

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790187
 研究課題名（和文）エネルギーホメオスタシスに関わる新規オーファン受容体の生理機能の解析
 研究課題名（英文）Physiological analysis of novel orphan GPCR involved in energy homeostasis
 研究代表者
 佐野 孝光 (Sano Takamitsu)
 独立行政法人理化学研究所・神経膜機能研究チーム・客員研究員
 研究者番号：10399967

研究成果の概要（和文）：

ショウジョウバエ BOSS 遺伝子は、細胞外のグルコースに反応し、糖/脂質代謝を制御する。BOSS 遺伝子は進化的に保存された遺伝子であり、哺乳類には4つのホモログである GPRC5A、GPRC5B、GPRC5C、GPRC5D が存在する。しかしながら、これらの遺伝子の生理機能はほとんど明らかとされていなかった。本研究では、GPRC5B がエネルギーホメオスタシスに関与する事を明らかにした。GPRC5B は脳と脂肪組織に高い発現を示し、その欠損マウスは高脂肪食摂取による肥満に抵抗性を示した。この原因は摂食量や運動量ではなく、酸素消費量の増加によるエネルギー消費の増大であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Drosophila orphan GPCR, bride of sevenless (BOSS) responds to extracellular glucose and regulates sugar and lipid metabolism. BOSS is evolutionally conserved from fly to human. In mammal, four homologues of BOSS, GPRC5A, GPRC5B, GPRC5C, and GPRC5D, exist. However, their molecular and physiological functions remain unclear. Here, we describe the role of GPRC5B in the regulation of energy homeostasis. GPRC5B was expressed highly in the brain and adipose tissue. GPCR5B-deficient mice showed decreased weight gain compared with wild type mice, despite of the similar food intake. This phenotype was attributed to increased oxygen consumption, but not increased physical activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 ・生理学一般

キーワード：GPCR、エネルギーホメオスタシス、肥満

1. 研究開始当初の背景

動物の個体を構成する細胞において、外部環境に応答し細胞内環境を変化させることは、生命活動の維持に必須である。細胞が外部環境に適応するためには、状況を正しく認識する必要があり、細胞は細胞膜表面にある受容体と呼ばれる一群の蛋白質を介して、細胞外環境変化を感知する。様々な受容体分子が知られているが、その中で最も多様なのが G 蛋白質共役型受容体 (G protein coupled receptor, GPCR) であり、ヒトにおいて約 800 種類の GPCR 遺伝子が知られている。GPCR は細胞外の様々なリガンドに反応し、三量体 G 蛋白質を解離することで、細胞内に情報を伝達する。GPCR のリガンドはホルモン、光、匂い分子、味覚分子、神経伝達物質などと多様である。しかし、未だリガンドが知られていない、オーファン受容体 (orphan GPCR) が約 250 種類程度に至り、これらのアゴニストやアンタゴニストの探索は創薬研究の標的として注目されている。

GPCR は、大きく 3 つのファミリーに分類され、Family A はロドプシン様受容体、Family B はセクレチン様受容体、Family C は metabotropic 受容体である。それらのうち、Family C はさらに 4 つのクラスに分けられ、class I は Calcium-sensing 受容体 (TAS1R (taste receptor type 1), V2R (pheromone receptor type 2))、class II は metabotropic glutamate 受容体、class III は GABA 受容体、class IV は GPCR5 受容体である。

GPCR family C class IV 受容体 (GPCR5 受容体) には、GPCR5A, 5B, 5C, 5D の 4 つのサブタイプが存在し、ショウジョウバエ、マウスからヒトに至るまで進化的に保存されている。GPCR family C class IV 受容体は、1998 年に Differential Display 法によりレチノイン酸刺激誘導遺伝子として、GPCR5A 受容体が単離されたこともあり、別名を Retinoic acid induced gene 1 (RAIG1) と呼ばれる。

