

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：37109

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00902

研究課題名(和文) 消化管GLP-1産生細胞におけるペプチドセンシング機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of peptide sensing mechanism in gastrointestinal GLP-1 producing cells

研究代表者

日野 真一郎 (Hino, Shinichiro)

中村学園大学・栄養科学部・准教授

研究者番号：00372699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：トウモロコシに含まれる難消化性タンパク質であるZeinのアミノ酸のコンセンサス配列をもとに複数の候補となる合成ペプチドを作成し、NCI-H716 (L細胞)細胞株におけるGLP-1誘導に必要なZeinのアミノ酸領域を明らかにした。ZeinによるL細胞でのGLP-1誘導に、Wntシグナル伝達経路の構成分子である-カテニンの蓄積が関与していた。ZeinによるGLP-1誘導には、細胞外分泌タンパク質Wntとの相互作用またはcAMP/PKA経路の活性化による-カテニンの増加などが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GLP-1は、膵臓の細胞でのインスリンの合成を促進する作用、いわゆるインクレチン作用を持つことで良く知られている。GLP-1の膵臓の細胞への作用は、糖尿病の治療に効果があることが示され、インクレチン関連薬の開発が進んでいる。本研究のような食物由来の機能性ペプチドによる細胞制御の詳細な解析は、機能性ペプチドによる血糖コントロール食材の応用につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Several candidate synthetic peptides were prepared based on the consensus sequence of amino acids of Zein which is an indigestible protein contained in corn. The amino acid site of Zein required for GLP-1 induction in NCI-H716 (L cell) cell line was clarified. Induction of GLP-1 in L cells by Zein involved the accumulation of -catenin, a component of the Wnt signaling pathway. Induction of GLP-1 by Zein was considered to include an increase in -catenin due to interaction with extracellular secretory protein Wnt or activation of cAMP/PKA pathway.

研究分野：分子生物学

キーワード：消化管内分泌細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

摂取した食物を消化・吸収することが消化管の主要な役割であるが、消化酵素の分泌、蠕動運動、糖代謝、食欲などを調節する消化管自身が持つ内分泌系としての機能も重要である。消化管の粘膜上皮には内分泌細胞(基底顆粒細胞)が散在し、管腔内に流入してきた食品成分(栄養素)を感知するセンサーとしての役割を担っている。例えば、胃の幽門前庭に多く分布する G 細胞は、肉汁に含まれる特定のアミノ酸やエタノール(お酒)、pH の高い食物を感知し、血液中にガストリンを放出することで胃底腺での塩酸放出を制御する。胃から直腸まで広く分布する EC 細胞は、血液中にセロトニンを分泌し、粘液分泌や蠕動運動などに関わっている。これらの細胞の他にも、セクレチンやグレリン、コレシストキニンなどを分泌する細胞が存在し、20 種類以上の消化管ホルモンが同定されている。これらの消化管ホルモンの中で、GIP(glucose-dependent insulintropic peptide)は K 細胞で、GLP-1(Glucagon-like peptide-1)は L 細胞において産生され分泌される。K 細胞と L 細胞は消化管上皮の基底膜上に存在し、細胞頂部の微絨毛冠は消化管の管腔側に達している。この構造が食事由来の刺激を感知することで、GIP と GLP-1 が各細胞から血中に分泌され、膵臓のβ細胞でのインスリンの合成を促進する。GIP を分泌する K 細胞は、腸の入口である十二指腸や小腸上部に分布していることから、食物中のグルコースや脂肪酸をすばやく感知し、インスリン分泌を促進している。一方、GLP-1 を分泌する L 細胞は、小腸下部から大腸に多く分布していることから、脂肪酸やグルコースが主たる分泌刺激因子ではない可能性が考えられる。タンパク質の消化の過程で出来るペプチドが体内に吸収されずに機能を発揮することが明らかとなり、「機能性ペプチド」として近年注目されている。興味深いことに、難消化性のタンパク質であるトウモロコシの加水分解物 ZeinH が L 細胞に作用して、GLP-1 の分泌を促進することが明らかとなった(Hira T, Hara H, et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2009)。すなわち、食品成分中の機能性ペプチドが血糖をコントロールできることを示唆している。

