

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790065

研究課題名（和文） 生理活性代謝産物、短鎖脂肪酸による交感神経系を介した生体内代謝制御機構の解明

研究課題名（英文） Mechanism of energy homeostasis maintenance via short-chain fatty acids receptor (GPR41), dietary energy sensor

研究代表者

木村 郁夫 (KIMURA IKUO)

京都大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：80433689

研究成果の概要（和文）：

今回の研究により、食事から腸内細菌により分解され生じる短鎖脂肪酸をリガンドとする細胞膜上受容体 GPR41 は交感神経節特異的に発現しており、短鎖脂肪酸、特にプロピオン酸により活性化され、交感神経系を亢進することにより、エネルギー消費を高めることがわかった。また、ケトン体である  $\beta$  ヒドロキシ酪酸は逆に GPR41 の活性を阻害することにより、交感神経系を抑制し、エネルギー消費を減少させる。このことは、食事により、生体内で腸内細菌により産生されるプロピオン酸をはじめとする短鎖脂肪酸を、また、絶食により糖に代わるエネルギー源として産生される  $\beta$  ヒドロキシ酪酸、ケトン体を GPR41 が体内栄養バランスとして認識し、生体内においてのエネルギーバランスを調節するという交感神経を介したエネルギー調節機構が成立する。したがって、プロピオン酸や  $\beta$  ヒドロキシ酪酸を GPR41 の標的として利用し、生体内エネルギーバランスを制御することによって、エネルギー破綻が原因である、肥満や糖尿病に代表される生活習慣病等の治療に有効であることが示唆される。

研究成果の概要（英文）：

Short-chain fatty acids (SCFAs) are the products of colonic bacterial degradation of unabsorbed dietary fiber, and have been suggested to modulate a various physiological responses including cardiovascular, metabolic and immune systems; however, the underlying mechanism for the process is uncertain. Our present work clarified their regulatory mechanism of sympathetic nervous system in cardiovascular and metabolic systems. SCFAs and ketones, major energy sources in body, directly regulate sympathetic activity via GPR41. Examining the cardiac and metabolic sympathetic responses in mice lacking GPR41, we found that propionate and  $\beta$ -hydroxybutyrate (major SCFA and ketone body) promotes or depresses GPR41-mediated SNS activation, respectively. This novel regulatory mechanism of SNS by dietary fatty acids would be of importance not only in the physiology, but in the diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学・分子生物学

キーワード：脂肪酸受容体、交感神経、ノックアウトマウス、GPCR、短鎖脂肪酸

### 1. 研究開始当初の背景

エネルギー代謝調節機構の破綻は肥満や糖尿病に代表される生活習慣病の直接的な原因とされ、生活習慣病の発症は様々な致死的な合併症を生じる。したがって、エネルギー代謝調節機構の解明とそれを応用した生活習慣病の予防と治療が現在の医学の最大のテーマであると考えられている。

### 2. 研究の目的

近年、短鎖脂肪酸をリガンドとする G タンパク質共役型受容体 GPR41 が同定された。この GPR41 は脂肪酸をリガンドとすることから脂質代謝やエネルギー調節に関与し、代謝異常による生活習慣病等の新たな創薬分子標的として国内外で注目されている。しかしながら、現在までにその生体における生理機能については未だ明らかにされていない。したがって、我々は GPR41 ノックアウトマウス等を用いることにより、GPR41 の個体レベルでの生理、病態機能解析を明らかにし、GPR41 を分子標的とする新たな治療薬創成の基礎検討を行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

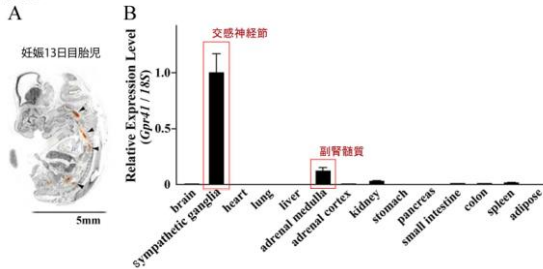
我々が独自に作成に成功した GPR41 ノックアウトマウスを用いて、分子生物学的、薬理学的手法を応用することにより実験を行った。

### 4. 研究成果

まず初めに GPR41 のマウス組織における詳細な発現解析を行った。

結果、*in situ hybridization* により、13 日目胎児においては交感神経節特異的に GPR41 の発現が確認された (図 1 A)。また生後においても、定量 RT-PCR によって生後 7 週令の組織における GPR41 の発現を確認したところ、他の組織と比較して有意に交感神経系における GPR41 の発現が確認された (図 1 B)。この発現は従来の特許で申請されていた作用部位である膵臓における発現の 100 倍以上の強い発現が交感神経節で確認された。

