

令和 2 年 4 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2015～2019

課題番号：15H05781

研究課題名(和文) 摂食シグナル胆汁酸の分子栄養学的機能解析と食品成分による摂食応答制御

研究課題名(英文) Analysis on molecular nutritional functions of bile acids as a feeding signal, and regulation of metabolic response to feeding by food factors

研究代表者

佐藤 隆一郎 (Sato, Ryuichiro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：50187259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 150,700,000円

研究成果の概要(和文)：胆汁酸は摂食に伴い小腸上部へと分泌されたのちに、小腸下部で取り込まれ肝臓へ戻る。一部の胆汁酸は全身血流へ流れるため、摂食後に血中胆汁酸濃度は上昇し、摂食シグナルと考えられる。これを認識する標的分子が胆汁酸受容体TGR5である。骨格筋での機能解析のために、ヒトTGR5を骨格筋に発現させたトランスジェニックマウスを樹立し、その解析を行った。胆汁酸結合によりTGR5が活性化されると、筋肥大効果をもたらすことを認めた。経口グルコース負荷試験を行うと、速やかな血糖低下が確認され、筋量増加が耐糖能異常改善に結び付くことを明らかにした。摂食応答に伴う筋量増加の一部はTGR5機能によるものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちの体の中でコレステロールは胆汁酸へと変換され、やがて糞中へと排泄される。血液中にも存在する胆汁酸は、摂食後に濃度が上昇する。私たちは血中胆汁酸を摂食シグナルと想定し、胆汁酸受容体TGR5の機能解析を行った。その結果、骨格筋にTGR5を過剰に発現させたマウスの筋量は増加し、欠損させたマウスでは減少する事実を確認した。摂食後に筋量が増加することの一部をTGR5-胆汁酸が担っていることを明らかにした。さらに運動直後にも同様のシステムが働くことも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Bile acids are secreted into the upper small intestine upon ingestion, and then taken up in the lower small intestine and returned to the liver. Since a portion of bile acids flow into the systemic bloodstream, the bile acid concentration in the blood increases after eating, which is considered to be a feeding signal. The target molecule that recognizes this is the bile acid receptor TGR5. For functional analysis in skeletal muscle, transgenic mice expressing human TGR5 in skeletal muscle were established and analyzed. It was found that activation of TGR5 by bile acid resulted in a muscle hypertrophy effect. When an oral glucose tolerance test was performed, a rapid decrease in blood glucose was confirmed, and it was clarified that an increase in muscle mass leads to an improvement in glucose intolerance. Part of the increase in muscle mass associated with the feeding response may be due to TGR5 function.

研究分野：食品科学

キーワード：胆汁酸 TGR5 運動 骨格筋 糖代謝

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

コレステロールの異化産物である胆汁酸は、長い間その生理機能が不明であった。21 世に入り、胆汁酸を結合して活性化される核内受容体 FXR が明らかにされ、胆汁酸代謝、糖代謝に関与する遺伝子の発現を制御する生理活性分子として認識されるようになった。それでも FXR は限られた組織に発現しており、血液中を介して全身を巡る胆汁酸の機能は不明であった。その中に、細胞表面の G タンパク質共役受容体の一つである TGR5 が結合受容体であることが明らかにされた。TGR5 は全身の組織に発現しており、小腸・大腸の L 細胞においては胆汁酸を結合するとインクレチン・GLP-1 分泌を促し、インスリン分泌を促進することが明らかにされた。同時に、褐色脂肪、骨格筋においては熱産生を上昇させ、抗肥満効果を引き起こすことが示された。胆汁酸は唯一の生成臓器である肝臓で生成されると、一旦胆のうに貯留され、摂食刺激により胆のうが収縮すると、小腸上部へと分泌される。その後その 95% 程度が小腸下部より取り込まれ肝臓へと戻る、いわゆる腸肝循環を繰り返す。この過程で一部の胆汁酸は全身血流へと流入し、その結果、摂食直後に血中胆汁酸濃度は上昇する。代表者らは、この胆汁酸濃度上昇は全身にエネルギー源、栄養素が流入することを知らせる「摂食シグナル」であると想定した。摂食行動に対する生体側の短時間の応答システムを理解するために、胆汁酸の生理機能をさらに解析する事を試みることにした。

