

令和元年6月13日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04919

研究課題名(和文) 小腸刷子細胞に発現する受容体の生理機能の解明と阻害物質の探索

研究課題名(英文) Physiological function of the receptor expressing intestinal tuft cells and screening of its inhibitors

研究代表者

石丸 喜朗 (Ishimaru, Yoshiro)

明治大学・農学部・専任准教授

研究者番号：10451840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：消化管刷子細胞に発現するオーファン(リガンドが同定されていない)受容体Gprc5cの生体内における機能を解明する目的で、新しいゲノム編集法(TALEN法とCRISPER/Cas9法)を用いて遺伝子欠損マウスを作出し、表現型を解析した。欠損マウスは野生型マウスと比べて低体重を示した。一方、線虫感染実験より、Gprc5c受容体は刷子細胞を介した線虫Nippostrongylus brasiliensisに対する2型免疫応答に関与しないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、アレルギー性疾患やメタボリックシンドロームは解決すべき重要な社会問題になっている。小腸刷子細胞の頂端部に局在するオーファン受容体の生理機能が解明され、この受容体を阻害する食品由来因子などの化合物を見つけることができれば、アレルギー性疾患や肥満・糖尿病の予防や治療に繋げることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the function of the orphan receptor Gprc5c, which is expressed in intestinal tuft cells, in vivo, we generated its knockout mice by new genome editing methods, TALEN and CRISPER/Cas9 and analyzed its phenotypes. KO mice have reduced body weight. Infection experiments showed that Gprc5c may not be involved in type 2 innate immune response against nematode, Nippostrongylus brasiliensis, infection.

研究分野：食品科学

キーワード：受容体 刷子細胞 代謝 免疫 遺伝子破壊マウス 消化管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小腸上皮細胞の約 0.4%を占める刷子細胞の分化制御機構と細胞機能は長い間不明であった。我々は、転写調節因子 *Skn-1a* が、味蕾の甘・苦・うま味細胞だけでなく、小腸刷子細胞への運命決定にも必須であることを明らかにした(Ushima et al., EBioMedicine, 2016)。また、*Skn-1* 欠損マウスでは摂餌量は不変だったが、カテコールアミンの過分泌によって消費エネルギーが増加したために、低体脂肪率を伴う顕著な低体重を示した。以上より、刷子細胞や味細胞を起点とし、脳を介して末梢組織(肝臓・筋肉・脂肪組織など)のエネルギー代謝を制御するという新しい概念を提唱した。さらに、RNA-Seq 法を用いて野生型と *Skn-1* 欠損マウス小腸における遺伝子発現プロファイルを比較解析した結果、刷子細胞頂端部に局在するオーファン受容体 *Gprc5c* を同定した。一方、複数のグループから、刷子細胞が寄生虫に対する 2 型免疫応答に関与することも報告された。

2. 研究の目的

本研究は、小腸刷子細胞の頂端部に局在することを研究代表者自らが発見したオーファン受容体 *Gprc5c* を鍵分子として、「小腸での食シグナルが脳を介して末梢組織のエネルギー代謝を調節する」という腸脳相関による代謝制御ネットワークにおける新たな分子機構を解明することを目的とする。また、最近報告された刷子細胞の 2 型自然免疫における機能とエネルギー代謝との関連を明らかにすることも目指している。具体的には、新しいゲノム編集法である TALEN 法と CRISPER/Cas9 法を用いて *Gprc5c* 受容体の遺伝子欠損マウスを作成して、その生体内における機能を解明し、*Gprc5c* 受容体の機能解析と抗肥満作用が期待されるその阻害物質を同定する。

3. 研究の方法

(1)TALEN 法と CRISPER/Cas9 法を用いた *Gprc5c* 受容体遺伝子欠損マウスの作出

予測プログラムを用いて、エキソン 2 に含まれる開始コドンから 200 塩基の領域から、TALEN や CRISPR/guide RNA を設計するのに適した特異性の高い標的配列を決定した。オフターゲット効果の可能性を排除するために、2 種類の方法で異なる標的配列を用いた。TALEN-*Gprc5c* プラスミドを精製、直鎖化して mRNA の *in vitro* 転写反応を行った後、polyA 配列を付加し、RNA 精製用カラムにより高純度 mRNA フラグメントを精製した。マイクロインジェクション法により TALEN-*Gprc5c* mRNA、あるいは、Cas9 mRNA と *Gprc5c* guide RNA を注入した C57BL/6J マウスの受精卵から、遺伝子欠損マウスのファウンダー候補となる産仔を得て、SURVEYOR ヌクレアーゼを用いてヘテロ二本鎖ミスマッチを検出することにより、遺伝子欠損マウスのファウンダー個体を同定した。これらのファウンダー個体について、標的エキソンのゲノム DNA の塩基配列を解析し、フレームシフトやミスマッチ変異を持つ個体を同定した。これらを C57BL/6J マウスと交配してヘテロ欠損マウスを獲得した。さらに、ヘテロ欠損マウス同士を交配し、得られた同腹仔を表現型解析に供した。