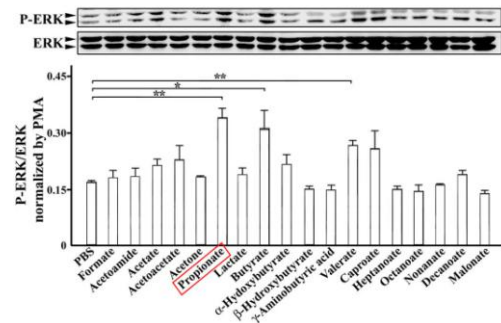
図 1



GPR41 は 3 量体 G タンパク質の  $G\alpha(i/o)$  と

カップリングする G タンパク質共役型受容体(GPCR)であることが知られている。そしてこの  $G_i/o$  型 3 量体 G タンパク質を介して MAPK 経路 (分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ経路) を活性化することがわかっている。そこで GPR41 のリガンドであると予想される種々の短鎖脂肪酸およびそれ以外のモノカルボン酸系脂肪酸による GPR41 の活性化について GPR41 安定発現 HEK293 細胞を用い、MAPK 経路に関与する ERK のリン酸化の亢進を指標とすることにより Western-blotting 法にて評価した。結果、プロピオン酸による刺激が最も GPR41 を活性化することがわかった (図 2)。したがって、GPR41 の内因性リガンドとしてプロピオン酸が最も強力な活性を有することがわかった。

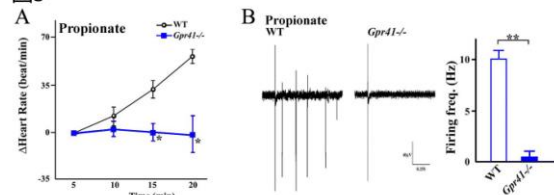
図 2



このプロピオン酸を用いて交感神経系における GPR41 の機能の評価を行った。

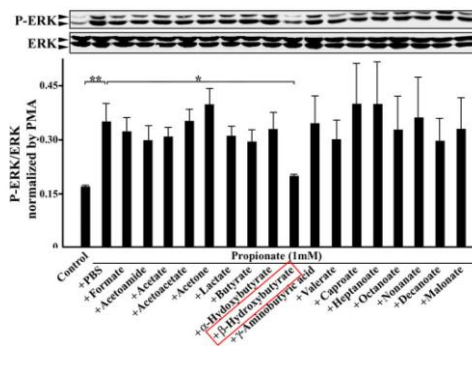
プロピオン酸の腹腔内投与 (1g/kg) により、野生型マウスにおいて、有意な心拍数の上昇がみられ、この効果は GPR41 ノックアウトマウスにおいては観察されなかった (図 3 A)。加えて、野生型マウスより得た交感神経細胞において、プロピオン酸による活動電位の発生が確認され、これは同様に GPR41 ノックアウトマウスにおいては観察されなかった (図 3B)。以上より、プロピオン酸は GPR41 を介して交感神経を活性化することがわかった。

図 3



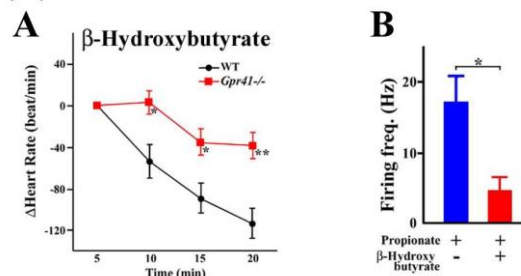
次にプロピオン酸による GPR41 の活性に拮抗するアンタゴニストの存在を調べるために種々のモノカルボン酸系脂肪酸による GPR41 アンタゴニストスクリーニングを行った。GPR41 の活性評価は前述と同様に Western-blotting による MAPK 経路の亢進を指標にして行った。結果、プロピオン酸との同時投与により、 $\beta$ ヒドロキシ酪酸のみがプロピオン酸による GPR41 の活性化を有意に抑制することができた(図 4)。したがって、 $\beta$ ヒドロキシ酪酸は GPR41 に対してアンタゴニストとして作用することが示唆された。

図4



この $\beta$ ヒドロキシ酪酸の GPR41 に対するアンタゴニスト効果が交感神経系に及ぼす影響について評価した。 $\beta$ ヒドロキシ酪酸の腹腔内投与(500mg/kg)によって、野生型マウスにおいては有意に心拍数の減少がみられ、この効果は GPR41 ノックアウトマウスでは観察されなかった(図 5A)。加えて、野生型マウスより得た交感神経ニューロンにおいて、プロピオン酸による活動電位の発生が $\beta$ ヒドロキシ酪酸により、有意に抑制されることがわかった(図 5B)。以上より、 $\beta$ ヒドロキシ酪酸は GPR41 に対してアンタゴニストとして作用することによって交感神経を抑制することがわかった。

