

論文審査の結果の要旨

申請者名 宮部 真裕

本研究では、イヌの肥満の遺伝的要因について遺伝子レベルで解析を行っている。肥満とは、エネルギー摂取量が消費量を上回った結果、白色脂肪組織に過剰な脂肪が蓄積された状態である。肥満は、ヒトでは動脈硬化や 2 型糖尿病のリスクを高め、メタボリックシンドロームを形成する病態として問題視されている。一方、イヌにおいても肥満は健康上有害であり、膵炎や高脂血症、関節疾患などのリスクを高め、長期的には寿命の短縮にも結びつくことが実証されている。そのため肥満の治療・予防は臨床的に重要な課題であり、これまで多くの研究報告がなされてきた。しかし、その多くは個体レベルでの栄養学的実験に留まり、分子生物学的手法を導入した研究はほとんど行われていない。

肥満の要因には環境的要因と遺伝的要因の 2 種類があり、ヒトでは脱共役タンパク質(UCPs)やレプチン、 $\beta 2$ および $\beta 3$ アドレナリン受容体(ADRB2, ADRB3)など多くの肥満関連遺伝子が見つかった。一方、イヌでは遺伝的多型と肥満度の関係について調べた研究はこれまで報告されていない。本研究は、今まで注目されてこなかったイヌの肥満関連遺伝子に着目し、候補遺伝子の発見と検証を行ったものである。

まず第 1 章では、近年ヒトで注目されている G タンパク質結合受容体であり、脂肪酸をリガンドとする GPR120 遺伝子について解析している。イヌ GPR120 遺伝子をクローニングしたところ、イヌ GPR120 はヒト、マウス、ラット、ネコ、ウマ、ブタ、シロクマなど他の動物種と塩基配列で 84-95%、アミノ酸配列で 78-96%の相同性が確認された。また、組織発現分布解析の結果、肺、空腸、回腸、大腸、視床下部、海馬、脊髄、骨髄、皮膚、脂肪組織で発現が確認された。遺伝子多型について調査を行ったところ、同義的置換が 5 種類と非同義的置換が 4 種類の合計 9 種類の SNP が確認された。特に c.595C>A (Pro199Thr)は 141 頭中 40 頭で確認され、BCS 別に遺伝子頻度を算出した結果、肥満群で有意に高い($p=0.022$)という結果が得られた。このように、本研究では GPR120 がイ

ヌでも発現していること、他種の物と類似した分子構造を持つことを示した上で多型調査を行い、肥満度と有意な相関を示す一塩基多型 (SNP) を特定するに至っている。この成果はイヌで遺伝子多型と肥満度の相関を初めて示した報告として、国際誌に発表されている。

第2章では、ヒトにおいて研究の歴史が長い肥満関連遺伝子である $\beta 3$ アドレナリン受容体 (ADRB3) 遺伝子に着目し、イヌにおける多型調査を行っている。ADRB3 はアドレナリン受容体サブタイプの一つで、7 回膜貫通型構造を有する。主に脂肪細胞に発現し、ノルアドレナリンやアドレナリンがこの受容体に結合すると、中性脂肪の分解が誘導されグリセロールと脂肪酸を生じる過程で熱産生が起こる。ヒトでは 64 番目のトリプトファンがアルギニンに変異(Trp64Arg)すると 1 日当たりの安静時代謝量がおおよそ 200-220 kcal 減少し、肥満や糖尿病のリスクとなることが知られている。本研究では、イヌ ADRB3 遺伝子について、160 頭の個体で多型調査を行ったところ、同義的置換が 5 種類と非同義的置換が 7 種類の合計 12 種類の SNP が確認された。うち c.749C>T (p.Ser250Phe)は肥満群で、c.1121C>G (p.Pro374Arg)は低体重群でそれぞれ遺伝子頻度が有意に高く、肥満関連遺伝子である可能性が示された。ADRB3 はヒトにおいて最も古くから研究されている肥満関連遺伝子であり、表現型との関連についても多くの報告がある。イヌの ADRB3 についても遺伝子クローニングや作動薬の効果について調べた研究はあったが、遺伝子多型と肥満度の関係を検証した調査は本研究が初めてである。

