

令和元年5月27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：16K08063

研究課題名(和文)ネコ遊離脂肪酸受容体の機能およびSNP解析

研究課題名(英文)Molecular Characterization of Free Fatty Acid Receptors in Cat

研究代表者

山本 一郎 (Yamamoto, Ichiro)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：00424763

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)：短鎖脂肪酸が結合するGPR41およびGPR43、中長鎖脂肪酸が結合するGPR40およびGPR120がヒトで明らかにされ、ネコも同遺伝子をそれぞれ有することが明らかとなった。この受容体のタンパク質共役解析により、それぞれがホモ2量体を形成する他、他の遊離脂肪酸受容体ともヘテロ2量体を形成していた。抗体を作成しウエスタンイムノブロット法に用いたが合成タンパク質は検出できたが、組織切片を用いた免疫組織化学染色法では特異な受容体発現を検出できなかった。また肥満ネコゲノム中の一遺伝子多型検出を行ったが、遺伝子診断に有用な多型を検出することができなかったため、多検体のSNP検出が必要であると考えらる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、家庭動物の生活習慣の変化に伴い肥満ネコが増えている。肥満はネコの2型糖尿病発症の最大要因であるが、他動物に比べネコは特異な脂質の代謝機構を有しており、同機構の解明が必須である。我々は4種の遊離脂肪酸の受容体に着目し、その受容体機能の解析と一塩基多型(SNP)を用いた遺伝子診断システムの開発を目的とした。ヒトとは異なり、ネコが肥満しやすい体質か否かを診断する検査技術は極めて少なく、本申請課題の遺伝子診断技術が将来の肥満を極めて早期に予測する有用な技術になると期待される。

研究成果の概要(英文)：We conducted experiments to give molecular characterization of free fatty acid receptors in cat. Short-chain fatty acid act as ligand in GPR41 and GPR43, medium- and long-chain fatty acid act as ligand in GPR40 and GPR120 respectively. The receptors are conserved in cat genome and expressed in several tissues. To study for dimerization status in GPRs, we used split luciferase assay system "NanoBiT". Interestingly, cat GPRs have strong interaction with each other. It may suggest that each free fatty acid receptors have cooperative relationship with in free fatty acid receptors in vivo. Next, we tried to detect protein expression in cat tissues section but it could not reveal specific receptor expression. We need to reconsider antigenic analysis for detection of cat free fatty acid receptors in tissue section. Also, we conducted experiment to detect SNPs in obese cat but we failed to find the SNPs in cats. Further investigation will need to use SNPs in diagnostic analysis for cat.

研究分野：分子内分泌学

キーワード：ネコ 遊離脂肪酸 受容体

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

1. 研究開始当初の背景

現在、日本の家庭でほぼ同数のイヌとネコがペットとして飼育されているが、地域の動物病院に来院するネコはイヌの3割以下であり、獣医師による診断・健康指導を適宜受けているとは言いがたい。ネコはヒト同様、2型糖尿病が多い動物であり、その最大リスク要因は肥満である。肥満は生活習慣などの環境要因に加えて複数の遺伝的な要因が合わさって発症するが、一般的に遺伝的な要因が「太る体質」を、環境的な要因が「太る原因」を決定する。ヒトでは個々のゲノム DNA 中のわずかな差、すなわち一塩基多型 (SNP) が遺伝的な主要因と考えられている。申請者はネコの肥満予防には脂質代謝機構の解明が必須と考え、予防医療研究のアイデア着想し研究を開始した。

2. 研究の目的

近年、ヒト遊離脂肪酸受容体は4種 (GPR41、43、40、120) 存在し、各受容体が結合する遊離脂肪酸に特異な結合様式が存在することが明らかとなった。ネコ GPR40 と GPR120 の遺伝子クローニングの結果、他哺乳動物と高い相同性を有する一方、異なる C 末端を有する特異なネコ GPR40 の形状が明らかになった。データベースを用いた *in silico* 解析によればアムールタイガーモネコと同じ C 末端形状であり、ネコ科特有の形状であることが推察される。GPR40 の C 末端は細胞内情報伝達に重要な部位であるが、ネコの C 末端形状の機能は不明であり、以下の研究を計画した。

ネコ遊離脂肪酸受容体を強発現する安定発現培養細胞を樹立し、各遊離脂肪酸投与により受容体機能を評価するシステムの構築を行う。

ヒト肥満研究の結果、遊離脂肪酸受容体遺伝子に多数の SNP が報告されている。申請者の保有する 100 検体を超える肥満ネコおよび健常ネコゲノム DNA を用い、肥満に関連する SNP を検索 (マッピング) し、診断に応用可能な肥満 SNP を選別、検出 (タイピング) するシステムの構築を行う。

3. 研究の方法

【安定発現培養細胞を用いた細胞内情報伝達解析】4種の遊離脂肪酸受容体を発現する細胞の培養液中に各種脂肪酸を添加し、細胞内カルシウムおよび cAMP 濃度を測定・解析する。

【細胞内タンパク質間相互作用解析】ネコ GPR41、43、40 mRNA は十二指腸で高く発現しているが、十二指腸のどの部位 (細胞) でタンパク質として発現しているかは不明である。このために作製した各受容体の特異的抗体と組織切片を用いた免疫染色法により十二指腸内の発現細胞を同定する。GPR はリガンドの結合によりホモあるいはヘテロ二量体を形成し、細胞内への情報伝達を調節している。特にヘテロ二量体を形成する GPR により細胞内に情報が伝達されないこともあるため、タンパク質-タンパク質共役実験を行い、解析する。