2. 研究の目的

(1) 骨格筋における胆汁酸受容体 TGR5 の新たな機能解析

超高齢社会を迎える日本において、健康寿命の延伸が重要視されている。自立した身体機能を維持して健康寿命を延伸させるためには、骨格筋機能、筋量の維持が不可欠である。TGR5 と同じ G タンパク質共役受容体である β_2 アドレナリン受容体は、骨格筋に発現し、その合成リガンドであるクレンプテロールは、動物実験、ヒト試験のいずれでも筋量を増強することが示されている。TGR5 も β_2 アドレナリン受容体もリガンドを結合すると、細胞内の cAMP を上昇させる。この事実から、TGR5 は骨格筋量を制御する標的として機能していることが想定され、この仮説を証明することを目的とする。

(2) 骨格筋における TGR5 発現の制御機構の解明

骨格筋において細胞内 cAMP 濃度を上昇させることが筋量増加を導くことが想定される。リガンドの増加のみならず、受容体の数を増やすことにより、より強いシグナルを骨格筋に送ることは筋量増加に貢献することが予想される。TGR5 について、どのような生理的変動等で遺伝子発現が上昇するかを調べ、その分子機構を明らかにする。筋量増加のための新たな標的として、TGR5 発現を上昇させることが期待される。

(3) TGR5 アゴニスト活性を有する柑橘成分ノミリンの TGR5 結合様式解析と筋量増強効果

代表者らはすでにヒト TGR5 を活性化するアゴニスト活性を有した食品成分を見出すことに成功している。柑橘成分ノミリンはリモノイドの 1 種のトリテルペン類であり、TGR5 との結合は胆汁酸と異なることが予想される。ドッキングシミュレーション法と結合が想定されるアミノ酸に変異を入れた変異受容体を用いて、その結合様式の解析を試みる。同時に、ノミリンを含む食餌を与えたマウスにおいて骨格筋量が上昇するかについて検証実験を行う。

(4) 肝臓胆汁酸輸送体 NTCP の輸送活性を抑制する食品成分の探索

胆汁酸-TGR5 シグナルを促進することが代謝改善、骨格筋量を増大させる効果を発揮する。そこで血中胆汁酸濃度を上昇させることを目的に、肝臓への胆汁酸取り込みを担う輸送体 NTCP の輸送活性を測定する評価系を構築し、約 350 種類の食品成分ライブラリーから輸送活性を抑制する成分を見出す。

(5) 胆汁酸合成の上流を制御する転写因子 SREBP の活性化機構解析

胆汁酸の機能を解析するうえで、その上流に位置するコレステロール合成の調節機構の詳細を明らかにすることは不可欠である。SREBP の活性化に直接関与する結合タンパク質である SCAP についてその機能調節について細胞生物学的解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 骨格筋における胆汁酸受容体 TGR5 の新たな機能解析

マウス・クレアチンキナーゼ・プロモーターの下流にヒト TGR5 遺伝子を挿入したプラスミドを構築し、骨格筋にヒト TGR5 を発現するマウス(hTGR5 マウス)を樹立した。一方、全身で TGR5 欠損したマウス(TGR5^{-/-})を Merck 社より恵みいただいた。通常食で雄(hTGR5 マウス、TGR5^{-/-}マウス)を飼育し、8 週齢で解剖し、体重、各種骨格筋重量について測定を行った。骨格筋での各種遺伝子発現量を定量 PCR 法にて定量した。骨格筋切片を用い、筋繊維サイズを 2 種類のマウス間で比較した。さらに、最長 21 か月齢まで野生型ならびに hTGR5 マウスを飼育し、3 か月ごとに筋力の測定をした。

