

ネコメラノコルチン 4 受容体およびメラノコルチン 2 受容体アクセサリータン  
パク質 2 の機能に関する研究

(Study on function of feline melanocortin 4 receptor and melanocortin 2  
receptor accessory protein 2)

羽原 誠

ネコメラノコルチン 4 受容体およびメラノコルチン 2 受容体アクセサリータン  
パク質 2 の機能に関する研究

(Study on function of feline melanocortin 4 receptor and melanocortin 2  
receptor accessory protein 2)

羽原 誠

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科  
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

## 目次

|  |    |
|--|----|
| 序論   | 4  |
| 第1章 ネコメラノコルチン4受容体およびメラノコルチン2受容体アクセサ<br>リータンパク質2におけるcDNAクローニングおよび組織発現の解析  |    |
| 1.1 緒論   | 8  |
| 1.2 材料および方法  | 10 |
| 1.3 結果   | 12 |
| 1.4 考察   | 18 |
| 1.5 小括   | 20 |
| 第2章 ネコメラノコルチン2受容体アクセサリータンパク質2の糖鎖付加お<br>よびメラノコルチン4受容体とのタンパク質間相互作用の解析      |    |
| 2.1 緒論   | 21 |
| 2.2 材料および方法  | 23 |
| 2.3 結果   | 27 |
| 2.4 考察   | 31 |
| 2.5 小括   | 33 |
| 第3章 ネコメラノコルチン4受容体のシグナル伝達および二量体形成におけ<br>るメラノコルチン2受容体アクセサリータンパク質2が与える影響の解析 |    |
| 3.1 緒論   | 34 |
| 3.2 材料および方法  | 36 |
| 3.3 結果   | 38 |
| 3.4 考察   | 43 |
| 3.5 小括   | 46 |

|  |    |
|--|----|
| 第4章 ネコメラノコルチン4受容体遺伝子およびメラノコルチン2受容体ア<br>クセサリータンパク質2遺伝子における一塩基多型と肥満との関連の解析 |    |
| 4.1 緒論   | 47 |
| 4.2 材料および方法  | 49 |
| 4.3 結果   | 53 |
| 4.4 考察   | 59 |
| 4.5 小括   | 61 |
| 総括   | 62 |
| 参考文献   | 66 |
| 謝辞   | 77 |
| 英文要約   | 78 |

## 序論

### 1. 伴侶動物における非感染性疾患の増加

近年、室内飼育の増加をはじめとする飼育環境の変化により、伴侶動物の肥満は増加傾向にある。更に、フードの改良や獣医療の発展による寿命延伸に伴い、加齢や生活習慣が原因となって生じる内分泌疾患、腫瘍、泌尿器疾患などの「非感染性疾患(NCDs)」の増加がヒト同様大きな健康問題となっている。特にネコでは、イヌと飼育頭数がほぼ等しいにもかかわらず、動物臨床施設への来院頭数はイヌの3割程しかなく、疾患が見過ごされやすい(アニコム株式会社, 2009)。そのため、病態が進行してから動物病院を受診し、治療が困難となるケースも少なくない。従ってNCDsの早期発見やその予防法の確立は現在の獣医療における喫緊の課題である。

肥満は摂取カロリーが消費カロリーを上回る事に起因する、体脂肪が過剰に蓄積した状態と定義される。肥満は脂肪組織のリモデリングを引き起こし、脂肪から分泌されるホルモンであるアディポカインの産生量の変化、血中への過剰な遊離脂肪酸の放出や慢性炎症の惹起などにより、糖尿病などの代謝・内分泌性疾患だけでなく様々なNCDsの基礎病態となっている(Bray & Bellanger, 2006; Hotamisligil, 2006; Monteiro & Azevedo, 2010)。

食事、運動といった環境要因だけでなく個体が有する遺伝素因との相互作用により肥満は生じる(Hetherington & Cecil, 2010)。遺伝素因の個体差を決める要因の1つに塩基配列の差(遺伝子多型)が挙げられる。肥満に関連する遺伝子多型への関心は高く、ボディマス指数(BMI)、ウエスト・ヒップ比、その他の肥満形質におけるゲノムワイド関連解析(GWAS)により、ヒトにおいて300を超える一塩基多型(SNP)が同定されている(Goodarzi, 2018)。

### 2. エネルギー恒常性に関与するメラノコルチン4受容体およびメラノコルチン2受容体アクセサリタンパク質2

メラノコルチンペプチドはプロオピオメラノコルチンを前駆体にもつ生理活性ペプチドであり、 $\alpha$ メラニン細胞刺激ホルモン( $\alpha$ -MSH)、 $\beta$ -MSH、 $\gamma$ -MSH、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)が含まれる。メラノコルチンペプチドは様々な

生理機能に関与しており(Cone, 2000; Yang, 2011)、これらの機能はメラノコルチン受容体(MCR)を介して起きる。

MCR ファミリーはMC1R~MC5R の 5 つのクラス A(ロドプシン様)G タンパク質共役型受容体(GPCR)で構成される。各 MCR はそれぞれに特異的な発現様式を持ち、種々のメラノコルチンペプチドと異なる結合様式を示す(MacNeil et al., 2002; Schiöth et al., 2005)。

メラノコルチン 4 受容体(MC4R)は主に中枢神経系に発現し(Gantz et al., 1993; Mountjoy, Mortrud, Low, Simerly, & Cone, 1994)、 $\alpha$ -MSH の結合を介してエネルギー恒常性の維持に関与している。MC4R の主要な細胞内伝達経路はGs タンパク質(Gs)、サイクリック AMP(cAMP)、プロテインキナーゼ A(PKA)で構築される Gs-cAMP-PKA シグナル伝達経路であると報告されている(Gantz et al., 1993)。ノックアウトマウスを用いた研究により、MC4R が実際に Gs-cAMP-PKA 伝達経路を介してエネルギー恒常性を維持することが明らかになっている(Czyzyk, Sikorski, Yang, & McKnight, 2008)。更に、MC4R アゴニストであるメラノタン II の脳室内投与は食物摂取量を減少させる(Azzara, Sokolnicki, & Schwartz, 2002; Huszar et al., 1997)。MC4R ノックアウトマウスは過食、高脂血症、高インスリン血症、高血糖、身体活動量低下、食事誘発性熱産生低下を伴う、幼少期肥満を呈する。MC4R 遺伝子変異は、単一遺伝子異常に起因するヒト肥満で最も高頻度である(Farooqi et al., 2003)。これらの結果から、 $\alpha$ -MSH-MC4R-Gs 軸は食物摂取量とエネルギー消費量の調節を介してエネルギー恒常性の維持に寄与していると考えられている。

メラノコルチン 2 受容体アクセサリタンパク質(MRAP)は MCR ファミリーのシグナル伝達および細胞膜発現を調節する一回貫通型膜タンパク質である。*in vitro* 解析にて MRAP2 は全ての MCR と分子間結合を示し(Chan et al., 2009)、また MC4R に対しては、受容体機能を調節することが知られている(Asai et al., 2013; Chan et al., 2009)。ヒト MRAP2 の mRNA は主に副腎および脳に発現しており、室傍核の多くの細胞にて MC4R の mRNA と共発現している(Asai et al., 2013)。マウス視床下部において MC4R および MC3R と MRAP2 は共発現し、受容体と比べ広範囲のニューロンに MRAP2 が発現している(Liang et al., 2018)。マウスにおける MRAP2 遺伝子の全身および脳特異

的ノックアウトは肥満を引き起こす(Asai et al., 2013; Novoselova et al., 2016)。一方で、マウス室傍核における過剰発現により室傍核ニューロンの活性化や食事誘発性熱産生の増加などが認められる(Bruschetta, Kim, Diano, & Chan, 2018)。また、*in vitro*解析にてMRAP2がMC4Rの $\alpha$ -MSHに対するシグナル伝達応答を増強することが知られている(Asai et al., 2013; Liang et al., 2018; Schonnop et al., 2016)。ヒト幼少期肥満患者において、低頻度のMRAP2遺伝子変異が認められ、一部の変異型MRAP2において、MC4Rに対するシグナル伝達調節・相互作用に変化が認められる(Liang et al., 2018; Schonnop et al., 2016)。これらの結果は、MRAP2の欠失によって生じる肥満にMC4R依存的メカニズムが関与していることを示唆している。

しかしながら、どのようにMRAP2がMC4Rシグナル伝達調節をしているかは明らかになっていない。また、興味深いことにMRAP2ノックアウトマウスは食物摂取量およびエネルギー消費量に有意な変化がなくとも肥満を呈する(Asai et al., 2013; Novoselova et al., 2016)など、MC4Rノックアウトマウスと異なる表現型を有しており、MC4R非依存的なMRAP2機能の存在が示唆されている。近年、MCRではないプロキネティシン1受容体との相互作用が報告されるなど(Chaly, Srisai, Gardner, & Sebag, 2016)、依然MRAP2の機能に関しては不明な点が多い。

### 3. ネコにおける肥満

上記の様にヒト、マウスにおいて肥満の分子メカニズムの解明が進められているものの、ネコにおける報告は非常に少ない。MC4R、MRAP2においても遺伝子の完全長配列すら知られておらず。ネコ肥満の分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。

幾つかの国の研究によると、各地域の11.5%-63%の飼いネコが過体重または肥満状態であると言われている(Tarkosova, Story, Rand, & Svoboda, 2016)。日本においても40%を超えるネコが過体重または肥満状態であると言われており、イヌの2倍に近い割合になっている(アニコム株式会社, 2017)。アンケートによりネコの飼い主は動物に対して甘い傾向があることも報告されている。

これらのことから、日本においてはネコの肥満があまり危険視されていないことが伺える。

一方で、ヒト同様肥満はネコにおいても NCDs の基礎病態となり得る。肥満ネコと正常ネコを比較した研究では、肥満により脂肪細胞のサイズの増大、脂肪組織から分泌されるアディポカインであるレプチン、アディポネクチンの発現量の変化、脂肪組織における T リンパ球の増加などヒト肥満と類似した兆候が認められている (Van de Velde et al., 2013)。また、ネコ肥満は 2 型糖尿病、尿路疾患、皮膚疾患などの危険因子である (Lund, Armstrong, Kirk, & Klausner, 2005; Rand, 1999)

以上から、ネコ肥満の分子メカニズムを解明し、その知見を基に遺伝子診断法を用いた肥満体質の早期発見法を確立することにより、獣医療の課題である肥満、ひいては NCDs の予防に寄与することが可能になると考えた。そのため、本研究では肥満関連遺伝子である MC4R および MRAP2 のネコにおける機能、肥満との関連について明らかにすることを目的とし、一連の実験を行った。



## 第1章 ネコメラノコルチン4受容体およびメラノコルチン2受容体アクセサリータンパク質2におけるcDNAクローニングと組織発現解析

### 1.1 緒論

メラノコルチン系は複数のアゴニスト、2種のアンタゴニスト、5種の受容体で構成されている。 $\alpha$ -MSH、 $\beta$ -MSH、 $\gamma$ -MSH、ACTHが主要なアゴニストであり、これらは全てプロホルモンであるプロオピオメラノコルチン(POMC)に由来する。アンタゴニストとしてアグーチおよびアグーチ関連ペプチド(AgRP)が知られている。受容体として、MC1R~MC5Rの5つのGPCRが知られており、メラノコルチンペプチドによる多彩な生理機能を媒介している(Cone, 2000)。近年、MCRの修飾因子としてMRAP1とMRAP2が同定されている(Chan et al., 2009)。

ヒトMC4Rはdegenerate PCRおよびホモロジースクリーニングにより1993年にGantzらによって初めて同定された(Gantz et al., 1993)。MC4R遺伝子はシングルエクソンからなり、999bpの翻訳領域を有する。後に、マウス、ラットを始めとした多くの哺乳類、更には魚類、鶏において同定された。これらの種においてもMC4Rの保存性は非常に高く(Hughes et al., 2009; Stäubert et al., 2007)、ゼブラフィッシュにおいてもMC4Rのアミノ酸配列はヒトと71%の相同性を示す(Li, Tuan, Noble, & Falconer, 2001)。特に7つの膜貫通領域やGPCRに共通して見られるDRYモチーフは高く保存されている。また、他のクラスA GPCRと比較して、MCRは細胞内および細胞外ループが短く特に第2細胞外ループはGPCRファミリーの中でも最短の部類であることやGPCRに保存されているNPXXYモチーフの代わりにDPXXYモチーフを持つなどの特徴を有する。主な発現部位は中枢神経系であり大脳皮質、視床、視床下部、脊髄など幅広い領域でmRNA発現が認められる(Gantz et al., 1993; Kishi et al., 2003; Mountjoy et al., 1994)。視床下部においては、特に室傍核において高い発現が認められる。

ヒトMRAP2は2009年にMRAP1のホモログとしてChanらによって初めて同定された(Chan et al., 2009)。MRAP2遺伝子は4つのエクソンからなり、

618bp の翻訳領域を有する。MRAP2 遺伝子は脊椎動物間で高く保存されており、特に膜貫通領域で高い相同性を示す(Chan et al., 2009)。ヒト MRAP2 は副腎および脳において mRNA 発現が認められ、室傍核の多くの細胞にて MC4R と共発現している(Asai et al., 2013)。

これらのことから、MC4R および MRAP2 遺伝子がネコにおいても保存されていることが予想されるが、ネコ MC4R および MRAP2 に関する報告はほとんど無く、完全長 cDNA 配列、組織発現パターンは知られていない。そこで、第 1 章ではネコ MC4R および MRAP2 遺伝子に関する知見を得ることを目的として、ネコ MC4R および MRAP2 の完全長 cDNA クローニングおよび RT-PCR による各組織の mRNA 発現解析を行った。

## 1.2 材料と方法

### ネコ Total RNA 試料

各組織 Total RNA は市販の健常ネコ(雑種、3歳、オス)から採取されたもの (Zyagen, San Diego CA, USA)を使用した。

### ネコ MC4R および MRAP2 の完全長 cDNA クローニング

RACE PCR 法にてネコ MC4R および MRAP2 遺伝子の完全長 cDNA クローニングおよび塩基配列の決定を行った。ネコ大脳皮質 Total RNA から、SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, Mountain View, CA, USA)を用いて、指示書に従い cDNA ライブラリーを作製した。100 倍希釈した cDNA ライブラリーを鋳型として MC4R および MRAP2 遺伝子の 5'末端をそれぞれ MC4R-A1、MRAP2-A1 アンチセンスプライマーを用いて増幅した(表 1)。同様に 3'末端はそれぞれ MC4R-S1、MRAP2-S1 センスプライマーを用いて増幅した(表 1)。特異的プライマーは GenBank 上のネコ MC4R 予想配列 (XM\_003995231)、ネコ MRAP2 予想配列(XM\_003995231)を基に設計した。5'RACE および 3' RACE PCR により得られた増幅産物は 50 倍希釈し、semi-nested PCR の鋳型として用いた。得られた semi-nested PCR 産物を精製後、T-Vector pMD19 (Takara, Shiga, Japan)を用いて TA クローニングを行い、3130xl ジェネティックアナライザー(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)により塩基配列を決定した。

### RT-PCR によるネコの各組織における MC4R および MRAP2 mRNA 発現解析

ネコ各組織 cDNA を鋳型として RT-PCR を行い、電気泳動にて mRNA 発現様式を解析した。

MC4R mRNA 発現解析のために、1 $\mu$ g のネコの各組織 total RNA を鋳型として PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara)を用いて、指示書に従い逆転写反応を行った。1  $\mu$ l の合成した cDNA を鋳型として、1 $\times$ Quick Taq HS DyeMix (Toyobo, Osaka, Japan)、0.2  $\mu$ M の各プライマー(MC4R-S1、

MC4R-A1; 表 1)を含む 25  $\mu$ l の反応液を調整し RT-PCR を行った。RT-PCR は 94°C 2 分の後、94°C 30 秒、60°C 30 秒および 68°C 1 分のサイクル条件で 40 サイクル行った。

MRAP2 mRNA 発現解析のために、1  $\mu$ g のネコの各組織 total RNA を鋳型として SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いて、指示書に従い逆転写反応を行った。1  $\mu$ l の合成した cDNA を鋳型として、1 $\times$ Ex Taq Buffer (Takara)、0.625 U の TaKaRa Ex Taq HS、200  $\mu$ M の dNTP、0.2  $\mu$ M の各プライマー(MRAP2-A1、MRAP2-S2; 表 1)を含む 25  $\mu$ l の反応液を調整し RT-PCR を行った。RT-PCR は 98°C 10 秒、60°C 30 秒および 72°C 45 秒のサイクル条件で 35 サイクル行なった。

RT-PCR 産物を Midori Green Advance (Nippon genetics, Tokyo, Japan)を含む 1.5 % TAE アガロースゲルにて電気泳動した。内因性コントロールとして  $\beta$ -アクチン特異的プライマー(ACTB-S、ACTB-A; 表 1)を用いて  $\beta$ -アクチンの発現も同様に確認した。

表 1 PCR に用いたプライマー

| 名称       | 配列 (5'-3')                 | 種別         | 位置        | Accession No. |
|----------|----------------------------|------------|-----------|---------------|
| MC4R-S1  | ATCTGGGCAGCTTGCACGGTTTCGG  | Sense      | 634 - 658 | LC223815      |
| MC4R-A1  | TGCACCCTTCATGTTGGCCCCCTTG  | Anti-sense | 849 - 825 | LC223815      |
| MRAP2-S1 | TGACCAAGACGGGAGCTCCACACCAA | Sense      | 263 - 288 | LC223816      |
| MRAP2-A1 | ACAGCTGTCAAGGGCTGTGGTCTGC  | Anti-sense | 486 - 462 | LC223816      |
| MRAP2-S2 | GCGAAGCTCACGCACCTCG        | Sense      | 2 - 20    | LC223816      |
| ACTB-S   | GCCAACCGTGAGAAGATGACT      | Sense      | 152 - 172 | AB051104      |
| ACTB-A   | CCCAGAGTCCATGACAATACCAG    | Anti-sense | 280 - 258 | AB051104      |

### 1.3 結果

#### ネコ MC4R および MRAP2 の cDNA クローニング

ネコ MC4R および MRAP2 の一次構造を明らかにするために、ネコ MC4R および MRAP2 の cDNA クローニングを行った。得られたネコ MC4R および MRAP2 の完全長 cDNA 配列は DDBJ/EMBL/GenBank (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)データベースにそれぞれ LC223815 および LC223816 のアクセッション番号で登録した。ネコ MC4R cDNA は 117 bp の 5'非翻訳領域、999 bp の翻訳領域、479 bp の 3'非翻訳領域で構成されていた(図 1)。一方、ネコ MRAP2 cDNA は 63 bp の 5'非翻訳領域、621 bp の翻訳領域、1192 bp の 3'非翻訳領域で構成されていた(図 2)。ネコゲノム情報 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST))を用いたコンピューター解析の結果、ネコ MC4R はシングルエクソン、ネコ MRAP2 は 4 つのエクソンで構成されていることが明らかになった。MRAP2 のイントロンにおける 5'および 3'末端配列は全てスプライシングの GT-AG ルールに従っていた(Breathnach, Benoist, O'Hare, Gannon, & Chambon, 1978)。

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
atgccaattt cagcctcaga actttcgggc agacaaaggc gtggagaaaa gcaactgagc tacctgacct gagagatcga atcaattccg aggggatctg

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
aatccactgg gtcaggatg aactccactc atcaccatgg aatgcacact tctctccact tctggaaccg cagcacctac ggaccgcaca gcaatgccag
      M N S T H H H G M H T S L H F W N R S T Y G P H S N A S

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
tgagtccctt ggaaaaggct actctgatgg aggggtgtat gagcaacttt ttgtctcccc tgagggtgtt gtgactctgg gtgtcatcag cttgttggag
E S L G K G Y S D G G C Y E Q L F V S P E V F V T L G V I S L L E

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
aatattctgg tgattgtggc aatagccaag aacaaaaacc tgcattcgcc catgtacttt ttcactctga gcctggctgt ggctgatatg ttggtgagcg
N I L V I V A I A K N K N L H S P M Y F F I C S L A V A D M L V S V

410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
tgtcaaacgc atccgaaacc attgtcatca ccctattaaa cagtacagat acggacggcg agagtttcac cgtgaatatt gataatgca ttgactcggt
S N G S E T I V I T L L N S T D T D A Q S F T V N I D N V I D S V

