレプチン欠乏のために過食症を発症する場合がある。高インスリン血症により広範囲のアカントーシス (黒色表皮腫) を生じ、その後、青年期には糖尿病が発症するようになる。一部の患者では、インスリン抵抗性糖尿病の発症後に著しい高 TG 血症をおこし、急性膵炎を起こしやすいことが報告されている(7,8)。また一般的に脂肪肝が見られ、肝炎、肝硬変そして肝不全に進行する可能性があることも問題となる(7)。

CGL は原因となる変異遺伝子によって 4 つのサブタイプ (CGL1~CGL4) に分類されている。CGL1 は 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2 (AGPAT2) の変異によるもので最も良く見られるタイプである(6-9)。CGL2 は BSCL2 によってコードされる Seipin の変異であり、CGL1 に次いで多く見られる(7,8,10)。CGL3 は Caveolin 1 (CAV1) の変異であり臨床報告が 1 例だけ存在する(11)。CGL4 は polymerase I and transcript-release factor (PTRF)のコードする Cavin 1 の変異であり、20 例程度の報告がある(12,13)。

家族性部分性脂肪萎縮症 (familial partial lipodystrophy; FPLD) は殆どが常染色体性優性疾患として遺伝し、四肢の皮下および体幹部の脂肪消失が認められる。FPLD には、発生が稀な FPLD1 の Kobberling 型(変異遺伝子は不明)(14)、最も報告が多い FPLD2 の Dunnigan 型 (LMNA のミスセンス変異 ; 500 例以上の報告) (15,16)、そして FPLD2 に次いで報告の多い FPLD3 (PPARG のヘテロ接合変異) (9,17)など、およそ 6 タイプが知られている。これらの患者は、小児期には正常な脂肪組織分布を示すが、その後、幼児期あるいは思春期頃から皮下脂肪の喪失が四肢から始まる。CGL 患者と比較すると、脂肪肝の発生はあまり顕著ではないが、重度の高トリグリセリド血症が一般的であり、急性膵炎のリスクが高いという特徴がある。

後天性全身性脂肪萎縮症 (Acquired generalized lipodystrophy; AGL) または Lawrence 症候群は、正常な脂肪組織分布で生まれたにも関わらず小児期または青年期から徐々に皮下脂肪が全身性に消失していく。AGL の 50%が特発性であり、残りの約 25%が皮下脂肪の消失を伴う脂肪織炎に由来するものと、自己免疫性 (約 25%) に分類される(18)。AGL 患者は、糖尿病や高 TG 血症に関わるインスリン抵抗性などの代謝性合併症の素因があり低レプチン血症が病態に関与していると考えられている。AGL 患者では、これらの合併症が重篤となることが多いが、脂肪織炎に由来する AGL では、他の 2 つのタイプの AGL よりも合併症は軽いことが多いとされる(18)。

このように脂肪萎縮症自体の原因は様々であり、脂肪組織の喪失に対しての根本的な治療はないのが現状である。そのため脂肪萎縮症の治療は、合併症のコントロールと美容的観点からの治療に主眼が置かれている(3)。

CGL 患者では血中レプチン濃度が著しく低いことから、レプチン補充療法が考え出され、さらにヒト組換えレプチン製剤（メトレレプチン）の開発へと繋がっていった経緯がある（Oral 2002）。メトレレプチンは現在、米国および日本で唯一承認されている CGL および AGL の治療薬であり(3)、メトレレプチンの投与により、血清 TG の低下、インスリン感受性の増加および脂肪肝の改善など、CGL 患者の代謝異常が改善されることが示されている(1)。

1-2. 脂肪萎縮症とレプチンの関連

脂肪組織は単なる脂肪の貯蔵臓器ではなく、活発な代謝調節臓器として働くことが現在では広く一般的に認識されている。レプチン、アディポネクチンに代表される、いわゆるアディポカインは、脂肪細胞で合成され循環血中に分泌されるホルモンであり、食物摂取量、インスリン作用およびエネルギー消費を調節することにより、全身のグルコース代謝および脂質代謝のホメオスタシスを調整する役割を担っている。とりわけレプチンは、体脂肪量やエネルギー代謝調節のための重要なシグナル分子であり、代謝に関わる主要臓器に対する直接・間接作用の両方を介して働く(19,20)。

レプチン受容体は主に視床下部に発現しており、食物摂取量および食欲を調節している(20)。レプチン受容体はレプチンが結合することでチロシン残基が活性化されると、JAK/STAT の活性化を介して遺伝子転写を刺激することが知られている(21,22)。一方でレプチンは骨格筋や肝臓など末梢組織への作用も持っている(23)。レプチンは、末梢でのグルコース代謝、TG 代謝、インスリン作用の調節に関与するが、これらの作用の詳細なメカ

ニズムは不明である。おそらくレプチンが視床下部に作用することによって間接的に末梢にシグナルが伝達されると推測される(23,24)。例えばレプチンは、骨格筋におけるグルコース取り込みの増加、肝臓での糖新生の減少、骨格筋および肝臓における遊離脂肪酸酸化の促進によって、インスリン作用を改善することが知られている(25-27)。

ヒトをはじめとする多くの動物では、血清レプチン濃度が体脂肪量と相関する(28)。そのため、全身性に脂肪組織を喪失した CGL では血中レプチンレベルが著しく低くなるが、部分性脂肪萎縮症では低～正常レベルであり、脂肪量と相関が見られる(29)。

この脂肪萎縮症で見られる低レプチンレベルと代謝異常の関連については、動物モデルでも詳しく調べられている(30)。脂肪組織において塩基性ジッパー転写因子 (bZIP) を不活性化するタンパク質を発現させた A-ZIP/F-1 マウスは全身性に脂肪組織が喪失するため CGL モデルマウスとして利用される(31)。この A-ZIP/F-1 マウスはヒトの CGL と同様に重度のインスリン抵抗性、高 TG 血症および肝臓への脂肪蓄積を起こす。一方で野生型のマウスから脂肪組織や脂肪細胞前駆細胞を取り出して、この脂肪萎縮症モデルマウスに移植すると代謝異常が改善された (31-35)。しかしながら、レプチン遺伝子に変異している *ob* / *ob* マウスからの脂肪組織の移植では代謝異常の改善には十分な効果が認められなかった (36)。また、下村らのグループは(37)、aP2-SREBP-1c トランスジェニックマウスにおいてレプチン補充により、脂肪萎縮症でみられた代謝パラメーター、インスリン作用、および脂肪肝が改善したことを報告している。つまりレプチンはグルコース代謝や脂質代謝に直接作用することで、脂肪萎縮症における代謝異常に関わっていることが明らかになった。

これらの報告が示しているように、ヒトやマウスでの脂肪組織の全身的な喪失は、血中レプチン濃度を低下させ代謝異常を生じさせることを示唆している。一方で、全身性の脂肪組織が少ないにも関わらず特に代謝異常を認めない、スunksという動物も存在している。

1-3. 実験動物としてのスunks

真無盲腸目（食虫目）トガリネズミ科ジネズミ亜科ジャコウネズミ属に属するスunks（Asian house musk shrew; *Suncus murinus*）は日本で実験動物化された小動物である(38,39)。マウスやラットといった、げっ歯類に外見は似ているが、食虫目の動物で広く実験動物として利用されているのはスunksだけである。なお「スunks」と表記した場合には、ジャコウネズミのうち実験動物化されたものを示す。野生状態のジャコウネズミは虫食性の動物とはいえ、人間の出す残飯なども摂食する肉食性（雑食性）の動物として生存し、生活環境も人間の生活圏が含まれている(39)。

現在実験動物化されて維持されている系統は複数存在するが、代表的な系統としてはネパールのカトマンズで捕獲された群に由来する系統である KAT(40)、バングラディッシュのマイメイシンで捕獲された群に由来する系統である BAN(41)、日本の長崎県で捕獲された NAG、スリランカで捕獲された系統の SK などがある(42)。バングラディッシュ産はスunksの中でも大型であり、野性個体では 150g を超すものもいる（雌は雄よりも小さく 100 g 程度）。この BAN に KAT の雌を交配し、戻し交雑を行って毛色や体サイズを戻した系統として BK が確立された(39,42)。

スunksは、その形態学的あるいは生理学的な違いからマウスやラットとは異なるモデル動物として利用されてきている。代表的な例としては嘔吐が可能である点が挙げられ、実験動物中央研究所で維持・生産されている JIC:SUN-Her（嘔吐高感受性スunks）と JIC:SUN-Ler（嘔吐低感受性スunks）が多くの研究者によって利用されている(39)。

解剖学的な特徴としてスunksは皮下の脂肪沈着が少ないという特徴がある(38)。また腹腔内および胸腔内の脂肪組織量も著しく少ない。これはヒトやマウスモデルの CGL と同様に全身脂肪組織欠損状態であるが、スunksが正常状態でインスリン抵抗性や高血糖などを示すという報告はない。

1-4. 本研究の目的

本研究ではスunksが新たな脂肪萎縮症病態解析モデルとして利用可能であるかを検討するために、その基礎的研究としてスunksレプチンの解析を行った。全身性に脂肪の少ないスunksが、ヒトの CGL のような病態を示さない理由を解明することは、ヒト CGL の病態解明、新たな治療基点の開発に重要であると考えられる。ある意味では、脂肪萎縮症の合併症非発症モデル動物としてスunksが利用できる可能性がある。そこで、ヒト CGL の代謝異常に重要な役割を果たしているレプチンに着目し、まずスunksのレプチンを同定し、その構造比較を行うことにした。つまりスunksのレプチンに構造的な違いがあれば、その差が病態形成に重要であると考えられる。本研究では、スunksレプチンの遺伝子クローニングを行い、1次構造を決定するとともに、その組織発現分布を検討し(第2章)、1次構造・2次構造の比較および進化系統的な検討(第3章)そして立体構造予測

による検討（第4章）から、スunksレプチンと代謝異常との関連について総合的に検討を行った。

第2章 スunksレプチンの cDNA クローニング および組織分布の解析

2-1. 緒 論

レプチンは遺伝性肥満マウス (*ob/ob* マウス) の原因遺伝子として 1994 年に同定された *ob* 遺伝子の産物であり、脂肪細胞で合成・分泌されるホルモンである(43)。脂肪細胞から分泌されたレプチンは血中を循環し、主に視床下部に作用して摂食抑制と交感神経活性化によるエネルギー消費の亢進をおこなう(19,20)。血中レプチン濃度は脂肪組織量と正の相関があり、脂肪組織が増えると血中濃度が増加し、脂肪組織の消失にともない血中濃度が減少する(28)。

ヒトの脂肪萎縮症の患者では、全身性あるいは部分性に脂肪組織が消失するため、血中のレプチン量が低下しインスリン抵抗性などの病態が形成されることが考えられている。遺伝子改変マウスにおいても脂肪組織の喪失によって血中レプチン濃度が低下し、糖・脂質代謝異常を示すことが確認されている。

一方でスunksは成獣でも全身の脂肪組織が少ないが、一般的な飼育環境下では糖代謝異常は示さない。人の CGL と同様な脂肪分布を示しながら、なぜ正常なスunksがインスリン抵抗性や脂肪肝を生じないのかという点は比較病態生理学的に大変興味深い。そこで

本研究では、スunksのレプチンに構造的な特徴があるのではないかと仮定し、その構造の違いがレプチン受容体との結合や作用に違いを与えている可能性を確認するため、スunksレプチン (*Lep*) 遺伝子を cDNA クローニングにより同定し、レプチンの 1 次配列を決定した。

さらに、スunksでも脂肪組織においてレプチンが発現していることは予測されるが、全身の脂肪組織が少ないため、循環レプチン量を補う目的で異所性に他の組織でレプチンの発現が見られる可能性も考えられる。そこで、スunksの全身諸臓器における *Lep* 遺伝子の組織発現分布についても検討を行った。

2-2. 材料および方法

1) 動物

BK 系スunksは、バングラディッシュで捕獲され実験動物化された BAN 系(41)とネパールのカトマンズで捕獲され実験動物化された KAT 系(40)との交配により作出されたラインである。岡山理科大学理学部動物学科で繁殖・維持されていた *ous*:BK 系を織田銃一博士（岡山理科大学元教授）より譲り受け、日本獣医生命科学大学生命科学研究棟で独自に繁殖・維持した個体を本実験で使用した（このラインを *nvlu*:BK とした。以下、単に BK と記載した場合はこの *nvlu*:BK を表す）。

スunksはアルマイト製のラット用ケージで個別に飼育し、床敷としてはコーンコブ（Shepherd's Cob ; EPS 益新、東京）とホワイトフレーク（日本チャールス・リバー、横浜市、神奈川）を混合して使用し、ケージ内にはエンリッチメント（巣材）として飲料の空

缶を加工したものをいれた。スunksの標準的な飼育環境で飼育・繁殖を行い、室温は23～26°C、12時間の明暗期（7時点灯、19時消灯）とし、餌と水は自由採取とした。虫食性であるスunksは高タンパク質食で飼育するため、マス類育成用配合飼料5pペレット（フイード・ワン、横浜）を給餌した（餌の栄養組成は表2-1を参照）。

なお本研究の動物実験は日本獣医生命科学大学の実験動物委員会の承認を得ており（30S-15）、日本獣医生命科学大学における動物実験等の実施に関する基本指針に従って実施した。

雄の成スunks（1歳齢以上、n=1）を過剰量（300mg/kg）のペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル®；共立製薬、東京）の腹腔内投与により安楽殺を行った。直ちに全身各組織を採材し、液体窒素で凍結した。RNAの分解を防ぐために組織の採材は30分以内に終了させた。凍結した試料はRNA抽出を行うまで、-80°Cの冷凍庫内で保存した。

2) RNA抽出

組織からのtotal RNAの抽出はNucleoSpin® RNA（タカラバイオ、大津、滋賀）を用いて行った。RNA抽出を行った組織は、脳、肝臓、大腿四頭筋、食道、胃、小腸、大腸、膵臓、胆嚢、心臓、腎臓、肺、脾臓、精巣、鼠径部皮下および精巣周囲白色脂肪組織（WAT）そして肩甲間褐色脂肪組織（BAT）である。

RNA抽出は添付のマニュアルに従って実施したが、以下に簡潔に述べる。液体窒素で凍結した組織片をハンマーで破碎し、その破片（約30mg）を350μLのβメルカプトメタノール添加RA1試薬を入れたエッペンドルフチューブに加えた。直ちにポリトロンホモジナイザー（セントラル科学貿易、文京区、東京）でホモジナイズを行った。ホモジネートを