その後、GPCR5A 受容体とのホモロジーから他 3 つの受容体が同定された。レチノイン酸刺激により、GPCR5B, 5C, 5D 受容体の発現も誘導される事から、これらの受容体は胚発達、分化、腫瘍形成に重要であることが示唆されている。現在までに GPCR5 受容体ファミリーのリガンドは全くの不明である。また、生理機能に関しても GPCR5A ノックアウトマウスが作製されているが、特に際立った表現型は認められない。また、他の GPCR5 受容体ノックアウトマウスに関する報告も未だなされてない。このように、哺乳類 GPCR5 受容体に関しては、その機能はほとんど明らかとされていなかった。

研究開始時の前年、研究代表者の研究室において、ショウジョウバエの BOSS (GPCR5 受容体ホモログ) が、外からのグルコース刺激に速やかに反応し、インスリン分泌を促すことを発見した。非常に興味深いことに、この遺伝子欠損変異体は、身体サイズの減少、インスリン分泌の低下、血糖値の上昇、飢餓時における生存率の低下など、グルコースとエネルギーホメオスタシスに関わる表現型を示した。ショウジョウバエの BOSS は、最も GPCR5B との相同性が高いため、研究代表者は GPCR5B に注目し、*LacZ*-ノックインマウスを作製した。その結果、GPCR5B 欠損マウスは体重が低下しており、哺乳類 GPCR5B がエネルギーホメオスタシスに関与していることが示唆された。

2. 研究の目的

ショウジョウバエの BOSS はエネルギーホメオスタシスに関与するが、哺乳類ホモログである GPCR5B の機能に関しては全くの不明である。本研究では、GPCR5B 欠損マウスの表現型解析を通して、GPCR5B 遺伝子の生理的意義を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) GPCR5B 遺伝子の組織局在の解析
- (2) GPCR5B 欠損マウスの表現型

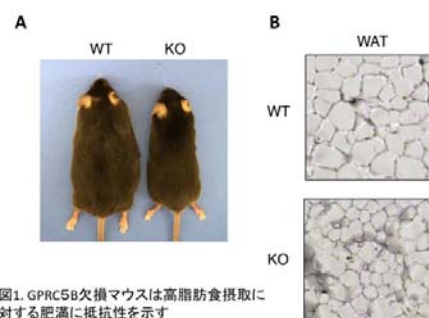


図1. GPCR5B欠損マウスは高脂肪食摂取に対する肥満に抵抗性を示す

解析

①解剖学的解析

体重、臓器の湿重量、脂肪組織の形態

②行動学的解析

エネルギー摂取量（摂食量）と消費量（自発運動量、概日リズム、酸素消費量）

③細胞レベルでの解析

脂肪細胞の分化

④血液生化学的解析

ホルモン分泌（インスリン分泌、レプチン分泌）、血中脂質（血中トリグリセライド、コレステロール）

4. 研究成果

(1) GPRC5B 遺伝子の組織局在の解析

GPRC5B 遺伝子は脳に強く発現しているが、他の組織における発現に関する情報は少ない。研究代表者が作製した GPRC5B 遺伝子欠損マウスには *LacZ* 遺伝子が GPRC5B 遺伝子のプロモーターの下流に導入されているため、X-Gal 染色により、簡便に組織局在を調べる事ができる。また、それと並行して、Real-time PCR 法により組織局在を調べた。その結果、GPRC5B 遺伝子は、脳のみならず、白色脂肪組織、褐色脂肪組織において発現している事が明らかとなった。この結果より、GPRC5B 遺伝子が脳、脂肪組織において、重要な働きをしている事を示唆された。

