

学 位 論 文 題 名

ネコ目動物のレプチン：

特異的測定法の開発と栄養評価への応用

学位論文内容の要旨

脂肪組織はエネルギーの主要な貯蔵部位であると同時に、様々な生理活性ポリペプチドを合成分泌しており、その代表例がレプチンである。

レプチンは 16kDa のポリペプチドで、*ob/ob* マウスの肥満原因遺伝子産物として同定された。その血中濃度は、短期的には絶食により低下し摂食後数時間で上昇するという日内変動を示し、長期的には脂肪組織量と良く相関し肥満すると血中濃度が高くなることが、ヒトやマウスで知られている。従って、レプチンの合成分泌動態は体脂肪量の変化をそのまま反映していることとなる。

獣医学領域においても、家畜の飼養栄養との関連で、ウシやブタのレプチンの構造やその発現、血中濃度の測定などがなされており、基本的にはヒトや齧歯類と同様の成績が報告されている。これら各種の動物のレプチン測定に汎用されているのが市販の multi-species RIA kit である。しかし、本キットではヒトレプチンに対する抗体を用いているため、全ての動物種のレプチンに対して満足すべき交差反応性を有するとは言えず、しかも標準品もヒトレプチンなので、これに対する相対値でしかレプチン濃度を求めることができないという問題を抱えている。これらを解決するには、対象とする各動物種に特異的な測定系を用いる必要である。本研究では、ネコ目の動物を対象として、伴侶動物であるネコのレプチンの構造、組み替え蛋白質の性質、免疫学的測定法の開発を行い、先行しているイヌでの知見と比較するとともに、更に野生動物への応用の可能性を検討した。

まず、ネコの白色脂肪組織から抽出した RNA から、501bp の open reading frame、21 アミノ酸の N 末シグナルペプチド、146 アミノ酸の mature peptide からなるネコレプチン cDNA をクローニングした。分泌型ネコレプチンの 146 アミノ酸配列は他の動物のレプチンと 81.5%から 91.8%の相同性を持っていた。RT-PCR 法でネコレプチン mRNA の発現を調べたところ、脂肪組織では確認さ

れたが、心臓、肺、肝臓、腎臓、骨格筋、膵臓、脳では確認されなかった。このように、ネコレプチンは他の動物のレプチンと高い相同性を持っており、主に脂肪組織に発現していることが明らかとなった。

次に、ネコレプチンおよびイヌレプチンの cDNA を大腸菌に組み込み、組み換えレプチンを作製した。その組み換えレプチンは他種のレプチン同様、16kDa でラットのレプチン受容体(OB-Rb)を発現した細胞の STAT3 や MAPK(Erk)のリン酸化を誘導した。組み換えネコレプチンをウサギに免疫して作製した抗ネコレプチン抗体はウエスタンブロット法での分析ではネコとヒトのレプチンに良く反応し、齧歯類のレプチンへの反応性は弱かった。また、組み換えイヌレプチンを免疫して作製した抗イヌレプチン抗体はウエスタンブロット法や非変性条件下での抗原固相化 EIA 法での分析でイヌレプチンに良く反応したが、ヒトと齧歯類のレプチンへの反応性は著しく弱かった。これらのことより、ネコ目、特にイヌのレプチンは他の動物種とアミノ酸配列では相同性が高いものの、免疫抗原性が大きく異なることが示された。

その組み換えイヌレプチン及び組み換えネコレプチンとそれぞれに対する特異抗体を用いて ELISA 法を開発し、有用性を検討した。この方法を用いることにより、ヒトレプチンに対する相対値ではなく、絶対値でレプチン濃度を測定することが出来るようになった。また、これらによって従来用いられてきた multi-species RIA kit に比べ、特に低濃度領域において遙かに正確に血中レプチン濃度を測定することができた。本 ELISA によりイヌやネコの血中レプチン濃度を求めることにより、体型が大きく異なるこれら伴侶動物の体脂肪評価、肥満の定量的評価に応用できることが示された。