(2) 骨格筋における TGR5 発現の制御機構の解明

マウス筋芽細胞 C2C12 を各種薬物を含む培地で培養し、内因性の TGR5 mRNA が上昇する薬物を探索する。初期知見から、運動による効果が期待されたことより、運動負荷時の発現上昇を解析する。マウスをトレッドミルで走行運動を負荷し、骨格筋を採取し、TGR5 遺伝子発現を定量 PCR 法、ウエスタンブロット法により定量、測定する。さらにマウス TGR5 遺伝子の転写開始点から上流域をクローニングし、luciferase 遺伝子に連結したレポータープラスミドを構築

した。このレポータープラスミドを用いて、転写に必要な領域を狭め、さらに配列に変異を入れて、転写調節に必須な塩基応答配列を明らかにする。

(3) TGR5 アゴニスト活性を有する柑橘成分ノミリンの TGR5 結合様式解析と筋量増強効果

代表者はすでにヒト TGR5 アゴニストとして柑橘成分ノミリンを見出している。ノミリンの代謝変換体のオバキュノンを含む餌を肥満を呈する KK-Ay マウスに投与し、抗肥満、骨格筋増加効果について解析する。さらにドッキングシミュレーションにより、ヒト TGR5 とノミリンとの結合を解析する。その予想に基づき、複数のアミノ酸をそれぞれ Ala 残基に置換し、ノミリンのアゴニスト活性が消失するアミノ酸を同定する。

(4) 肝臓胆汁酸輸送体 NTCP の輸送活性を抑制する食品成分の探索

ヒト NTCP 遺伝子発現プラスミドを構築し、HEK293 細胞に遺伝子導入し、抱合型胆汁酸を細胞内に取り込む細胞を用意する。細胞内に取り込んだ胆汁酸が FXR に結合し、活性化した FXR が luciferase 遺伝子発現を上昇させるレポーターアッセイ系を樹立する。このアッセイ系により、数百の化合物の探索を容易にする。同時に、放射性ラベルされた抱合型胆汁酸の取り込みを定量する細胞システムも構築する。餌に候補食品成分を添加し、マウスに投与し、血中胆汁酸の上昇を確認する。TGR5 下流に位置する遺伝子群の発現変動、骨格筋量の変動を測定する。

(5) 胆汁酸合成の上流を制御する転写因子 SREBP の活性化機構解析

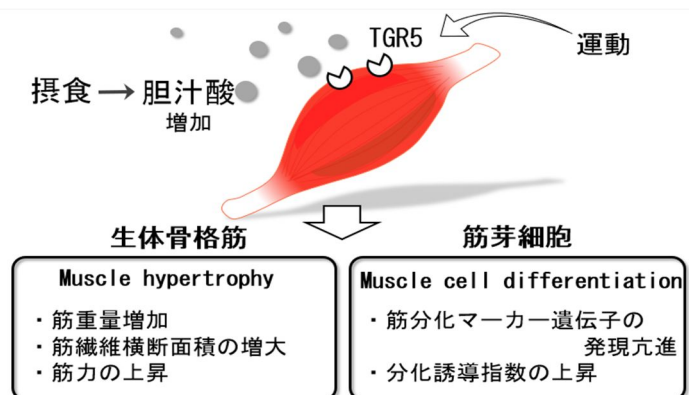
SREBP の結合タンパク質である SCAP は複合体を形成し、小胞体からゴルジへの細胞内輸送を制御する。SCAP の新たな結合タンパク質を見出す目的で、SREBP と直接結合する SCAP の C 末端領域の WD40 repeat domain を細胞に過剰発現させ、結合するタンパク質を免疫沈降法にて回収し、質量分析法にてタンパク質の同定を行う。また、SCAP は比較的早い半減期で分解することを見出したことから、SCAP を特異的にユビキチン化する E3 ligase を見出す解析を進める。

