

博士論文要約 (Summary)

令和 2 年入学

連合農学研究科 応用生命科学 専攻

氏 名 長澤 智隆

タイトル	FFAR4／インクレチンシグナリングに関わる非栄養性食品分子の新規機能の解明
------	--

キーワード (GPCR) (FFAR4) (GLP-1)

メタボリックシンドロームは食生活の乱れなどが原因の生活習慣病であり、糖尿病、動脈硬化、肝硬変のリスクを高める事が知られている。メタボリックシンドロームおよびその予備軍は年々増加しており、その治療や予防法の研究は非常に重要なものとされている。その予防のターゲットとして消化管ホルモンであるインクレチンが注目されており、インクレチン分泌に食品由来の成分が関与する事が明らかになっている。インクレチンの1つである GLP-1 はインスリン分泌促進作用や食欲抑制作用を持ち、この事はヒト体内には食事の過剰摂取を抑える食欲抑制／生体恒常性を維持するシステムが元来備わっている事を示している。一方、GLP-1 の血中半減期を遅らせる薬剤は、2 型糖尿病の分子標的薬として上市されている。これらの事から、インクレチンシグナリングの制御がメタボリックシンドローム制御の1つの鍵と考えられている。

インクレチンである GLP-1 分泌に関わる受容体の1つに FFAR4 (free fatty acid receptor 4) がある。遊離脂肪酸受容体である FFAR4 は G タンパク質共役型受容体 (GPCR; g-protein coupled receptor) に属し、その生理的リガンドは主に長鎖脂肪酸とされている。FFAR4 は小腸内分泌 L 細胞に豊富に発現し、食品由来の脂肪酸と結合すると活性化され GLP-1 の分泌を誘導する。このシグナリングはマウスを用いた実験で抗糖尿病効果を持つ事が示されている。また、この受容体の機能不全がマウスやヒトにおいて肥満を誘導する事から、食事脂肪を感知し生体恒常性への関与が示されている。これらの事から、FFAR4 はインクレチンシグナリングに重要なタンパク質とされゲノム創薬のターゲットとして注目されている。これまでゲノム創薬のターゲットとして低分子合成リガンドを対象とした創薬研究が行われてきたが、脂肪酸以外の食品成分と FFAR4 に関する研究はほとんど存在しなかった。FFAR4 は小腸上皮に発現し様々な食品

由来分子に暴露されている。この事から、その食品成分の中に FFAR4 を介して GLP-1 の分泌を誘導する脂肪酸以外の成分があるのではないかと考えた。そこで私は、脂肪酸を除く日常的に摂取する食品成分の中に FFAR4/インクレチンシグナリングを制御する分子が存在する可能性を検証し、これによる抗メタボリックシンドローム作用という新しい作用機序を持つ食品機能の解明を試みた。

私は最初に、FFAR4 活性検出法の構築に着手した。食品成分が誘導する FFAR4 の弱い活性化も検出する為である。さらに、従来の検出法は感度と定量性のどちらも高いとは言えない。よって、食品成分が FFAR4/インクレチンシグナリングに影響を与えるのか検証するには、従来の方法よりも感度と定量性の高い活性検出法が必要となる。そこで私は FFAR4 の研究を行うに先立って、第2章 FFAR4 新規活性検出法の開発において、活性検出法の確立を行なった。ゲノム創薬のために開発されたリガンド未知 GPCR のリガンドスクリーニング法である TGF α shedding assay を FFAR4 に応用した。本法は、GPCR に共役する G タンパク質 G α_q , G $\alpha_{11/12/13}$ が細胞膜上に発現する TGF α 切断酵素 (TACE) を活性化させて起きる TGF α の切断を利用した方法である。アルカリフォスファターゼを融合させた TGF α (AP-TGF α) を細胞に発現させる。リガンドが FFAR4 を活性化させると TACE によって AP-TGF α が切断される。そして培地中に遊離した TGF α の量をアルカリフォスファターゼの活性として定量し、これを活性化の指標に GPCR の活性化を検出する。これが TGF α shedding assay である。第2章 FFAR4 新規活性検出法の開発で、私は TGF α の切断を指標とした活性検出法を FFAR4 に応用しアッセイ法を確立した。以後、FFAR4-TGF α shedding assay と称する。本アッセイ法は長鎖脂肪酸である ALA による FFAR4 の活性化を濃度依存的に簡便かつ高感度で検出した。また、確立したアッセイ系を用いて、FFAR4 選択的阻害剤である AH7614 の FFAR4 活性阻害能の評価を行い、FFAR4 活性化が阻害されるのを確認した。これらの事から、本アッセイ法が FFAR4 の活性阻害剤の探索にも有効である事が示された。これらの事から、FFAR4-TGF α shedding assay は感度と定量性に優れた活性検出法である事が示された。本法を用いて、FFAR4 の活性に影響を与える食品成分のスクリーニングを行なった。

