

令和元年6月4日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08088

研究課題名(和文) スンクスは新しい糖代謝解析モデル動物となるか? - 肉食性糖尿病モデルへの可能性 -

研究課題名(英文) The House Musk Shrew (*Suncus murinus*): A New Animal Model for Studies of Glucose Metabolism

研究代表者

佐々木 典康 (SASAKI, Noriyasu)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：20307979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： スンクスはトガリネズミ目に属する食虫性小動物であり日本で実験動物化がなされた。我々は、このスンクスを新たな糖代謝解析モデル動物として利用するための基礎的研究を行った。まず脂肪細胞から分泌されるホルモンであるレプチンの構造を決定し、他の動物種と比較したところ、スンクスでは他の動物種に見られない3アミノ酸(VPQ)の挿入が認められた。また糖代謝に重要な代謝酵素であるリンゴ酸脱水素酵素(MDH)の構造を決定し、他の動物種と比較したところ、アミノ酸配列は高度に保存されており、エピジエネティックな制御であるアセチル化修飾を受けると予想されるリジン残基も保存されていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実験動物として広く利用されているマウスやラットはげっ歯類であり、雑食性とは言っても草食性の強い動物種である。現代社会では高タンパク質食、高脂肪食による糖代謝異常・肥満への影響が心配されているが、この食事環境の代謝への影響を解析するためにはげっ歯類よりもさらに肉食性の強い実験動物が適していると考えられる。

スンクスは肉食性の強い実験小動物であることから、高タンパク質食が代謝に与える影響を解析するために好適であると考えられる。また、獣医学領域で重要な犬や猫も肉食性の強い動物であることから、本研究の知見は生物学、医学、獣医学と幅広い分野での応用が期待できると確信している。

研究成果の概要(英文)： The house musk shrew (*Suncus murinus*) is a small insectivorous animal belonging to the family Soricidae and was established as laboratory animals in Japan. We here conducted basic researches to use the suncus as a new animal model for glucose metabolism analysis. First, the structure of leptin, which is a hormone secreted from adipocytes, was identified. Compared with those of other animal species, the insertion of three amino acids (VPQ) was observed only in suncus leptin. Also, we determined the structure of malate dehydrogenase (MDH), which is a metabolic enzyme important for glucose metabolism. The amino acid sequence is highly conserved among many other animal species, and lysine residues predicted to be modified by acetylation, were also conserved.

研究分野：獣医生化学

キーワード：スンクス 糖代謝 糖尿病 レプチン 肉食性動物 脂肪萎縮症 アセチル化 MDH

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

スunks (*Suncus murinus*) は一般的に実験動物として広く利用されているマウス、ラットなどのげっ歯目とは異なり、トガリネズミ目に分類される小動物である。野性では主に食虫性であるが、飼育環境下では高タンパク質食での飼育を行うため、肉食傾向が強い動物である。また、嘔吐ができる、胃の構造がヒトに似ている、盲腸の発達が悪いなど、肉食動物の特性を多く持っている。そのため現代社会でみられる高タンパク質・高脂肪食の栄養解析には、従来から使われているげっ歯類よりもスunksの方が適している可能性が高い。完全肉食動物であるネコ、ミンク、フェレットやイルカの代謝解析により、これら肉食動物の正常糖代謝状態はヒトの糖尿病時の糖代謝状態に類似しているとの報告もある。しかし、これらの動物は飼育環境や費用、動物愛護の面から実験用途での利用が難しく、より小型で飼育繁殖が行いやすい肉食動物モデルの開発が望まれる。特に肉食(高タンパク質食)動物モデルは現代の食生活が糖尿病病態に及ぼす影響を調べるために重要な役割を果たすと考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではスunksを高タンパク質食による糖尿病代謝解析モデルとして利用すること目標に、その糖代謝調節機構の一端を明らかにすることを目的としている。とりわけスunksの糖代謝に関わる生理活性因子や酵素活性制御を中心に解析することで、スunksを新たな糖代謝解析モデル動物としての可能性を探る。

そこで本研究においては、(1)脂肪細胞に発現し、摂食調節やエネルギー代謝に関与するレプチンの一次配列を決定し、他の動物種との比較を行うことでスunksに特徴的な構造の有無を確認した。また、(2)糖代謝に重要な TCA 回路の酵素であるリンゴ酸脱水素酵素 (MDH) に着目し、MDH 活性がエピジェネティックな制御の可能性に関して、アセチル化の標的アミノ酸であるリジン残基の有無を他の動物種と比較し検討した。

3. 研究の方法

(1)現在、日本では複数系統のスunksが実験で使用されているが、本研究室では代謝解析に利用することを考慮して、やや大型のスunksである BK 系および遺伝性早期糖尿病発症モデルである EDS 系を繁殖・維持し、実験に供した。

