

共役リノール酸受容体の同定

井上 和彦

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 生体情報薬理学

〒890-8544 鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1

TEL: 099-275-5256 FAX: 099-265-8567

要旨

共役リノール酸 (conjugated linoleic acid: CLA) は多価不飽和脂肪酸の 1 種である。CLA にはがん細胞の増殖抑制や生活習慣病の予防・改善など、生体にとって有益な効果があることが報告されている。しかしながら CLA には多くの異性体が存在し、シグナル伝達機構もまだ完全には解明されていない。そのため、細胞や組織に対する CLA の作用に関して相反する報告がなされることも少なくない。そこで本研究では CLA のシグナル伝達機構を明らかにするため、新規 CLA 受容体の同定を試みた。

CLA 受容体の候補として、長鎖脂肪酸受容体 GPR120 に着目した。human GPR120 遺伝子の N 末端側に FLAG タグを挿入した細胞導入用ベクターを構築し、CHO-K1 細胞に導入した。この細胞に CLA を添加したところ、リン酸化 ERK1/2 の発現が増加した。しかしながら、ベクターのみを導入した細胞でも CLA の添加によってリン酸化 ERK1/2 の発現が増加したため、今回の結果から GPR120 が CLA 受容体であると結論づけることはできなかった。現在遺伝子を導入する細胞を再選定している。

1. 緒言

CLA はリノール酸と同様に炭素数が 18 で、分子内に二重結合を 2 個有する長鎖脂肪酸である (図 1)。しかしながら、CLA の二重結合が共役二重結合である点がリノール酸と異なる。

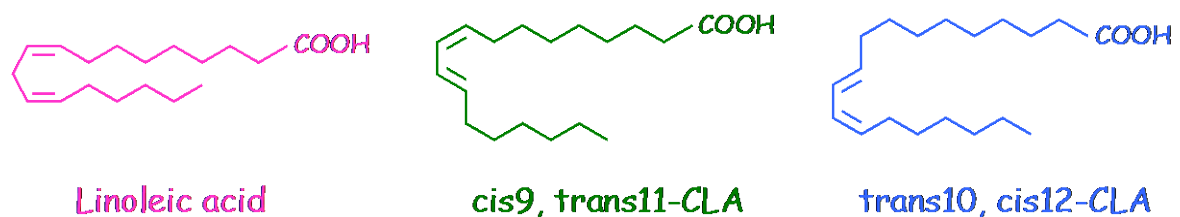


Fig.1 Chemical structure of linoleic acid and representative CLA

この共役二重結合の位置や幾何の違いにより、CLA には異性体が多数存在し、現在では 28 種類が確認されている。中でも 9cis, 11trans 型 (cis9, trans11-CLA) と 10trans, 12cis 型 (trans10, cis12-CLA) の 2 つが代表的な CLA として知られている。

CLA は牛などの反芻動物の胃に存在する嫌気性細菌が持つイソメラーゼによって、リノール酸から合成される。ヒトには CLA の生合成経路が存在しない。また、ヒトは CLA を合成する嫌気性細菌を持っていないので、CLA の機能性を得るためには肉や乳製品を摂取するのが最も確実な方法である。なお、最近では CLA のサプリメントも販売されるようになった。

CLA の生理機能に関しては多くの報告がある。体重減少、心血管疾患やがんの予防、免疫応答の改善、抗炎症作用などがヒトの細胞や実験動物レベルで、また疫学調査によって証明された¹⁾。しかしながら同じ内容の実験をしても実施者によって結果が相反するケースや、マウスで効果が確認できてヒトでは効果が現れないなど、動物種によって反応性が異なるケース²⁾も報告され、確固たる結論は出ていない。

