

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 羽原 誠

メラノコルチン 4 受容体 (MC4R) は中枢神経系に発現し、 α メラニン細胞刺激ホルモン(α -MSH)によるエネルギー恒常性維持を媒介する G タンパク質共役型受容体(GPCR)である。メラノコルチン 2 受容体アクセサリタンパク質 2(MRAP2)は MC4R の機能を調節する膜タンパク質である。ヒト、マウスにおいて MC4R および MRAP2 遺伝子の多型、変異、欠失は肥満と関連することが報告されている。申請者は、ネコにおける肥満の分子メカニズム解明および遺伝子診断法開発のため、MC4R および MRAP2 の機能および肥満との関連について明らかにすることを目的として本研究を行った。

第 1 章では対象分子の基礎的知見を得るため、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 GPCR およびメラノコルチン受容体(MCR)に特徴的なモチーフ構造が保存され 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。以上より、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と示唆された。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することが予想された。ネコ MC4R および MRAP2 mRNA は共に中枢神経系において高い発現を示した。この結果は他の哺乳類の発現様式と類似している。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唆された。さらに、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と申請者は結論している。

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参与していることが知られ、ネコにおいても N9、N175 の糖鎖付加状態が MRAP2 の機能に参与している可能性がある。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、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を示唆している。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明らかにした。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 α -MSH の添加は相互作用にわずかな影響を与えた。 α -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 の近傍におい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細に検討する必要がある。

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、 α -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 EC₅₀ 値はヒト MC4R と類似しており、ネコにおいても MC4R が α -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 EC₅₀ を減少させ、ヒト MRAP2 同様、 α -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 を共発現させた結果、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 を持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、 α -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 のシグナル伝達を増強のメカニズムであると仮説が立てられている。この仮説の証明のために、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と申請者は結論している。

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 遺伝子における一塩基多型 (SNP) タイピングを行い症例対照研究により、ボディコンディションスコア (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を有するかもしれない。今後はこれら SNP の機能の解明を進める必要がある。以上のことから、更にサンプル数を増やす必要があるものの、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 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、ヒトゲノムワイド関連解析(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報告されており、数多くの研究がなされている。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。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非感染性疾患(NCDs)は大きな健康問題で、肥満の予防法・治療法確立は獣医療においても喫緊の課題である。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重要である。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。同定された 2 つの SNP は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組み合わせ、精度の高い遺伝子診断が可能になれば、発症前に肥満体質を予測し、食事・運動管理により、肥満や NCDs の発症リスク低減が可能となり、生活の質向上に大きく寄与するものになることが期待されると申請者は総括している。

以上のように、本論文は、ネコにおけるメラノコルチン 4 受容体(MCR4)とその調節タンパク質であるメラノコルチン 2 受容体アクセサリタンパク質(MRAP2)の構造と機能を解析し、ネコ肥満の早期診断を可能にする SNP の存在を明らかにした。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。