510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
gatctgtagc tccttgcctg catcgatttg cagcctgctc tcaattgcag tggacaggta ctttactatc ttttatctc tcacagtaaa taacatcatg
I C S S L L A S I C S L L S I A V D R Y F T I F Y A L Q Y H N I M

610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
acggtcagcg gggttgggat catcataagt tgtatctggg cagcttgcac ggtttcgggc gttttgttca tcactctc agacagcagt gctgtcatca
T V R R V G I I I S C I W A A C T V S G V L F I I Y S D S S A V I I

710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
tctgcctcat caccatgttc ttcaccatgc tggctctcat ggccctctc tatgtccaca tgttcctcat ggccagactg cacattaaga gaattgctgt
C L I T M F F T M L A L M A S L Y V H M F L M A R L H I K R I A V

810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
cctccccggc actggcacca tccgccaagg ggccaacatg aagggtgcaa ttaccctgac catactgatt ggggtctttg ttgtctgctg ggccccgttc
L P G T G T I R Q G A N M K G A I T L T I L I G V F V V C W A P F

910     920     930     940     950     960     970     980     990     1000
ttcctccact taatattcta catctctgtt ccccagaatc cttactgtgt gtgcttcctg tctcacttta acctgtatct catactgac atgtgtaatt
F L H L I F Y I S C P Q N P Y C V C F M S H F N L Y L I L I M C N S

1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080    1090    1100
ccatcatcga ccctctaatt tatgcactcc ggagccaaga actaaggaaa accitcaaag agatcatctg ttgctatcct ctaggcggcc tctgtgattt
I I D P L I Y A L R S Q E L R K T F K E I I C C Y P L G G L C D L

1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
gtctagcaga tactaactgt gcagatagaa acgtgcataa gagacttctt cattcttaca gaaccggaac attgtgcttt gatgacctt ttctctctg
S S R Y *

1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280    1290    1300
tgtaaggcat gggttgagac tatctgtgtg ataaatttaa gttcatgact ttttttggga atggaacaaa tgcccagtct ctgtacatt ctaatgtctt

1310    1320    1330    1340    1350    1360    1370    1380    1390    1400
gctacttttt ggctgtacaa tgttaatcca tattataggt tgtaggcact atgaatgtat aaagaaaaaa aaaactctta ttaaaagcat aagaatgttt

1410    1420    1430    1440    1450    1460    1470    1480    1490    1500
cttgttactc acaaggattt gacactttgc ttgttttagt aacacagaaa tcacagaatc attaaatag ctctaacaaa tggctctcta cattacacta

1510    1520    1530    1540    1550    1560    1570    1580    1590
tctaactctg aaatgtagag atttgattgt agcatttggg ggtaaatatt gaaggataga tgcttagcca aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaa

```

図1 ネコ MC4R の cDNA および予想されるアミノ酸配列

図中の数字は 5'末端からの鎖長、\*は終止コドンを示す。小文字は塩基配列を、大文字はアミノ酸配列を示す。この塩基配列は GenBank にてアクセッション番号 : LC223815 で登録されている。

```

      10      20      30      40      50      ▼60      70      80      90      100
ggcgaagctc acgcacctcg gaggagcggg gcccgcgggc cggggagcgc cagccgggta gagatgtctg cccagaggtt aatttctaac agaacaatccc
                                     M S A Q R L I S N R T S Q

      110     120     130     140     150     160     170     180     190 ▼ 200
agcaatctgc atctaattct gattacacct gggaatatga atattatgag attggaccag tttcctttga aggactgaag gotcataaat attccattgt
Q S A S N S D Y T W E Y E Y Y E I G P V S F E G L K A H K Y S I V

      210     220     230     240     250     260     270     280     290 ▼ 300
gattggattt tgggttggc ttgctgtctt cgtgattttc atgttttttg tctgactttt gctgaccaag acgggagctc cacaccaaga caatgcagag
I G F W V G L A V F V I F M F F V L T L L T K T G A P H Q D N A E

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
tcttcagaga agagattcag aatgaatagc tttgtgtcag acttcggaag accactggag ccagataagg tgttttctcg acagggaact gaggaatcca
S S E K R F R M N S F V S D F G R P L E P D K V F S R Q G N E E S R

      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
ggtctctctt tcaactgtac atcaacgaag tggaaacactt ggatagggct aaagcttctc agcagaccac agcccttgac agctgtgttc aactgcagga
S L F H C Y I N E V E H L D R A K A C Q Q T T A L D S C V Q L Q E

      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
agccattaga agcaacgggc ggccagagga ggagttgaac aggcctcatga agtttgacat ccccaacttc gtgaacacag accagaactc ctcctttggg
A I R S N G R P E E E L N R L M K F D I P N F V N T D Q N S S F G

      610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
gaggatgac ttctgattc agaaccacct attgttctag aaaataagcc agtttcccgag acgtcacaca aagacctgga ttgagaaacg tactctgtaa
E D D L L I S E P P I V L E N K P V S Q T S H K D L D *

      710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
agtgtcttcc tggagatggt ggatccgtct ttgtaaagca agaaatctcc actgaccaca gttgtttgtg tgtgttgggg gggagacatg ggagacagag

      810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
atagaagaaa agacacagag aagagagccc cctcagaaaa gagctgaaga agctgagttt ctgtgccttt aaacacagtt caggcttttt tgagaataaa

      910     920     930     940     950     960     970     980     990     1000
gtatttgcat ggtctcatct ttctgtgtgt tgaaaagtgt ggctgcacag agtgtcagtg ttcttgaatg ggggttagca tctgtcattc cagtctggcc

      1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080    1090    1100
ctgocaccac cacgctctat ttttagcaag ttgctttacc tctctgggct gccacattgt tcattgtaac atgaggagtt tgaagtagat gactcatccc

      1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
agctctaata ttttgtgaat ttgtgacttt gcatccagaa gaagctggaa tgtacataat gcagtataaa ccagggcact gccctctatc tctttagga

      1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280    1290    1300
tgccctatgt tggtaacctc cactcagccc ttaactgagc ccagcttttg tcagaggctc aagcatctat gaggaggtca gaagacacat ctctcagta

      1310    1320    1330    1340    1350    1360    1370    1380    1390    1400
ccatggccaa catttctttg attgtactga aaaagctctt ctgagaacct ccagccacct atgctaaaag ctagggccag ccctgcccct ctctcccag

      1410    1420    1430    1440    1450    1460    1470    1480    1490    1500
aatgaaccaa ttcatggtac caattcatgg tacatcgcat ggcactttg ttcccagaaa tgtagagaag gttgtcagct cagtgtagag aggtgccttt

      1510    1520    1530    1540    1550    1560    1570    1580    1590    1600
tgtatctctg tgttggcgtg cgtccgtcac aagaagagta cttgccatgc tatttacttg gcagatgtgt aggtgatagt catgtgactc gtgtatggac

      1610    1620    1630    1640    1650    1660    1670    1680    1690    1700
tttgagctga gatggtgaat gggttgtaaa tccccaccaa cagatatgca gggtgccctg gtgcaacaca gagttaattt catgaaagaa tccagtttgc

      1710    1720    1730    1740    1750    1760    1770    1780    1790    1800
acaactggat tggaaacaac ttggttttgc gcacacagtt gcttgcattg ccaactgcta atctttgggt ggcattttca tcatgagttt gtttaccacc