最後に、この特異的 ELISA の系が野生動物へも応用可能か、ネコ目の一種であるアライグマとクマを対象に、multi-species RIA kit と抗イヌレプチン抗体を用いた特異的 ELISA での結果を比較検討した。その結果秋から冬にかけて高く、春以降低くなるという血中レプチンの季節変動が観察された。さらに、血中レプチン濃度と BMI の間に正の相関があった。BMI は多くの動物で大まかな肥満のマーカーとなることから、秋にレプチン濃度が高くなることは、越冬に向けて脂肪を蓄えることを反映していると推察された。このようにイヌレプチン ELISA は、ネコ目の種の中で少なくともイヌ科、アライグマ科、クマ科の動物のレプチン測定に有用であり、これらの動物の栄養状態を知る上での良い指標となることが判明した。

以上のように、イヌとネコのレプチン及びその特異抗体を用いて作成した ELISA 法の開発により、従来不可能であったこれらの動物の血中レプチン濃度

を正確に測定することが出来るようになった。また、その測定法は、ネコ目の種の中で少なくともイヌ科、アライグマ科、クマ科の動物のレプチン測定に有用であり、これらの動物の栄養状態を知る上での良い指標となることが判明した。今後、multi-species RIA kit を使用して野生動物のレプチン濃度を測定していた従来の報告、とりわけネコ目の成績については、再検討が必要となろう。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 齊 藤 昌 之

副 査 助 教 授 鈴 木 正 嗣

副 査 助 教 授 木 村 和 弘

副 査 教 授 橋 本 晃 (光塩学園女子短期大学)

学 位 論 文 題 名

ネコ目動物のレプチン：

特異的測定法の開発と栄養評価への応用

脂肪組織はエネルギーの貯蔵部位であると同時に、様々な生理活性ポリペプチドを合成分泌しており、その代表例がレプチンである。実験動物やヒトのレプチンについては膨大な知見があるが、獣医学領域では対象動物の多様性と特異性のため満足すべき測定系が確立されていないなど、未解決の問題が山積している。本研究では、伴侶動物であるネコのレプチンについて基礎および臨床獣医学的検討を行い、イヌでの知見と比較するとともに、更に野生動物への展開を試みた。

まず、ネコのレプチン cDNA をクローニングし、他の動物種と高い相同性や脂肪組織での mRNA 発現などを確認した。次に、ネコ組み替えレプチンを大腸菌で作成し、これがレプチン受容体を介して細胞応答を惹起することを見出した。更にこれに対するウサギ抗体を作成し反応性を調べたところ、ネコとヒトレプチンには良く反応するが齧歯類レプチンには反応性が弱いことが明らかになった。イヌ組み替えレプチンに対する抗体についても同様に検討したところ、齧歯類、ヒトいずれのレプチンに対しても反応性が著しく弱いことが判明した。これらの結果から、ネコ目、特にイヌのレプチンは他の動物種と構造上の相同性が高いものの免疫原性が大きく異なることが明らかとなった。そこで、これらの組み替えレプチンとそれぞれに対する抗体を利用して、ネコおよびイヌに特異的な ELISA 法を開発した。この方法を用いることにより、対象動物のレプチン絶対値の測定が可能となり、更に従来用いられてきた非特異的 RIA 法に較べて、特に低濃度領域において正確に血中レプチン濃度を測定することが可能となった。実際、本 ELISA 法により求めたイヌやネコの血中レプチン濃度は体脂肪量と良く相関しており、体型が大きく異なるこれら伴侶動物の体脂肪・肥満の評価に応用できることが示された。最後に、野生動物であるアライグマとクマの血中レプチン濃度を本 ELISA 法で測定したところ、体脂肪が増える秋冬に高値となり春には低値となる明瞭な季節変動の存在が明らかとなった。

以上のように、イヌとネコのレプチンに特異的な ELISA 法の開発により、従来不可能であったこれら伴侶動物および他のネコ目の野生動物の血中レプチン濃度を正確に測定

することが可能となり、これら動物の体脂肪量や栄養状態の指標としての有用性が示された。よって審査員一同は上記学位論文提出者柴田治樹氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。