FFAR4 の生理的リガンドは遊離脂肪酸である。FFAR4 が発現する小腸上皮は、消化吸収

前の多種多様な分子に暴露されている。雑多な食品分子の中で、私は遊離脂肪酸と構造が類似する食品成分が FFAR4 のリガンドになる可能性が高いと考えた。そこで私は、第3章 FFAR4 新規リガンドの探索において長鎖脂肪酸と構造的に類似した脂質や長鎖アルキルが FFAR4 活性化に影響を与えるのかを検討した。FFAR4 活性化の検出には、前章で確立した評価系である FFAR4-TGF α shedding assay を用いた。その結果、酵母の細胞膜に含まれるスフィンゴイド塩基の1つ phytosphingosine (PHS) の添加によって AP-TGF α が切断されることを確認した。加えて、PHS は小腸内分泌細胞上で GLP-1 の分泌を誘導する事も確認した。PHS は酵母の細胞膜に存在し、味噌などの発酵食品に豊富に含まれる。これらの事から、脂肪酸以外の食品分子が小腸内の FFAR4 を活性化させ、GLP-1 分泌を誘導する事が示された。

さらに私は脂肪酸と構造的に類似する脂質関連分子だけでなく、抗メタボリックシンドローム作用が報告されている食品成分の中にも FFAR4 を活性化させる分子があるのではないかと考えた。そこで私は世界中で好んで飲まれており、その機能性も報告されている茶成分に注目した。茶は世界中で好んで飲まれており、既に抗メタボリック症候群効果を持つ茶成分分子が報告されている。私は日常的に摂取される茶成分分子の中にも FFAR4 を活性化させる分子があるのではないかと考え、茶成分を対象に FFAR4-TGF α shedding assay を用いてリガンド探索した。その結果、微生物発酵茶成分の1つである teadenol A が FFAR4 を活性化させた。また、teadenol A は小腸内分泌細胞で GLP-1 の分泌を誘導する事も確認した。これらの結果から、teadenol A も PHS と同様に、FFAR4/インクレチンシグナリングを活性化させる事が明らかになった。以上の結果から、私はスフィンゴイド塩基の1つである PHS と微生物発酵茶成分である teadenol A は FFAR4 の新規リガンドである事を見出した。

FFAR4 は遊離脂肪酸受容体である。これまでの研究で、多くの FFAR4 天然リガンドはカルボキシル基を持ち、この部位が FFAR4 のリガンド認識に重要な役割を持っていると考えられてきた。これまで FFAR4 作動薬の開発を目指して合成アゴニストの探索も行われてきたが、その多くの分子はカルボキシル基を持っており、天然リガンドである脂肪酸と比較して高い結合力を持つ分子の開発には至っていない。しかし、私が見出した PHS はカルボキシル基を持たず、これまでとは異なる作用様式によって FFAR4 に結合する事が予測される。新たな結合/活性化様

式の解明は、これまでにない創薬概念や食品分子による活性調節機構の解明に繋がる可能性がある。そこで私は FFAR4 新規リガンド結合部位／活性様式の解明を目指した。第4章 FFAR4 ／リガンド間の結合部位の同定の研究で、PHS と代表的なリガンドである α -リノレン酸 (ALA) を用いてドッキングシミュレーションを行い FFAR4 の結合部位を予測した。さらに、予想結合部位のアミノ酸変異体を作製し FFAR4 新規リガンド結合部位に関する詳細な解析を行った。その結果、PHS が FFAR4 の 249 番目のグルタミン酸 (E249)、ALA が 264 番目のアルギニン (R264) と結合する事を見出した。この研究により、PHS がこれまで知られていたリガンドと全く異なる結合様式で FFAR4 を活性化させると明らかになった。この研究は、FFAR4 のリガンド特異性に新たな視点を加える事になり非常に興味深い。

FFAR4 の生理的なリガンドは遊離脂肪酸であると考えられてきたが、本研究で食品中に含まれる PHS や teadenol A がリガンドとなる事が初めて示された。本研究の特色は、抗メタボリックシンドロームに働くインクレチンシグナリングを非栄養性食品成分で活性化する事にある。インクレチンシグナリングは、過食や過剰なエネルギー蓄積を防ぐフィードバックシステムであり、これを非栄養性食品成分で活性化／活性制御する事により、生活習慣病の発病を未然に防ぐ食品や食生活の提唱に繋げる事が本研究の特徴である。これまでの受容体の活性様式の研究は、栄養食品成分であるリガンドと受容体の相互作用に関して詳細に行われてきた。しかし、消化管内分泌細胞はリガンドとなる食品分子以外にも消化吸收前の様々な分子に暴露される。これまであまり研究されてこなかった非栄養性食品成分がどの様に受容体の活性様式に影響を与えるのかを明らかにする視点も本研究の特徴と言える。