(2)スunksは脂肪組織、特に内臓脂肪が蓄積しにくいことが知られており、さらに絶食で容易に脂肪肝を発症することが知られている。この病態は、ヒトでインスリン抵抗性や脂肪肝を主要症状とする先天性脂肪萎縮症 (Congenital generalized lipodystrophy; CGL) の病態に類似している可能性がある。そこでまず脂肪細胞から分泌されるアディポカインであるレプチンの遺伝子クローニングを RACE 法で行い、その一次構造を決定することにした。他の動物種と構造の比較を行い、スunksに特徴的な構造の有無を検索した。

(3)ネコやスunksのような肉食動物は血糖の維持をアミノ酸からの糖新生に大きく依存しているため、糖新生と TCA 回路の分岐点となる律速酵素であるリンゴ酸脱水素酵素 (MDH) が肉食動物における糖新生にどのような働きを担っているかについて興味を持たれる。他の研究者らのアセチル化解析の結果から、MDH は細胞内でアセチル化による活性調節を受けることが報告されている。本研究ではスunksの肝臓でのエピジェネティックな制御が MDH を介する糖代謝にどのような影響を及ぼすか組換え MDH を作出することで検討した。

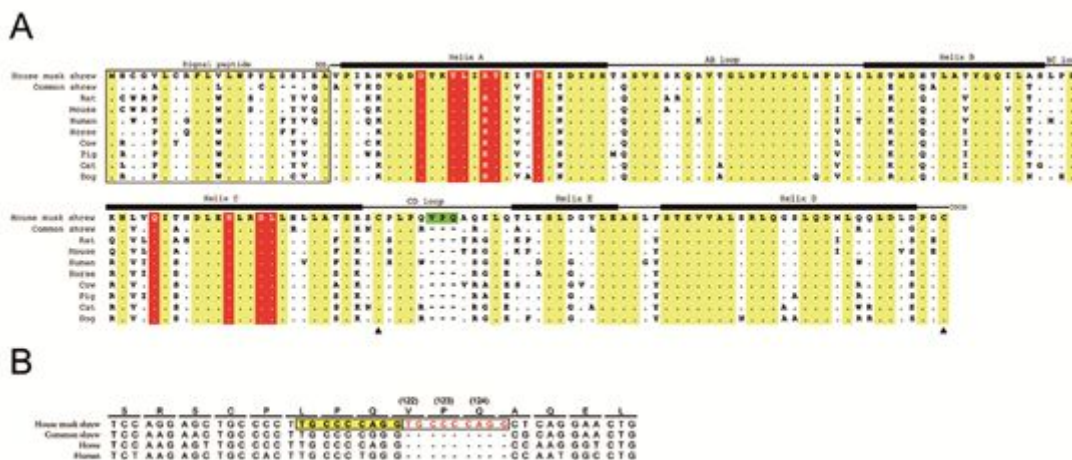
まずスunksの肝臓 mRNA を用いて RACE 法により完全長遺伝子をクローニングし、一次配列を決定した。このスunksおよび比較対照としてのネコの組換え MDH1 を疑似的にアセチル化し、活性調節機構を検討した。リジンアセチル化はリジン残基をグルタミンに置換することで、また非アセチル化はアルギニンに置換することで模倣した。

4. 研究成果

(1)本研究で使用した BK 系スunksは、バングラディッシュ由来の BAN 系とネパール・カトマンズ由来の KAT 系を交配することで作出された系統である。一方の EDS 系は BAN 系から自然発生した遺伝的糖尿病系統である。今後の解析では遺伝的バックグラウンドの違いが解析の妨げとなる可能性があることから、EDS 系と BK 系の交配を行い、BK 系のバックグラウンドを持つ遺伝的糖尿病系統を作出している。現在、まだ 3 世代目であるが両系統の交配によっても糖尿病の形質は失われずに維持されている。

