

令和 4 年 4 月 26 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06409

研究課題名(和文)短鎖脂肪酸をリガンドとするネコGPR41とGPR43の機能解析

研究課題名(英文)Molecular Characterization of Short-chain Fatty Acid receptor GPR41 and GPR43 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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪を構成する脂肪酸は必須栄養素のみならず、生理機能をもつシグナル伝達物質としても作用する。近年数々の脂肪酸に対するヒトGタンパク質共役型受容体(GPR)4種が発見され、それぞれが異なる生理作用を介することが明らかとなった。

ネコは幼猫期の網膜・神経発達に多量の長鎖脂肪酸を必要とするが、これは長鎖脂肪酸を ω -リノレン酸前駆体から生合成する活性が極めて弱い等、他の哺乳類とは異なる代謝経路を有している。GPR41とGPR43は短鎖脂肪酸の受容体であるが、ネコではその遺伝子すら明らかにされていないことから、ネコのGPR41とGPR43の分子生物学的な性状解析を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト同様、ネコも2型糖尿病が多い動物であり、過度の脂肪が蓄積され肥満した結果、糖尿病を発病する。脂肪を構成する脂肪酸は必須栄養素のみならず、生理機能をもつシグナル伝達物質としても作用する。2003年以降、数々の脂肪酸に対するヒトGタンパク質共役型受容体GPR40、GPR41、GPR43、GPR120が発見され、異なる生理作用を介することが明らかとなった。ネコは幼猫期に多量の脂肪酸DHAを必要とする等、他の動物とは異なる脂肪酸の代謝経路を持つことから、本研究では特に短鎖脂肪酸の受容体GPR41とGPR43の機能を分子生物学的な解析を行なった。

研究成果の概要(英文)：G protein-coupled receptors (GPRs) 41 and 43 were identified and characterized as free fatty acid receptors (FFARs) 3 and 2, respectively. FFAR2 and FFAR3 mediate short-chain fatty acids (SCFAs) as signaling molecules. The present study aimed to molecularly characterize FFAR2 and FFAR3 to study lipid metabolism in the domestic cat. cDNA cloning of cat FFAR2/3 revealed high homology with that in other mammals. Tissue distribution of cat FFAR2 and FFAR3 mRNA was analyzed by qPCR. Inhibition of intracellular cAMP concentrations was observed in cells transfected with cat FFAR2 or FFAR3 and treated with propionate and acetate. Split luciferase assay (NanoBiT) revealed homo/heterodimerization in HEK293 cells transfected with cat FFAR2 and/or FFAR3. These results indicate that the functional receptor proteins, FFAR2 and FFAR3, are expressed in cat tissues and show differential distribution patterns.

研究分野：分子内分泌学

キーワード：ネコ GPR41 GPR43 短鎖脂肪酸 FFAR2 FFAR3

1. 研究開始当初の背景

ヒト同様、ネコも2型糖尿病が多い動物であり、過度の脂肪が蓄積され肥満した結果、糖尿病を発病する(右写真2枚)。脂肪を構成する脂肪酸は必須栄養素のみならず、生理機能をもつシグナル伝達物質としても作用する。2003年以降、数々の脂肪酸に対するヒトGタンパク質共役型受容体(表: GPR40、GPR41、GPR43、GPR120)が発見され、異なる生理作用を介することが明らかとなった。これら4種はともに消化管で機能する消化管脂肪酸センサーと呼ばれ、それぞれのヒト遺伝子中の一遺伝子多型(SNP)は重篤な肥満・糖尿病に関与する(GPR40:3箇所、GPR41:2箇所、GPR43:2箇所、GPR120:2箇所)。

近年多くのGタンパク質共役型受容体の構造が解析され、生細胞中で単量体の他に受容体同士で2量体を形成していることが明らかとなった。またGABA_B受容体のように1型と2型のヘテロ2量体を形成し初めて機能するケースもあり、Gタンパク質共役型受容体のホモ・ヘテロ2量体解析が必須となりつつある。