4. 研究の成果

全身性の TGR5^{-/-} マウスは野生型マウスに比較して、体重に差はないものの、腓腹筋、大腿四頭筋等の筋量が有意に低下していた。一方、骨格筋に TGR5 を発現させた hTGR5 マウスの体重は有意に上昇しており、体重当たりの骨格筋量も同腹仔の野生型マウスに比べて有意に増加していた。骨格筋切片を用いて筋繊維断面積を測定したところ、hTGR5 マウスで有意に上昇していた。さらに骨格筋での各種遺伝子発現を解析したところ、筋細胞分化に関与する遺伝子、筋量を増加させる機能を有する複数の遺伝子(NR4a1, PGC-1a4)の発現が hTGR5 マウスで有意に上昇していた。培養筋管細胞 C2C12 に hTGR5 を過剰発現させ、そのリガンドである胆汁酸を培地に添加すると、hTGR5 マウス骨格筋で認められた遺伝子と同様の遺伝子の発現上昇が確認された。以上の結果より、骨格筋 TGR5 は筋量上昇作用を発揮する機能を持つことが示された。

野生型マウスと hTGR5 マウスを 21 か月齢まで飼育し、3 か月ごとに筋力測定を行った。その結果、いずれのマウスも 9 か月齢で筋力が最大値を示し、その後加齢とともに減少した。どの時点をとっても、hTGR5 マウスの筋力は野生型のそれより有意に増加していた。筋量増加が筋力上昇に結びついたことが示唆された。

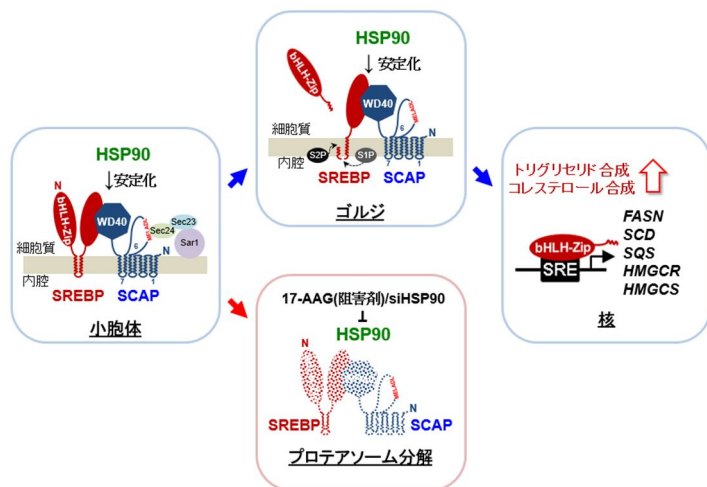
培養筋管細胞 C2C12 を各種薬剤を含む培地で培養し、TGR5 遺伝子発現変動を解析した結果、小胞体ストレス誘導剤(Tunicamycin, Thapsigargin)で有意に上昇することを認めた。そこでマウス TGR5 遺伝子の転写開始点上流 1600bp を含むレポーターを用いた luciferase assay を行った。その結果、Tunicamycin 処理で luciferase 活性が有意に上昇することを確認した。小胞体ストレスに応じて活性化される ATF6 を発現させプロモーター活性を上昇させるか調べると、ATF6 依存的に活性の上昇が認められた。転写開始点上流領域の塩基配列を調べると ATF6 応答配列が検出された。そこでこの領域の複数個所に変異を入れたレポーターを作成すると、転写調節にこの応答配列が必須であることが示された。同時に野生型マウスの骨格筋に Thapsigargin を筋注し TGR5 発現を測定したところ、mRNA、タンパク質のいずれも発現量が有意に上昇することを確認した。一過的な運動負荷は骨格筋に小胞体ストレスを起こすことから、マウスをトレッドミルで中程度の負荷の運動を行わせた。その結果、TGR5 遺伝子発現の有意な上昇が認められた。さらに野生型と ATF6^{-/-} マウスに同様な条件で運動負荷をかけると、野生型でのみ TGR5 遺伝子発現が上昇した。以上の知見より、骨格筋の胆汁酸受容体 TGR5 は運動負荷に応じて発現が上昇すること、この応答反応は運動負荷により筋量が増大することの一部を説明するものであることが示唆された(右図参照論文)