この CLA を取り巻く複雑な状況をクリアにするために、CLA のシグナル伝達経路、特に CLA 受容体に着目した。これまでに CLA 受容体の候補とし核内受容体 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ が知られている³⁾。しかし、CLA の生理作用全てが PPAR γ を介しているわけではない。最近になり、G タンパク質共役型受容体 GPR40 が新たな CLA 受容体として報告された⁴⁾。これにより、CLA が核内受容体と細胞膜に存在する受容体の 2 種類を介して作用することが判明し、CLA の生理作用の全容解明に向けて大きく前進した。一方、GPR40 は元々リノール酸など長鎖脂肪酸の受容体として同定されたが⁵⁾、長鎖脂肪酸受容体にはもう 1 つ、G タンパク質共役型受容体 GPR120 も同定されている⁶⁾。そこで、本研究では新たな CLA 受容体として GPR120 に焦点を絞り、CLA による GPR120 の活性化について検討した。

2. 実験

2.1 human GPR120 遺伝子のクローニング

ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞株 A549 から RNA を抽出し、逆転写反応を行って cDNA を調整した。これを鋳型にして、PCR によって human GPR120 遺伝子の coding sequence を含む部分を増幅した。なお、PCR 産物に Kozak 配列と FLAG タグが組み込まれるように forward primer を設計した。アガロースゲル電気泳動後、予想サイズのバンドを切り出し、PCR 産物を精製した。その後 TA クローニングによって、pTAC-1 ベクターに PCR 産物を組み込んだ。

制限酵素反応によって必要部分を切断して精製し、pcDNA3.1(+)ベクターに組み込んだ。その後、配列をシーケンサーで確認した。

2.2 CHO-K1 細胞への遺伝子導入

2.1 で作製した human GPR120 遺伝子を含むベクターと、空の pcDNA3.1(+)ベクターをそれぞれ FuGENE® 6 を用いて CHO-K1 細胞に導入し、human GPR120-CHO および mock-CHO をそれぞれ作製した。

2.3 導入した遺伝子の発現解析

2.2 で作製した human GPR120-CHO において、導入した遺伝子が正しく発現していることを確認するために、anti-FLAG 抗体による蛍光免疫染色を実施した。

2.4 GPR120 の活性評価

GPR120 に長鎖脂肪酸が結合すると、リン酸化 ERK1/2 の発現量が増加する⁷⁾。すなわち、GPR120 の活性はリン酸化 ERK1/2 の発現量を指標にして評価できる。2.2 で作製した human GPR120-CHO に CLA やその他の GPR120 のリガンドを添加し、リン酸化 ERK1/2 の発現量を western blotting で評価した。

3. 結果

3.1 蛍光免疫染色による FLAG の検出 (図 2)

図 2 に示すように、anti-FLAG 抗体を用いた免疫染色を行うと、human GPR120-CHO の細胞膜で陽性染色像が得られた。一方、mock-CHO の細胞膜は染まらなかった。また、negative control として control IgG を使った場合、両者ともに陽性染色像は得られなかった。この結果、human GPR120-CHO で目的遺伝子が細胞膜に特異的に高発現していることが確認できた。なお、細胞を蛍光顕微鏡下で視認しやすくするため、DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) による核染色を実施した。

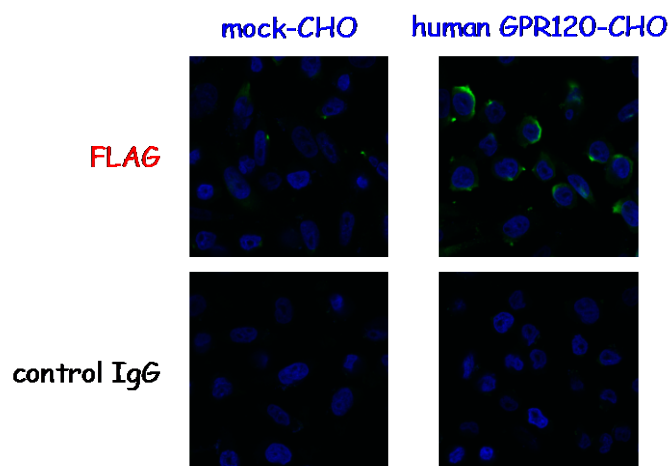


Fig.2 The expression of FLAG in transfected cells

3.2 western blotting によるリン酸化 ERK1/2 の発現 (図 3)

human GPR120-CHO および mock-CHO に positive control として GPR120 の合成リガンド GW9508、リノール酸、2 種類の CLA (cis9, trans11-CLA、trans10, cis12-CLA) をそれぞれ 10、100 μ M になるように添加し (GW9508 は 10 μ M のみ)、5 分間反応させた。その後細胞を回収してタンパク質を抽出した。タンパク質の濃度を測定し、10 μ g 分を用いて SDS-PAGE を行った。PVDF メンブレンへタンパク質を転写し、anti-phospho-ERK1/2 抗体および anti-ERK1/2 抗体でそれぞれ western blotting を実施した。