2. 研究の目的

消化管の粘膜上皮には内分泌細胞(L 細胞など)が散在し、管腔内に流入してきた食品成分(栄養素)を感知することで、様々なホルモンを血液中に分泌する。インスリンの合成促進作用、いわゆるインクレチン作用を持つ GLP-1(Glucagon-like peptide-1)は、L 細胞から分泌される。この L 細胞が消化の過程で生じたペプチドを感知していることが明らかとなった。本研究では、GLP-1 分泌 L 細胞が、どのように食品成分中の機能性ペプチドを感知するかの分子メカニズムの解明を目指す。L 細胞内の GLP-1 分泌までのシグナル伝達経路を明らかにし、食物由来の新規機能性成分の探索も試みる。

3. 研究の方法

【Zein 内の機能性領域の同定】

RPMI-1640 培地 + 10% Fetal Bovine Serum (FBS)で NCI-H716 (L 細胞)を培養した。Zein (wako, 264-01281)。合成ペプチド 1 (PYLPSIIASVCENPTLQPYRL、純度 93.39%)、合成ペプチド 2 (LQQQLLPFSQLATAYSQQQFLPFNQL、純度 82.76%)、合成ペプチド 3 (YQQFAANPATLLQLQQLTFVQLAL、純度 95.1%) (ペプチド 1, 2, 3 は北海道システム・サイエンスにて合成)。それぞれのペプチドを 10 mg/ml(50%EtOH)の濃度で溶解し、最終濃度 200 µg/ml にて 37 °C、1 h 細胞を刺激した。QIAGEN 社 RNeasy Mini kit を用いて totalRNA を精製し、M-MLV 逆転写酵素にて cDNA を合成した。SYBR premix Ex Taq™ 6.5 µl、10

μM sense primer 0.5 μl、10 μM antisense primer 0.5 μl、滅菌水 4.5 μl を添加し 12 μl とした (表 1)。TaKaRa PCR Thermal Cycle Dice を用いて、GLP-1 遺伝子をコードする pre-proglucagon の mRNA の変化を Real-timePCR 法にて解析し、β-actin の mRNA 量を内部標準として用いた。

		プライマー
pre-proglucagon	Forward	5'-CAG ATC ATT CTC AGC TTC CCA GGC AGA C-3'
	Reverse	5'-CCA TCA GCA TGT CTG CGG CCA AGT TC-3'
-actin	Forward	5'-CTG GAC TTC GAG CAA GAG AT-3'
	Reverse	5'-GAG GTA GTA CTT CAC ACT GC-3'

表1 プライマーシーケンス

【GLP-1 誘導における新規機能性成分の探索】

5,7,3',4'-テトラメトキシフラボン、7,8,3',4'-テトラメトキシフラボン、タンゲレチン、ノビレチン、ヘプタメトキシフラボン 30 μM、48~72h、EPA と DHA は 100 μM、2h、12h、24h 添加した。QIAGEN 社 RNeasy Mini kit を用いて totalRNA を精製し、M-MLV 逆転写酵素にて cDNA を合成した。GLP-1 遺伝子をコードする pre-proglucagon の mRNA の変化を半定量 PCR 法にて解析した。PCR 反応は、Paq-5000DNA ポリメラーゼを用いて pre-proglucagon 21 サイクル、β-actin 19 サイクルにて行った。

【Zein による細胞内シグナル伝達経路の解明】

RPMI-1640 培地+10 % Fetal Bovine Serum(FBS)で NCI-H716(L 細胞)を培養した。Zein (wako)を 10 mg/ml (50 %EtOH) の濃度で溶解し、最終濃度 200 μg/ml にて 37 °C、1 h 細胞を刺激した。刺激した細胞から抽出液を調整し、Phospho- p 38MAPK(mitogen-activated protein kinases),(Cell signaling 社)、Phospho-ERK1(extracellular-signal-regulated kinase1/2)(ThermoFisher 社)、β-カテニン(NOVUS BIOLOGICAL 社)、β-アクチン(wako)抗体を用いてウエスタンブロットによりタンパク質を検出した。mRNA の発現解析では、GSK-3β阻害剤(CHIR99021)10 μM にて 37 °C、1 h 細胞を刺激し、RNA 抽出後に、M-MLV 逆転写酵素にて cDNA を合成した。SYBR premix Ex Taq™ 6.5 μl、10 μM sense primer 0.5 μl、10 μM antisense primer 0.5 μl、滅菌水 4.5 μl を添加し 12 μl とした。TaKaRa PCR Thermal Cycle Dice を用いて、GLP-1 遺伝子をコードする pre-proglucagon の mRNA の変化を Real-timePCR 法にて解析し、β-アクチンの mRNA 量を内部標準として用いた。