ノミリンの代謝変換体のオバキュノンを含む餌を肥満を呈する KK-Ay マウスに投与し、抗肥満、骨格筋増加効果について解析した。その結果、抗肥満、代謝改善効果、さらに筋量増加効果が認められた。さらにドッキングシミュレーションにより、ヒト TGR5 とノミリンとの結合を解析した。その予想に基づき複数のアミノ酸をそれぞれ Ala 残基に置換し、ノミリンのアゴニスト活性が消失するアミノ酸を同定した。ノミリンはヒト TGR5 に比較してマウス TGR5 の活性化能が低いことを見出した。ヒトとマウスで保存されていない 3 か所のアミノ酸をヒト型に変異させるとマウス TGR5 はヒト型と同等の応答性を示し、この 3 か所のアミノ酸を介して結合することが明らかになった。TGR5 は膜貫通領域のポケットに胆汁酸を取り込み結合することが予想されているが、ノミリンはそのポケットに分子の一部を突き入れ、残りの部分は細胞膜外に突き出す形で、TGR5 の膜外領域に含まれる 2 アミノ酸残基(Gln と Arg)と結合することが明らかになった。つまり、内因性のリガンド胆汁酸と食品成分ノミリンの TGR5 結合様式は異なることが判明した(論文)。

肝臓へ抱合型胆汁酸を輸送する輸送体 NTCP の輸送活性を低下させる食品成分を探索した結果、フラボノイド成分のフィセチンを見出した。フィセチンを結合させたレジンを作成し、NTCP との結合を調べた結果、吸着レジンに結合されることが見出された。また培養細胞に NTCP を発現させ、培地にフィセチンを添加すると、フィセチンを結合した NTCP は早い半減期で分解されることも明らかになった。以上の 2 通りの作用で肝臓への胆汁酸取り込みをフィセチンは抑制し、全身血流の胆汁酸濃度を上昇させることが推察された。複数の発表論文から血中胆汁酸濃度の上昇は代謝改善との効果を有することから、NTCP 輸送活性を抑制する食品成分には同様の効果が期待できる。

SREBP の結合タンパク質である SCAP の新たな結合タンパク質を見出す目的で、SREBP と直接結合する SCAP の C 末端領域の WD40 repeat domain を細胞に過剰発現させ、結合するタンパク質を免疫沈降法にて回収し、質量分析法にてタンパク質の同定を試みたところ、Hsp90 を見出した。Hsp90 は培養細胞で十分量発現しており、抗体で免疫沈降をすると SCAP、SREBP の共沈することが確認された。Hsp90 発現を siRNA で抑制した時、もしくは Hsp90 阻害剤で細胞を培養すると、SCAP、SREBP のいずれもが早い分解を受けることが明らかになり、Hsp90 は SREBP/SCAP 複合体と結合して、それらを安定化することが判明した。細胞分画実験の結果、Hsp90 は SREBP/SCAP 複合体と結合した状態で、小胞体からゴルジ装置まで輸送されることが明らかになった。さらにマウスに Hsp90 阻害剤を投与すると、肝臓において SREBP の活性化は抑制され、その結果、脂肪酸合成、コレステロール合成関連遺伝子発現はいずれも減少した。以上、Hsp90 は SREBP/SCAP 複合体を安定化させ、脂質合成を正に制御することを明らかにした(右図参照論文)。



さらに SCAP のポリユビキチン化酵素を探索する発展研究において、E3 ligase の RNF5 を見出した。SCAP の 305 番目の Lys 残基が K29 を介したポリユビキチン化され、その結果、SCAP は分解されることなく、むしろ SREBP/SCAP 複合体の小胞体からゴルジへの輸送を促進する構造を保持することを明らかにした。ポリユビキチン化による新たなタイプのタンパク質修飾として提示することに成功した(論文)。

<参考文献>

Sasaki T, Kuboyama A, Mita M, Murata S, Shimizu M, Inoue J, Mori K, Sato R. (2018) The exercise-inducible bile acid receptor Tgr5 improves skeletal muscle function in mice. *J. Biol. Chem.* 293, 10322-10332.