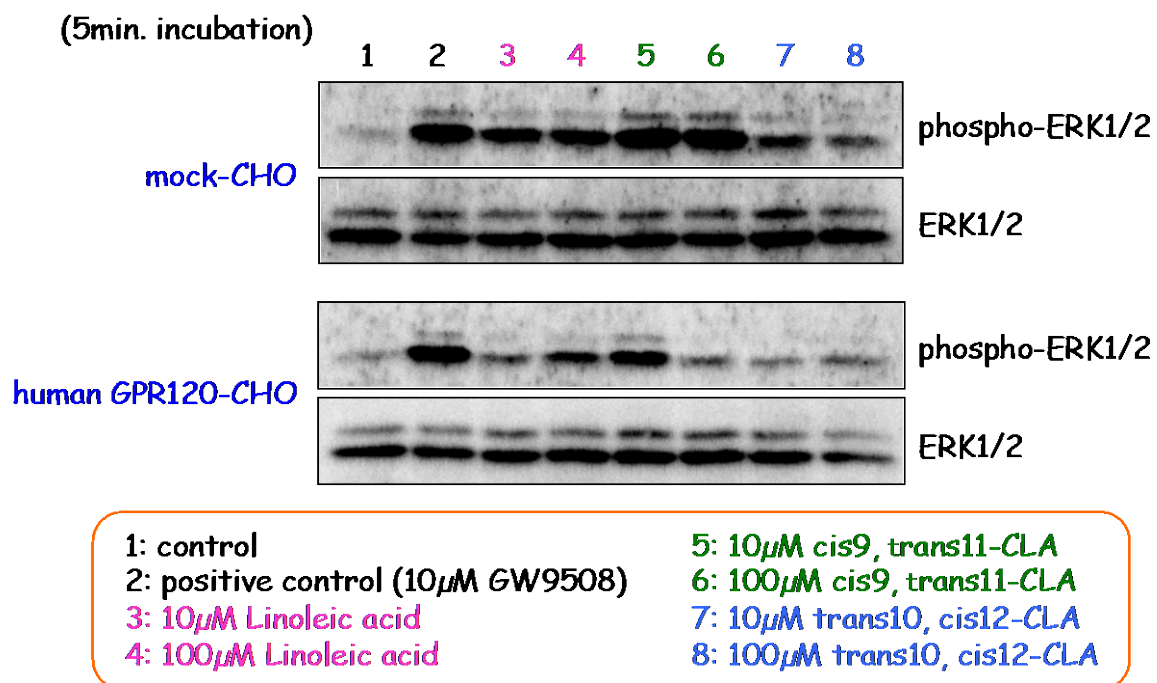


Fig.3 The expression of phosphorylated ERK1/2 in transfected cells

human GPR120-CHO において、positive control の GW9508 でリン酸化 ERK1/2 の発現量が増加した。また GPR120 のリガンドであるリノール酸でも、濃度依存的なリン酸化 ERK1/2 の発現量が増加した。cis9, trans11-CLA でもリン酸化 ERK1/2 の発現量が増加したが、リノール酸とは異なり濃度と発現量は反比例していた。一方、trans10, cis12-CLA ではリン酸化 ERK1/2 の発現量は control と同程度で、濃度の違いによる変化も見られなかった。

図 2 が示すように、mock-CHO では human GPR120 は発現していない。そのため、CLA をはじめとする添加物質ではリン酸化 ERK1/2 の発現量は変化しないと予想された。しかしながら、GW9508、リノール酸、cis9, trans11-CLA、trans10, cis12-CLA の全てで control よりもリン酸化 ERK1/2 の発現量が増加していた。したがって、human GPR120-CHO の western blotting の結果は、human GPR120 の高発現による影響ではない可能性が高い。