NucleoSpin Filter に移し、高速微量冷却遠心機 (KUBOTA1720 ; 久保田商事、文京区、東京) で 12,000rpm、1 分間、4℃で遠心を行った。フィルターを通った濾液に 350μL の 70%エタノールを加え、ピペットで混和した。混和した溶液を NucleoSpin RNA カラムに移し、12,000rpm で 30 秒間、4℃で遠心を行い、RNA をカラムに吸着させた。350μL の膜脱塩用緩衝液 (MDB) をカラムに加え、12,000rpm、1 分間、4℃で遠心を行った。RNA 溶液に混在するゲノム DNA を除くため、rDNaseI (RNase-free) をカラムに 95μL 加え、室温で 15 分間反応させた。その後、200μL の RA2 洗浄バッファーを加え、12,000rpm、30 秒間、4℃で遠心し、さらに 600μL の RA3 洗浄バッファーで同様に遠心洗浄を行った。最後にもう一度、250μL の RA3 洗浄バッファーで 12,000rpm、2 分間、4℃で遠心を行い、カラムを洗浄、乾燥した。60μL の RNase-free 水をカラムに加え、8,000rpm、2 分間、4℃で遠心を行い、カラムに結合している RNA を溶出した。

回収した RNA 溶液中の RNA 濃度を測定するために、Qubit RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, 港区、東京)を用いて Qubit フルオロメーター (Thermo Fisher Scientific) で計測した。

3) スンクスレプチン遺伝子 (部分配列) の RT-PCR によるクローニング

スンクスレプチン遺伝子 (*Lep*) の cDNA をクローニングするために通常の RT-PCR と rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法を組み合わせ実施した。最初にスンクス *Lep* 遺伝子の部分配列を増幅するために、PCR プライマーを設計した。このプライマー設計には KAT のゲノムリソースデータベース (論文公表前のため非公開) をスンクスゲノムプロジェクトの協力のもとで利用した。KAT ゲノムデータベースを“Leptin“でキーワード検索

したところ、既にスンスゲノム上にアノテーションが行われている 3'末端の異なる 3 種類
の推定 *Lep* 遺伝子配列が得られた。この 3 つの cDNA 配列に共通する領域を使って、web
プライマー設計プログラムである Primer3Plus ([https://primer3plus.com/cgi-
bin/dev/primer3plus.cgi](https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi)) により PCR プライマー、SunLepF (5'-gaa gcc caa ccc agg aag aa-3')、
および SunLepR (5'-gct gct tct cct gga gac tc-3') を設計した。

3)-a RT-PCR によるスンス *Lep* 遺伝子の部分クローニング

次にこのプライマーセットを用いて、スンス *Lep* 遺伝子の部分配列を増幅した。まず
先に抽出した鼠径部皮下 WAT の RNA を鋳型に用いて cDNA を合成した。cDNA の合成は
PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ) を用いて実施した。5μg の鋳型
RNA に 50μM オリゴ dT プライマー (1μL) と 10mM dNTP mix (1μL) を加え、RNase-free
水で全量を 10μL とした。65°C、5 分間の加熱により RNA の高次構造を変性させ、その後、
直ちに氷上で急冷した。この変性 RNA 溶液 (10μL) に 4μL の 5×PrimeScript Buffer、0.5μL
の RNase 阻害剤 (40U/μL)、1μL の PrimeScript RTase (200U/μL) を加え、RNase-free 水で全
量を 20μL とした。42°C、60 分間の逆転写反応により cDNA 合成を行い、その後、95°C、
5 分間のインキュベーションにより逆転写酵素を失活させた。合成した cDNA 溶液 20μL は TE
緩衝液 (pH8.0) 20μL を加えて希釈した後、4°C で保存した。

PCR のエラーを防ぎながら、TA クローニングを実施するために、3'→5' exonuclease 活性
(proof reading 活性) を有する *TaKaRa LA Taq® Hot Start Version* (タカラバイオ) を用いて
PCR を行い、スンス *Lep* 部分配列のクローニングを行った。PCR 用チューブの中に、5μL
の 10×LA PCR Buffer II (Mg²⁺ plus)、8μL の 2.5mM dNTP mix、それぞれ 2.5μL ずつの SunLepF

および SunLepR プライマー（最終濃度 0.5 μ M）、1 μ L の希釈済み cDNA 溶液そして 0.5 μ L の TaKaRa LA Taq[□] HS（5units/ μ L）加え、NanoPure 水で総量を 50 μ L に調整した。PCR はサーマルサイクラーPTC-200（MJ Research、Reno, NV, USA）を用いて実施した。PCR 条件は 94 $^{\circ}$ C、1 分間の熱変性により抗 Taq 抗体を失活させ、その後 98 $^{\circ}$ C、10 秒間および 68 $^{\circ}$ C、5 分間の 2 ステップを 30 サイクル繰り返した。最後に 72 $^{\circ}$ C、10 分間の追加伸長反応を行った。

3)-b PCR 産物のアガロースゲルからの精製

PCR による増幅産物は、Mupid-2plus サブマリン型電気泳動装置（株式会社ミューピッド、中央区、東京）を用い TAE 緩衝液中で 2.0%アガロースゲルにより 100V、30 分間の電気泳動を行い分離した。DNA の染色は Midori Green Direct（日本ジェネティクス、文京区、東京）により行い、泳動用試料に予め混ぜることで染色を行った。DNA の可視化は Blue LED の照射により行い、ゲル撮影装置（Fas-Digi；日本ジェネティクス）を用いてデジタル撮影を行った。

アガロースゲル電気泳動で確認された増幅産物は FastGene Gel/PCR Extraction Kit（日本ジェネティクス）を用いて精製を行った。まず PCR 増幅産物をゲルから切り出し、微量遠心チューブに移した。500 μ L の結合バッファーGP1 を加え、55 $^{\circ}$ C で 10 分間加温しゲルを完全に溶解させた。溶解サンプルを FastGene GP カラムに移し、12,000rpm、30 秒間の遠心を行った。カラムに 600 μ L の洗浄バッファーGP2 を加え、12,000rpm で 30 秒間の遠心を行い、カラムを洗浄した。さらに 12,000rpm、2 分間の遠心を行うことでカラムを完全に乾燥させた。カラムに 50 μ L の 10mM Tris-HCl (pH8.5)を加え、12,000rpm、2 分間の遠心により

PCR 産物を回収した。

3)-c PCR 産物の TA クローニング

回収した PCR 産物は T ベクターに TA クローニング法で挿入を行った。1 μ L の PCR 産物に、1 μ L (50ng) の pMD20 T ベクター (タカラバイオ) を加え、さらに滅菌蒸留水で総量を 5 μ L にした。この溶液に、DNA リガーゼを含む DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (タカラバイオ) を 5 μ L 加え、16 $^{\circ}$ C で 30 分間のライゲーション反応を行った。ライゲーション後に反応液全量 (10 μ L) を用いて 100 μ L のコンピテント細胞 NovaBlue (メルク、目黒区、東京) を形質転換した。コンピテント細胞にライゲーション産物を加えて氷上で 30 分間静置した後、42 $^{\circ}$ C のウォーターバスで 60 秒間のヒートショックを行った。直ちに氷上に戻して 3 分間静置してから、400 μ L の LB 液体培地を加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分間の振盪培養を行った。アンピシリン (最終濃度 100 μ g/mL) 添加 LB 寒天培地に 0.1M Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) と 2% 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside (X-Gal) を予め塗布しておき、その寒天培地に 5 μ L あるいは 50 μ L の培養菌液を塗布した後、37 $^{\circ}$ C で一晩培養を行った。

3)-d 組換えプラスミド精製

生育したコロニーのうち、白いコロニーを選抜しアンピシリン添加 LB 液体培地で 37 $^{\circ}$ C、一晩の振盪培養を行った。プラスミドは FastGene Plasmid Mini Kit (日本ジェネティクス) を用いて精製した。大腸菌液を微量遠心チューブに移し、12,000rpm で 30 秒間遠心し菌体を沈殿させた。上清を除いた菌体ペレットに RNase 添加した再懸濁バッファー mP1 を 200 μ L 加え、ピペッティングで再懸濁させた。次に 200 μ L の溶解バッファー mP2 を加え、

転倒混和により菌体を溶解させ、室温に2分間静置した。さらに300 μ Lの中和バッファームP3を加え、転倒混和を行い、12,000rpmで2分間の遠心を行った。上清をFastGene mPカラムに移し、12,000rpmで30秒間遠心を行った。次に150 μ Lの第一洗浄バッファームP4、更に300 μ Lの第二洗浄バッファームP5を続けて加え、12,000rpmで3分間遠心を行った。カラムに50 μ Lの10mM Tris-HCl (pH8.5)を加え、2分間静置した後、12,000rpmで2分間遠心を行い、精製プラスミドを回収した。精製したプラスミドは0.8%アガロース電気泳動により精製具合を確認し、その濃度を既知濃度のプラスミドのバンド陰影と比較することで測定した。

3)-e 塩基配列の決定

精製したプラスミドを鋳型としてダイターミネーター法で塩基配列を解析した。DNA シークエンスに用いるプライマーはプラスミド上のユニバーサル配列を利用し、M13 primer RV (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3')およびM13 primer M4 (5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3')を用いた。シークエンス解析はFASMAC (厚木市、神奈川県)に委託した。シークエンス反応はBigDye Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific、品川区、東京)を用いて行い、泳動および解析はApplied Biosystems 3130xl ジェネティックアナライザーおよび3730xl DNA アナライザー (Thermo Fisher Scientific)により行った。

得られたDNA塩基配列は相同性を持つ核酸配列を検索するため、核酸ホモロジー検索プログラムであるblastn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)を用いて検索を行った。検索結果より、他の動物種のレプチン配列と相同性の高かったクローンに含まれる挿入断片をスunks *Lep* 遺伝子の部分配列と判定した。なおPCRによるエ

ラーを防ぐため、3回の独立したPCRから得られた、それぞれ3コロニーを鋳型にしたシーケンスを行い、その配列のアラインメントを行うことでスunks *Lep* 遺伝子コンセンサス塩基配列を決定した。

4) 3'RACE 法によるスunks *Lep* cDNA 3'末端のクローニング

スunks *Lep* cDNA の3'末端をクローニングするために、SMARTer® RACE 5'/3' Kit (タカラバイオ) を用いて3'RACEを行った。前述の鼠径部皮下 WAT 由来 total RNA を鋳型として1st-strand cDNA の合成を行った。1µg/µL に希釈した鼠径部皮下 WAT 由来 total RNA 1µL と 1µL の 3'-CDS Primer A (キット付属; 配列は非公開) を合わせ、NanoPure 水で総量を 12µL にした。72°C で 3 分間の熱変性を行った後、42°C で 2 分間の冷却を行った。熱変性した RNA-プライマー混液に、4µL 5×First-Strand バッファー、0.5µL の 100mM DTT、1µL の 20mM dNTP mix、0.5µL (40U/µL) RNase 阻害剤、2µL SMARTScribe Reverse Transcriptase (100U) を加え、総量を 12µL とした後、42°C で 90 分間インキュベートし逆転写反応を行った。70°C、10 分間の加熱により逆転写酵素を失活させてから、90µL の Tricine-EDTA バッファーを加えて希釈を行った。

先に決定したスunks *Lep* cDNA 部分配列を用いて、Primer3Plus プログラムによりプライマーを設計した。PCR 産物のクローニングには In-Fusion クローニングを利用するため、設計したプライマーの 5'末端に (5'-GATTACGCCAAGCTT-3') の 15 塩基を付加した。作成したプライマーは SuncusLep3RACE1 (5'-GAT TAC GCC AAG CTT AAG CCT CAC TCT TCT CCA CAG AGG T-3') および SuncusLep3RACE2 (5'-GAT TAC GCC AAG CTT

GTC CTG GAA GCC TCA CTC TTC TCC AC-3') である (下線部は In-Fusion のために付加した配列を示す)。

3'RACE は、25 μ L 2 \times SeqAmp バッファー、5 μ L の 10 \times Universal Primer (UPM ; RACE キットに付属。配列は非公開)、1 μ L の SuncusLep3RACE1 プライマー、2.5 μ L の 1st-Strand cDNA そして 1 μ L の SeqAmp DNA polymerase を加え、NanoPure 水で総量を 50 μ L に調整した。PCR はサーマルサイクラー PTC-200 (MJ Research) を使用して、94 $^{\circ}$ C、30 秒間の熱変性、68 $^{\circ}$ C、30 秒間のアニーリング、72 $^{\circ}$ C、3 分間の伸長反応の 3 ステップを 1 サイクルとし、25 サイクル行った。

PCR 産物は 2% アガロースゲル電気泳動で確認し、前述のように FastGene Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス) によりゲルからの精製を行った。ゲルから精製した PCR 産物 7 μ L に、1 μ L の Linearized pRACE ベクター (RACE キットに付属) と 2 μ L の In-Fusion HD Master Mix を加え、50 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートを行った。50 μ L の StellarTM コンピテント細胞に 5 μ L のライゲーション産物を添加し、氷上に 30 分間静置した。42 $^{\circ}$ C で 45 秒間のヒートショックを行った後、ただちに氷上に移し、2 分間静置して冷却した。450 μ L の SOC 培地を加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間振盪培養を行った。10 μ L および 100 μ L の培養菌液をアンピシリン添加 LB 寒天培地に塗布し、37 $^{\circ}$ C で一晩培養を行った。

生育したコロニーは M13 RV プライマーおよび M13 M4 プライマーを用いてコロニー PCR を行い、挿入した断片と同じ程度の長さをもつ PCR 産物が得られたクローンのみをシーケンス解析に利用した。なお挿入断片の長さが 1 kbp 以上になるため、シーケンスはプライマーウォーキング法により行った。DNA シーケンス解析は前述と同様に

FASMAC に委託し、BigDye Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific) を用いて Applied Biosystems 3130xl ジェネティックアナライザーおよび3730xl DNA アナライザー (Thermo Fisher Scientific)で解析を行った。解析が終了した配列内に新たなシークエンスプライマーを作成し、解析済み配列とオーバーラップさせながら解析を進めていった。クローンの両鎖について解析を行い、得られたシークエンスのアラインメント結果からコンセンサス配列を決定し、スunks *Lep* cDNA 3'末端配列とした。

5) RT-PCR によるスunks *Lep* cDNA 5'-UTR のクローニング

解析済みスunks *Lep* cDNA 配列内の推定開始コドン (ATG) が、真の開始コドンであることを確認するために、さらに上流側の 5'-UTR の解析を行った。5'-UTR のクローニングは RT-PCR 法で行った。ここまでの解析で得られた部分スunks *Lep* cDNA 配列をクエリーとして、KAT 系統のゲノムデータベース上で blast 検索を行ったところ、アノテーションが行われている *Lep* 遺伝子との相同性が確認された。さらに上流の配列を確定するために、KAT 系スunks の *Lep* 遺伝子配列を参考に 5'側に 2つの新たなプライマー、SunLep5'-F1 (5'- TAA GAG AGA CCG GCC GGC -3') および SunLep5'-F2 (5'- CCC CGG AGG ACT TCA GCA GC-3') を設計した。2-2-3a)で作成した鼠径部皮下 RNA 由来 cDNA を鋳型とし、SunLep5'-F1 と SunLepR あるいは SunLep5'-F2 と SunLepR の間で PCR を行った。クローニングおよびシークエンスの方法は前述の 1-2-3a)から e)と同様に行った。