(2)*Gprc5c* 受容体遺伝子欠損マウスの表現型解析

欠損マウスを用いて、エネルギー代謝や 2 型免疫などに関する表現型を解析した。組織学的な表現型解析では、*in situ* hybridization 法や RT-PCR 法などを用いて、各種マーカー分子等の発現を調べた。エネルギー代謝に関する表現型解析では、1) 普通食・高脂肪食摂取条件下における継時的な体重変化の測定 2) 白色脂肪組織や肝臓など各組織の重量測定 3) 摂餌量の測定 4) 代謝測定システムを用いたエネルギー消費量、呼吸商、自発運動量の測定などを行った。2 型免疫に関しては、線虫 *Nippostrongylus brasiliensis* (*Nb*) 感染実験を行った。マウスの後頸部に *Nb* を皮下注射して、9 日後に腸内に残存する匹数を計測した。また、免疫染色法によって刷子細胞の過形成を調べた。

(3)*Gprc5c* 受容体の機能解析

Gprc5c 受容体をキメラ G タンパク質 G16/gust44 などと共に HEK293T 細胞に一過的に発現させ、Flexstation 3 を用いた発光系カルシウムイメージング法でリガンドの同定を試みた。

4. 研究成果

(1)*Gprc5c* 受容体遺伝子欠損マウスの作出と表現型解析

TALEN 法からフレームシフトを生じる 2 塩基欠失ホモ欠損マウス 1 系統と、CRISPER/Cas9 法からフレームシフト変異を持つホモ欠損マウス 2 系統が得られた。離乳後成長期における体重変化を継時的に測定した結果、TALEN 法で作製した欠損マウスは同腹仔の野生型マウスと比較して低体重を示した。一方、CRISPER/Cas9 法で作製した欠損マウスは同腹仔の野生型マウスと比べて有意な体重差はなかった。さらに、様々な方法で表現型解析を行ったが、明確な表現型を示さなかった。

線虫 *Nippostrongylus brasiliensis* (*Nb*) 感染実験では、感染後 9 日後の腸内において、刷子細胞が消失している *Skn-1* 欠損マウスでは既報の通り多数の *Nb* が残存していた。しかし、この欠損マウスでは野生型マウスと同数程度の *Nb* しか検出されなかった。また、線虫感染に伴う刷子細胞数の増加も野生型マウスと同様に観察された。以上より、*Gprc5c* 受容体は刷子細胞を

介した線虫 *Nb* に対する 2 型免疫応答には関与しないことが示唆された。

(2)Gprc5c 受容体の機能解析

発光系を用いた高感度アッセイ系の構築を試みた結果、Gprc5c 受容体は繰り返し凍結融解したグルタミン溶液に対して応答するという予備的な結果が得られた。一方、この応答を阻害する物質の同定には至らなかった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

Ushiana S, Ishimaru Y, Narukawa M, Yoshioka M, Kozuka C, Watanabe N, Tsunoda M, Osakabe N, Asakura T, Masuzaki H, Abe K, Catecholamines facilitate fuel expenditure and protect against obesity via a novel network of the gut-brain axis in transcription factor Skn-1-deficient mice, *EBioMedicine*, 8 巻、査読有、2016、60-71

DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.04.031

Ishimaru Y, Kozuka C, Nakajima K, Sasaki T, Expanding frontiers in weight-control research explored by young investigators, *The Journal of Physiological Sciences*, 67 巻、2016、83-95

DOI: 10.1007/s12576-016-0495-7

Tsutsui K, Otoh M, Sakurai K, Suzuki-Hashido N, Hayakawa T, Misaka T, Ishimaru Y, Aureli, Melin AD, Kawamura S, Imai H, Variation in ligand responses of the bitter taste receptors TAS2R1 and TAS2R4 among New World monkeys, *BMC Evolutionary Biology*, 16 巻、査読有、2016、208

DOI: 10.1186/s12862-016-0783-0

Abe A, Nito C, Sakamoto Y, Nogami A, Hokama H, Takahashi S, Kirita K, Ueda M, Ishimaru Y, Kimura K, Spontaneous bilateral cervical internal carotid and vertebral artery dissection in a Japanese patient without collagen vascular disease with special reference to single-nucleotide polymorphisms. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 25 巻、査読有、2016、e114-e117

DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.04.027

Imai H, Suzuki-Hashido N, Ishimaru Y, Takanobu S, Lijie Y, Wenshi P, Masaji I, Masuda K, Abe K, Misaka T, Hirai H, Amino acid residues of bitter taste receptor TAS2R16 that determine sensitivity in primates to α -glycosides, *Biophysics and Physicobiology*, 13 巻、査読有、2016、165-171

