

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15047

研究課題名(和文) 化学感覚受容体を標的とした常在性腸内細菌叢の産生する生理活性代謝産物の探索

研究課題名(英文) Screening for gut microbiota-derived metabolites that activate bitter taste receptors

研究代表者

森田 啓行 (Morita, Hiroyuki)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60323573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究は、ヒト苦味受容体(Gタンパク質共役型受容体ファミリーに属する分子群：25種類存在し味蕾だけでなく腸管上皮細胞にも発現する)を活性化する新規生理活性腸内細菌叢由来低分子代謝産物の同定を目指すものである。今回、苦味受容体の一つであるT2R16とそのリガンドであるSalicinをモデル系として用い、HEK293T細胞にT2R16、キメラGタンパク質G16/gust44、NFAT-Luciferaseレポーターを一過性に発現しSalicinで刺激したところGタンパク質依存性シグナルを検出できた。今後はこのアッセイ系を他の苦味受容体にも応用しスクリーニングを進めていく。

研究成果の概要(英文)：This study is being conducted to identify gut microbiota-derived metabolites that activate bitter taste receptors expressed in host intestinal epithelium. Utilizing the salicin-T2R16 axis as a model, we first established a novel assay system for this purpose. HEK293T cells transiently transfected with T2R16, G16/gust44 and NFAT-luciferase reporter were stimulated with salicin. Dose-dependent activation of NFAT-reporter was successfully observed, suggesting that this assay system can be applied to other bitter taste receptors. The actual metabolite screening using this assay is currently in progress.

研究分野：内科学、ゲノム医学、分子生物学

キーワード：苦味受容体 Gタンパク質共役型受容体 常在性腸内細菌叢 低分子代謝産物

1. 研究開始当初の背景

味蕾に発現する味覚の化学感覚受容体群として G タンパク質共役型受容体 (GPCR) ファミリーに属する甘味受容体 (T1R)、苦味受容体 (T2R) が知られている。近年、これらの受容体分子が消化管上皮にも発現し、新たな生理機能を持つことが明らかとなった。例えば、胃上皮に存在する甘味受容体 T1R2/T1R3 ヘテロダイマーが甘味を感知すると、摂食促進ホルモンであるグレリンが分泌され、求心性の摂食行動が促進される。また、小腸上皮 L 型内分泌細胞に発現する T1R2/T1R3 は、甘味を感知して GLP-1 分泌を引き起こす。分泌された GLP-1 は膵β細胞からのインシュリン分泌を促進し、血糖の恒常性維持に働く。このように腸管における甘味受容体の作用は解明されつつあるが、腸管における苦味受容体の生理作用については未だにほとんど報告がない。

2. 研究の目的

腸内細菌が多数の代謝酵素群を発現することが近年の腸内細菌叢のメタゲノム解析により明らかとなった。それら代謝酵素群は多彩な代謝産物を産生することで宿主の生理機能に影響を及ぼす。実際、短鎖脂肪酸は、腸内細菌の主要な代謝産物の一つであり、腸管内で短鎖脂肪酸受容体である GPR41 及び GPR43 (これらの受容体も GPCR である) を介して生体内エネルギー調節に寄与している。そこで、本申請研究では、“外来性の低分子化学物質を認識する苦味受容体が、腸内細菌叢の産生する代謝産物の受容体としても機能する”との作業仮説の元、健康者から抽出した糞便由来の低分子代謝産物画分を全てのヒト苦味受容体 (25 種類) に対して網羅的かつ系統的にスクリーニングすることで、新規リガンド (代謝産物) - 苦味受容体ペアの同定を目指す。

3. 研究の方法

以下のような手順でヒト糞便由来の低分子代謝産物をスクリーニングし、苦味受容体に対する新規リガンドの同定を目指す。リガンド-受容体ペアが同定された場合にはその生理機能の解明を目指す。

苦味受容体の活性化状態をモニターするアッセイ系の構築。

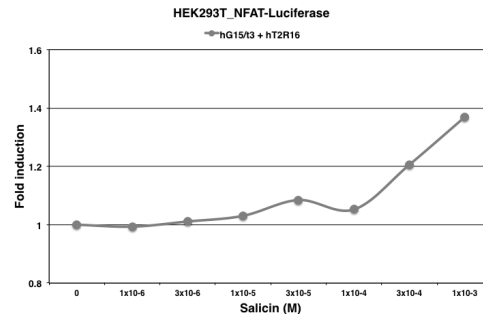
様々な被験者糞便から抽出した低分子化学物質画分のライブラリー化。

ライブラリー化した低分子化学物質画分を苦味受容体に対する活性を指標にスクリーニング。

4. 研究成果

苦味受容体は GPCR であるため、その活性化

状態は G タンパク質依存性シグナルを測定する方法もしくは、リガンド刺激依存的な受容体とベータアレスチンの会合をモニターする方法 (ベータアレスチンアッセイ) を用いて検出できる可能性がある。低分子リガンドスクリーニングには受容体の活性化状態を直接モニターできるベータアレスチンアッセイ系がより適していること、また既報により苦味受容体の脱感作においてダイナミンの関与が示されていたことから、まずは苦味受容体に対するベータアレスチンアッセイ系の確立を試みた。しかしながら Salicin-T2R16 のモデル系においてすらリガンド刺激により惹起されるべき活性を検出できなかった。この予想外の結果により、G タンパク質依存性シグナルを検出する系の確立をさらに試すこととなった。T2R16、キメラ G タンパク質である G16/gust44、NFAT-Luciferase レポーターを HEK293T 細胞に一過性に発現させ、Salicin で刺激したところ容量依存性の発光シグナルを検出できた。今後はこのアッセイ系を全ての苦味受容体に適応し低分子代謝産物のスクリーニングを進めていく。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