6) スunks *Lep* cDNA の相同性検索およびモチーフ検索

クローニングにより得られたコンセンサス塩基配列からスunks *Lep* cDNA のほぼ全長となる配列を構築した。このスunks *Lep* cDNA 配列を用いて相同性核酸配列検索プログ

ラム (Nucleotide BLAST; BLASTn, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) により相同性の高い遺伝子を検索した。また、スunks *Lep* cDNA のオープンリーディングフレームの予測には ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) を利用した。検索条件としては 75 塩基対以上の長さで、かつ入れ子構造にならない ORF を予測した。ORF 予測で候補となった領域のコードしているアミノ酸配列は、相同性および遠縁性を検索するために BLASTp プログラムの中の Position-Specific Iterated BLAST (PSI-BLAST) アルゴリズムを用いて検索を行った。

一般的にレプチンは分泌タンパク質であるためシグナルペプチド配列を有している。今回、スunksレプチンにおいてもシグナルペプチド切断部位の予測を SignalP 4.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) で行った。ペプチドの分子量および等電点 (pI) の計算は、ExPASy の Compute pI/Mw tool (https://web.expasy.org/compute_pi/) で行った。

7) スunks *Lep* mRNA 組織分布の解析

スunksの全身各組織における *Lep* mRNA の分布および発現を確認するために、様々な組織から抽出し DNaseI で消化した total RNA を使用して、RT-PCR により発現を確認した。

7)-a 逆転写反応 (1st-strand cDNA の作成)

今回の実験では定性的に *Lep* mRNA の発現の有無を確認するため、リアルタイム PCR ではなく、一般的な RT-PCR を利用して行った。1st-strand cDNA は、PrimeScript® RT 試薬キット (タカラバイオ) を用いて添付の説明書に従って合成した。

7)-b PCR と解析方法

Lep 遺伝子は、クローニングセクションに記載されたものと同じスunks *Lep* 遺伝子特

異的プライマー対 (SunLepF および SunLepR ; 2-2-3) で作成したもの) を利用し、607bp の PCR 断片を増幅した。逆転写反応の成否を確認する目的および各組織における cDNA 量が揃っていることを確認する目的で、ハウスキーピング遺伝子のグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (*Gapdh*) を内部標準として使用した。*Gapdh* 遺伝子の増幅には遺伝子特異的プライマー対 *GapdhF* (5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3') および *GapdhR* (5'-TCC ACC ACC CTG TGG CTG TA-3') を用い 452bp の PCR 断片を得た。PCR は、KAPA2G Fast HS ReadyMix with dye (Kapa Biosystems、Woburn、MA、USA) を利用し添付の説明書に従って実施した。

得られた PCR 産物は、2.0% (w/v) アガロースゲルで電気泳動を行い、Midori Green Advance (日本ジェネティクス、東京) で染色し、100bp DNA サイズマーカーと比較することで断片長を推定した。

2-3. 結 果

スンクスレプチンの cDNA クローニング

まず初めに、KAT スンクスのゲノム解析により構築されたスンクスゲノムデータベース (非公開) を利用し、すでにアノテーションされているスンクス *Lep* 遺伝子をキーワードで検索することで推定スンクス *Lep* 遺伝子の配列を取得した。ゲノム配列から推定された *Lep* 遺伝子はスンクスゲノムデータベース上に 3 個登録されているが、これは同じ遺伝子がスプライシング予測部位の違いによりエクソンの長さが異なって登録されているものであった。この 3 つの推定 *Lep* 遺伝子配列のうち保存されているコード領域内に PCR プラ

イマー (SunLepF および SunLepR) を設計し、予備的な RT-PCR を行った。

哺乳動物ではレプチン発現が最も多い組織は脂肪組織であるため、鋳型となる RNA を白色脂肪細胞から得た。スンクスは成獣になっても腹腔内にあまり脂肪組織が発達しないため、目視で確認できる明瞭な白色脂肪組織は鼠径部皮下組織、背部皮下組織そして腹腔内では生殖腺周囲脂肪組織に限定される (図 2-1)。今回は鼠径部皮下脂肪組織から抽出した total RNA を用いて cDNA 合成を行った。この cDNA を鋳型として PCR を行ったところ目的の 600bp 付近に増幅産物が得られたため、これをサブクローニングし塩基配列の決定を行った。この塩基配列で NCBI の BLASTn を実行したところ、他の動物種のレプチン遺伝子と非常に高い相同性が確認された。よってこの PCR プライマーの増幅産物は BK スンクス *Lep* 遺伝子の一部であることが確認できたので、3 回の独立した PCR を実施し、各 PCR から得られた 3 つのクローンの塩基配列を多重配列整列 (マルチプルアラインメント) することでコンセンサス配列を決定した。

Lep mRNA の 3'末端は 3'RACE 法によりクローニングを行い、塩基配列を決定した。一方で、最初にクローニングを行った PCR 断片の塩基配列が KAT のレプチン配列と相同性が高かったことから、5'末端はデータベース上の KAT スンクス *Lep* 遺伝子配列をもとにプライマーを設計し PCR を行ったところ、予想された大きさに増幅産物が得られた。そこで、5'末端は RACE 法を行わずに RT-PCR でクローニングを実施した。最終的には RT-PCR および 3'RACE で得られた全ての塩基配列をマルチプルアラインメントにより比較し、コンセンサス配列を決定することで完全なコード領域を含む BK スンクス *Lep* cDNA のヌクレオチド配列を決定した (図 2-2)。

確定した BK スンクス *Lep* cDNA の全塩基配列を使って、web 解析プログラムである ORF finder により ORF を検索した結果、15 ヶ所に ORF が予測された。この中で、cDNA の (+) 鎖側に ORF を持つ領域は 3 ヶ所であり、最も長いものが 143 番目から 655 番目までの 513 bp がコードする領域で 170aa からなるポリペプチドをコードしていると予測された。この配列を PSI-BLAST で検索したところ、相同性の指標となる Score および E-value の上位 100 位までの遺伝子はすべて他の動物種のレプチンであった。他の 2 つの ORF は 939 番目から 1106 番目の 168 bp (55aa) と 2839 番目から 2955 番目の 117 bp (38aa) であったが、どちらの配列も PSI-BLAST の検索では相同性の高いオーソログやモチーフは検出されなかったため、これらが主要な ORF となる可能性は低いと判断した。

以上より、今回得られた BK スンクス *Lep* cDNA は全長 3026 bp であり、142bp の部分的 5'側非翻訳領域 (UTR) と 2371 bp の 3'-UTR そして 513 bp の ORF から構成されていた。この 513bp の推定 ORF は、170aa のポリペプチドをコードしていると予測された。mRNA のポリ A 鎖付加に関わるポリアデニル化シグナル (aataaa) はポリ A 尾部の 15-20bp 上流に確認された (図 2-2)。

レプチンは分泌タンパク質であるため、SignalP プログラムによるシグナルペプチド切断部位の予測を行ったところ、他の動物種と同じようにスンクスレプチンにもシグナルペプチドが存在することが予測され、その切断部位は 21 番目のアラニンと 22 番目のバリンの間と推定された。

これらの結果より、BK スンクスレプチンは 170aa のレプチン前駆体として翻訳され、N 末端側に存在する 21aa のシグナルペプチドが切断された後、149aa が成熟レプチンとして

血中に分泌されると予想された。計算されたレプチン前駆体の分子質量は 18.9kDa であり、理論等電点 (pI) は 5.17 であった。また成熟レプチン (149aa) の分子質量は 16.4kDa と計算され、理論 pI は 4.98 であった。

本研究で決定した BK 系スunks *Lep* cDNA 配列は、日本 DNA データバンク (DNA Data Bank of Japan; DDBJ) にアクセッション No.LC432494 として登録した。

スunks *Lep* 遺伝子の組織分布

今回の実験では、スunks *Lep* 遺伝子の発現の有無を確認することを主眼としたため定量的な解析ではなく、定性的な解析となる通常の RT-PCR を用いて検討した。内部標準として利用した *Gapdh* 遺伝子は、すべての組織で 450bp 付近に増幅が確認された。一方で、*Lep* 遺伝子は鼠径部皮下、精巣周囲の白色脂肪組織および肩甲間褐色脂肪組織でのみ 600bp 付近に増幅産物が認められ、他の組織では増幅が見られなかった (図 2-3)。

2-4. 考 察

現在、研究での利用が多いスunksのラインは主に KAT とその変異体、または嘔吐感受性系 (JIC:SUN-Her および JIC:SUN-Ler) であるが、これらのスunksは体重も 30~50g 程度と小型である。本研究ではスunksの代謝解析モデル動物としての利用可能性を考える上で、分析に利用する血液および組織の採材可能量が少しでも多い方が利点となると考え、織田銚一博士の助言に従いスunksの中でも大型の BAN 由来である BK を実験動物として選択した。

また、現在進められているスンクスゲノム計画では KAT がゲノムの供与動物として利用されており、すでに蓄積されているゲノムデータも KAT 由来である。そのため、データベースに登録されている遺伝子情報が BK にどの程度適用できるかは不明であり、その点を確認する上でも本研究の遺伝子データは重要である。

今回、BK スンクスのレプチン構造を明らかにするために、BK スンクス *Lep* cDNA のクローニングを 3' RACE 法と通常の RT-PCR とを組み合わせることにより行った。

今回確定した BK スンクスの *Lep* cDNA は 3026 bp であり、コード領域と比較すると短い (142 bp) 5'-UTR と非常に長い 3'-UTR (2371 bp) を持つ構造であったが、これは他の哺乳動物のレプチン mRNA と比較しても同様な構造であることが確認された。

KAT スンクスゲノムが公表前のためデータは示さないが、データベース上の KAT スンクスゲノムに対して BK スンクス *Lep* cDNA を BLAST 検索した結果では、BK スンクスの *Lep* cDNA の 1 番目の塩基から 286 番目までの塩基で 97%の相同性 (1 塩基のギャップ)、286 番目から 1827 番目までの塩基で 96%の相同性 (9 塩基のギャップ)、そして 1848 番目から 2959 番目までの塩基で 98%の相同性 (1 塩基のギャップ) が得られ、塩基配列の保存という点では KAT と BK の間で極めて高い相同性が確認された。BK スンクス *Lep* cDNA で決定した 3'末端の配列 (2960 番目から 3026 番目の塩基配列) に関しては、スンクスゲノムデータベース上ではスンクス *Lep* 遺伝子配列として認識されていなかったが、この配列をクエリーとして KAT スンクスのゲノムに Blat 検索を行ったところ、推定 *Lep* 遺伝子の 3'末端下流に 95%の相同性 (5 塩基のギャップを含む) を持つゲノム配列の存在が確認された。よって、今回クローニングを行った BK スンクスの *Lep* cDNA 塩基配列は、KAT

スunksのゲノム上にも相同な配列が存在していることが確認でき、その相同性は 95～98%程度であることが明らかとなった。つまり、KAT の *Lep* 遺伝子と BK の *Lep* 遺伝子の間でも塩基の置換は起きているが、概ね保存されていることが確認できた。

レプチンのアミノ酸 1 次配列に着目すると、BK スunksおよびデータベース上の KAT 推定レプチン 1 次配列も、どちらも前駆体は 170aa から構成されていることが確認された。しかし、NCBI の GenBANK および PDB に登録されている哺乳動物のレプチン 1 次配列はほぼ全てが 167aa で構成されており、スunksのレプチンでは 3aa 多いことが判明した。

哺乳動物では、レプチンは主に脂肪細胞によって産生され、血中に分泌されるペプチドホルモンである。レプチンは主として全身のエネルギー状態を調節し、食物摂取量を調節する役割を担っている。しかしながら、脂肪組織以外にも胃や肝臓（肝星状細胞）での発現(19,44,45)や、心臓、胎盤および胎児組織においても低レベルでの発現が報告されている(46)。レプチンはまた、哺乳動物の肺の構造および機能的な発達のために重要であることも報告されている(47)。さらに哺乳動物以外では、より広範な組織に *Lep* mRNA の発現が見られる動物種もいる。例えば、両生類のカエルでは脳、下垂体および心臓において発現が最大であり、フグ科魚類であるトラフグでは、肝臓でのレプチン発現が認められている。

スunksは全身の脂肪組織が少ないため、皮下の白色脂肪組織が主要な脂肪蓄積部位となっている。今回も組織発現の検討に用いた白色脂肪は、比較的量が多い鼠径部白色脂肪組織を利用した。マウスおよびラットは体サイズがスunksと同程度であるが、大網、腸間膜、後腹膜、腹膜および心膜の白色脂肪組織は加齢とともに蓄積する。しかしスunks

では、これらの腹腔内領域における脂肪蓄積はほとんど認められず、唯一、精巣周囲の白色脂肪組織が肉眼ではっきりと確認できる量であった。また、BK スンクスは温暖なバングラディッシュが原産地であるため非冬眠性の動物であるが、げっ歯類のように肩甲間に褐色脂肪組織 (Brown adipose tissue; BAT) を有している。スンクスの BAT も脱共役タンパク質 (uncoupling protein 1; UCP-1) を発現し、余剰なエネルギーを熱として散逸させることが報告されている(48,49)。

このようにスンクスは他の哺乳動物よりも体脂肪が少ないので、循環レプチン濃度およびレプチンの生理的機能を維持するためにも、代替的に脂肪外組織での *Lep* 遺伝子発現が異所性に起こっている可能性も考えられたが、少なくとも BK スンクスでは他の哺乳動物と同様に白色脂肪組織および褐色脂肪組織の両脂肪組織でのみ発現が確認され、他の臓器における代償的発現は行われていないと考えられた。

2-5. 小 括

スンクス *Lep* cDNA のクローニングを行い、塩基配列を決定した。スンクス *Lep* cDNA は 170 aa のレプチン前駆体をコードしており、21 aa のシグナルペプチドが除去されて 149 aa の成熟レプチンとして血中に分泌されることが予測された。しかし、これまでに報告のある哺乳動物の成熟レプチンは 146 aa であり、スンクスでは 3 aa 多いことが判明した。