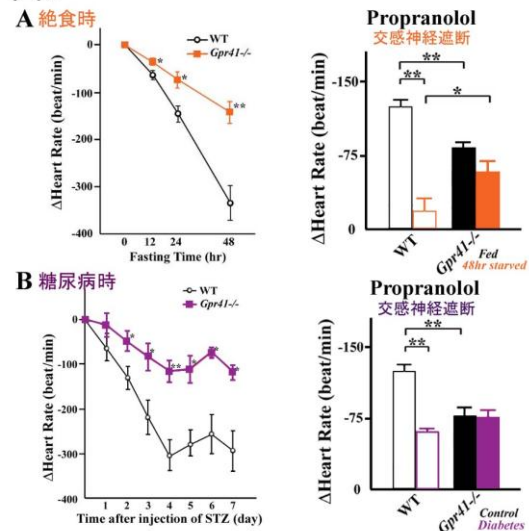
図 5



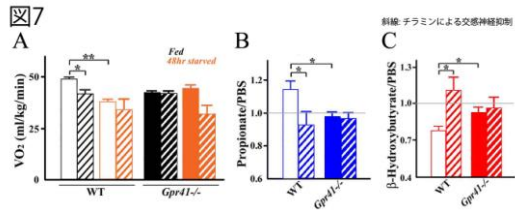
さらにケトン体( $\beta$ ヒドロキシ酪酸)が生体内において過剰に産生される生理的状態である絶食時(図 6A)や、エネルギー代謝調節異常を伴う糖尿病時(図 6B)における GPR41 の交感神経系機能に及ぼす影響につ

いての評価を行った。絶食時、糖尿病時において野生型マウスでみられる心拍数の抑制作用が GPR41 ノックアウトマウスでは、ほとんど観察されなかった(図 6 左)。加えて絶食、糖尿病時において交感神経系が抑制されることから、プロプラノロールでの交感神経遮断による心拍数の抑制効果が絶食・糖尿病時の野生型マウスでは通常時の野生型マウスに比べて有意に減弱するのに対し、GPR41 ノックアウトマウスではその減弱作用がほとんどみられなかった(図 6 右)。このことは GPR41 ノックアウトマウスでは絶食、糖尿病等のケトン体過剰産生による交感神経抑制作用が起こらないことを示す。

図6



GPR41 を介した交感神経活性とエネルギー消費との関連を評価するために、酸素消費量の測定を行った。摂食時と絶食時の比較を行ったところ、野生型マウスでは絶食により、有意にエネルギー消費の減少がみられ、摂食時のエネルギー消費はチラミンによる交感神経抑制下、有意に減少したが GPR41 ノックアウトマウスではこれらの効果がみられなかった(図 7A)。プロピオン酸の腹腔内投与(1g/kg)により、野生型マウスでは酸素消費量は有意に上昇し、交感神経抑制や GPR41 ノックアウトマウスでは、その効果は見られなかった(図 7B)。同様に $\beta$ ヒドロキシ酪酸の腹腔内投与(500mg/kg)は野生型マウスでは酸素消費量は有意に減少し、交感神経抑制や GPR41 ノックアウトマウスでは、その効果は見られなかった(図 7C)。したがって、GPR41 を介し、プロピオン酸は交感神経を活性化することによりエネルギー消費を増大させ、逆に $\beta$ ヒドロキシ酪酸は GPR41 の活性化を阻害することにより、交感神経を抑制し、エネルギー消費を減少させることがわかった。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① I. Kimura, D. Inoue, T. Maeda, T. Hara, A. Ichimura, S. Miyauchi, M. Kobayashi, A. Hirasawa, and G. Tsujimoto.

Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via GPR41

Proc Natl Acad Sci U S A. 査読あり, 108, 8030-8035, 2011.

DOI : 10.1073/pnas.1016088108

② 木村 郁夫, 辻本 豪三

腸内細菌と脂肪酸受容体を介したエネルギー調節機構

医学のあゆみ. 査読無し, 239, 170-171, 2011.

[学会発表] (計1件)

① I. Kimura.

GPR41, short-chain fatty acids receptor, modulates metabolic activity via sympathetic nervous system.

IRS 2011. 2011/4/1 Kyoto, Japan.

[その他]

ホームページ等

[http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news\\_data/h/h1/news6/2011/110426\\_1.htm](http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2011/110426_1.htm)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 郁夫 (KIMURA IKUO)

京都大学大学院 薬学研究科・助教

研究者番号 : 80433689

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし