

短鎖脂肪酸の受容体GPR41の欠損マウスを用いた メタボリックシンドロームにおける短鎖脂肪酸の機能解析

Functional analysis of short chain fatty acids on the metabolic syndrome
by GPR41-deficient mice

岩 本 隆 司

Takashi IWAMOTO

要 旨

短鎖脂肪酸（SCFA；Table 1 参照）は哺乳類では主に腸内細菌叢（マイクロフローラ）で食物繊維から産生される生理活性物質で、消化管上皮細胞の増殖や免疫細胞の制御、糖脂質代謝の調節など多岐にわたる作用を持っていることは示唆されてきた。それにも関わらず、SCFAが如何なる分子メカニズムで標的細胞に作用を及ぼすかは殆ど解っていないかった。最近、新規G蛋白質共役型受容体（GPCR）¹⁾であるGPR41とGPR43がSCFAの細胞膜受容体であるという大変興味ある事実が明らかになった。GPR41は主に脂肪細胞、GPR43は白血球細胞に発現しており、それぞれ脂質代謝や自然免疫において何らかの生理的役割を演じていると推測される。

ここではこれらSCFA受容体発見の経緯とこれらの遺伝子欠損マウス作製の試みおよび抗体を用いた解析から得られた知見を述べる。

Table 1 Short chain fatty acid (SCFA)

CH₃COOH	酢酸 acetic acid
C₂H₅COOH	プロピオン酸 propionic acid
C₃H₇COOH	酪酸 butyric acid
C₄H₉COOH	吉草酸 valeric acid

キーワード：短鎖脂肪酸、GPR41、GPR43、遺伝子欠損マウス

学問的背景

ヒトGPR41とGPR43は1997年にヒト染色体の19番にGPR40と42とクラスターをなすリガンドが判らない受容体（オーファン受容体）として同定されたが（Sawzdargo et al., 1997）、それらの機能やリガンドは長い間不明であった。ところが

が、2003年にGPR40は膵臓のβ細胞²⁾に高発現し、中長鎖脂肪酸をリガンドとしてインスリンの分泌を制御している極めて重要な分子であることが明らかになった（Itoh et al., 2003）。

一方、GPR41とGPR43のリガンドはこれとほぼ時を同じくして共にC2-C6のSCFAであることが報告され、GPR40シリーズはこれにより脂肪

酸をリガンドとする新しいGPCRファミリーとして位置付けられた (Brown et al., 2003)。

我々はマウス骨髄性白血病細胞M1がleukemia inhibitory factorというサイトカイン³⁾により単球に分化する過程で発現が誘導される新規GPCRを単離し、LSSIGと命名した (Senga et al., 2003)。LSSIGはヒト GPR43とアミノ酸レベルで85%相同性があり、GPR43のマウスカウンターパートと考えられた。GPR43/LSSIGも組織での発現は、血液細胞に特異的で末梢血細胞において強い。さらに、ヒト末梢血より単離した単球と好中球を種々のサイトカインやリポ多糖体で刺激したところ、その発現が増強した。以上より我々はGPR43/LSSIGの発現は白血球の分化や活性化に密接に関連しており、自然免疫になんらかの役割をはたしていると推測した。

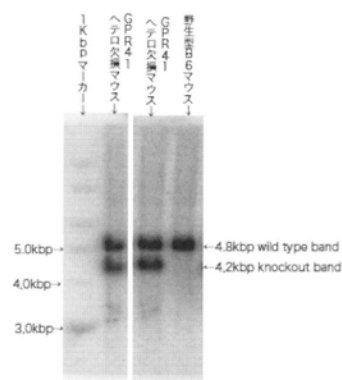
他方、GPR41はGPR43とアミノ酸レベルで52%の相同性があり脂肪細胞で発現が高いが、血管内皮細胞、リンパ球、脾臓、膵臓など広い組織に発現が分布していると報告されている (Brown et al., 2003)。Xiongらは、マウス脂肪細胞においてSCFAがGPR41を介して摂食抑制サイトカインであるレプチンの発現を誘導し、実際マウス成体にSCFAを経口で投与すると血中レプチンの濃度が上昇することを示した (Xiong et al., 2004)。この事実は経口投与されたSCFAが摂食を抑制するという今までの報告を裏づけるものである。

この様にGPR41とGPR43の好発現組織は異なっており、更に、SCFAに対する親和性も両者で若干異なっている。成体はこれらのSCFAの受容体を組織により巧妙に使い分けられていると思われるが、その分子メカニズムは殆ど明らかにされていない。

実験結果

I. GPR41欠損マウスの作製と解析

GPR41の成体での機能を解析するために遺伝子欠損マウスの作製を試みた。相同組み換え遺伝子の子孫への伝達が確認出来た1匹のGPR41キメラマウスから雌雄GPR41ヘテロ欠損マウス (+/-) を得て交配させ、複数の子マウスを得て、尾DNAを解析した (図1)。その結果、現在まで解析した34匹の生体マウスの内、野生型 (+/+) が10匹、ヘテロ欠損マウス (+/-) が24匹であった (図2 A)。この結果から、GPR41



尾から抽出したDNAを制限酵素BamHIで消化し、アガロースゲルで泳動。アイソトープで標識したプローブでハイブリダイズした。野生型は4.8kbpのバンドが1本のみであるが、ヘテロ欠損マウスでは4.8kbpおよび4.2kbpの2本のバンドが確認できる。

図1 GPR41遺伝子ヘテロ欠損マウス (+/-) のサザンブロット法による解析

ホモ欠損マウスは胎生致死となっている可能性が高いと考えられた。そこで、胎生18.5日齢の胎児21匹、胎生9.5日齢の胎児31匹を解析したが、それぞれ野生型 (+/+) が3匹、ヘテロ欠損マウス (+/-) が18匹 (図2 B)、野生型 (+/+) が5匹、ヘテロ欠損マウス (+/-) が26匹 (図2 C) であった (Table 2 参照)。

そこで既にこれ以前に発生停止になっている可能性が高いと考え、過排卵処理した雌GPR41ヘテロ欠損マウス (+/-) を雄GPR41ヘテロ欠損マウス (+/-) と交配させ、受精後3.5日の胚盤胞⁴⁾を回収してPCR反応を行った。その結果、12匹の内、野生型 (+/+) が2匹、ヘテロ欠損マウス (+/-) が10匹であった (data not shown)。

Table 2 GPR41欠損マウスの遺伝子型
(図2のまとめ)

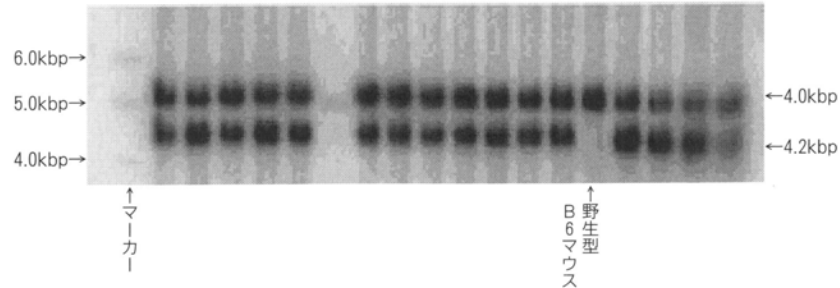
() 内の数値はPCR解析によって確認した数

	野生型マウス	ヘテロ欠損マウス	ホモ欠損マウス	解析総数
4週齢	10匹	16 (24) 匹	0匹	34匹
胎児18.5日齢	3匹	18匹	0匹	21匹
胎児9.5日齢	5匹	26匹	0匹	31匹

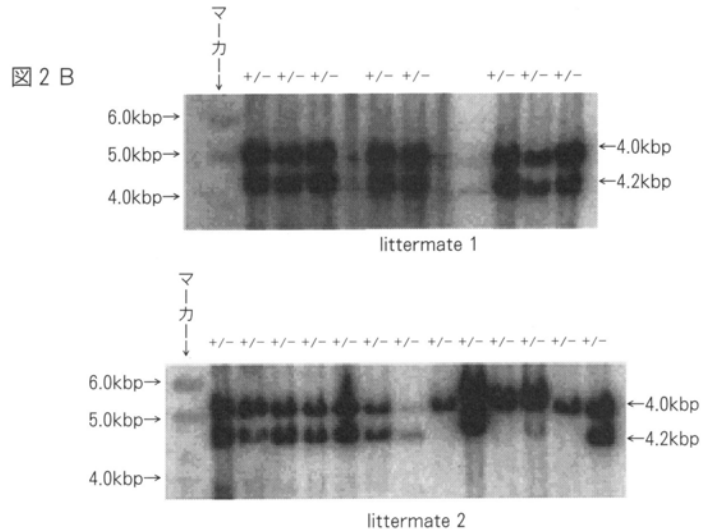
BamH1 Digestによるサザン解析にて、スクリーニングを行った。

ヘテロ欠損マウス同士の交配によって生れた仔マウスを4週齢にて、サザン解析したもの。
あらかじめPCR解析によって、少なくともヘテロには欠損していると思われるものを解析した。

図2 A この週齢ではホモ欠損マウスは確認できず、
GPR41の欠損により胎生致死となる可能性が示された。



さらにヘテロ欠損マウス同士の交配による18.5日齢のマウス胎児を用いてサザン解析したもの
前もってのPCR解析は、行っていない。



この時点のマウス胎児でも、ホモ欠損マウスを確認することは出来なかった。

さらに胎児の日齢をさかのぼり、9.5日齢にて胎児を採取しBamH1にてサザン解析を行った。

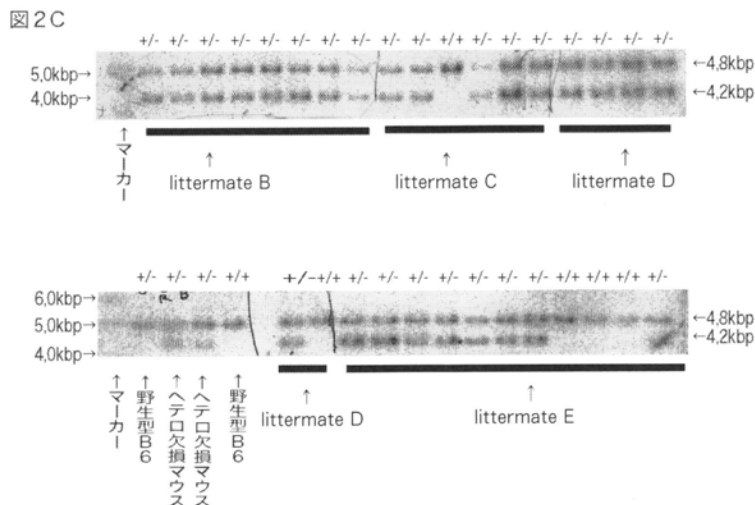


図2 GPR41 (+/-) 雌雄マウス交配により生まれた子マウスの遺伝子型の解析

II. GPR43に対するポリクロナル抗体の作製

GPR41とGPR43の発現解析は我々を含め複数のグループにより報告されているが、それらはノーザンブロット法やReal time PCRなどのRNAレベルの解析が主である。しかしRNAの発現量は分子の発現を必ずしも反映していない。そこでタンパクレベルでの解析が必要になるが、そのためには良質な抗体が必須である。我々はヒト、マウスのGPR41およびGPR43のペプチドを合成して、家兎に免疫してポリクロナル抗体の作製を試みた。

- 1) マウスおよびヒトの各組織を免疫染色したところGPR43の抗体ではノーザンブロット法の結果と一致して単球に強い発現が見られた。また、意外にも腸管上皮の一部の細胞に発現が確認できた。この細胞は抗glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 抗体により染色されるため内分泌系細胞であるL細胞であると考えられた (data not shown)。
- 2) これらの抗体が確かにGPR43を認識していることを確認するために網膜の光受容体であるロドプシンとGPR43の融合遺伝子を発現ベクターに組み込み Chinese hamster ovary cell (CHO細胞) に導入してウエスタンブロット法にて解析した。図3に示すように予想される分子量である~60kDの位置に明瞭なバンドを確認した。

一方、何らかの原因でGPR41に対する抗体の作製には未だ成功していない。

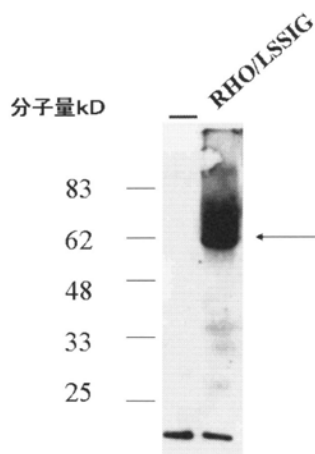


図3 GPR43/LSSIGタンパクの
ウエスタンブロット解析
(コンストラクトをCHO細胞に導入後
48時間で抗マウスGPR43抗体で解析)

まとめ

現在までのところGPR41のホモ欠損マウス(−/−)は得られていない。今後さらに胚盤胞についてPCR解析を行う予定である。最終的に(−/−)個体が得られない場合はヘテロ欠損生殖細胞同士の受精不全あるいは受精後の子宮への遊走不全の可能性も考えられる。特に子宮がSCFAの豊富な場所であることを考えると、SCFAがGPR41を介して受精卵の遊走を制御している可能性も考えられる。

当初白血球のみに強い発現がみられると考えられていたGPR43であるが我々の抗体を用いた解析により腸管の内分泌系上皮細胞にも発現していることがわかった。この事実を支持する報告がごく最近ラットを使った研究グループからあった(Karaki et al., 2006)。彼らはPYYペプチドを分泌する腸管内分泌細胞がGPR43を発現していることを報告している。PYYは摂食抑制作用を有する腸脳ペプチドであるため、GPR43が腸管内のSCFAを感知して、PYYを分泌することにより摂食を抑制しているのかもしれない。

glucagon-like peptide-1 (GLP-1)は膵臓のβ細胞に作用してインスリンの分泌を増加する。最近、新しい中長脂肪酸の受容体として新規GPCRであるGPR120が同定されたが、これらは腸管の内分泌細胞に発現しており脂肪酸に反応してGLP-1を分泌することがわかった(Hirasawa et al., 2005)。今までに明らかになったGPCRと脂肪酸の関係を図4に示す。今後このように新しい

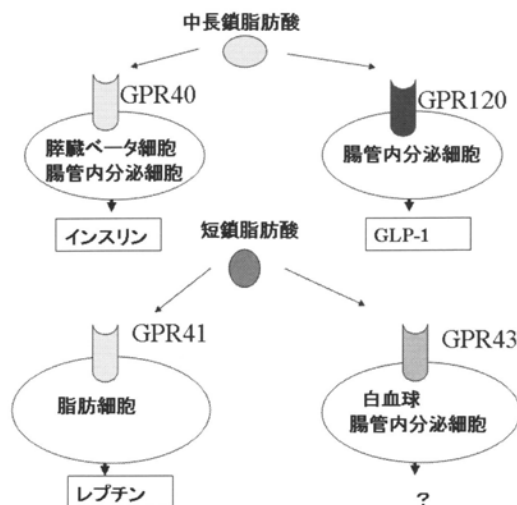


図4 脂肪酸受容体モデル

脂肪酸の特異的受容体がさらに明らかになることにより脂肪酸を介する情報伝達ネットワークの全貌を垣間見ることができるよう。それが糖尿病やメタボリックシンドロームの新しい予防法や治療薬の開発に繋がることを期待して研究を進めた。

文中の用語

- 1) G蛋白質共役型受容体 (GPCR) : 細胞膜を7回貫通する特徴的な構造をもち、それぞれ特異的な分子 (リガンドと呼ぶ) と結合して情報を細胞内に伝達する。細胞膜受容体として最もメジャーなファミリーを形成している。しかしこれらの多くはリガンドが未知であり、「オーファン受容体」とも呼ばれる。ヒトゲノム全体でGPCRは800近くあると予想されるが、リガンド既知の受容体はその3分の1程度であり、残りはオーファン受容体である。また既存の医薬品の半数近くはGPCRを標的としている。
- 2) 膵臓β細胞 : 膵臓の内分泌部ランゲルハンス島にあるインスリンを分泌する細胞。この細胞の機能が低下すると糖尿病の原因となる。
- 3) サイトカイン : 当初リンパ球から分泌されて免疫反応、炎症反応を制御するタンパク質として同定されたが、最近では種々の細胞から分泌されることがわかり、その作用も細胞の増殖、分化制御など多岐にわたることが明らかになっている。ホルモンとの違いはホルモンが血流によって全身に作用するのにに対して、サイトカインは局所で作用する。
- 4) 胚盤胞 (ブラストシスト) : 受精後3.5日前後の受精卵。胞胚腔と内部細胞塊を栄養外胚葉が取り囲む構造をとる。

引用文献

- Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D, Muir AI, Wigglesworth MJ, Kinghorn I, Fraser NJ, Pike NB, Strum JC, Steplewski KM, Murdock PR, Holder JC, Marshall FH, Szekeres PG, Wilson S, Ignar DM, Foord SM, Wise A, Dowell SJ. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem.* 2003, 278:11312-11319.
- Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, Sugimoto Y, Miyazaki S, Tsujimoto G. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med.* 2005, 11:90-94.
- Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, Ogi K, Hosoya M, Tanaka Y, Uejima H, Tanaka H, Maruyama M, Satoh R, Okubo S, Kizawa H, Komatsu H, Matsumura F, Noguchi Y, Shinohara T, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature.* 2003, 422: 173-176.
- Karaki S, Mitsui R, Hayashi H, Kato I, Sugiya H, Iwanaga T, Furness JB, Kuwahara A. Short-chain fatty acid receptor, GPR43, is expressed by enteroendocrine cells and mucosal mast cells in rat intestine. *Cell Tissue Res.* 2006, 324: 353-360.
- Le Poul E, Loison C, Struyf S, Springael JY, Lannoy V, Decobecq ME, Brezillon S, Dupriez V, Vassart G, Van Damme J, Parmentier M, Detheux M. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J Biol Chem.* 2003, 278: 25481-25489.
- Sawzdargo M, George SR, Nguyen T, Xu S, Kolakowski LF, O'Dowd BF. A cluster of four novel human G protein-coupled receptor genes occurring in close proximity to CD22 gene on chromosome 19q13.1. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997, 239: 543-547.
- Senga T, Iwamoto S, Yoshida T, Yokota T, Adachi K, Azuma E, Hamaguchi M, Iwamoto T. LSSIG is a novel murine leukocyte-specific GPCR that is induced by the activation of STAT3. *Blood.* 2003, 101: 1185-1187.
- Xiong Y, Miyamoto N, Shibata K, Valasek MA, Motoike T, Kedzierski RM, Yanagisawa M. Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004, 101: 1045-1050.
- Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D, Muir AI, Wigglesworth MJ, Kinghorn I, Fraser NJ, Pike NB, Strum JC, Steplewski KM, Murdock PR, Holder JC, Marshall FH, Szekeres PG, Wilson S, Ignar DM, Foord SM, Wise A, Dowell SJ. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by

————— 著 者 —————

岩本隆司 (Takashi IWAMOTO)

1984年名古屋大学医学部卒業。1990年名古屋大学大学院医学研究科博士課程修了。名古屋大学医学部助手、米国DNAX分子細胞生物学研究所ポストドクトラルフェロー、名古屋大学医学部助教授を経て2006年より現職。現在、遺伝子改変マウス作成のシステムを実験動物教育研究センターでセットアップ中である。専門：実験動物学、分子生物学、眼科学。