ネコは幼猫期の網膜・神経発達に多量のDHAを必要とするが、これは長鎖脂肪酸EPAやDHAを-リノレン酸前駆体から生合成する活性が極めて弱いためである。このため必須脂肪酸として-リノレン酸とリノール酸の他、アラキドン酸も必須である等、他の哺乳類とは異なる脂肪酸の代謝経路を有している。研究代表者は以前より糖脂質代謝とGタンパク質共役型受容体の研究を続けており、ネコ科動物の中・長鎖脂肪酸受容体GPR40のC末端は他動物よりも長いことその他、DHA・EPAなど結合後の細胞内シグナル伝達にその長いC末端が重要であることを明らかにしたが、短鎖脂肪酸受容体GPR41とGPR43の消化管での発現部位(細胞)細胞内シグナル伝達の差異、ホモ・ヘテロ2量体の有無については不明である。

2. 研究の目的

本研究はネコGPR41とGPR43の発現部位(細胞)受容体としての機能、受容体の構造および同遺伝子中のSNP検出による将来の肥満予測のための遺伝子診断法の開発を目的とする。本来ネコは肉食動物のため食物繊維を必要としないが、便秘改善・毛玉ケア・かさ増しのためフードに含まれることが多い。食物繊維や炭水化物の多くは大腸で乳酸菌やビフィズス菌に発酵され短鎖脂肪酸が生成されるが、短鎖脂肪酸はネコの重要な栄養素としての認識に止まり、ネコ体内のシグナル伝達物質としての機能は不明である。この他に以下の独自性・創造性を挙げる。

(1) NanoBiT法で消化管脂肪酸センサー同士のホモ・ヘテロ2量体を明らかにする

NanoBiT法は2分子のタンパク質にそれぞれ分割したルシフェラーゼを融合させ、生細胞内でのタンパク質-タンパク質共役を観察する方法である。研究代表者はDHA添加によりGPR120が細胞内タンパク質アレスチンと2分以内に結合して細胞膜から細胞内に局在が移ることをNanoBiT法により明らかにした。すなわち同法の応用により、細胞膜上でGタンパク質共役型受容体がホモ2量体を形成しているのか、ヘテロ2量体を形成しているのかをリアルタイムに観察することが可能となる。NanoBiT法によるホモ・ヘテロ2量体化の新しい分析法として確立し、他のGPR研究に強力なツールとして還元する。

(2) 「ネコだからこそ遺伝子検査を」～「肥満」を知るメリット・教えるメリット～

我が国のネコは飼育頭数がイヌを上回ったものの、その反面、イヌ頭数の4割しか動物病院に来院しておらず肥満が見過ごされることが多い。日常ネコと接しつつも、少し太っていた方が可愛いと思うオーナーが多いのも事実である。遺伝子検査のメリットは胎生期から将来の疾病リ

スクが予測できることにある。特に肥満はがんと異なり、オーナーの管理次第で予防可能な疾病である。動物病院に来院することの少ないネコだからこそ遺伝子診断による将来の肥満予測は有用であり、ネコオーナー側は早く知ることで将来に備え、動物病院側は健康診断のためにネコとオーナーを継続して来院させるメリットがある。

3. 研究の方法

本研究では研究代表者が短鎖脂肪酸をシグナル伝達物質とするネコ消化管脂肪酸センサー GPR41 と GPR43 の研究を行い、SNP 検出による遺伝子診断法の開発を目的とする。

(1)GPR41 と GPR43 発現ベクター作成および細胞内シグナル伝達解析

GPR41 と GPR43 が発現している腸管部位から全 RNA 抽出・ポリ(A)+RNA 精製を行う。精製したポリ(A)+RNA を鋳型として逆転写反応により cDNA 合成を行う。RT-PCR 法により各 GPR 領域を増幅して InFusion 法により pcDNA3.2 ベクターに導入し、GPR41 と GPR43 発現ベクターを作成する。DNA シーケンスにより塩基配列決定、大量培養を行う。HEK293、CHO 細胞に GPR41、GPR43 発現ベクターを導入し、Forskolin による上昇した細胞内 cAMP の短鎖脂肪酸添加による抑制効果 (Gi) を pGloSensor cAMP により検出する。検出が困難な場合、短鎖脂肪酸リガンド結合後の GPR41 と GPR43 の細胞膜から細胞内への移動 (内在化) を HiBiT Extracellular Detection 法により定量解析する。G タンパク質共役型受容体はリガンド結合により細胞内に移動する性質があるため、本法を既に他の GPR 研究に研究代表者が用いて成果を得ている。