      1810    1820    1830    1840    1850    1860    1870
tgctctgcta aagctaaaaa ataatgcat ttgcacagga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa

```

図 2 ネコ MRAP2 の cDNA および予想されるアミノ酸配列

図中の数字は 5'末端からの鎖長、\*は終止コドン、矢頭はイントロンの位置を示す。小文字は塩基配列を、大文字はアミノ酸配列を示す。この塩基配列は GenBank にてアクセッション番号：LC223816 で登録されている。

## cDNA クローニングから予想されるネコ MC4R および MRAP2 のアミノ酸配列

cDNA クローニングの結果から予想されるネコ MC4R および MRAP2 アミノ酸配列はそれぞれ 332、206 アミノ酸残基であった。また、ネコ MC4R 全体のアミノ酸配列はイヌと 97.0%、ヒトと 96.4%、マウスと 95.2%、ラットと 95.2%と高い相同性を示した(図 3a)。同様にネコ MRAP2 全体のアミノ酸配列はイヌと 96.1%、ヒトと 96.1%、マウスと 88.8%、ラットと 89.8%と高い相同性を示した(図 3b)。MC4R、MRAP2 共に膜貫通領域ではこれらの動物種間でそれぞれ>97.4%、100%とより高い相同性を示した。ネコ MC4R は N 末端に 3 つ(N2、N17、N26)、第 1 細胞外ループに 1 つ(N108)の N 結合型糖鎖付加が予想されるシークオン配列 (NXS/T) (Imperiali & O'Connor, 1999)を有していた。ネコ MRAP2 は N 末端側に 1 つ(N9)、C 末端側に 1 つ(N175)のシークオン配列を有していた。クラス A GPCR で高く保存されている第 6 膜貫通領域の WXPFF/Y モチーフ、ヒト MC4R においてリガンド結合に重要であるとされる第 3 膜貫通領域の DRY モチーフ(Fredriksson, Höglund, Gloriam, Lagerström, & Schiöth, 2003; Yamano et al., 2004)はネコ MC4R においても認められた。さらに全ての MCR に共通して見られる特徴である第 7 膜貫通領域の DPXXY モチーフ(Tao, 2010)も認められた。



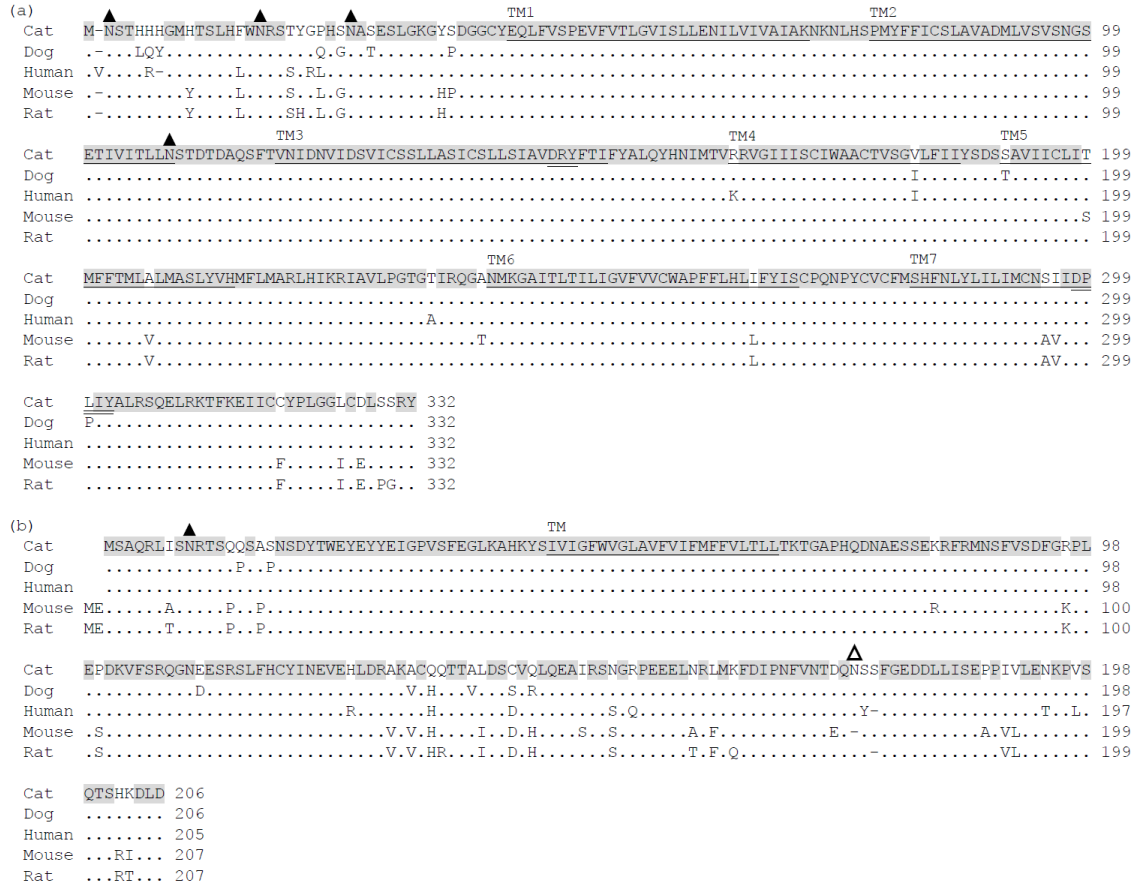


図 3 ネコ MC4R(a)および MRAP2(b)予想アミノ酸配列の他の哺乳類との比較

cDNA 塩基配列から予想されるネコ MC4R のアミノ酸配列をイヌ (LC223817)、ヒト(NP\_005903)、マウス(NP\_058673)、ラット(NP\_037231) MC4R アミノ酸配列と比較した。同様にネコ MRAP2 アミノ酸配列をイヌ (LC223818)、ヒト(NP\_612418)、マウス(NP\_001171202)、ラット (NP\_001102244) MRAP2 アミノ酸配列と比較した。図中数字は N 末端からのアミノ酸残基数、ドットはネコと共通のアミノ酸残基、灰地は全ての動物種で共通のアミノ酸残基、下線は膜貫通領域(TM)、二重下線は各モチーフ、黒三角は全ての動物種で共通の N 結合型糖鎖付加予測部位、白三角はイヌ、ネコのみで認められた N 結合型糖鎖付加予測部位を示す。

## 各組織におけるネコ MC4R および MRAP2 mRNA 発現様式

ネコ MC4R および MRAP2 mRNA の発現様式を解析するために、RT-PCR を行った。ネコ MC4R、MRAP2 共に大脳皮質、視床下部、脊髄といった中枢神経系で高い発現が認められた(図 4)。加えて MC4R では腎臓においても高い発現が認められ、脂肪組織、肝臓においても低い発現が認められた。その他の組織では発現が認められなかった。

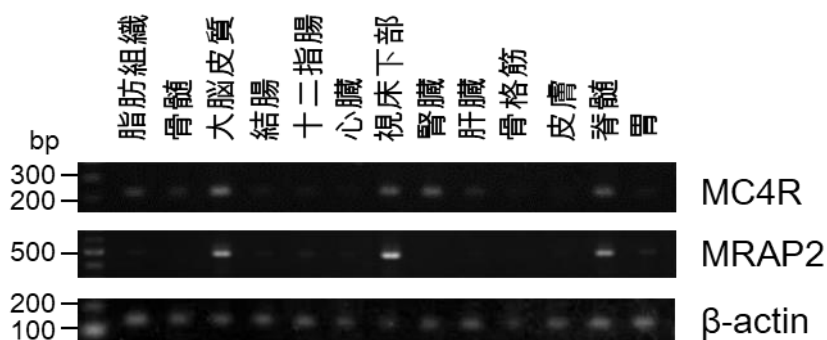


図 4 ネコ MC4R および MRAP2 の RT-PCR 産物の電気泳動像

ネコの各組織における MC4R および MRAP2 mRNA 発現様式を RT-PCR により確認した。β-アクチン mRNA の発現も同時に確認し、内在性コントロールとして用いた。

## 1.4 考察

ネコ大脳皮質 total RNA を用いて、RACE PCR 法にてネコ MC4R および MRAP2 遺伝子の完全長 cDNA クローニングを行った。シーケンスの結果より、ネコ MC4R および MRAP2 遺伝子はそれぞれ単一エクソン、4つのエクソンで構成されていることが予想された。これらはヒト、マウスなど他の哺乳類の結果と一致しており、ネコにおいても MC4R および MRAP2 遺伝子構造が高く保存されていることが示唆される。

cDNA から予想されたネコ MC4R のアミノ酸配列の残基数は他の哺乳類と完全に一致していた。また、配列全体も高い相同性を示し、膜貫通領域ではより高い相同性を示した。加えて、MCR や GPCR に特徴的なモチーフを有しており、4つの N 結合型糖鎖付加予測部位も他の哺乳類と一致した。これらのことから、ネコ MC4R の構造は他の哺乳類と類似していると考えられ、他の哺乳類と同様受容体として機能している可能性がある。

cDNA から予想されたネコ MRAP2 のアミノ酸配列全体は他の哺乳類と高い相同性を示し、膜貫通領域では完全に一致していた。一方で、残基数はヒトでは 205 残基、マウス、ラットでは 207 残基であるのに対し、ネコでは 206 残基であった。これは、マウス、ラットの MRAP2 では他の動物種と比べ N 末端にアミノ酸が 2 残基追加されていること、イヌ、ネコに認められた C 末端側の N 結合型糖鎖付加予測部位(N175)がヒト、マウス、ラットで欠失していることに起因する。N175 はアムールタイガー(XP\_007090217)、豚(XP\_013848111)、鶏(ALO81626)など他の動物種でも認められる。全ての種に共通してみられる N 末端側の N 結合型糖鎖付加部位(N9)における糖鎖付加の状態は、ヒト MRAP2 において MC2R のシグナル伝達調節機能と関連することが知られているが(Chan et al. 2009)、N175 については知られていない。N175 については糖鎖付加を受けているかを含め、MRAP2 機能との関連などをより詳細に調査する必要がある。

RT-PCR により、ネコ MC4R および MRAP2 mRNA は共に中枢神経系で高い発現を示した。この結果は他の哺乳類の発現様式と類似している(Gantz et al. 1993; Mountjoy et al. 1994; Chan et al. 2009; Asai et al. 2013)。従って、ネコ

においても、他の哺乳類同様、中枢神経系にてエネルギー恒常性の維持に関与している可能性がある。末梢組織については、ネコ **MRAP2** ではほとんど発現が認められなかったのに対し、**MC4R** では腎臓、脂肪組織、肝臓などで発現が認められた。主な発現場所は中枢神経系であるものの、末梢においても **MC4R** の発現は報告されており、代謝と関連することが知られている(An et al., 2007; Panaro et al., 2014; Qu et al., 2014)。ネコにおいても末梢 **MC4R** が代謝において何らかの役割を果たしているかもしれない。

以上のことからネコ **MC4R** は他の哺乳類同様、中枢神経系にて受容体として機能し、**MRAP2** はその機能を修飾している可能性が示された。今後は **MC4R** の受容体としての機能解析、**MRAP2** との相互作用解析を進めていく必要がある。また、ネコ **MRAP2** に認められた N175 の糖鎖付加部位についても検討したい。

## 1.5 小括

本章では RACE PCR 法を用いた cDNA クローニングにより、ネコ MC4R および MRAP2 の完全長 cDNA 塩基配列を決定した。塩基配列から予想されるネコ MC4R および MRAP2 のアミノ酸配列は全体を通して他の哺乳類と高い相同性を示した。特に膜貫通領域は高い相同性を示し、MC4R においては MCR、GPCR に特徴的なモチーフも有していた。一方で、ネコ MRAP2 の C 末端側にはヒト、マウス、ラットでは認められない N 結合型糖鎖付加部位の存在が予測された。

RT-PCR による各組織における mRNA 発現解析の結果、ネコ MC4R および MRAP2 は中枢神経系で高い発現を示した。

以上のことから、ネコ MC4R および MRAP2 は他の哺乳類同様、中枢神経系にて何らかの役割を持つ可能性が示された。ネコ MC4R については受容体としての特徴を多く有していたことから、受容体として機能していることが予想される。また、ネコ MRAP2 の C 末端側に認められた N 結合型糖鎖付加部位は、ヒト、マウス、ラットとは異なる種特異的な MRAP2 の機能が存在する可能性を示唆している。

## 第2章 ネコメラノコルチン2受容体アクセサリータンパク質2の糖鎖付加およびメラノコルチン4受容体とのタンパク質間相互作用の解析

### 2.1 緒論

糖鎖付加はタンパク質または脂質に糖類が付加する反応と定義され、主要な翻訳後修飾の1つである。全てのタンパク質のおよそ半数が糖鎖付加を受けており、特に真核生物の分泌タンパク質および膜タンパク質に多く認められる (Apweiler, 1999; Dell, Galadari, Sastre, & Hitchen, 2010; Goettig, 2016)。糖鎖付加は真核生物のタンパク質における適切なフォールディング、オリゴマー化、溶解のために重要であり、また多糖類は多くの場合タンパク質の分解を抑制し、安定性を高め、半減期を延長する (Mitra, Sinha, Ramya, & Surolia, 2006; Russell, Oldham, & Davis, 2009)。糖鎖付加はN結合型糖鎖付加およびO結合型糖鎖付加に分けられる。N結合型糖鎖付加は、小胞体にてシークオン配列(NXS/T)内のアスパラギン残基(N)に糖類が共有結合することで生じる (Imperiali & O'Connor, 1999)。

ヒトMC4RはN末端に3つ(N3, N17, N26)、第1細胞外ループに1つ(N108)の4ヶ所でN結合型糖鎖付加を受けている。これらの各糖鎖付加部位のアスパラギン残基をグルタミン残基に置換した、非糖鎖付加MC4Rにおいて、膜発現、脱感作に変化は見られず、MC4Rの機能に糖鎖付加は必須でないと考えられている (Granell, Molden, & Baldini, 2013)。

一方で、ヒトMRAP2はN末端に1ヶ所(N9)N結合型糖鎖付加を受けている。N9のアスパラギン残基をグルタミン酸に置換した場合、MC2RのACTHに対するcAMP応答をMRAP2非存在時と同等まで下げることから、MRAP2のN9における糖鎖付加はMRAP2の受容体修飾機能において重要であるとされている (Chan et al., 2009)。

MRAP2は全てのMCRと相互作用し、受容体の機能を調節する (Chan et al., 2009)。特にMC4Rにおいては発現部位が中枢神経系でありMRAP2と一致していること、MC4RまたはMRAP2ノックアウトマウスが共に肥満を呈すること、MRAP2の共発現がMC4Rのシグナル伝達を高めることから、MRAP2と

MC4R の相互作用はエネルギー恒常性の維持に重要であると考えられている (Asai et al., 2013)。ホモログである MRAP1 において、膜貫通領域が受容体調節機能に必要であることから、MCR と直接あるいは近傍で相互作用することが重要であると考えられている (Sebag & Hinkle, 2007, 2009a, 2009b)。

第 1 章で行った実験の結果から、ネコにおいても MC4R および MRAP2 遺伝子が高く保存されており、mRNA は共に中枢神経系で発現していることが明らかになった。したがって、ネコにおいても中枢神経系にて MRAP2 と MC4R は相互作用している可能性がある。また、ネコ MRAP2 の C 末端に認められた新規糖鎖付加部位(N175)は MRAP2 の機能に影響しているかもしれない。そこで、第 2 章では、ネコ MC4R および MRAP2 の機能解析への足掛かりとして、MRAP2 の糖鎖付加および MC4R-MRAP2 間の相互作用解析を行った。

## 2.2 材料と方法

### ネコ MC4R および MRAP2 の発現ベクターの作製

ネコ MC4R および MRAP2 を細胞実験にて評価するためそれぞれの発現ベクターを作製した。cDNA クローニングで得た配列情報を基に特異的プライマー(MC4R-S2, MC4R-A2, MRAP2-S3, MRAP2-A2)を設計した(表 2)。1 章で合成したネコ大脳皮質 cDNA を鋳型として、上記プライマーおよび PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara)を用いて PCR を行い、MC4R および MRAP2 のコザック配列を含む翻訳領域全長を増幅した。得られた増幅産物を精製後、MC4R 断片を pcDNA3.2/V5/GW/D-TOPO 発現ベクター(Invitrogen)に pcDNA Gateway Directional TOPO Expression Kits (Invitrogen)を用いて、MC4R-V5(C 末端タグ)発現ベクターを作製した。MRAP2 断片を Hind III および Age I にて直鎖化した発現用ベクター pcDNA3.1 V-5-His B (Invitrogen)に In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech)を用いて、MRAP2-His (C 末端タグ)発現ベクターを作製した。作製したベクターをそれぞれ Competent Quick DH5 $\alpha$  (Toyobo)に形質転換し、アンピシリン添加 LB 寒天培地上で一晩培養し、コロニー PCR でインサートを確認した。インサートを含むコロニーをアンピシリン添加 LB 液体培地に植菌し、37°C 16 時間振盪培養した。得られた大腸菌液から Labo Pass Plasmid Mini Kit (Cosmo genetech, Seoul, South Korea)を用いてプラスミド DNA を抽出した。得られた DNA の濃度を QuantiFluor dsDNA System (Promega, Madison, WI, USA)にて測定し、プラスミド DNA に目的の配列が含まれていることをシーケンスにより確認した。

### 部位特異的変異導入による非糖鎖付加 MRAP2 発現ベクターの作製

PrimeSTAR Max Mutagenesis Basal Kit (Takara)を用いて MRAP2-His 発現ベクターの N 結合型糖鎖付加予測部位(NXS/T)に変異を導入した。予測部位のアスパラギン(N)に相当する塩基配列(AAC)をグルタミン(Q)に相当する塩基配列(CAG)に置換した変異導入用プライマーを設計し、MRAP2-His 発現ベクターを鋳型にしたインバース PCR により変異導入ベクターを増幅した。アミノ酸配列の 9 番目のアスパラギンをグルタミン酸に変えたものを N9Q として、



同様に N175Q、N9Q+N175Q を作製した。増幅産物を Competent Quick DH5 $\alpha$  (Toyobo) に形質転換後、上記と同様の手順で変異導入 MRAP2-His 発現ベクターを得た。

### CHO-K1 細胞の培養

チャイニーズハムスター卵巣由来 CHO-K1 細胞は理化学研究所バイオリソースセンターから入手した。培養にはシャーレと液体培地(10% FBS 添加 F-12 HAM)を用い、CO<sub>2</sub> インキュベーターにて継代培養後、実験に用いた。

### 糖鎖付加部位の解析

各変異導入 MRAP2-His ベクターを一過的にトランスフェクトした CHO-K1 細胞からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット法により糖鎖付加部位を解析した。CHO-K1 細胞を 6 ウェルプレートに  $0.375 \times 10^6$  /well で播種した。24 時間後、各ウェルに変異導入したものを含む各 MRAP2-His 発現ベクター  $1.875 \mu\text{g/well}$ 、ScreenFect A (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)  $5.625 \mu\text{l/well}$ 、Dilution Buffer for ScreenFect A  $250 \mu\text{l/well}$  を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション開始から 24 時間後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、プロテアーゼインヒビター添加 RIPA Buffer を  $100 \mu\text{l/well}$  で加え、セルスクレイパーを用い細胞を回収した。回収した溶液を超音波破碎機にて破碎し、 $14000 \times g$ 、 $4^\circ\text{C}$ 、15 分遠心分離後、上清を回収した。回収した試料  $2.5 \mu\text{l}$  を Glycopeptidase F (PNGase F; Takara) で処理し、N 結合型糖鎖の分解を行った。未処理および処理した試料を 10% アクリルアミドゲルにて電気泳動した。泳動後、セミドライ式膜転写装置 ( $2 \text{ mA/ゲル面積 cm}^2$ ) によりゲル中の試料タンパク質を PVDF 膜に転写した。PVDF 膜は TBS-T ( $137 \text{ mM Sodium Chloride}$ ,  $20 \text{ mM Tris}$ ,  $0.1\% \text{ Tween-20}$ ,  $\text{pH}7.6$ ) にて洗浄後、 $5\% \text{ Skim milk}$  加 TBS-T にて 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後、TBS-T で 3 回洗浄し、Anti 6 $\times$ Histidine Antibody (9F2;  $1 \mu\text{g/ml}$ ; Wako Purechemical Industries) で  $4^\circ\text{C}$ 、一晩一次抗体処理した。処理後、TBS-T で 3 回洗浄し、Anti-mouse IgG HRP-linked Antibody (50000 倍希釈; Cell Signaling Technology, Danvers, MA) にて 1 時間二次抗体処理した。HRP 発光には SuperSignal West Dura

Extended Duration Substrate (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)を用い、ImageQuant LAS4000mini (Fujifilm, Tokyo, Japan)でシグナルを検出した。また、同じ PVDF 膜を用いて GAPDH を検出しローディングコントロールとした。

### ネコ MC4R および MRAP2 の共免疫沈降

MC4R-V5 および MRAP2-His 発現ベクターをトランスフェクションした CHO-K1 細胞からタンパク質を抽出し、共免疫沈降法により相互作用を解析した。CHO-K1 細胞を 6 ウェルプレートに  $0.375 \times 10^6$ /well で播種した。24 時間後、各ウェルに 2.5  $\mu\text{g}$  の MC4R-V5 または MRAP2-His 単独、1.25  $\mu\text{g}$  ずつの MC4R-V5 および MRAP2-His を 7.5  $\mu\text{l}$  Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を用いてトランスフェクションした。トランスフェクションから 48 時間後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、プロテアーゼインヒビター加 RIPA Buffer を 100  $\mu\text{l}$ /well で加え、セルスクレイパーを用い細胞を回収した。回収した溶液を超音波破碎機にて破碎し、14000 $\times$ g、4 $^{\circ}\text{C}$ 、15 分遠心分離後、上清を回収した。

免疫沈降のため、回収した試料 50  $\mu\text{l}$  を 50 %スラリーの Protein A Agarose Beads (Cell Signaling Technology)加 RIPA Buffer 2.5  $\mu\text{l}$  で前洗浄し、anti-V5 antibody (50 倍希釈; Cell Signaling Technology)で 4 $^{\circ}\text{C}$ 一晩抗体処理した。翌日、50%スラリーの Protein A Agarose Beads (Cell Signaling Technology) 7.5  $\mu\text{l}$  を添加し、4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 時間インキュベーションした。ビーズを 5 回 RIPA Buffer で洗浄し、上清を取り除いた後に SDS ローディングバッファーに溶解した。免疫沈降したサンプルと未処理の細胞溶解液を 12.5%SDS-アクリルアミドゲルにて電気泳動した。泳動後は、上記の糖鎖付加解析と同様の手順で、ウェスタンブロットを行い、MRAP2-His を検出した。

### NanoBiT 法によるネコ MC4R-MRAP2 間の相互作用の経時的解析

$\alpha$ -MSH 添加時の MC4R-MRAP2 間の相互作用の変化を NanoBiT 法により評価した。MC4R および MRAP2 の翻訳領域全長をそれぞれ増幅した。増幅産物を直鎖化した 4 種の NanoBiT 用ベクター(pFN33K LgBiT TK-neo Flexi Vector, pFC34K LgBiT TK-neo Flexi Vector, pFN35K SmBiT TK-neo Flexi

Vector and pFC36K SmBiT TK-neo Flexi Vector; Promega)に In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech)にてライゲーションし、MC4R および MRAP2 の N 末端または C 末端に Large BiT または Small BiT が融合したタンパク質を発現するベクターを作製した。この論文では MC4R の C 末端に Large BiT を融合させたタンパク質を MC4R-Lg と呼称する。

CHO-K1 細胞を 96 ウェルプレートに  $1 \times 10^4$  /well で播種した 24 時間後、MC4R-Lg 発現ベクター 37.5 ng/well、MRAP2-Sm 発現ベクター 37.5 ng/well、ScreenFect A (Wako Pure Chemical Industries) 0.375  $\mu$ l/well、Dilution Buffer for ScreenFect A 10  $\mu$ l/well を用いてトランスフェクションした。Small BiT と Large BiT およびタグの方向の組み合わせに関しては、事前に全ての組み合わせでシグナルを測定し、シグナルが最も強かった MC4R-Lg および MRAP2-Sm を採用した。トランスフェクション開始から 24 時間後、培地を無血清培地に交換した。4 時間培養後、Nano-Glo Live Cell Assay System (Promega)を添加し、Large BiT と Small BiT が結合することによって生じる発光を GloMax Multi Detection System (Promega)を用いて定量した。測定開始 2 分後に  $1 \times 10^{-5}$  M  $\alpha$ -MSH を添加した。またネガティブコントロールとして、MC4R-HaloTag 間の相互作用を同様に評価した。発光量-時間曲線は  $\alpha$ -MSH 添加時を 0 秒として時間ごとの発光量をプロットし、作製した。また、 $\alpha$ -MSH の相互作用への影響を評価するため、0~150 秒において、0 秒との発光量の差をプロットして曲線を作製し、曲線下面積を求めた。グラフの作製および統計処理は GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を用いた。得られたデータは平均値 $\pm$ 標準誤差として表し、統計学的有意差は Student's T 検定にて検討し有意水準は  $p < 0.05$  とした。

表 2 翻訳領域全長増幅用プライマー

| 名称       | 配列 (5'-3')                          | 種別         | 位置          | Accession No. |
|----------|-------------------------------------|------------|-------------|---------------|
| MC4R-S2  | CACCAGGATGAACTCCACTCATCACC          | Sense      | 115 - 136   | LC223815      |
| MC4R-A2  | GTATCTGCTAGACAAATCACAGAG            | Anti-sense | 1113 - 1090 | LC223815      |
| MRAP2-A2 | GGTGATGATGACCGGAATCCAGGTCTTTGTGTGAC | Anti-sense | 682 - 663   | LC223816      |
| MRAP2-S3 | CTGGCTAGTTAAGCTGAGATGTCTGCCAGAGG    | Sense      | 61 - 78     | LC223816      |