スンクスにおいても *Lep* 遺伝子の発現は、脂肪組織のみに限局しており、他の臓器での発現は確認できなかった。

以上より、スンクスの 1 次配列および組織分布は、これまでに報告のある他の哺乳動物

に類似しており、大きな違いとしてはスunks成熟レプチンの長さが 3aa 長いことであつた。

表 2-1 スunks飼料（ます類育成用配合飼料 5p）の成分含量

成 分	含 量
粗タンパク質量	45.0%以上
粗脂肪	3.5%以上
粗繊維	3.0%以下
粗灰分	16.0%以下
カルシウム	1.60%以上
リン	1.20%以上

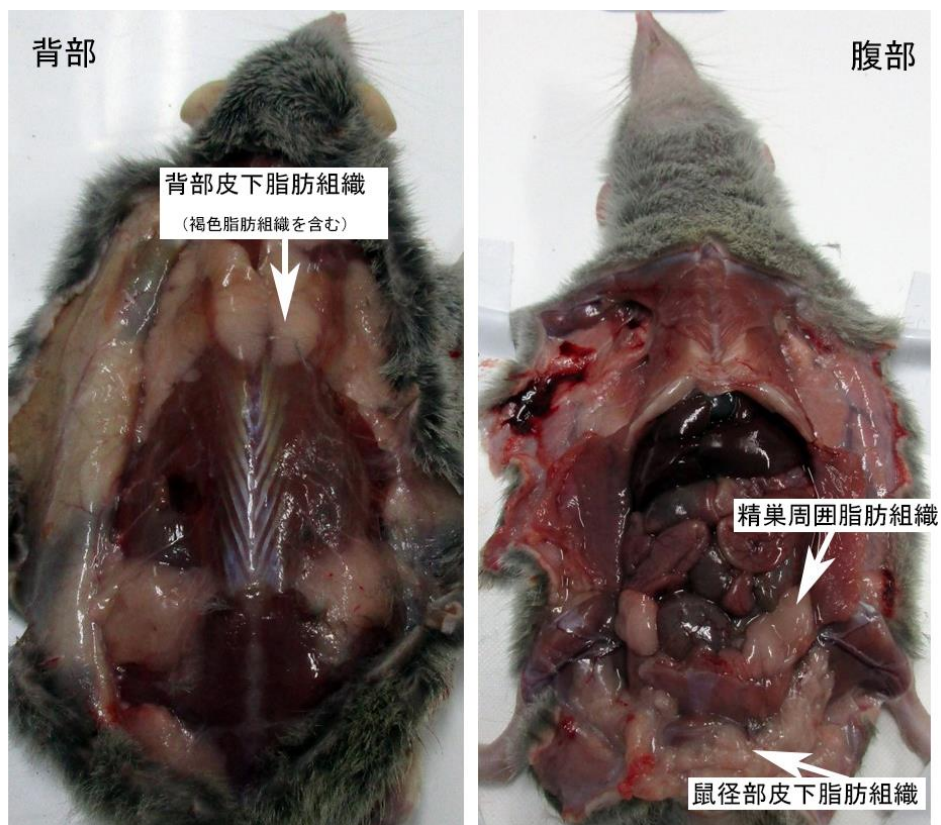


図 2-1 スンクスの背部皮下脂肪組織および腹腔内脂肪

背部皮下（左側）では散在的に皮下脂肪組織が確認できた。肩甲間の脂肪組織には褐色脂肪組織が含まれていた。腹部皮下および腹腔内（右側）では、鼠径部皮下の脂肪組織が比較的に見られたが、腹腔内には内臓脂肪がほとんど認められず、唯一目視可能なのは生殖腺周囲脂肪組織のみであった。臓器を取り除いても、後腹膜脂肪組織は確認できなかった。

```

-142                                     gccggcatgtagccccgggag
-120 acttcagcagcagcttcgaggcgctcctctcctcttgggtggccttgctgggtg
- 60 gtcacagccactcactccactgagaacaaagcccaagcccaaccaggaagaacg
1  atgcactgtgggttctgtgcccgatcttgggtgcttggccttatctgtcttccatagaa
   M H C G V L C R F L V L W P Y L S S I E      20
61 gccgtgcccatccgcaatgtccaggatgacaccaaaccctcatcaggacgattatcacc
   A V P I R N V Q D D T K T L I R T I I T      40
121 aggatcattgatattccacacgcattctgtctcctccaagcagagagtcactggctctg
   R I I D I S H T H S V S S K Q R V T G L      60
181 gattttatccctggacttcacctgacctgagctgtctacgatggaccacacactggcc
   D F I P G L H P D L S L S T M D H T L A      80
241 acctaccaacagatcctagccagctctgcttccaaaaacctggctccagatcaccaatgac
   T Y Q Q I L A S L P S K N L V Q I T N D      100
301 ctggagaacctctgtgacctcctccactgctggctacctccaggagctgcccttgccc
   L E N L R D L L H L L A T S R S C P L P      120
361 cagggtgccccaggctcaggaactgcagacattggagagcctggatggggctcctggaagcc
   Q V P Q A Q E L Q T L E S L D G V L E A      140
421 tcaactctctccacagaggtgggtggcctgagcaggctcagggtctctgcaggacatg
   S L F S T E V V A L S R L Q G S L Q D M      160
481 ctgcagcagctcgacctgacctgggtgctgagacctcagatctctcctaccctcc
   L Q Q L D L D P G C *                          170
541 caagaactaaagtgtgaaagagaagcctgagctctccaggagaagcagcctgcaaggcctg
601 cctttcccaggaacttggcttgggttttcaactcattcactatgccctcttccaaaggct
661 gaggtccaggcacaaaagcaggggggacatcggtgatatttctcctggctggctagtt
721 gtatggcctgtgggtactcagcagcatctagcctattctgtctcccctcactgcactccc
781 atctgtctatgcactatgttttggaaagcagggacacagttttgaaacatcagagaag
841 ggttccatctaaagaattgggtgtgcatctgtctgctacatcccaacacacagctggaa
901 actcctaaatcacacaagttgggaagctcttattatgatgtatttctctgcatggat
961 gtgaagcagaacttggccttattcccatctctatgggggtgggggtgggggtgaggggccc
1021 tggcagagccaggctgtgcctgggttttcaatcccatgggtggggctggctgagaaaaa
1081 ctcaaggacttgagttaccatcaggacaattctcttcaagtggttgggttctaccatgta
1141 ctgatccaagtgcagcctttgcaatggcattgctctgagcagatctcgggtggccaag
1201 ttattttaaagagatgaaatttgtcaagagtaataatagctgggtataccagagg
1261 tgggaataggtgtgggtgagaggtggaagaccagaataatctctgaaataatgtttg
1321 gaagggggcactcctggaatggcatgaggagcctctgctgctcccctgtcaagaattctt
1381 agagtcccatgaaactcatgtaggagctgggtctccaggggtgagggagcatgtgtg
1441 atttttttcaggtgcccattaggaagcaggactgaagctgaagcccaggctgggcaga
1501 gggcttggcttttgcatactgctaaagggaggtttattctagcttataggggtgctcata
1561 ccagcagtgattgcccagagcaacagactttgggtggggcctatgggggtgatttccatgc
1621 tgggtggccacaagaagctctacttgggggtgctgtctgattcagttctcccctg
1681 actggcttttttttttttttttgcacttgcaccaagcceaatecaggcttcccacatc
1741 agttcatggaaggtgaaatcaaggagcggggagggctgtgagctttagcggatggcccaa
1801 gatggctgaggaatccctctcctgcaagaactcataggatgaaaggtgagaagaaggtc
1861 tgggtgtccctactcactcagatagcagccaccctctgaggggtctagctgtgtcc
1921 tggaaatggaaatccaagtgtccagcctgggtctcagattccacaaggggtggtgggtacc
1981 aaggggtattctgggtcagcatgctcactgagacataaaaaccaattctacattcag
2041 acgcttgtctctgagtgctaaatcgactcttgcaaaaactggcatttactagggcaa
2101 cccagtgtgaaggtgagggagcccaaggggcactcactgttcttagtagcattttaca
2161 atccagggcacatctgcctctgtgctgtggcaacaggtttgaagtaggacacttgagga
2221 ttgaaaaatcttaataaagctgagacggctcagtgaggtgttttaactaagaagaagcc
2281 aggggtgaggaatcctgggggcaaaaggaatccaatgagacaggggtgagagcaggggtgga
2341 caggggtgagcaggtgaaatttagggaaatggggaggggtgaggaagtgataatgtgga
2401 ggagtggagaagtggaattttatgggtgctgaggtgagcaactggctcacaagaaaaac
2461 aaagaaaaggcattgggcaggaagagatgcttggaaaggcctcagaaccattaaagag
2521 ctaaaaatctaggatgggtatggaaatggtatgactgaaatcaactatgaacaatgt
2581 tctttactctgtagctcaggtgacttaataatgaaatttttggaaagggaaaaacgt
2641 tgaaggtcaggaatagctcaggagatggacagggcaagccactctgtgggaaattatga
2701 tcaagaccatcagggcattgcccaggttgggggtgttttaagcttctgtcttaacaaaat
2761 ctaaaaactgccactctggctcattctcagagtgtagacacttcaaaaataaagtgattt
2821 ttaaatgtaactttaaattgttttgggttggtttttaaaaatccaataaaatgctcctata
2881 cccc

```

図 2-2 BK 系スルクス (*Suncus murinus*) の *Lep* cDNA の塩基配列および推定アミノ酸

配列 上段に *Lep* cDNA の塩基配列を、下段には予測されるアミノ酸配列を 1 文字コードで示した。左

側の数字は塩基数、右側の数字はアミノ酸残基数を表す。開始コドンおよび終止コドンは赤字で示し、終

始コドンのアミノ酸は (*) で表記した。推定シグナル配列 (21 塩基対) は下線で示した。予想されるポ

リ (A) シグナル (aataaa) は二重下線と黄色で表示した。

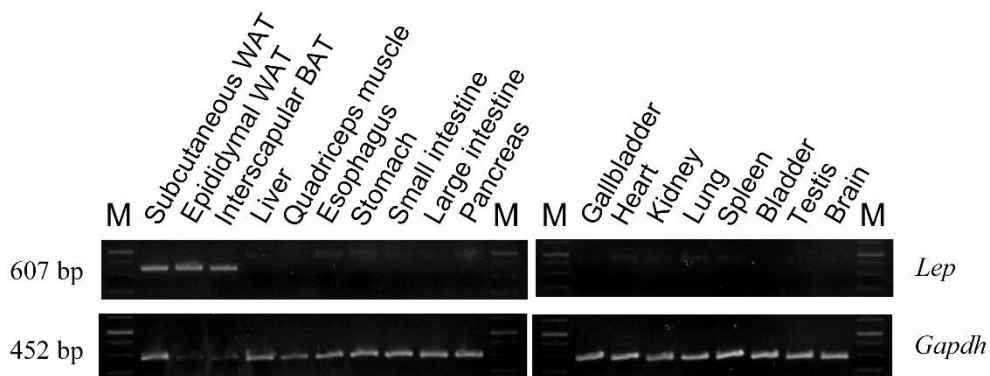


図 2-3 スンクスにおける *Lep* mRNA の組織分布

鼠径部皮下および精巣周囲白色脂肪組織、肩甲間褐色脂肪組織、肝臓、大腿四頭筋、食道、胃、小腸、大腸、膵臓、胆嚢、胆嚢、心臓、腎臓、肺、脾臓、膀胱、精巣および脳の各組織から抽出した RNA を鋳型として RT-PCR を行った。増幅産物は 2.0% アガロースゲル電気泳動を行い、Midori Green で染色した。上段は *Lep* 遺伝子 (607 bp) の結果を示す。下段は内部標準としての *Gapdh* 遺伝子 (452 bp) であり、全ての組織において増幅を確認した。遺伝子名は右側、PCR 産物のサイズはそれぞれ左側に示した。M :

100bp DNA サイズマーカー

第3章 スンクスレプチンの分子系統解析

3-1 緒 論

cDNA クローニングにより BK スンクスレプチン前駆体のアミノ酸 1 次配列は 170aa で構成されていることが明らかとなった。しかしこれまでに報告のある哺乳動物のレプチン前駆体および GenBANK、DDBJ、PDB などの公開データベースに登録されている哺乳動物のレプチン前駆体は、ほぼ全てが 167aa で構成されている。

そこで BK スンクスのレプチン前駆体 1 次配列が他の哺乳動物のレプチンとどの程度の相同性があり、また挿入されている 3 aa がどの部位に、どのように挿入されているのかを明らかにすることを試みた。また、そのアミノ酸の挿入が、なぜ生じたのかを明らかにするために、挿入アミノ酸残基に相当する部位の塩基配列を確認し、他の哺乳動物との相違点を検索することにした。

スンクスの属する真無盲腸目（食虫目）は系統分類学的には哺乳類（有胎盤類）の基部に位置し、哺乳動物の系統進化の上では大変重要な動物群であると言える。レプチンに見られる 3aa の挿入が、分岐後に獲得されたものなのか、あるいは他の哺乳動物がこれらのアミノ酸を欠損したことで進化を遂げたものなのかを明らかにする手がかりにもなる可能性がある。

スンクスの体脂肪が少ないにも関わらず、脂肪萎縮症のような代謝異常を生じない理由として、この 3 アミノ酸の挿入がレプチン 2 次構造および高次構造にどのような影響を与える可能性があるのかについても検討することにした。

3-2 材料および方法

1) レプチン1次配列の多重比較

分子系統解析を行うためにデータベース上のレプチン1次配列の多重配列整列（マルチプルアラインメント）を行った。アラインメントにはMolecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) ソフトウェア（MEGA X）に搭載されている塩基配列あるいはアミノ酸配列の汎用多重配列整列プログラム ClustalW を用いて行った(50)。比較する配列対象は前駆体レプチンとし、マルチプルアラインメントに用いた動物種、アクセッション番号、アミノ酸残基数（aa）はそれぞれ、ウマ *Equus caballus* (NP_001157452; 167 aa)、ブタ *Sus scrofa* (NP_999005; 167 aa)、ウシ *Bos taurus* (NP_776353; 167 aa)、ヒト *Homo sapiens* (NP_000221; 167 aa)、マウス *Mus musculus* (NP_032519; 167 aa)、ラット *Rattus norvegicus* (NP_037208; 167 aa)、ヨーロッパトガリネズミ *Sorex araneus* (XP_004608342; 165 aa)、イヌ *Canis lupus familiaris* (AB020986; 167 aa; (51))、ネコ *Felis catus* (AB041360; 167 aa; (52)) であった。

2) 挿入塩基配列の検索

スルクスレプチンの1次配列比較において見出された挿入 3aa を明確にするために、その領域を含む前後の塩基配列をマルチプルアラインメントで比較を行った。比較に用いた塩基配列は、ヨーロッパトガリネズミ（XM_004608285）、ヒト（NM_000230）、ウマ（NM_001163980）とした。アラインメントにはMEGA X の ClustalW を用いた。塩基配列のアラインメントを実施後、3 アミノ酸領域付近のデータを目視で確認しながら gap の妥当性を検討・修正するとともに、前後の不要な塩基配列の除去を行った。