【遺伝子中の SNP 解析】SURVEYOR 法により 100 検体のネコの遊離脂肪酸受容体遺伝子の SNP 解析を行い、肥満ネコと健常ネコ群間で比較探索する。肥満体質の予測診断に SNP の遺伝子診断を目指す。

4. 研究成果

ネコの遊離脂肪酸受容体の機能解析を行った。遊離脂肪酸受容体は G タンパク質を共役する 7 回膜貫通型の受容体であり、これまでに短鎖脂肪酸が結合する GPR41 および GPR43、中および長鎖脂肪酸が結合する GPR40 および GPR120 がヒトで明らかにされており、ネコも同遺伝子をそれぞれ有することが明らかとなった。細胞内情報伝達解析の結果、GPR40 および GPR120 はリガンド結合により細胞内カルシウム濃度の上昇が見られた。一方、GPR41 および GPR43 はリガンド結合により細胞内 cAMP 抑制作用を発揮することが明らかとなった。

細胞内タンパク質間相互作用解析のため NanoBiT 法を用い、それぞれの受容体末端に分割型ルシフェラーゼを融合し細胞で発現させた結果、それぞれがホモ 2 量体を形成する他、他の遊離脂肪酸受容体ともヘテロ 2 量体を形成することが明らかとなった。この他、各遊離脂肪酸受容体に対する抗体を作成しウエスタンブロット法に用いたところ、無細胞タンパク質発現では検出に成功したが、ネコ組織切片を用いた免疫組織化学染色法では特異的な受容体の発現を検出できなかった。また肥満ネコゲノム DNA 中の一遺伝子多型 (SNP) 検出をエクソン部位に限り行ったが、遺伝子診断に有用な SNP を検出することができなかったことから、プロモーターおよびイントロン部位まで探索を進める他、さらに多検体を用いた SNP 検出が必要であると考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Kawasumi K, Murai T, Mizorogi T, Okada Y, Yamamoto I, Suruga K, Kadokura K, Arai T. Changes in plasma metabolites concentrations in obese dogs supplemented with anti-oxidant compound. *Frontiers in Nutrition*. 2018, 5:74. doi: 10.3389/fnut.2018.00074. (査読有)

Habara M, Mori N, Okada Y, Kawasumi K, Nakao N, Tanaka Y, Arai T, Yamamoto I. Molecular characterization of feline melanocortin 4 receptor and melanocortin 2 receptor accessory protein 2. *Gen Comp Endocrinol*. 2018, 261, 31-9. doi: 10.1016/j.ygcen.2018.01.020. (査読有)

Okada Y, Kawasumi K, Kobayashi M, Yamamoto I, Arai T. Physiological changes following acute weight gain and loss in cats. *Research & Reviews: Journal of Veterinary Sciences*. 2017, 3(2):1-7. (査読有)

Okada Y, Kawasumi K, Koide M, Hirakawa Y, Nori N, Yamamoto I, Arai T. Changes in energy metabolic indicators with aging in thoroughbred riding horses. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2016, 11(4):253-257. (査読有)

〔学会発表〕(計 7 件)

2018/8/4-8 Makoto Habara, Koh Kawasumi, Toshiro Arai, Ichiro Yamamoto. Investigation of obesity-related single nucleotide polymorphism in feline melanocortin 4 receptor gene. 18th International Society for Animal Clinical Pathology (ISACP) Tokyo, Japan.

2018/8/4-8 Ichiro Yamamoto, Yosuke Izumida, Makoto Habara, Koh Kawasumi, Toshiro Arai. Quantitative interaction analysis of cat GPR41 with beta-arrestins 18th International Society for Animal Clinical Pathology (ISACP) Tokyo, Japan

2018/8/4-8 Koh Kawasumi, Tae Murai, Takayuki Mizorogi, Yuki Okada, Ichiro Yamamoto, Kohei Suruga, Kazunari Kadokura, Toshiro Arai. Evaluation of Anti-Oxidant compound in obese dogs. 18th International Society for Animal Clinical Pathology (ISACP) Tokyo, Japan

2017/9/13-15 羽原誠、岡田ゆう紀、川角浩、山本一郎、新井敏郎 ネコにおけるメラノコルチン4受容体およびメラノコルチン受容体アクセサリタンパク質2の機能解析 第160回日本獣医学会 鹿児島

2016/9/6-8 羽原誠、岡田ゆう紀、森伸子、川角浩、山本一郎、新井敏郎 ネコにおけるメラノコルチン4受容体およびメラノコルチン受容体アクセサリタンパク質2の同定と解析 第159回日本獣医学会 藤沢

2016/4/5-9 Yuki Okada, Koh Kawasumi, Eiji Iwazaki, Nobuko Mori, Ichiro Yamamoto, Toshiro Arai. Novel definition of obesity: Pathological weight gain in cats 17th International Society for Animal Clinical Pathology (ISACP) Cape Town, South Africa

2016/4/5-9 Makoto Habara, Maoko Tabuchi, Yuki Okada, Koh Kawasumi, Toshiro Arai, Ichiro Yamamoto. cDNA cloning and mRNA expression of cat melanocortin 4 receptor. 17th International Society for Animal Clinical Pathology (ISACP) Cape Town, South Africa

〔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〕

ホームページ等

無し

6. 研究組織

(1) 研究分担者:無し

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:羽原 誠

ローマ字氏名: Habara Makoto

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。