## 2.3 結果

### ネコ MRAP2 における糖鎖付加部位の解析

ネコ MRAP2 に認められた 2 つの予測部位が実際に糖鎖付加を受けているかを確認するために、各予測部位に変異を導入した MRAP2 発現ベクター、PNGase F を用いたウェスタンブロットを行い、分子量を評価した。MRAP2-His は各 PNGase F 非処理サンプルにおいて 26~28 kDa の複数のバンドとして検出された。PNGase F 処理により、N9 および N175 の両部位に変異を導入したベクター(N9Q+N175Q)由来の試料を除く全ての試料で高分子量のバンドの移動度が増加し、26 kDa 付近のバンドに集約された(図.5)。これは PNGase F 処理により糖鎖が分解され、MRAP2 の分子量が減少したことを示唆している。すなわち、CHO-K1 細胞においてネコ MRAP2 は N9 および N175 の両部位で糖鎖付加を受けていると考えられる。

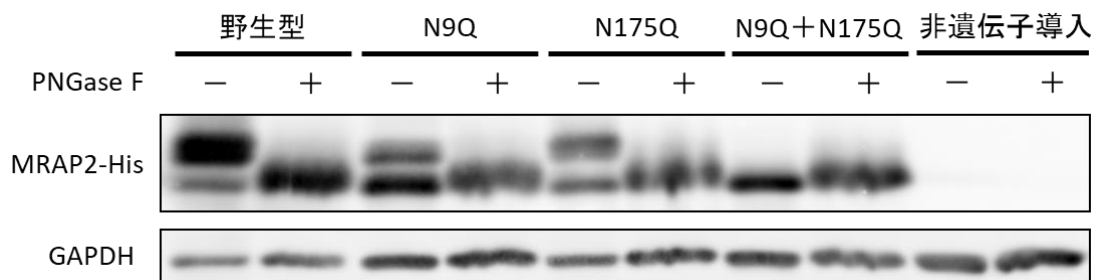


図 5 PNGase F 処理による各ネコ MRAP2-His の分子量の変化

各ネコ MRAP2 発現細胞由来のタンパク質試料を PNGase F で処理し、ウェスタンブロット法により分子量を解析した。上部は CHO-K1 細胞にトランスフェクションした MRAP2 発現ベクターの種類を示す。同じ PVDF 膜を用いて GAPDH を検出しローディングコントロールとした。

### 共免疫沈降法による MC4R-MRAP2 間の相互作用の解析

ネコ MC4R および MRAP2 のタンパク質間相互作用を評価するために共免疫沈降を行った。免疫沈降を行った試料のうち、MC4R-V5 および MRAP2-His を共発現させた CHO-K1 細胞由来の試料においてのみ MRAP2-His のバンドが検出され、MC4R-V5 単独または MRAP2-His 単独発現ではバンドは認められなかった(図 6)。これは少なくとも *in vitro* では MC4R と MRAP2 が相互作用していることを示唆している。

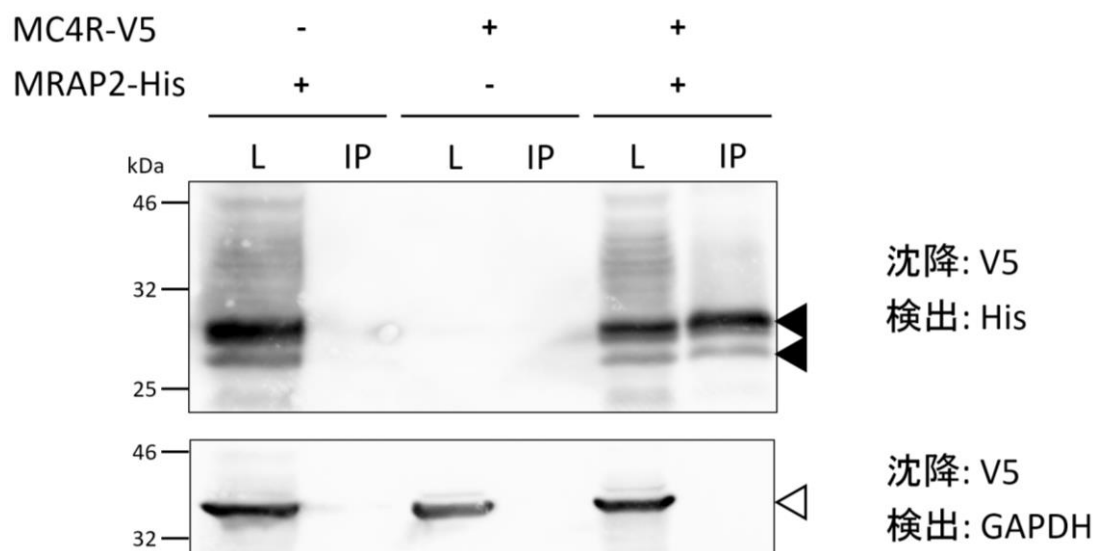


図 6 共免疫沈降法による MC4R-MRAP2 間の相互作用の解析

MC4R-MRAP2 間の相互作用を共免疫沈降法にて解析した。上部は CHO-K1 細胞にトランスフェクションした発現ベクターの種類を示す。L は免疫沈降を行っていない未処理の細胞溶解液を、IP は免疫沈降を行った細胞溶解液を示す。同じ PVDF 膜を用いて GAPDH を検出しローディングコントロールとした。

### NanoBiT 法によるネコ MC4R–MRAP2 間の相互作用の経時的解析

共免疫沈降法により、MC4R–MRAP2 間の相互作用が認められた。更に詳しく相互作用を理解するため、NanoBiT 法を用いて生細胞内における  $\alpha$ -MSH 添加時の相互作用の経時的変化を解析した。MC4R-Lg および MRAP2-Sm をトランスフェクションした CHO-K1 細胞における発光量はネガティブコントロールである MC4R-Lg および HaloTag-Sm のものと比べ最大で 6 倍高かった(図 7a)。また曲線下面積の比較では、 $\alpha$ -MSH の添加により MC4R-Lg および MRAP2-Sm をトランスフェクションした CHO-K1 細胞における発光量は  $\alpha$ -MSH 非添加時のものに比べて有意に上昇した(図 7b)。

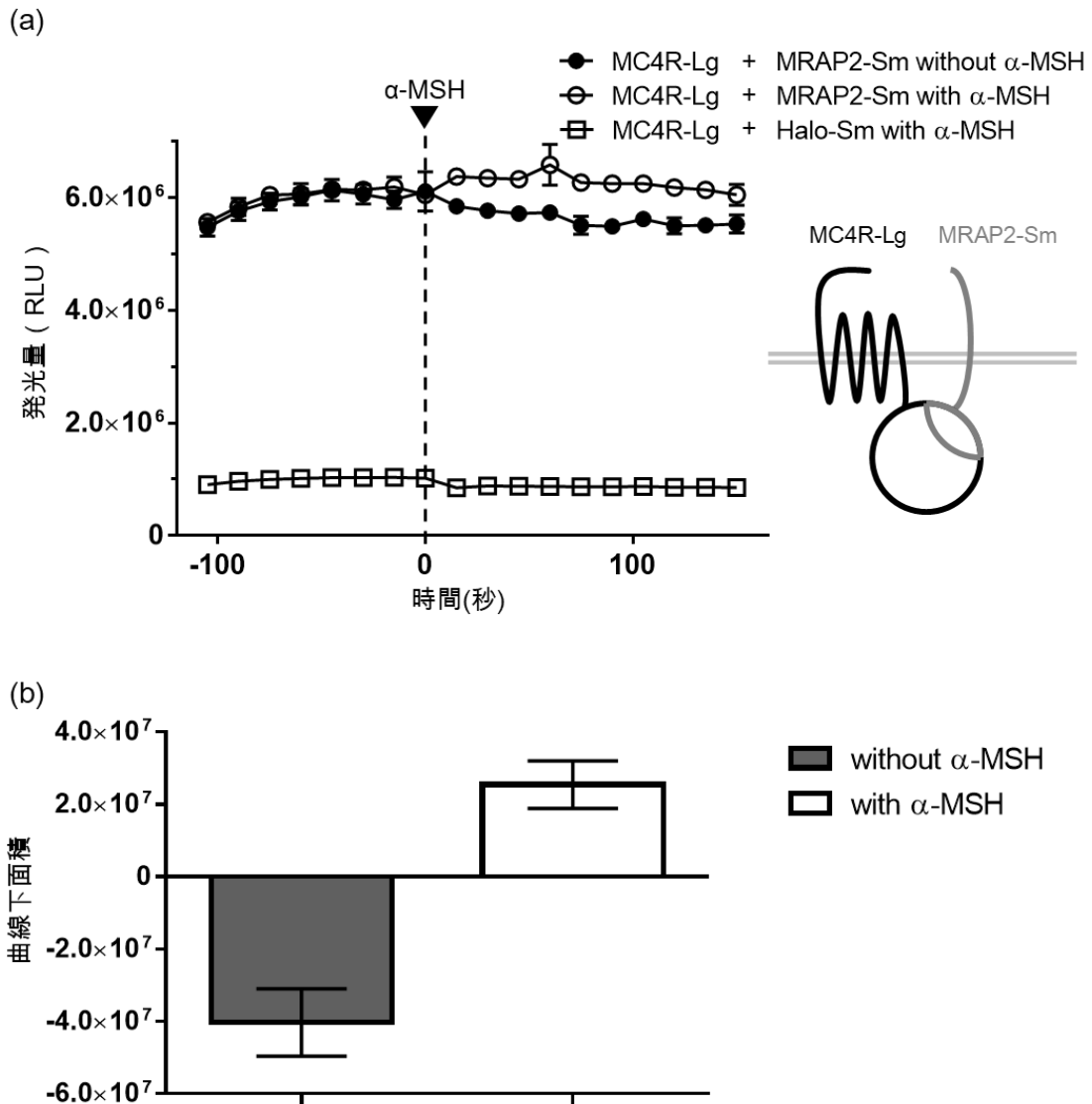


図 7 NanoBiT 法によるネコ MC4R-MRAP2 間の相互作用の経時的解析

(a) MC4R-Lg および MRAP2-Sm の両発現ベクターを CHO-K1 細胞にトランスフェクションし、NanoBiT 法により相互作用を経時的に解析した。また  $10^{-5}$  M  $\alpha$ -MSH 添加し、 $\alpha$ -MSH による相互作用の変化を評価した。(b) 0 秒とそれ以降の発光量の差をプロットして曲線を作製し、曲線下面積を求めた。0 秒の発光量より低い部分の面積は負で表した。データは  $n = 3$ 、平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。

## 2.4 考察

ネコ MRAP2 における糖鎖付加の状態を評価するために、糖鎖付加予測部位に変異を導入したベクターおよび糖鎖分解酵素である PNGase F を用いてウェスタンブロットを行った。分子量を解析した結果、CHO-K1 細胞においてネコ MRAP2 は N9 および N175 の両部位で糖鎖付加を受けていることが明らかになった。N9 において糖鎖付加を受けることは知られているが、N175 における糖鎖付加を確認したのは、我々の知る限り本研究が初である。N9 における糖鎖付加の状態は MRAP2 の受容体調節機能と関連することが知られており、ヒトにおいて N9Q 変異を導入した MRAP2 は MC2R に対するシグナル伝達増強作用が失われる(Chan et al., 2009)。MC4R のシグナル伝達調節における N9 の糖鎖付加の影響は報告されていないが、何らかの影響があるかもしれない。

また、今回の糖鎖解析の結果は MRAP2 のトポロジーに関する間接的なエビデンスとなり得る。興味深いことに、MRAP2 のホモログである MRAP1 において、N 末端が細胞外に出るタンパク質と C 末端が細胞外に出るタンパク質が混在している逆トポロジー構造を取ることが報告されている(Maben, Malik, Jiang, & Hinkle, 2016; Sebag & Hinkle, 2007, 2009b)。同様に MRAP2 も逆トポロジー構造を取ると考えられているが(Dores, 2016)、実際に確認しているのは Sebag らの報告 1 報のみである(Sebag & Hinkle, 2010)。N 結合型糖鎖付加は粗面小胞体膜の管腔側でのみ起こることを考慮すると、今回の N 末端および C 末端における糖鎖付加は、上記の逆トポロジー説を支持するものであると言える。

共免疫沈降法および NanoBiT 法を用いて、ネコ MC4R-MRAP2 間の相互作用を解析した結果、ネコ MC4R および MRAP2 は相互作用を示すことが明らかになった。この結果はヒト、マウス MRAP2 における報告と類似しているが(Asai et al., 2013; Chan et al., 2009)、我々の知る限り、生細胞内における MC4R-MRAP2 間の相互作用を経時的に定量した報告は本研究が初めてである。NanoBiT 法において、リガンド添加時の  $\beta 2$  アドレナリン受容体と  $\beta$  アレスチン 2 の様にタンパク質間相互作用に大きな動的変化が生じる場合、リガンド添加により発光量は数倍変化する(Dixon et al., 2016)。しかしネコ MC4R お



よび MRAP2 の場合、リガンド添加前からネガティブコントロールより高い発光量を示していた。これはネコ MC4R および MRAP2 が基底状態から相互作用していることを示唆している。また、 $\alpha$ -MSH の添加により発光量がわずかに増加した。リガンド結合により GPCR が活性化すると、GPCR の構造が変化することでシグナルが下流に伝達される (Kobilka, 2007)。 $\alpha$ -MSH の結合による MC4R の構造の変化が MC4R-MRAP2 間の相互作用に影響を与えた可能性がある。

以上のことから、ネコ MRAP2 は予想された両部位で糖鎖付加を受けており、MC4R と相互作用を示すことが明らかになった。よって、ネコにおいても MRAP2 が MC4R の近傍にてシグナル伝達を調節し、MRAP2 における糖鎖付加がその機能を修飾している可能性がある。今後は MC4R における MRAP2 の役割を糖鎖付加も含め、シグナル伝達解析等で進めていく必要がある。

## 2.5 小括

本章では、糖鎖付加部位に変異を導入した MRAP2 と糖鎖分解酵素を利用して、MRAP2 における糖鎖付加の状態を評価した。その結果、ネコ MRAP2 は N9 および N175 の両部位で糖鎖付加を受けていることが明らかになった。また、膜貫通領域を挟んで両側で糖鎖付加を受けていることから、MRAP2 は逆トポロジー構造を取る可能性が示された。

共免疫沈降法および NanoBiT 法によるタンパク質間相互作用解析の結果、ネコ MC4R および MRAP2 が相互作用を示すことが明らかになった。また、NanoBiT 法により、これらの相互作用を生細胞内で経時的に定量することができた。MC4R および MRAP2 は基底状態から相互作用しており、 $\alpha$ -MSH の添加はわずかに相互作用に影響した。

以上のことから、ネコ MRAP2 が MC4R の機能に影響を与える可能性が示された。 $\alpha$ -MSH 添加により相互作用が変化したことから、MRAP2 がシグナル伝達に関与していることが予想される。糖鎖についてもシグナル伝達解析と交え、その役割を明らかにしていく必要がある。

## 第3章 ネコメラノコルチン4受容体のシグナル伝達および二量体形成におけるメラノコルチン2受容体アクセサリータンパク質2が与える影響の解析

### 3.1 緒論

MC4Rは主に中枢神経系に発現し、 $\alpha$ -MSHの結合を介してエネルギー恒常性の維持に関与している。1986年、ラットにおいて $\alpha$ -MSHの脳室内投与が食物摂取量を減少させることが報告されたが(Poggioli, Vergoni, & Bertolini, 1986; Vergoni, Poggioli, & Bertolini, 1986)、媒介する受容体は知られていなかった。その後、1993年にMC4Rがクローニングされたが、当初は機能未知の受容体であった(Gantz et al., 1993)。1997年、Fanらによる合成アゴニストおよびアンタゴニストを用いた研究がエネルギー恒常性の維持におけるMC4Rの重要性を示した(Fan, Boston, Kesterson, Hruby, & Cone, 1997)。それ以降、MC4Rは盛んに研究され多くのことが明らかにされた。

MC4Rは主要な3つのGタンパク質(Gs、Gi/o、Gq)全てと共役し、cAMPやカルシウムなどのセカンドメッセンジャー濃度を変化させ、また細胞外シグナル調節キナーゼ(ERK)1/2回路やc-Jun N末端キナーゼ(JNK)回路などの分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)カスケードの活性も調節することが知られている(Büch, Heling, Damm, Gudermann, & Breit, 2009; Chai, Li, Zhang, Wang, & Mulholland, 2009; Newman et al., 2006; Sutton, Duos, Patterson, & Berthoud, 2005; Tao, 2010)。最もよく知られているMC4Rの細胞内シグナル伝達経路はGs-cAMP-PKA伝達経路であり(Gantz et al., 1993)、ノックアウトマウスを用いた研究により実際にMC4RがGs-cAMP-PKA伝達経路を介してエネルギー恒常性維持に関与していることが知られている(Czyzyk et al., 2008)。

いくつかの*in vitro*研究でヒトMRAP2は $\alpha$ -MSHによるMC4Rを介したcAMP産生を増強することが報告されている(Asai et al. 2013; Schonnop et al. 2016; Liang et al. 2018)。*in vivo*研究においてもMRAP2ノックアウトマウスが肥満を呈すること(Asai et al. 2013; Novoselova et al. 2016)やMRAP2の過剰発現マウスで室傍核ニューロンの活性化や食事誘発性熱産生の増加が認めら

れること(Bruschetta et al. 2018)は *in vitro*における観察と一致する。しかし、MRAP2がどのようにMC4Rのシグナル伝達調節をしているかは知られていない。加えて、MRAP2 ノックアウトマウスはMC4R ノックアウトマウスと異なり食物摂取量およびエネルギー消費量に有意な変化がなくとも肥満を呈することから、MRAP2にはMC4R非依存的な機能も存在することが示唆されており、未だ不明な点が多い。

また近年、GPCRの機能調節メカニズムの1つとして、GPCRの二量体化が受容体機能に関与していることが明らかとなっている(Fanelli, Seeber, Felling, Casciari, & Raimondi, 2013)。様々なGPCRで二量体化が報告されており、MC4Rもホモ二量体を形成することが知られている(Biebermann et al., 2003)。第2細胞内ループを置換した二量体非形成の変異型MC4Rにおいてシグナル伝達が増強される(Piechowski et al., 2013)。また、MRAP2のホモログであるMRAP1において、MRAP1の発現がMC5Rのホモ二量体形成を阻害する(Sebag & Hinkle, 2009a)。これらの結果からSchonnopらは、MRAP2のMC4Rへの相互作用がMC4Rのホモ二量体形成を阻害することで、MC4Rのシグナル伝達が増強されると仮説を立てている(Schonnop et al., 2016)。

第2章で行った実験結果から、ネコにおいてもMC4RおよびMRAP2が相互作用していることが明らかになった。よって、ネコMRAP2がMC4Rのシグナル伝達機能を調節している可能性がある。また、ネコMRAP2に認められた2つの糖鎖付加部位はシグナル伝達と関与しているかもしれない。そこで、第3章ではネコMC4RおよびMRAP2の機能の解明を目的として、様々な条件下でのMC4Rシグナル伝達解析を行った。また、MRAP2の受容体調節メカニズムの解明を目的として、MC4Rのホモ二量体化の解析を行った。

## 3.2 材料と方法

### ルシフェラーゼレポーターアッセイ法によるネコ MC4R のシグナル伝達解析

MC4R および変異型を含む各 MRAP2 発現ベクターを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイにてリガンド添加時の細胞内 cAMP 産生を評価した。CHO-K1 細胞を 96 ウェルプレートに  $1 \times 10^4$ /well で播種し、第 2 章と同様に条件で培養した。24 時間後、各ウェルに pGL4.29 [luc2P/CRE/Hygro]ベクター (Promega) 14.5 ng/well、pNL1.1 [TK/Nluc]ベクター (Promega) 0.5 ng/well、MC4R-V5 発現ベクター 5 ng/well、各 MRAP2-His 発現ベクターまたは pcDNA3.1 V5-His B (モックとして利用) 30 ng/well、ScreenFect A (Wako Pure Chemical Industries) 0.25  $\mu$ l/well、Dilution Buffer for ScreenFect A 10  $\mu$ l/well を用いてトランスフェクションした。MC4R-V5 および各 MRAP2-His 発現ベクターは第 2 章で作製したものを使用した。トランスフェクション開始から 24 時間後、培地を無血清培地(F-12 HAM)に交換した。7 時間培養後、各濃度( $10^{-12}$ ~ $10^{-6}$  M)の  $\alpha$ -MSH を添加し更に 5 時間培養した。培養後 Nano-Glo Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)を添加し、Nluc の発光および cAMP によって誘導される luc2P の発光を GloMax Multi Detection System (Promega)にて定量した。Luc2P の値は、内在性コントロールである Nluc の値で補正した。グラフの作製および統計処理は GraphPad Prism 6 (GraphPad Software)を用いた。得られたデータは平均値 $\pm$ 標準誤差として表し、統計学的有意差はテューキーの検定にて検討し有意水準は  $p < 0.05$  とした。

### NanoBiT 法によるネコ MC4R ホモ二量体化の経時的解析

MC4R-Lg および MC4R-Sm を用いて、第 2 章と同様の条件で NanoBiT を行い MC4R のホモ二量体化を評価した。CHO-K1 細胞を 96 ウェルプレートに  $1 \times 10^4$  /well で播種した 24 時間後、MC4R-Lg 発現ベクター 37.5 ng/well、MC4R-Sm 発現ベクターまたは HaloTag-Sm(ネガティブコントロールとして使用) 37.5 ng/well、ScreenFect A (Wako Pure Chemical Industries) 0.375  $\mu$ l/well、Dilution Buffer for ScreenFect A 10  $\mu$ l/well を用いてトランスフェク

ションした。以降の手順は、第 2 章の NanoBiT 法による MC4R-MRAP2 間の相互作用解析と同様である。

また、NanoBiT タンパク質を除去したタンパク質発現ベクターを共発現させて、MC4R のホモ二量体化への影響を評価した。タグ無しタンパク質発現ベクターはそれぞれ MC4R-Sm、MRAP2-Sm、HaloTag-Sm 発現ベクターから SmBiT の領域をインバース PCR 法によって削除することで作製した。上記同様に CHO-K1 細胞を播種した。24 時間後、MC4R-Lg 発現ベクター 12.5 ng/well、MC4R-Sm 発現ベクター 12.5 ng/well、各濃度(1~12.5 ng/well)の非タグタンパク質発現ベクターに合計 DNA 量が 50 ng になるようにサケ精子を加え、ScreenFect A (Wako Pure Chemical Industries) 0.25  $\mu$ l/well、Dilution Buffer for ScreenFect A 10  $\mu$ l/well を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション開始から 24 時間後、培地を無血清培地に交換した。4 時間培養後、Nano-Glo Live Cell Assay System (Promega)のバッファーと基質を添加し、90 秒後の発光量を GloMax Multi Detection System (Promega)を用いて定量した。グラフの作製および統計処理は GraphPad Prism 6 (GraphPad Software)を用いた。得られたデータは平均値 $\pm$ 標準誤差として表した。

### 3.3 結果

#### ネコ MC4R および MRAP2 発現 CHO-K1 細胞における cAMP 濃度の測定

MC4R および MRAP2 の機能を解析するために、各発現ベクターおよび CHO-K1 細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。α-MSH は MC4R を介して、用量依存的に cAMP による発光を高めた(図 8)。MC4R 単独発現(モック)CHO-K1 細胞では EC<sub>50</sub> 値が 8.15 nM であったのに対し、MRAP2 共発現 CHO-K1 細胞では EC<sub>50</sub> 値が 0.794 nM であった。更に MC4R 単独発現 CHO-K1 細胞では基底状態から最大で 4.1 倍発光が高まったのに対し MRAP2 共発現 CHO-K1 細胞では最大で 6.5 倍高まった。

また糖鎖付加部位に変異を導入した MRAP2 の比較では、変異型を含む各 MRAP2-His 発現ベクターの共発現はいずれも MC4R 単独発現よりも 2.5-3.2 倍高い発光を示した( $p < 0.01$ ; 図 9)。変異型 MRAP2 間では N9Q における発光は低く、N175Q では高い傾向が認められ、野生型-N175Q 間および N9Q-N175Q 間には有意な差が認められた( $p < 0.05$ )。

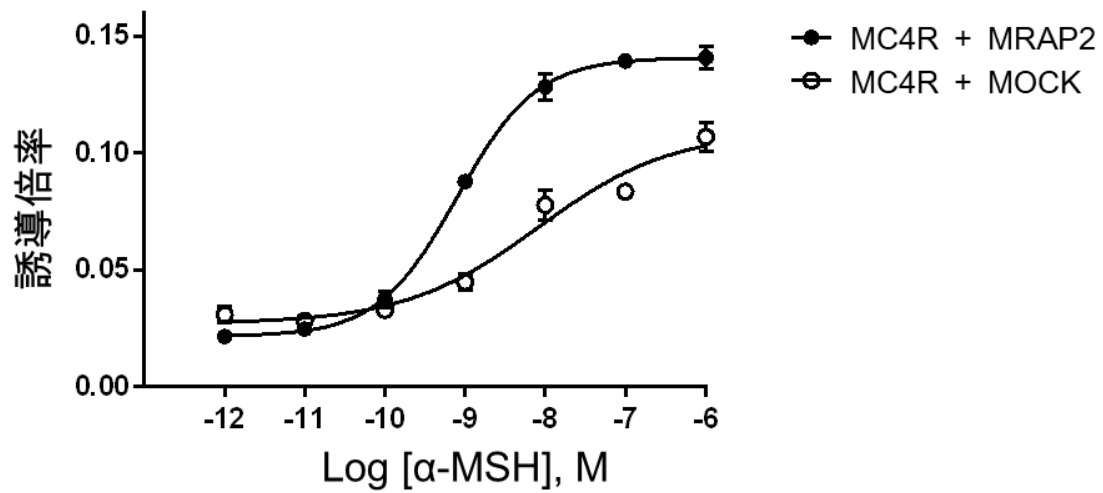


図 8  $\alpha$ -MSH による MC4R シグナル応答における MRAP2 の影響

各濃度の  $\alpha$ -MSH による MC4R を介した cAMP 産生をルシフェラーゼレポーターアッセイで測定した。誘導倍率は cAMP で誘導される luc2P の発光量と内在性コントロールである Nluc の発光量との比を表す。データは  $n = 4$ 、平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。



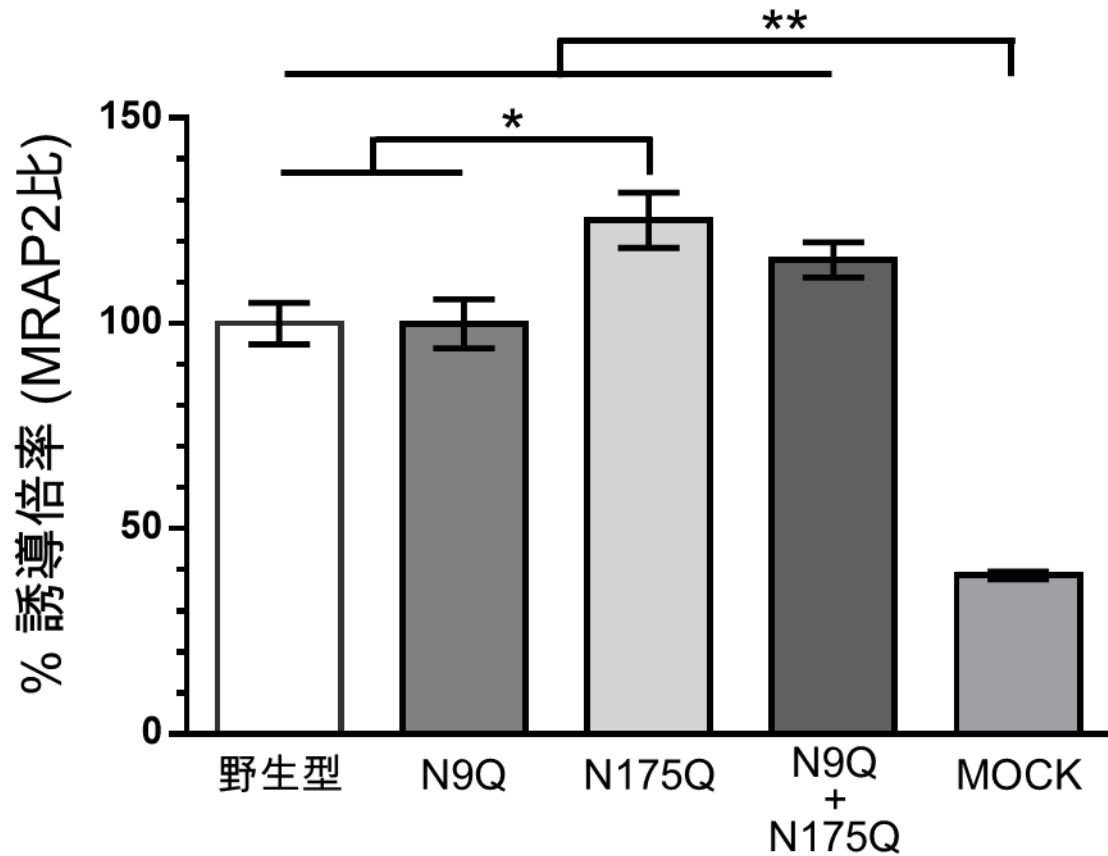


図 9 MC4R シグナル応答における MRAP2 の糖鎖付加状態の影響

$10^{-9}$  M  $\alpha$ -MSH 添加時の MC4R を介した cAMP 産生をルシフェラーゼレポーターアッセイで測定した。下部は MC4R と共発現させたベクターを示す。誘導倍率は cAMP で誘導される luc2P の発光量と内在性コントロールである Nluc の発光量との比を表す。縦軸は野生型 MRAP2 の誘導倍率を 100% としたときの相対値を表す。データは  $n = 3$ 、平均値  $\pm$  標準誤差で表した。\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ 。

## NanoBiT 法によるネコ MC4R のホモ二量体化の解析

シグナル伝達解析の結果、ネコ MRAP2 の共発現は MC4R のシグナル伝達を増強した。この増強は MC4R ホモ二量体化と関連していると仮説を立て、ネコ MRAP2 の MC4R ホモ二量体化への影響を調べるため、NanoBiT 法を用いた解析を行った。MC4R-Lg および MC4R-Sm を共発現させた CHO-K1 細胞において、12.5 ng のタグなし MC4R 発現ベクターを共にトランスフェクションした場合の発光は、同量のタグなし MRAP2 および HaloTag 発現ベクターをトランスフェクションした場合に比べ、減少した(図 10 a)。これは本実験系における発光が MC4R 同士の特異的な結合つまりホモ二量体によって生じていること示唆している。

また、MC4R-Lg および MC4R-Sm の二量体化によって生じる発光は、リガンド添加前からネガティブコントロール(MC4R-Lg および HaloTag-Sm)より高く、 $\alpha$ -MSH の添加による影響は認められなかった(図 10b)。

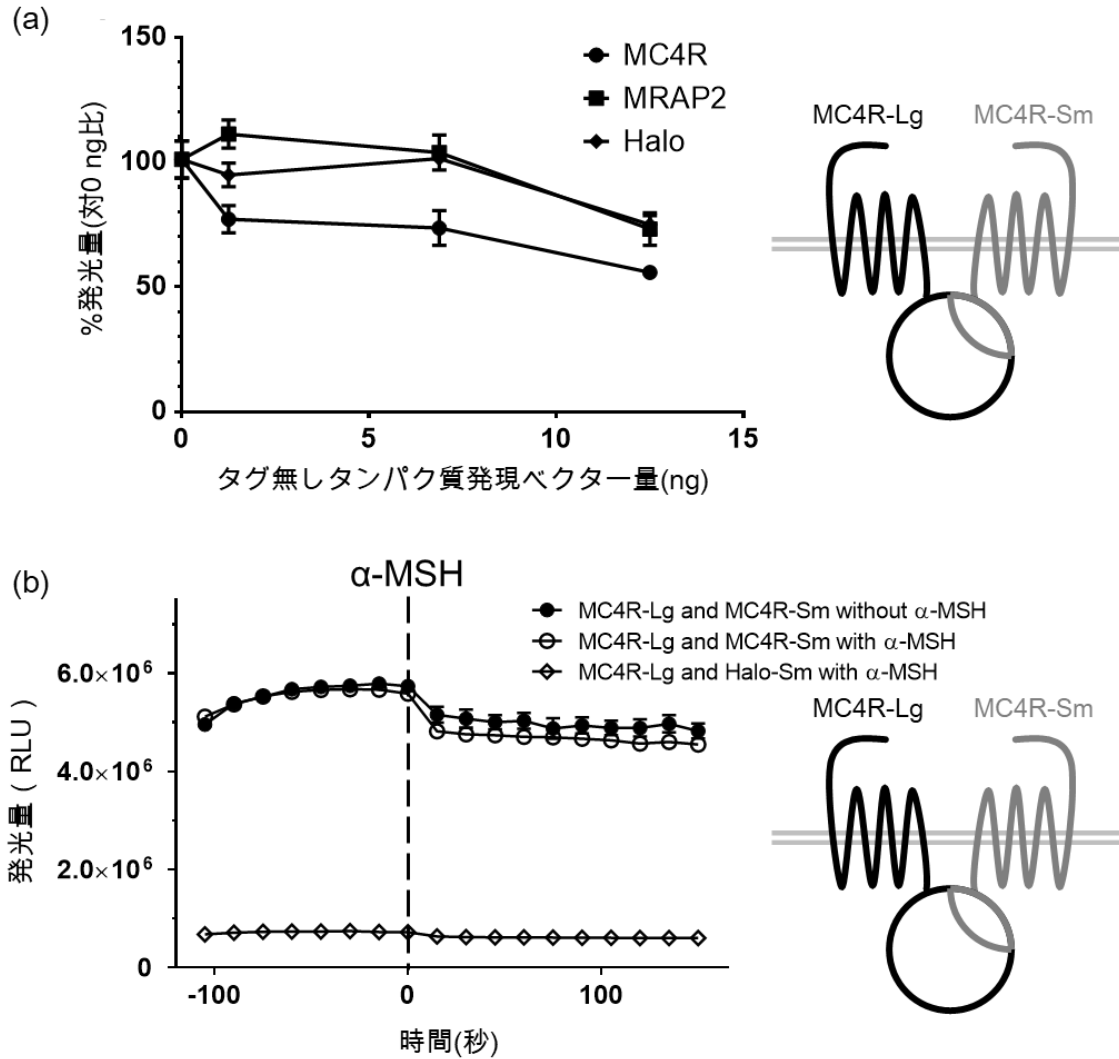


図 10 NanoBiT 法によるネコ MC4R のホモ二量体化の解析

(a) タグ無しタンパク質の共発現による MC4R ホモ二量体への影響を NanoBiT 法により評価した。12.5 ng の MC4R-Lg および MC4R-Sm、各量のタグ無しタンパク質発現ベクターをトランスフェクションした CHO-K1 細胞にて発光を測定した。横軸はトランスフェクションしたタグ無しタンパク質発現ベクターの量を示す。(b) MC4R ホモ二量体における  $\alpha$ -MSH 添加の影響を NanoBiT 法により評価した。データは  $n = 3$ 、平均値  $\pm$  標準誤差で表した。

### 3.4 考察

MRAP2 の MC4R シグナル伝達における影響を見るために、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。一過性に MC4R を発現させた CHO-K1 細胞において、 $\alpha$ -MSH の添加は MC4R を介した細胞内 cAMP 産生を用量依存的に増加させた。用量反応曲線から得られた EC<sub>50</sub> の値(8.15 nM)はヒト MC4R の EC<sub>50</sub> の値(8.6 nM)と近い値であった(Oosterom et al., 2001)。MRAP2 の共発現は MC4R を介した細胞内 cAMP 産生を増強し、MC4R の EC<sub>50</sub> を減少させた。このような MRAP2 による MC4R シグナル伝達の変化は、ヒト MC4R および MRAP2 の報告と類似している(Asai et al., 2013; Schonnop et al., 2016)。従って、これらの結果はネコ MC4R が  $\alpha$ -MSH の受容体として機能すること、ネコ MRAP2 が  $\alpha$ -MSH の MC4R に対する親和性および内活性を調節する可能性を示している。

ネコ MRAP2 における 2 つの糖鎖付加部位(N9 および N175)に変異を導入した非糖鎖付加 MRAP2 発現ベクターを用いて、MRAP2 の糖鎖付加状態が MC4R シグナル伝達に与える影響をルシフェラーゼレポーターアッセイで解析した。N9Q 変異と野生型の MRAP2 において MC4R シグナル伝達に有意な差は認められなかった。ヒト MRAP2 における N9Q 変異は MC2R のシグナル伝達を MRAP2 非発現時と同等まで下げる(Chan et al., 2009)。そのため、MC2R のシグナル伝達調節において N9 の糖鎖付加は必須であると考えられているが、ネコ MRAP2 においては N9 の糖鎖付加状態は MC4R シグナル伝達の調節に関与していないと思われる。一方、N175Q 変異は野生型と比較して、MC4R を介した細胞内 cAMP 産生を有意に高めた。N175 の糖鎖付加状態は MRAP2 の機能に関与していることが示唆される。また、N175 の糖鎖付加部位を持つ動物種と持たない動物種間で MRAP2 機能に差があるかもしれない。

NanoBiT 法による、MC4R ホモ二量体の解析によりネコ MC4R はホモ二量体を形成することが明らかになった。これはヒト MC4R における報告と一致しているが(Biebermann et al., 2003)、我々の知る限り、生細胞内で経時的に MC4R の二量体形成を解析したのは本研究が初めてである。GPCR の多量体におけるリガンド添加の影響については、多くの報告がある。方法、リガンド、