4. 考察

GPR120 は主に肺や腸管で高発現している⁶⁾。そのため、human GPR120 クローニングに肺の細胞株 A549 由来の cDNA を用いた。クローニングは計画通りに進んだ。また、遺伝子導入でも特に問題は認められず、人為的に組み込んだ FLAG タグも機能しており、蛍光免疫染色で細胞膜特異的な陽性染色像が得られた。

しかしながら、GPR120 の活性評価で期待した結果が得られなかった。mock-CHO で CLA や GPR120 リガンドによって ERK1/2 の発現量が増加した原因として、CHO-K1 細胞に内因性の長鎖脂肪酸受容体が発現していた可能性が考えられる。CHO-K1 細胞はチャイニーズハムスターの細胞なので、チャイニーズハムスターの GPR120、もしくは先述した PPAR γ や GPR40、あるいは未知の長鎖脂肪酸受容体が CHO-K1 に発現しており、CLA や GPR120 リガンドがそれらに結合した結果、mock-CHO でリン酸化 ERK1/2 の発現量が増加したと考えられる。CHO-K1 細胞は遺伝子の導入に汎用されているが、少なくとも内因性の GPR120 が発現していないこと、さらに GW9508 やリノール酸などでリン酸化 ERK1/2 の発現量が増加しないことを確認すべきであった。現在、CHO-K1 以外の細胞 (293 や COS-7 など) で、上述した事項の確認を急いでいる。

6. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究費の援助をしていただいた公益財団法人サンケイ科学振興財団に深く感謝致します。

7. 引用文献

- 1) Dilzer A, et al. Implication of conjugated linoleic acid (CLA) in human health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 52(6):488-513, 2012
- 2) Plourde M, et al. Conjugated linoleic acids: why the discrepancy between animal and human studies? *Nutr Rev.* 66(7):415-421, 2008
- 3) Houseknecht KL, et al. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 244(3):678-682, 1998
- 4) Schmidt J, et al. Conjugated linoleic acids mediate insulin release through islet G protein-coupled receptor FFA1/GPR40. *J Biol Chem.* 286(14):11890-11894, 2011
- 5) Itoh Y, et al. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature.* 422(6928):173-176, 2003

- 6) Hirasawa A, et al. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med.* 11(1):90-94, 2005
- 7) Katsuma S, et al. Free fatty acids inhibit serum deprivation-induced apoptosis through GPR120 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *J Biol Chem.* 280(20):19507-19515, 2005

Is GPR120 a receptor of conjugated linoleic acids?

Kazuhiko Inoue

Department of Pharmacology, Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Kagoshima University
8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima City, Kagoshima, JAPAN
TEL: +81-99-275-5256 FAX: +81-99-265-8567

Conjugated linoleic acids (CLA) are a family of polyunsaturated fatty acids (PUFA). CLA is produced by anaerobic bacteria which convert linoleic acids into CLA. These anaerobic bacteria exist in the stomach of ruminant, therefore we can mainly take CLA from meat and dairy products.

CLA may have beneficial effects against several diseases including colitis, atherosclerosis, diabetes, rheumatoid arthritis, obesity, carcinogenesis, and so on. However, precise mechanisms have not been clarified yet. In order to elucidate the physiological functions of CLA, we tried to identify novel CLA receptors. G protein-coupled receptor GPR40 and GPR120 are identified as long-chain free fatty acid receptors. Although GPR40 has already reported to be a receptor of CLA, GPR120 has not. So we examined whether GPR120 was a receptor of CLA.

When transfected FLAG-tagged GPR120 into CHO-K1, fluorescent immunohistochemistry revealed that FLAG-tagged GPR120 localized to cell membranes. After 5 minutes incubation of CLA, the expression of phosphorylated ERK1/2 was increased in FLAG-tagged GPR120 transfected cells. However this was also seen in cells transfected empty vectors only. So we are trying to examine by using another cell lines that do not express endogenous GPR120 and show low reactivity to GPR120 ligands.