Sasaki, T., Mita, M., Ikari, N., Kuboyama, A., Hashimoto, S., Kaneko, T., Ishiguro, M., Shimizu, M., Inoue, J., and Sato, R. (2017) Identification of key amino acid residues in the hTGR5-nomilin interaction and construction of its binding model. *PLoS ONE* 12, e0179226.

Kuan, Y-C., Hashidume, T., Shibata, T., Uchida, K., Shimizu, M., Inoue, J., and Sato, R. (2017) Heat Shock Protein 90 Modulates Lipid Homeostasis by Regulating the Stability and Function of Sterol Regulatory Element-Binding Protein (SREBP) and SREBP Cleavage-Activating Protein. *J. Biol. Chem.* 292, 3106-3028.

Kuan YC, Takahashi Y, Maruyama T, Shimizu M, Yamauchi Y, Sato R. (2020) Ring finger protein 5 activates sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2) to promote cholesterol biosynthesis via inducing polyubiquitination of SREBP chaperone SCAP. *J. Biol. Chem.* 295, 3918-3928.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kuan YC, Takahashi Y, Maruyama T, Shimizu M, Yamauchi Y, Sato R	4. 巻 295
2. 論文標題 Ring finger protein 5 activates sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2) to promote cholesterol biosynthesis via inducing polyubiquitination of SREBP chaperone SCAP	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 3918-3928
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.011849	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki T, Kuboyama A, Mita M, Murata S, Shimizu M, Inoue J, Mori K, Sato R.	4. 巻 293
2. 論文標題 The exercise-inducible bile acid receptor Tgr5 improves skeletal muscle function in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 10322-10332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.002733	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuan, YC., Hashidume, T., Shibata, T., Uchida, K., Shimizu, M., Inoue, J., and *Sato, R.	4. 巻 292
2. 論文標題 Protein 90 Modulates Lipid Homeostasis by Regulating the Stability and Function of Sterol Regulatory Element-Binding Protein (SREBP) and SREBP Cleavage-Activating Protein.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 3016-3028
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M116.767277	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計29件（うち招待講演 16件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 佐藤隆一郎
2. 発表標題 コレステロール異化産物胆汁酸の新規機能と胆汁酸受容体TGR5
3. 学会等名 2020年度日本農芸化学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤隆一郎
2. 発表標題 Food factors regulate muscle mass
3. 学会等名 2019 International Conference on Functional Food for Metabolic Disorder and Aging (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤隆一郎
2. 発表標題 骨格筋機能と食品成分
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤隆一郎
2. 発表標題 摂食シグナル胆汁酸を感知する受容体 TGR5 による骨格筋機能維持機構
3. 学会等名 日本サルコペニア・フレイル学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤隆一郎
2. 発表標題 Function of a bile acid receptor TGR5 in skeletal muscle
3. 学会等名 2017 The Korean Nutrition Society 50th ANNIVERSARY INTERNATIONAL CONFERENCE (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計5件

1. 著者名 佐藤隆一郎	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 5
3. 書名 臨床栄養	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学・大学院農学生命科学研究科・応用生命化学専攻・食品生化学研究室 http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/food-biochem/index.html 東京大学・大学院農学生命科学研究科・応用生命化学専攻・社会連携講座「栄養・生命科学」 http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/nls/index.html</p>
--

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
研究分担者	及川 彰 (Oikawa Akira) (50442934)	山形大学・農学部・准教授 (11501)	
研究分担者	柴田 貴広 (Shibata Takahiro) (80447838)	名古屋大学・生命農学研究科・准教授 (13901)	