受容体の違いにより、ホモ二量体化を抑制するものから促進するものまで様々な結果が報告されている(Herrick-Davis, Grinde, Cowan, & Mazurkiewicz, 2013)。今回我々が行った NanoBiT 法では、 $\alpha$ -MSH の添加は短期的に MC4R ホモ二量体化に影響を与えなかった。従って、MC4R は基底状態からホモ二量体を形成しており、シグナル伝達時にそれらの形態に変化が起きないことが示唆された。

更に MRAP2 による MC4R シグナル伝達の増強が MC4R ホモ二量体化の阻害によるものであるという Schonnop らの仮説を確認するために、タグ無しタンパク質を競合させ、MC4R ホモ二量体への影響を解析した。MC4R ホモ二量体化において、タグ無し MRAP2 共発現および HaloTag (ネガティブコントロール)共発現との間に差は認められなかった。従って、MRAP2 は MC4R ホモ二量体化に干渉しないと考えられる。すなわち、MRAP2 による MC4R シグナル伝達の増強には他のメカニズムが存在していると思われる。例えば MRAP1 は MCR のリガンド結合を調節していることが知られている(Sebag, Zhang, Hinkle, Bradshaw, & Cone, 2013; Sebag & Hinkle, 2010)。しかしながら、我々の知る限り、MRAP2 が MC4R の  $\alpha$ -MSH 結合能を調節するかどうかは知られていない。MRAP2 自身もホモ二量体を形成し、N 末端と C 末端が逆転した逆平行ホモ二量体というユニークな構造を取ると考えられている(Chan et al., 2009; Does, 2016; Sebag & Hinkle, 2010)。MC4R および MRAP2 の細胞内動態についてより詳しく検討していく必要がある。

シグナル伝達解析からネコ MC4R は  $\alpha$ -MSH の受容体として機能し、MRAP2 がその機能を調節していることが明らかになった。1 章、2 章の結果と合わせて考えると、他の哺乳類同様、中枢神経系でエネルギー恒常性の維持に関与している可能性がより高まったといえる。ネコ MRAP2 の N175 における糖鎖付加状態は MC4R シグナル伝達の調節機能に関与していると考えられ、N175 を有する種とそうでない種で MRAP2 の機能に差があるかもしれない。MC4R のホモ二量体解析の結果、MC4R は基底状態からホモ二量体を形成し、 $\alpha$ -MSH の添加はそれらに影響を与えなかった。また、MRAP2 の共発現は MC4R ホモ二量体化に影響を与えなかったことから、MRAP2 による競合が MC4R のホモ二量体化を阻害し、MC4R のシグナル伝達を増強するという仮説は否定された。

MRAP2によるMC4Rシグナル伝達調節機能には二量体化の調節以外のメカニズムが存在していると考えられる。メカニズムの解明には、リガンド結合やGsタンパク質との共役など、cAMPより上流のシグナル伝達経路を解析していく必要がある。また、ネコMC4RおよびMRAP2が実際にエネルギー恒常性に関与しているかを評価するために、正常体重および肥満のネコでMC4RおよびMRAP2遺伝子配列に差があるかをSNP解析で評価していきたい。

### 3.5 小括

本章ではルシフェラーゼレポーターアッセイ法を用いて、様々な条件下での MC4R シグナル伝達を評価した。 $\alpha$ -MSH の添加は MC4R を介した cAMP 産生を用量依存的に高め、他の哺乳類同様ネコにおいても  $\alpha$ -MSH の受容体として機能していることが明らかになった。また MRAP2 の共発現は MC4R シグナル伝達を増強したことから、MC4R と共にエネルギー恒常性の維持に関与している可能性がある。MRAP2 の N175 における糖鎖付加の状態は、MC4R シグナル伝達の調節に関与していた。N175 に糖鎖付加部位には種差が見られるため、糖鎖付加を受ける種と受けない種で MRAP2 の機能に違いがある可能性がある。

NanoBIT 法を用いて MC4R のホモ二量体化を解析した結果、MC4R は基底状態からホモ二量体を形成し、 $\alpha$ -MSH の添加はホモ二量体化に影響を与えなかった。また、MRAP2 の共発現もホモ二量体化に影響を与えず、MRAP2 の競合により MC4R のホモ二量体が解離するという仮説は否定される結果になった。MRAP2 による MC4R シグナル伝達調節メカニズムにはリガンド結合能など他の要因が存在していると考えられる。

以上のことから、ネコ MC4R が中枢神経系で  $\alpha$ -MSH の受容体として機能し、MRAP2 がその機能を調節している可能性が示された。他の哺乳類同様、MC4R および MRAP2 はエネルギー恒常性において重要な役割を担っていることが予想される。今後は、実際にネコでこれらの遺伝子がエネルギー恒常性に関与しているかを調べるため、SNP タイピングによる肥満との関連解析を行っていく必要がある。

## 第4章 ネコメラノコルチン4受容体遺伝子およびメラノコルチン2受容体ア クセサリータンパク質2遺伝子における一塩基多型と肥満との関連の解析

### 4.1 緒論

ネコにおいて、肥満およびそれが要因となって起こる NCDs は獣医領域の大きな健康問題となっている。幾つかの国の研究で、各地域の 11.5%-63%の飼いネコが過体重または肥満状態であると報告されており (Tarkosova et al., 2016)、日本では、40%を超える飼いネコが過体重または肥満である (アニコム株式会社, 2017)。肥満は食事、運動といった環境要因だけでなく、個体が有する遺伝素因との相互作用により容易に生じる (Hetherington & Cecil, 2010)。肥満に関連する遺伝子多型への関心は高く、BMI、ウエスト・ヒップ比、その他の肥満形質における GWAS により、ヒトにおいて 300 を超える SNP が同定されている (Goodarzi, 2018)。

MC4R 遺伝子における、多型・変異は肥満と強く関連する。ヨーロッパ系の祖先を持つ人々を対象とした GWAS では MC4R 遺伝子近傍の SNP (rs17782313) が FTO 遺伝子の SNP (rs9939609) に次いで 2 番目に強い肥満との関連を示すことが知られている (Loos et al., 2008)。また、MC4R における機能喪失変異は単一遺伝子異常に起因するヒト肥満で最も高頻度であり、ヨーロッパでは前肥満者の数%を占めていると言われている (Farooqi et al., 2003; Xi, Chandak, Shen, Wang, & Zhou, 2012)。MC4R 全コード領域にわたって 150 を超える変異がヒトにおいて同定されており、ヘテロ接合体変異でも肥満や過食を引き起こす特徴をもつ (Tao, 2010)。過体重のネコにおいて、糖尿病と関連する SNP が MC4R 遺伝子で同定されている (Forcada, Holder, Church, & Catchpole, 2014)。また肥満だけではなく、MC4R 遺伝子近傍の SNP (rs17782313) は日本人において血中トリグリセリド濃度と関連することが知られている (Katsuura-Kamano et al., 2014)。

MRAP2 遺伝子においても、肥満と関連する変異が見つかった。ヒト幼少期肥満患者において、低頻度の変異が認められ、一部の変異型 MRAP2 にお



いて、MC4R に対するシグナル伝達調節・相互作用、MRAP2 ホモ二量体形成に変化が認められる(Liang et al., 2018; Schonnop et al., 2016)。

第 3 章までの実験結果から、ネコ MC4R は中枢神経系にて受容体として機能し、MRAP2 は MC4R と相互作用しシグナル伝達を増強することが明らかになった。他の哺乳類同様、MC4R および MRAP2 は中枢神経系にてエネルギー恒常性の維持に関与している可能性がある。そこで、第 4 章では、実際にネコでこれらの遺伝子がエネルギー恒常性の維持に関与しているかを評価することを目的として、MC4R および MRAP2 遺伝子における SNP 頻度と肥満(BCS)との関連について解析した。

## 4.2 方法

### 供試ネコ

日本、オーストラリアおよびスペインの動物臨床施設を受診した飼いネコ 88 頭(雄 47 頭、雌 27 頭、性別情報なし 14 頭、0.5-17 歳)から採取された血液サンプルを使用した。消化器疾患、内分泌疾患などの体重に影響を与える可能性がある疾患を有するもの、およびそれらの臨床的または生化学的徴候が認められるネコは研究対象から除外した。ネコは 9 段階 BCS 測定を行い、正常ネコ (BCS<3)、および過体重ネコ (BCS>3.5) に分類した。血統の遺伝的背景により生じるバイアスを排除するため、雑種のみを研究対象とした。

### ゲノム DNA の抽出

DNA Extractor WB Kit (Wako Pure Chemical Industries) を用いて、EDTA 処理した全血サンプル 100  $\mu$ l からゲノム DNA を抽出し、100  $\mu$ l の TE バッファーに溶解した。

### SNP の同定

初めに SNP を同定するため、ネコ MC4R および MRAP2 遺伝子の各エクソンを含む領域を PCR にて増幅し、ダイレクトシーケンスを行った。10 頭分(肥満 6 頭、正常 4 頭)の抽出したゲノム DNA を鋳型として PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara)、特異的プライマーを用い、非翻訳領域を含む MC4R 遺伝子全域および上流 563 bp (MC4Rseq-S、MC4Rseq-A; 表 3)、MRAP2 のエクソン 2 全域およびその上流 583 bp と下流 370 bp (MRAP2E2-S、MRAP2E2-A; 表 3)、エクソン 3 全域およびその上流 589 bp と下流 600 bp (MRAP2E3-S、MRAP2E3-A; 表 3)、エクソン 4 全域およびその上流 41 bp と下流 101 bp (MRAP2E4-S、MRAP2E4-A; 表 3) を増幅した。増幅産物を High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) にて精製し、3130xl ジェネティックアナライザー (Applied biosystems) により塩基配列を決定した。シーケンス波形解析および 10 頭分の塩基配列の比較を行い、SNP を同定した。

## アレル特異的プライマーPCRによる SNP タイピング

アレル特異的プライマーPCR(ASP-PCR)により SNP をタイピングした。同定した SNP のうち 5 ヶ所を対象として、それぞれに 2 つのアレル特異的プライマーおよび 1 つの共通プライマーを作製した(表 4)。特異性を高めるためにアレル特異的プライマーの 3'末端には SNP サイトの他に mismatches サイトを 1 つ追加した。また、2 つのアレル特異的プライマーによる増幅産物を解離曲線解析により区別するため、片方のアレル特異的プライマーの 5'末端には GC テイル配列(5'-GCCGCCCTGCCCGC-3')を付加し、増幅産物の  $T_m$  値を上昇させるように設計した。抽出したゲノム DNA 0.5  $\mu$ l、Power SYBR Green Master Mix 5  $\mu$ l (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)、共通プライマー 0.2  $\mu$ M(表 4)、非 GC テイルアレル特異的プライマー 0.2  $\mu$ M または各濃度(0.05~0.2  $\mu$ M; 表 4)の GC テイル付加アレル特異的プライマーを含む 10  $\mu$ l の反応液を調整し、ASP-PCR を行った。ASP-PCR の条件は 50°C 2 分、95°C 10 分の後、95°C 15 秒、60°C 1 分のサイクル条件で 40 サイクル行った。増幅後に解離曲線解析を行い、増幅産物の特異性を確認した。増幅曲線および解離曲線の解析には QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)を使用した。増幅曲線および解離曲線をコントロールと比較し、SNP をタイピングした。SNP タイピングの際には、シーケンスを行った 10 頭分の SNP タイピングの結果がシーケンスと一致することを確認し、それらをコントロールとして用いた。

## 症例対照研究

BCS を基にネコを正常群および過体重群に分け、症例対照研究を行い、肥満と SNP の関連解析を行った。アレルおよび遺伝子型の頻度はダイレクトアレルカウント法にて求めた。肥満とリスク因子アレルとの傾向の解析にはコクラン-アーミテージ検定(Armitage, 1955)を、リスク因子アレルにおける優性、劣性の評価には Sasieni が考案した検定を用いた(Sasieni, 1997; Sladek et al., 2007)。有意水準は  $p < 0.05$  とした。

表 3 シーケンス用 PCR に用いたプライマー

| 名称        | 配列 (5'-3')                | 種別         | 位置             | Accession No. |
|-----------|---------------------------|------------|----------------|---------------|
| MC4RSeq-S | ACTCTGTACAAGGAGAATGAACACG | Sense      | 80793171 - 95  | NC_018734.3   |
| MC4RSeq-A | ATGGCCTCTAGGGACGAAGT      | Anti-sense | 80795360 - 41  | NC_018734.3   |
| MRAP2E2-S | GGGCTGAAGTTGTAAGCTTGG     | Sense      | 76036955 - 75  | NC_018727.2   |
| MRAP2E2-A | ATGGTCTAAATGCATAAGGGGC    | Anti-sense | 76038041 - 20  | NC_018727.2   |
| MRAP2E3-S | GGTCAGATCCATTTTTGCCGA     | Sense      | 76049753 - 73  | NC_018727.2   |
| MRAP2E3-A | GCCCAACTCAAATGTTCTTTATCCT | Anti-sense | 76051041 - 17  | NC_018727.2   |
| MRAP2E4-S | GCTGGTATGTAAGCACTC        | Sense      | 76067122 - 39  | NC_018727.2   |
| MRAP2E4-A | GGCTCCTAGAGATGACAG        | Anti-sense | 76068814 - 797 | NC_018727.2   |

表 4 ASP-PCR に用いたプライマー

| 名称                 | 配列 (5'-3')   | 種別         | 使用濃度 (μM) |
|--------------------|--|------------|-----------|
| <b>MC4R</b>        |  |            |           |
| <b>c.-147 T/G</b>  |  |            |           |
| -147common         | GGAGACAGTAAAACTCCATTTC                                     | Sense      | 0.2       |
| -147T              | AAATGTCACGTGCTCT <u>AA</u>                                 | Anti-sense | 0.2       |
| -147G              | <u>GCCGCCCTGCCCGCAA</u> ATGTCACGTGCTCT <u>CA</u>           | Anti-sense | 0.05      |
| <b>c.*452 T/C</b>  |  |            |           |
| *452common         | ACTCTGTACAAGGAGAATGAACACG                                  | Anti-sense | 0.2       |
| *452T              | GTAATATTGAAGGATAGATGCTTAT <u>TC</u>                        | Sense      | 0.2       |
| *452C              | <u>GCCGCCCTGCCCGCGG</u> TAAATATTGAAGGATAGATGCTT <u>CGC</u> | Sense      | 0.05      |
| <b>MRAP2</b>       |  |            |           |
| <b>c.7-170 A/T</b> |  |            |           |
| 7-170common        | GAAGACATGGTGTCTGATTC                                       | Sense      | 0.2       |
| 7-170A             | GCTGCCTATACTTCATAC <u>CTA</u>                              | Anti-sense | 0.2       |
| 7-170T             | <u>GCCGCCCTGCCCGCG</u> CTGCCTATACTTCATAC <u>GAA</u>        | Anti-sense | 0.2       |
| <b>c.*543 T/G</b>  |  |            |           |
| *543common         | GACAAAAGCTGGGCTCAG   | Anti-sense | 0.2       |
| *543T              | GTTGGTACCTTCCACTCT <u>TC</u>                               | Sense      | 0.2       |
| *543G              | <u>GCCGCCCTGCCCGCG</u> TGGTACCTTCCACTCT <u>GC</u>          | Sense      | 0.05      |
| <b>c.*1047 A/G</b> |  |            |           |
| *1047common        | CACACTGGTATTGGAACAAC                                       | Sense      | 0.2       |
| *1047A             | ATGCAAGCAACTGTGT <u>AG</u>                                 | Anti-sense | 0.2       |
| *1047G             | <u>GCCGCCCTGCCCGCAT</u> GCAAGCAACTGTGT <u>ACG</u>          | Anti-sense | 0.1       |

網掛けは GC テール配列を、下線はミスマッチサイトを、囲いは SNP サイトをそれぞれ示す。

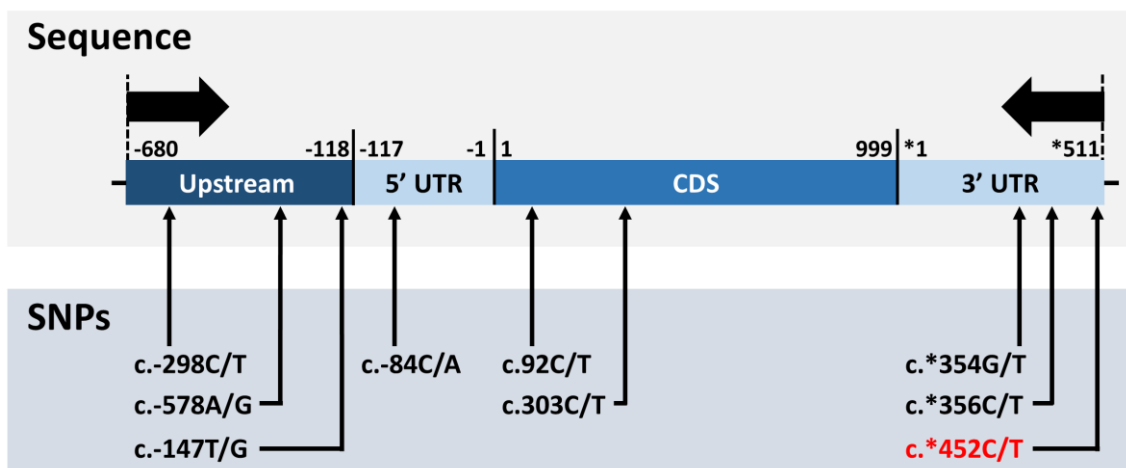
### 4.3 結果

#### シーケンスによる SNP の同定

SNP を同定するために 10 頭分のネコゲノム DNA のネコ MC4R および MRAP2 遺伝子のエクソン領域を中心にシーケンスを行い、塩基配列を比較した。ネコ MC4R において、遺伝子上流に 3 つ(c.-298C/T、c.-578A/G、c.-147T/G)、5'非翻訳領域 1 つ(c.-84C/A)、翻訳領域に 2 つ(c.92C/T、c.303C/T)、3'非翻訳領域に 3 つ(c.\*354G/T、c.\*356C/T、c.\*452C/T)の SNP が存在していた(図 11a)。ネコ MRAP2 においては、エクソン 2 周囲のイントロンに 2 つ(c.-7-170A/T、c.127+535A/G)、エクソン 3 周囲のイントロンに 7 つ(c.128-438G/T、c.128-430C/T、c.128-289C/T、c.128-125G/A)、エクソン 4 の翻訳領域に 2 つ(c.291A/G、c.380A/G)、エクソン 4 の 3'非翻訳領域に 7 つ(c.\*42G/A、c.\*75A/C、c.\*96G/A、c.\*259C/G、c.\*447G/A、c.\*543T/G、c.\*1407A/G)の SNP が存在していた(図 11b)。MRAP2 のエクソン 1 については増幅が難しく、現在条件検討を進めている。

翻訳領域に認められた SNP のアミノ酸配列への影響を評価した。MC4R の翻訳領域に認められた c.92C/T は非同義 SNP であり、アミノ酸配列をロイシン/プロリンに変化させる。一方 c.303C/T は同義 SNP であった。MRAP2 の翻訳領域に認められた c.380G/A は非同義 SNP であり、アミノ酸配列をグリシン/アスパラギン酸に変化させる。一方 c.291A/G は非同義 SNP であった。

(a) MC4R



(b) MRAP2

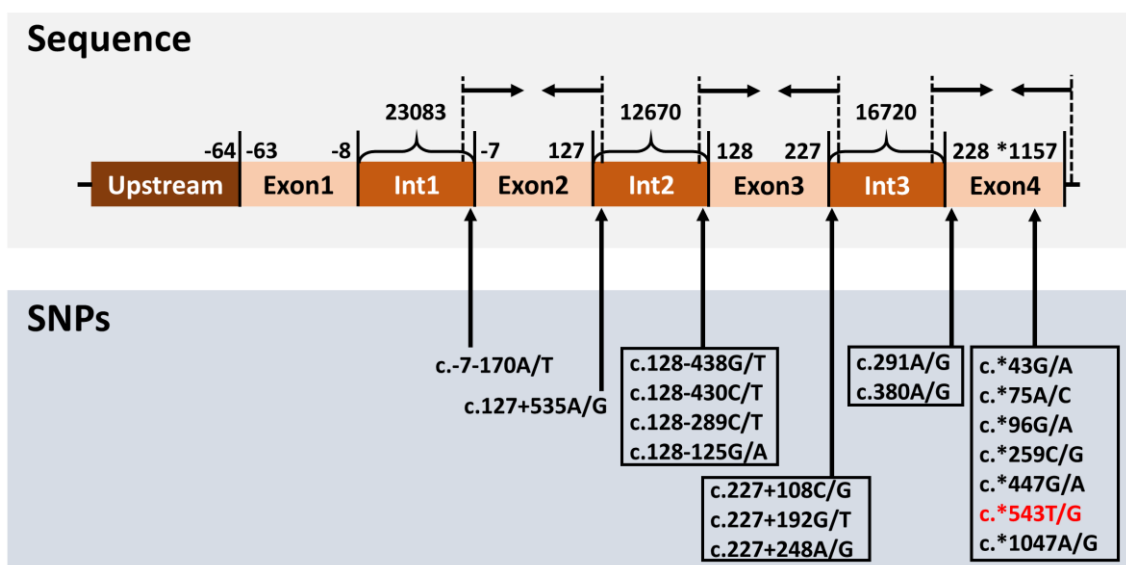


図 11 ネコ MC4R(a)および MRAP2(b)遺伝子にて同定された SNP の位置

図中の数字は翻訳領域の 1 塩基目を 1 としたときの位置を示す。矢印は PCR で使用したプライマーの位置を示す。赤字は後の関連解析で肥満との関連が示された SNP を示す。Int: インtron、CDS: 翻訳領域、UTR: 非翻訳領域。

## ASP-PCR による SNP タイピング

アレル特異的プライマーを用いた PCR を行い、増幅曲線および解離曲線の解析により SNP のタイピングを行った(図 12)。シーケンス済みのサンプルにおいて SNP タイピング結果がシーケンスと一致するかを確認することで、タイピングの正確性を評価した。今回扱った 5 つの SNP において、SNP タイピング結果はシーケンスと完全することを確認した。

ネコ MC4R 遺伝子においては予備実験にて行った 50 頭分のシーケンス結果を基に肥満との関連が予想される 2 つの候補 SNP(c.-147T/G、c.\*452C/T)についてアレル特異的プライマーを設計し、ASP-PCR により全てのサンプル(n = 88)の遺伝子型を決定した。ネコ MRAP2 においては正確なタイピングが確認できた 3 つの SNP(c.-7-170A/T、c.\*543T/G、c.\*1047A/G)について、スペインの全サンプル(n = 40)の遺伝子型を決定した。



遺伝子型

増幅曲線

解離曲線

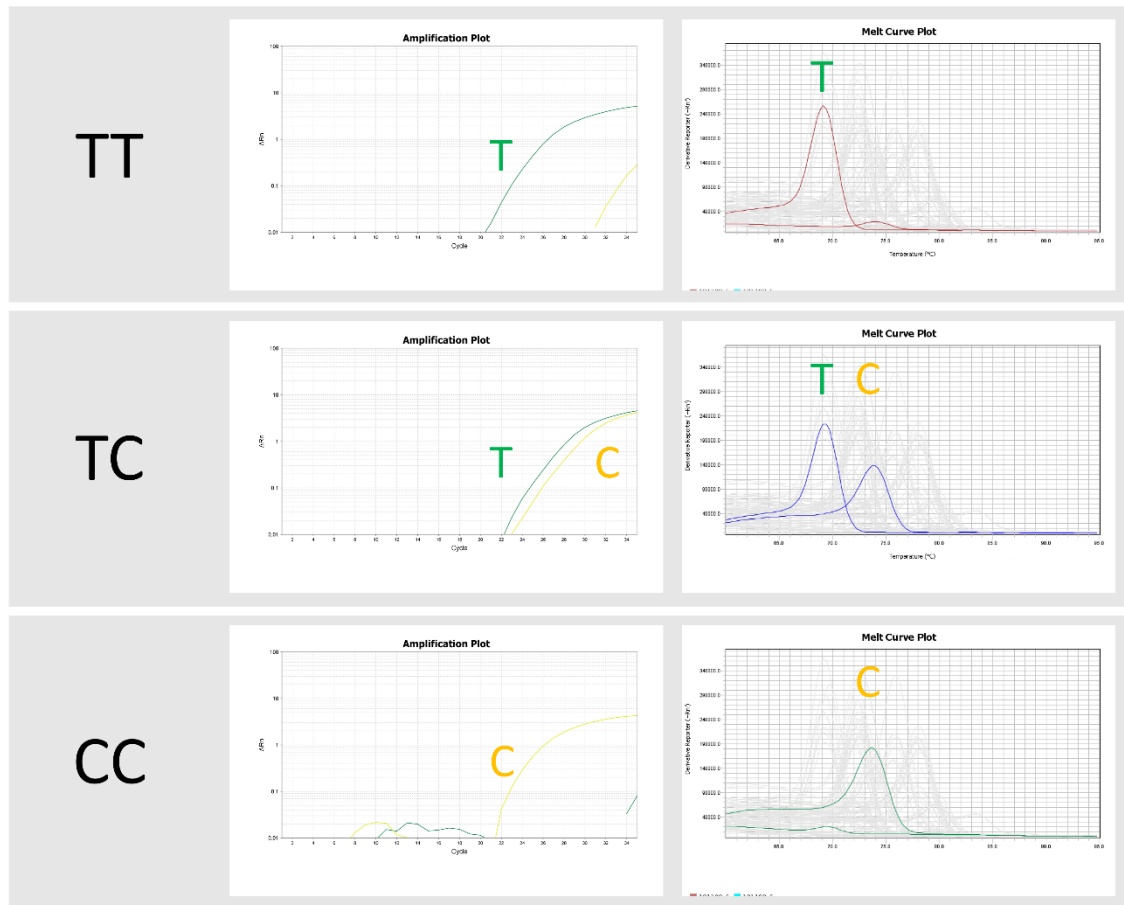


図 12 ASP-PCR による SNP タイピングの一例(c.\*452C/T)

各ネコゲノム DNA を鋳型にアレル特異的プライマーを用いて PCR を行い、増幅曲線の立ち上がりおよび解離曲線のピークを基に SNP の遺伝子型を決定した。

## 症例対照研究

BCS を基にネコを正常群( $BCS < 3$ )と過体重群( $BCS > 3.5$ )に分け、SNP 遺伝子型の頻度について症例対照研究を行った。ネコ MC4R において、過体重群の c.\*452T>C の頻度は高く、コクラン-アーミテージ検定の結果、正常群および過体重群間で遺伝子型頻度が有意に異なる傾向を示すことが明らかになった(表 5)。また、Sasieni の検定により、優性検定の統計量である  $P_{dominant}$  の値が低いことから、c.\*452T>C はヘテロ接合体においても肥満と関連する傾向を有することが示唆された。また、ネコ MRAP2 においては、過体重群の c.\*543G>T の頻度は高く、コクラン-アーミテージ検定の結果、正常群および過体重群間で遺伝子型頻度が有意に異なる傾向を示すことが明らかになった(表 6)。また、c.\*543G>T はヘテロ接合体においても肥満と関連する傾向を有することが示唆された。他の SNP については有意な傾向は認められなかった。

表 5 ネコ MC4R c.\*452T/C における遺伝子型の頻度

| MC4R<br>c.*452               | 遺伝子型頻度           |                  |                 |  |
|------------------------------|------------------|------------------|-----------------|--|
|                              | TT               | TC               | CC              |  |
| 正常<br>(BCS<3)<br>(n = 39)    | 0.79<br>(n = 31) | 0.18<br>(n=7)    | 0.03<br>(n = 1) |  |
| 過体重<br>(BCS>3.5)<br>(n = 49) | 0.55<br>(n = 27) | 0.37<br>(n = 18) | 0.08<br>(n = 4) | $P_{trend} = 0.019$<br>$P_{dominant} = 0.017$<br>$P_{recessive} = 0.260$ |

$P_{trend}$ 、 $P_{dominant}$ 、 $P_{recessive}$  はそれぞれ、コクラン-アーミテージ検定、Sasieni の優性、劣性検定の  $p$  値を示す。

表 6 ネコ MRAP2c.\*543T/G における遺伝子型の頻度

| MRAP2<br>c.*543              | 遺伝子型頻度           |                 |                 |  |