1. Ikeda Y, Kumagai H, Motozawa Y, Suzuki J, Akazawa H, Komuro I: Understanding vascular diseases: Lessons from premature aging syndromes. *Can J Cardiol.* 32:650-658,2016

2. Zempo H, Suzuki J, Watanabe R, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Komuro I, Isobe M: Cacao polyphenols ameliorate autoimmune myocarditis in mice. *Hypertens Res.* 39:203-209,2016

3. Watanabe R, Suzuki J, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Komuro I, Isobe M: Angiotensin II receptor blocker irbesartan attenuates cardiac dysfunction induced by

myocardial infarction in the presence of renal failure. *Hypertens Res.* 39:237-244,2016

4. Suzuki J, Shimamura M, Suda H, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Isobe M, Komuro I, Morishita R: Current therapies and investigational drugs for peripheral arterial disease. *Hypertens Res.* 39:183-191,2016

5. Izumi M, Ikeda Y, Yamashita H, Asaoka Y, Fujishiro M, Shin M, Abo Y: Safety and effectiveness of endovenous laser ablation combined with ligation for severe saphenous varicose veins in Japanese patients. *Int Heart J.* 57:87-90,2016

6. Ikeda Y, Kumagai H, Motozawa Y, Suzuki J: Growth differentiation factor 15 (GDF15) as a reliable biomarker for cardiovascular risk assessment. *Int Heart J.* 57:1-2,2016

7. Ikeda Y, Kumagai H, Motozawa Y, Suzuki J, Komuro I: Next generation ARBs: going beyond modulation of the renin-angiotensin system. *Int Heart J.* 56:585-586,2015

8. Nakayama A, Morita H, Nakao T, Yamaguchi T, Sumida T, Ikeda Y, Kumagai H, Motozawa Y, Takahashi T, Imaizumi A, Hashimoto T, Nagai R, Komuro I: A food-derived flavonoid luteolin protects against angiotensin II-induced cardiac remodeling. *PLoS One* 10(9): e0137106,2015

9. Ikeda Y, Kumagai H, Motozawa Y, Suzuki J, Komuro I: Biased agonism of the angiotensin II type I receptor: a potential strategy for the treatment of acute heart failure. *Int Heart J.* 56:485-488,2015

10. Motozawa Y, Uozumi H, Maemura S, Nakata R, Yamamoto K, Takizawa M, Kumagai H, Ikeda Y, Komuro I, Ikenouchi H: Acute myocardial infarction that resulted from poor adherence to medical treatment for giant coronary aneurysm: the importance of patient education in the chronic phase of Kawasaki disease. *Int Heart J.* 56:551-554,2015

11. Ikeda Y, Takimoto E, Komuro I:

SH2B1: a new player in the regulation of cardiac hypertrophic response in failing hearts. *Cardiovasc Res.* 107:197-199,2015

12. Ikeda Y, Kumagai H, Okazaki H, Fujishiro M, Motozawa Y, Nomura S, Takeda N, Toko H, Takimoto E, Akazawa H, Morita H, Suzuki J, Yamazaki T, Komuro I, Yanagisawa M: Monitoring β -arrestin recruitment via β -lactamase enzyme fragment complementation: purification of peptide E as a low-affinity ligand for mammalian bombesin receptors. *PLoS One* 10(6): e0127445,2015

13. Kumagai H*, Ikeda Y*, Motozawa Y, Fujishiro M, Okamura T, Fujio K, Okazaki H, Nomura S, Takeda N, Harada M, Toko H, Takimoto E, Akazawa H, Morita H, Suzuki J, Yamazaki T, Yamamoto K, Komuro I, Yanagisawa M: Quantitative measurement of GPCR endocytosis via pulse-chase covalent labeling. *PLoS One* 10(5): e0129394,2015 (co-first author)

14. Ono S, Fujishiro M, Ikeda Y, Komuro I, Koike K: Recent clinical management of anti-thrombotic agents for gastrointestinal endoscopy after revision of guideline in Japan. *Dig Endosc.* 27:649-656,2015

15. Mochizuki S, Ikeda Y, Arai T, Matsuo K: Toward further prevention of bleeding after gastric endoscopic submucosal dissection. *Dig Endosc.* 27:295-297,2015

16. Lee IT, Chang AS, Manandhar M, Shan Y, Fan J, Izumo M, Ikeda Y, Motoike T, Dixon S, Seinfeld JE, Takahashi JS, Yanagisawa M: Neuromedin S-producing neurons act as essential pacemakers in the suprachiasmatic nucleus to couple clock neurons and dictate circadian rhythms. *Neuron* 85:1086-1102,2015

[学会発表](計0件)

〔図書〕(計1件)

Ikeda Y, Akazawa H, Komuro I:
Pathophysiological role of chronic
inflammation in aging-associated
diseases. Chronic inflammation:
Elucidation and Control of the
Mechanisms, Springer Japan. 2016, in
press.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

森田啓行(MORITA, Hiroyuki)
東京大学医学部附属病院・講師
研究者番号：60323573

(2)研究分担者

池田祐一(IKEDA, Yuichi)
東京大学医学部附属病院・特任准教授
研究者番号：10744419

熊谷英敏(KUMAGAI, Hidetoshi)
東京大学医学部附属病院・特任助教
研究者番号：20281008

(3)連携研究者

なし