(3)NanoBiT 法による各消化管脂肪酸センサーのホモ・ヘテロ 2 量体測定

NanoBiT を融合させた消化管脂肪酸センサー発現ベクターを培養細胞 (HEK293、CHO 細胞 他) に導入し発現させる。血清添加の有無 (脂肪酸を含むため)、短鎖・長鎖脂肪酸濃度、被曝時間などを検討する。各消化管脂肪酸センサーが各々ホモ・ヘテロ 2 量体で機能するかを比較する。NanoBiT 法の検出感度が低い場合、NanoBRET 法 (NanoBiT 変法) あるいは BD FACSAria (本学所有) による FRET 検出を行い、消化管脂肪酸センサーのホモ・ヘテロ 2 量体化測定を行う。

(4)健康・肥満ネコゲノム DNA を用いた GPR41・GPR43 遺伝子 SNP の探索

研究代表者は既に健康および肥満ネコゲノム DNA を 50 検体ずつ所有しているが、この他にネコのゲノム DNA を採取して SURVEYOR 法による GPR41・GPR43 遺伝子上の SNP 探索を行う。同法は 3 kb 程度のゲノム DNA 中にある SNP を 96 検体であれば 1 日で探索することができる RFLP 法の変法である。研究代表者が所属する獣医生化学研究室では 5 名の大学院生が小動物臨床医として動物病院で勤務している。彼らが勤務する 4 箇所の動物病院に来院した肥満ネコのオーナーに本研究課題の趣旨を説明し、インフォームドコンセントを取得する。種別、年齢、性別、体重、ボディコンディションスコア (5 段階中 3.5 以上を肥満と診断)、日常のフード組成および量をデータとして回収する。SNP と肥満の相関が高いと判断した場合、Realtime PCR を用いた SNP 検出法により迅速な検査法を確立する。

4. 研究成果

小腸から全 RNA 抽出、続いてポリ A RNA 精製を行った。精製したポリ A RNA を鋳型、Oligo(dT) をプライマーとした逆転写反応により cDNA 合成を行った。cDNA 合成後、ネコ遊離脂肪酸受容体 (G タンパク質共役型受容体 GPR40、41、43、120) のうち GPR41 および GPR43 をそれぞれ PCR 法により増幅し pcDNA3.2/V5/GW/D-TOPO ベクターにクローニング、強発現ベクターを作成した。これらベクターをそれぞれ CHO-K1 細胞株にリポフェクション法により pGloSensor-22FcAMP ベクターと共に導入した。培養後、6% GloSensor cAMP reagent を含む HBSS に交換し室温にて 2 時

間静置した。静置後 GloMax Discover system ルミノメーターにて発光を測定し短鎖脂肪酸を添加し測定、続いて Forskolin を最終濃度 10 マイクロモルとなるよう添加したところ、酪酸が GPR43 発現細胞での cAMP 上昇を抑制できなかった他は全て抑制効果を確認したことから GPR41 および GPR43 共に機能的な短鎖脂肪酸受容体であることが明らかとなった。

GPR41 および GPR43 の生細胞での 2 量体形成およびアレスチン結合実験を行うため RT-PCR 法により各 GPR 領域を増幅し、InFusion 法により NanoBiT 発現ベクター (pFC34K LgBiT TK-neo Flexi) に導入した。DNA シーケンスにより塩基配列を確認後、培養細胞 (HEK293 他) に一過性発現させるための大量培養を行った。また NanoBRET 発現ベクターは上記発現ベクターの替わりに pFN31K Nluc CMV-neo Flexi を用い、同様に DNA シーケンスと大量培養を行い、一過性導入用ベクターとした。