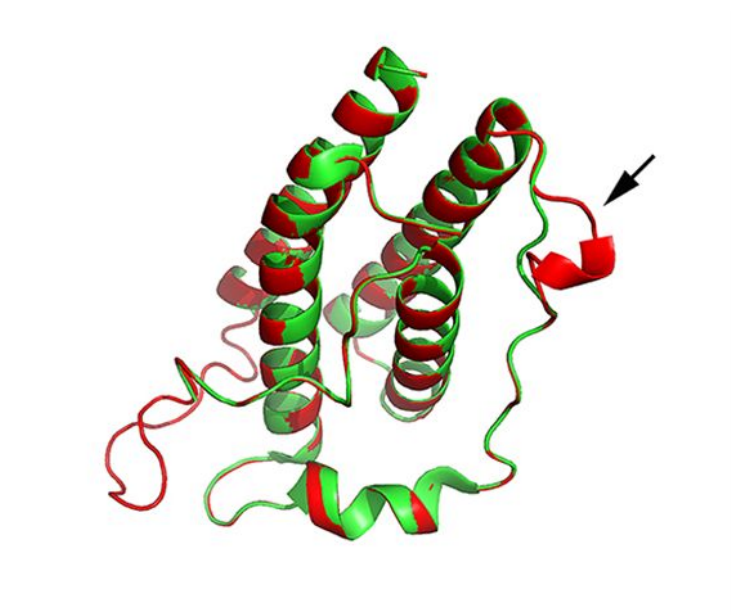
(2)遺伝子クローニングの結果より、スunks成熟レプチンは、149 アミノ酸残基から構成されていることが明らかとなり、他の哺乳動物種のレプチンとは 75~82% の相同性を示した。特筆すべきは他の哺乳動物のレプチンには見られない 3 つのアミノ酸残基 VPQ の挿入が CD ループに見出されたことである (図 1-A)。この VPQ 挿入は、遺伝子上における slippage のようなマイクロインデルによる 9 塩基の塩基対挿入に起因すると推測された (図 1-B)。予測されたスunksレプチンの立体構造は典型的な 4 つのヘリックス構造を示したが、VPQ 領域はヒトレプチンに比べて少し突出していることが明らかになった (図 2)。他の動物種と同様にレプチン mRNA の発現は、白色および褐色脂肪組織に限られていた。

このようにスunksレプチンには他の哺乳動物には見られない VPQ の挿入が確認されたことから、スunksレプチンはその生理学的な作用が注目される。スunksはヒトの脂肪萎縮症のモデル動物、特に合併症のないモデル動物としても有用であるかもしれない (Saga, JAVAR,



(図 1 : (A)スンスレプチンと他の動物種のレプチンとの比較、(B) VPQ 挿入部分に相当する塩基配列の比較)

VPQ (緑背景) がスンスレプチンでのみ認められる挿入アミノ酸配列を示す。



(図 2 : スンスレプチンの立体構造 (赤) とヒトレプチン (緑) との重ね合わせモデル)
矢印部分が VPQ 領域を示している。

(3)すでに我々はネコ MDH をクローニングし、アセチル化に重要なリジン残基が保存されていることを報告しているが(Sasaki, JVMS, 2013)、今回、スンスの MDH 1 においてもアミノ酸一次配列は高度に保存されており、アセチル化の標的リジン残基が保存されていることを確認した。

ネコ MDH1 のアセチル化モデルとしてはアセチル化標的部位と推定される 118 番目、121 番目、298 番目のリジン残基をグルタミンに置換した MDH 1 (それぞれ K118Q、K121Q、K298Q) を、非アセチル化モデルとしてはアルギニンに置換した MDH 1 (それぞれ K118R、K121R、K298R) を大腸菌発現系で作製し、その酵素活性を測定した。ネコ野生型 MDH1 と比較すると、非アセチル化モデルであるアルギニン置換 MDH は、すべての置換部位において野生型と同様に低い比活性を示した。一方、アセチル化モデルであるグルタミン置換では、K118Q および K298Q でアセチル化により活性が抑制されたが、K121Q ではアセチル化により著しく活性化された (未発表データ) 。なおスンス MDH1 のリジンアセチル化については現在も実験を継続中である。

今後は、本研究で繁殖を行った糖尿病発症 BK 系スンスを中心に、VPQ 挿入レプチンの機能解析および肝臓における MDH 1 および MDH2 のアセチル化による糖代謝制御を詳細に検討していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Saga, Sayaka, Sasaki, Noriyasu, Arai, Toshiro, Molecular identification, characterization and structure analysis of house musk shrew (*Suncus murinus*) leptin. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research* 6(1), 1-8, 2019 (査読有)
DOI: <https://doi.org/10.5455/javar.2019.f305>

〔学会発表〕(計 2 件)

佐々木典康、比較代謝解析モデル動物としてのスunks、第12回スunks研究会(東京) 2018 (招待講演)

佐賀さやか、新井敏郎、佐々木典康、スunks (*Suncus murinus*) におけるレプチンの同定と解析、第160回日本獣医学会学術集会(鹿児島) 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

2018年度日本学術振興会ひらめき ときめきサイエンス 「遺伝子検査をやってみよう！～この肉は牛？豚？それとも鶏？～」 2018年8月23日(日本獣医生命科学大学)
イベント内のランチョンセミナーで高校生向けに研究内容を紹介

2017年度日本学術振興会ひらめき ときめきサイエンス 「遺伝子検査をやってみよう！～この肉は牛？豚？それとも鶏？～」 2017年8月17日(日本獣医生命科学大学)
イベント内のランチョンセミナーで高校生向けに研究内容を紹介

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：金田 剛治

ローマ字氏名：(KANEDA, Takeharu)

所属研究機関名：日本獣医生命科学大学

部局名：獣医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：10350175

(2)研究協力者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。