DOI: 10.2142/biophysico.13.0_165

Sharma R, Ishimaru Y, Davison I, Ikegami K, Chien M, You H, Chi Q, Kubota M, Yohda M, Ehlers M, Matsunami H, Olfactory receptor accessory proteins play crucial roles in receptor function and gene choice, *eLife*, 6 巻、査読有、2017、e21895

DOI: 10.7554/eLife.21895

Takuma A, Abe A, Saito Y, Nito C, Ueda M, Ishimaru Y, Harada H, Abe K, Kimura K, Asakura T, Gene expression analysis of the effect of ischemic infarction in whole blood, *International Journal of Molecular Sciences*, 18 巻、査読有、2017、2335

DOI: 10.3390/ijms18112335

Maeda N, Narukawa M, Ishimaru Y, Yamamoto K, Misaka T, Abe K, A large increase of sour taste receptor cells in Skn-1-deficient mice does not alter the number of their sour taste signal-transmitting gustatory neurons, *Neuroscience Letters*, 648 巻、査読有、2017、53-58

DOI: 10.1016/j.neulet.2017.03.046

Toda Y, Nakagita T, Hirokawa T, Yamashita Y, Nakajima A, Narukawa M, Ishimaru Y, Uchida R, Misaka T, Positive/negative allosteric modulation switching in an umami taste receptor (T1R1/T1R3) by a natural flavor compound, methional, *Scientific Reports*, 8 巻、査読有、2018、11796

DOI: 10.1038/s41598-018-30315-x

[学会発表] (計 9 件)

Ishimaru Y, Ushiana S, Narukawa M, Yoshioka M, Kozuka C, Watanabe N, Tsunoda M, Osakabe N, Asakura T, Masuzaki H, Abe K, Catecholamines facilitate fuel expenditure and protect against obesity via a novel network of the gut-brain axis in transcription factor Skn-1-deficient mice, ISOT2016 (国際学会)、2016 年

谷下 道大、成川 真隆、石渡 賢治、吉岡 美紗子、朝倉 富子、嘉糠 洋陸、阿部 啓子、石丸 喜朗、小腸刷子細胞に発現する遺伝子の生体内機能の検証、日本農芸化学会 2017 年度京都大会、2017 年

谷下 道大、成川 真隆、戸田 安香、石渡 賢治、吉岡 美紗子、朝倉 富子、嘉糠 洋陸、益崎 裕章、阿部 啓子、石丸 喜朗、小腸刷子細胞頂端部に局在する受容体の生体内機能の検

証、第71回日本栄養・食糧学会大会、2017年
戸田 安香、石丸 喜朗、霊長類における旨味受容体の機能解析、日本味と匂学会第51回大会、2017年
Ishimaru Y、Intestinal tuft cells: immunity and metabolism、The 16th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (国際学会)、2017年
石丸 喜朗、小腸刷子細胞頂端部に局在する受容体の生体内機能の検証、日本味と匂学会第52回大会、2018年
久保園 峻、戸田 安香、石丸 喜朗、コイ味覚受容体の発現解析、日本農芸化学会 2019年度大会、2019年
戸田 安香、早川 卓志、中北 智哉、河村 正二、今井 啓雄、石丸 喜朗、三坂 巧、霊長類 T1R1/T1R3 におけるグルタミン酸受容能獲得の分子基盤：クモザルに注目した検討、2019年
西原 秀典、戸田 安香、工楽 樹洋、蔵本 多恵、岡部 正隆、石丸 喜朗、脊椎動物における味覚受容体 T1R ファミリーの進化解析、日本進化学会第20回大会、2018年

〔図書〕(計5件)

阿部 啓子、石丸 喜朗、おいしさの科学的評価・測定法と応用展開、シーエムシー出版、2016、212
阿部 啓子、中嶋 康博 他、アグリバイオ、2017年8月臨時増刊号、北隆館、2017、100
石丸 喜朗、味覚と味覚受容体、医歯薬出版、2018、5
戸田 安香、石丸 喜朗、さまざまな脊椎動物における味覚の進化、医歯薬出版、2018、5
石丸 喜朗、アレルギー疾患性疾患や寄生虫感染と刷子細胞、医歯薬出版、2019、5

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：低体重誘導剤のスクリーニング方法、低体重誘導剤、及び低体重モデル動物
発明者：石丸 喜朗、阿部 啓子、朝倉 富子、谷下 道大、田辺 創一
権利者：日清食品ホールディングス株式会社
種類：特許
番号：W0/2018/159817
出願年：2017年
国内外の別：国際

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
https://meiji-agrichem.jp/professor/p_ishimaru/

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。