4 . 研究成果

ヒト大腸由来の GLP-1 産生細胞株 NCI-H716 においても、コントロール(エタノール)と比較し、Zein により GLP-1 の発現が誘導された。合成ペプチドを用いた場合、ペプチド 1 及びペプチド 3 は Zein 同様に pre-proglucagon の mRNA の発現を強く誘導した(図 1)。本研究により、トウモロコシ難消化性 Zein ペプチドはヒト培養細胞である L 細胞に作用し、GLP-1 の発現を促進することが明らかとなった。今回の結果では、ペプチド 1 とペプチド 3 が強い GLP-1 発現促進能を有していたが、これらのペプチド間に共通のアミノ酸シーケンスは認められなかった。今回用いたペプチドが消化され細胞内に吸収される可能性は極めて低いことから、ペプチドを認識する受容体の存在が強く示唆された。今後はペプチド受容体を同定するとともにどのようなメカニズムにより細胞内にシグナルが伝達され、GLP-1 の発現を促進するかを明らかにする必要がある。

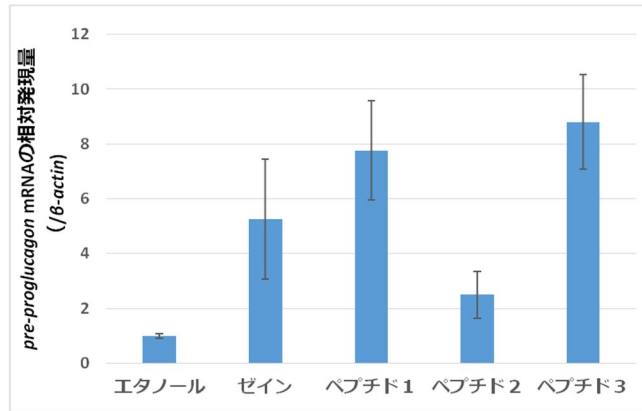


図1 *pre-proglucagon* mRNA の発現量

各ポリメトキシフラボンを用いて様々なタイムコースにて解析したが、*pre-proglucagon* の mRNA を強く誘導する因子を同定できなかった (図2)。グルコース(-)培地、血清(-)で3h前処理においても *pre-proglucagon* の発現量に大きな違いは見られなかった。GLP-1 を強く誘導する因子の探索のために半定量 PCR 法を用いて解析した。ポリメトキシフラボンのみならず、種々のフラボノイド等による GLP-1 誘導成分の同定を現在も継続中である。Real-time PCR 法を用いて発現変動を正確に検出するとともに ELISA 法等を用いた GLP-1 のたんぱく質量の測定を継続行っている。

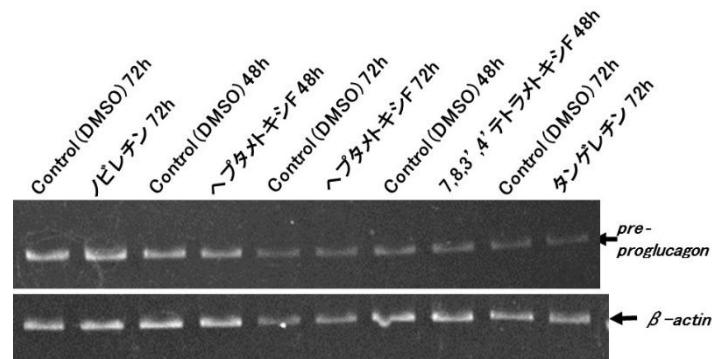


図2 フラボノイドによる *pre-proglucagon* mRNA の発現変化

L 細胞における肉加水分解産物への応答の場合、ERK1/2 と p38MAPK の活性化が報告されているが、Zein 添加ではこれらの活性化は認められなかった(図3)。一方、Wnt シグナル構成分子である β -カテニンのタンパク質量がコントロールに比べ著明に増加した(図4)。また、ヒトL細胞において GSK-3 β 阻害剤により、 β -カテニンの蓄積を引き起こすと、GLP-1 産生の指標である *pre-proglucagon* の mRNA の発現が強く誘導された(図5)。本研究により、トウモロコシ難消化性 Zein ペプチドはヒト大腸由来の L 細胞に作用し、細胞内の β -カテニンの量を増加させることが明らかになった。L 細胞において、 β -カテニンの蓄積を介して GLP-1 の発現を誘導していると考えられる。Zein による β -カテニンを増加させる機序は不明であるが、細胞外分泌タンパク質 Wnt との相互作用、cAMP/PKA 経路の活性化による β -カテニンの増加、未知の受容体への作用などが考えられ、現在もさらに解析を行っている。

