

氏名	Md. Sarowar Hossain		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 8246 号		
学位授与年月	平成 29年 3月 24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Novel dominant screening scheme identified mutations of the <i>Sim1</i> and <i>Mc4r</i> genes in obese pedigrees (新規の優性遺伝スクリーニング法による、肥満マウス家系における <i>Sim1</i> 及び <i>Mc4r</i> 遺伝子変異の同定)		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	島野 仁
副査	筑波大学教授	博士（医学）	柳沢 裕美
副査	筑波大学教授	博士（獣医学）	杉山 文博
副査	筑波大学講師	博士（医学）	横山 泰久

論文の内容の要旨

Md. Sarowar Hossain 氏の博士学位論文は、肥満マウスの優性スクリーニングによる遺伝子変異の同定を検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

(目的)

著者らの研究室では、睡眠覚醒制御に関わる新規遺伝子を同定するために5000匹以上のランダム点突然変異マウスのスクリーニングを実施してきている。その過程で、変異マウスの中に顕著な肥満を呈するものが複数得られた。これらの変異マウスは、化学変異原であるエチルニトロソウレアを投与した雄と野生型雌との交配で得られたマウスであるため、遺伝子変異が肥満を惹き起こしたとすれば、その遺伝子変異は肥満を惹き起こす優性変異と考えられる。しかしながら、これまでランダム点突然変異マウスのスクリーニングによって、肥満を惹起する劣性変異はいくつか報告があるものの、優性変異については報告がない。そこで著者は、優性スクリーニングスキームの有効性検討と優性に肥満を惹起する遺伝子変異の同定を目的とした肥満の優性スクリーニングを実施した。

(対象と方法)

8-10週齢の雄 B6J マウスにエチルニトロソウレア投与で変異誘発し、野生型雌マウス卵と体外受精を行った。次世代マウスの3割以上が肥満を示した場合に、遺伝性があるとし肥満家系の N2 世代マウス (B6J を B6N に2回戻し交配) を用いて、連鎖解析を行っている。連鎖解析には最近公表された B6J と B6N 間の一塩基多型データを用いた。10番染色体上の連鎖領域変異ストレインと C57BL/6 (B6) サブストレインである B6J と B6N をカウンターストレインとして用い、次世代シーケンス技術の進展による全エクソームシーケンスを用いて連鎖領域上での変異から原因遺伝子の特定を試みている。

(結果)

ランダム点突然変異を持つマウスの中から、週齢変えて最も肥満したマウスを合計13匹選んだ。体外受精によって次世代を作成し13家系のうち2家系で約半数の個体が肥満を示した。遺伝性の肥満を示す2家系の連鎖解析を行い、10番染色体と18番染色体に連鎖が認められた。全エクソームシーケンスにより、10番染色体上の連鎖領域に *Sim1* 遺伝子の変異が、18番染色体上の連鎖領域に *Mc4r* 遺伝子の変異が認められた。遺伝子変異は **SIM1** 蛋白質 PAS ドメイン内のアミノ酸置換をもたらし、変異型 **SIM1** 蛋白質はルシフェラーゼアッセイにおいて転写活性を全く示さなかった。一方、*Mc4r* 遺伝子の変異は、第一膜貫通ドメイン直前に終止コドンを含んでいる。視床下部において、摂食行動やエネルギー代謝に関する神経ペプチドの発現を検討したが、肥満モデルごとに全く異なる傾向であったという結果が得られている。

(考察)

著者は B6 サブストレインを使用することで、はじめて肥満の優性スクリーニングに成功している。家系の樹立から遺伝子変異の同定まで、実質的に2年程度であった。見出した遺伝子変異は *Sim1* と *Mc4r* であり、どちらも機能欠失型の変異である。過去の報告から *Sim1* と *Mc4r* とも haploinsufficiency によって肥満を呈することが知られており、今回見出した遺伝子変異が肥満の原因になると考えられた。

(結論)

見出された肥満原因遺伝子はいずれもエネルギー代謝において重要な役割を持つことが知られている遺伝子であった。しかし著者はこの研究の手法の将来性として B6 サブストレイン、体外受精、全エクソームシーケンスを組み合わせたフォワード・ジェネティクス研究は感度が良く、家系の維持が安定しており肥満以外の表現型への応用が可能であると結論している。

審査の結果の要旨

(批評)

B6 サブストレイン間交配、体外受精、全エクソームシーケンスと最新の手法を組み合わせたこのフォワード・ジェネティクス研究は、従来のポジショナルクローニングより効率ははるかに良く様々な定量表現系の原因遺伝子の同定に役立つ。事実、研究室の睡眠覚醒制御に関わる新規遺伝子を同定に繋がっている。本研究も肥満の新規遺伝子発見にはつながらなかったものの、エネルギー代謝に関する多くの遺伝子がすでに知られていることから、本スクリーニングを踏まえ新たなエネルギー代謝制御遺伝子を見つけることはかなり困難であるかもしれないと申請者も考えている。見つかった遺伝子が、視床下部周辺の食欲関連タンパクであることも興味深くまた本スクリーニングの特性なのかもしれない。*Sim1* ヘテロ変異、*Mc4r* ヘテロ変異、高脂肪食誘導性肥満という機序の異なる肥満モデルマウスから特定した *Sim1* と *Mc4r* とも視床下部に作用する分子であり、haploinsufficiency によって肥満を起こすことは興味深く既知の肥満モデルでの変動の結果も得られており、機序の解析は肥満の理解に貢献しよう。

審査の中で問題議論となったのは、肥満原因因子として特定した変異型 **SIM1** 蛋白質が遺伝子発現したルシフェラーゼアッセイ上転写活性を失っているが、正常 **SIM1** と同量の共発現で正常 **SIM1** の転写活性に影響を与えず、優性スクリーニングの結果であることや、既報の **SIM1** の報告と合わせて、dominant negative 効果が予想されていた点から導入量比を変えたさらなる検証実験や別の機序に関する検討が今後の課題である。 *Sim1* の近傍に同定された *Sec63* の関与の可能性も議論された。本研究は膨大な仕事量からの成果であり、本人はその中で代謝表現系の解析、ルシフェラーゼアッセイ、qPCR に貢献したと宣言している。

平成28年12月22日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。