|------------------------------|------------------|-----------------|-----------------|--|
|                              | GG               | GT              | TT              |  |
| 正常<br>(BCS<3)<br>(n = 21)    | 0.52<br>(n = 11) | 0.33<br>(n=7)   | 0.14<br>(n = 3) |  |
| 過体重<br>(BCS>3.5)<br>(n = 19) | 0.16<br>(n = 3)  | 0.42<br>(n = 8) | 0.42<br>(n = 8) | $P_{trend} = 0.010$<br>$P_{dominant} = 0.015$<br>$P_{recessive} = 0.049$ |

$P_{trend}$ 、 $P_{dominant}$ 、 $P_{recessive}$  はそれぞれ、コクラン-アーミテージ検定、Sasieni の優性、劣性検定の  $p$  値を示す。

#### 4.4 考察

今回の雑種ネコを用いた研究では、MC4R 遺伝子付近に 9 個の SNP を同定した。ヒト MC4R 遺伝子周辺においては、1000 個以上の SNP が GenBank に登録されているが、この中には非常に低頻度の SNP も含まれている。ネコにおいてもサンプル数を増やし、様々な品種でシーケンスを行うことでより多くの SNP が同定できるかもしれない。イギリスのバーミーズおよび雑種ネコの MC4R において、翻訳領域に 3 つの SNP(c.92C/T、c.297C/T、c.303C/T)が同定されている(Forcada et al., 2014)。そのうち c.92C/T および c.303C/T については本研究でも認められたが、c.297C/T については認められなかった。これは地域ごとの遺伝的背景の差によるものであるかもしれない。Forcada らの報告同様、c.92C/T および c.303C/T において肥満との関連は認められなかった。c.92C>T は過体重のネコにおいて糖尿病との関連が報告されているが(Forcada et al., 2014)、本研究では糖尿病ネコの十分なサンプルが確保できていないため、確認することはできなかった。一方、本研究では上記の翻訳領域の SNP に加え、上流に 3 つ、5'非翻訳領域に 1 つ、3'非翻訳領域に 3 つの SNP を新たに同定した。特に 3'非翻訳領域に認められた c.\*452C/T はその遺伝子型と肥満に関連が認められた。ネコ MC4R の 3'非翻訳領域はヒトのものとは比べて長く、ヒト MC4R において c.\*452C/T に相当する SNP は認められなかった。本研究では c.\*452C/T の機能的意義について評価することはできなかったが、一般的に 3'非翻訳領域は、mRNA の安定性、局在、翻訳の制御に加えタンパク質間相互作用の媒介に関与していることが知られている(Chen & Shyu, 1995; Martin & Ephrussi, 2009; Mayr, 2018)。C.\*452C/T はこれらの機能に影響を与え、MC4R の発現様式を変化させているかもしれない。発現解析などで、より詳細に検討していく必要がある。

ネコ MRAP2 遺伝子においてはエクソン 2~4 およびその周囲のイントロンに 18 個の SNP が同定された。ヒト MRAP2 遺伝子周辺において GenBank に 25000 個以上の SNP が登録されている。ネコ MRAP2 においてもイントロン全域、エクソン 1 も含めてより多くの頭数でシーケンスすることでより多くの SNP が同定できると思われる。しかし、本研究ではサンプル数が少なく、

低頻度の SNP を対象とするのには不十分である。ネコを含めた伴侶動物ではヒト GWAS のような大規模な遺伝子研究は現状において困難であり、伴侶動物のゲノムバンクの充実化を図る必要がある。スペインで収集されたゲノム DNA サンプルを用いて、同定された SNP のうち、3 つを ASP-PCR にてタイピングしたところ、3'非翻訳領域に認められた c.\*543T/G において肥満との関連が示唆された。C.\*452C/T 同様、何らかの機能的意義を有する可能性があり、より詳しく調べていく必要がある。また、タイピングが完了していない残りの SNP に関しても、タイピングを進める必要がある。

以上のことから、ネコ MC4R、MRAP2 共に肥満と関連する SNP が同定された。サンプル数が少ないため今後更に検討していく必要があるものの、この結果は MC4R および MRAP2 がネコにおいても体重制御に何らかの役割を有していることを示唆している。また、これらの SNP は遺伝子診断法を用いた肥満体質の早期診断におけるマーカー候補となり得ることが明らかとなった。

## 4.5 小括

本章では、ネコ血液から抽出したゲノム DNA を用いて、MC4R および MRAP2 遺伝子における SNP の同定および同定した SNP の ASP-PCR によるタイピングを行った。次いでタイピングした結果を基に、BCS と SNP の遺伝子型頻度についての症例対照研究を行った。その結果 MC4R の 3'非翻訳領域に存在する c.\*452C/T および MRAP2 の 3'非翻訳領域に存在する c.\*543T/G の遺伝子型頻度は肥満と関連していた。c.\*452T>C、c.\*543G>T の頻度は過体重群において多く、これらを調べることで肥満体質の予測に利用できる可能性がある。また、これらの結果は MC4R および MRAP2 が他の哺乳類同様ネコにおいても体重制御に関わっている可能性を示唆している。

## 総括

本研究は、ネコにおける肥満の分子メカニズムの解明および遺伝子診断法の開発のため、ヒトやマウスで肥満関連遺伝子として知られる MC4R および MRAP2 の機能、肥満との関連について明らかにすることを目的として、一連の実験を行った。

第 1 章では対象分子の基礎的知見を得るために、ネコ MC4R および MRAP2 遺伝子の cDNA クローニングおよび RT-PCR による各組織の mRNA 発現解析を行った。cDNA クローニングによりネコ MC4R および MRAP2 の完全長 cDNA 配列を明らかにした。cDNA から予想されるアミノ酸配列は全体を通して他の哺乳類の MC4R および MRAP2 と高い相同性を示した。ネコ MC4R においては GPCR および MCR に特徴的なモチーフ構造が保存されており、MC4R および MRAP2 共に膜貫通領域では特に高い相同性を示した。これらのことから、ネコにおいても MC4R および MRAP2 遺伝子は保存されており、それぞれ受容体、膜タンパク質として機能していることが示唆された。一方、ネコ MRAP2 の C 末端にはヒト、マウス、ラットには存在しない N 結合型糖鎖付加予測部位が存在しており、ヒト、マウス、ラットと異なる機能を有しているかもしれない。RT-PCR によりネコ MC4R および MRAP2 mRNA は共に中枢神経系で高い発現を示した。この結果は他の哺乳類の発現様式と類似している。以上のことから、ネコ MC4R は中枢神経系にてメディエーターとして機能し、MRAP2 は膜タンパク質として受容体機能を修飾している可能性が示された。次いで、MC4R の受容体機能の解析、MRAP2 の相互作用解析、新規糖鎖付加部位の解析を行っていく必要がある。

第 2 章ではネコ MC4R および MRAP2 の機能解析への足がかりとして、MRAP2 の糖鎖付加および MC4R-MRAP2 間の相互作用解析を行った。N 結合型糖鎖付加予測部位に変異を導入した発現ベクターを用いて MRAP2 の糖鎖付加状態を評価した結果、哺乳類で共通して見られる C 末端の予測部位(N9) および N 末端の新規予測部位(N175)の両部位で糖鎖付加を受けていることが明らかになった。ヒト MRAP2 における N9 の糖鎖付加状態は MC2R のシグナル伝達調節機能に関与していることが知られており、ネコにおいても N9、N175

の糖鎖付加状態が MRAP2 の機能に関与しているかもしれない。また、MRAP2 のホモログである MRAP1 において N 末端が細胞外のタンパク質と C 末端が細胞外のタンパク質が混在する逆トポロジー構造を取ることが知られている。N 結合型糖鎖付加は粗面小胞体膜の管腔側でのみ起こることから、今回の膜貫通領域を挟んだ N 末端および C 末端の両部位での糖鎖付加は、MRAP2 が逆トポロジー構造を取ること示唆している。また、共免疫沈降法および NanoBiT 法による相互作用解析により、ネコ MC4R-MRAP2 間の相互作用の生細胞における経時的変化を初めて報告した。ネコ MC4R および MRAP2 は基底状態から結合しており、MC4R のリガンドである  $\alpha$ -MSH の添加は相互作用にわずかな影響を与えた。 $\alpha$ -MSH の結合による MC4R の構造の変化がこれらの相互作用に影響したのかもしれない。以上のことから、ネコにおいても MRAP2 が MC4R の近傍にてシグナル伝達を調節し、MRAP2 における糖鎖付加部位がその機能を修飾している可能性が示された。今後は、MC4R における MRAP2 の役割を糖鎖付加も含め、シグナル伝達解析等でより詳しく明らかにしていく必要がある。

第 3 章ではネコ MC4R および MRAP2 の機能の解明を目的として、ルシフェラーゼレポーターアッセイ法による様々な条件下での MC4R シグナル伝達解析を行った。また、MRAP2 の受容体調節メカニズムの解明を目的として、NanoBiT 法による MC4R のホモ二量体化の解析を行った。一時的に MC4R を発現させた CHO-K1 細胞において、 $\alpha$ -MSH の添加は MC4R を介した細胞内 cAMP 産生を用量依存的に増加させた。得られた  $EC_{50}$  の値はヒト MC4R と類似しており、ネコにおいても MC4R が  $\alpha$ -MSH の受容体として機能していることが示唆された。また、ネコ MRAP2 の共発現は、MC4R を介した cAMP 産生を増強し、MC4R の  $EC_{50}$  を減少させ、ヒト MRAP2 同様、 $\alpha$ -MSH の MC4R に対する親和性および内活性を調節している可能性が示された。糖鎖付加部位に変異を導入した MRAP2 を共発現させたところ、C 末端における糖鎖付加部位(N175)のアスパラギンをグルタミンに置換させた非糖鎖付加 N175Q 変異は、野生型と比較して、MC4R を介した細胞内 cAMP 産生を有意に高めた。N175 の糖鎖付加状態は MRAP2 の機能に関与している可能性があり、N175 をもつ動物種と持たない動物種で MRAP2 の機能に差があるかもしれない。NanoBiT



法により、MC4R は基底状態でホモ二量体を形成し、 $\alpha$ -MSH の添加は二量体形成に影響しないことが明らかになった。ヒトにおいて変異導入による MC4R ホモ二量体形成阻害が MC4R のシグナル伝達を増強することが報告されている。加えて、MRAP2 のホモログである MRAP1 において、MRAP1 の発現が MC5R のホモ二量体形成を阻害することが知られている。これらのことから、MRAP2 による MC4R ホモ二量体形成の阻害が MC4R のシグナル伝達の増強のメカニズムであると仮説が立てられている。この仮説を証明するために、MRAP2 を共発現させ MC4R ホモ二量体形成への影響を NanoBiT 法により調べた。しかしながら、MRAP2 の共発現は MC4R ホモ二量体形成に影響せず、MRAP2 による MC4R シグナル伝達の調節にはリガンド結合など他のメカニズムが存在していると考えられ、さらなる検討が必要である。

第 4 章ではネコ MC4R および MRAP2 遺伝子がエネルギー恒常性に関与しているかを評価するために、MC4R および MRAP2 遺伝子における SNP タイピングを行い症例対照研究により、BCS と SNP の関連について解析した。MC4R 遺伝子の 3'非翻訳領域に認められた c.\*452C/T および MRAP2 遺伝子の 3'非翻訳領域に認められた c.\*543T/G において正常群および過体重群のネコで遺伝子型頻度の傾向が異なり、過体重群において c.\*452T>C、c.\*543G>T の頻度が高かった。本研究ではこれらの SNP の機能的意義について評価することはできなかったが、3'非翻訳領域は、mRNA の安定性、局在、翻訳の制御などに関与していることが知られており、c.\*452T>C、c.\*543G>T では mRNA の発現様式が異なるなど何らかの機能的意義を有するかもしれない。今後はこれらの SNP の機能的意義の解明していく必要がある。以上のことから、今後更にサンプル数を増やしていく必要があるものの、MC4R および MRAP2 がネコにおいても体重制御に何らかの役割を有している可能性が示された。また、これらの SNP は遺伝子診断法による肥満体質の早期診断における診断マーカー候補となり得る。

近年、ヒト GWAS により非常に多くの肥満関連遺伝子が同定され、肥満の分子メカニズムの理解が急速に進んでいる。中でも MC4R は非常に強い肥満との関連が知られており、数多くの研究がなされてきた。MRAP2 についても近年 MC4R との相互作用が明らかになり、新たな体重制御因子として注目されて

いる。しかしながら、ネコにおいては肥満の分子メカニズムに関する報告は非常に少ない。一方、獣医領域においても肥満およびそれが要因となって起こるNCDsは大きな健康問題となっており、肥満の予防法・治療法の確立は獣医療における喫緊の課題である。本研究ではネコMC4RおよびMRAP2の一次構造とmRNA発現様式、MC4Rの受容体機能、MC4R-MRAP2間の相互作用、MRAP2の糖鎖の機能、MC4Rのホモ二量体化、MC4RおよびMRAP2のSNPと肥満との関連について明らかにした。MC4Rはエネルギー恒常性における重要性から創薬研究の標的分子として注目されており、今回得られた知見は肥満の治療薬など、新規治療法の開発を行う上で基盤になると思われる。また、MRAP2によるMC4R調節機能の解析は新たな受容体調節メカニズムの解明につながるかもしれない。また、同定された2つのSNPは遺伝子診断法による肥満体質の予測に有用であると考えられる。他の肥満関連遺伝子と合わせ、精度の高い診断が可能になれば、発症前に肥満体質を予測し、幼少期からの食餌・運動管理により、肥満およびNCDsのリスク低減が可能となり、動物の生活の質の向上に大きく寄与するものになることが期待される。

## 参考文献

- An, J. J., Rhee, Y., Se, H. K., Dol, M. K., Han, D. H., Jung, H. H., ... Lim, S. K. (2007). Peripheral effect of  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone on fatty acid oxidation in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(5), 2862–2870. <http://doi.org/10.1074/jbc.M603454200>
- Apweiler, R. (1999). On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1473*(1), 4–8. [http://doi.org/10.1016/S0304-4165\(99\)00165-8](http://doi.org/10.1016/S0304-4165(99)00165-8)
- Armitage, P. (1955). Tests for linear trends in proportions and frequencies. *Biometrics*, *11*(3), 375–386. <http://doi.org/10.2307/3001775>
- Asai, M., Ramachandrappa, S., Joachim, M., Shen, Y., Zhang, R., Nuthalapati, N., ... Majzoub, J. A. (2013). Loss of function of the melanocortin 2 receptor accessory protein 2 is associated with mammalian obesity. *Science*, *341*(6143), 275–278. <http://doi.org/10.1126/science.1233000>
- Azzara, A. V., Sokolnicki, J. P., & Schwartz, G. J. (2002). Central melanocortin receptor agonist reduces spontaneous and scheduled meal size but does not augment duodenal preload-induced feeding inhibition. *Physiology and Behavior*, *77*(2–3), 411–416. [http://doi.org/10.1016/S0031-9384\(02\)00883-1](http://doi.org/10.1016/S0031-9384(02)00883-1)
- Biebermann, H., Krude, H., Elsner, A., Chubanov, V., Gudermann, T., Gruters, A., ... Gruters, A. (2003). Autosomal-dominant mode of inheritance of a melanocortin-4 receptor mutation in a patient with severe early-onset obesity is due to a dominant-negative effect caused by receptor dimerization. *Diabetes*, *52*(12), 2984–2988. <http://doi.org/10.2337/diabetes.52.12.2984>
- Bray, G. A., & Bellanger, T. (2006). Epidemiology, trends, and morbidities of obesity and the metabolic syndrome. *Endocrine*, *29*(1), 109–117.

<http://doi.org/10.1385/ENDO:29:1:109>

- Breathnach, R., Benoist, C., O'Hare, K., Gannon, F., & Chambon, P. (1978). Ovalbumin gene: evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *75*(10), 4853–4857. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/283395>
- Bruschetta, G., Kim, J. D., Diano, S., & Chan, L. F. (2018). Overexpression of melanocortin 2 receptor accessory protein 2 (MRAP2) in adult paraventricular MC4R neurons regulates energy intake and expenditure. *Molecular Metabolism*, *2*, 1–9. <http://doi.org/10.1016/J.MOLMET.2018.09.010>
- Büch, T. R. H., Heling, D., Damm, E., Gudermann, T., & Breit, A. (2009). Pertussis toxin-sensitive signaling of melanocortin-4 receptors in hypothalamic GT1-7 cells defines agouti-related protein as a biased agonist. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(39), 26411–26420. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.039339>
- Chai, B., Li, J. Y., Zhang, W., Wang, H., & Mulholland, M. W. (2009). Melanocortin-4 receptor activation inhibits c-Jun N-terminal kinase activity and promotes insulin signaling. *Peptides*, *30*(6), 1098–1104. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.03.006>
- Chaly, A. L., Srisai, D., Gardner, E. E., & Sebag, J. A. (2016). The Melanocortin Receptor Accessory Protein 2 promotes food intake through inhibition of the prokineticin receptor-1. *eLife*, *5*(FEBRUARY2016), 1–17. <http://doi.org/10.7554/eLife.12397>
- Chan, L. F., Webb, T. R., Chung, T.-T., Meimaridou, E., Cooray, S. N., Guasti, L., ... Clark, A. J. L. (2009). MRAP and MRAP2 are bidirectional regulators of the melanocortin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(15), 6146–6151. <http://doi.org/10.1073/pnas.0809918106>
- Chen, C.-Y. A., & Shyu, A.-B. (1995). AU-rich elements: characterization and

- importance in mRNA degradation. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(11), 465–470. [http://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)89102-1](http://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)89102-1)
- Cone, R. D. (2000). *The melanocortin receptors*. Springer Science & Business Media.
- Czyzyk, T. a, Sikorski, M. a, Yang, L., & McKnight, G. S. (2008). Disruption of the RIIbeta subunit of PKA reverses the obesity syndrome of Agouti lethal yellow mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(1), 276–281. <http://doi.org/10.1073/pnas.0710607105>
- Dell, A., Galadari, A., Sastre, F., & Hitchen, P. (2010). Similarities and differences in the glycosylation mechanisms in prokaryotes and eukaryotes. *International Journal of Microbiology*, 2010, 1–14. <http://doi.org/10.1155/2010/148178>
- Dixon, A. S., Schwinn, M. K., Hall, M. P., Zimmerman, K., Otto, P., Lubben, T. H., ... Wood, K. V. (2016). NanoLuc complementation reporter optimized for accurate measurement of protein interactions in cells. *ACS Chemical Biology*, 11(2), 400–408. <http://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00753>
- Dores, R. M. (2016). Hypothesis and theory: revisiting views on the co-evolution of the melanocortin receptors and the accessory proteins, MRAP1 and MRAP2. *Frontiers in Endocrinology*, 7(June), 1–12. <http://doi.org/10.3389/fendo.2016.00079>
- Fan, W., Boston, B. A., Kesterson, R. A., Hruby, V. J., & Cone, R. D. (1997). Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature*, 385(6612), 165–168. <http://doi.org/10.1038/385165a0>