最後に第3章では、第2章で発見したイヌ ADRB3 の SNP について、細胞発現系を用いた *in vitro* の解析実験を行い、受容体機能との関連について検証した。HEK293T 細胞に各種 SNP を含む ADRB3 を発現させたところ、標的分子の発現が抗 HA-tag 抗体を用いたウェスタンブロット法で確認された。これらの細胞をアドレナリン(Adr)、ノルアドレナリン(NAdr)、CL316,243 などのアゴニストで刺激し、産生される cAMP の濃度を測定した。その結果、野生型と比較して Ser250Phe と Pro395Gln の変異を持つ解析系で cAMP の濃度が低値を示した。本研究は刺激条件の変更や再現性の確認などがまだ必要であるが、第2章と一致する結果が *in vitro* の実験系でも得られたものであり、今後の展開が期待できる

成果である。

総括として、今回イヌ GPR120 および ADRB3 という 2 つの遺伝子を肥満関連候補遺伝子として解析を行ったところ、イヌ GPR120 遺伝子の c.595C>A (Pro199Thr) の遺伝子頻度が正常犬と比較して肥満犬で有意に高かった。また、イヌ ADRB3 の c.749C>T (Ser250Phe) の遺伝子頻度が肥満群で有意に高く、c.1121C>G (Pro374Arg) の遺伝子頻度は低体重群で有意に高かった。さらにイヌ ADRB3 遺伝子変異と cAMP 濃度関連の解析では、Ser250Phe と Pro395Gln 変異において Adr や NAdr、CL316,243 などの作動薬を加えた際の cAMP 産生低下が確認され、これらの多型の肥満との関連性が示唆された。

本研究は、イヌの肥満リスクについて遺伝子多型という新しい角度から解析を進めたものであり、新奇性が非常に高い。また、臨床現場でこれまで漠然と扱われてきた「個体差」についてデータに立脚した評価を可能とし、治療への応用も期待できる成果と言える。今後、遺伝子のスクリーニング検査によってイヌの肥満リスクを数値化し、肥満予防や治療など、個体レベルでの栄養管理に応用可能なものとして成果を高く評価する。

以上のように、本論文は新奇性が特に高く、臨床レベルでの調査と分子生物学的手法による研究を融合させた成果として、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（獣医保健看護学）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。

最終試験の結果の要旨

申請者名 宮部 真裕

成 績：合 格

審査委員一同は、平成 28 年 1 月 25 日、学位論文審査申請者に対し、論文の内容ならびに関連事項について試験を行った結果、本申請者が博士（獣医保健看護学）の学位を受けるに必要な学識を有するものと認め、合格と判定した。

論文目録

報告番号	博看甲 第 号	申請者氏名	宮部 真裕
学位論文 1. 題目 ¹⁾ イヌの肥満関連遺伝子の探索と遺伝子変異が代謝機能に与える影響 2. 印刷公表の方法及び時期 ^{2) 3)}			
公表年月日		出版物の種類及び名称 ⁴⁾	
平成 27 年 5 月 10 日		Genetic variants of the unsaturated fatty acid receptor GPR120 relating to obesity in dogs. (2015) Miyabe M, Gin A, Onozawa E, Daimon M, Yamada H, Oda H, Mori A, Momota Y, Azakami D, Yamamoto I, Mochizuki M, Sako T, Tamura K, Ishioka K. J. Vet Med Sci. 77 (10) 1201-1206.	
公表内容			
要約			
公表（予定）年月日			
平成 年 月 日			
公表内容			
全文・要約			
3. 冊 数		1 編	
参考論文 ⁵⁾		なし	

- 注 1 学位論文の題目が外国語の場合は、日本語訳を併記する。
- 2 論文は公表予定を含め、すべて併記する。
- 3 論文は発表年代順に記載する。
- 4 共著者全員の氏名を記載する。和文の場合は姓だけでもよい。
- 5 参考論文がある場合は、学位論文の公表の記載に準じて表示する。