3) 系統樹の作成

より詳細な系統樹解析を行うために、3-2-1)のマルチプルアラインメントで使用した動物種の他に、チンパンジー *Pan troglodytes* (NP_001180601; 167 aa)、アカゲザル *Macaca mulatta* (NP_001036220; 167 aa)、ハイイロジネズミオポッサム *Monodelphis domestica* (XP_001366398; 167 aa)を追加してマルチプルアラインメントを再度解析し直した。アラインメントには MEGA X の ClustalW を用い、得られたアラインメントデータを目視で確認しながら gap の妥当性を検討し修正を行った。

系統樹の作成は距離行列法である近隣結合法 (Neibor-joinig method; NJ 法) で実施した。系統樹の信頼性評価はブートストラップ法を用い、繰り返し回数は 1000 回とした。進化距離とは座位当たりのアミノ酸置換数であり、ここではポアソン補正法を用いて計算した。NJ 法で作成した系統樹は無根系統樹となるため、外群としては有袋類であるハイイロジネズミオポッサムのレプチン配列を置いた。

3-3 結果

レプチン 1 次配列の多重比較

まず、スunksレプチン前駆体のアミノ酸 1 次配列 (170 aa) を、代表的な哺乳動物であるラット、マウス、ヒト、ウマ、ウシ、ブタ、ネコ、イヌの各レプチン前駆体と比較した。この比較にはスunksと同じトガリネズミ目トガリネズミ科 (Soricidae 科) トガリネズミ亜科に属しているヨーロッパトガリネズミ (*Sorex araneus*) のレプチン 1 次配列も加えた。ただしヨーロッパトガリネズミはトガリネズミ属 (*Sorex*) であり、スunksはジャコウネズミ属 (*Suncus*) に属している。

図 3-1 に示すようにアミノ酸 1 次配列のマルチプルアラインメントでは、これらの動物種間でレプチン前駆体は高度に保存されており、スunks との間の相同性はラット (77%)、マウス (77%)、ヒト (75%)、ウマ (82%)、ウシ (80%)、ブタ (80%)、ネコ (78%)、イヌ (76%) およびヨーロッパトガリネズミ (81%) となっていることが確認された。図 3-1 から判るように、スunks レプチン前駆体は 170 aa で構成されているのに対し、他の哺乳動物では 167 aa で構成されている。一方、ヨーロッパトガリネズミでは他の哺乳動物よりもさらに 2 aa 少なく、スunks と比べると 5 aa も少ないことになる。しかし、ヨーロッパトガリネズミでのみ見られる 2 aa の欠失は、シグナルペプチド内に存在するため、成熟レプチンとしては他の哺乳動物と同じ 146aa になることが予想される。

スunks レプチンに見られる 3 アミノ酸の挿入配列は、アミノ酸配列のアラインメント結果からは P_{QV} または P_{QA} のどちらかであると推定された。しかしどちらの挿入配列がより妥当性があるかを確認するために、この領域の塩基配列アラインメントを再検討した。この塩基配列アラインメントには、ヒト、相同性が最も高かったウマ、そしてスunks の近縁種であるヨーロッパトガリネズミの *Lep* 遺伝子の塩基配列を使用した (図 3-2)。

塩基配列アラインメントの結果からスunks *Lep* 遺伝子の塩基配列に着目すると、挿入された 3aa に対応する塩基配列領域に隣接して、全く同じ 9 塩基対が 5'側上流領域に存在することが確認された。図 3-2 に示すように、119 番目のロイシン (L₁₁₉) をコードするコドンの第 2 塩基 (T) から、122 番目のバリン (V₁₂₂) をコードするコドンの第 1 塩基 (G) までの 9 塩基配列 “TGCCCCAGC” が、その直後に再び現れることが判明した。

つまり本来のアミノ酸 1 次配列は L₁₁₉-P₁₂₀-Q₁₂₁-A₁₂₂ であり、この 1 次配列をコードする

塩基配列は 5'-TTG CCC CAG GCT -3'であったものと推定されるが、スunksでは 122 番目のアラニン (Ala₁₂₂) コドンの第 1 塩基と第 2 塩基の間に 9 塩基配列 “TGCCCCAGG” が挿入され、結果として部分的なフレームシフトが生じたものと思われる。よって、5'-TTG CCC CAG GCT -3'の配列が 5'-TTG CCC CAG G (TG CCC CAG G) CT-3'へと変化し、その結果、アミノ酸配列も L₁₁₉-P₁₂₀-Q₁₂₁-(V₁₂₂-P₁₂₃-Q₁₂₄)-A₁₂₅ に変化したと考えられる。すなわち、スunksレプチンに見られた 3aa の挿入は、VPQ であると判断された。

次にレプチンアミノ酸 1 次配列を比較することで、既知のレプチン立体構造保持に必要なモチーフが保存されているかを確認した。図 3-1 において最上段にヒトレプチンの 2 次構造を示した。このアラインメントにあるように全てのレプチンが 21aa からなるシグナルペプチド配列をアミノ末端に保持していることがわかる (ただしヨーロッパトガリネズミは 19aa)。

レプチンはクラス I ヘリカルサイトカインに属し、その三次構造はヘリックス A から D と命名された 4 つの α ヘリックスの存在によって特徴付けられる。ただし他のサイトカインと異なるのは、CD ループの間に小さなヘリックス E を有する点である。ほとんどのクラス I ヘリカルサイトカインでは、この 4- α ヘリックスバンドルはジスルフィド架橋によって安定化されている。ヒトレプチンで見出されているジスルフィド架橋形成に必要な 2 つのシステイン残基 (図 3-1 中の矢頭で示してある) は、今回アラインメントに用いた全ての動物種で保存されていた。以前の報告にある、レプチン受容体との結合に重要な部位も保存されていることが確認された。

前述のように、スunksおよび同じトガリネズミ亜科に属するヨーロッパトガリネズミ

ではレプチン前駆体の1次配列に他の哺乳動物とは異なる挿入や欠失が認められる。これらの違いが進化的にどのような関わりを有しているのかを推測するために、レプチン前駆体の1次配列を用いて進化系統解析を行った。

この解析では哺乳動物の有胎盤類を解析の対象とし、哺乳動物ではあるが有袋類のハイロジネズミオポッサムのレプチンを外群に設定した。また、霊長類での進化を詳しく見るために、ヒトだけでなくチンパンジーおよびアカゲザルのレプチンも解析に加えた。

図3-3のように、トガリネズミ亜科（食虫目）と他の哺乳動物は初期に分岐していることが示された。また、食虫目と分岐した後に、霊長類とげっ歯類、そして奇蹄類、偶蹄類、食肉目の2つのクレードに分岐したことが確認された。

一方、トガリネズミ亜科の中でもスルクスとヨーロッパトガリネズミは進化の初期に分岐したと推定された。

3-4 考 察

BK スルクスレプチンのアミノ酸1次配列と、他の動物種、特にヒトを含む哺乳動物のレプチンを比較するために、アミノ酸1次配列のマルチプルアラインメントを行った。シグナルペプチドも含むレプチン前駆体のアミノ酸配列比較において、スルクスレプチン前駆体との相同性は霊長類（ヒト）が75%と最も低く、次いで食肉目（ネコ、イヌ）の76～78%、げっ歯類（マウス、ラット）の77%、と、偶蹄類（ウシ、ブタ）の80%、そして最も高い相同性を示したのは奇蹄類（ウマ）の82%であった。一方、スルクスの近縁種であるヨーロッパトガリネズミは81%と高い相同性を示したが、ウマよりも低い値となった。

しかし、この相同性の比較ではギャップも含んだ配列での比較を行ったため、その部分が低く計算されたものと思われる。全体的に判断すると、スンクスを含む哺乳動物種では70%以上の相同性で保存されており、レプチンの持つ生理的機能の重要性が予想される。

一方で、データは示さないが KAT スンクスのレプチン 1 次配列 (170 アミノ酸配列) と BK スンクスのレプチン 1 次配列 (170 アミノ酸配列) を比較したところ、相同性は 96% であり、BK スンクスの 4 ヶ所のアミノ酸に置換が確認された。そのうちの 3 ヶ所は同じ性質のアミノ酸同士の置換であったが (V24I、H 25R、V39I)、残る 1 ヶ所は KAT でスレオニン (T) であるところが BK ではイソロイシン (I) に置換されていた (T43I)。

今回の解析により注目される点は、アラインメントの結果 (図 3-1 および 3-2) で示したように、スンクスではレプチン配列内に他の動物では見られない、連続する 3aa が挿入されていることが判明した点である。データは示さないが、同様な挿入は他の哺乳動物のみならず、GenBank 等のデータベースに登録されている脊椎動物のレプチン配列にも認められず、スンクスレプチンに特有のものであることがわかった。加えて近縁種であるヨーロッパトガリネズミのレプチンにも、この挿入は認められないことから、少なくともジャコウネズミ属のスンクスのみが持つ特徴であると予想された。

この 3aa の挿入を詳しく調べるために、塩基配列レベルでのアラインメント比較を行ったところ、アミノ酸挿入部位に相当するヌクレオチド配列のすぐ上流に全く同じ 9 塩基配列が存在することが判明した。恐らくこの 9 塩基の配列が DNA 複製の際などに何らかの理由で挿入され、繰り返し配列になったものと思われる。

Taylor らは、ヒト、マウスおよびラットのゲノムに見られる挿入の大部分（52%）が、挿入または欠失配列に直接隣接する配列と同一の配列を有することを報告している(53)。このようなゲノム DNA 中に認められる塩基配列の挿入や欠失は、まとめてインデル(indels)と呼ばれている(54)。その中で特に 1~50 塩基対の変化を生じるインデルのことはマイクロインデル (microindels) と定義されている(55)。今回、BK スンクスおよび KAT スンクスで見られた 9 塩基 (3aa) の挿入は、このマイクロインデルに該当するものと思われる。隣接する配列が挿入された配列と同一である場合、このインデルはスリップ (slippage) と考えられる(53)。つまり、BK スンクスで見られた 9 塩基対の挿入配列は、その直前の 5'側に全く同じ配列が存在することから考えて、スリップにより上流の 9 塩基対が挿入されたものと考えられた。

非コード領域で生じるマイクロインデルとは対照的に、タンパク質コード領域内のマイクロインデルは重要であり、挿入塩基の数や長さによっては致命的となる場合がある。つまり、挿入されたインデル長が 3 の倍数にならない場合は、それ以降のアミノ酸配列でフレームシフトが生じ、タンパク質の機能が失われる可能性が高い。また、仮に 3 の倍数のインデルであったとしても、その中に終止コドンが含まれる、あるいは新たに終止コドンを生じさせる場合には、やはりタンパク質の構造に大きな影響を与える。

今回の BK スンクスで見られたマイクロインデルでは、9 塩基対の挿入（つまり 3 の倍数）となるため、フレームシフトは起こらず挿入配列以降のアミノ酸配列に変化は認められない。また、挿入配列が新たな終止コドンを生じなかったのでナンセンス突然変異になることもなかった。

レプチンは、成長ホルモン、プロラクチン、エリスロポエチンなどと同じクラス I ヘリカルサイトカインに分類される。ヒトレプチンでの X 線結晶構造解析の結果から、レプチンは 4 つの α ヘリックスが密に存在する 4-ヘリックスバンドル構造を取ることが報告されている(5)。クラス I ヘリカルサイトカインの構造では 4 つの α ヘリックスのトポロジーが up-up-down-down という配置になっていることが特徴として挙げられる。このようなヘリックスのトポロジーとなるため、 α ヘリックス A と B を繋ぐ A-B ループ、そして C と D を繋ぐ C-D ループが長くなり、逆にヘリックス B と C は逆平行となるため B-C ループが短くなる。レプチンでは長い C-D ループの途中で短いヘリックス E が存在する。

脊椎動物のレプチンは、1 次構造の相同性にはかなりの幅があるが、その予測される 2 次および 3 次構造はヒトレプチンと非常に類似していることが知られている。クラス I ヘリカルサイトカインの例で説明されているように(5)、突然変異により 1 次構造が変化してもタンパク質の 2 次、3 次構造が維持されている限り、基本的な生理機能が維持されていくものと考えられている。

図 3-1 に見られるように、スルクスレプチンも 2 次構造として A、B、C、D の 4 つの α ヘリックス構造を有し、3 次構造の維持および生理活性に必要な 2 つのシステイン残基が保存されていた(56)。

レプチンの受容体との結合部位は、突然変異を導入した組換えレプチンを用いた実験により解析されている。受容体との相互作用に重要な部位は 3 ヶ所あり、部位 I はヘリックス D 上に、部位 II はヘリックス A および C 上に、部位 III はヘリックス D の N 末端上に存在する。今回の解析の結果からは、ヘリックス A および C に存在する部位 II の構成に

必要なアミノ酸はスルクスレプチンでも保存されていることが確認された（図 3-1 中の赤色背景のアミノ酸）。これ以外にも、受容体との結合に重要なアミノ酸は高度に保存されており、例えば AB ループ上にある 6aa の配列 GLDFIP は哺乳動物間で高度に保存されている。この LDF または LDFI 配列は受容体結合部位の一部ではないが、すべてをアラニンに置換した変異体レプチンでの実験により受容体に結合しても活性を示さないアンタゴニストとして作用することが報告されている。

合成ペプチドを用いた実験では、スルクスで VPQ の挿入が見られた部位に相当する CD ループ上の配列を合成し ob/ob マウスに投与したところ著しい摂食量の低下と体重減少が認められている(57)。つまり、この CD ループは受容体の結合部位ではないが、レプチンの生理作用に重要な働きを持っていることが判る。このことから推測しても、スルクスの持つ VPQ の挿入変異が何らかの生理活性を示す可能性が伺える。

トガリネズミ科（以前の食虫目）に属するスルクスは、系統学的にはラットなどのげっ歯目あるいはウサギなどの重歯目とは異なり、哺乳動物の初期に分岐したと考えられており、霊長類およびげっ歯目の共通の祖先としての特徴を保存していると思われる(58)。今回はスルクスレプチンが進化系統的にどのような位置付けになるのかを確認するために、レプチン前駆体のアミノ酸 1 次配列を用いて進化系統解析を行った。比較に用いた動物種としては、霊長類としてヒト、チンパンジーおよびアカゲザル、げっ歯類としてラットおよびマウス、奇蹄類としてウマ、偶蹄類としてウシおよびブタ、ネコ科（食肉目）としてネコおよびイヌ、そしてトガリネズミ科（食虫目）のスルクスおよびヨーロッパトガリネ