- Fanelli, F., Seeber, M., Feline, A., Casciari, D., & Raimondi, F. (2013). Quaternary structure predictions and structural communication features of GPCR dimers. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 117, 105–142. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-386931-9.00005-2>

- Farooqi, I. S., Keogh, J. M., Yeo, G. S. H. H., Lank, E. J., Cheetham, T., & O'Rahilly, S. (2003). Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *New England Journal of Medicine*, *348*(12), 1085–1095. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa022050>
- Forcada, Y., Holder, A., Church, D. B., & Catchpole, B. (2014). A Polymorphism in the melanocortin 4 receptor gene (MC4R:c.92C>T) is associated with diabetes mellitus in overweight domestic shorthaired cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *28*(2), 458–464. <http://doi.org/10.1111/jvim.12275>
- Fredriksson, R., Höglund, P. J., Gloriam, D. E. ., Lagerström, M. C., & Schiöth, H. B. (2003). Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives. *FEBS Letters*, *554*(3), 381–388. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01196-7](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01196-7)
- Gantz, I., Miwa, H., Konda, Y., Shimoto, Y., Tashiro, T., Watson, S. J., ... Yamada, T. (1993). Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, *268*(20), 15174–15179. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8392067>
- Goettig, P. (2016). Effects of glycosylation on the enzymatic activity and mechanisms of proteases. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(12), 1–24. <http://doi.org/10.3390/ijms17121969>
- Goodarzi, M. O. (2018). Genetics of obesity: what genetic association studies have taught us about the biology of obesity and its complications. *The Lancet. Diabetes & Endocrinology*, *6*(3), 223–236. [http://doi.org/10.1016/S2213-8587\(17\)30200-0](http://doi.org/10.1016/S2213-8587(17)30200-0)
- Granell, S., Molden, B. M., & Baldini, G. (2013). Exposure of MC4R to agonist in the endoplasmic reticulum stabilizes an active conformation of the receptor that does not desensitize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(49), E4733–E4742. <http://doi.org/10.1073/pnas.1219808110>

- Herrick-Davis, K., Grinde, E., Cowan, A., & Mazurkiewicz, J. E. (2013). Fluorescence correlation spectroscopy analysis of serotonin, adrenergic, muscarinic, and dopamine receptor dimerization: the oligomer number puzzle. *Molecular Pharmacology*, *84*(4), 630–642. <http://doi.org/10.1124/mol.113.087072>
- Hetherington, M. M., & Cecil, J. E. (2010). Gene-environment interactions in obesity. *Forum of Nutrition*, *63*, 195–203. <http://doi.org/10.1159/000264407>
- Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, *444*(7121), 860–867. <http://doi.org/10.1038/nature05485>
- Hughes, D. A., Hinney, A., Brumm, H., Wermter, A. K., Biebermann, H., Hebebrand, J., & Stoneking, M. (2009). Increased constraints on MC4R during primate and human evolution. *Human Genetics*, *124*(6), 633–647. <http://doi.org/10.1007/s00439-008-0591-8>
- Huszar, D., Lynch, C. A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J. H., Fang, Q., Berkemeier, L. R., ... Lee, F. (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*, *88*(1), 131–141. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81865-6](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81865-6)
- Imperiali, B., & O'Connor, S. E. (1999). Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure. *Current Opinion in Chemical Biology*, *3*(6), 643–649. [http://doi.org/10.1016/S1367-5931\(99\)00021-6](http://doi.org/10.1016/S1367-5931(99)00021-6)
- Katsuura-Kamano, S., Uemura, H., Arisawa, K., Yamaguchi, M., Hamajima, N., Wakai, K., ... Tanaka, H. (2014). A polymorphism near MC4R gene (rs17782313) is associated with serum triglyceride levels in the general Japanese population: the J-MICC Study. *Endocrine*, *47*(1), 81–89. <http://doi.org/10.1007/s12020-014-0306-y>
- Kishi, T., Aschkenasi, C. J., Lee, C. E., Mountjoy, K. G., Saper, C. B., & Elmquist, J. K. (2003). Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, *457*(3), 213–235. <http://doi.org/10.1002/cne.10454>

- Kobilka, B. K. (2007). G protein coupled receptor structure and activation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768(4), 794–807.  
<http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.10.021>
- Li, S., Tuan, V. A., Noble, R. D., & Falconer, J. L. (2001). One melanocortin 4 and two melanocortin 5 receptors from zebrafish show remarkable conservation in structure and pharmacology. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 40(26), 6165–6171.  
<http://doi.org/10.1021/ie010525f>
- Liang, J., Li, L., Jin, X., Xu, B., Pi, L., Liu, S., ... Zhang, C. C. (2018). Pharmacological effect of human melanocortin-2 receptor accessory protein 2 variants on hypothalamic melanocortin receptors. *Endocrine*, 61(1), 94–104. <http://doi.org/10.1007/s12020-018-1596-2>
- Loos, R. J. F., Lindgren, C. M., Li, S., Wheeler, E., Zhao, J. H., Prokopenko, I., ... Mohlke, K. L. (2008). Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nature Genetics*, 40(6), 768–775. <http://doi.org/10.1038/ng.140>. Common
- Lund, E. E. M., Armstrong, P. P. J., Kirk, C. a., & Klausner, J. S. J. S. (2005). Prevalence and risk factors for obesity in adult cats from private US veterinary practices. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 3(2), 88–96. Retrieved from <http://www.jarvm.com/articles/Vol4Iss2/Lund.pdf>
- Maben, Z. J., Malik, S., Jiang, L. H., & Hinkle, P. M. (2016). Dual topology of the melanocortin-2 receptor accessory protein is stable. *Frontiers in Endocrinology*, 7(JUL). <http://doi.org/10.3389/fendo.2016.00096>
- MacNeil, D. J., Howard, A. D., Guan, X., Fong, T. M., Nargund, R. P., Bednarek, M. A., ... Van der Ploeg, L. H. T. (2002). The role of melanocortins in body weight regulation: Opportunities for the treatment of obesity. *European Journal of Pharmacology*, 440(2–3), 141–157. [http://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)01425-5](http://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)01425-5)
- Martin, K. C., & Ephrussi, A. (2009). mRNA Localization: Gene Expression



- in the Spatial Dimension. *Cell*, *136*(4), 719–730.  
<http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.044>
- Mayr, C. (2018). What Are 3' UTRs Doing? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, a034728. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a034728>
- Mitra, N., Sinha, S., Ramya, T. N. C., & Surolia, A. (2006). N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. *Trends in Biochemical Sciences*, *31*(3), 156–163.  
<http://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.01.003>
- Monteiro, R., & Azevedo, I. (2010). Chronic Inflammation in Obesity and the Metabolic Syndrome. *Mediators of Inflammation*, *2010*, 1–10.  
<http://doi.org/10.1155/2010/289645>
- Mountjoy, K. G., Mortrud, M. T., Low, M. J., Simerly, R. B., & Cone, R. D. (1994). Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Molecular Endocrinology*, *8*(10), 1298–1308.  
<http://doi.org/10.1210/mend.8.10.7854347>
- Newman, E. A., Chai, B. X., Zhang, W., Li, J. Y., Ammori, J. B., & Mulholland, M. W. (2006). Activation of the melanocortin-4 receptor mobilizes intracellular free calcium in immortalized hypothalamic neurons. *Journal of Surgical Research*, *132*(2), 201–207.  
<http://doi.org/10.1016/j.jss.2006.02.003>
- Novoselova, T. V., Larder, R., Rimmington, D., Lelliott, C., Wynn, E. H., Gorrigan, R. J., ... Chan, L. F. (2016). Loss of MRAP2 is associated with Sim1 deficiency and increased circulating cholesterol. *Journal of Endocrinology*, *230*(1), 13–26. <http://doi.org/10.1530/JOE-16-0057>
- Oosterom, J., Garner, K. M., Den Dekker, W. K., Nijenhuis, W. A. J., Gispen, W. H., Burbach, J. P. H., ... Adan, R. A. H. (2001). Common requirements for melanocortin-4 receptor selectivity of structurally unrelated melanocortin agonist and endogenous antagonist, Agouti protein. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(2), 931–936.

<http://doi.org/10.1074/jbc.M007261200>

- Panaro, B. L., Tough, I. R., Engelstoft, M. S., Matthews, R. T., Digby, G. J., Müller, C. L., ... Cone, R. D. (2014). The melanocortin-4 receptor is expressed in enteroendocrine l cells and regulates the release of peptide YY and glucagon-like peptide 1 in vivo. *Cell Metabolism*, *20*(6), 1018–1029. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.10.004>
- Piechowski, C. L., Rediger, A., Lagemann, C., Mühlhaus, J., Müller, A., Pratzka, J., ... Biebermann, H. (2013). Inhibition of melanocortin-4 receptor dimerization by substitutions in intracellular loop 2. *Journal of Molecular Endocrinology*, *51*(1), 109–118. <http://doi.org/10.1530/JME-13-0061>
- Poggioli, R., Vergoni, A. V., & Bertolini, A. (1986). ACTH-(1-24) and  $\alpha$ -MSH antagonize feeding behavior stimulated by kappa opiate agonists. *Peptides*, *7*(5), 843–848. [http://doi.org/10.1016/0196-9781\(86\)90104-X](http://doi.org/10.1016/0196-9781(86)90104-X)
- Qu, H., Li, J., Chen, W., Li, Y., Jiang, Q., Jiang, H., ... Zhang, Q. (2014). Differential expression of the melanocortin-4 receptor in male and female C57BL/6J mice. *Molecular Biology Reports*, *41*(5), 3245–3256. <http://doi.org/10.1007/s11033-014-3187-5>
- Rand, J. (1999). Current understanding of feline diabetes: part 1, pathogenesis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, *1*(3), 143–153. [http://doi.org/10.1016/S1098-612X\(99\)90203-6](http://doi.org/10.1016/S1098-612X(99)90203-6)
- Russell, D., Oldham, N. J., & Davis, B. G. (2009). Site-selective chemical protein glycosylation protects from autolysis and proteolytic degradation. *Carbohydrate Research*, *344*(12), 1508–1514. <http://doi.org/10.1016/j.carres.2009.06.033>
- Sasieni, P. (1997). From genotypes to genes: doubling the sample size. *Biometrics*, *53*(4), 1253–1261. <http://doi.org/10.2307/2533494>
- Schiöth, H. B., Haitina, T., Ling, M. K., Ringholm, A., Fredriksson, R., Cerdá-Reverter, J. M., & Klovins, J. (2005). Evolutionary conservation of the structural, pharmacological, and genomic characteristics of the

- melanocortin receptor subtypes. *Peptides*, *26*(10), 1886–1900.  
<http://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.11.034>
- Schonnop, L., Kleinau, G., Herrfurth, N., Volckmar, A.-L. L., Cetindag, C., Müller, A., ... Hinney, A. (2016). Decreased melanocortin-4 receptor function conferred by an infrequent variant at the human melanocortin receptor accessory protein 2 gene. *Obesity*, *24*(9), 1976–1982.  
<http://doi.org/10.1002/oby.21576>
- Sebag, J. A., & Hinkle, P. M. (2007). Melanocortin-2 receptor accessory protein MRAP forms antiparallel homodimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(51), 20244–20249. <http://doi.org/10.1073/pnas.0708916105>
- Sebag, J. A., & Hinkle, P. M. (2009a). Opposite Effects of the Melanocortin-2 (MC2) Receptor accessory protein MRAP on MC2 and MC5 receptor dimerization and trafficking. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(34), 22641–22648. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.022400>
- Sebag, J. A., & Hinkle, P. M. (2009b). Regions of melanocortin 2 (MC2) receptor accessory protein necessary for dual topology and MC2 receptor trafficking and signaling. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(1), 610–618. <http://doi.org/10.1074/jbc.M804413200>
- Sebag, J. A., & Hinkle, P. M. (2010). Regulation of G protein-coupled receptor signaling: specific dominant-negative effects of melanocortin 2 receptor accessory protein 2. *Science Signaling*, *3*(116), ra28.  
<http://doi.org/10.1126/scisignal.2000593>
- Sebag, J. A., Zhang, C., Hinkle, P. M., Bradshaw, A. M., & Cone, R. D. (2013). Developmental control of the melanocortin-4 receptor by MRAP2 proteins in zebrafish. *Science*, *341*(6143), 278–281.  
<http://doi.org/10.1126/science.1232995>
- Sladek, R., Rocheleau, G., Rung, J., Dina, C., Shen, L., Serre, D., ... Froguel, P. (2007). A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*, *445*(7130), 881–885.

