

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 佐賀 さやか

脂肪萎縮症は局所性または全身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などの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、脂肪細胞から分泌される重要なアディポカインであるレプチンは食物摂取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低下を引き起こし、それに伴う糖・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においても、レプチン欠乏がインスリン抵抗性を引き起こし、レプチン補充によりインスリン感受性が顕著に改善することが実証されている。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、使用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、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、生理学および形態学的実験に広く使用されている。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。スンクスは体脂肪が非常に少ないにもかかわらず、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。このようにスンクスは特有のエネルギー代謝機構を有する動物といえる。申請者は、スンクスの血中レプチン量やレプチン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研究を行った。

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。そのために、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、スンクスの *Lep* mRNA の組織分布を解析した。

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 個の疎水性アミノ酸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 によって確認した結果、*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

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%) と相溶性が高いことが示された。アライン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。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、比較した。参照レプチン配列として、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の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ると申請者は考察した。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と申請者は総括した。

以上のように、本論文は、スルクスレプチンの特徴を明らかにし、スルクスが脂肪萎縮症を含む種々の脂質代謝異常症のユニークなモデル動物となりうることを明らかにした。このことは獣医学領域において学術上、応用上貢献するところが少なくない。

よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。