ズミである。今回用いた NJ 法は無根系統樹なのでアウトグループ（外群）として有袋類であるオポッサムのレプチン配列を使用した。

哺乳動物でみられるレプチン進化系統解析の結果は、構成されるクレードや分岐点、進化距離などは概ね以前の報告(59,60)と同じであった。従来の解析ではトガリネズミ科（食虫目）のデータが不十分であったが、今回用いたスunksおよびヨーロッパトガリネズミの結果からも、霊長類やげっ歯類が進化の初期に食虫目から分岐して進化したことが裏付けられた。

アミノ酸配列に見られた VPQ の挿入は、近縁種であるヨーロッパトガリネズミには見られなかった。つまりトガリネズミ亜科以下でトガリネズミ属とジャコウネズミ属への分岐以降にジャコウネズミ属が獲得した変異であると考えられる。このことからトガリネズミ属とジャコウネズミ属が進化系統樹的にはトガリネズミ亜科に分岐後、早い時期にさらに分岐したことを裏付けている。データには示さないが KAT スunksの推定レプチン配列にもこの3アミノ酸の挿入が認められることから、ジャコウネズミ属の中で、少なくとも KAT が獲得した挿入変異であると考えられる。今回の実験では純粋な BAN の遺伝子が入手できなかったので、BAN がこの変異を有しているのかを確認することはできなかった。よって BK スunksで見られる挿入変異が KAT に由来するものであるのか、あるいは BAN もこの変異を保持しているものであるのかは現時点では不明である。今後、このスunksレプチンの変異を調べることで東南アジア地域のスunksがどのように分布していったのかを知る手がかりにすることも可能と思われる。

3-5 小 括

アミノ酸配列のマルチプルアラインメントより、BK スンクスレプチンは他の哺乳動物とも 75~82%と高い相同性が維持されていることが確認された。しかしスンクスレプチンには他の哺乳動物には見られない 3 aa の挿入が認められた。この挿入は *Lep* 遺伝子上で 9 塩基対の配列が、slippage によるマイクロインデルのために挿入されたと推定され、その結果として VPQ のアミノ酸が CD ループ内に挿入されることとなった。進化系統樹解析では、これまでの報告と同様にスンクスは進化の初期に霊長類とは分岐し、別のクレードを形成したことが確認された。今回見つかったアミノ酸の挿入はトガリネズミ科のクレードを形成してから、ジャコウネズミ属のスンクスのみが獲得した変異と考えられる。

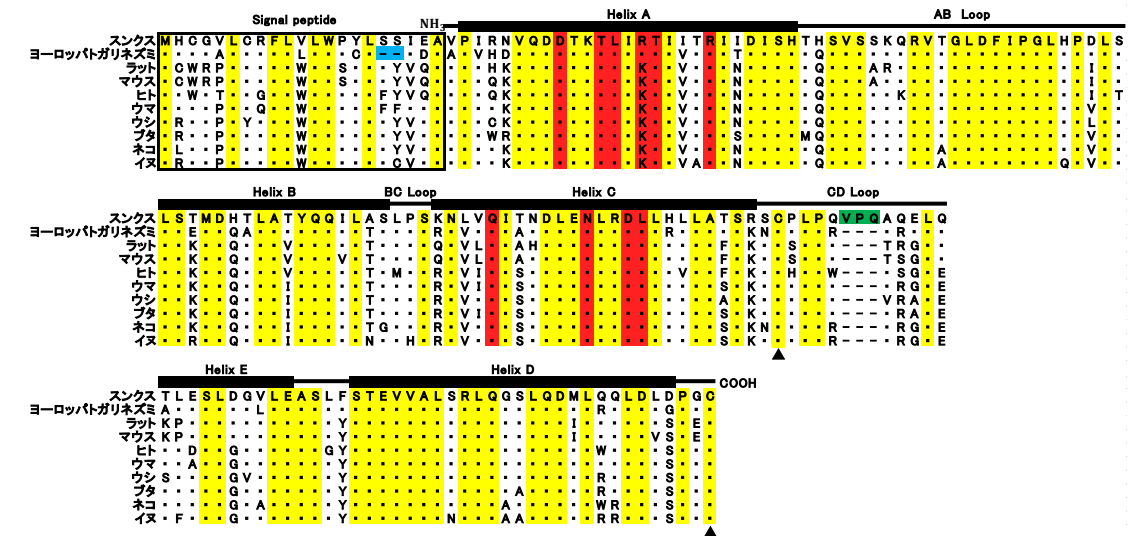


図 3-1 スヌクスおよび代表的な哺乳類の間でのレプチンアミノ酸配列のマルチプルアライメント

ClustalW を用いてアミノ酸配列のマルチプルアライメントを行った。すべての配列に見られる同一のアミノ酸残基はドット (.) で表し、gap はダッシュ (-) で示した。推定シグナル配列は黒枠で示した。全ての動物種で保存されている残基は黄色背景で示している。レプチン受容体への結合に重要とされるアミノ酸残基は赤色背景で示される。立体構造の形成に必要とされる 2 つのシステイン残基は矢頭で示した。スヌクスのみに見られる 3 つのアミノ酸残基 “VPQ” は、緑色背景で示した。ヒト成熟レプチンの 2 次構造を配列アラインメントの上を示した。

	S	R	S	C	P	L	P	Q	(122) V	(123) P	(124) Q	A	Q	E	L	
House musk shrew	T	C	A	G	G	A	G	C	T	G	C	C	C	A	G	G
Common shrew	T	C	A	A	G	A	A	C	T	G	C	C	C	C	G	G
Horse	T	C	A	A	G	A	G	T	T	G	C	C	C	C	A	G
Human	T	C	T	A	A	G	A	G	C	T	T	G	C	C	C	T

図 3-2 VPQ 挿入部分に相当する塩基配列のマルチプルアラインメント

レプチンの部分的な塩基配列を整列させた。ほとんどの動物で保存された 9 個のヌクレオチド配列は、黄色の陰影で示されている。直後に現れる同じ 9 個のヌクレオチドは赤いボックスで囲んだ。

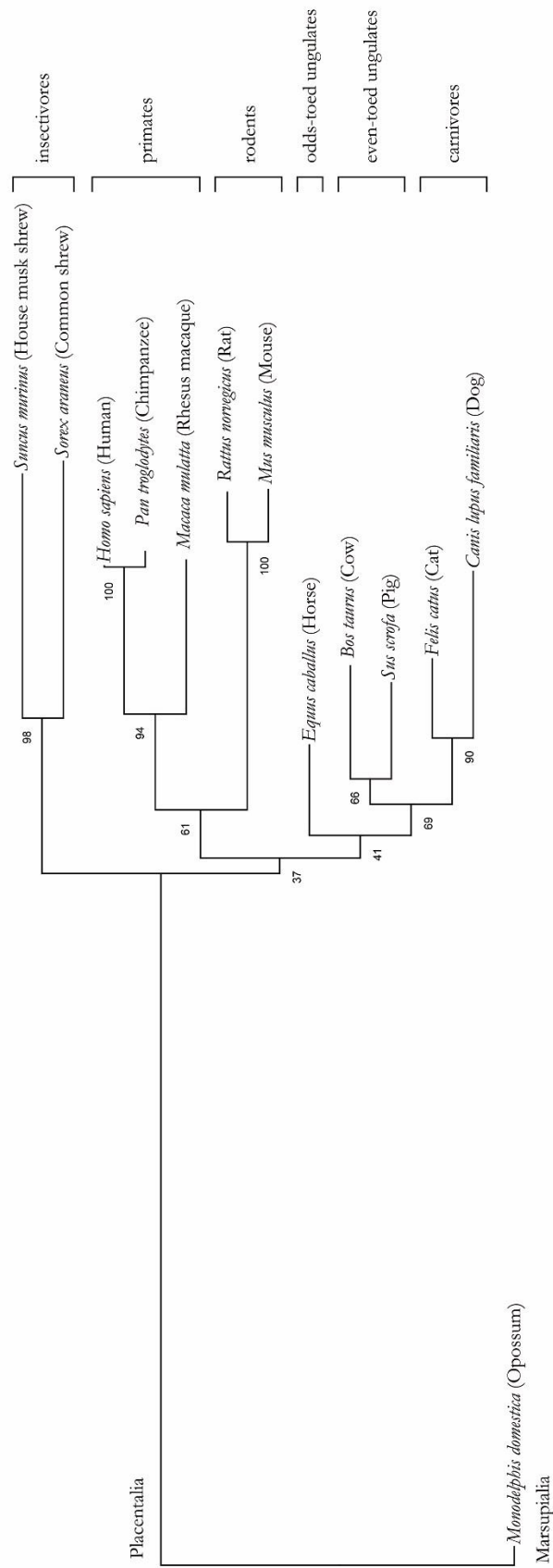


図 3-3 近隣結合法 (NJ 法) に基づくレプチンアミノ酸配列の進化系統樹解析 (前ページ)

系統樹の作成は距離行列法である近隣結合法 (Neighbor-joining method; NJ 法) で実施した。系統樹の信頼性評価はブートストラップ法を用い、繰り返し回数は 1000 回とした。進化距離とは座位当たりのアミノ酸置換数であり、ここではポアソン補正法を用いて計算した。外群としては有袋類であるハイイロジネズミオポッサムのレプチン配列を置いた。解析は MEGA X(50)を用いて行った。

第4章 スンクスレプチンの構造解析

4-1 緒 論

第3章で考察したようにスンクスレプチンには他の動物には見られない3aa “VPQ”の挿入が認められる。2次構造予測では挿入断片はCDループ領域に存在するが、このCDループは以前の報告からレプチンの作用に影響を与える部位であることが明らかとなっている。1次構造および2次構造から推測すると、スンクスレプチンの3次構造はヒトレプチンと同じクラス1ヘリカルサイトカン、すなわち4- α ヘリックスバンドルを持つ立体構造を形成すると予測される。そこで既にX線結晶構造解析により詳細な解析が行われているヒトレプチンをモデルにし、スンクスレプチンの1次配列から立体構造予測を行い、スンクスレプチンの構造上の特徴を検索することにした。

特にスンクスレプチンはCDループに3つのアミノ酸残基が余計に付加されていることから、これらのアミノ酸が立体構造にどのような影響を与えるのか興味を持たれる。合成ペプチドを用いた *in vivo* 実験により、このCDループ部のペプチドはレプチンのアンタゴニストとして働き、*ob/ob* マウスの体重増加を抑制する働きをすることが報告されている(57)。

立体構造予測によりスンクスレプチンに特異的な構造が見つければ、それがスンクスにおけるレプチン作用の特徴となる可能性がある。

4-2 材料および方法

1) BK スンクスレプチンの立体構造モデルの作成

スンクスレプチンの立体構造予測は、SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) のホモロジーモデリングにより行った。成熟 BK スンクスレプチン (149aa) をクエリーとして、自動モードで BLAST および HHblits により適切なテンプレートの同定を行った。今回の結果では、BLAST、HHblits とともに Human obesity protein, leptin (PDB : 1AX8) が 1 番目の候補となった。このヒト *ob* タンパク質をモデルに、スンクスレプチンの立体モデルを表示した。得られた立体モデルは PDB フォーマットで保存した。

2) ヒトレプチン (1AX8) 立体構造モデルとの重ね合わせ

ヒト *ob* タンパク質と BK スンクスレプチンの重ね合わせ図は PyMOL (<https://pymol.org/2/>) を用いて行った。先に作成したスンクスレプチンの PDB ファイルとヒトレプチン (1AX8) の PDB ファイルを同時に開くことで重ね合わせ図を作成した。表示は cartoon モードとした。

4-3 結果

BK スンクスレプチンのアミノ酸 1 次配列を元に BLAST および HHblits 検索を行った結果、前述の結果と同様にヒト肥満 (*ob*) タンパク質であるレプチンの PDB 形式の立体構造データ (1AX8) が推奨された。このヒトレプチンの立体構造をモデルにして、BK スンクスレプチンの立体構造モデルを作成したところ、ヒトレプチンとほぼ同様の立体モデルが

作成された。よって、BK スンクスレプチンもヒトと同様に 4- α ヘリックスバンドルを形成するクラス I ヘリカルサイトカインの構造を有することが確認できた。

より詳細に構造上の差異を検索するために、ヒトレプチンとスンクスレプチンの立体モデルを重ね合わせて表示した (図 4-1)。重ね合わせモデルはヒトレプチンを緑色、スンクスレプチンを赤色で表示しているが、ほぼ同じような割合で重ねあわされており、基本的な構造上の違いは見られない。ただし、図中の矢印で示したようにスンクスレプチンでは、ごく短いヘリックス状の鎖が CD ループ間、特にヘリックス C とヘリックス E の途中に存在していることがわかる。この突出部分が、まさにスンクスレプチンにのみ見られる VPQ の挿入部分に該当する。

ヒトレプチンとスンクスレプチンの構造上の大きな違いは、この VPQ に由来する突出部分だけと考えられる。

4-4 考 察

スンクスレプチンの 1 次配列は他の動物種のレプチンとも 70%以上の相同性を示しているため、2 次構造の予測からも概ねヒトレプチンと同様な立体構造を取ることが予測できた。実際にヒトレプチンをモデルとした立体予測の結果では、レプチンに特徴的な 4- α ヘリックスバンドルを示し、ヒトレプチンの構造とも良く一致していた。特に、受容体との結合に重要とされる部位 I、部位 II および部位 III はほぼ保存されていることから、スンクスレプチンが他の動物種のレプチンと同様に生理的活性を持っていることは間違いないであろう。

唯一大きく異なるのが、CD ループ上の VPQ 挿入部位である。重ね合わせモデルからも明瞭に判るとおり、スルクスレプチンではこの3つのアミノ酸がヘリックス様に突出していることが確認できる（図中の矢印で示されている）。しかし、CD ループはレプチン受容体の直接の結合部位ではないため、この突出がどの程度、活性に影響を及ぼすかについては不明なままである。

したがって、BK スルクスレプチンは他の哺乳動物のレプチンと同じ生理活性を有することが予想されるが、詳細な分析のためには組換えタンパク質によるレプチン受容体との結合実験や *in vivo* での投与実験が必要であると思われる。

4-5 小 括

全体的な1次配列の相同性からも予測されるように、スルクスレプチンの立体構造もクラス1ヘリカルサイトカインに特徴的な4つの α ヘリックスが作るタンパク質構造を保持していることが明らかとなった。スルクスでのみ見つかったVPQの部分はCDループの途中に位置するが、立体構造予測でもVPQ部分がやや突出した形状を示した。この突出が受容体の結合やレプチンの機能にどのような影響を与えるかは不明であり、今後詳細な解析を行う必要があると思われる。