(2) GPRC5B 欠損マウスの表現型解析

①解剖学的解析

GPRC5B 欠損マウスを普通食及び高脂肪食摂取条件下で飼養し、体重を経時的に測定した。普通食では体重に顕著な差は認められなかったが、高脂肪食では GPRC5B 欠損マウスは肥満になりにくい傾向が認められた（図 1A）。次に、高脂肪食摂取時の各組織の湿重量を比較したところ、GPRC5B 欠損マウスにおいて白色脂肪組織と肝臓の重量が野生型と比べ、低下していた。一方、他の臓器では野生型と同様であった。すなわち、GPRC5B 欠損マウスでは、脂肪を蓄積する臓器における臓器重量の低下が顕著であった。続いて、白色脂肪組織の切片を作製し、白色脂肪組織の形態を観察したところ、GPRC5B 欠損マウスでは脂肪細胞の肥大化が抑制されていた（図 1B）。これらの結果により、GPRC5B 欠損マウスは高

脂肪食摂取による肥満に抵抗性を示す事が明らかとなった。

②行動学的解析

GPRC5B 欠損マウスが肥満に抵抗性を示す原因として、エネルギー摂取量の低下、またはエネルギー消費量の増加が考えられる。そこで、まず、摂食量を測定したところ、野生型と比べ、有意な差は認められなかった。次に、ホームケージ内での自発運動量を 4 日間測定したが変化は認められなかった。このとき、GPRC5B 欠損マウスは野生型と同様に、明期に睡眠を取り、暗期に活発に活動している事から、概日リズムに影響はないと考えられた。続いて、代謝チャンバーにマウスを入れ、酸素消費量を比較したところ、GPRC5B 欠損マウスにおいて、酸素消費量の増加が認められた。これらの結果は、GPRC5B 欠損マウスではエネルギー摂取の低下ではなく、エネルギー消費の増加により、肥満に抵抗性を示している事が明らかとなった。

③細胞レベルでの解析

GPRC5B 遺伝子は脂肪組織に発現している事から、脂肪細胞の分化に影響があるかどうかについて検討を行った。野生型マウスと GPRC5B 欠損マウスからマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) を調製し、脂肪細胞分化誘導剤を添加して培養することで脂肪細胞への分化を促した。その後、経時的に細胞を回収し、Real-time PCR 法により遺伝子発現変化を調べた。その結果、*C/EBP α* や *PPAR γ* などの転写因子の発現や脂肪細胞の脂肪滴の蓄積に影響は認められなかった。

④血液生化学的解析

血中のホルモン、脂質量を調べるため、高脂肪食を摂取した GPRC5B 欠損マウスの尾静脈から血液を採取し、ELISA 法により各種ホルモン、血中脂質量を測定した。肥満に伴い高インスリン血症、高レプチン血症をきたすが、GPRC5B 欠損マウスでは高脂肪摂取条件下でも、野生型よりも低いインスリン、レプチンレベルであった。しかしながら、トリグリセライドやコレステロールには影響しなかった。

以上の結果より、GPRC5B 欠損マウスでは、エネルギー消費の増加のため、肥満に抵抗性になっていることが明らかとなった。今後、GPRC5B のリガンドが同定できれば、メタボリックシンドロー

ムの治療へ向けての創薬研究の対象へと発展していくことを期待される。

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)

[学会発表] (計3件)

① 佐野孝光、大嶋恵理子、金然正、清成寛、阿部高也、東秀好、平林義雄

GPRC5B、GPRC5C 受容体の組織局在の解析

第32回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会年会 合同大会

2008年12月11日

神戸ポートアイランド

② 香山綾子、佐野孝光、金然正、三浦正幸、平林義雄

ショウジョウバエ：新しい脂質代謝ホメオスタシス維持機構

第32回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会年会 合同大会

2008年12月11日

神戸ポートアイランド

③ 金然正、鍋谷卓司、Peter Greimel、渡辺正樹、浅野佳美、佐野孝光、平林義雄

Lysophosphatidylcholine modulates stress-induced apoptosis via GPRC5B

第32回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会年会 合同大会

2008年12月11日

神戸ポートアイランド

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 孝光 (Sano Takamitsu)

独立行政法人理化学研究所・神経膜機能研究チーム・客員研究員

研究者番号：10399967