- <http://doi.org/10.1038/nature05616>
- Stäubert, C., Tarnow, P., Brumm, H., Pitra, C., Gudermann, T., Grüters, A., ... Römler, H. (2007). Evolutionary aspects in evaluating mutations in the melanocortin 4 receptor. *Endocrinology*, *148*(10), 4642–4648.  
<http://doi.org/10.1210/en.2007-0138>
- Sutton, G. M., Duos, B., Patterson, L. M., & Berthoud, H. R. (2005). Melanocortinergic modulation of cholecystokinin-induced suppression of feeding through ERK signaling in rat solitary nucleus. *Endocrinology*, *146*(9), 3739–3747. <http://doi.org/10.1210/en.2005-0562>
- Tao, Y. X. (2010). The melanocortin-4 receptor: Physiology, pharmacology, and pathophysiology. *Endocrine Reviews*, *31*(4), 506–543.  
<http://doi.org/10.1210/er.2009-0037>
- Tarkosova, D., Story, M., Rand, J., & Svoboda, M. (2016). Feline obesity – prevalence, risk factors, pathogenesis, associated conditions and assessment: a review. *Veterinární Medicína*, *61*(6), 295–307.  
<http://doi.org/10.17221/145/2015-VETMED>
- Van de Velde, H., Janssens, G. P. J., de Rooster, H., Polis, I., Peters, I., Ducatelle, R., ... Hesta, M. (2013). The cat as a model for human obesity: insights into depot-specific inflammation associated with feline obesity. *British Journal of Nutrition*, *110*(07), 1326–1335.  
<http://doi.org/10.1017/S0007114513000226>
- Vergoni, A. V., Poggioli, R., & Bertolini, A. (1986). Corticotropin inhibits food intake in rats. *Neuropeptides*, *7*(2), 153–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3010169>
- Xi, B., Chandak, G. R., Shen, Y., Wang, Q., & Zhou, D. (2012). Association between common polymorphism near the MC4R gene and obesity risk: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, *7*(9), e45731.  
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0045731>
- Yamano, Y., Kamon, R., Yoshimizu, T., Toda, Y., Oshida, Y., Chaki, S., ... Morishima, I. (2004). The role of the DRY motif of human MC4R for

receptor activation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68(6), 1369–1371. <http://doi.org/10.1271/bbb.68.1369>

Yang, Y. (2011). Structure, function and regulation of the melanocortin receptors. *European Journal of Pharmacology*, 660(1), 125–130. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.12.020>

アニコム株式会社(2009)「家庭どうぶつ白書」

[https://www.anicom-page.com/hakusho/book/pdf/book\\_091120.pdf](https://www.anicom-page.com/hakusho/book/pdf/book_091120.pdf)

アニコム株式会社(2017)「家庭どうぶつ白書 2017」

[https://www.anicom-page.com/hakusho/book/pdf/book\\_201712.pdf](https://www.anicom-page.com/hakusho/book/pdf/book_201712.pdf)

## 謝辞

本研究を行うに当たり、日本獣医生命科学大学 獣医学部 獣医学科 基礎獣医学部門 獣医生化学研究室教授、新井敏郎先生には終始懇篤なご指導とご高配を戴いた。ここに深謝の意を表す。同研究室准教授、山本一郎先生には実験手法、実験方針に関して終始懇篤なご指導、ご助言を戴いた。ここに深謝の意を表す。同研究室准教授、川角浩先生には学会運営や科学者としての姿勢について熱心なご指導、ご助言を戴いた。ここに深謝の意を表す。本研究の第4章の実験では、ムルシア大学 獣医学部教授 José Joaquín Cerón Madrigal 先生に試料を提供して戴くと共に終始留學生活の支援をして戴いた。ここに深謝の意を表す。日本獣医生命科学大学 獣医学部 獣医学科 基礎獣医学部門 獣医生化学研究室内の各位には研究遂行に当たり日頃より有益なご討論ご助言を戴いた。ここに感謝の意を表す。並びに、日頃より生活を支援して戴いた家族、友人達に感謝の意を表す。

## Summary

The aim of this study was to elucidate molecular mechanisms of feline obesity and establish genetic diagnosis of feline obesity. For this purpose we performed a series of experiments regarding melanocortin 4 receptor (MC4R) and melanocortin 2 receptor accessory protein 2 (MRAP2) which are known as obesity-related gene.

In the first chapter, we performed cDNA cloning of cat MC4R and MRAP2 and characterized their mRNA expression profiles in order to obtain fundamental knowledge. cDNA cloning revealed the sequences of full-length cat MC4R and MRAP2 cDNA. The deduced amino acid sequences of cloned cat MC4R and MRAP2 displayed high overall sequence identity with other mammalian MC4R and MRAP2. Cat MC4R contained the motifs which are conserved among melanocortin receptor and G protein coupled receptor family. Moreover, the transmembrane regions (TM) of cat MC4R and MRAP2 displayed higher sequence identity with TM of other mammalian MC4R and MRAP2. These results suggest that cat MC4R and MRAP2 gene are conserved, and that cat MC4R and MRAP2 may act as receptor and membrane protein, respectively. On the other hand, cat MRAP2 contained 2 putative N-linked glycosylation sites in the N- (N9) and C-terminal domains (N175). While N9 was observed among many mammals, N175 was not observed in human, mouse, and rat MRAP2. This result suggests that cat MRAP2 might have different function compared to human, mouse, and rat MRAP2. Reverse transcription-polymerase chain reaction analysis revealed that cat MC4R and MRAP2 mRNA were expressed highly in the central nervous system. Similar expression profiles were reported in other mammals. Summarizing the above, cat MC4R may act as a neuronal mediator in the central nervous system and MRAP2 may act as a membrane protein modulating receptor function. Further investigations regarding functions of cat MC4R and MRAP2, their interactions, and N-linked

glycosylation of cat MRAP2 are needed to understand their role in energy homeostasis.

In the second chapter, we performed glycosylation analysis of cat MRAP2 and protein–protein interaction analysis as a preparation of functional analysis. Western blotting with MRAP2 expression construct harboring mutations at each putative N-linked glycosylation site ((N9Q, N175Q, and N9Q+ N175Q) revealed that both N9 and N175 residues are glycosylated in CHO-K1 cells. The glycosylation status at N9 is involved in MC2R signaling in humans, suggesting the glycosylation status at N9 and N175 may be involved in MRAP2 function in cats. In addition, MRAP1, an MRAP2 homolog, adopts reverse topology homodimeric structure. Similarly, it is assumed that MRAP2 also adopts reverse topology. Considering that N-linked glycosylation can take place only on the luminal side of rough-surfaced endoplasmic reticulum (RER) membrane, our results of the glycosylation in the N-terminus and C-terminus supports the reverse topology hypothesis. Protein–protein interaction analysis by co-immunoprecipitation and NanoBiT revealed that interaction dynamics between cat MC4R and MRAP2 in living cells for the first time. Cat MC4R and MRAP2 interact in the basal state, and stimulation with  $\alpha$ -MSH increased their interactions slightly. The structural change of MC4R by binding  $\alpha$ -MSH may affect the average level of interactions between MC4R and MRAP2 in whole cells. Summarizing the above, cat MRAP2 may modulate MC4R signaling near MC4R, and the glycosylation status may regulate its function. Further investigations regarding the role of MRAP2 in MC4R signaling are needed.

In the third chapter, we performed MC4R signaling analysis by luciferase reporter assay in order to know the functions of cat MC4R and MRAP2. Moreover, we performed MC4R homodimerization analysis by NanoBiT in order to clarify the mechanisms underlie the MC4R regulation by MRAP2. A luciferase reporter assay revealed that stimulation with  $\alpha$ -MSH increased



MC4R-mediated intracellular cAMP production in a dose-dependent manner in CHO-K1 cells transiently expressing MC4R. The EC<sub>50</sub> values of cat MC4R were similar to that of human MC4R. The presence of MRAP2 increased MC4R-mediated intracellular cAMP production and decreased the EC<sub>50</sub> of MC4R. These alterations in the presence of MRAP2 were similar to results from MRAP2 and MC4R experiments in humans. Thus, our results indicate that MC4R can act as an  $\alpha$ -MSH receptor in cats, and that MRAP2 may modulate the potency and efficacy of  $\alpha$ -MSH toward MC4R in cats. The presence of N175Q, which is mutated MRAP2 construct prepared by replacing asparagine residues (N175) with glutamine, increased MC4R-mediated cAMP production compared to wild type, suggesting that the glycosylation status at N175 is involved in MRAP2 function.

Furthermore, there might be a difference in MRAP2 function based on whether they have N175 or not in several species. NanoBiT revealed that cat MC4R can homodimerize in the basal state, and that MC4R homodimer was not affected by  $\alpha$ -MSH stimulation in the short-term. Inhibition of MC4R homodimerization results in increased MC4R signaling. In addition, MRAP1 can inhibit MC5R homodimerization. Thus, we and Schonnop et al. hypothesized that dimer or oligomer separation of MC4R by MRAP2 interaction is related to MC4R signaling regulation of MRAP2. To verify the hypothesis, we performed competitive experiments with unfused MRAP2 expression constructs. However, the presence of MRAP2 did not inhibit MC4R homodimerization. Thus, MRAP2 may not alter MC4R homodimerization, suggesting that other mechanisms underlie the MC4R regulation by MRAP2. For example, it is known that MRAP1 modulate ligand binding of MCR. More detailed investigations are necessary to gain a further understanding of mechanisms of MC4R regulation by MRAP2.

In the fourth chapter, we performed SNP typing in cat MC4R and MRAP2 gene and case-control study between single nucleotide polymorphism (SNP) and body condition score in order to evaluate the possible relation between

MC4R/MRAP2 genotypes and obesity in cats. The case-control study between SNP and BCS revealed that the genotype of c.\*452C/T in the 3' untranslated region of MC4R and the genotype of c.\*543T/G in the 3' untranslated region of MRAP2 were correlated with BCS. The frequencies for c.\*452T>C and c.\*543G>T of overweight cats were higher than that of normal cats. In this study, we did not evaluate the functional significance of these SNPs. However, 3' untranslated regions are known to regulate mRNA stability, mRNA localization, and translation. c.\*452T>C and c.\*543G>T might have a functional significance regarding mRNA-based process. Further investigations such as expression analysis are needed to clarify their functional significance. Summarizing the above, although sample number is low, we identified 2 SNPs which is correlated with BCS, suggesting that MC4R and MRAP2 may play some role in weight regulation in cats. In addition, 2 SNPs may be a candidate marker for genetic diagnosis of feline obesity.

Genome-wide association studies (GWAS) for body mass index (BMI), waist-to-hip ratio and other adiposity traits have identified more than 300 SNPs in humans. Consequently, the understanding of molecular mechanisms underlying human obesity has developed rapidly. Among these obesity-related genes, MC4R is strongly related to obesity and has been studied especially. MRAP2 also has attracted a lot of attention as new weight regulation factor since it have become clear that MRAP2 interact with MC4R and is involved in weight regulation recently. However, the molecular mechanisms underlying obesity in cats are hardly understood. As with humans, obesity and following non-communicable diseases have become growing problems for domestic cats. Thus, it is an urgent task for veterinary medicine to develop treatment and prevention method for obesity. In this study, we clarified first structure of MC4R and MRAP2, their mRNA expression profile, their interactions, functions of N-linked glycosylation of MRAP2, MC4R homodimerization, and relation between their SNPs and

BCS. Since MC4R has also attracted a lot of attention as drug discovery target, our findings can make a contribution to developing new treatment for obesity. In addition, further understanding of receptor regulation by MRAP2 may lead to find new mechanisms of receptor regulation. Two SNPs we identified in this study may be a candidate marker for genetic diagnosis of feline obesity. If genetic diagnosis of feline obesity is established with other obesity-related gene, we can predict the obesity risk before onset, and can prevent obesity and NCDs by dietary and exercise management. Consequently, it is being expected to contribute to improving the quality of life of cats.