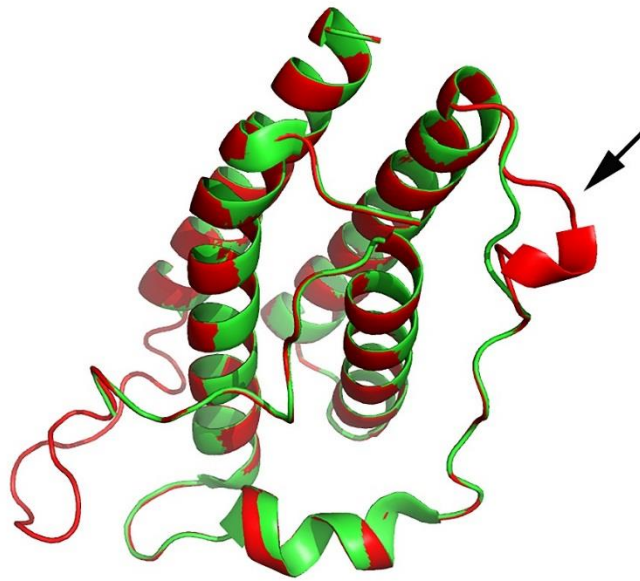


図 4-1 スンクスレプチンの立体構造とヒトレプチンとの重ね合わせモデル

スンクスレプチンの立体構造は、詳細に解析されているヒトレプチン (PDB ID : 1AX8) に基づいて SWISS-MODEL により予測した。ヒトおよびスンクスレプチン立体構造の重ね合わせは、PyMOL を用いて描画した。ヒトレプチンは緑色で、スンクスレプチンは赤色でそれぞれ示してある。図中の矢印は、スンクスレプチンにのみ見られる追加のアミノ酸残基 VPQ を示す。

第5章 総括

脂肪萎縮症は部分性または全体性の体脂肪欠損を特徴とし、インスリン抵抗性、糖尿病、および脂肪肝を含む脂質代謝異常を合併する症候群である。脂肪組織はエネルギー貯蔵だけでなく代謝調節にとっても重要な臓器であり、脂肪細胞から分泌される最も重要なアディポカインであるレプチンは食物摂取量と全身のエネルギー消費調節に関与している。したがって脂肪組織の欠損は循環レプチン濃度の低下を引き起こし、それに伴って糖、脂質代謝の異常をもたらす。

脂肪萎縮症で見られるこれらの代謝障害はレプチン投与によって改善されるので、レプチン補充療法は脂肪異栄養症の治療として承認されている。トランスジェニック脂肪萎縮症マウスを用いた動物実験でも、レプチン欠乏症がインスリン抵抗性を引き起こし、レプチン補充がインスリン感受性を顕著に改善することを実証している。

ヒト組換えレプチン（メトレプチン）は、脂肪萎縮症に伴う代謝性合併症のためのレプチン補充療法に有効であることが報告されており、米国および日本で承認されている薬剤である。メトレプチンは、脂肪萎縮症患者における糖および脂質代謝異常を顕著に改善し、それによって脂肪萎縮症の症状が軽減される。

スンクス (*Suncus murinus*) は日本で実験動物として樹立されたトガリネズミ科の食虫性動物であり、生理学的および形態学的実験に広く使用されてきた。その特徴の1つに体脂肪、特に内臓脂肪の顕著な欠乏がある。しかしながら、スンクスは体脂肪が欠乏しているにもかかわらず、ヒトおよびげっ歯類と同程度の血糖レベルおよび通常のグルコース代謝

を示す。このことからスunksがインスリン抵抗性や脂肪萎縮症で見られる他の特徴を示さない理由に興味を持たれる。そのため、血中レプチン量やレプチンの機能がヒトや他の動物とは異なるかもしれないという仮説を立てた。

本研究の目的は、スunksレプチンの構造およびその生理学的役割、特にインスリン感受性およびグルコース代謝への関与を解明することである。この目的のために、スunks *Lep* cDNA をクローニングしてその配列およびタンパク質構造を明らかにし、続いてスunksでの *Lep* mRNA の組織分布を決定した。

1. スunks *Lep* cDNA のクローニングと組織分布

スunks *Lep* cDNA のクローニングは、3'RACE 法と 5'-UTR のための RT-PCR を組み合わせることによって実施した。得られた PCR 断片からコンセンサス配列を決定することにより、完全なコード領域を含むスunks *Lep* cDNA の塩基配列を決定した。

今回クローニングしたスunks *Lep* cDNA は 3026 bp であり、170 アミノ酸残基 (aa) のポリペプチドをコードする 513 bp の推定オープンリーディングフレームを含んでいた。計算上のレプチン前駆体の分子量 (MW) は 18.9kDa であった。推定されたスunksレプチン前駆体は、そのアミノ末端に 21 個の疎水性残基からなる予測シグナルペプチドを有し、成熟レプチンは 149 aa であり、計算上の MW は 16.4kDa であった。

スunksは他の哺乳動物よりも体脂肪が少ないので、*Lep* 遺伝子発現の組織分布を調べることにより、レプチンが脂肪組織以外にも発現され得るかどうかを確認した。*Lep* mRNA の組織分布を RT-PCR によって確認したところ、*Lep* 遺伝子発現は他の哺乳動物で見られ

る分布と同様に、白色脂肪組織（皮下および精巣上体）および褐色脂肪組織においてのみ観察された。

2. スンクスレプチンの多重配列解析と進化系統解析

続いて、スンクスレプチン前駆体のアミノ酸配列をラット、マウス、ヒト、ウマ、ウシ、ブタ、ネコおよびイヌを含むいくつかの代表的な哺乳動物種と比較した。配列のマルチプルアラインメント（多重配列比較）には、スンクスと同じトガリネズミ科（食虫目）に属しているヨーロッパトガリネズミ (*Surx araneus*) のレプチン配列も用いた。レプチンはこれらの哺乳動物の間で高度に保存されており、スンクスレプチン前駆体は、ラット (77%)、マウス (77%)、ヒト (75%)、ウマ (82%)、ウシ (80%)、ブタ (80%)、ネコ (78%)、イヌ (76%) およびヨーロッパトガリネズミ (81%) と相同性が高いことが示された。アライメントの結果からは、スンクスレプチンに 3aa の挿入があることが示されたが、これは他の哺乳動物には認められなかった。塩基配列の比較からは 9 塩基対の挿入がスンクスの *Lep* 遺伝子配列に見られたが、挿入塩基対数が 3 の倍数となるためフレームシフト変異は起こさずに 3aa が挿入されたことを示している。この挿入は、スンクス *Lep* 遺伝子内に生じた 9 塩基対のマイクロインデルに起因すると考えられた。

代表的ないくつかの哺乳動物、特に有胎盤類のレプチンアミノ酸配列を用いて進化系統樹を作製し、比較を行った。参照レプチン配列としては、霊長類としてヒト、チンパンジーおよびアカゲザル、げっ歯類としてラットおよびマウス、奇蹄類としてウマ、偶蹄類としてウシおよびブタ、食肉目としてネコおよびイヌ、そして食虫目としてスンクス (*Suncus*

murinus) とヨーロッパトガリネズミ (*Sorex arenius*) を用いた。系統樹分析の結果は以前に報告されたものと非常に類似していた。

3. スンクスレプチンの立体構造解析

ヒトレプチン (PDB コード: 1AX8) の構造に基づいてスンクスレプチンの立体構造モデルを作成したところ、典型的な 4 つの α -ヘリックス構造を示した。このことから、今回クローニングした *Lep* cDNA は、他の哺乳動物由来のレプチンタンパク質と類似の構造を有するスンクスレプチン前駆体タンパク質をコードしていることを示している。CD ループに挿入された VPQ 配列がヒトレプチンと比較すると突出部を形成している。しかしながらこの部分はレプチン受容体への結合部位には影響を与えない。

そのためスンクスレプチンは他の哺乳動物由来のレプチンと同様な生理活性を有すると推測されたが、より詳細な分析のためには、組換えタンパク質によるレプチン受容体との結合実験が必要である。

本研究では、ヒト脂肪萎縮症の動物モデルとしてのスンクスの有用性を探った。他の哺乳動物よりも体脂肪が少ないスンクスが通常の条件下でインスリン抵抗性を示さない理由を明らかにするために、スンクスレプチンの構造を明らかにし、ヒトレプチンとの違いを同定した。

本研究により以下の結果が得られた。cDNA クローニングにより、スンクスは他の哺乳動物と相同性の高いレプチンタンパク質を有することが確認された。スンクスレプチンに

は他の哺乳動物のレプチンには見られない3つのアミノ酸 VPQ が、slippage のようなマイクロインデルの結果として生じたものと推測された。

予測した立体構造はヒトレプチンのものと類似しているが、CD ループの VPQ 領域はわずかに外側に突出していた。*Lep* 遺伝子の発現は、他の哺乳動物と同様に、WAT および BAT に限られていた。

これらの結果を総合的に判断すると、脂肪萎縮症の病態形成におけるスルクスレプチンの役割に決定的な証拠を得ることはできなかった。しかし今回発見した3アミノ酸の挿入によりレプチンの機能やスルクスの代謝がどのような影響を受けているかについての興味をもたれる。今後、組換えタンパク質を用いたレプチンの機能の詳細な分析を行うことで、スルクスレプチンの生理学的役割および正常なスルクスがインスリン抵抗性を示さない理由を明らかにするために必要であろう。今後の研究の進展により、スルクスが脂肪萎縮症の合併症非発症モデルとして利用できる可能性が期待され、脂肪萎縮症のさらなる病態解明や新たな治療起点の開発につながると考えられる。

加えて獣医学領域では、これまで産業動物、伴侶動物ともに脂肪萎縮症についての報告がない。今後、獣医学領域においても脂肪萎縮症に注目することで、これまでは糖尿病や糖・脂質代謝異常と診断されていた動物に脂肪萎縮症が発見される可能性がある。スルクスのように、げっ歯類とは異なる脂肪萎縮症モデル動物は、獣医学領域で多く見られる肉食性動物のモデル動物としても重要な役割を果たすことが期待される。

参考文献

1. Brown RJ, Gorden P. Leptin Therapy in Patients with Lipodystrophy and Syndromic Insulin Resistance. In: Leptin. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 225–36.
2. Garg A. Lipodystrophies: Genetic and Acquired Body Fat Disorders. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Nov 1;96(11):3313–25.
3. Hussain I, Garg A. Lipodystrophy Syndromes. *Dermatol Clin.* 2008;26(4):569–78.
4. Brown RJ, Araujo-Vilar D, Cheung PT, Dunger D, Garg A, Jack M, et al. The Diagnosis and Management of Lipodystrophy Syndromes: A Multi-Society Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016 Dec;101(12):4500–11.
5. Haque WA, Shimomura I, Matsuzawa Y, Garg A. Serum Adiponectin and Leptin Levels in Patients with Lipodystrophies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 May 1;87(5):2395–2395.
6. Antuna-Puente B, Boutet E, Vigouroux C, Lascols O, Slama L, Caron-Debarle M, et al. Higher Adiponectin Levels in Patients with Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy due to Seipin as compared with 1-Acylglycerol-3-Phosphate- *O* -Acyltransferase-2 Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Mar 1;95(3):1463–8.
7. Van Maldergem L, Magré J, Khallouf TE, Gedde-Dahl T, Delépine M, Trygstad O, et al. Genotype-phenotype relationships in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. *J Med Genet.* 2002;39(10):722–33.
8. Agarwal AK, Simha V, Oral EA, Moran SA, Gorden P, O’Rahilly S, et al. Phenotypic and

- Genetic Heterogeneity in Congenital Generalized Lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(10):4840–4847.
9. Agarwal AK, Arioglu E, de Almeida S, Akkoc N, Taylor SI, Bowcock AM, et al. AGPAT2 is mutated in congenital generalized lipodystrophy linked to chromosome 9q34. *Nat Genet.* 2002 May 22;31(1):21–3.
 10. Magré J, Delépine M, Khallouf E, Gedde-Dahl T, Van Maldergem L, Sobel E, et al. Identification of the gene altered in Berardinelli–Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nat Genet.* 2001 Aug 23;28(4):365–70.
 11. Kim CA, Delépine M, Boutet E, El Mourabit H, Le Lay S, Meier M, et al. Association of a Homozygous Nonsense Caveolin-1 Mutation with Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Apr 1;93(4):1129–34.
 12. Hayashi YK, Matsuda C, Ogawa M, Goto K, Tominaga K, Mitsuhashi S, et al. Human PTRF mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized lipodystrophy. *J Clin Invest.* 2009 Sep 1;119(9):2623–33.
 13. Shastri S, Delgado MR, Dirik E, Turkmen M, Agarwal AK, Garg A. Congenital generalized lipodystrophy, type 4 (CGL4) associated with myopathy due to novel PTRF mutations. *Am J Med Genet A.* 2010 Sep;152A(9):2245–53.
 14. Köbberling J, Dunnigan MG. Familial partial lipodystrophy: two types of an X linked dominant syndrome, lethal in the hemizygous state. *J Med Genet.* 1986 Apr;23(2):120–7.
 15. Cao H, Hegele RA. Nuclear lamin A/C R482Q mutation in canadian kindreds with Dunnigan-

- type familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet.* 2000 Jan 1;9(1):109–12.
16. Shackleton S, Lloyd DJ, Jackson SNJ, Evans R, Niermeijer MF, Singh BM, et al. LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat Genet.* 2000 Feb 1;24(2):153–6.
 17. Semple RK, Chatterjee VKK, O’Rahilly S. PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest.* 2006 Mar;116(3):581–9.
 18. Anoop Misra AG. Clinical Features and Metabolic Derangements in Acquired Generalized Lipodystrophy: Case Reports and Review of the Literature. *Medicine (Baltimore).* 2003 Mar 1;82(2):129–46.
 19. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 1998.
 20. Caron A, Lee S, Elmquist JK, Gautron L. Leptin and brain-adipose crosstalks. *Nat Rev Neurosci.* 2018 Feb 16;19(3):153–65.
 21. Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE, Stoffel M, Friedman JM. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genet.* 1996;14(1):95–7.
 22. Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH, Skoda RC. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jun 25;93(13):6231–5.
 23. Muoio DM, Lynis Dohm G. Peripheral metabolic actions of leptin. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2002 Dec 1;16(4):653–66.
 24. Cawthorne MA, Morton NM, Pallett AL, Ling Liu Y, Emilsson V. Peripheral metabolic actions of leptin. *Proc Nutr Soc.* 1998 Aug 28;57(03):449–53.