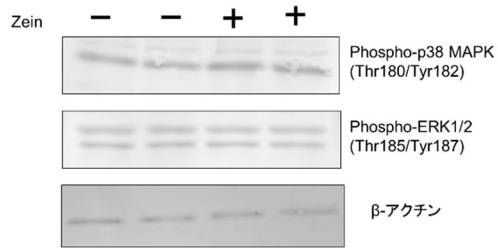


図3 Zein 処理による p38、ERK1/2 活性に及ぼす影響

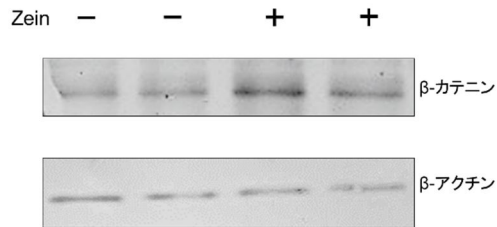


図4 Zein 処理によるβ-カテニンの蓄積

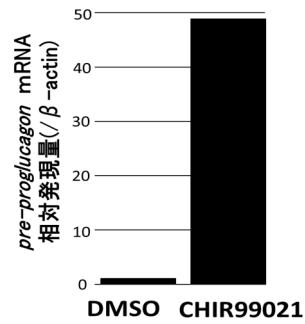


図5 GSK-3β阻害による GLP-1 誘導

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Phyu Synn Oo, Yuya Yamaguchi, Akira Sawaguchi, Myat Tin Htwe Kyaw, Narantsog Choijookhuu, Mohmand Noor Ali, Naparee Srisowanna, Shin-ichiro Hino, Yoshitaka Hishikawa.	4. 巻 51 (1)
2. 論文標題 Estrogen Regulates Mitochondrial Morphology through Phosphorylation of Dynamin-related Protein 1 in MCF7 Human Breast Cancer Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Histochem. Cytochem	6. 最初と最後の頁 21-31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1267/ahc.17034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 日野真一郎
2. 発表標題 フラボノイドによるミトコンドリアの形態におよぼす効果
3. 学会等名 第59回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日野真一郎、溝田知香
2. 発表標題 ヒト大腸がん細胞HCT-116におよぼすポリメトキシフラボンの効果
3. 学会等名 第60回日本顕微鏡学 九州支部集会・学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日野真一郎
2. 発表標題 ヒト大腸がん細胞のミトコンドリア形態に及ぼすポリメトキシフラボンの効果
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 溝田知香、日野真一郎
2. 発表標題 Wnt/ -カテニン経路に及ぼすポリメトキシフラボンの効果
3. 学会等名 第59回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Phyu Synn Oo, Yuya Yamaguchi, Akira Swaguchi, Myat Tin Htwe Kyaw, Narantsog Choijookhuu, Mohmand Noor Ali, Naparee Srisowanna, Shin-ichiro Hino, Yoshitaka Hishikawa.
2. 発表標題 A role of estrogen and estrogen receptor in mitochondrial morphology through phosphorylation of Dynamin-related protein 1 in human breast cancer cells
3. 学会等名 第59回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 溝田知香、日野真一郎
2. 発表標題 ポリメトキシフラボンによるWnt/ -カテニン経路依存性大腸がんの抑制機序解明
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Phyu Synn Oo, Yuya Yamaguchi, Myat Tin Htwe Kyaw, Narantsog Choijookhuu, Mohmand Noor Ali, Naparee Srisowanna, Shin-ichiro Hino, Yoshitaka Hishikawa
2. 発表標題 Estrogen accelerates phosphorylation of Dynamin-related protein 1(Drp1) through estrogen receptor in MCF7
3. 学会等名 第58回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 溝田知香、日野真一郎
2. 発表標題 ポリメトキシフラボンによるWnt/ β -カテニン経路の制御
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日野 真一郎、溝田知香
2. 発表標題 細胞運動能におよぼすフラボノイドの効果
3. 学会等名 日本解剖学会第75回九州支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 日野 真一郎、溝田知香
2. 発表標題 GLP-1産生消化管上皮細胞のペプチドセンシング機構の解明
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 溝田知香、日野真一郎
2. 発表標題 大腸がん細胞におけるポリメトキシフラボンの細胞運動・浸潤能への作用機序解明
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	溝田 知香 (Mizota Chika) (80783125)	中村学園大学・栄養科学部・助手 (37109)	