

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)

学位論文の内容の要約

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

佐 賀 さやか

(指導教授：新井 敏郎)

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。このことからスンクス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、スンクス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、スンクス *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、続いてスンクスで

の *Lep* mRNA の組織分布を決定した。

## 1. スンクス *Lep* cDNA のクローニングと組織分布

スンクス *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ンクス *Lep* cDNA の塩基配列を決定した。

今回クローニングしたスンクス *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。推定されたスンクスレプチン前駆体は、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。

スンクス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、スルクスレプチンに 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 塩基対の挿入がスルクスの *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、スルクス *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ルクス (*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. スル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ル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  $\alpha$ -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ル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。

そのためスル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unks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unks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unks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unks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unks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unks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unks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unksレプチンの生理学的役割および正常なスunks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unks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unks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。