短鎖および長鎖脂肪酸をリガンドとした各消化管脂肪酸センサーのホモ・ヘテロ 2 量体形成測定 (NanoBiT 法) を行った。各消化管脂肪酸センサー (GPR40、GPR41、GPR43、GPR120) の C 末端側に二分割した NanoLuc ルシフェラーゼを融合タンパク質として哺乳類培養細胞で発現するベクターを作成し、培養細胞 (HEK293) に導入、一過性に強制発現させた。各消化管脂肪酸センサーがそれぞれホモ・ヘテロ 2 量体で機能するのかを解析した結果、GPR43 と各消化管脂肪酸センサーがヘテロ 2 量体を形成する際に比較対象サンプルの 1.0 倍程度の活性を示したことから特異的なタンパク質共役が示唆された。

また G タンパク質共役型受容体はリガンド結合後、各種アレスチンより細胞内に移動する (internalization) が、ネコ GPR41 および GPR43 の internalization もアレスチンによるものか否かを NanoBiT 法により解析した結果、リガンド添加による internalization は 4 種存在するアレスチンのうち、Arrestin-3/beta-arrestin-2 によってのみ引き起こされることが明らかとなった。

この他、ネコ GPR41 および GPR43 の cAMP 抑制機能 (Gi/o) の解析を行なったが、同発現ベクターを用いて細胞内カルシウム濃度上昇を共発現させた NFAT-ルシフェラーゼ活性により測定した。培地中に酢酸を添加した結果、GPR43 ではルシフェラーゼ活性が上昇したが (EC50=722nM)、GPR41 では変化が見られなかったことから、GPR43 は Gi/o および Gq 型の受容体であることが明らかとなった。

NanoBRET 法は NanoBiT 法とは異なり、生物発光共鳴 (エネルギー転移) を用いた分子間近接度を検出する方法であり、NanoBiT 法の直接的な相互作用を検出する方法とは異なる分子間作用解析技術であるため、本研究に用い GPR43 と他の GPR との分子間近接度を解析したが、GPR43 の明確なホモ、ヘテロ 2 量体形成を確認できなかった。NanoBiT 法と NanoBRET 法で異なる結果が得られたことは興味深く、それぞれに用いる発現ベクターのプロモーター活性の違いも影響を与えていることが考えられた。

肥満ネコのゲノム DNA を用い、GPR41 および GPR43 遺伝子中の SNP 解析を SURVEYOR 法により解析した。SURVEYOR 法は一種の制限酵素であり、DNA の二本鎖中の水素結合をしていないミスハイブリッド部位を特異的に切断する SURVEYOR 酵素を用いた SNP 検出法である。本検出法により BCS3.5 以上のネコ 25 頭の SNP 検出を試みたが、GPR41 と GPR43 のエクソン部位に有意な SNP を検出することは出来なかった。今後は頭数をさらに増やすと共に同遺伝子プロモーター部位をさらに上流へと探索部位を広げることが必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamamoto Ichiro, Kawasumi Koh, Ohkusu Tsukada Kozo, Arai Toshiro	4. 巻 7
2. 論文標題 Molecular characterization of free fatty acid receptors FFAR2 and FFAR3 in the domestic cat	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Veterinary Medicine and Science	6. 最初と最後の頁 77～85
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/vms3.356	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mizorogi Takayuki, Kobayashi Motoo, Ohara Kenji, Okada Yuki, Yamamoto Ichiro, Arai Toshiro, Kawasumi Koh	4. 巻 Volume 11
2. 論文標題 <p>Effects of Age on Inflammatory Profiles and Nutrition/Energy Metabolism in Domestic Cats</p>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Veterinary Medicine: Research and Reports	6. 最初と最後の頁 131～137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/VMRR.S277208	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takayuki Mizorogi, Motoo Kobayashi, Kenji Ohara, Yuki Okada, Ichiro Yamamoto, Toshiro Arai and Koh Kawasumi.
2. 発表標題 Changes in energy metabolism of healthy cats with aging
3. 学会等名 19th International Society for Animal Clinical Pathology (ISACP) Virtual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Amane Suzuki, Kumi Mashiyama, Hitomi Onodera, Yuki Okada, Ichiro Yamamoto, Kohei Suruga, Kazunari Kadokura, Toshiro Arai and Koh Kawasumi.
2. 発表標題 Changes in plasma metabolites concentrations in riding horses supplemented with anti-oxidant and anti-inflammatory compound.
3. 学会等名 19th International Society for Animal Clinical Pathology (ISACP) Virtual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------