25. D'souza AM, Neumann UH, Glavas MM, Kieffer TJ. The glucoregulatory actions of leptin. *Mol Metab.* 2017;6(9):1052–65.
26. Triantafyllou GA, Paschou SA, Mantzoros CS. Leptin and Hormones: Energy Homeostasis. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2016;45(3):633–45.
27. Meek TH, Morton GJ. The role of leptin in diabetes: metabolic effects. *Diabetologia.* 2016 May 11;59(5):928–32.
28. Considine R V., Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum Immunoreactive-Leptin Concentrations in Normal-Weight and Obese Humans. *N Engl J Med.* 1996 Feb 20;334(5):292–5.
29. Herbst KL, Tannock LR, Deeb SS, Purnell JQ, Brunzell JD, Chait A. Köbberling type of familial partial lipodystrophy: an underrecognized syndrome. *Diabetes Care.* 2003 Jun 1;26(6):1819–24.
30. Savage DB. Mouse models of inherited lipodystrophy. *Dis Model Mech.* 2009 Nov 1;2(11–12):554–62.
31. Moitra J, Mason MM, Olive M, Krylov D, Gavrilova O, Marcus-Samuels B, et al. Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes Dev.* 1998 Oct 15;12(20):3168–81.
32. Reitman ML, Gavrilova O. A-ZIP/F-1 mice lacking white fat: a model for understanding lipotrophic diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000 Nov;24 Suppl 4:S11-4.
33. Gavrilova O, Marcus-Samuels B, Graham D, Kim JK, Shulman GI, Castle AL, et al. Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipotrophic mice. *J Clin Invest.* 2000

- Feb;105(3):271–8.
34. Zhang Z, Turer E, Li X, Zhan X, Choi M, Tang M, et al. Insulin resistance and diabetes caused by genetic or diet-induced KBTBD2 deficiency in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(42):E6418–26.
 35. Rodeheffer MS, Birsoy K, Friedman JM. Identification of White Adipocyte Progenitor Cells In Vivo. *Cell*. 2008 Oct 17;135(2):240–9.
 36. Colombo C, Cutson JJ, Yamauchi T, Vinson C, Kadowaki T, Gavrilova O, et al. Transplantation of adipose tissue lacking leptin is unable to reverse the metabolic abnormalities associated with lipodystrophy. *Diabetes*. 2002 Sep 1;51(9):2727–33.
 37. Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL. Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature*. 1999 Sep 2;401(6748):73–6.
 38. 鬼頭純三, 太田克明. 第IV編 スンクスの解剖・組織学 IV-1概観と外皮. In: 織田銑一, 鬼頭純三, 太田克明, 磯村源蔵, 編. スンクス. 学会出版センター; 1985. p. 175–84.
 39. 織田銑一. スンクスの入手、飼育、繁殖. In: 織田銑一, 東家一雄, 宮木孝昌, 編. スンクスの生物学. 学会出版センター; 2011. p. 69–72.
 40. Oda S, Koyasu K, Shrestha K. Breeding of the house musk shrew, *Suncus murinus*, originating from a wild population in Kathmandu, Nepal. *Ann Res Inst Environ Med*. 1992;43:239–240.
 41. Ishikawa A, Tsubota Y, Namikawa T. Morphological and reproductive characteristics of musk shrews (*Suncus murinus*) collected in Bangladesh, and development of the laboratory line (BAN

- line) derived from them. *Jikken Dobutsu*. 1987 Jul;36(3):253–60.
42. 織田銚一, 城ヶ原貴通. スンクスの地域集団由来系統とミュータント. In: 織田銚一, 東家一雄, 宮木孝昌, editors. *スンクスの生物学*. 学会出版センター; 2011. p. 78–83.
 43. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994 Dec 1;372(6505):425–32.
 44. Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau J-P, Bortoluzzi M-N, et al. The stomach is a source of leptin. *Nature*. 1998 Aug 20;394(6695):790–3.
 45. Ikejima K, Takei Y, Honda H, Hirose M, Yoshikawa M, Zhang Y-J, et al. Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology*. 2002 May 1;122(5):1399–410.
 46. Potter JJ, Womack L, Mezey E, Anania FA. Transdifferentiation of Rat Hepatic Stellate Cells Results in Leptin Expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Mar 6;244(1):178–82.
 47. Torday JS, Rehan VK. Stretch-stimulated surfactant synthesis is coordinated by the paracrine actions of PTHrP and leptin. *Am J Physiol Cell Mol Physiol*. 2002 Jul;283(1):L130–5.
 48. Suzuki D, Murata Y, Oda S. Cloning of Putative Uncoupling Protein 1 cDNA in a Cold-intolerant Mammal, the House Musk Shrew (*Suncus murinus*). *Zoolog Sci*. 2006 Nov 1;23(11):1009–15.
 49. Suzuki D, Murata Y, Oda S. Changes in Ucp1, D2 (Dio2) and Glut4 (Slc2a4) mRNA Expression in Response to Short-Term Cold Exposure in the House Musk Shrew (*Suncus murinus*). *Exp Anim*. 2007;56(4):279–88.

50. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Battistuzzi FU, editor. *Mol Biol Evol.* 2018 Jun 1;35(6):1547–9.
51. Iwase M, Kimura K, Sasaki N, Komagome R, Ishioka K, Morimatsu M, et al. Canine leptin: cDNA cloning, expression and activity of recombinant protein. *Res Vet Sci.* 2000 Apr 1;68(2):109–14.
52. Sasaki N, Shibata H, Honjoh T, Kimura K, Saito M, Ohishi I. cDNA Cloning of Feline Leptin and Its mRNA Expression in Adipose Tissue. *J Vet Med Sci.* 2001;63(10):1115–20.
53. Taylor MS, Ponting CP, Copley RR. Occurrence and consequences of coding sequence insertions and deletions in Mammalian genomes. *Genome Res.* 2004 Apr;14(4):555–66.
54. Mills RE, Luttig CT, Larkins CE, Beauchamp A, Tsui C, Pittard WS, et al. An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome. *Genome Res.* 2006 Sep;16(9):1182–90.
55. Gonzalez KD, Hill KA, Li K, Li W, Scaringe WA, Wang J-C, et al. Somatic microindels: analysis in mouse soma and comparison with the human germline. *Hum Mutat.* 2007 Jan 1;28(1):69–80.
56. Zhang F, Basinski MB, Beals JM, Briggs SL, Churgay LM, Clawson DK, et al. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature.* 1997 May 8;387(6629):206–9.
57. Grasso P, Leinung MC, Lee DW. Epitope mapping of secreted mouse leptin utilizing peripherally administered synthetic peptides. *Regul Pept.* 1999 Dec 23;85(2–3):93–100.

58. Novacek MJ. Mammalian phylogeny: shaking the tree. *Nature*. 1992 Mar 12;356(6365):121–5.
59. Londraville RL, Macotela Y, Duff RJ, Easterling MR, Liu Q, Crespi EJ. Comparative endocrinology of leptin: assessing function in a phylogenetic context. *Gen Comp Endocrinol*. 2014 Jul 1;203:146–57.
60. Denver RJ, Bonett RM, Boorse GC. Evolution of leptin structure and function. *Neuroendocrinology*. 2011;

謝 辞

本研究の遂行にあたり終始丁寧な御指導ならびに御鞭撻を頂きました日本獣医生命科学大学 獣医学部獣医学科 獣医生化学研究室の新井敏郎教授に心より感謝いたします。特に、指導教員の異動により学位取得への道が途絶えそうになった時に、快く指導教授になることをお引き受けくださり、私に希望を与えてくださいましたことに深謝いたします。

また本研究を遂行するにあたって、実験の御指導ならびに有意義な御助言を頂きました日本獣医生命科学大学 獣医学部獣医学科 獣医生化学研究室の佐々木典康准教授に心より御礼申し上げます。そして私が大学院に進学するきっかけを与えてくださいました、敬愛する入交眞巳先生に心より御礼申し上げます。研究室での日々の生活の中で、時に励まし、時に慰め、そして時に叱咤激励をしてくださいました獣医生化学研究室栄養学研究班の皆様感謝申し上げます。

非公開の KAT スンクスゲノムデータの利用に関し格別の御高配を賜りました織田銑一岡山理科大学元教授をはじめとするスンクスゲノムプロジェクトのメンバー各位に深謝いたします。

毎日の辛い研究生生活において、くじけそうになった私を常に身近で励まし、また暖かく見守り、時に叱ってくれた中澤翔太氏に心から感謝申し上げます。そして学部から重ねて10年間という長い年月にわたり、私のわがままを許し、そして支えてくれた家族に感謝いたします。

最後に、私の心の支えであり、そして最愛の子であるマカロンに感謝の意を表し、この論文を捧げます。

Summary

Lipodystrophy syndromes, characterized by the partial or total loss of body fat, are associated with insulin resistance, diabetes, and lipid metabolism abnormalities, including fatty liver.

Adipose tissue is an important organ, not only for energy storage, but also for metabolic regulation, and leptin, the most important adipokine secreted by adipocytes, is involved in the regulation of food intake and whole-body energy expenditure. Thus, a lack of adipose tissue is associated with low levels of circulating leptin, which result in disordered glucose and lipid metabolism.

Because the metabolic disorders that accompany lipodystrophy are ameliorated by leptin administration, leptin replacement has been approved as a treatment for lipodystrophy. Animal experiments using transgenic lipodystrophic mice have also demonstrated that leptin deficiency causes insulin resistance and that leptin replacement substantially improves insulin sensitivity.

Human recombinant leptin (metreleptin) has been reported to be effective as a leptin replacement therapy for the metabolic complications associated with lipodystrophy, and is the drug approved in the United States and Japan. Metreleptin significantly ameliorates glucose and lipid metabolic disorders in lipodystrophic patients

and thereby alleviates the symptoms of lipodystrophy.

House musk shrew (*Suncus murinus*), also called suncus, is an insectivore of the Soricidae family that has become established as a laboratory animal in Japan, and has been widely used for physiologic and morphologic experiments. One of its features is its remarkable deficiency of body fat, especially visceral fat. However, despite this, these shrews demonstrate similar blood glucose levels to humans and rodents, and unremarkable glucose metabolism. Therefore, we were interested in the reason why suncus do not show insulin resistance or other features of lipodystrophy. We hypothesized that the amount of circulating leptin and the function of this hormone might differ from that in humans and other animals.

The objectives of this study were to determine the structure of suncus leptin and its physiologic role, especially with regard to its regulation of insulin sensitivity and glucose metabolism. To this end, we cloned suncus *Lep* cDNA to determine both its and the encoded polypeptide sequence, and subsequently evaluated the tissue distribution of *Lep* mRNA in suncus.

1. Cloning of suncus *Lep* cDNA and its tissue distribution

Cloning of suncus *Lep* cDNA was carried out by combining 3' rapid amplification of cDNA ends with conventional RT-PCR of the partial 5'-untranslated region. By assembling the obtained sequences and determining a consensus sequence,

the nucleotide sequence of the entire coding region of suncus *Lep* cDNA was determined.

The cloned suncus *Lep* cDNA is 3,026 bp long and contains a 513 bp putative open reading frame that encodes a 170 amino acid (aa) polypeptide. The calculated molecular weight (MW) of the leptin precursor is 18.9 kDa. The putative suncus leptin precursor possesses a predicted signal peptide comprising 21 hydrophobic residues at its amino-terminal, suggesting that the mature leptin polypeptide is 149 aa long, with a calculated MW of 16.4 kDa.

Because suncus have less body fat than other mammals, the tissue distribution of *Lep* gene expression was evaluated to establish whether leptin might be expressed in tissues other than adipose tissue. In fact, when its tissue distribution was confirmed by RT-PCR, *Lep* gene expression was detectable only in white adipose tissue (WAT; subcutaneous and epididymal) and brown adipose tissue (BAT), which is similar to its distribution in other mammals

2. Sequence analyses and phylogenetic analysis

Next, the peptide sequence of the suncus leptin precursor was compared with its counterparts in representative mammalian species, including rat, mouse, human, horse, cow, pig, cat, and dog. The leptin sequence of the common shrew (*Sorex araneus*), also known as the Eurasian shrew, which belongs to the same family as suncus, was also compared.

The leptin precursor was found to be highly conserved among these species, with suncus leptin being homologous to the rat (77%), mouse (77%), human (75%), horse (82%), cow (80%), pig (80%), cat (78%), dog (76%), and common shrew (*Sorex*) (81%) precursors. These results suggest that leptin is highly conserved in a range of mammals.

The sequence alignment revealed an insertion of 3 aa in suncus leptin that is not present in the polypeptides from the other mammals. This corresponded to a 9-base pair insertion in the *Lep* sequence of suncus, and therefore no frameshift mutation. This insertion is thought to be attributable to a 9-base microindel within the suncus *Lep* gene.

A phylogenetic tree was also constructed using mammalian leptin amino acid sequences, which included selected mammalian species, especially Placentalia. The reference leptin sequences comprised human, chimpanzee, and macaque monkey sequences to represent primates, rat and mouse sequences to represent rodents, the horse sequence to represent odd-toed ungulates, cow and pig sequences to represent even-toed ungulates, cat and dog sequences to represent carnivores, and house musk shrew and common shrew sequences to represent insectivores. The results of the phylogenetic tree analysis were very similar to those previously published.

3. 3D structure analysis

A 3D model of the suncus leptin structure was created using the established

structure of the human obesity protein (leptin; PDB code: 1AX8), and this exhibited a typical four α -helix structure. These results indicate that our cloned *Lep* cDNA encodes a suncus leptin precursor protein with a structure similar to leptin proteins in other mammals. Because the VPQ aa sequence is inserted into the CD loop, which connects helices C and D, it creates a protrusion; however, this region of the molecule is not predicted to affect binding to the leptin receptor.

Therefore, we speculated that suncus leptin has the same physiologic activity as leptin from other mammals, but for a more definitive answer, binding experiments using a recombinant protein and the leptin receptor are necessary.

In this study, we have explored the usefulness of suncus as an animal model of human lipodystrophy. To establish why suncus, which has less body fat than other mammals, does not show insulin resistance under normal conditions, we determined and analyzed the structure of suncus leptin, and identified differences from human leptin.

In the present study, the following results were obtained. cDNA cloning confirmed that suncus produces a leptin polypeptide that is highly homologous to that of other mammals. We speculate that the three-amino-acid-insertion (VPQ), which is not found in other mammalian leptins, is the result of a slippage-like event creating a microindel. The predicted 3D structure is similar to that of human leptin, but the VPQ region protrudes slightly outwards. The expression of the *Lep* gene is restricted to WAT

and BAT, similar to other mammals. Detailed analysis of the function of suncus leptin using recombinant proteins is required to reveal the physiologic role of suncus leptin and the reasons why suncus do not show insulin resistance.

In addition, in the field of veterinary medicine, there have been few reports of lipodystrophy in domestic animals. However, it is possible that in the future lipodystrophy may be identified in companion animals that are presently diagnosed with diabetes or other metabolic abnormalities. We predict that suncus will play an important role as a model for disease in dogs and cats, the commonest species seen in veterinary companion animal practice.